

Imię i nazwisko autora rozprawy: Zuzanna Koziara
Dyscyplina naukowa: Nauki Chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Ocena wpływu pokarmowych kwasów nukleinowych i ich komponentów na replikacyjną i naprawczą syntezę DNA w modelach komórek ludzkiego układu pokarmowego

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Evaluation of the influence of dietary nucleic acids and their components on replicative and repair DNA synthesis in cellular models of human digestive system

Promotor

podpis

Prof. dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska

Gdańsk, 2023



OŚWIADCZENIE

Autor rozprawy doktorskiej: Zuzanna Koziara

Ja, niżej podpisany(a), oświadczam, iż jestem świadomy(a), że zgodnie z przepisem art. 27 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (t.j. Dz.U. z 2021 poz. 1062), uczelnia może korzystać z mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej:

„Ocena wpływu pokarmowych kwasów nukleinowych i ich komponentów na replikacyjną i naprawczą syntezę DNA w modelach komórek ludzkiego układu pokarmowego”

do prowadzenia badań naukowych lub w celach dydaktycznych.¹

Świadomy(a) odpowiedzialności karnej z tytułu naruszenia przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych i konsekwencji dyscyplinarnych określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2021.478 t.j.), a także odpowiedzialności cywilno-prawnej oświadczam, że przedkładana rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie.

Oświadczam, że treść rozprawy opracowana została na podstawie wyników badań prowadzonych pod kierunkiem i w ścisłej współpracy z promotorem prof. dr hab. inż. Agnieszką Bartoszek-Pączkowską

Niniejsza rozprawa doktorska nie była wcześniej podstawą żadnej innej urzędowej procedury związanej z nadaniem stopnia doktora.

Wszystkie informacje umieszczone w ww. rozprawie uzyskane ze źródeł pisanych i elektronicznych, zostały udokumentowane w wykazie literatury odpowiednimi odnośnikami, zgodnie z przepisem art. 34 ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych.

Potwierdzam zgodność niniejszej wersji pracy doktorskiej z załączoną wersją elektroniczną.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

Ja, niżej podpisany(a), wyrażam zgodę/~~nie wyrażam zgody*~~ na umieszczenie ww. rozprawy doktorskiej w wersji elektronicznej w otwartym, cyfrowym repozytorium instytucjonalnym Politechniki Gdańskiej.

Gdańsk, dnia

.....
podpis doktoranta

**niepotrzebne usunąć*

¹ Art. 27. 1. Instytucje oświatowe oraz podmioty, o których mowa w art. 7 ust. 1 pkt 1, 2 i 4–8 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, mogą na potrzeby zilustrowania treści przekazywanych w celach dydaktycznych lub w celu prowadzenia działalności naukowej korzystać z rozpowszechnionych utworów w oryginale i w tłumaczeniu oraz zwielokrotniać w tym celu rozpowszechnione drobne utwory lub fragmenty większych utworów.

2. W przypadku publicznego udostępniania utworów w taki sposób, aby każdy mógł mieć do nich dostęp w miejscu i czasie przez siebie wybranym korzystanie, o którym mowa w ust. 1, jest dozwolone wyłącznie dla ograniczonego kręgu osób uczących się, nauczających lub prowadzących badania naukowe, zidentyfikowanych przez podmioty wymienione w ust. 1.



*Serdeczne podziękowania składam Pani Promotor mojej pracy,
prof. Agnieszce Bartoszek, która dzięki swojej wiedzy i determinacji w zgłębianiu
niezbadanych obszarów nauki umożliwiła mi ukończenie tej trudnej,
lecz niezwykle rozwijającej i satysfakcjonującej drogi.*

*Szczególne podziękowania kieruję do Moniki Kuczyńskiej oraz Patrycji Jakubek,
które dzieliły się ze mną swoją wiedzą i doświadczeniem,
a także towarzyszyły we wszystkich wznosach i upadkach nie pozwalając,
abym poddała się w chwilach zwątpienia.*

*Chciałabym również podziękować Klaudii Suliborskiej, Karolowi Parchemowi,
Annie Kościelak oraz Marice Mróz za niezwykle atmosferę i wsparcie, jakie przez te
wszystkie lata otrzymywałam.*

A przede wszystkim dziękuję moim Rodzicom, że nigdy we mnie nie zwątpili.





OPIS ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Autor rozprawy doktorskiej: Zuzanna Koziara

Tytuł rozprawy doktorskiej w języku polskim: Ocena wpływu pokarmowych kwasów nukleinowych i ich komponentów na replikacyjną i naprawczą syntezę DNA w modelach komórek ludzkiego układu pokarmowego

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Evaluation of the influence of dietary nucleic acids and their components on replicative and repair DNA synthesis in cellular models of human digestive system

Język rozprawy doktorskiej: polski

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. inż. Agnieszka Bartoszek-Pączkowska

Data obrony:

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku polskim: pokarmowe kwasy nukleinowe, synteza naprawcza DNA, synteza replikacyjna DNA

Słowa kluczowe rozprawy doktorskiej w języku angielskim: dietary nucleic acids, repair DNA synthesis, replicative DNA synthesis

STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU POLSKIM

Kwasy nukleinowe, do których należą DNA i RNA, są podstawowymi elementami każdej komórki niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Pomimo, że cząsteczki te stanowią również nieodłączne składniki produktów żywnościowych spożywanych przez człowieka, to badania na temat ich zawartości w żywności oraz wartości odżywczej są ograniczone.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej pokazały istotne różnice w ilości, wielkości i rozmieszczeniu jąder komórkowych, a także stopniu fragmentacji DNA w produktach żywnościowych. Wyizolowane z badanych produktów kwasy nukleinowe oraz pojedyncze nukleozydy miały wpływ na pobudzenie wzrostu komórek ludzkiego układu pokarmowego w obecności inhibitora syntezy replikacyjnej DNA, czego nie zaobserwowano w warunkach niezaburzonego procesu syntezy. Dodatek badanych związków nie wpłynął na zmniejszenie fragmentacji DNA komórek HT29 wywołanej H_2O_2 w obecności kofeiny. Uzyskane wyniki potwierdziły, że komórki układu pokarmowego są w stanie korzystać z egzogennych, pochodzących z żywności kwasów nukleinowych oraz ich prekursorów, tym samym wskazując na celowość uznania ich za odżywczy składnik żywności.

STRESZCZENIE ROZPRAWY W JEZYKU ANGIELSKIM

Nucleic acids, which embrace DNA and RNA, are the basic components of every cell necessary for the proper functioning of the body. Although they are also inseparable molecules found in food products consumed by humans, research on their content and nutritional value is limited.

The results obtained in this doctoral dissertation revealed significant differences in the number, size and arrangement of cell nuclei, as well as the degree of DNA fragmentation in food products. Nucleic acids isolated from the tested food products and isolated nucleosides showed the stimulatory effect on the growth of human digestive system cells in the presence of a DNA replication synthesis inhibitor, which was not observed in the conditions of the undisturbed DNA synthesis. In HT29 cells, the addition of the tested compounds did not decrease DNA fragmentation induced by H₂O₂ addition in the presence of caffeine. The obtained results confirmed that the cells of the digestive system are able to utilize exogenous food-derived nucleic acids and their precursors, thereby the appropriateness of considering them as nutrients.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU POLSKIM.....	8
STRESZCZENIE ROZPRAWY W JĘZYKU ANGIELSKIM	9
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	12
1. WSTĘP.....	14
1.1. Ogólna charakterystyka kwasów nukleinowych.....	14
1.1.1. Budowa kwasów nukleinowych.....	14
1.1.2. Budowa i rodzaje RNA.....	16
1.2. Kwasy nukleinowe jako składniki żywności	18
1.2.1. Zawartość kwasów nukleinowych w produktach żywnościowych.....	18
1.2.2. Trawienie, absorpcja i metabolizm kwasów nukleinowych.....	23
1.2.3. Żywieniowa rola kwasów nukleinowych i ich pochodnych	28
1.2.4. Żywieniowa rola cząsteczek miRNA	36
2. CEL I ZAKRES PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	44
3.1. Materiał badawczy.....	44
3.2. Odczynniki chemiczne	44
3.3. Aparatura	47
3.4. Metody badawcze - część analityczna.....	48
3.4.1. Przygotowanie bloczków parafinowych i preparatów mikroskopowych.....	48
a. Tkanki zwierzęce.....	48
b. Tkanki roślinne i grzyby.....	49
3.4.2. Przygotowanie preparatów mrożonych.....	50
3.4.3. Barwienie i obserwacja preparatów mikroskopowych.....	51
3.4.4. Określenie stopnia degradacji kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych	52
a. Tkanki zwierzęce.....	52
b. Tkanki roślinne i grzyby	54
3.4.5. Izolacja DNA z wybranych produktów żywnościowych	54
3.4.6. Oznaczenie zawartości suchej masy dla wybranych produktów żywnościowych....	57
3.4.7. Elektroforeza agarozowa wyizolowanych kwasów nukleinowych.....	57
3.5. Metody badawcze - część biologiczna	58
3.5.1. Prowadzenie hodowli komórkowej.....	58
3.5.2. Oznaczanie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek ludzkiego układu pokarmowego	58
3.5.3. Oznaczanie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek HT29 i HepG2 z zaburzoną syntezą replikacyjną DNA.....	60
3.5.4. Oznaczanie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na zdolność naprawy DNA komórek HT29 z zaburzoną syntezą naprawczą DNA	62

3.6. Analiza statystyczna	63
4. WYNIKI	64
4.1. Wizualizacja kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych	67
4.2. Ocena stopnia fragmentacji kwasów nukleinowych izolowanych z produktów żywnościowych z wykorzystaniem testu kometowego	78
4.3. Zawartość suchej masy w badanych produktach żywnościowych	83
4.4. Porównanie wydajności izolacji DNA z produktów żywnościowych wybranymi metodami	83
4.5. Ocena stopnia fragmentacji kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych z wykorzystaniem elektroforezy agarozowej	85
4.6. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek ludzkiego układu pokarmowego	88
4.7. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek HT29 i HepG2 z zaburzoną syntezą replikacyjną DNA	101
4.8. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na zdolność naprawy DNA komórek HT29 z zaburzoną syntezą naprawczą DNA	114
5. PODSUMOWANIE	120
WYKAZ LITERATURY	124
DOROBEK NAUKOWY	139

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

³ H-TdR	-	³ H-tymidyna
5-FU	-	5-fluorouracyl
A	-	adenozyna
ATM	-	kinaza <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	-	adenozyno-5'-trifosforan
ATR	-	kinaza <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BrUrd	-	5-bromourydyna
C	-	cytydyna
cfDNA	-	wolne, pozakomórkowe cząsteczki DNA (<i>cell-free DNA</i>)
CoA	-	koenzym A
CTAB	-	bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
dA	-	2'-deoksyadenozyna
dC	-	2'-deoksytydyna
dG	-	2'-deoksyguanozyna
DMSO	-	dimetylosulfotlenek
DNA	-	kwasy deoksyrybonukleinowe
dsRNA	-	dwuniciowe cząsteczki RNA (<i>double stranded RNA</i>)
EFSA	-	<i>European Food Safety Authority</i>
FAD	-	dinukleotyd flawinoadeninowy, forma utleniona
G	-	guanozyna
hCNTs	-	<i>human Concentrative Nucleoside Transporters</i>
hENTs	-	<i>human Equilibrative Nucleoside Transporters</i>
HU	-	hydroksymocznik
IAP	-	jelitowa fosfataza alkaliczna (<i>intestinal alkaline phosphatase</i>)
IUGR	-	<i>intrauterine growth restriction</i>
miRNA	-	mikroRNA
mTORC1	-	<i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
MTT	-	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazolu
NAD ⁺	-	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma utleniona
ncRNA	-	niekodujące cząsteczki RNA (<i>non-coding RNA</i>)

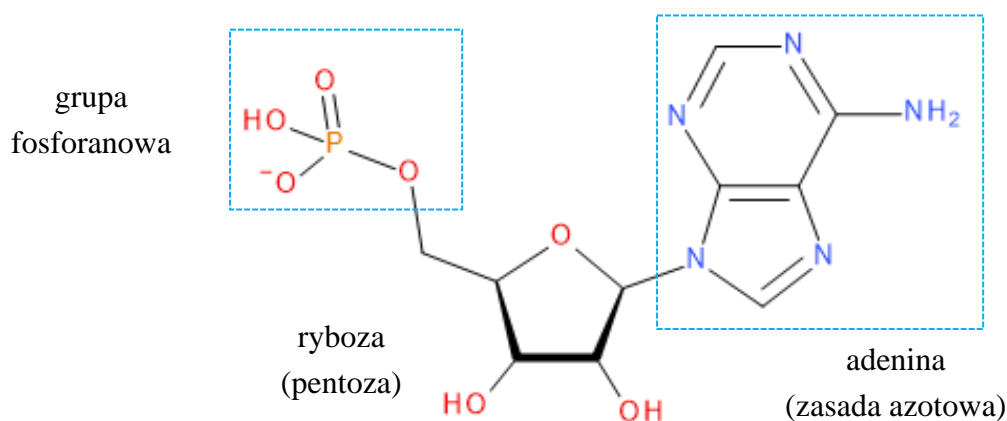
NER	-	naprawa DNA poprzez wycięcie nukleotydu (<i>nucleotide excision repair</i>)
NK	-	<i>natural killer</i> (komórki układu odpornościowego)
PCR	-	reakcja łańcuchowa polimerazy (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	-	kwasy rybonukleinowe
RNR	-	reduktaza rybonukleotydowa
SDS	-	siarczan dodecyłu sodu
SIDT1	-	<i>systemic RNA interference defective protein 1</i>
SNAs	-	sferyczne kwasy nukleinowe (<i>spherical nucleic acids</i>)
T	-	tymidyna
TMP	-	tymidyno-5'-monofosforan
TLR9	-	<i>Toll like receptor 9</i>
U	-	urydyna
UDS	-	<i>unscheduled DNA synthesis</i>

1. WSTĘP

1.1. Ogólna charakterystyka kwasów nukleinowych

1.1.1. Budowa kwasów nukleinowych

Podstawową jednostką strukturalną kwasów nukleinowych są nukleotydy. Składają się one z heterocyklicznej zasady azotowej, cukru pentozy oraz grupy fosforanowej (rys. 1.). Zależnie od rodzaju reszty cukrowej wyróżnia się kwas rybonukleinowy – RNA, który posiada w swojej strukturze cukier rybozę oraz kwas deoksyrybonukleinowy – DNA, zawierający 2-deoksyrybozę. Do zasad azotowych należą puryny: adenina i guanina, które łączą się z resztą cukrową wiązaniem N-glikozydowym pomiędzy atomami N-9 puryny i C-1' pentozy oraz pirymidyny: cytozyna, tymina (występująca tylko w DNA) i uracyl (występujący tylko w RNA), łączące się z resztą cukrową wiązaniem N-glikozydowym pomiędzy atomem N-1 pirymidyny i C-1' pentozy. Częsteczka składająca się z zasady azotowej oraz związanej z nią reszty cukrowej nazywana jest nukleozydem. Każdy nukleozyd tworzy nukleotyd łącząc się wiązaniem estrowym poprzez C-5'-OH pentozy z jedną grupą fosforanową. W łańcuchu polinukleotydowym pojedyncze nukleotydy połączone są ze sobą wiązaniem 3'-5' fosfodiastrowym, a łańcuch umownie zorientowany jest od końca 5', posiadającego wolną grupę fosforanową, w kierunku końca 3', z wolną grupą hydroksylową (Blakley, 1998).



Rys 1. Podstawowe jednostki budujące nukleotyd na przykładzie adenozy-5'-monofosforanu.

DNA charakteryzuje się uporządkowaną, trójwymiarową strukturą, która determinowana jest przez stereochemię łańcucha polinukleotydowego, wysoki

ładunek ujemny wynikający z występowania powtarzających się grup fosforanowych oraz wiązania wodorowe między zasadami azotowymi. Ostatnie badania dotyczące struktury DNA wskazują ponadto na istotność oddziaływań hydrofobowych we wnętrzu podwójnej helisy, które odgrywają główną rolę w stabilizacji jej struktury w środowisku wodnym (Feng i in., 2019). Wiązania wodorowe tworzą się pomiędzy adeniną i tyminą (dwa wiązania) oraz guaniną i cytozyną (trzy wiązania) dwóch antyrównoległych nici. Wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe prowadzą do utworzenia podwójnej helisy, w której płaszczyzny par zasad są prostopadłe do osi helisy, a odległość pomiędzy sąsiednimi parami wzdłuż osi wynosi $3,4 \text{ \AA}$ (0,34 nm). Skok helisy to 10 kolejnych par zasad (lub 34 \AA), a na powierzchni jej struktury wyróżnić można tzw. mały i duży rowek. Wiele białek oddziałuje z DNA, a większość interakcji występuje pomiędzy grupami fosforanowymi skierowanymi na zewnątrz helisy oraz zasadami azotowymi znajdującymi się w dużym rowku ze względu na ich większą dostępność. Opisana powyżej struktura DNA określana jest jako forma B i uważana za podstawową, najpowszechniej występującą formę tego kwasu nukleinowego. Poza nią wyróżnić można także formę A, która występuje w warunkach niższej zawartości wody i cechuje się liczbą 11 par zasad przypadających na skok helisy. Forma Z natomiast jest lewoskrętna (w przeciwieństwie do prawoskrętnej helisy B-DNA i A-DNA) i charakteryzuje się występowaniem 12 par zasad na skok helisy. Łańcuchy polinukleotydowe DNA mogą również tworzyć bardziej złożone struktury trój- i czteroniciowe (Zubay, 1998a).

DNA znajdujący się w jądrze komórki eukariotycznej zorganizowany jest w chromosomy, w których występuje w ściśle upakowanej formie zwanej chromatyną. Stanowi ona kompleks nici kwasu nukleinowego z białkami histonowymi. Fragment obejmujący 147 par zasad owiniętych na czterech rodzajach białek histonowych (po dwa białka z każdego rodzaju – H2a, H2b, H3, H4) tworzy oktamer stanowiący rdzeń nukleosomu, który od kolejnego nukleosomu oddzielony jest 10-90 parami zasad i dodatkowymi białkami histonowymi (histony H1 i/lub H5). Organizacja genomowego DNA w strukturę chromatyny odgrywa kluczową rolę w regulacji transkrypcji genów i w innych procesach biologicznych z udziałem

DNA, takich jak replikacja, naprawa i rekombinacja kwasu deoksyrybonukleinowego (Zubay, 1998a; Li i Zhu, 2015).

Za regulację ekspresji genów odpowiedzialne są również mechanizmy epigenetyczne, które nie ingerują w sekwencję nukleotydową zapisaną w DNA. Obejmują one metylację zasad azotowych w łańcuchu polinukleotydowym oraz modyfikacje białek histonowych. Metylacja DNA to bezpośrednia, chemiczna modyfikacja zasady azotowej, polegająca na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej $-CH_3$ do węgla C-5 cytozyny. Reakcja ta katalizowana jest przez klasę enzymów znanych jako metylotransferazy DNA. Modyfikacja histonów może natomiast odbywać się poprzez acetylację, metylację, ubikwitynację lub fosforylację reszt aminokwasowych, głównie lizyny. Zmiany te są odwracalne i prowadzą do wyciszenia lub aktywacji regulowanych genów (Sweatt i in., 2013).

1.1.2. Budowa i rodzaje RNA

Do trzech podstawowych, a dokładnie najwcześniej poznanych rodzajów RNA należą:

- mRNA (*messenger RNA* - RNA informacyjny),
- rRNA (*ribosomal RNA* – RNA rybosomalny),
- tRNA (*transfer RNA* – RNA transportujący).

Każdy z nich odgrywa istotną rolę w syntezie białek. Powstający na matrycy DNA w wyniku procesu transkrypcji mRNA niesie informację o sekwencji aminokwasów w syntetyzowanym białku. Za przyłączanie aminokwasów zgodnie z kolejnością zapisaną na mRNA odpowiedzialny jest tRNA. Ze względu na swoją funkcję, tRNA posiada dwie charakterystyczne trójnukleotydowe sekwencje: miejsce wiązania aminokwasu, który przyłączany jest do końca 3' łańcucha kwasu rybonukleinowego oraz antykodon, czyli sekwencję komplementarną do specyficznego, składającego się z trzech par zasad kodonu, znajdującego się na nici mRNA. Natomiast rRNA występuje w kompleksie z białkami tworząc rybosom, który jest miejscem spotkania mRNA oraz tRNA w procesie biosyntezy białek (Zubay, 1998b). Pomimo, że RNA jest cząsteczką jednoniciową, może tworzyć struktury drugo- i trzeciorzędowe. Krótkie odcinki dwuniciowe i helisy umożliwiają utworzenie różnego rodzaju pętli. Wynikają one z oddziaływań pomiędzy komplementarnymi parami zasad

w łańcuchu i mogą się tworzyć w obrębie jednej nici lub między dwoma różnymi cząsteczkami RNA. Na trzeciorzędową strukturę kwasu rybonukleinowego mają wpływ takie czynniki jak występowanie odcinków dwuniciowych, wiązania wodorowe pomiędzy zasadami azotowymi i regionami szkieletowymi łańcucha, a także interakcje z jonami i innymi cząsteczkami takimi jak np. białka (Brooker, 2005).

Oprócz opisanych cząsteczek kwasów rybonukleinowych bezpośrednio związanych z syntezą białek, poza tRNA oraz rRNA wyróżnić można wiele tzw. niekodujących RNA. Poniżej wspomniane są najlepiej poznane z nich. Mały jądrowy RNA, czyli snRNA, zaangażowany jest w proces splicingu mRNA, czyli potranskrypcyjnego wycinania intronów i łączenia egzonów w celu utworzenia dojrzałego mRNA, będącego matrycą do syntezy białek podczas translacji. Wszystkie opisane rodzaje kwasu rybonukleinowego są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórki. Znaczna część z nich może także zawierać różne modyfikacje chemiczne, za których wprowadzanie odpowiedzialne są małe jąderkowe RNA, czyli snoRNA. Do aktywnie badanych obecnie, małych cząsteczek RNA o długości do 200 nukleotydów, które pełnią funkcje regulatorowe, należą także miRNA (mikro RNA), piRNA (piwi RNA) oraz siRNA (mały interferujący RNA). Pierwsze z nich, czyli miRNA, bezpośrednio oddziałują z częściowo lub w pełni komplementarnymi do nich regionami mRNA hamując ich wykorzystanie w biosyntezie białek. Cząsteczki te odgrywają istotną rolę podczas różnicowania i rozwoju oraz zaangażowane są w utrzymanie homeostazy komórkowej. Ponadto ostatnie badania sugerują, że miRNA mogą być powiązane z rozwojem wielu chorób, w tym różnych rodzajów nowotworów. W przeciwieństwie do miRNA, piRNA u ssaków odgrywają rolę głównie w rozwoju zarodkowym, gdzie regulują ekspresję regionów repetytywnych i ulegających transpozycji w celu zapewnienia stabilności genomu. Z kolei siRNA przyczyniają się do utrzymania stabilności genomowej w żeńskich liniach zarodkowych. Ostatnie badania wskazują, że podczas gdy ok. 2/3 genomu ssaków jest aktywnie transkrybowane, tylko ok. 1,9% koduje białka. Znaczna część tej aktywności transkrypcyjnej reprezentowana jest przez inną klasę regulatorowych, niekodujących cząsteczek RNA – lncRNA (długie

niekodujące RNA). Charakteryzują się one długością co najmniej 200 nukleotydów, często posiadają ogony poli-A i mogą ulegać procesowi splicingu, podobnie jak mRNA. Chociaż funkcja wielu z lncRNA nie jest jeszcze poznana, wykazano, że mogą one odgrywać kluczową rolę w wielu procesach biologicznych takich jak kontrola epigenetyczna ekspresji genów, regulacja specyficzna dla promotora, inaktywacja chromosomu X czy utrzymywanie architektury jądra (Hombach i Kretz, 2016).

1.2. Kwasy nukleinowe jako składniki żywności

1.2.1. Zawartość kwasów nukleinowych w produktach żywnościowych

Kwasy nukleinowe są podstawowymi składnikami organizmów żywych i w związku z tym występują również w produktach żywnościowych. Pomimo stałej obecności w diecie, ich rola odżywcza i potencjalny wpływ na kondycję konsumenta są przedmiotem nieporównanie mniejszej liczby badań niż w przypadku białek, sacharydów czy lipidów. Na podstawie dostępnej literatury naukowej można stwierdzić, że większość produktów spożywanych w postaci natywnej, jak i po przetworzeniu, jest źródłem kwasów nukleinowych i/lub ich składników w diecie człowieka. Częsteczki te występują w żywności głównie w formie związanej z białkami jako nukleoproteiny (Zhang i in., 2016b) lub są zamknięte w pęcherzykach błonowych zwanych egzosomami (miRNA w mleku) (Jakubek i in., 2020). Jakość i ilość kwasów nukleinowych w produktach żywnościowych zależy od rodzaju tkanki, tempa wzrostu i stadium rozwoju organizmu z którego dany produkt został pozyskany, jego pochodzenia, gęstości komórek, a także obróbki kulinarnej. Przyjmuje się, że tkanki zwierzęce zawierają więcej kwasów nukleinowych niż tkanki roślinne. Bogatym źródłem tych cząsteczek są również drożdże i grzyby, które charakteryzują się szybkim wzrostem, oraz produkty fermentacji zawierające kwasy nukleinowe pochodzenia bakteryjnego i drożdżowego (Jonas i in., 2001; Bauer i in., 2003; Rizzi i in., 2012; Cieślewicz i in., 2021). Zawartość RNA w tkankach może być nawet kilkukrotnie wyższa niż zawartość DNA, a informacja o stosunku DNA/RNA jest wykorzystywana m.in. do określania dobrostanu ryb i owoców morza (Yeung i Leung, 2013; Bhat i in., 2020).

Istnieją znaczne rozbieżności w danych literaturowych dotyczących zawartości kwasów nukleinowych w żywności. Najczęściej cytowanymi opracowaniami na ten temat są prace Herbela i Montaga (1987) oraz Lassek i Montaga (1990). Należy jednak podkreślić, że artykuły te zostały opublikowane w ubiegłym wieku w języku niemieckim (Herbel i Montag, 1987; Lassek i Montag, 1990). Autorzy wykorzystali hydrolizę kwasową i chromatografię kationowymienną do określenia zawartości poszczególnych zasad azotowych oraz obliczenia na tej podstawie ilości DNA i RNA w różnych produktach żywnościowych. Doniesienia te wskazują, że kwasy nukleinowe mogą stanowić kilka procent suchej masy produktu żywnościowego, w zależności od jego rodzaju (tab. 1).

Tabela 1. Zawartość kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych wyrażona w g/kg suchej masy produktu (Herbel i Montag, 1987; Lassek i Montag, 1990)

Grupa produktów	Produkt	RNA [g/kg s.m]	DNA [g/kg s.m.]
Mięso, podroby i produkty mięsne	Wątroba cielęca, wołowa, wieprzowa	22,1 - 32,1	14,8 - 19,5
	Serce wołowe, wieprzowe	6,1 - 9,4	5,3 - 6,9
	Nerka wołowa, wieprzowa	13,5 - 15,5	16,1 - 17,6
	Śledziona wołowa, wieprzowa	17,9 - 21,7	32,6 - 40,4
	Płuca wołowe, wieprzowe	15,5 - 17,3	32,2 - 39,7
	Grasica cielęca	32,0	148,5
	Pasztetowa	2,3-9,0	1,8-4,3
	Salceson	1,0-3,1	1,1-3,6
	Mięso wieprzowe surowe	3,6	2,7
	Mięso wieprzowe gotowane	2,9	1,6
	Mięso wieprzowe smażone	3,0	2,4
Ryby i owoce morza	Tuńczyk	1,7	0,8
	Filet rybne (z czarniaka, karmazyna, plamiaka, dorsza)	2,5 - 4,7	0,3 - 1,6
	Biały halibut	4,7	0,5
	Wędzony pstrąg tęczowy	4,7	1,0
	Wędzona makrela	1,2	0,6
	Anchois	2,0	0,8
	Ikra śledzia	15,3	0,6
	Szprot wędzony	2,2	1,7
	Małże	10,8	9,2

Grupa produktów	Produkt	RNA [g/kg s.m.]	DNA [g/kg s.m.]
Rośliny strączkowe i zboża	Żyto	1,3	0,7
	Pszenica	1,1	0,6
	Soczewica	3,9	0,8
	Biała fasola	3,4	1,8
	Fasola mung	6,3	2,5
	Groszek	4,7	1,6
	Ciecierzycza	2,7	1,7
	Kukurydza konserwowa	4,1	1,1
	Proso białe	1,5	0,7
Warzywa kapustowate i inne, owoce	Brokuły mrożone	20,6	5,1
	Brukselka mrożona	9,9	1,3
	Kapusta pekińska	14,6	2,0
	Jarmuż mrożony	8,4	1,8
	Kalafior	14,5	2,8
	Szpinak mrożony	14,0	2,6
	Natka pietruszki	8,1	2,7
	Ziemniaki	1,4	1,0
	Cebula	2,6	0,7
	Awokado	1,5	0,6
Grzyby	Drożdże piekarskie	66,2	6,0
	Boczniki	24,8	1,4
	Borowiki	23,1	1,0
	Pieczarki	20,5	0,9
	Kurki	6,0	1,0

Podobną metodologię oznaczania zawartości zasad purynowych w wybranych produktach żywnościowych wykorzystali już w 1976 roku Clifford i Story (Clifford i Story, 1976), natomiast zawartość RNA oznaczyli oni spektrofotometrycznie z wykorzystaniem metody opisanej przez Flecka i Munro'a (Fleck i Munro, 1962). Wśród przebadanych przez nich produktów najwyższą zawartością RNA charakteryzowały się sardynki konserwowe (590 mg/100 g), sucha fasola pinto (485 mg/100 g) i soczewica (484 mg/100 g), a najmniejszą tuńczyk konserwowy (5 mg/100 g), anchois konserwowe (6 mg/100 g) oraz krewetki konserwowe

(10 mg/100 g) (Clifford i Story, 1976). Imafidon i Sosulski przeprowadzili pomiar zawartości kwasów nukleinowych poprzez analizę zawartości azotu (NAN - *nucleic acid nitrogen*) w którym wykazali, że najwięcej NAN znajdowało się w sałacie, kapuście i kurczaku (odpowiednio 0,728 mg/g próbki, 0,654 mg/g próbki, 0,558 mg/g próbki), a najmniej w jajach i serze (0,05 mg/g próbki i 0,108 mg/g próbki) (Imafidon i Sosulski, 1990). Przegląd 13 publikacji wydanych w latach 1976-2017 dotyczących zawartości puryn w produktach żywnościowych pokazuje, że największą ilością tych związków charakteryzują się produkty mięsne oraz ryby i owoce morza, natomiast najniższą jaja i nabiał. Autorzy analizy zwracają jednak uwagę, że zawartość puryn w produktach tego samego rodzaju różni się znacząco pomiędzy poszczególnymi publikacjami, a metody analityczne w wielu przypadkach są słabo opisane (Wu i in., 2019). Dominguez-Alvarez i wsp. w opracowaniu z 2017 r. prezentują przegląd artykułów dotyczących metod chromatograficznych i elektroforetycznych oznaczania nukleozydów i nukleotydów w produktach żywnościowych. Dane te odnoszą się jednak głównie do analizy omawianych związków w grzybach i preparatach dla niemowląt, a nieliczne dotyczą produktów mięsnych i owoców morza (Dominguez-Alvarez i in., 2017). Ding i wsp. zaproponowali sposób obliczania zawartości nukleotydów w żywności na podstawie danych dotyczących substancji zawierających azot. Metoda ta opiera się na założeniu, że głównymi źródłami azotu w żywności są aminokwasy, witaminy z grupy B, nukleotydy oraz roztwory soli. Ze względu na znikomą ilość roztworów soli, zawartość nukleotydów może być obliczona jako różnica pomiędzy całkowitą zawartością białka, standardowo mierzoną na podstawie oznaczania azotu całkowitego w próbce metodą Kjeldahla (Mæhre i in., 2018), a zawartością aminokwasów i witamin z grupy B. Na tej podstawie autorzy wskazali rośliny strączkowe oraz mięso i podroby jako produkty o najwyższej zawartości nukleotydów (odpowiednio 0,008-15,99 i 0,003-17,01 g nukleotydów/100 g), a nabiał - o najniższej (0,004-4,2 g nukleotydów/100 g) (Ding i in., 2021). Warto również zaznaczyć, że na oznaczaną zawartość kwasów nukleinowych wpływa obróbka kulinarna produktów żywnościowych. Cieślewicz i wsp. wykazali, że zawartość kwasów nukleinowych różni się w mięsie surowym, gotowanym oraz

grillowanym. Autorzy podkreślają jednak, że różnice te mogą wynikać z denaturacji termicznej białek obecnych w mięsie, co wpływa na wydajność trawienia tych cząsteczek proteinazą K i jednocześnie ułatwia ekstrakcję kwasów nukleinowych. Obserwacje te podważają wiarygodność oznaczania zawartości kwasów nukleinowych w oparciu o ich izolację z produktów żywnościowych (Cieślewicz i in., 2021).

Częściej niż informacje o zawartości DNA lub RNA w produktach żywnościowych znaleźć można dane dotyczące ich składowych - puryn. Zainteresowanie purynami w żywności związane jest z końcowym produktem ich metabolizmu, tj. kwasem moczowym, którego wysokie stężenie wiąże się z występowaniem dny moczanowej. Choroba ta powodowana jest przez odkładanie się w stawach kryształów moczanu sodu, dlatego spożycie produktów bogatych w puryny, będących prekursorami kwasu moczowego, uważa się za jeden z czynników zwiększających ryzyko ataków opisywanego schorzenia (Jonas i in., 2001; Zhang i in., 2012; Kaneko i in., 2014; Wu i in., 2019; Zhang i in., 2022). Okazuje się również, że podwyższony poziom kwasu moczowego w surowicy (hiperurykemia) może wiązać się z występowaniem innych dolegliwości, takich jak stłuszczenie wątroby, przewlekła choroba nerek, zespół metaboliczny - w tym cukrzyca, nadciśnienie tętnicze i otyłość (Rospleszcz i in., 2020).

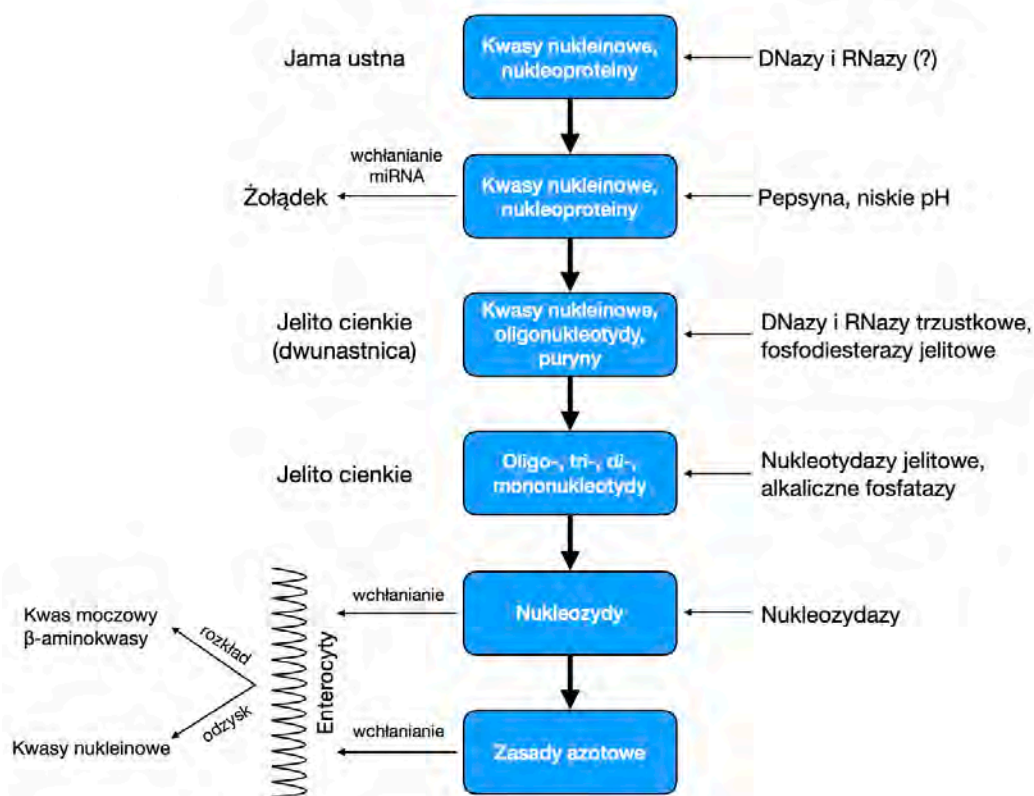
Kwasy nukleinowe obecne w produktach żywnościowych ulegają degradacji podczas obróbki kulinarnej (Bauer i in., 2003). Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na fragmentację DNA są niskie pH i wysoka temperatura (Gryson, 2010). Badania pokazują jednak, że pomimo zastosowania m.in. mikrofal, niskiego pH, podwyższonej temperatury oraz ciśnienia, nadal możliwe jest uzyskanie fragmentów DNA pozwalających na ich amplifikację techniką PCR, co potwierdza, że cząsteczki te nie ulegają całkowitej degradacji (Arslan i in., 2006; Van der Colff i Podivinsky, 2008; Bergerová i in., 2011). Ostatnie badania wskazują również na zależność jakości oraz wykrywalnej ilości wyizolowanych kwasów nukleinowych od rodzaju zastosowanej metody izolacji, co może wpłynąć na zafałszowanie wyników dotyczących zawartości omawianych cząsteczek w żywności (Piskata i in., 2019; Cieślewicz i in., 2021). Jednak głównym celem identyfikacji kwasów

nukleinowych w produktach żywnościowych jest wykrywanie zafałszowań żywności oraz obecności modyfikacji genetycznych, czyli poszukiwanie określonych sekwencji nukleotydów, a nie dokładne oznaczenie ich stężenia (Querci i in., 2010; Hong i in., 2017).

1.2.2. Trawienie, absorpcja i metabolizm kwasów nukleinowych

Kwasy nukleinowe, podobnie do odżywczych składników żywności, są trawione w przewodzie pokarmowym. Nukleazy występują powszechnie w organizmie człowieka (Santa i in., 2021), lecz pomimo udowodnionej obecności zarówno DNaz (Zöllner i in., 1974; Zöllner i in., 1975; Konečná i in., 2020) jak i RNaz (Bardoń i Shugar, 1980; Hasan i Al-Issa, 2011) w ludzkiej ślinie, obecnie przyjmuje się, że trawienie kwasów nukleinowych rozpoczyna się dopiero w żołądku (Liu i in., 2015). Eksperyment *in vitro* przeprowadzony przez Yao i wsp. pokazał, że czas półtrwania wolnych, pozakomórkowych cząsteczek DNA (cfDNA - *cell-free* DNA) naturalnie występującego w ludzkiej ślinie, wynosi niecałe 3 h (dla śliny inkubowanej w 37°C) (Yao i in., 2016), co może wskazywać, że czas kontaktu śliny z przeżuwany pokarmem jest zbyt krótki dla zainicjowania trawienia omawianych cząsteczek. W żołądku kwasy nukleinowe są nie tylko uwalniane z nukleoprotein w wyniku działania pepsyny, ale także wstępnie trawione przez ten enzym. Reakcja ta jest mniej specyficzna niż w przypadku białek, jednak wykazano, że enzym ten preferuje cięcie łańcuchów DNA w obrębie sekwencji bogatych w puryny (Zhang i in., 2016a; Zhang i in., 2016b). Również cząsteczki RNA mogą być częściowo trawione, co udowodniono dla dsRNA (*double stranded RNA*) wirusa papryki i melona w eksperymencie *in vitro* przeprowadzonym z wykorzystaniem świńskiej pepsyny (McCanless i in., 2019). Dodatkowo, pod wpływem niskiego pH w żołądku, dochodzi do uwalniania puryn (tzw. depurynacji) z cząsteczek DNA poprzez samorzutną hydrolizę wiązań N-glikozydowych (An i in., 2014). Ostatnie badania na myszach wykazały, że w żołądku zachodzi także wchłanianie cząsteczek miRNA przez białka błonowe SIDT1 (ang. *systemic RNA interference defective protein 1*). Zaabsorbowane miRNA są wydzielane przez komórki śluzowe żołądka do układu krążenia w postaci egzosomów i z krwią mogą być transportowane do innych tkanek i organów (Chen i in., 2021).

W dwunastnicy kwasy nukleinowe trawione są do oligo-, tri-, di- i mononukleotydów przez nukleazy trzustkowe, zarówno RNazy jak i DNazy, a ich działanie wspomagają jelitowe fosfodiesterazy. W dalszej części jelita cienkiego uwolnione nukleotydy są rozkładane do nukleozydów przez jelitowe nukleotydyazy (m.in. ekto-5'-nukleotydazę - CD73) i alkaliczne fosfatazy (IAP - *intestinal alkaline phosphatase*), a dalsza hydroliza z udziałem nukleozydaz prowadzi do uwolnienia zasad azotowych. Zarówno nukleozydy, jak i zasady azotowe, mogą być wchłaniane przez enterocyty, a następnie metabolizowane do kwasu moczowego (puryny) lub β -aminokwasów (pirymidyny) lub wykorzystywane na drodze odzysku do syntezy nowych kwasów nukleinowych w komórce (Weickmann i in., 1981; Hawley i in., 1983; Morley i in., 1987; Carver i Walker, 1995; Crane i in., 2007; Pastor-Anglada i in., 2018; Williams, 2018; Williams, 2021). Schemat trawienia kwasów nukleinowych przedstawiony jest na rys. 2.



Rys. 2. Trawienie i absorpcja kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym.

Ze względu na hydrofilowy charakter nukleozydów i ich pochodnych, wchłanianie tych cząsteczek uzależnione jest od obecności transporterów

znajdujących się w błonach komórkowych. Należą do nich białka hCNTs (ang. *human Concentrative Nucleoside Transporters*) kodowane przez rodzinę genów *SLC28* oraz białka hENTs (ang. *human Equilibrative Nucleoside Transporters*) kodowane przez rodzinę genów *SLC29*. Wśród hCNTs wyróżnić można trzy transportery: hCNT1 (*SLC28A1*) uczestniczące we wchłanianiu nukleozydów pirymidynowych (oraz w mniejszym stopniu adenozyne), hCNT2 (*SLC28A2*) przenoszące nukleozydy purynowe i urydynę oraz hCNT3 (*SLC28A3*) odpowiedzialne za przenoszenie zarówno nukleozydów purynowych jak i pirymidynowych. Białka hCNTs umożliwiają jednokierunkowy przepływ nukleozydów do wnętrza komórki w kosztownym energetycznie procesie sprzężonym z napływem jonów sodu (hCNT1, hCNT2, hCNT3) oraz protonów (hCNT3). Do transporterów hENT należą cztery białka (hENT1-4) kodowane odpowiednio przez geny *SLC29A1*, *SLC29A2*, *SLC29A3* i *SLC29A4*. Transportery hENT1-3 zdolne są do dwukierunkowego transportu zarówno nukleozydów purynowych i pirymidynowych, jak i zasad azotowych (w przypadku hENT3 możliwy jest tylko transport adeniny), natomiast hENT4 odpowiadają za transport adenozyne. Białka hENT1-2 przenoszą cząsteczki na zasadzie dyfuzji ułatwionej. W przypadku hENT3-4 mechanizm transportu nie jest jeszcze dokładnie poznany, jednak optimum działania obserwowane w kwaśnym środowisku może wskazywać na mechanizm zależny od transportu protonów. Na poziomie mRNA, w układzie pokarmowym, największą ekspresją genów kodujących opisywane transportery charakteryzuje się dwunastnica i jelito cienkie (*SLC28A1* i *SLC28A2*) oraz wątroba (*SLC28A1*). Ponadto silną ekspresję *SLC28A1* zaobserwować można również w nerkach, a *SLC29A1* w nadnerczach i łożysku. Omawiane białka pełnią ważną rolę nie tylko za względu na uczestnictwo we wchłanianiu nukleozydów i zasad azotowych w przewodzie pokarmowym, ale umożliwiają także transport tych cząsteczek (również produkowanych endogennie w wątrobie) do tkanek i komórek z deficytem szlaków biosyntezy *de novo*. Zaliczają się do nich eryocyty, leukocyty, komórki szpiku kostnego oraz mięśnie i mózg (Baldwin i in., 2005; Young i in., 2013; Pastor-Anglada i in., 2018; Pastor-Anglada i in., 2022). Ogólna charakterystyka transporterów nukleozydów została przedstawiona w tab. 2.

Tabela 2. Ogólna charakterystyka transporterów nukleozydów kodowanych przez geny z rodziny *SLC28* i *SLC29* (Young i in., 2013)

Nazwa genu	Nazwa białka	Typ transportu/ stechiometria parowania z jonami	Główne miejsca występowania
<i>SLC28A1</i>	CNT1	Symport/ 1:1 Na ⁺ :nukleozyd	Nerki, wątroba, jelito cienkie, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej
<i>SLC28A2</i>	CNT2	Symport/ 1:1 Na ⁺ :nukleozyd	Serce, mięśnie szkieletowe, wątroba, nerki, jelita, trzustka, łożysko i mózg, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej
<i>SLC28A3</i>	CNT3	Symport/ 2:1 Na ⁺ :nukleozyd, 1:1 proton:nukleozyd, prawdopodobnie 1:1:1 Na ⁺ :proton:nukleozyd	Szeroko rozpowszechnione, w największej ilości w gruczole sutkowym, trzustce, szpiku kostnym, tchawicy i jelicie, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej, w niektórych typach komórek również wewnątrzkomórkowo
<i>SLC29A1</i>	ENT1	Dyfuzja ułatwiona	Szeroko rozpowszechnione, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej, ale także w błonach jądrowych i mitochondrialnych
<i>SLC29A2</i>	ENT2	Dyfuzja ułatwiona	Szczególnie rozpowszechnione w mięśniach szkieletowych, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej, ale wykryte również w błonach jądrowych
<i>SLC29A3</i>	ENT3	Prawdopodobnie powiązany z przenoszeniem protonów	Szeroko rozpowszechnione, zlokalizowane wewnątrzkomórkowo w błonach endosomalnych/ lizosomalnych oraz mitochondrialnych
<i>SLC29A4</i>	ENT4	Prawdopodobnie powiązany z przenoszeniem protonów	Serce, mózg i mięśnie szkieletowe, zlokalizowane głównie w błonie plazmatycznej

Doświadczenia na zwierzętach wykazały, że pomimo trawienia i metabolizmu, również dłuższe (kilkaset par zasad) fragmenty kwasów nukleinowych mogą przenikać do krwi i limfy, a także do innych narządów. Jednym z pierwszych doniesień dotyczących losów egzogenego DNA w przewodzie pokarmowym były badania zespołu Schubberta i wsp. (Schubbert i in., 1994). Wykazali oni, że DNA faga M13 może częściowo przetrwać trawienie w przewodzie pokarmowym myszy, a także w niewielkim stopniu przenikać do krwiobiegu. Dotychczas obecność zrekombinowanych fragmentów DNA i naturalnie występujących genów pochodzenia roślinnego wykryto w różnych odcinkach przewodu pokarmowego i narządach m.in. zwierząt hodowlanych, ryb, myszy i szczurów (Rizzi i in., 2012;



Nadal i in., 2018). Badania *in vitro* przeprowadzone przez Johannessena i wsp. z wykorzystaniem komórek Caco-2 wykazały, że większe fragmenty DNA mogą być wchłaniane poprzez endocytozę adsorpcyjną i transportowane do przeciwnego bieguna komórek w pęcherzykach. Autorzy sugerują, że w proces ten mogą być zaangażowane receptory i białka wiążące DNA, m.in. TLR9 (*Toll like receptor 9*), receptory zmiatacze (*scavenger receptors*), kanały kwasu nukleinowego (*nucleic acid channels*) czy nukleoliny (Johannessen i in., 2013). W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie syntetycznymi, sferycznymi kwasami nukleinowymi (*spherical nucleic acids* - SNAs) o potencjalnej roli terapeutycznej, które również są wchłaniane na drodze endocytozy z udziałem receptorów zmiataczy (Cutler i in, 2012; Choi i in., 2013; Mirkin i in., 2019). Ponieważ wielkość cząsteczek SNAs (średnio kilkanaście nm) zbliżona jest do rozmiarów nukleosomu (ok. 11-13 nm) można przypuszczać, że również w takiej formie kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego będą mogły być wchłaniane w przewodzie pokarmowym (Khorasanizadeh, 2004; Cutler i in, 2012; Cutter i Hayes, 2015; Li i in., 2018).

Krążące w płynach ustrojowych cząsteczki kwasu deoksyrybonukleinowego nazywane są wolnymi, pozakomórkowymi cząsteczkami DNA (*cell free DNA* - cfDNA). Ich obecność została udokumentowana we krwi osób zdrowych, ale podwyższone poziomy tych cząsteczek można zaobserwować zwłaszcza w przypadku różnych typów nowotworów (Aarthy i in., 2015; Otandault i in., 2019). W organizmie człowieka cfDNA mogą być m.in. aktywnie wydzielane przez komórki, pochodzić z ich rozpadu (np. w wyniku apoptozy czy nekrozy) lub mieć pochodzenie mikrobiologiczne czy wirusowe (Bronkhorst i in., 2021; Han i Lo, 2021). Istnieją przesłanki, że tego typu cząsteczki mogą przenikać do krwiobiegu także z produktów żywnościowych. Badania przeprowadzone przez Spisaka i wsp. sugerują obecność w ludzkim krwiobiegu cfDNA o sekwencjach odpowiadających sekwencjom chloroplastów roślinnych, wśród których najpowszechniejsze były te pochodzące z ziemniaka i pomidora (Spisak i in., 2013). Wskazuje to na możliwość wchłaniania z przewodu pokarmowego nawet dużych fragmentów DNA, które nie uległy degradacji w trakcie procesu trawienia. Należy jednak zaznaczyć, że praca ta została zakwestionowana przez Luska, który zwrócił uwagę na wysoce

prawdopodobną obecność zanieczyszczeń egzogennym DNA próbek analizowanych przez zespół Spisaka (Lusk, 2014). Obecnie większość badań dotyczących cfDNA nie uwzględnia żywności jako źródła wspomnianych cząsteczek.

1.2.3. Żywnościowa rola kwasów nukleinowych i ich pochodnych

Kwasy nukleinowe obecne w produktach żywnościowych mogą oddziaływać w przewodzie pokarmowym konsumenta na różnych płaszczyznach. Jako składnik odżywczy ulegają trawieniu i wchłanianiu, a następnie są metabolizowane lub odzyskiwane w celu syntezy nukleotydów. Już w ubiegłym stuleciu zauważono, że nukleotydy pochodzenia żywieniowego powinny być uznawane za niezbędne składniki pokarmowe w diecie człowieka (Grimble, 1996). Jednakże większość badań dotyczących żywieniowej roli omawianych cząsteczek została przeprowadzona na modelach zwierzęcych. W latach 80. Leleiko i wsp. wykazali, że karmienie szczurów dietą pozbawioną puryn i pirymidyn skutkowało zmniejszeniem zawartości zarówno RNA, jak i białka całkowitego w jelicie cienkim i okrężnicy (Leleiko i in., 1987). W przypadku odstawionych od matki szczurów Uauy i wsp. zasugerowali, że dodatek nukleozydów do diety może wspomagać wzrost i dojrzewanie jelit (Uauy i in., 1990), podczas gdy u dorosłych zwierząt brak nukleotydów w diecie wiąże się ze zmniejszeniem zawartości tych cząsteczek oraz RNA w ich wątrobach (López-Navarro i in., 1995). Również u starszych gryzoni wykazano, że obecność nukleotydów w diecie korzystnie wpływa na regenerację jelit po okresie głodu (Ortega i in., 1995). Suplementacja nukleotydami zwierząt doświadczalnych była związana z wydłużeniem życia (Xu i in., 2013), a także ochroną przed alkoholowym uszkodzeniem wątroby poprzez zmniejszanie stanu zapalnego i wpływ na mikrobiotę jelit (Cai i in., 2016). Podanie hydrolizowanych nukleoprotein pochodzących z mleczu łososia również wykazywało działanie protekcyjne w sytuacji indukowanego etanolem uszkodzenia wątroby u szczurów (Kojima-Yuasa i in., 2016). Badania na myszach z wykorzystaniem mieszaniny nukleotydów otrzymanych z RNA drożdży browarniczych wykazały działanie przeciwmęczeniowe tych cząsteczek, co było prawdopodobnie związane z ograniczeniem stresu oksydacyjnego oraz poprawą funkcji mitochondriów w mięśniach szkieletowych (Xu i in., 2017). Korzystny wpływ dodatku

nukleotydów na funkcje komórek mięśniowych potwierdzono również dla linii komórkowych mięśni szkieletowych myszy (Uberti i in., 2020). Egzogenne kwasy nukleinowe i ich pochodne mają również wielokierunkowe działanie immunomodulujące. Wykazano, że wpływają one na poziom przeciwciał u myszy (Sudo i in., 2000; Nagafuchi i in., 2002), produkcję cytokin (Nakamoto i in., 2011) i aktywność komórek NK (Carver i in., 1990) oraz zmniejszają stan zapalny w tkance tłuszczowej (Sakai i in., 2015).

Obecnie wiele badań skupia się na możliwości suplementacji zwierząt hodowlanych egzogennymi kwasami nukleinowymi, w których upatruje się m.in. alternatywy do stosowania antybiotyków w celu zachowania dobrostanu zwierząt (Sauer i in., 2011). Doświadczenia przeprowadzone na prosiątach wykazały m.in. wpływ suplementacji nukleotydami pochodzącymi z ekstraktu drożdżowego na obniżenie ekspresji interleukin IL-6 i IL-1 β oraz zwiększenie ekspresji IL-10 i interferonu IFN- γ wśród odstawionych od matek prosiąt (Superchi i in., 2012). Dodatek kwasów nukleinowych i/lub ich pochodnych poprawił także wykorzystanie składników odżywczych, funkcjonowanie jelit oraz odporność w przypadku prosiąt dotkniętych wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu (IUGR - *intrauterine growth restriction*) (Che i in., 2016), wpłynął na stymulację rozwoju jelit i transportu nukleotydów (Xie i in., 2019) oraz wydajność wzrostu zwierząt (Perricone i in., 2020). Ponadto Tan i wsp. wykazali, że dodatek nukleotydów w diecie macior w okresie ciąży może sprzyjać wzrostowi prosiąt (Tan i in., 2021). Dodatek do diety kurcząt omawianych cząsteczek wpłynął korzystnie na właściwości fizyczne i odżywcze ich mięśni (Chiofalo i in., 2011), poprawił wydajność wzrostu, morfologię jelit, produkcję przeciwciał (Daneshmand i in., 2017; Kreuz i in., 2020; Kamel i in., 2021), odpowiedź immunologiczną oraz różnorodność mikrobioty jelitowej (Wu i in., 2018) tych zwierząt, a także ograniczył negatywne skutki zakażenia bakterią *Clostridium perfringens* (Mohamed i in., 2020). Suplementacja nukleotydami wpłynęła również korzystnie na zdrowotność ryb hodowlanych. Zwiększyła wzrost oraz odporność na stres pstrąga tęczowego (Tahmasebi-Kohyani i in., 2012), wzmocniła odpowiedź immunologiczną oraz przeżywalność tilapii przy zakażeniu *Streptococcus iniae* (Shiau i in., 2015) oraz

poprawiła parametry krwi, odpowiedź immunologiczną, reakcję na stres i wydajność wzrostu pagrusa czerwonego (Hossain i in., 2017). Ponadto wpłynęła na zwiększenie zawartości kwasów tłuszczowych n-3 oraz poprawę jakości mięsa (Tie i in., 2019) i ograniczyła zachorowalność na zapalenie jelit wywołane zakażeniem *Aeromonas hydrophila* (Tie i in., 2021) amura białego. Przyniesione badania pokazują, że kwasy nukleinowe i ich pochodne mają korzystny wpływ szczególnie na wzrost, dojrzewanie jelit, odpowiedź immunologiczną oraz reakcję na stres. Potwierdza to, że obecność tych cząsteczek w diecie jest kluczowa dla zachowania dobrostanu różnych gatunków zwierząt.

Badania dotyczące wpływu kwasów nukleinowych pochodzących z żywności z udziałem ludzi skupiają się przede wszystkim na kwestiach zdrowotnych:

- ryzyku wystąpienia dny moczanowej (co zostało omówione w podrozdziale 1.2.1),
- możliwości wzbogacania mieszanek dla niemowląt m.in. w celu wspomaganie rozwoju dzieci,
- oraz w ostatnich latach również na możliwości suplementacji omawianymi cząsteczkami sportowców m.in. w celu poprawy wydolności organizmu czy przyspieszenia regeneracji po wysiłku.

Już w ubiegłym wieku zauważono, że dodatek pochodnych kwasów nukleinowych do diety niemowląt może wpływać na skład kwasów tłuszczowych błon komórkowych erytrocytów. Wzbogacenie mieszanki dla dzieci nukleotydami spowodowało wzrost zawartości kwasów n-3 i n-6 (DeLucchi i in., 1987; Pita i in., 1988) oraz obniżenie ilości cholesterolu w błonach czerwonych krwinek (Pita i in., 1988) w porównaniu do dzieci karmionych standardową mieszanką na bazie mleka krowiego. W badaniach przeprowadzonych przez Sanchez-Pozo i wsp. dodatek nukleotydów do mieszanki mlekozastępczej spowodował wzrost stężenia lipoprotein w osoczu wcześniaków (Sánchez-Pozo i in., 1994). Odmienne wyniki uzyskali jednak Woltil i wsp., w badaniach których obecność nukleotydów w mieszance dla niemowląt nie wpłynęła na status długołańcuchowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych erytrocytów oraz estrów cholesterolu w osoczu przedwcześnie urodzonych dzieci (Woltil i in., 1995). Badania przeprowadzone w kolejnych latach również nie pozwoliły na wyciągnięcie

jednoznacznych wniosków dotyczących wpływu dodatku nukleotydów na profil lipidowy noworodków (Axelsson i in., 1997; Siahnidou i in., 2004; Gibson i in., 2005). Natomiast metaanaliza przeprowadzona w 2015 r. i obejmująca 8 prac badawczych wskazała, że suplementacja nukleotydami znacząco zwiększa stężenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w osoczu, ale nie wpływa na skład kwasów tłuszczowych w erytrocytach niemowląt (Wang i in., 2015). Przedmiotem zainteresowania naukowców jest również potencjalny wpływ podawanych doustnie prekursorów kwasów nukleinowych na odpowiedź immunologiczną dzieci. Badania wskazują, że fortyfikacja mieszanek mlekozastępczych nukleotydami może przyczynić się do wzrostu stężenia w osoczu przeciwciał należących do różnych klas, m.in. przeciwciał IgG przeciwko β -laktoglobulinie (Martínez-Augustin i in., 1997), przeciwciał przeciwko polisacharydom *Haemophilus influenzae* typu b oraz błonicy wytworzonych w wyniku immunizacji (Pickering i in., 1998), czy przeciwciał IgA i IgM (Navarro i in., 1999). Ponadto, może również obniżać ryzyko biegunki u niemowląt (Brunser i in., 1994; Yau i in., 2003). W badaniach przeprowadzonych w 2004 r. zaobserwowano silniejszą odpowiedź immunologiczną dzieci karmionych mieszanką wzbogaconą w nukleotydy w stosunku do dzieci karmionych standardowym preparatem, jednak efekt był słabszy lub zbliżony do uzyskanego dla dzieci karmionych mlekiem matki (Schaller i in., 2004; Buck i in., 2004). Zaobserwowany efekt uzasadnić można faktem naturalnej obecności w mleku kobiecym kwasów nukleinowych, zarówno w formie nukleotydów, jak i cząsteczek miRNA (Leach i in., 1995; Jakubek i in., 2020). W przypadku niedożywionych niemowląt nie zaobserwowano znaczącego wpływu dodatku nukleotydów w diecie na odpowiedź immunologiczną (Vásquez-Garibay i in., 2004), również w przypadku zdrowych dzieci wyniki były niejednoznaczne (Hawkes i in., 2006). Wnioski z metaanalizy uwzględniającej 9 prac badawczych wskazują na lepszą odpowiedź immunologiczną suplementowanych nukleotydami niemowląt po podaniu szczepionki przeciwko *Haemophilus influenzae*, toksoidu błoniczego oraz doustnej szczepionki przeciwko polio. Ponadto, na podstawie przeprowadzonej metaanalizy autorzy zaznaczają, że dowody potwierdzające korzyści zdrowotne dodatku nukleotydów w diecie niemowląt są wystarczające, aby

zarekomendować wzbogacanie mieszanek mlekozastępczych w te składniki. Podkreślają oni również, że taka suplementacja nie wiąże się z żadnym ryzykiem zdrowotnym (Gutiérrez-Castrellón i in., 2007). Poza przytoczonymi badaniami, w literaturze można znaleźć również informacje dotyczące wpływu prekursorów kwasów nukleinowych na wzrost dzieci. Suplementacja nukleotydami niemowląt z upośledzoną czynnością błony śluzowej spowodowała uzyskanie wyższych średnich wskaźników przyrostu masy ciała, długości i obwodu głowy w stosunku do niemowląt karmionych mlekiem modyfikowanym na bazie serwatki, do którego nukleotydy nie były dodawane (Cosgrove i in., 1996). Również w przypadku zdrowych dzieci wzbogacenie mieszanki mlekozastępczej o nukleotydy wpłynęło na zwiększenie obwodu głowy oraz masy ciała (Singhal i in., 2010), co jednak nie pokrywało się z wynikami uzyskanymi wcześniej przez Hawkes i wsp. (2006). Metaanaliza obejmująca 8 prac badawczych wykazała, że suplementacja nukleotydami zwiększa tempo przyrostu masy ciała oraz wzrostu obwodu głowy noworodków, ale nie ma wpływu na masę ciała czy jego długość. Autorzy podkreślają, że dla wyciągnięcia jednoznacznych wniosków potrzebne są randomizowane badania na dużą skalę (Wang i in., 2019).

Zainteresowanie naukowców dodawaniem pochodnych kwasów nukleinowych do preparatów dla niemowląt jest związane z naturalnym występowaniem tych cząsteczek w mleku ludzkim (Leach i in., 1995), co potwierdza ich istotną rolę w diecie rozwijającego się noworodka. W rekomendacjach zaproponowanych przez Koletzko i wsp. dotyczących kompozycji mieszanek mlekozastępczych nukleotydy wymienione są jako opcjonalne dodatki, których ilość nie powinna przekraczać 5 mg/100 kcal (Koletzko i in., 2005). Opinia EFSA (*European Food Safety Authority*) wydana w 2014 r. uwzględnia możliwość dodawania nukleotydów do mieszanek dla niemowląt, jednak zaznacza, że ze względu na brak jednoznacznych dowodów na korzyści płynące z obecności tych cząsteczek nie ma konieczności ich dodawania (EFSA NDA Panel, 2014). Wyniki omówionych powyżej badań wskazują jednak, że obecność nukleotydów w diecie niemowląt może korzystnie wpływać na ich rozwój, a w szczególności na tempo przyrostu masy ciała, odpowiedź immunologiczną czy obniżanie ryzyka biegunek.

Kolejnym trendem obserwowanym w ostatnich latach jest pojawianie się coraz większej liczby badań dotyczących możliwości suplementacji sportowców składnikami kwasów nukleinowych. W badaniach przeprowadzonych z udziałem 14-stu średnio wytrenowanych mężczyzn wykazano, że 60-dniowa suplementacja preparatem Nucell zawierającym kwasy nukleinowe pochodzące z drożdży przyczyniła się do wzrostu stężenia przeciwciał IgA w ślinie oraz obniżenia stężenia kortyzolu bezpośrednio po ćwiczeniach na ergometrze rowerowym, w stosunku do grupy przyjmującej placebo (Mc Naughton i in., 2006). Autorzy potwierdzili uzyskane wyniki również dla ćwiczeń o wysokiej intensywności (Mc Naughton i in., 2007). Suplementacja przez 30 dni zawodników taekwondo preparatem Immunactive, zawierającym mieszaninę nukleotydów, spowodowała szybsze namnażanie limfocytów po wysiłku fizycznym na cykloergometrze (Riera i in., 2013). Natomiast 14-dniowa interwencja podawanymi podjęzykowo nukleotydami wpłynęła na wzrost stężenia przeciwciał IgA w surowicy, aktywność cytotoksyczną komórek NK oraz wydłużyła czas do zmęczenia podczas wysiłku fizycznego (Ostojic i in., 2013). Stosowanie preparatu nuBound, w którego skład wchodzi m.in. nukleotydy pochodzące z drożdży, przez 14 dni, doprowadziło do znaczącego spadku stężenia kortyzolu i mieloperoksydazy bezpośrednio po wysiłku z obciążeniem oraz do spadku aktywności kinazy kreatynowej po 24 godz. od treningu. Zaobserwowano również zwiększenie siły izometrycznej bezpośrednio, a także po 24 i 48 godz. od wysiłku w grupie przyjmującej badany preparat (Sterczala i in., 2016). Poza mieszaninami nukleotydów wśród sportowców badany jest także wpływ suplementacji ATP, cząsteczki odpowiedzialnej za przenoszenie energii m.in. w mięśniach, a więc mogącej bezpośrednio wpływać na wyniki uzyskiwane przez osoby trenujące. Przykładowo, doustna, 14-dniowa suplementacja ATP zapobiegła obniżeniu stężenia tego związku, a także ADP i AMP we krwi, po wysiłku fizycznym, oraz poprawiła pobudliwość mięśni (Purpura i in., 2017). Przyjęcie preparatu zawierającego ATP jedynie 30 min przed treningiem aerobowym miało wpływ na ciśnienie krwi oraz zmienność rytmu serca kobiet z nadciśnieniem (de Freitas i in., 2018). Także w przypadku mężczyzn wykonujących półprzysiady z obciążeniem,

zastosowanie jednorazowej dawki 400 mg ATP pół godziny przed wysiłkiem umożliwiło osiągnięcie większej liczby powtórzeń (Dos Santos Nunes de Moura i in., 2021). Przytoczone badania pokazują, że suplementacja pochodnymi kwasów nukleinowych może mieć wpływ m.in. na zwiększenie siły i wytrzymałości, poprawę odpowiedzi immunologicznej, a także obniżenie stężenia kortyzolu bezpośrednio po wysiłku fizycznym. Wydaje się więc zasadne stwierdzenie, że obecność pochodnych kwasów nukleinowych w diecie może być korzystna dla osób trenujących.

Okazuje się, że kwasy nukleinowe mogą być wykorzystywane jako składniki odżywcze przez wiele gatunków mikroorganizmów (Ibáñez de Aldecoa i in., 2017; Wasmund i in., 2021; Huang i in., 2022). Finkel i Kolter przeprowadzili badania w których udowodnili, że *Escherichia coli* wykorzystuje zewnątrzkomórkowe DNA jako źródło węgla, a mutacja powodująca niezdolność tych bakterii do utylizacji DNA wpływa znacząco na pogorszenie ich wzrostu (Finkel i Kolter, 2001). Natomiast dla obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka bakterii *Bacteroides thetaiotaomicron* wykazano, że posiadają one układy degradujące rybozę (Głowacki i in., 2020). Zdolność wykorzystywania kwasów nukleinowych udowodniono również dla bakterii *Bacteroides ruminicola* i *Selenomonas ruminantium*, bytujących w przewodach pokarmowych przeżuwaczy (Cotta, 1990).

Poza rolą odżywczą, wśród mikroorganizmów zewnątrzkomórkowy DNA odgrywa ważną rolę w tworzeniu biofilmu, który jest uważany za istotny czynnik wirulencji dla bakterii chorobotwórczych (Jakubovics i in., 2013). Od czasu do czasu pojawiają się rozważania na temat możliwości horyzontalnego transferu genów przez mikrobiotę konsumenta, głównie w związku ze spożywaniem roślin modyfikowanych genetycznie. Jednak jak dotąd nie ma twardych dowodów na to, że takie zjawisko rzeczywiście występuje *in vivo* lub występuje w stopniu, który może stanowić zagrożenie dla konsumenta (Rizzi i in., 2012; Nawaz i in., 2019; Alamnie i Andualem, 2020).

W przypadku zwierząt udowodniono, że pewne gatunki wykorzystują nukleozydy jako źródło energii dla czerwonych krwinek. Dojrzałe erytrocyty świń metabolizują inozynę do produkcji ATP (Magnani i in., 1983; Young i in., 1986),

natomiast guanozyna i inozyna mogą być wykorzystywane zarówno przez dojrzałe erytrocyty, jak i retikulocyty (rozwijające się czerwone krwinki) kur (Mathew i in., 1993).

W przypadku człowieka nie można jeszcze jednoznacznie określić, czy jest on zdolny pozyskiwać energię z rozkładu kwasów nukleinowych. Badania przeprowadzone przez Giannecchini i wsp. na ludzkiej linii komórek raka jelita grubego LoVo wykazały, że komórki te są zdolne do wykorzystywania fosforylowanej reszty rybozy pochodzącej z inozyny na cele energetyczne, jednak miało to miejsce w warunkach braku glukozy w pożywce oraz przy zablokowanej fosforylacji oksydacyjnej (Giannecchini i in., 2005). Najnowsze badania Skinner i wsp. wskazują na zdolność utylizacji rybozy pochodzącej z urydyny lub RNA na cele energetyczne w warunkach niedoboru glukozy przez różne nowotworowe linie komórkowe. Badacze udowodnili opisywany proces w eksperymentach *in vitro* m.in. dla komórek białaczki K562 (Skinner i in., 2023). Omówione badania pokazują, że kwasy nukleinowe nie tylko pełnią rolę

Obecnie brak jest badań, które wskazywałyby na możliwe zagrożenia lub brak ryzyka związanego ze spożywaniem zmodyfikowanych nukleozasad. Aktywność przeciwnowotworowa fluorouracylu podawanego doustnie jasno pokazuje, że chemicznie modyfikowane składniki kwasów nukleinowych są wchłaniane przez ludzkie komórki, włączane do DNA podczas replikacji i mogą decydować o przeżyciu komórki (Zhang i in., 2008). Nie ma powodu zakładać, że ten sam scenariusz nie jest możliwy w przypadku np. utlenionych nukleozasad pochodzących ze spożywanej żywności. Możliwość taką pośrednio potwierdza istnienie w ludzkich komórkach enzymu - trifosfatazy MTH1, którego rolą jest selektywne usuwanie oksydacyjnie uszkodzonych nukleotydów z puli trifosforanów nukleozydów (Fujikawa i in., 2001). Enzym ten jest aktywny w enterocytach, czyli w komórkach, które mają bezpośredni kontakt z egzogennymi kwasami nukleinowymi i produktami ich trawienia. W przypadku komórek nowotworowych wykazano, że wbudowanie utlenionej guaniny do DNA komórek o wyciszonej aktywności MTH1 prowadzi do apoptozy (Gad i in., 2014). Włączenie utlenionych

nukleozasad może być również przyczyną upośledzenia mechanizmów epigenetycznych (Lewandowska i Bartoszek, 2011; Zarakowska i in., 2014).

1.2.4. Żywnościowa rola cząsteczek miRNA

W ostatnich latach rosnącym zainteresowaniem wśród naukowców cieszą się regulatorowe cząsteczki miRNA. Są one najbardziej rozpowszechnioną klasą małych, niekodujących cząsteczek RNA (ncRNA), wpływającą m.in. na regulację ekspresji genów, a zaburzenia w ich produkcji powiązane są m.in. z rozwojem różnego rodzaju nowotworów. Występują powszechnie u zwierząt, roślin, a nawet wirusów (Chen i in., 2008; Cai i in., 2009; Skalsky i Cullen, 2010). Badania wykazały, że miRNA występujące w ludzkim osoczu są odporne na gotowanie, przedłużone przechowywanie, niskie i wysokie pH oraz cykle zamrażania i rozmrażania, a także częściowo na trawienie RNazą (Chen i in., 2008). Również w przypadku miRNA pochodzących z kukurydzy, cząsteczki te były nadal wykrywalne w karmie zawierającej gotowaną kukurydzę i poddanej obróbce w wysokiej temperaturze i ciśnieniu (Luo i in., 2017). Trwałość miRNA potwierdzono także dla cząsteczek obecnych w soi i ryżu, poddanych zarówno gotowaniu, jak i symulowanemu trawieniu *in vitro* (Philip i in., 2015). Może to wskazywać, że miRNA obecne w produktach żywnościowych są w pewnym stopniu odporne na obróbkę kulinarną, a także na warunki panujące w przewodzie pokarmowym.

Jednym z rodzajów pokarmów niezwykle bogatych w miRNA jest mleko. Badania dotyczące mleka ludzkiego pokazały, że stanowi ono jedno z najbogatszych źródeł miRNA wśród płynów ustrojowych człowieka, w którym Alsaweed i wsp. zidentyfikowali ok. 3500 rodzajów tych cząsteczek (Alsaweed i in., 2015; Alsaweed i in., 2016). We frakcji odtłuszczonej mleka wspomniane cząsteczki mogą znajdować się w egzosomach, tzn. pęcherzykach błonowych, które uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej (Jakubek i in., 2020). Duża część miRNA obecnego w mleku i zamknięta w egzosomach jest odporna na działanie RNaz, niskie pH oraz kilkukrotne cykle zamrażania i rozmrażania (Kosaka i in., 2010; Izumi i in., 2012). Jednak ostatnie badania przeprowadzone na mleku krowim wskazują, że komercyjna obróbka mleka, tj. pasteryzacja oraz sterylizacja, mogą

doprowadzić do uszkodzenia struktury egzosomów (Kleinjan i in., 2021). Doświadczenia przeprowadzone na liniach komórkowych wykazały, że wchłanianie egzosomów odbywa się poprzez endocytozę i jest możliwe dzięki obecności specyficznych glikoprotein na powierzchni egzosomów oraz komórek nabłonka jelita (Wolf i in., 2015). Ponadto badania przeprowadzone na myszach wskazują, że cząsteczki miRNA mogą być wchłaniane już w żołądku z udziałem białek błonowych SIDT1 (Chen i in., 2021).

Odporność miRNA znajdujących się w mleku może wskazywać, że cząsteczki te są zdolne do przetrwania warunków panujących w przewodzie pokarmowym, dzięki czemu mogą być absorbowane w niezmienionej formie. Udowodniono, że kwasy nukleinowe w postaci miRNA wchłaniane są przez noworodki karmione mlekiem matki, a cząsteczki te wpływają m.in. na rozwój dziecka, w szczególności na układ odpornościowy, biorą udział w regulacji równowagi płynów ustrojowych, kontroli apetytu i pragnienia (Alsaweed i in., 2016; Leroux i in., 2021; Melnik i in., 2021). Ponadto udowodniono, że cząsteczki miRNA występujące w mleku ludzkim oraz krowim mogą wpływać na ekspresję metylotransferaz DNA związanych z regulacją epigenetyczną (Melnik i Schmitz, 2017). Co ciekawe, niektóre z rodzajów miRNA są obecne zarówno w mleku ludzkim, jak i w tym pochodzącym od krów, świń czy pand, co uważa się za dowód na ich istotną rolę w rozwoju noworodków ssaków (van Herwijnen i in., 2018). Obecność oraz aktywność miRNA, obok innych składników mleka ludzkiego, podkreśla wyższość naturalnego karmienia niemowląt nad stosowaniem mieszanek mlekozastępczych oraz potwierdza niezwykle ważną rolę mleka kobiecego w diecie rozwijającego się dziecka.

Oddziaływanie miRNA mleka na noworodki dowodzi, że wspomniane kwasy nukleinowe nie są obojętne dla organizmu dziecka. Powstaje jednak pytanie, czy spożywanie mleka krowiego, powszechnego elementu diety, na kolejnych etapach życia człowieka, może nieść ze sobą także zagrożenia zdrowotne. Wykazano m.in., że po doustnym podaniu mleka krowiego ludzie wchłaniają znaczne ilości miRNA (miR-29b i miR-200c), które mogą wpływać na ekspresję genów jednojądrzastych komórek krwi obwodowej oraz, co wykazano w testach *in vitro*, embrionalnych komórek nerki HEK-293 (Baier i in., 2014). Natomiast obecne w mleku krowim

cząsteczki miRNA-21 osłabiają działanie hamujące różnych białek supresorowych nowotworów na kinazę mTORC1 (*mechanistic target of rapamycin complex 1*), której zaburzona aktywność może wpływać na rozwój chorób cywilizacyjnych (Melnik i in., 2013). Ponadto miRNA mleka krowiego powiązано z rozwojem chłoniaków rozlanych z dużych komórek B, będących nowotworami układu limfatycznego (Melnik i in., 2023). Przyniesione badania potwierdzają niezwykle ważną rolę mleka krowiego w rozwoju noworodków, a jednocześnie podkreślają, że spożycie mleka krowiego przez dorosłego człowieka może nieść ze sobą pewne zagrożenia zdrowotne.

Poza omówioną aktywnością miRNA obecnych w mleku, pojawiają się również doniesienia dotyczące możliwości oddziaływania na organizm miRNA pochodzącego z produktów roślinnych. Jednym z pierwszych tego typu badań była praca dotycząca możliwości wchłaniania przez myszy cząsteczek MIR168a pochodzących z ryżu, które wiązały się z LDLRAP1 (ang. *low-density lipoprotein receptor adapter protein 1*) mRNA i hamowały jego ekspresję w wątrobie, co skutkowało wzrostem stężenia lipoprotein LDL w osoczu zwierząt (Zhang i in., 2012). Przyniesione doświadczenia zostały jednak poddane analizie przez innych naukowców, co ochłodziło początkowy entuzjazm dotyczący możliwości pobierania miRNA z przewodu pokarmowego i jego zdolności do regulacji ekspresji genów w organizmie biocy (Witwer i Hirschi, 2014). Wnioski z dotychczas przeprowadzonych badań nad możliwością przenikania egzogennych, niekodujących cząsteczek RNA wraz z dietą do tkanek zwierzęcych i ludzkich są niejednoznaczne (Li i in., 2018; Zhang i in., 2019; McNeill i Hirschi, 2020). Poza bezpośrednim wpływem na tkanki przewodu pokarmowego pojawiają się również doniesienia wskazujące na możliwy wpływ pokarmowego RNA na mikrobiotę jelitową. Wykazano m.in., że miRNA obecne w nanocząstkach przypominających egzosomy otrzymanych z imbiru regulują ekspresję genów bakterii *Lactobacillus rhamnosus* (Teng i in., 2018), a miRNA kukurydzy oddziałują na bakterie z rodzaju *Firmicutes* (Huang i in., 2020), przez co wpływają na skład mikrobioty przewodu pokarmowego.

Dane literaturowe dotyczące miRNA w mleku wskazują na ich istotny wpływ w rozwoju noworodków ssaków oraz zdolność oddziaływania na organizm dorosłego człowieka. Badania nad miRNA obecnymi w pokarmach roślinnych nie pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków o ich wpływie na organizm ludzki, jednak wydaje się, że cząsteczki te mogą co najmniej oddziaływać na mikrobiotę jelitową konsumenta.

2. CEL I ZAKRES PRACY

Kwasy nukleinowe, jako podstawowe elementy komórek organizmów żywych, znajdują się we wszystkich produktach żywnościowych spożywanych przez człowieka. Pomimo ich niepodważalnej obecności w codziennej diecie, są one nadal postrzegane głównie jako nośniki informacji genetycznej, a dane dotyczące wpływu tych cząsteczek na organizm konsumenta są ograniczone. Pomimo braku systematycznych badań na temat właściwości odżywczych kwasów nukleinowych istnieje pewna liczba publikacji wskazująca na właśnie taką ich rolę. Wiadomo, że wspomniane cząsteczki mogą m.in. wspomagać regenerację jelit, zwiększać wydajność wzrostu i odporność na stres oraz łagodzić objawy zakażeń bakteryjnych u zwierząt. Ponadto obecność nukleotydów w diecie niemowląt zwiększa przyrost masy ich ciała, poprawia odpowiedź immunologiczną oraz powoduje obniżenie ryzyka biegunek. Wiadomo także, że organizm człowieka posiada cały szereg enzymów umożliwiających trawienie omawianych cząsteczek, a komórki układu pokarmowego są wyposażone w transportery zapewniające absorpcję składników egzogennych kwasów nukleinowych. Istnieje zatem potrzeba przeprowadzenia badań, które pozwoliłyby na określenie roli odżywczej pokarmowych kwasów nukleinowych.

W wyniku wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności potwierdzono obecność kwasów nukleinowych zarówno w surowym, jak i przetworzonym termicznie mięsie ze schabu wieprzowego, a także w komercyjnie dostępnych przetworach mięsnych, takich jak kiełbasa i paszтет. Wykazano również pewne różnice w stopniu fragmentacji cząsteczek DNA pochodzących z komórek wspomnianych produktów. Obserwacje te doprowadziły do postawienia pytania, czy także produkty różnego pochodzenia, tj. zwierzęcego, roślinnego oraz grzyby, będą różniły się zawartością oraz stopniem fragmentacji kwasów nukleinowych. Dlatego pierwszym celem niniejszej pracy było znalezienie produktów żywnościowych różniących się zarówno zawartością, jak i jakością kwasów nukleinowych, poprzez przeprowadzenie wizualizacji i charakterystyki tych cząsteczek znajdujących się w wybranych składnikach żywności. Postawiono następującą hipotezę: **ilość oraz**

stopień fragmentacji kwasów nukleinowych w produktach żywnościowych różni się w zależności od pochodzenia produktów. Metodologię w części analitycznej badań zaprojektowano w oparciu o opracowany w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności zestaw metod pozwalających na analizę jakościową i ilościową pokarmowych kwasów nukleinowych (Cieśliewicz i in., 2021). Jako wyjściowy materiał do badań zostały wykorzystane tkanki pochodzące z jednego rodzaju organizmu (mięśnie piersi i uda oraz wątroba kury), reprezentujące różne królestwa (tkanki roślinne, zwierzęce, grzybowe) oraz na różnych etapach rozwoju i pełniących różne funkcje (nasiona fasoli szparagowej, bulwa ziemniaka, bulwa kalarepy, zgrubiały ogonek liściowy selera naciowego). I tak, w celu wizualizacji *in situ* jąder komórkowych obecnych we wspomnianych produktach zastosowana została technika bloczków parafinowych oraz skrawków mrożonych. Następnie, aby ocenić stopień fragmentacji DNA komórek produktów żywnościowych, przeprowadzony został test kometowy, co pozwoliło na wstępne określenie różnic w jakości kwasów nukleinowych obecnych w tych produktach. W celu oznaczenia zawartości badanych cząsteczek przeprowadzona była izolacja kwasów nukleinowych, a uzyskane izolaty zostały poddane elektroforezie agarozowej. Pozwoliło to na uzyskanie profili fragmentacji, a więc dokładniejsze zdefiniowanie długości fragmentów polinukleotydowych pochodzących z różnych produktów żywnościowych. Na podstawie uzyskanych wyników do badań biologicznych zostały wybrane produkty różniące się istotnie zawartością oraz jakością kwasów nukleinowych.

Drugi blok badawczy skupił się na ocenie potencjalnie odżywczej roli kwasów nukleinowych i ich pochodnych obecnych w żywności. Jak wiadomo, synteza DNA w komórkach jest niezbędna do ich prawidłowego wzrostu i proliferacji, a także podczas naprawy uszkodzonego DNA. Komórki mogą pozyskiwać prekursory niezbędne do produkcji DNA na drodze syntezy *de novo* lub na drodze odzysku z egzogennych cząsteczek. W związku z tym postawiono pytanie, czy komórki układu pokarmowego, mające dostęp do kwasów nukleinowych pochodzących z żywności, będą wchłaniały i wykorzystywały te cząsteczki we własnym metabolizmie. Postanowiono sprawdzić, czy obecność pokarmowych kwasów

nukleinowych i ich prekursorów może stymulować wzrost komórek, a także czy może wspomagać naprawę ich własnego materiału genetycznego. Dlatego drugim celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu pochodzących z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych i ich składowych na wzrost i zdolność naprawy DNA komórek wybranych linii ludzkiego układu pokarmowego. Sformułowano następujące hipotezy badawcze: **kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego oraz ich komponenty są wykorzystywane na drodze odzysku w syntezie replikacyjnej DNA, przez co wspomagają wzrost komórek ludzkiego układu pokarmowego oraz w syntezie naprawczej DNA, przez co wspomagają procesy naprawy uszkodzeń DNA w komórkach ludzkiego układu pokarmowego.** W celu sprawdzenia postawionych hipotez przeprowadzono badania *in vitro* z zastosowaniem modeli komórkowych ludzkiego układu pokarmowego. Jako główny model badawczy wykorzystano linię ludzkich komórek gruczołaka jelita grubego (HT29), będącą jedną z najpowszechniej wykorzystywanych linii w badaniach nad żywnością. Komórki te naśladują nabłonek przewodu pokarmowego mający bezpośredni kontakt z trawionym pokarmem, a ze względu na szybką regenerację charakteryzują się dużym zapotrzebowaniem na energię i składniki budulcowe. Wzmożony metabolizm komórek nowotworowych związany z intensywnym wzrostem oraz podziałami powoduje, że ich zapotrzebowanie na składniki odżywcze jest jeszcze większe, dzięki czemu stanowią one idealny model do badania zdolności wykorzystania jako budulca pochodzących z diety kwasów nukleinowych. Badania na linii HT29 zostały uzupełnione doświadczeniami przeprowadzonymi z wykorzystaniem normalnej ludzkiej linii CCD 841 CoN, będącej niestransformowanym odpowiednikiem wspomnianych komórek HT29. Komórki nienowotworowe, m.in. ze względu na zachodzący w nich proces starzenia oraz zdecydowanie wolniejsze tempo wzrostu i podziałów komórkowych, nie są tak powszechnie wykorzystywane w badaniach nad żywnością, dlatego przeprowadzono na nich jedynie część eksperymentów dla wybranych próbek.

Ponieważ strawione w przewodzie pokarmowym kwasy nukleinowe pochodzące z żywności po wchłonięciu w jelicie są transportowane do wątroby, część badań została powtórzona także dla linii HepG2 (komórki raka wątrobowokomórkowego).

W celu zbadania wpływu pochodzących z żywności kwasów nukleinowych oraz ich komponentów na wzrost komórek układu pokarmowego wykorzystano test MTT. Aby sprawdzić, czy komórki zdolne są do wykorzystywania badanych cząsteczek w syntezie replikacyjnej DNA, warunki testu MTT zmodyfikowano poprzez dodatek hydroksymocznika, który zaburza proces syntezy DNA w komórkach. Następnie, w celu sprawdzenia zdolności komórek do wykorzystywania pokarmowych kwasów nukleinowych i ich komponentów w syntezie naprawczej DNA, przeprowadzono test kometowy. Aby zainicjować procesy naprawcze, materiał genetyczny komórek uszkadzano działaniem czynnika genotoksycznego, tj. nadtlenu wodoru. Dodatkowo, w celu zwiększenia czułości testu, zastosowano kofeinę, będącą czynnikiem zaburzającym procesy naprawy DNA w komórkach. Wykorzystany zestaw technik badawczych umożliwił wstępną charakterystykę kwasów nukleinowych znajdujących się w produktach żywnościowych różnego pochodzenia oraz pozwolił na zbadanie zdolności wykorzystywania tych cząsteczek przez komórki ludzkiego układu pokarmowego.

Niniejsza praca doktorska została zrealizowana w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej pod opieką prof. dr hab. inż. Agnieszki Bartoszek.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1. Materiał badawczy

Materiałem wykorzystywanym do badań były produkty żywnościowe reprezentowane przez surowe tkanki zwierzęce, roślinne oraz grzyby. Analizie poddano udo, pierś oraz wątrobę drobiową ze świeżej kury pozyskanej z lokalnej wsi na Pomorzu. Mięso po uboju było przechowywane chłodniczo (4°C) przez 48 h, a następnie rozporcjowane i zamrożone w temperaturze -80°C. Fasola szparagowa (*Phaseolus vulgaris L.*) została zebrana w przydomowym ogrodzie na Pomorzu, kalarepa (*Brassica oleracea var. gongylodes L.*), ziemniak (*Solanum tuberosum L.*), seler naciowy (*Apium graveolens var. Dulce*) oraz pieczarki (*Agaricus bisporus*) zostały zakupione w lokalnym supermarkecie, następnie były przechowywane chłodniczo przez 24-72 h i zamrożone w temperaturze -80°C. Do przygotowania preparatów mikroskopowych techniką kriosekcji wykorzystano wątrobę drobiową oraz konserwową fasolę szparagową (Bonduelle) zakupione w lokalnym markecie. W technice bloczków parafinowych oraz kriosekcji użyto świeżych tkanek, a materiał do pozostałych badań przechowywano w temperaturze -80°C.

Do eksperymentów na liniach komórkowych wykorzystano komercyjnie dostępne nukleozydy: adenozyne (A), cytydine (C), guanozyne (G), urydine (U), 2'-deoksyadenozyne (dA), 2'-deoksycytydine (dC), 2'-deoksyguanozyne (dG), tymidine (T) (Sigma-Aldrich) jako związki reprezentujące końcowe produkty trawienia kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym.

3.2. Odczynniki chemiczne

W tab. 3. zestawiono spis odczynników chemicznych wykorzystywanych podczas wykonywania badań.

Tabela 3. Odczynniki chemiczne wykorzystywane do badań

Nazwa	Producent
Agaroz, Basica LE	Prona
Agaroz o niskiej temperaturze żelowania LMP	Sigma-Aldrich
Agaroz o normalnej temperaturze żelowania NMP	Bioline
Antybiotyki penicylina (10.000 U) i streptomycyna (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich

Nazwa	Producent
Bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenyloctetrazolu (MTT)	Sigma-Aldrich
Bufor obciążający FastGene, 6x stężony	Nippon Genetics
Chlorek sodu (NaCl) cz.d.a	POCH
Chloroform	POCH
Dimetylosulfotlenek (DMSO) bezwodny $\geq 99,9\%$	Sigma-Aldrich
Etylowy alkohol 96% cz.d.a.	POCH
Etylowy alkohol bezwodny 99,8% cz.d.a.	POCH
Fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1, v/v/v)	Sigma Aldrich
Formaldehyd 36-38% cz.d.a.	POCH
Formaldehyd 4% w buforze fosforanowym	Maga-Herba
GelRed, 10000x stężony, w wodzie	Biotium
Glicerol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Hematoksylina wg Delafielda	Chempur
Histosec parafina histologiczna	Merck
Hoechst 33342 20 mM	Thermo Scientific
Kofeina	Sigma-Aldrich
Ksilen (mieszanina izomerów) cz.d.a.	POCH
Kwas chlorowodorowy (HCl) 37%	POCH
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) $>99\%$	Sigma-Aldrich
Kwas ortoborowy $>99,9\%$	POCH
Kwas octowy lodowaty 100%	Merck
L-glutamina roztwór 200 mM	Sigma-Aldrich
Marker wielkości, 1 kb DNA Ladder Plus	Nippon Genetics
Nadtlenek wodoru 30% (w/w)	Sigma-Aldrich
NeoMount bezwodny środek do osadzania do mikroskopii	Merck
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	Sigma-Aldrich
Płyn do mrożenia tkanek (Tissue Freezing Medium)	Leica
Pożywka Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Sigma-Aldrich
Pożywka McCoy's 5A Medium Modified	Sigma-Aldrich
Pożywka Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich
Proteinaza K z <i>Tritirachium album</i> w buforze Tris/ HCl pH = 7,5, 20 mg/mL	Merc
Siarczan dodecyłu sodu (SDS) $\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich
Sól fizjologiczna buforowana fosforanami (PBS)	Sigma-Aldrich
Sól sodowa eozyny Y	Serva
SYBR Green I	Sigma-Aldrich

Nazwa	Producent
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trizma-base $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Trypsyna-EDTA 10x stężona	Sigma-Aldrich
Woda destylowana	Millipore
Wodorotlenek sodu (NaOH) cz.d.a.	Chempur
Zestaw do izolacji DNA NucleoSpin® Food	Macherey-Nagel
Zestaw do izolacji DNA NucleoSpin® Plant II	Macherey-Nagel
Żelatyna spożywcza, wieprzowa	Lidl

W tab. 4. przedstawiono spis roztworów wykorzystywanych podczas wykonywania badań.

Tabela 4. Roztwory wykorzystywane do badań

Nazwa roztworu	Sposób przygotowania
0,25% (w/v) roztwór eozyny	1 g eozyny rozpuścić w 400 mL 70% roztworu alkoholu etylowego
0,5% (w/v) roztwór żelatyny	0,5 g żelatyny rozpuścić w 100 mL wody destylowanej
0,8%, 1% (w/v) agarozą LMP	Do 10 mL buforu PBS dodać odpowiednią ilość agarozy LMP (0,08 g lub 0,1 g), podgrzewać w kuchenke mikrofalowej do upłynnienia
1% (w/v) agarozą NMP	Do 100 mL wody destylowanej dodać 1 g agarozy NMP, podgrzewać w kuchenke mikrofalowej do upłynnienia
1% (w/v) żel agarozowy do elektroforezy izolatów kwasów nukleinowych	Do 50 mL buforu TBE dodać 0,5 g agarozy (Basica LE), podgrzewać w kuchenke mikrofalowej do upłynnienia
5 M roztwór NaCl	29,22 g NaCl rozpuścić w 70 mL wody destylowanej, dopełnić wodą do 100 mL
50%, 60%, 70%, 80% (v/v) roztwory alkoholu etylowego	Alkohol etylowy 96% rozcieńczyć wodą destylowaną w określonych proporcjach EtOH:H ₂ O (50% - 25:23, 60% - 5:3, 70% - 35:13, 80% - 5:1)
90% (v/v) roztwór glicerolu	Glicerol rozcieńczyć buforem PBS w stosunku 9:1.
Bufor do lizy (do izolacji DNA)	Na 2 mL buforu: zmieszać 40 μ L 1 M wodnego roztworu Tris o pH = 8, 8 μ L 5 M wodnego roztworu NaCl, 80 μ L 0,5 M wodnego roztworu EDTA o pH = 8, 200 μ L 10% (w/v) wodnego roztworu SDS, 60 μ L 20 mg/mL proteinazy K oraz 1612 μ L wody destylowanej
Bufor do elektroforezy (do testu kometowego)	Do 1 L wody destylowanej dodać 0,372 g EDTA, a następnie stopniowo dodawać 12 g NaOH mieszając, schłodzić w lodówce, pH > 13 (można przygotować 10x stężony i rozcieńczyć wodą przed użyciem)
Bufor PBS	1 tabletkę PBS rozpuścić w 200 mL wody destylowanej

Nazwa roztworu	Sposób przygotowania
Bufor TBE (do elektroforezy izolatów kwasów nukleinowych)	10,8 g Trizma-base i 5,5 g kwasu borowego rozpuścić w 900 mL wody destylowanej, dodać 4 mL 0,5 M wodnego roztworu EDTA o pH = 8, ustalić pH = 8,3, uzupełnić wodą destylowaną do 1 L (można przygotować 10x stężony i rozcieńczyć wodą przed użyciem)
Bufor TBE (do testu kometowego)	Do 900 mL wody destylowanej dodać 0,545 g Trizma-base, 0,278 g kwasu borowego oraz 0,029 g EDTA, doprowadzić do pH = 8,4, uzupełnić wodą destylowaną do 1 L (można przygotować 10x stężony i rozcieńczyć wodą przed użyciem)
Bufor TBE z 2,5% SDS (w/v)	Do 100 mL buforu TBE dodać 2,5 g SDS
Bufor TE (do izolacji DNA)	Na 2 mL buforu: zmieszać 20 µL 1 M wodnego roztworu Tris o pH = 8, 4 µL 0,5 M wodnego roztworu EDTA o pH = 8 oraz 1976 µL wody destylowanej
Bufor TE (do przygotowania roztworu SYBR Green)	Do 800 mL wody destylowanej dodać 1,576 g Tris-HCl oraz 0,372 g EDTA, doprowadzić do pH = 7,5, uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1 L (można przygotować 10x stężony i rozcieńczyć wodą przed użyciem)
Bufor Tris-HCl	Do 800 mL wody destylowanej dodać 48,456 g Trizma-base, doprowadzić do pH = 7,5, uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1 L
Ksylen:absolutny alkohol etylowy (v/v)	Ksylen zmieszać z absolutnym alkoholem etylowym w określonych stosunkach (1:3, 1:1, 3:1)
Parafina:ksylen (v/v)	Parafinę termostatowaną w 58°C zmieszać z ksylenem w stosunku 9:1
Roztwór A	Do 800 mL wody destylowanej dodać 146,1 g NaCl, 37,2 g EDTA oraz 1,2 g Trizma-base, stopniowo dodawać 7 g NaOH mieszając, doprowadzić do pH = 10, uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1 L, schłodzić w lodówce
Roztwór B	Do 90 mL wody destylowanej dodać 10 mL Triton X-100, mieszać do rozpuszczenia i schłodzić w lodówce
Roztwór barwnika Hoechst 33342	Do 10 mL wody destylowanej dodać 10 µL handlowego preparatu barwnika
Roztwór do rozcieńczania	Na 2 mL roztworu: zmieszać 60 µL 5 M wodnego roztworu NaCl, 20 µL 0,5 M wodnego roztworu EDTA o pH = 8 oraz 1920 µL wody destylowanej
Roztwór FAA	Do 100 mL 96% alkoholu etylowego dodać 70 mL wody destylowanej, 20 mL 37% formaldehydu oraz 10 mL lodowatego kwasu octowego
Roztwór lizujący AB	Bezpośrednio przed użyciem zmieszać 90 mL roztworu A z 10 mL roztworu B
Roztwór MTT	0,8 g MTT rozpuścić w 200 mL wody destylowanej
Roztwór SYBR Green	Do 200 mL buforu TE dodać 30 µL barwnika rozcieńczonego w 2,97 mL DMSO, przechowywać w lodówce chroniąc przed dostępem światła
Trypsyna x1	Trypsynę rozcieńczyć 10-cio krotnie buforem PBS

3.3. Aparatura

W tab. 5. przedstawiono aparaturę wykorzystywaną podczas wykonywania badań.



Tabela 5. Aparatura oraz materiały zużywalne wykorzystywane do badań

Nazwa	Model, producent
Aparat do analizy żeli z oprogramowaniem Image Lab	Gel Doc XR+, BioRad
Aparat do elektroforezy	Basic, Biorad
Aparat do oczyszczania wody	Millipore Elix 5
Aspirator	Integra Vacusafe, Integra
Cieplarka	Binder
Homogenizator	Pellet Mixer, VWR
Laboratoryjna płyta grzejna	DHN
Licznik komórek	Scepter 2.0 Cell Counter, Merck
Inkubator laboratoryjny	Heal Force Smart Cell HF90
Komora laminarna	Airstream ESCO Class II BSC
Kriostat	CM 1520, Leica
Mieszadło magnetyczne	MSC basic C, Yellow Line
Mikroskop	Fluorescent Cell Analyser, Juli TM Smart
Mikroskop fluorescencyjny sprzężony z oprogramowaniem Metafer	Axio Imager.Z2, Zeiss
Mikroskop optyczny	BX 60, Olympus
Ręczny mikrotom rotacyjny	RM50H, Biomed
Spektrofotometr UV/VIS	NanoDrop 2000c, Thermo Scientific
Spektrofotometryczny czytnik płytek UV/VIS	Infinite M200, Tecan
Suszarka	Binder
Termoblok	QBD4, Grant
Waga analityczna	XS204, Mettler Toledo
Wirówka	Centrifuge 5415 R, Eppendorf

3.4. Metody badawcze - część analityczna

3.4.1. Przygotowanie bloczków parafinowych i preparatów mikroskopowych

a. Tkanki zwierzęce

W celu wizualizacji kwasów nukleinowych w badanych tkankach składników żywności, z analizowanego materiału przygotowano bloczki parafinowe oraz preparaty mikroskopowe. Z każdej tkanki wycięto fragmenty o wymiarach ok. 0,2 x 0,9 x 1,4 cm (wys. x szer. x dł.). Próbki mięsa utrwalano w 4% formaldehydzie

w buforze fosforanowym przez 24 h, a następnie płukano pod bieżącą wodą przez 24 h. Po tym czasie próbki przeniesiono do 50% roztworu alkoholu etylowego na 1 h, po czym tkanki kolejno przenoszono do roztworów etanolu o wzrastającym stężeniu (60%, 70%, 80%, 96% alkoholu). W 80% roztworze próbki przetrzymywano przez całą noc, a w pozostałych roztworach przez 1 h. Następnie tkanki dwukrotnie odwadniano w absolutnym alkoholu etylowym (każde płukanie 1 h). Po odwodnieniu próbki przeniesiono na 10 min do mieszaniny ksylen:absolutny alkohol etylowy (1:1 v/v), po czym przeniesiono je do czystego ksyleny w celu przepojenia tkanek rozpuszczalnikiem (dwukrotne płukanie ksylenem przez 30 min do 1 h). Następnie tkanki zanurzono w mieszaninie parafina:ksylen (9:1 v/v) i umieszczono w cieplarni w temp. 58°C na 1 h. W kolejnym kroku próbki przeniesiono do upłynnionej parafiny termostatowanej w 58°C na 24 h. Po tym czasie tkanki umieszczono w metalowych formach wypełnionych ciekłą parafiną, którą odpowietrzono przez przelanie jej po rozżarzonych, metalowych szczypcach. Aby nie dopuścić do powstania pęcherzy powietrza w bloczku, rozgrzane do czerwoności szczypce kilkakrotnie zanurzano w parafinie tak, aby nie dotknąć znajdującej się w niej tkanki. Metalowe formy pozostawiono na lodzie do czasu zastygnięcia parafiny, po czym wyjęto z nich parafinowe bloczki. Tak przygotowane próbki przycinano do kształtu ściętego ostrosłupa i mocowano na drewnianych klockach, które umieszczono w ramieniu ręcznego mikrotomu rotacyjnego. Bloczki krojono na skrawki o grubości 7 µm. Skrawki przenoszono na odtłuszczone szkiełka podstawowe pokryte uprzednio lepikiem, a następnie nakraplano na nie wodę i przenoszono na płytę grzejną rozgrzaną do temp. 37°C w celu rozprostowania i przyklejenia się skrawków do powierzchni szkiełek. Po wyschnięciu przygotowane preparaty przechowywano w temp. pokojowej w zamkniętym pojemniku.

b. Tkanki roślinne i grzyby

Bloczki parafinowe przygotowano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Weigel i Glazebrook (Weigel i Glazebrook, 2008) z modyfikacjami. Z kalarepy, ziemniaka, selera naciowego i pieczarek wycięto fragmenty o wymiarach ok. 0,2 x 0,9 x 1,4 cm (wys. x szer. x dł.), natomiast w przypadku fasoli szparagowej

wykorzystano całe nasiona bez przycinania. Próbkę utrwalano poprzez umieszczenie ich w zlewkach z roztworem FAA, a następnie wstawiono do eksykatora i za pomocą pompki wodnej obniżono ciśnienie. Próżnię utrzymywano przez 15 min, po czym procedurę powtórzono. Następnie tkanki zanurzono w świeżej porcji roztworu FAA na 4 h. Po tym czasie próbki przeniesiono do 50% roztworu alkoholu etylowego na 30 min, po czym tkanki kolejno przenoszono do roztworów alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (60%, 70%, 80%, 96% alkoholu). W 80% roztworze próbki przetrzymywano przez całą noc, a w pozostałych roztworach przez 30 min. Następnie tkanki dwukrotnie odwadniano w absolutnym alkoholu etylowym (pierwsze płukanie przez 1 h, drugie płukanie przez 30 min). Po odwodnieniu próbki płukano kolejno w mieszaninach ksylenu i absolutnego alkoholu etylowego (1:3, 1:1, 3:1 v/v), w każdym roztworze przez 30 min, a następnie dwukrotnie w czystym ksylenu (każde płukanie przez 1 h). Dalsze etapy przeprowadzono analogicznie jak dla tkanek zwierzęcych.

3.4.2. Przygotowanie preparatów mrożonych

W celu porównania techniki bloczków parafinowych z alternatywną techniką wykorzystującą kriostat przygotowano preparaty mikroskopowe z zastosowaniem kriosekcji. Z wątroby drobiowej wycięto fragmenty o wymiarach ok. 0,5 x 0,5 x 1 cm (wys. x szer. x dł.), natomiast w przypadku konserwowej fasoli szparagowej wykorzystano całe nasiona bez przycinania. Tkanki przeniesiono do plastikowych form wypełnionych częściowo płynem do mrożenia (*Tissue Freezing Medium*), a następnie zalano płynem w celu pełnego pokrycia próbek. Za pomocą pęsety formy zanurzano w ciekłym azocie na ok. 2 min, po czym przeniesiono je do kriostatu utrzymującego temp. -20°C na ok. 15 min. Uformowane bloczki wyjęto z form i umieszczono w ramieniu mikrotomu wbudowanym w kriostat, a następnie krojono na skrawki o grubości 10 μm . Skrawki przenoszono na szkiełka podstawowe pokryte uprzednio 0,5% (w/v) wodnym roztworem żelatyny. Tak przygotowane preparaty pozostawiono na 10 min w temp. pokojowej w celu pełnego przyklejenia się skrawków do szkiełek mikroskopowych, a następnie przeniesiono do temp. 4°C .

3.4.3. Barwienie i obserwacja preparatów mikroskopowych

W celu wybarwienia przygotowanych z bloczków parafinowych preparatów mikroskopowych i obserwacji kwasów nukleinowych obecnych w próbkach niezbędne było ich wcześniejsze odparafinowanie. W tym celu preparaty dwukrotnie płukano w ksylie (każde płukanie przez 2 min), a następnie kolejno w roztworach alkoholu etylowego o malejącym stężeniu (alkohol absolutny dwukrotnie, 96%, 80%, 70%, 60%, każde płukanie przez 2 min). W kolejnym etapie zanurzano je w wodzie, po czym na powierzchnię preparatu tkanki nakrapiano roztwór hematoksyliny. Po 45 s preparaty płukano pod bieżącą wodą przez 20 min, zanurzano w świeżej porcji wody destylowanej, a po wyciągnięciu nakrapiano roztwór eozyny Y. Po 10 s przepłukano szkiełka wodą destylowaną. Wybarwione preparaty płukano kolejno w roztworach alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (60%, 70%, 80%, 96%, absolutny alkohol etylowy – dwukrotnie, każde płukanie przez ok. 10 s). Następnie szkiełka dwukrotnie zanurzano w ksylie (na 2 min i 5 min), po czym preparaty pokryto żywicą NeoMount i przykryto szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty uzyskane z zastosowaniem kriosekcji barwiono w następujący sposób: szkiełka zanurzano w wodzie, po czym na powierzchnię preparatu tkanki nakrapiano roztwór hematoksyliny. Po 45 s preparaty płukano pod bieżącą wodą przez 20 min, zanurzano w świeżej porcji wody destylowanej, a po wyciągnięciu nakrapiano roztwór eozyny Y. Po 10 s przepłukano szkiełka wodą destylowaną, po czym preparaty pokryto żywicą NeoMount i przykryto szkiełkami nakrywkowymi. Tak przygotowane próbki pozostawiono do wyschnięcia i utwardzenia żywicy na co najmniej jeden dzień. Po tym czasie preparaty obserwowano w świetle widzialnym pod mikroskopem sprzężonym z kamerą cyfrową zapewniającą 20-krotne powiększenie.

Część preparatów wybarwiono barwnikami fluorescencyjnymi Hoechst 33342 oraz SYBR Green. Analogicznie jak w przypadku barwienia eozyną Y i hematoksyliną, preparaty z bloczków parafinowych poddano odparafinowaniu i uwodnieniu poprzez płukanie w ksylie i w szeregu alkoholowym. Następnie szkiełka płukano w wodzie, po czym nakrapiano roztwór barwnika. W przypadku barwnika Hoechst 33342 barwienie trwało 10 min, natomiast w przypadku barwnika

SYBR Green – 20 min (każdy barwnik na osobnym preparacie). Ten etap przeprowadzano chroniąc preparaty przed dostępem światła. Po inkubacji z barwnikami szkiełka płukano w wodzie przez 1 min, a następnie pokrywano je niewielką ilością 90% roztworu gliceryny i przykrywano szkiełkami nakrywkowymi. Dla zabezpieczenia przed wysychaniem brzegi szkiełek pokrywano lakierem do paznokci. Do czasu obserwacji preparaty przechowywano w lodówce chroniąc je przed dostępem światła. Preparaty uzyskane z zastosowaniem kriosekcji barwiono analogicznie, z pominięciem etapu odparafinowania i uwodnienia. Dodatkowo przygotowano preparat z chityny, którą naniesiono na szkiełko podstawowe i pokryto 0,8% agarozą LMP, przykryto szkiełkiem nakrywkowym i pozostawiono na lodzie na 5 min. Następnie szkiełko usunięto, a preparat wybarwiono Hoechst 33342. Obserwacje mikroskopowe prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego sprzężonego z kamerą cyfrową zapewniającą 20-krotne powiększenie.

3.4.4. Określenie stopnia degradacji kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych

W celu określenia stopnia degradacji kwasów nukleinowych w tkankach badanych składników żywności przeprowadzono test kometowy, który jest uznaną metodą pomiaru uszkodzeń DNA w komórkach eukariotycznych. W teście tym niewielka ilość komórek badanego materiału zawieszana jest w żelu agarozowym nałożonym na szkiełko mikroskopowe, poddana lizie, a następnie elektroforezie. Podczas elektroforezy następuje migracja pofragmentowanego jądrowego DNA, co skutkuje powstaniem struktur przypominających kształtem komety. Preparat po wybarwieniu poddaje się analizie z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego. Stosunek intensywności fluorescencji ogona do głowy komety jest miarą fragmentacji DNA (Collins, 2004).

a. Tkanki zwierzęce

Test kometowy dla produktów zawierających tkanki zwierzęce przeprowadzono zgodnie z normą PNEN 13784:2003 z modyfikacjami. Z mięsa przechowywanego w -80°C zeskrobano ostrym skalpelem po ok. 1 g materiału i przeniesiono do

zlewek, a następnie zalano 5 mL zimnego (4°C) buforu PBS. Zawiesinę mieszano na mieszadle magnetycznym (500 rpm, 5 min) w łaźni lodowej. Po tym czasie homogenat przefiltrowano przez gazę w celu usunięcia większych fragmentów tkanek. Dodatkowo, filtrat uzyskany z kurzej wątroby, ze względu na dużą gęstość hepatocytów, rozcieńczono buforem PBS w stosunku 1:3. Przesącz pozostawiono na lodzie na 5 min, następnie pobrano 20 μ L zawiesiny komórek z osadu i zmieszano z 200 μ L 0,8% (w/v) roztworu agarozy LMP termostatowanej w 42°C. Natychmiast naniesiono po dwie krople (35 μ L każda) na szkiełka podstawowe pokryte uprzednio warstwą 1% (w/v) roztworu agarozy NMP, przykryto szkiełkami nakrywkowymi i od razu przeniesiono na lód na co najmniej 5 min w celu zestalenia naniesionej zawiesiny w agarozie. Następnie delikatnie usunięto szkiełka nakrywkowe, a preparaty z żelami agarozowymi umieszczono na 10 min w buforze lizującym (bufor TBE z 2,5% SDS) w temperaturze pokojowej w celu usunięcia błon i rozpuszczalnych składników komórek. Po tym czasie preparaty przeniesiono do aparatu do elektroforezy, zalano buforem TBE do wysokości 24 mm ponad powierzchnię szkiełek i pozostawiono na 5 min (etap rozwijania chromatyny). Następnie, nie zmieniając buforu, przeprowadzono rozwinięcie jądrowego DNA na drodze elektroforezy (2 V/cm, 2 min, temp. pokojowa). Po jej zakończeniu preparaty płukano przez 5 min w wodzie, po czym wysuszono je na powietrzu. Tak uzyskane jądra komórkowe zawieszono w żelach agarozowych, unieruchomiono na szkiełkach mikroskopowych, barwiono zimnym (4°C) roztworem barwnika SYBR Green (w komorze do barwienia na wytrząsarce laboratoryjnej) przez 30 min bez dostępu światła, a następnie płukano wodą przez 10 min w tych samych warunkach. Po tym czasie żele przykryto szkiełkami nakrywkowymi, a immobilizowane w nich wybarwione jądra komórkowe poddano analizie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Zeiss Axio Imager.Z2) sprzężonego z oprogramowaniem Metafer 4. W przypadku tkanek zwierzęcych komety obserwowano pod 50-krotnym powiększeniem, a w każdej analizie uwzględniano po 100 kolejnych obiektów na pojedynczym żelu lub wszystkie, gdy obiektów było mniej niż 100.

b. Tkanki roślinne i grzyby

Test kometowy dla tkanek roślinnych i grzybów przeprowadzono zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Pourrut i wsp. (Pourrut i in., 2015) z modyfikacjami. Z tkanek przechowywanych w -80°C odważono po ok. 450 mg materiału i przeniesiono do szklanych szalek Petriego umieszczonych na lodzie. Próbkę zalano 1,5 mL zimnego (4°C) buforu Tris-HCl i energicznie siekano żyłką przez 30 s. Płytki pozostawiono przechylone na lodzie na 5 min, po czym zawiesinę przefiltrowano przez gazę w celu usunięcia większych fragmentów tkanek. Przesącz przetrzymywano na lodzie. Otrzymaną zawiesinę komórek ($90\ \mu\text{L}$) zmieszano z $150\ \mu\text{L}$ 1% agarozy LMP termostatowanej w 42°C . Natychmiast naniesiono po dwie krople ($80\ \mu\text{L}$ każda) na szkiełka podstawowe pokryte uprzednio 1% agarozą NMP, przykryto szkiełkami nakrywkowymi i przeniesiono na lód na co najmniej 5 min w celu zestalenia agarozy. Następnie delikatnie usunięto szkiełka nakrywkowe, a preparaty z żelami agarozowymi umieszczono w aparacie do elektroforezy uprzednio wypełnionym zimnym (4°C) buforem elektroforetycznym o pH powyżej 13. Próbkę pozostawiono w buforze na 15 min (etap rozwijania chromatyny). Następnie, nie zmieniając buforu, przeprowadzono rozwinięcie jądrowego DNA na drodze elektroforezy ($0,72\ \text{V/cm}$, $300\ \text{mA}$ – regulowane za pomocą poziomego buforu - 5 min, 4°C). Po jej zakończeniu preparaty płukano trzykrotnie w buforze Tris-HCl (każde płukanie 5 min), po czym wysuszono na powietrzu. Tak uzyskane jądra komórkowe zawieszono w żelach agarozowych, unieruchomiono na szkiełkach mikroskopowych, barwiono analogicznie jak preparaty przygotowane z tkanek zwierzęcych. Komety obserwowano pod 100-krotnym powiększeniem, a w każdej analizie uwzględniano po 100 kolejnych obiektów na pojedynczym żelu lub wszystkie, gdy obiektów było mniej niż 100.

3.4.5. Izolacja DNA z wybranych produktów żywnościowych

Izolację DNA z wątroby drobiowej oraz nasion fasoli szparagowej przeprowadzono zgodnie z opisaną wcześniej procedurą z wykorzystaniem metody ekstrakcji rozpuszczalnikami (Cieślewicz i in., 2021) z odpowiednimi modyfikacjami. Z zamrożonej uprzednio w -80°C wątroby drobiowej zeskrabano porcję tkanki skalpelem i odważono po ok. 25 mg do eppendorfów ($1,5\ \text{mL}$).

W przypadku fasoli nasiona wyłuskano z zamrożonych wcześniej w -80°C strąków i odważono po ok. 25 mg do eppendorfów (1,5 mL). Do próbek dodano 200 μL buforu lizującego (20 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 1% (w/v) SDS, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ proteiny K) i zhomogenizowano zawartość ręcznym homogenizatorem (PelletMixer, VWR). Próbki inkubowano w 37°C przez 1,5 h w celu umożliwienia optymalnego działania proteiny K, inaktywacji nukleaz oraz uwolnienia kwasów nukleinowych z komórek, a następnie w 56°C przez 1,5 h w przypadku wątroby drobiowej lub przez 3 h w przypadku fasoli szparagowej, w celu denaturacji białek i oddzielenia ich od kwasów nukleinowych. Po inkubacji rozcieńczono lizaty roztworem do rozcieńczania (150 mM NaCl, 5 mM EDTA) w stosunku 1:1 (v/v). Dodano mieszaninę fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1, v/v/v) do próbek w stosunku 1:1 (v/v) i worteksowano przez 30 s, a następnie zwirowano (2 min, 13.000 rpm w przypadku wątroby drobiowej lub 4 min, 13.000 rpm w przypadku fasoli szparagowej) w temperaturze pokojowej w celu rozdzielania faz. Fazy wodne (górne), zawierające kwasy nukleinowe, przeniesiono do nowych eppendorfów (1,5 mL), dodano chloroform w stosunku 1:1 (v/v) i ponownie worteksowano przez kilka sekund, po czym próbki zwirowano (2 min, 13.000 rpm) w temperaturze pokojowej. Fazy wodne przeniesiono do nowych eppendorfów (1,5 mL), dodano 5 M NaCl do osiągnięcia końcowego stężenia 250 mM NaCl i wymieszano (stosunek objętościowy 5 M NaCl do fazy wodnej = 1:19). Do próbek dodano dwie objętości 99,8% etanolu, przeniesiono je do 4°C (do lodówki) i pozostawiono na noc w celu wytrącenia DNA. Następnego dnia próbki zwirowano (30 min, 13.000 rpm, 4°C), supernatant odrzucono, a wytrącony DNA przemyto zimnym 70% etanolem i ponownie zwirowano (10 min, 13.000 rpm, 4°C). Supernatant ostrożnie usunięto za pomocą pipety, a wytrącony DNA pozostawiono do wyschnięcia na lodzie w komorze laminarnej. Po całkowitym odparowaniu etanolu, DNA zawieszono w 310 μL buforu TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) w przypadku wątroby, lub w 210 μL w przypadku fasoli, i pozostawiono w lodówce do rozpuszczenia. Następnego dnia oznaczono spektrofotometrycznie czystość i stężenie DNA w uzyskanych izolatach (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific), a następnie próbki przeniesiono do -20°C . Izolaty

uzyskane z zastosowaniem ekstrakcji rozpuszczalnikami zostały wykorzystane do dalszych badań w hodowli komórkowej.

Izolację DNA przeprowadzono także z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów. Do ekstrakcji DNA z wątroby drobiowej zastosowano zestaw NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel) przeznaczony do izolacji DNA z próbek żywności. Tkanę zeszkrobano skalpelem z zamrożonego kawałka mięsa i odważono po ok. 25 mg do eppendorfów (1,5 mL). Po dodaniu buforu lizującego przeprowadzono homogenizację próbek za pomocą ręcznego homogenizatora (PelletMixer, VWR). Następnie dodano proteinazę K w celu strawienia białek i inaktywacji nukleaz i inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. Po zwirowaniu pozostałości tkanki, lizaty przeniesiono do nowych eppendorfów i dodano bufor wiążący DNA oraz etanol. Mieszaniny zworteksowano i naniesiono na kolumnienki wiążące DNA. Po zwirowaniu, kolumnienki przepłukano buforami do przemywania. DNA eluowano 100 µL podgrzanego do 70°C 5 mM buforu Tris/HCl o pH 8,5. Czystość i stężenie wyizolowanego DNA oznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Uzyskany materiał przeniesiono do -20°C.

Do izolacji DNA z nasion fasoli szparagowej wykorzystano komercyjnie dostępny zestaw NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel) przeznaczony do izolacji DNA z próbek roślinnych. Z zamrożonych strąków fasoli wyłuskano nasiona i odważono po ok. 25 mg do eppendorfów (1,5 mL). Po dodaniu buforu lizującego (bufor zawierający CTAB lub SDS) przeprowadzono homogenizację próbek za pomocą ręcznego homogenizatora (PelletMixer, VWR). Następnie dodano RNazę A w celu usunięcia obecnego w próbce RNA i inkubowano przez 30 min w temp. 65°C. W przypadku zastosowania buforu lizującego zawierającego SDS, po inkubacji do eppendorfów dodano octanu potasu i przeniesiono na 5 min na lód w celu całkowitego wytrącenia detergentu. Wszystkie próbki zwirowano, a supernatanty poddano filtracji przy użyciu kolumnienek filtrujących. Następnie dodano bufor wiążący DNA, próbki wymieszano na wortexie i naniesiono mieszaniny na kolumnienki wiążące DNA. Po zwirowaniu, kolumnienki przepłukano buforami do przemywania. DNA eluowano 2 x 50 µL podgrzanego do 65°C buforu Tris/HCl (5 mM) o pH 8,5. Czystość i stężenie wyizolowanego DNA oznaczono

spektrofotometrycznie (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Uzyskany materiał przeniesiono do -20°C .

3.4.6. *Oznaczenie zawartości suchej masy dla wybranych produktów żywnościowych*

Zawartość suchej masy w wątrobie drobiowej oraz nasionach fasoli szparagowej oznaczono metodą wagowo-suszarkową. Około 1 g zhomogenizowanych próbek umieszczono w wysuszonych i zważonych naczynkach wagowych zawierających piasek. Po utarciu próbek z piaskiem naczynka zważono i przeniesiono do suszarki (Binder). Próbkę suszono w temp. 105°C do stałej masy. Oznaczenie dla każdej z próbek wykonano w trzech powtórzeniach. Zawartość suchej masy w próbkach obliczono z wykorzystaniem następującego wzoru:

$$\text{zawartość suchej masy [\%]} = 100\% - (m_1 - m_2) \times 100\% / (m_1 - m_3)$$

gdzie:

m_1 - masa naczynka z próbką przed suszeniem [g],

m_2 - masa naczynka z próbką po wysuszeniu [g],

m_3 - masa naczynka bez próbki [g].

3.4.7. *Elektroforeza agarozowa wyizolowanych kwasów nukleinowych*

Elektroforezę uzyskanych izolatów przeprowadzono w 1% żelu agarozowym. W szklanej kolbie Erlenmeyera zmieszano 0,5 g agarozy (Basica LE) z 50 mL buforu TBE i ogrzano w kuchence mikrofalowej do rozpuszczenia. Po ochłodzeniu dodano 2 μL barwnika GelRed, całość wymieszano i wylano żel do formy. Po zastygnięciu umieszczono żel w aparacie do elektroforezy i zalano buforem TBE. Izolaty (bez rozcieńczenia) wymieszano z buforem obciążającym (8 μL izolatu + 2 μL buforu) i naniesiono na żel, po 10 μL do studzienki. Dodatkowo na żel naniesiono również marker wielkości DNA zawierający fragmenty od 100 do 10 000 pz. Elektroforezę prowadzono przez 1,5 h, 80 V w temp. pokojowej. Wizualizację elektroforegramu uzyskano w świetle UV z wykorzystaniem aparatu Gel Doc XR+ (BioRad) z oprogramowaniem Image Lab.

3.5. Metody badawcze - część biologiczna

3.5.1. *Prowadzenie hodowli komórkowej*

W badaniach wykorzystywano ludzkie linie komórkowe HT29 (komórki gruczolaka jelita grubego), CCD 841 CoN (prawidłowe komórki jelita grubego) oraz HepG2 (komórki raka wątrobowokomórkowego) pochodzące z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection). Hodowlę prowadzono z zastosowaniem odpowiednio pożywki McCoy's 5A Medium Modified z dodatkiem penicyliny (100 U/mL) i streptomycyny (0,1 mg/mL), L-glutaminy (0,22 g/L) oraz FBS (10% (v/v)) dla linii HT29, Minimum Essential Medium Eagle z dodatkiem penicyliny (100 U/mL) i streptomycyny (0,1 mg/mL), L-glutaminy (0,29 g/L) oraz FBS (10% (v/v)) dla linii CCD 841 CoN oraz Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose z dodatkiem penicyliny (100 U/mL) i streptomycyny (0,1 mg/mL), L-glutaminy (0,58 g/L) oraz FBS (10% (v/v)) dla linii HepG2. Komórki w naczyniach hodowlanych inkubowano w warunkach stałej temperatury (37°C) w atmosferze zawierającej CO₂ (5%) oraz wilgotności (95%). Morfologię komórek okresowo kontrolowano przy użyciu mikroskopu Juli TM Smart. Po otrzymaniu z ATCC, komórki kontrolowano na obecność mykoplazmy z wykorzystaniem testów real-time PCR.

3.5.2. *Oznaczanie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek ludzkiego układu pokarmowego*

W celu oznaczenia wpływu badanych nukleozydów i ich mieszanin oraz egzogennych wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek HT29, CCD 841 CoN i HepG2 przeprowadzono kolorymetryczny test MTT, który opiera się na pomiarze aktywności przemian energetycznych zachodzących w mitochondriach żywych komórek. Oksydoreduktazy znajdujące się w mitochondriach redukują rozpuszczalny w wodzie, żółty bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (MTT) do nierozpuszczalnych w wodzie, fioletowych kryształów formazanu. Ilość powstających kryształów

związana jest z aktywnością redukcyjną komórek, dzięki czemu może być traktowana jako miara liczby żywych komórek.

Test MTT przeprowadzono zgodnie z procedurą stosowaną uprzednio (Baranowska i in., 2018) z niezbędnymi modyfikacjami. Dla linii CCD 841 CoN test wykonano jedynie dla wyizolowanych z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych. Komórki zaszczerpiono w dołkach transparentnych płytek 96-dołkowych (5.000 komórek na dołek dla linii HT29 i HepG2, 10.000 komórek na dołek dla linii CCD 841 CoN), w objętości 180 μL zawiesiny do dołka w przypadku traktowania nukleozydami lub w 160 μL zawiesiny do dołka w przypadku traktowania izolatami DNA, a następnie inkubowano przez 24 h w stałych warunkach (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%, wilgotność 95%), w celu przyklejenia się komórek do dna studzienek. Przed zakończeniem inkubacji przygotowano wodne roztwory badanych nukleozydów, z których po sterylizacji przez filtrację (22 μm , Millipore) wykonano rozcieńczenia dziesiętne oraz sporządzono mieszaniny. Końcowe stężenia związków wynosiły odpowiednio 0,01 - 1000 μM dla A, dA, C, dC, U, T oraz 0,01 - 100 μM dla G i dG. W mieszaninach stężenia poszczególnych związków były odpowiednio mniejsze, tak, aby sumaryczne stężenie związków wynosiło od 0,01 do 1000 μM (dla mieszanin bez G lub dG) lub od 0,01 do 100 μM (dla mieszanin zawierających G lub dG). W przypadku wyizolowanego DNA, zmierzone stężenia w ng/ μL przeliczono na stężenia molowe przyjmując za masę molową średnią masę 4 deoksynukleotydu (dAMP, dGMP, dCMP, TMP), która wynosi 327 g/mol. Izolaty zostały rozcieńczone buforem TE do otrzymania końcowych stężeń nukleotydu w zakresie 0,01 - 100 μM . Komórki traktowano przygotowanymi roztworami (w objętości 20 μL na dołek dla nukleozydów i 40 μL na dołek dla izolatów). Dodatkowo przygotowano hodowlę kontrolną traktowaną wodą (dla nukleozydów) lub buforem TE (dla izolatów). Końcowa objętość płynu w pojedynczym dołku wynosiła 200 μL . Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 6, 24 i 72 h. Po określonym czasie, za pomocą aspiratora usunięto płyn z nad komórek, a następnie dodano po 200 μL świeżej pożywki do każdej ze studzienek. Każde traktowanie wykonano w 4 powtórzeniach technicznych. Po 72 h

do wszystkich dołków dodano 50 μL roztworu MTT o stężeniu 4 mg/mL i inkubowano w stałych warunkach hodowlanych przez 3,5 h. Po zakończeniu inkubacji, za pomocą aspiratora usunięto płyn z nad krysztalów formazanu, które rozpuszczono w 50 μL DMSO. Następnie, przy pomocy spektrofotometrycznego czytnika płytek UV/VIS Tecan Infinite M200, przeprowadzono pomiar absorbancji roztworów znajdujących się w poszczególnych studzienkach (długość fali $\lambda = 540 \text{ nm}$). Test wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych. Wpływ badanych związków na wzrost komórek wyrażono jako % wzrostu komórek traktowanych nukleozydami lub izolatami w stosunku do traktowanych wodą lub buforem TE komórek kontrolnych, których wzrost przyjęto za 100%. Na podstawie obliczonych wartości „% kontroli” przygotowano wykresy przedstawiające zależność wzrostu komórek od czasu ekspozycji oraz stężenia danego związku (tzw. krzywe przeżycia). Dla linii HT29 oraz HepG2 wyniki przedstawiono również w postaci tzw. indeksów przeżywalności, które definiuje się jako suma pól powierzchni pod krzywymi przeżycia.

3.5.3. Oznaczenie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek HT29 i HepG2 z zaburzoną syntezą replikacyjną DNA

W celu zbadania zdolności komórek do wykorzystania egzogennych nukleozydów i egzogennych wyizolowanych kwasów nukleinowych w syntezie DNA przeprowadzono zmodyfikowany test MTT. Synteza DNA w komórkach została zablokowana poprzez dodanie hydroksymocznika (HU), który jest inhibitorem reduktazy rybonukleotydomowej - enzymu odpowiedzialnego za redukcję difosforanów rybonukleozydów do difosforanów deoksyrybonukleozydów (Kunos i in., 2011). Komórki zaszczipiono w dołkach transparentnych płytek 96-dołkowych (5.000 komórek na dołek), w objętości 160 μL zawiesiny do dołka w przypadku traktowania nukleozydami lub w 150 μL zawiesiny do dołka w przypadku traktowania izolatami DNA, a następnie inkubowano przez 24 h w stałych warunkach (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%, wilgotność 95%), w celu przyklejenia się komórek do dna studzienek. Przed zakończeniem inkubacji przygotowano wodne roztwory badanych związków oraz hydroksymocznika,

z których po sterylizacji przez filtrację (22 μm , Millipore) wykonano rozcieńczenia dziesiętne i sporządzono mieszaniny. Końcowe stężenia związków wynosiły odpowiednio 1 - 100 μM , a hydroksymocznika 1 i 50 mM. W mieszaninach stężenia poszczególnych nukleozwiązków były odpowiednio mniejsze, tak, aby sumaryczne stężenie związków wynosiło od 1 do 100 μM . Izolaty DNA przygotowano analogicznie jak do testu MTT otrzymując stężenia końcowe w zakresie 1 - 100 μM . Komórki traktowano hydroksymocznikiem (20 μL na dołek dla nukleozydów i 10 μL dla izolatów) i natychmiast badanymi związkami (20 μL na dołek dla nukleozydów i 40 μL na dołek dla izolatów). Dodatkowo przygotowano kontrolę z wodą (40 μL na dołek) dla nukleozydów lub z buforem TE (40 μL buforu TE i 10 μL wody) dla izolatów oraz kontrolę z hydroksymocznikiem (20 μL HU i 20 μL wody na dołek dla nukleozydów oraz 10 μL HU i 40 μL buforu TE na dołek dla izolatów). Końcowa objętość płynu w pojedynczym dołku wynosiła 200 μL . Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 24 i 72 h z dodatkiem 1 mM lub 50 mM HU. Po określonym czasie, za pomocą aspiratora usunięto płyn nad komórkami, a następnie dodano po 200 μL świeżej pożywki do każdej ze studzienek. Każde traktowanie wykonano w 3 powtórzeniach technicznych. Po 72 h do wszystkich dołków dodano 50 μL roztworu MTT o stężeniu 4 mg/mL i inkubowano w stałych warunkach hodowlanych przez 3,5 h. Po zakończeniu inkubacji za pomocą aspiratora usunięto płyn nad kryształami formazanu, które rozpuszczano w 50 μL DMSO. Następnie, przy pomocy spektrofotometrycznego czytnika płytek UV/VIS Tecan Infinite M200, przeprowadzono pomiar absorbancji roztworów znajdujących się w poszczególnych studzienkach (długość fali $\lambda = 540 \text{ nm}$). Test wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych. Wpływ badanych związków na wzrost komórek wyrażono jako % wzrostu komórek traktowanych nukleozydami lub izolatami DNA i hydroksymocznikiem w stosunku do traktowanych wodą lub buforem TE komórek kontrolnych, których wzrost przyjęto za 100%. Na podstawie obliczonych wartości „% kontroli” przygotowano wykresy przedstawiające zależność wzrostu komórek od czasu ekspozycji oraz stężenia danego związku (tzw. krzywe przeżycia). Wyniki przedstawiono również w postaci tzw. indeksów

przeżywalności, które definiuje się jako suma pól powierzchni pod krzywymi przeżycia.

3.5.4. *Oznaczanie wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na zdolność naprawy DNA komórek HT29 z zaburzoną syntezą naprawczą DNA*

W celu zbadania zdolności komórek do wykorzystania egzogennych nukleozydów i egzogennych wyizolowanych kwasów nukleinowych do naprawy własnego DNA przeprowadzono test kometowy. Naprawa DNA w komórkach została ograniczona poprzez dodanie kofeiny, która jest inhibitorem tego procesu (Sabisz i Składanowski, 2008). Komórki zaszczerpiono na transparentnych płytkach 24-dołkowych (100.000 komórek na dołek), po 1,6 mL zawiesiny do dołka, a następnie inkubowano przez 24 h w stałych warunkach (temperatura 37°C, stężenie CO₂ 5%, wilgotność 95%), w celu przyklejenia się komórek do dna studzienek. Następnie komórki traktowano kofeiną (100 µL na dołek; końcowe stężenie 1 mM) i inkubowano przez 24 h. Po tym czasie przygotowano roztwór nadtlenu wodoru, którym traktowano komórki (100 µL na dołek; końcowe stężenie 300 µM) przez 1 h, a następnie dodawano roztwory nukleozydów i ich mieszanin lub izolatów kwasów nukleinowych (200 µL na dołek) przygotowanych analogicznie jak w punkcie 3.5.3, w takim samym zakresie stężeń, i inkubowano przez 3 h. Przygotowano również kontrolę, gdzie komórki traktowano wodą (dla nukleozydów i ich mieszanin) lub buforem TE (dla izolatów kwasów nukleinowych) w miejsce badanych związków. Dodatkowo przygotowano komórki traktowane jedynie nadtlakiem wodoru lub kofeiną. Końcowa objętość płynu w pojedynczym dołku wynosiła 2 mL. Po zakończeniu inkubacji płytkę z komórkami umieszczono na lodzie, komórki z poszczególnych dołków zeszkrobano skrobakiem i przeniesiono po 1 mL zawiesiny do eppendorfów. Zawiesinę zwirowano (5 min, 4000 g, 4°C), supernatant usunięto, a komórki przepłukano 1 mL zimnego (4°C) buforu PBS i ponownie zwirowano (10 min, 4000 g, 4°C). Supernatant usunięto, pozostawiając ok. 50 µL płynu w eppendorfach. Komórki rozpipetowano, 30 µL zawiesiny wymieszano z 150 µL 0,5% (w/v) roztworu agarozy LMP termostatowanej uprzednio w 40°C i natychmiast naniesiono po dwie 30 µL krople mieszaniny na

szkiełka podstawowe pokryte 1% (w/v) roztworem agarozy NMP, a następnie przykryto szkiełkami nakrywkowym. Szkiełka od razu przeniesiono na lód w celu zestalenia się żelu agarozowego. Po ok. 10 min usunięto szkiełka nakrywkowe, a szkiełka podstawowe z żelami agarozowymi umieszczono w zimnym (4°C) roztworze lizującym AB w celu usunięcia błon i rozpuszczalnych składników komórek i przeniesiono do lodówki (4°C). Następnego dnia szkiełka umieszczono w aparacie wypełnionym zimnym (4°C) buforem elektroforetycznym, inkubowano przez 30 min w ciemności w celu rozwinięcia chromatyny i poddano elektroforezie (26 V, 300 mA, 30 min). Szkiełka z żelami agarozowymi płukano dwukrotnie w buforze PBS, wodzie oraz w 70% (v/v) etanolu (każde płukanie 5 min w 4°C) i pozostawiono do całkowitego wyschnięcia. Preparaty barwiono przez 30 min w zimnym (4°C) roztworze barwnika SYBR Green bez dostępu światła, a następnie płukano przez 10 min w wodzie w tych samych warunkach. Po tym czasie żele przykryto szkiełkami nakrywkowymi, a immobilizowane w nich jądra komórkowe poddano analizie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Zeiss Axio Imager.Z2) sprzężonego z oprogramowaniem Metafer 4. Komety obserwowano pod 50-krotnym powiększeniem. Wybarwione preparaty analizowano z wykorzystaniem oprogramowania Comet Score, a w każdej analizie uwzględniano po 100 kolejnych obiektów na pojedynczym żelu.

3.6. Analiza statystyczna

Wszystkie przedstawione wyniki liczbowe są wyrażone jako średnie z trzech niezależnych eksperymentów \pm odchylenia standardowe (SD), o ile nie podano inaczej. Statystycznie istotne różnice w testach *in vitro* wyznaczono za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (one way ANOVA) z testem Tukey'a ($p < 0,05$) lub z testem Dunnetta ($p < 0,05$) odpowiednio dla indeksów przeżywalności wyznaczonych w teście MTT oraz dla testu kometowego.

4. WYNIKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszego projektu doktorskiego zostały podzielone na dwa bloki badawcze. Pierwszy z nich dotyczył charakterystyki kwasów nukleinowych w różnych produktach żywnościowych. Wybór produktów do badań przeprowadzono w taki sposób, aby możliwe było porównanie tkanek jadalnych:

- w obrębie jednego rodzaju organizmu (mięśnie piersi i uda oraz wątroba kury),
- pomiędzy różnymi królestwami (tkanki roślinne, zwierzęce, grzybowe),
- na różnych etapach rozwoju i pełniących różne funkcje (nasiona fasoli szparagowej, bulwa ziemniaka, bulwa kalarepy, zgrubiały ogonek liściowy selera naciowego).

Metodologię badawczą zaprojektowano w oparciu o opracowany w Katedrze Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności zestaw metod pozwalających na analizę kwasów nukleinowych w żywności (Cieślewicz i in., 2021). I tak, w celu wizualizacji *in situ* omawianych cząsteczek w produktach żywnościowych zastosowano technikę bloczków parafinowych. Uzyskane preparaty mikroskopowe wybarwiono eozyną Y, która nadaje białkom cytoplazmatycznym barwę różową, oraz hematoksyliną, barwiącą kwasy nukleinowe na niebiesko (tzw. barwienie podstawowe). W celu selektywnego wybarwienia jąder komórkowych obecnych w badanych produktach zastosowano także barwniki fluorescencyjne SYBR Green I oraz Hoechst 33342, wiążące się z kwasami nukleinowymi w komórce. Możliwości wizualizacji kwasów nukleinowych w stosunku do wcześniejszych badań (Cieślewicz i in., 2021) rozszerzono o przygotowanie preparatów mikroskopowych z wykorzystaniem kriostatu, jako metody potencjalnie szybszej w stosunku do techniki bloczków parafinowych i umożliwiającej pominięcie etapu utrwalania próbek. Do oznaczenia integralności i wielkości cząsteczek DNA obecnych w wymienionych produktach żywnościowych, tak jak uprzednio, zastosowano techniki elektroforetyczne (Cieślewicz i in., 2021). W celu określenia stopnia fragmentacji kwasów nukleinowych znajdujących się w produktach żywnościowych zastosowano elektroforezę pojedynczych komórek, czyli tzw. test kometowy, który jest powszechnie używany do badania genotoksyczności związków chemicznych,

a w analizie żywności rekomendowany do wykrywania napromieniania produktów żywnościowych. Przeprowadzono również izolację kwasów nukleinowych oraz oznaczenie suchej masy badanych produktów w celu ilościowego oszacowania zawartości omawianych biocząsteczek. Dla porównania profili fragmentacji kwasów nukleinowych pochodzących z różnych produktów żywnościowych wykonano elektroforezę agarozową uprzednio otrzymanych izolatów.

Na podstawie wyników uzyskanych w części analitycznej, do dalszych badań biologicznych wybrano jako modelowe źródła pokarmowych kwasów nukleinowych jeden produkt żywnościowy pochodzenia zwierzęcego - wątrobę drobiową - oraz jeden produkt pochodzenia roślinnego - fasolę szparagową.

Drugi blok badawczy skupiał się na ocenie potencjalnie odżywczej roli kwasów nukleinowych i ich pochodnych obecnych w żywności, ze szczególnym naciskiem na wpływ omawianych cząsteczek na komórki ludzkiego przewodu pokarmowego. Jako podstawowy model do badań biologicznych wybrana została linia ludzkich komórek gruczołaka jelita grubego (HT29), która jest jedną z najpowszechniej wykorzystywanych linii w badaniach nad żywnością (Krishna i Gopalakrishnan, 2016). Komórki te naśladują nabłonek przewodu pokarmowego mający bezpośredni kontakt z trawionym pokarmem, a więc także z kwasami nukleinowymi znajdującymi się w żywności. Nabłonek jelita należy do najszybciej regenerujących się tkanek w organizmie, w przypadku której pojedyncza warstwa komórek jest całkowicie odnawiana co 3-5 dni (Rath i Haller, 2022). Wiąże się to m.in. z dużym zapotrzebowaniem energetycznym oraz na składniki budulcowe. Wzmożony metabolizm komórek nowotworowych związany z intensywnym wzrostem oraz podziałami powoduje, że ich zapotrzebowanie na składniki odżywcze jest jeszcze większe (Nenkov i in., 2021). Dzięki temu stanowią one idealny model do badania zdolności wykorzystania pochodzących z diety kwasów nukleinowych i wstępnego wnioskowania o potencjalnym znaczeniu odżywczym omawianych cząsteczek. Badania te uzupełniono doświadczeniami przeprowadzonymi z wykorzystaniem normalnej ludzkiej linii CCD 841 CoN, będącej niestransformowanym odpowiednikiem komórek HT29.

Strawione składniki pokarmowe, które przenikają przez barierę jelitową, transportowane są z naczyń włosowatych do żyły wrotnej, a dalej do wątroby, z której krew płynie do serca i jest rozprowadzana do pozostałych narządów (Reece i in., 2016). Wątroba odgrywa kluczową rolę w homeostazie nukleozydów w organizmie, ponieważ odpowiada za ich produkcję i dostarczanie do tkanek i komórek, które nie posiadają szlaków biosyntezy *de novo* (Young i in., 2013). Ponieważ wątroba jest nie tylko odbiorcą wchłanianych z pokarmu produktów trawienia kwasów nukleinowych, ale również miejscem produkcji nukleozydów i ich dystrybutorem do innych narządów, do części badań wykorzystano także linię ludzkich komórek raka wątrobowokomórkowego (HepG2).

Pierwszym etapem badań biologicznych prowadzonych z użyciem wymienionych modeli *in vitro* było sprawdzenie wpływu kwasów nukleinowych wyizolowanych z fasoli szparagowej i wątroby drobiowej oraz pojedynczych nukleozydów na wzrost komórek wybranych linii za pomocą testu MTT. Komórki jelita mają kontakt zarówno z kwasami nukleinowymi pochodzącymi z żywności, jak i z produktami ich trawienia, natomiast do komórek wątroby trafiają one głównie w formie nukleozydów. Istnieją jednak doniesienia wskazujące na obecność w wątrobie dłuższych fragmentów kwasów nukleinowych pochodzenia żywieniowego (Chowdhury i in., 2004; El-Sanhoty i in., 2006; Guertler i in., 2008; Ran i in., 2009). Z tego względu ocena wpływu izolatów kwasów nukleinowych, jak i pojedynczych nukleozydów, została przeprowadzona zarówno dla komórek jelita, jak i wątroby. W przypadku wyizolowanych kwasów nukleinowych test MTT przeprowadzono także dla nienowotworowych ludzkich komórek jelita grubego (CCD 841 CoN) w celu porównania wyników z uzyskanymi dla nowotworowego odpowiednika (HT29). Ponieważ tempo wzrostu oraz podziałów komórkowych prawidłowej linii jest zdecydowanie niższe niż komórek nowotworowych oraz ulegają one starzeniu wskutek skracania się telomerów podczas podziałów komórkowych (Nestor i in., 2001; Verma 2014), dla pozostałych próbek oraz testów badania prowadzono jedynie na liniach nowotworowych.

Kolejnym krokiem badawczym było sprawdzenie zdolności komórek przewodu pokarmowego do wykorzystania egzogennych kwasów nukleinowych i ich

pochodnych w sytuacji upośledzonej syntezy replikacyjnej DNA. W tym celu zmodyfikowano test MTT poprzez zastosowanie hydroksymocznika, który jest czynnikiem zaburzającym wspomniany proces. Hydroksymocznik blokuje działanie reduktazy rybonukleotydu odpowiedzialnej za redukcję difosforanów rybonukleozydów do difosforanów deoksyrybonukleozydów (Kunos i in., 2011). Tym samym ogranicza produkcję *de novo* prekursorów DNA w komórce. Ponieważ synteza DNA jest niezbędna do proliferacji, zastosowanie testu MTT w obecności hydroksymocznika miało na celu określenie zdolności komórek do wykorzystywania egzogennych źródeł deoksyrybonukleozydów, w tym kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych. Dla komórek linii HT29, jako głównego modelu badawczego, sprawdzono także możliwość wykorzystania egzogennych kwasów nukleinowych oraz nukleozydów do naprawy własnego materiału genetycznego w obecności kofeiny. Kofeina jest związkiem zaburzającym proces naprawy DNA na wielu płaszczyznach, wpływa m.in. na bezpośrednią inhibicję enzymów zaangażowanych we wspomniany proces, może interkalować w łańcuchy DNA (a przez to maskować uszkodzenia lub zakłócać ich rozpoznawanie) oraz wpływać na cykl komórkowy (Sabisz i Składanowski, 2008). W celu określenia zdolności komórek do wykorzystywania badanych związków do naprawy własnego DNA w sytuacji narażenia na czynnik genotoksyczny (H_2O_2) przy jednoczesnym upośledzeniu systemów naprawczych wywołanym obecnością kofeiny wykorzystano test kometowy.

4.1. Wizualizacja kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych

Technika bloczków parafinowych, powszechnie stosowana w badaniach histopatologicznych, została zaadaptowana do przygotowania preparatów mikroskopowych z próbek żywności różnego pochodzenia w celu szacunkowej oceny wstępnej zawartości kwasów nukleinowych występujących w tkankach jadalnych. Dzięki uprzejmości Pani prof. dr hab. Małgorzaty Kozieradzkiej-Kiszkurno z Katedry Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego przygotowane bloczki parafinowe zostały pocięte przy pomocy mikrotomu na skrawki, z których następnie wykonano preparaty mikroskopowe. Barwienie

różnymi rodzajami barwników umożliwiło wizualizację kwasów nukleinowych *in situ* w tkankach wybranych produktów żywnościowych.

Na zdjęciach preparatów przekroju poprzecznego mięśni piersi (rys. 3A) oraz na fotografiach preparatów przekroju podłużnego mięśni uda kury (rys. 3B) widoczne są liczne jądra komórkowe wielojądrzastych miocytów. Są one charakterystycznie dla tkanki poprzecznie prążkowanej szkieletowej zlokalizowane na obrzeżach komórek. Dlatego na rys. 3B. zauważyć można typowe dla włókien mięśniowych rozmieszczenie jąder komórkowych, które występują obok siebie, tuż pod błoną komórkową. Dodatkowo, widoczne są prążki tworzone przez elementy kurczliwe zwane sarkomerami, składające się z filamentów aktyny i miozyny (Cui i in., 2011a). Przekrój wątroby – organu zbudowanego w dużej części z wielokątnych komórek zwanych hepatocytami – przedstawiony jest na rys. 4A. Na zdjęciach widoczne są jądra komórkowe, których ilość przypadająca na cm² zdjęcia preparatu tkanki (przy powiększeniu 200x) jest znacznie większa w porównaniu z tkanką budującą mięśnie uda i piersi kury. Sugeruje to duże zagęszczenie komórek, a więc i jądrowego materiału genetycznego znajdującego się w tkance wątroby, co może wiązać się z licznymi funkcjami pełnionymi przez ten organ i jego zdolnością do regeneracji. Na rys. 4B., przedstawiającym zdjęcia preparatów mikroskopowych nasion fasoli szparagowej, widoczne są jądra komórkowe znacznych rozmiarów, które zajmują dużą część komórki. Rozmiar jąder oddaje fakt dużego genomu roślin strączkowych, a więc i wysokiej zawartości kwasów nukleinowych (dla porównania rozmiar genomu grochu zwyczajnego wynosi ok. 4,45 Gb (Yang i in., 2022), a kury domowej ok. 1,2 Gb (Kasai i in., 2012)). Rozmiar jąder, ale i komórek, jest większy niż w przypadku wątroby, co wiąże się jednocześnie z mniejszą gęstością komórek w nasionach fasoli.

Na rys. 5. znajdują się zdjęcia preparatów wykonanych z kalarepy (rys. 5A, 5B), selera naciowego (rys. 5C) oraz ziemniaka (rys. 5D, 5E, 5F). Obecność ściany komórkowej w produktach roślinnych utrudnia właściwą penetrację zastosowanych barwników do wnętrza komórek, co nie zawsze pozwala na obserwację rozmieszczenia kwasów nukleinowych *in situ*. Na fotografiach preparatów bulwy ziemniaka barwionych eozyną Y i hematoksyliną oraz fluorochromem Hoechst

33342 (rys. 5D, 5E) widoczne są ziarna skrobi, która stanowi materiał zapasowy rośliny. Uzyskane zdjęcia wskazują również na częściowy rozpad tkanek (brak widocznych komórek uporządkowanych w struktury tkankowe), co może oznaczać, że zastosowana metoda utrwalania próbek nie jest uniwersalna dla produktów pochodzenia roślinnego. Ponadto w przypadku barwnika fluorescencyjnego prawdopodobnie nastąpiło niespecyficzne wiązanie tej substancji do innych składników komórki (rys. 5E - ziarna skrobi wybarwione fluorochromem Hoechst 33342 wykazujące fluorescencję), co utrudniło wybarwienie i wizualizację materiału genetycznego, mimo zastosowania metody zaleconej do przygotowania preparatów roślinnych.

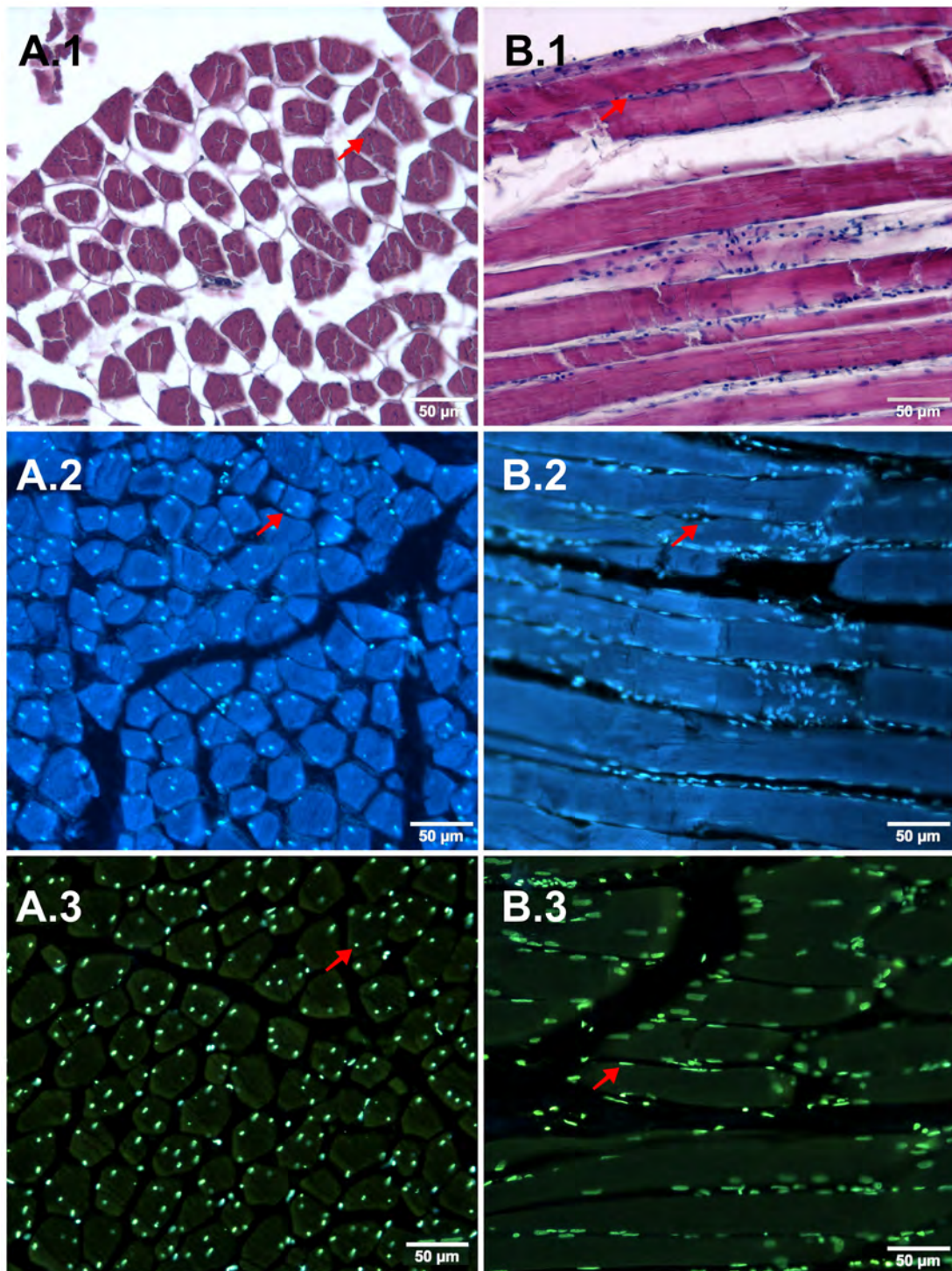
Zdjęcia preparatów uzyskanych z pieczarek, należących do odrębnego królestwa grzybów, znajdują się na rys. 6. Zastosowanie barwnika fluorescencyjnego SYBR Green umożliwiło wizualizację jąder komórkowych znajdujących się w badanym produkcie żywnościowym (rys. 6C). Duża ilość materiału genetycznego, jaką można zaobserwować w preparacie, związana jest ze zdolnością grzybów do szybkiego wzrostu. Na fotografiach preparatów barwionych eozyną Y i hematoksyliną (rys. 6A) widoczne są rozległe struktury, które przy zastosowaniu fluorochromu Hoechst 33342 wykazują silną fluorescencję (rys. 6B). Ponieważ elementem ściany komórkowej, który odróżnia komórkę grzybową od roślinnej, jest chityna, wykonano dodatkowy preparat zawierający ten polisacharyd. Barwienie Hoechst 33342 potwierdziło możliwość niespecyficznego wiązania się barwnika z tym składnikiem ściany komórkowej, co można zaobserwować w postaci niebieskiej fluorescencji chityny na rys. 7.

Dzięki uprzejmości Pana prof. dr hab. inż. Pawła Sachadyna z Laboratorium Biotechnologii Regeneracyjnej Politechniki Gdańskiej przygotowano preparaty z surowej wątroby drobiowej oraz konserwowej fasoli szparagowej także z wykorzystaniem kriostatu. Na rys. 8 porównano obrazy mikroskopowe uzyskane dla preparatów otrzymanych techniką bloczków parafinowych oraz techniką kriosekcji. Obie metody umożliwiły wizualizację kwasów nukleinowych w badanych produktach żywnościowych a jakość uzyskanych preparatów jest porównywalna. Integralność tkanek została zachowana zarówno w przypadku

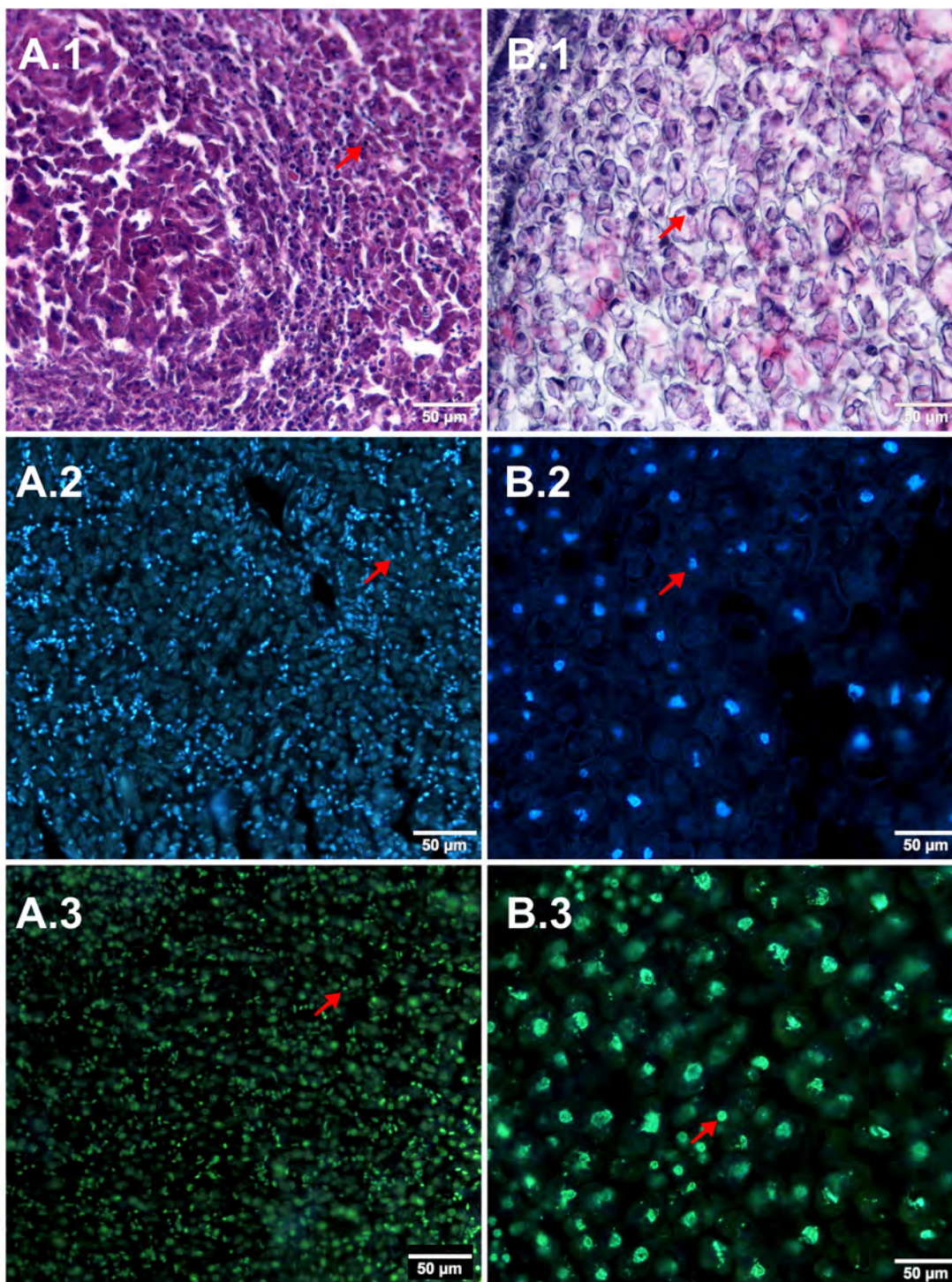
produktu pochodzenia zwierzęcego (rys. 8), jak i roślinnego (rys. 9). Na zdjęciach tkanek uzyskanych techniką kriosekcji widoczne komórki są nieznacznie większe niż w przypadku preparatów parafinowych, szczególnie dla konserwowej fasoli szparagowej (rys. 9). Procedura przygotowania produktów żywnościowych do zatopienia w parafinie obejmowała etap utrwalania próbek z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych, co powodowało usunięcie wody z tkanek. W przypadku kriosekcji nie ma potrzeby odwadniania, przez co widoczne na zdjęciach, uwodnione komórki, są większe niż na fotografiach preparatów parafinowych.

Wyniki uzyskane zarówno dla produktów pochodzenia zwierzęcego, jak i dla produktu roślinnego oraz przedstawiciela grzybów pozwoliły na wizualizację DNA w postaci jąder komórkowych w wybranych tkankach pochodzących z trzech różnych królestw. Zaobserwować można różnice zarówno pod względem rozmieszczenia jąder, jak i ich wielkości oraz ilości przypadającej na cm^2 zdjęcia preparatu tkanki. Jednak we wszystkich tkankach, niezależnie od pochodzenia, jądra komórkowe zachowują zwartą strukturę i nie są widoczne ich uszkodzenia. Struktura jądra została zachowana także w przypadku produktu poddanego działaniu wysokiej temperatury (konserwowa fasola szparagowa), dla którego czas od zbioru do analizy był dłuższy niż dla świeżych tkanek. Świadczy to o wysokiej stabilności organelum zawierającego DNA oraz odporności tej struktury komórkowej na przechowywanie oraz obróbkę żywności. Obecność materiału genetycznego w postaci jąder komórkowych w produktach żywnościowych uzasadnia występowanie w przewodzie pokarmowym licznych enzymów trawiących kwasy nukleinowe, które umożliwiają rozkład omawianych biopolimerów do formy pozwalającej na ich wchłanianie z jelita. Należy również zwrócić uwagę, że w zastosowanej metodologii nie uwzględniono barwników pozwalających na wizualizację RNA, którego zawartość może być nawet kilkukrotnie większa niż DNA (Yeung i Leung, 2013; Bhat i in., 2020). Sugeruje to duży udział kwasów nukleinowych w stosunku do pozostałych składników komórki. Składniki te są trawione i wchłaniane w przewodzie pokarmowym, natomiast ich znaczenie

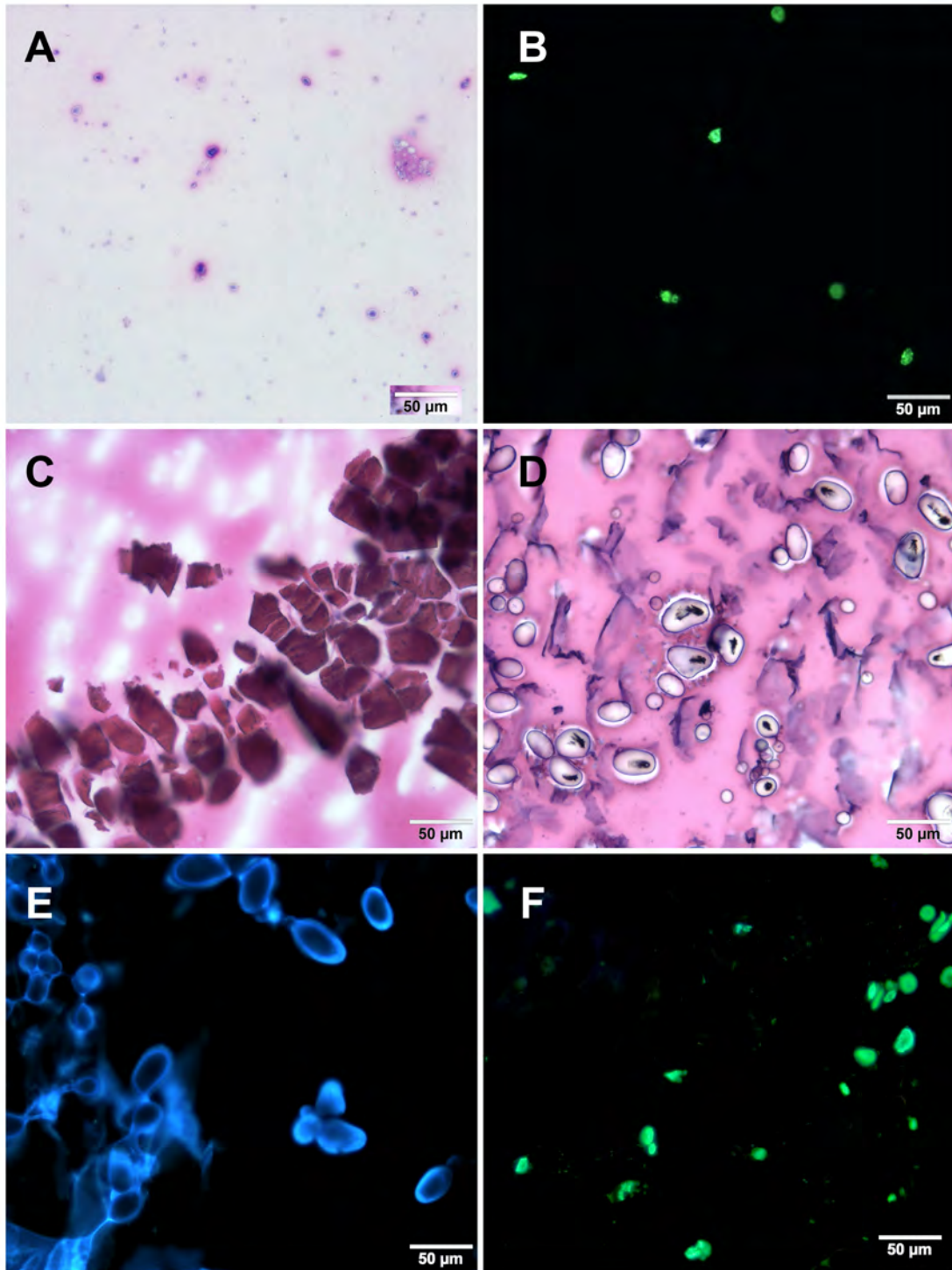
żywniowe jest tylko w niewielkim stopniu przedmiotem badań, co omówiono w podrozdziale 1.2 części teoretycznej.



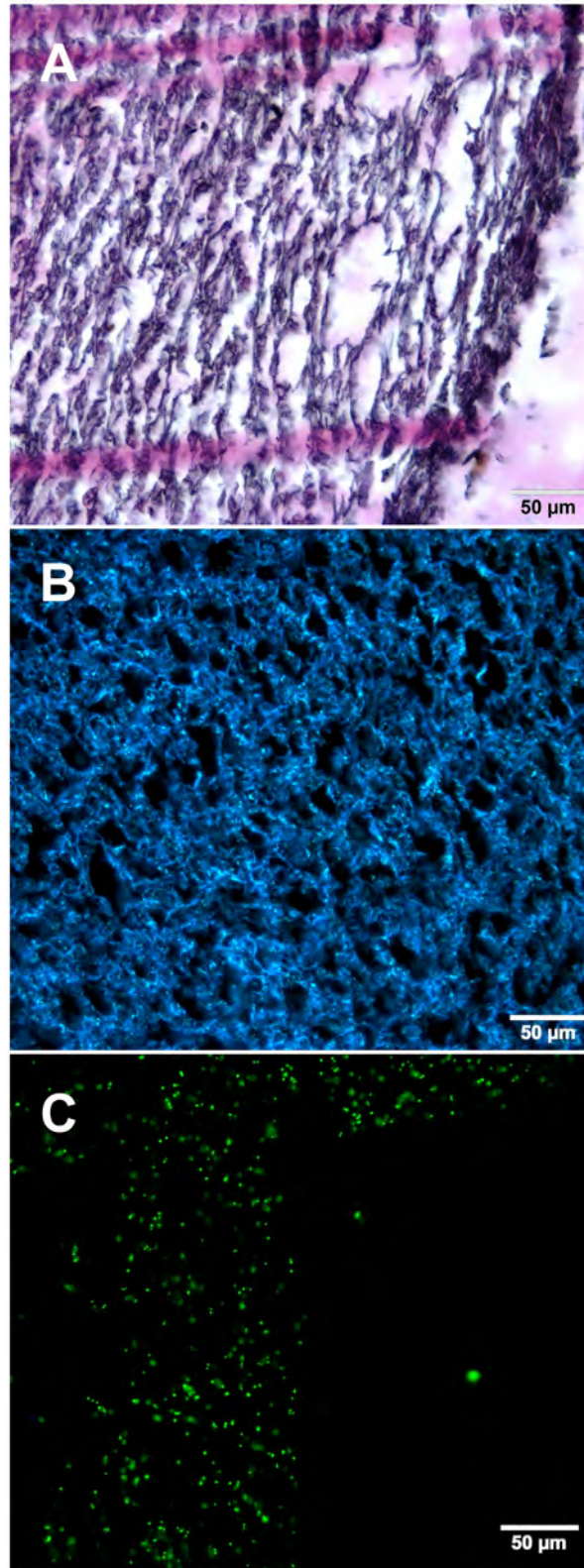
Rys. 3. Zdjęcia preparatów mikroskopowych mięśni piersi kury (A) oraz mięśni uda kury (B) wybarwionych odpowiednio eozyną Y i hematoksyliną (1) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (2) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (3) w celu wizualizacji jąder komórkowych. Czerwone strzałki wskazują przykładowe wybarwione jądra komórkowe.



Rys. 4. Zdjęcia preparatów mikroskopowych wątroby drobiowej (A) oraz fasoli szparagowej (B) wybarwionych odpowiednio eozyną Y i hematoksylina (1) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (2) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (3) w celu wizualizacji jąder komórkowych. Czerwone strzałki wskazują przykładowe wybarwione jądra komórkowe.



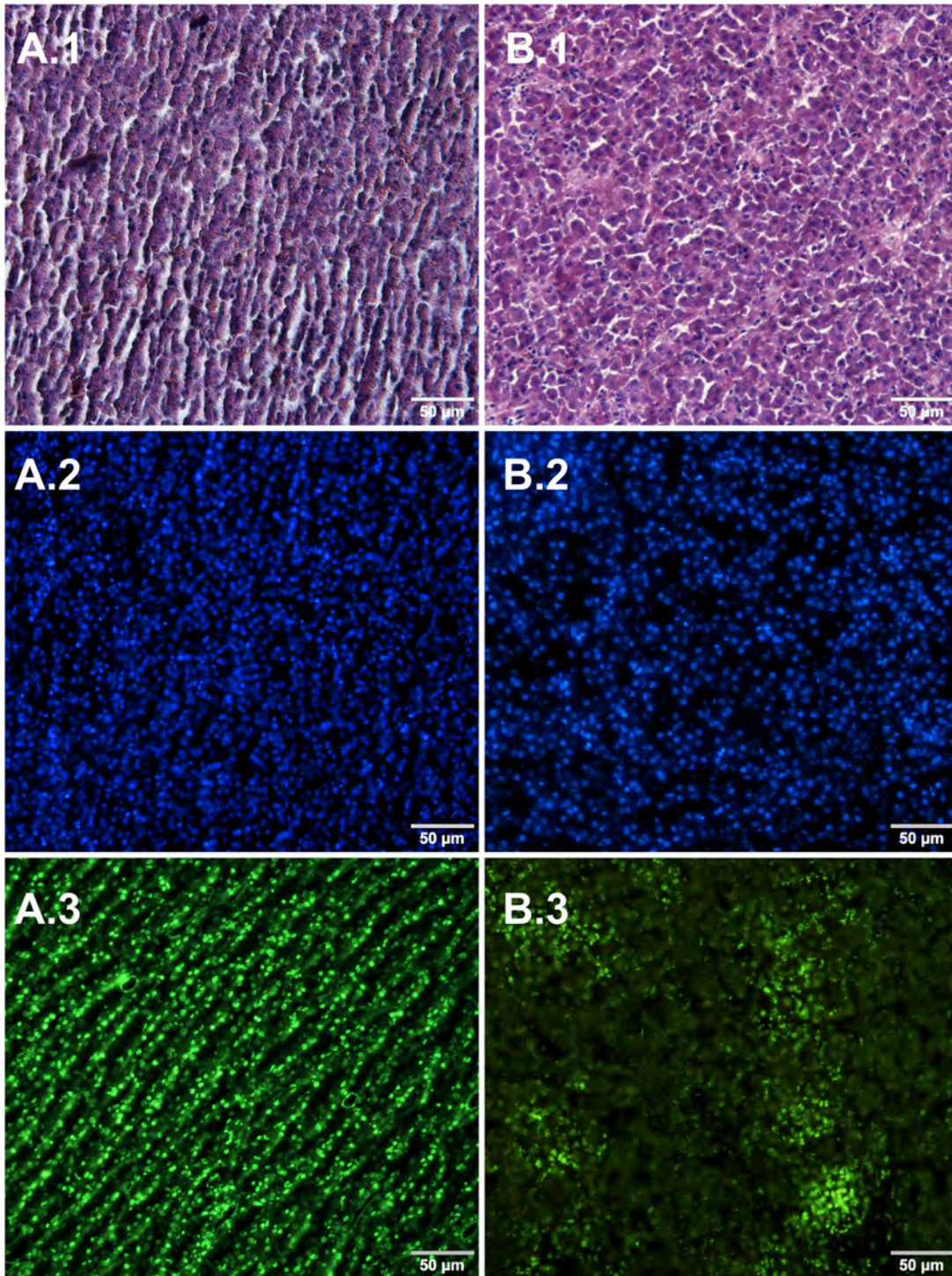
Rys. 5. Zdjęcia preparatów mikroskopowych kalarepy (A, B), selera naciowego (C) oraz ziemniaka (D, E, F) wybarwionych eozyną Y i hematoksyliną (A, C, D) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (E) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (B, F) w celu wizualizacji jąder komórkowych.



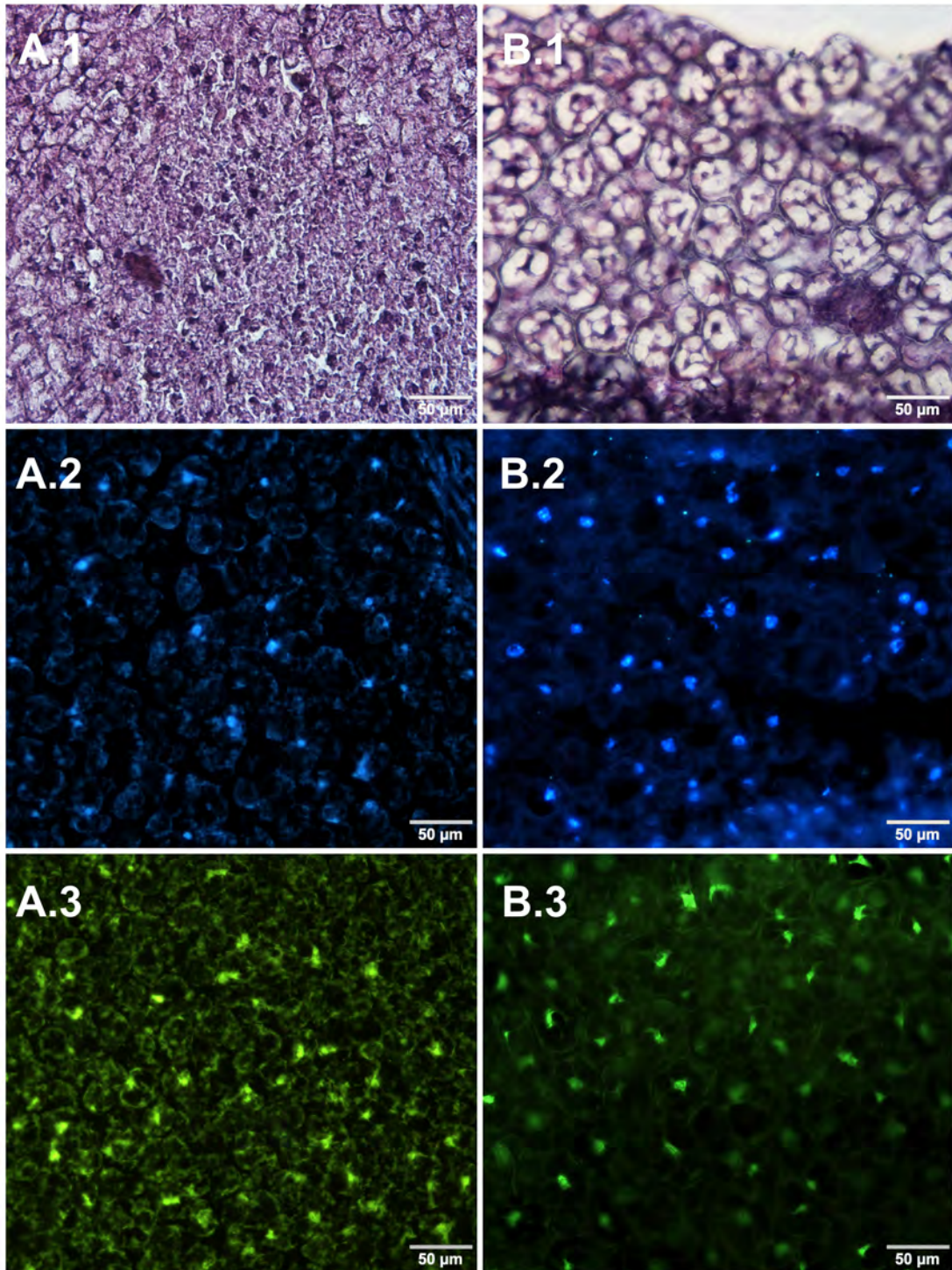
Rys. 6. Zdjęcia preparatów mikroskopowych pieczarki wybarwionych odpowiednio eozyną Y i hematoksyliną (A) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (B) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (C) w celu wizualizacji jąder komórkowych.



Rys. 7. Zdjęcie preparatu mikroskopowego chityny wybarwionego barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342.



Rys. 8. Zdjęcia preparatów mikroskopowych wątroby drobiowej przygotowanych z wykorzystaniem techniki bloczków parafinowych (A) oraz kriosekcji (B) wybarwionych odpowiednio eozyną Y i hematoksyliną (1) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (2) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (3) w celu wizualizacji jąder komórkowych.

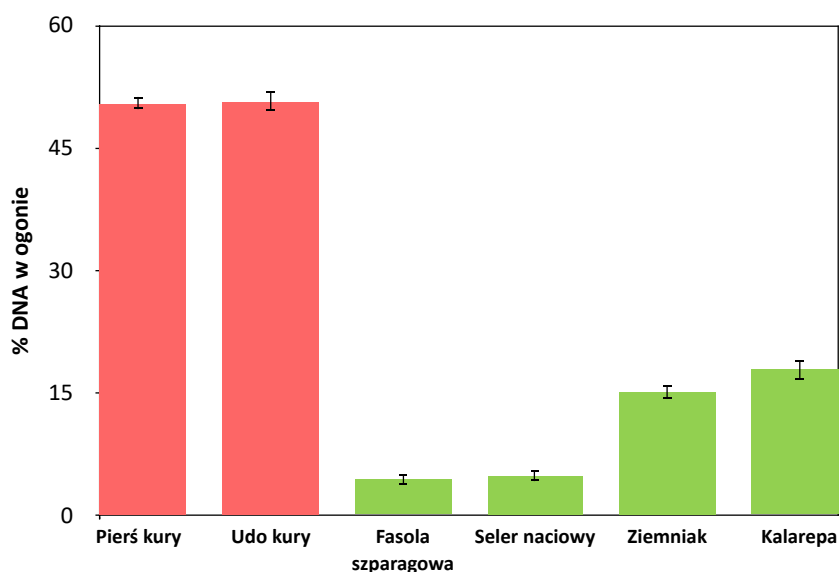


Rys. 9. Zdjęcia preparatów mikroskopowych konserwowej fasoli szparagowej przygotowanych z wykorzystaniem techniki bloczków parafinowych (A) oraz kriosekcji (B) wybarwionych odpowiednio eozyną Y i hematoksyliną (1) w celu wizualizacji struktur komórkowych, barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (2) oraz barwnikiem fluorescencyjnym SYBR Green (3) w celu wizualizacji jąder komórkowych.

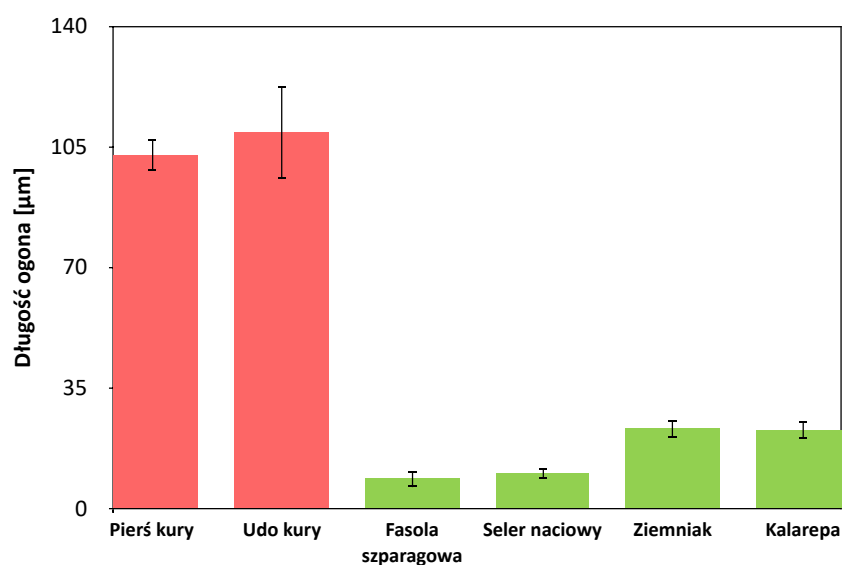
4.2. Ocena stopnia fragmentacji kwasów nukleinowych izolowanych z produktów żywnościowych z wykorzystaniem testu kometowego

Zastosowanie techniki bloczków parafinowych uwidocznilo obecność licznych jąder komórkowych w badanych produktach żywnościowych. Występowanie materiału genetycznego w takiej formie pozwoliło na zastosowanie elektroforezy pojedynczych komórek, tzw. testu kometowego, do oceny stopnia fragmentacji DNA znajdującego się w jądrach komórkowych badanych tkanek jadalnych. Standardowo test ten wykorzystywany jest m.in. w badaniach genotoksyczności związków chemicznych, biotycznych i abiotycznych czynników stresu powodujących oksydacyjne uszkodzenia materiału genetycznego, badaniach ekotoksykologicznych (Ventura i in., 2013), a także do wykrywania napromieniania żywności (PNEN 13784:2003). W moim przypadku zastosowanie tej metody umożliwiło porównanie stopnia fragmentacji oraz uszkodzeń kwasów nukleinowych w jądrach komórkowych badanych surowych produktów żywnościowych.

Wykres na rys. 10. przedstawia średnią zawartość procentową DNA w ogonach komet, natomiast wykres na rys. 11 średnią długość ogona komet oznaczoną dla poszczególnych próbek. Parametr % DNA w ogonie wskazuje, jaka część materiału genetycznego znajdującego się w jądrze uległa fragmentacji, a długość ogona mówi o tym, w jakim stopniu kwasy nukleinowe w nim obecne zostały pofragmentowane. Dłuższy ogon będzie świadczył o obecności krótszych fragmentów DNA w komórkach budujących badane tkanki. Powodem fragmentacji może być obecność w żywności endogennych nukleaz, których aktywność nie została zatrzymana np. w wyniku obróbki termicznej. Natomiast narażenie produktów żywnościowych na działanie czynników uszkadzających DNA (np. termiczna obróbka kulinarna przy dostępie tlenu, ekspozycja na czynniki mutagenne takie jak napromieniowanie żywności) może skutkować pojawieniem się krótszych fragmentów będących wynikiem chemicznych uszkodzeń jądrowego materiału genetycznego.



Rys. 10. Wyniki testu kometowego wyrażone jako procentowa zawartość DNA w ogonach komet oznaczona dla poszczególnych próbek badanych produktów żywnościowych. Wyniki są średnią z 4 powtórzeń uwzględniających 100 kolejnych komet dla każdego powtórzenia.



Rys. 11. Wyniki testu kometowego wyrażone jako długości ogonów komet oznaczone dla poszczególnych próbek badanych produktów żywnościowych. Wyniki są średnią z 4 powtórzeń uwzględniających 100 kolejnych komet dla każdego powtórzenia.

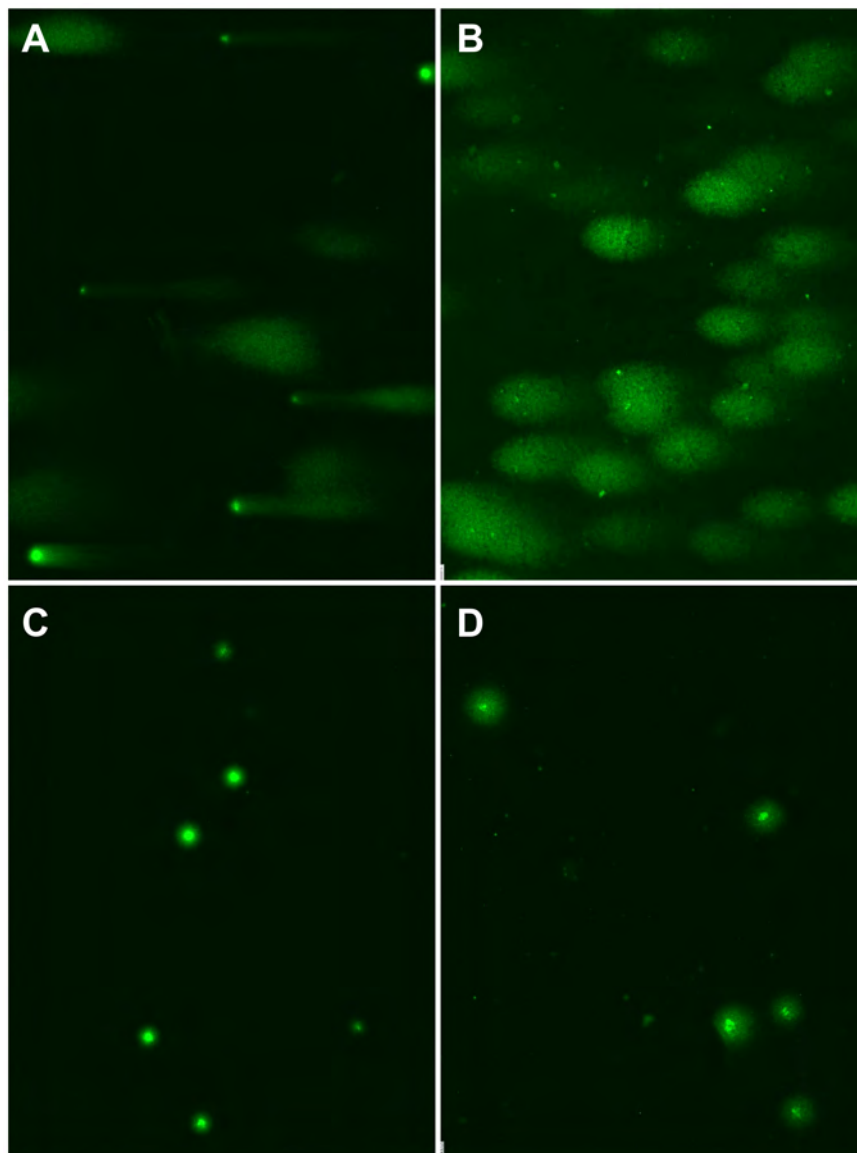
W przypadku badanych próbek największe różnice w uzyskanych wynikach widoczne są pomiędzy materiałem genetycznym tkanek zwierzęcych i roślinnych. Stopień fragmentacji DNA w jądrach miocytów pochodzących z piersi i uda kury jest zbliżony i oscyluje w granicach 50% DNA w ogonie (rys. 10). Wartość ta pokrywa się z wynikami uzyskanymi przez Cieślewicz i wsp. dla schabu wieprzowego i prawdopodobnie wiąże się z działaniem endogennych nukleaz, które

mogą być wciąż aktywne w surowym mięsie (Cieślewicz i in., 2021). Długości ogonów komet dla obu produktów wynoszą ok. 100 μm i są kilkukrotnie większe niż te zaobserwowane w badaniach tkanek roślinnych (rys. 11), co świadczy o obecności krótszych fragmentów materiału genetycznego w badanym mięsie. Największą degradację DNA stwierdzono w przypadku jąder wątroby drobiowej, gdzie nie są nawet widoczne głowy komet, a cały materiał genetyczny znajduje się w ogonie (rys. 12.B). Ilość jąder komórkowych znajdujących się w zawiesinie hepatocytów była kilkukrotnie większa niż dla próbek mięśni piersi i uda kury. Wyniki te wskazują na dużą gęstość komórkową wątroby, co pokrywa się z obrazami uzyskanymi techniką blozków parafinowych oraz kriosekcji. Wysoki stopień degradacji DNA hepatocytów oraz duże zagęszczenie jąder komórkowych może się wiązać z funkcjami tego organu, do których należą między innymi synteza i wydzielanie żółci, synteza i uwalnianie do krwiobiegu białek osocza takich jak fibrynogen, protrombina, lipoproteiny czy albuminy, udział w metabolizmie lipidów, białek i sacharydów, magazynowanie żelaza, glikogenu, triacylogliceroli oraz witamin A, D, B₁₂ (Cui i in., 2011b). Synteza wymienionych metabolitów pociąga za sobą dużą aktywność transkrypcyjną tej tkanki, co wymaga rozplątania DNA i pojawienia się obszarów jednoniciowych, wrażliwszych na hydrolizę. Wątroba cechuje się też dużą zdolnością do regeneracji (Michalopoulos i Bhushan, 2021), podczas której jednym z etapów naprawy uszkodzonego materiału genetycznego jest rozcięcie nici DNA (Chatterjee i Walker, 2017), co może być widoczne w postaci wzmożonej fragmentacji kwasów nukleinowych. Ponadto jest to organ odpowiedzialny za detoksykację organizmu narażony na działanie licznych ksenobiotyków i substancji, które mogą mieć działanie genotoksyczne (Gillman i in., 2021).

W prezentowanych badaniach stopień fragmentacji materiału zawartego w jądrach komórkowych pochodzących z tkanek roślinnych zawierał się w zakresie 4-18% DNA w ogonie. Zbiór warzyw nie przerywa ich procesów życiowych, a głównym czynnikiem, który reguluje procesy dojrzewania, jest temperatura. Obniżenie temperatury podczas przechowywania produktów pozwala na ograniczenie szybkości zmian zachodzących w roślinach (Pijanowski i in., 1997).

Odmienność stan roślin, w stosunku do opisanych wyżej przebadanych próbek mięsa, może tłumaczyć tak duże różnice w zawartości pofragmentowanego DNA. Najniższą fragmentację materiału genetycznego zaobserwowano dla fasoli szparagowej (4,4% DNA w ogonie). Funkcją nasion jest zapoczątkowanie wzrostu nowej rośliny, co wiąże się z koniecznością szczególnej ochrony DNA niezbędnego m. in. do produkcji białek i odtworzenia nowej rośliny. Przed czynnikami zewnętrznymi dodatkową ochronę stanowią strąki, w których znajdują się opisywane nasiona. Również w przypadku selera naciowego stopień fragmentacji DNA jest niewielki i wynosi 4,9% DNA w ogonie, natomiast dla ziemniaka i kalarepy uzyskuje wartość odpowiednio 15,1% i 17,8% DNA w ogonie, przy czym ogony komet są kilkukrotnie krótsze niż w przypadku jąder komórkowych tkanek mięśni kury (rys. 11). Świadczy to o występowaniu jedynie długich fragmentów materiału genetycznego w badanych jądrach pochodzących z produktów roślinnych. Fragmentem selera naciowego wykorzystywanego do badań był zgrubiały ogonek liściowy, a w przypadku ziemniaka i kalarepy – bulwa. Powodem różnic w poziomie fragmentacji DNA w komórkach badanych roślin mogą być inne funkcje pełnione przez te tkanki, co wiąże się z różnicami w budowie poszczególnych fragmentów warzyw. Środek bulwy pędowej ziemniaka stanowi silnie rozrośnięty rdzeń, który wypełnia duża ilość miękiszu spichrzowego zawierającego skrobię. Bulwa kalarepy natomiast jest przekształconą, nadliścieniową częścią pędu. Funkcją bulw jest magazynowanie substancji zapasowych, są one również organami przetrwalnikowymi i służą do rozmnażania wegetatywnego. Jadalną część selera naciowego stanowi natomiast zgrubiały ogonek liściowy. W ogonkach liściowych występuje kolenchyma, której mogą towarzyszyć także włókna sklerenchymatyczne. Są to tkanki wzmacniające, nadające odporność mechaniczną tej części rośliny (Szweykowska i Szweykowski, 2008). Odmienność budowa tkankowa badanych organów roślinnych może być powodem różnic w odporności na czynniki powodujące uszkodzenia DNA, a zatem i potencjalną fragmentację materiału genetycznego. Ponadto czynniki środowiskowe, takie jak dostępność światła, wody, czy temperatura, mogą wpływać na aktywność niektórych ścieżek naprawy DNA. Szybko dzielące się i zróżnicowane komórki różnych organów roślinnych nie

wykorzystują jednakowo całego dostępnego repertuaru mechanizmów naprawczych. Zdolność roślin do zachowania integralności genomowej zmniejsza się z wiekiem rośliny, głównie ze względu na zmniejszenie wydajności wykorzystywanych ścieżek naprawy DNA (Manova i Gruszka, 2015), co również mogło wpłynąć na zaobserwowany poziom fragmentacji materiału genetycznego badanych warzyw. W przypadku pieczarek, zastosowana metodologia nie pozwoliła na izolację jąder komórkowych. Wiąże się to prawdopodobnie z odmienną w stosunku do roślin budową ściany komórkowej grzybów, utrudniającą mechaniczną destrukcję komórki i uwolnienie jąder.



Rys. 12. Obrazy jąder komórkowych wybarwionych fluorochromem SYBR Green uzyskanych w wyniku przeprowadzenia testu kometowego dla piersi kury (A), wątroby kury (B), fasoli szparagowej (C) oraz ziemniaka (D).

Na podstawie wyników uzyskanych z obserwacji mikroskopowych oraz testu kometowego do dalszych badań wybrano wątrobę drobiową oraz fasolę szparagową, jako przedstawicielei odpowiednio produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, a przy tym zasadniczo różniących się integralnością materiału genetycznego.

4.3. Zawartość suchej masy w badanych produktach żywnościowych

Zawartość suchej masy oznaczoną metodą wagowo-suszarkową dla badanych produktów żywnościowych przedstawiono w tab. 6. Dla produktu pochodzenia roślinnego i zwierzęcego zawartość suchej masy jest zbliżona i wynosi ok. 26% wag.

Tabela 6. Zawartość suchej masy oznaczona dla wątroby drobiowej oraz nasion fasoli szparagowej

Rodzaj próbki	Średnia zawartość suchej masy* [% wag.]
Fasola szparagowa	25,89 ± 0,75
Wątroba drobiowa	25,84 ± 0,18

*Wyniki są średnią z 3 niezależnych powtórzeń

4.4. Porównanie wydajności izolacji DNA z produktów żywnościowych wybranymi metodami

W celu porównania wydajności izolacji kwasów nukleinowych z wybranych produktów żywnościowych zastosowano klasyczną ekstrakcję rozpuszczalnikami z wykorzystaniem mieszaniny fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1, v/v/v) oraz dedykowane zestawy do izolacji DNA z żywności (NucleoSpin® Food, Macherey-Nagel) i materiału roślinnego (NucleoSpin® Plant II, Macherey-Nagel). W tab. 7. zestawiono średnie zawartości DNA w próbkach obliczone na podstawie zmierzonego stężenia kwasów nukleinowych w izolatach, mas naważek i objętości buforu zastosowanego do elucji, a także czystość DNA w uzyskanych izolatach oznaczoną spektrofotometrycznie. Czystość DNA określa się na podstawie stosunku absorbancji zmierzonych dla długości fali 260 oraz 280 nm. Przyjmuje się, że dla wartości $A_{260}/A_{280} > 1,8$, próbka jest wolna od zanieczyszczeń takich jak białka, fenol, czy inne substancje silnie absorbujące przy 280 nm.

Tabela 7. Zawartość DNA w badanych produktach żywnościowych oznaczona z zastosowaniem różnych metod izolacji

Rodzaj próbki	Metoda izolacji	Średnia zawartość DNA w próbce*		A ₂₆₀ /A ₂₈₀
		[mg/g mokrej masy]	[mg/g suchej masy]	
Fasola szparagowa	Zestaw NucleoSpin® Plant II - liza z CTAB	0,06 ± 0,01	0,24 ± 0,04	1,87 ± 0,05
	Zestaw NucleoSpin® Plant II - liza z SDS	0,09 ± 0,03	0,36 ± 0,10	1,88 ± 0,04
	Izolacja rozpuszczalnikami	2,99 ± 0,14	11,55 ± 0,55	2,16 ± 0,03
Wątroba drobiowa	Zestaw NucleoSpin® Food	1,45 ± 0,18	5,62 ± 0,71	2,03 ± 0,01
	Izolacja rozpuszczalnikami	8,52 ± 2,19	32,96 ± 8,49	1,99 ± 0,03

*Wyniki są średnią z 3 niezależnych powtórzeń

Uzyskane wyniki wskazują na wyższą wydajność izolacji kwasów nukleinowych z zastosowaniem ekstrakcji rozpuszczalnikami w porównaniu do izolacji z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów, zarówno dla materiału roślinnego (od ok. 32 do 48 razy większy odzysk), jak i zwierzęcego (prawie 6 razy większy odzysk). W przypadku nasion fasoli szparagowej, podczas izolacji zestawem NucleoSpin® Plant II, procedura z zastosowaniem SDS umożliwiła uzyskanie 1,5 razy większej ilości DNA niż w przypadku izolacji z dodatkiem CTAB. Na niski, końcowy odzysk kwasów nukleinowych w izolatach uzyskanych z zastosowaniem gotowych zestawów wpływ może mieć m.in. objętość buforu użytego do elucji. Jak podaje producent zestawu NucleoSpin® Plant II, zastosowanie 100 µL eluenta pozwala na odzysk 60-70% kwasów nukleinowych związanych z wypełnieniem kolumny. Natomiast dwukrotna elucja 100 µL buforu skutkuje odzyskaniem od 95 do 100 % kwasów nukleinowych, jednak prowadzi do otrzymania bardziej rozcieńczonego izolatu. Procedura izolacji zestawem NucleoSpin® Plant II uwzględniała także użycie RNazy, czego nie zastosowano przy ekstrakcji rozpuszczalnikami. Ewentualna obecność RNA w izolatach mogła wpłynąć na wyższy wynik oznaczonej zawartości DNA zmierzony spektrofotometrycznie. W przypadku izolacji rozpuszczalnikami średnia zawartość DNA w izolatach z wątroby drobiowej jest prawie 3-krotnie większa niż w izolatach z nasion fasoli szparagowej. Może się to wiązać nie tylko z faktycznie wyższą

zawartością tych makrocząsteczek w tkankach zwierzęcych, ale także z zastosowanym sposobem homogenizacji próbki. Komórki roślinne posiadają bardzo wytrzymałą ścianę komórkową, co uniemożliwia jej pełne rozbicie, a to z kolei skutkuje utrudnionym uwalnianiem kwasów nukleinowych z wnętrza komórek. Wszystkie zastosowane metody ekstrakcji pozwoliły na uzyskanie izolatów o wysokiej czystości ($A_{260}/A_{280} > 1,8$). Należy jednak zaznaczyć, że wartości A_{260}/A_{280} dla kwasów nukleinowych wyizolowanych z fasoli szparagowej z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych oraz dla kwasów nukleinowych wyizolowanych z wątroby drobiowej są większe lub oscylują wokół wartości 2, co może wskazywać na obecność RNA w tych izolatach (Khosravinia i in., 2007).

4.5. Ocena stopnia fragmentacji kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych z wykorzystaniem elektroforezy agarozowej

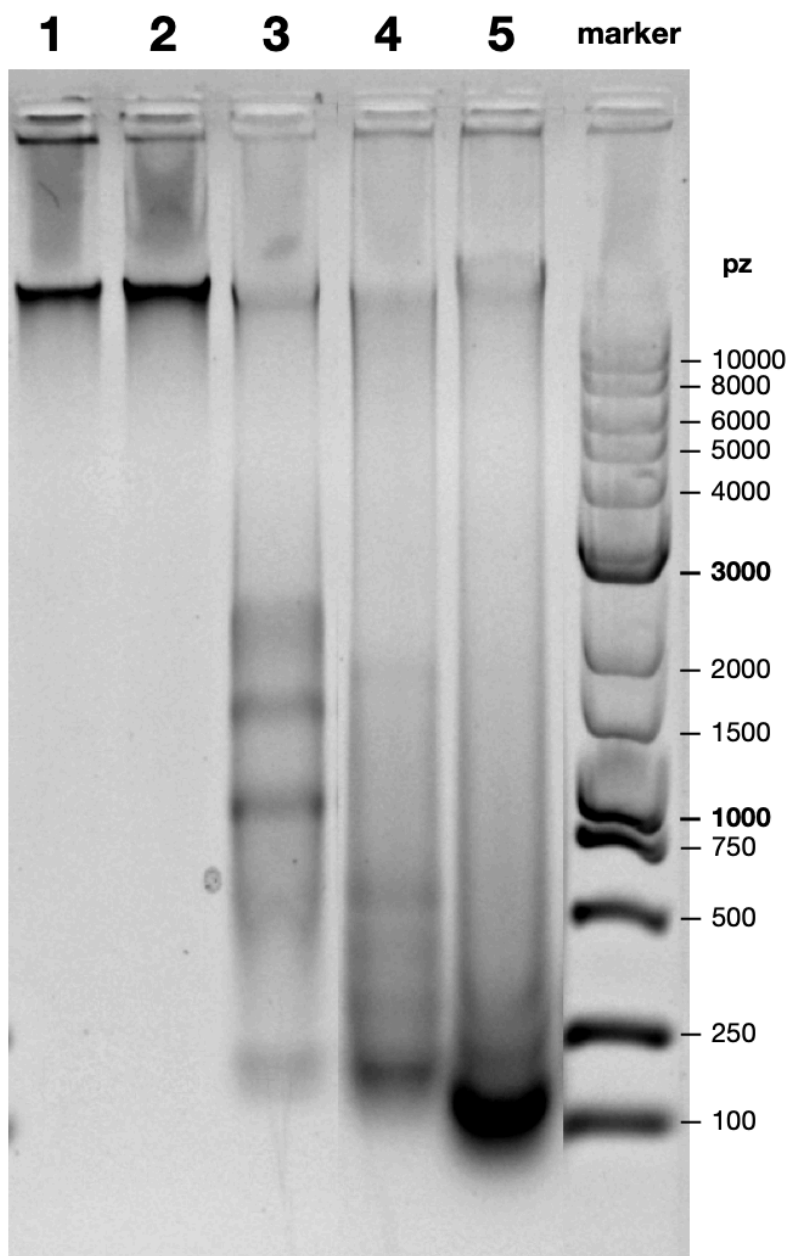
Na rys. 13 przedstawione są profile fragmentacji kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych uzyskane z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym. Do fragmentacji długołańcuchowych kwasów nukleinowych może prowadzić narażenie na czynniki genotoksyczne, jak i sama procedura izolacji. Uzyskane profile są więc wynikiem działania wszystkich czynników wpływających na stopień fragmentacji kwasów nukleinowych. Zarówno tych, które oddziaływały na badane produkty żywnościowe przed i po ich zbiorze/ uboju, jak i tych działających bezpośrednio na kwasy nukleinowe podczas ekstrakcji.

Izolacja DNA z fasoli szparagowej z zastosowaniem zestawu NucleoSpin® Plant II, zarówno w przypadku lizy z CTAB (rys. 13, ścieżka 1) jak i SDS (rys. 13, ścieżka 2), pozwoliła na otrzymanie niepofragmentowanych kwasów nukleinowych o długości powyżej 10 000 pz. W przypadku ekstrakcji rozpuszczalnikami, widoczne są długie fragmenty powyżej 10 000 pz, jak i krótsze odcinki kwasów nukleinowych w zakresie od ok. 200 do 3 000 pz (rys. 13, ścieżka 3). Dla wątroby drobiowej izolacja zestawem NucleoSpin® Food (rys. 13, ścieżka 4) pozwoliła na uzyskanie fragmentów odpowiadających długości powyżej 10 000 pz oraz poniżej 2 000 pz, natomiast dla ekstrakcji rozpuszczalnikami na elektroforegramie (rys. 13,

ścieżka 5) widoczne są fragmenty kwasów nukleinowych powyżej 10 000 pz oraz poniżej ok. 300 pz.

Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w stopniu fragmentacji kwasów nukleinowych pochodzących z fasoli szparagowej oraz wątroby drobiowej. Obserwacje te pokrywają się z wynikami uzyskanymi w teście kometowym. DNA nasion fasoli składa się z długich fragmentów powyżej 10 000 pz (rys. 13, ścieżki 1 i 2), natomiast DNA wątroby to głównie krótsze fragmenty poniżej 2 000 pz, przy czym największą intensywnością charakteryzują się fragmenty o długości ok. 100-200 pz (rys. 13, ścieżki 4 i 5), w zależności od metody. Ich obecność wskazuje na fragmentację materiału genetycznego w regionach pomiędzy nukleosomami, których rdzeń otacza fragment DNA o długości ok. 146 pz (Khorasanizadeh, 2004; Cutter i Hayes, 2015). Intensywność prążków odpowiadających fragmentom o długości ok. 100 pz na elektroforegramie wskazuje na zbyt wysokie stężenie kwasów nukleinowych w izolacie nałożonym na żel agarozowy. Mogło to doprowadzić do migracji fragmentów poniżej obszaru odpowiadającego ich faktycznej wielkości; są to raczej fragmenty odpowiadające odległościom między nukleosomami.

Zastosowanie różnych metod izolacji pokazało wpływ procedury ekstrakcji rozpuszczalnikami na stopień fragmentacji kwasów nukleinowych w porównaniu do izolacji z użyciem komercyjnie dostępnych zestawów. Te ostatnie pozwoliły na uzyskanie dłuższych fragmentów w przypadku fasoli szparagowej (rys. 13, ścieżki 1 i 2 w porównaniu do ścieżki 3) oraz dłuższych fragmentów dla wątroby drobiowej (rys. 13, ścieżka 4 w porównaniu do ścieżki 5). Obecność większej ilości krótszych odcinków kwasów nukleinowych w izolatach uzyskanych metodą ekstrakcji rozpuszczalnikami wynika prawdopodobnie z etapów mechanicznego wytrząsania, pod wpływem którego łańcuchy kwasów nukleinowych mogły ulegać pęknięciom na odcinkach pomiędzy nukleosomami. Otrzymane wyniki uzasadniają wykorzystywanie zestawów do izolacji kwasów nukleinowych dla uzyskania reprezentatywnych cząsteczek, np. do reakcji PCR, gdzie wydajność ekstrakcji nie jest tak istotna jak szybkość i łatwość zastosowanej procedury. Zestawy te nie wydają się jednak nadawać do ilościowej izolacji opisywanych makromolekuł, gdyż



Rys. 13. Profile fragmentacji kwasów nukleinowych wyizolowanych z fasoli szparagowej z zastosowaniem zestawu NucleoSpin® Plant II - liza z CTAB (1), zestawu NucleoSpin® Plant II - liza z SDS (2), izolacji rozpuszczalnikami (3) oraz kwasów nukleinowych wyizolowanych z wątroby drobiowej z zastosowaniem zestawu NucleoSpin® Food (4) i izolacji rozpuszczalnikami (5). Zastosowano marker wielkości od 100 do 10 000 par zasad.

wydajność izolacji jest zdecydowanie niższa niż w przypadku zastosowania ekstrakcji rozpuszczalnikami (tab. 7.). Ponieważ klasyczna metoda izolacji pozwoliła na większy odzysk badanych makrocząsteczek, kwasy nukleinowe izolowane właśnie tą metodą zostały wykorzystane do dalszych badań z użyciem linii komórkowych.

4.6. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek ludzkiego układu pokarmowego

Kwasy nukleinowe stanowią podstawowe składniki komórki, dzięki którym może ona prawidłowo rosnąć, rozwijać się oraz ulegać proliferacji. Są niezbędne m.in. do syntezy białek (DNA i RNA), stanowią nośnik informacji genetycznej przekazywany komórkom potomnym w procesie replikacji (DNA), ich pochodne uczestniczą w przenoszeniu energii (ATP) i stanowią elementy koenzymów zaangażowanych w wiele procesów metabolicznych (m.in. NAD⁺ i FAD odpowiedzialne za przenoszenie elektronów i protonów w łańcuchu oddechowym, CoA uczestniczący w cyklu Krebsa). Ponadto niekodujące cząsteczki RNA (ncRNA - należą do nich m.in. miRNA) odpowiadają za regulację ekspresji genów, zarówno na poziomie transkrypcyjnym, potranskrypcyjnym, jak i epigenetycznym. Komórki zdolne są zarówno do syntezy kwasów nukleinowych *de novo*, jak i do wykorzystania egzogennych makromolekuł na drodze odzysku, co jest mniej kosztowne energetycznie (Carver i Walker, 1995; Zhang i in., 2019).

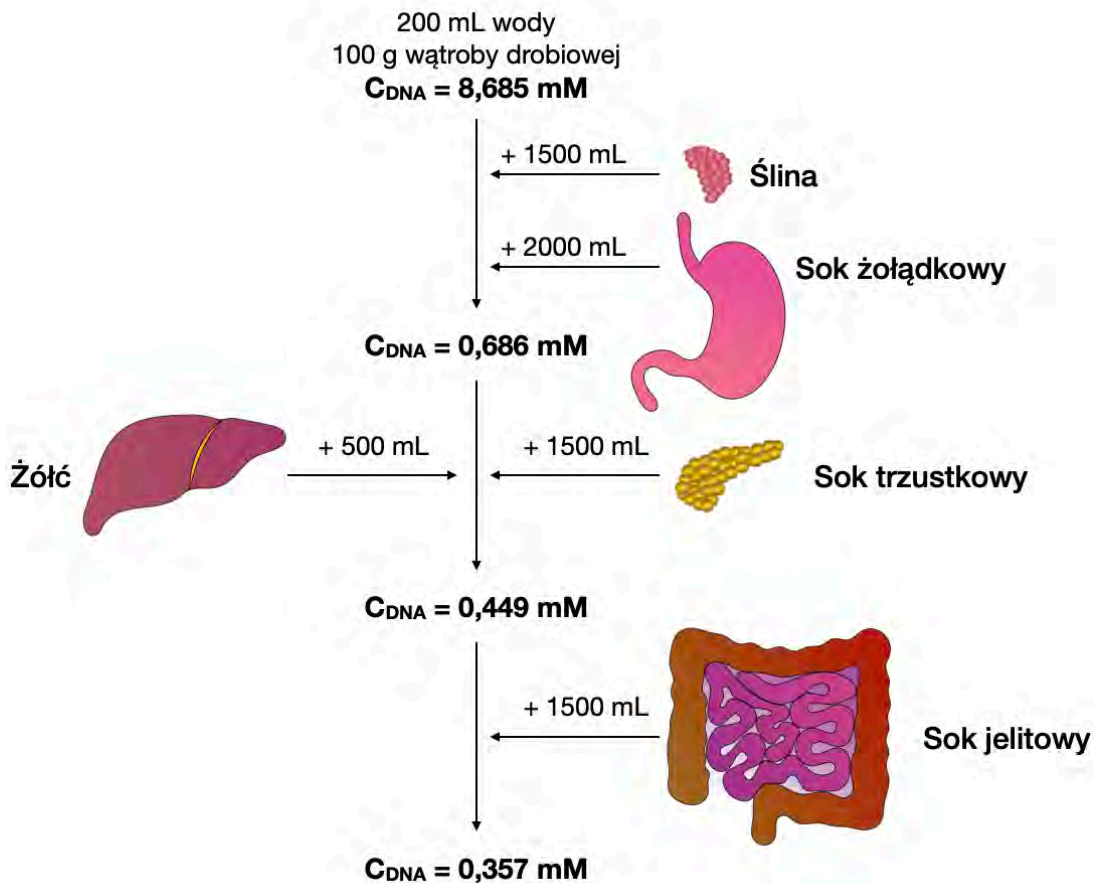
Przeprowadzone w ramach prezentowanego projektu doktorskiego badania na liniach komórkowych opierały się na założeniu, że komórki przewodu pokarmowego będą wykorzystywały dostarczane z zewnątrz kwasy nukleinowe i ich komponenty, a biodostępność tych makromolekuł będzie skutkowałą pobudzeniem wzrostu wybranych linii komórek jelita i wątroby. Kwasy nukleinowe pochodzące z żywności docierają do jelit zarówno w postaci dłuższych fragmentów (nawet kilkuset par zasad), jak i w formie strawionej, głównie w postaci nukleozydów. W związku z tym do badań zostały wykorzystane zarówno wyizolowane z produktu roślinnego oraz zwierzęcego kwasy nukleinowe, jak i pojedyncze nukleozydy oraz mieszaniny tych cząsteczek. W badaniach wykorzystano deoksyrybonukleozydy, które są niezbędne do syntezy DNA, oraz rybonukleozydy, będące prekursorami zarówno RNA, jak i DNA.

Do oceny wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek wybranych linii zastosowano test MTT. Jest on podstawowym narzędziem do badania wpływu związków chemicznych na wzrost komórek w warunkach *in vitro*. W przeprowadzonych doświadczeniach, jako



modele tkanek przewodu pokarmowego, wykorzystano ludzkie linie komórkowe. Komórki tych tkanek albo mają bezpośredni kontakt ze spożywaną żywnością w przypadku jelita (HT29 i CCD 841 CoN) albo produktami jej trawienia w przypadku jelita (HT29 i CCD 841 CoN) i wątroby (HepG2). Jak opisano we Wstępie (rozdział 4. WYNIKI), kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego trafiają do komórek wątroby głównie w formie nukleozydów, jednak badania naukowe wskazują na obecność dłuższych fragmentów kwasów nukleinowych również w wątrobie (Chowdhury i in., 2004; El-Sanhoty i in., 2006; Guertler i in., 2008; Ran i in., 2009). Z tego względu ocena wpływu izolatów kwasów nukleinowych, jak i pojedynczych nukleozydów, została przeprowadzona zarówno dla komórek jelita, jak i wątroby. Uzyskane wyniki testu MTT zostały przedstawione w postaci wykresów zależności wzrostu komórek od czasu ekspozycji oraz stężenia danego związku (nazywane tu krzywymi przeżycia) (rys. 15-19. dla HT29, rys. 20. dla CCD 841 CoN oraz rys. 21-24. dla HepG2). Użyty zakres stężeń dla roztworów wodnych adenozy, cytydiny, urydiny, deoksyadenozy, deoksycytydiny i tymidiny zawierał się w przedziale od 0,01 do 1000 μM . Wpływ guanozy i deoksyguanozy zbadano w zakresie stężeń 0,01-100 μM ze względu na małą rozpuszczalność tych związków w wodzie. Również dla mieszanin nukleozydów oraz izolatów kwasów nukleinowych zastosowano stężenia od 0,01 do 100 μM .

Na rys. 14. przedstawione są teoretycznie możliwe do uzyskania stężenia kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym po spożyciu 100 g wątroby drobiowej. Grafikę przygotowano na podstawie informacji zawartych w publikacji autorstwa Sensoy I. (2021). Obliczenia stężeń przeprowadzono na podstawie średniej zawartości DNA w wątrobie drobiowej (tab. 7.), przyjmując za masę molową średnią z mas molowych nukleotydów, tzn. 327 g/mol. Dane przedstawione na rys. 14. wskazują, że użyte w badaniach stężenia kwasów nukleinowych nie przekraczały stężeń możliwych do osiągnięcia w układzie pokarmowym.

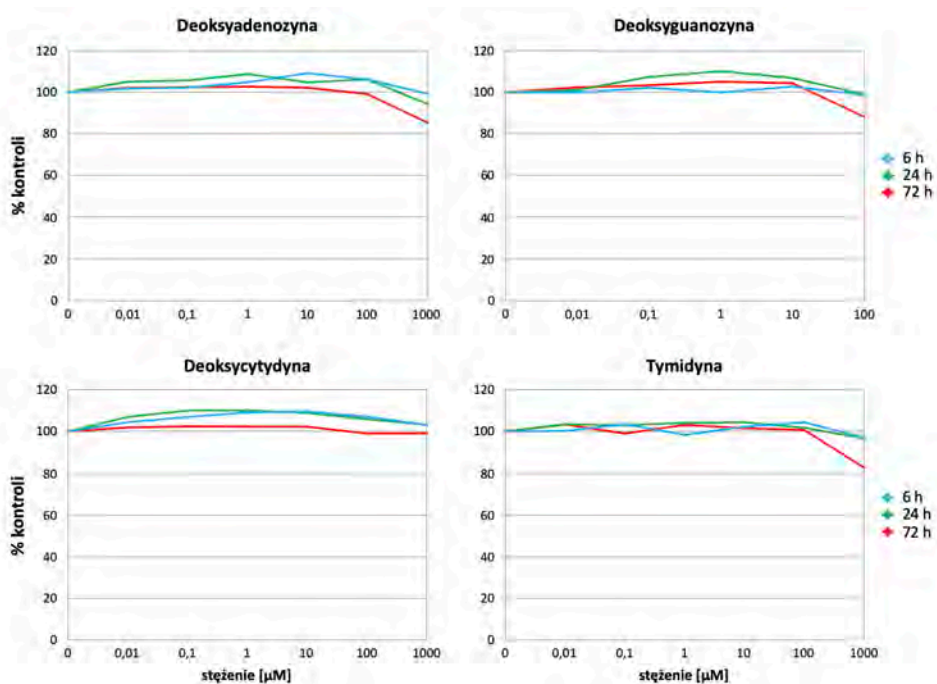


Rys. 14. Stężenia pokarmowego DNA teoretycznie możliwe do osiągnięcia w przewodzie pokarmowym po zjedzeniu 100 g wątroby drobiowej i wypiciu 200 mL wody, z uwzględnieniem objętości płynów wydzielanych przez poszczególne części układu pokarmowego (na podstawie Sensoy, 2021).

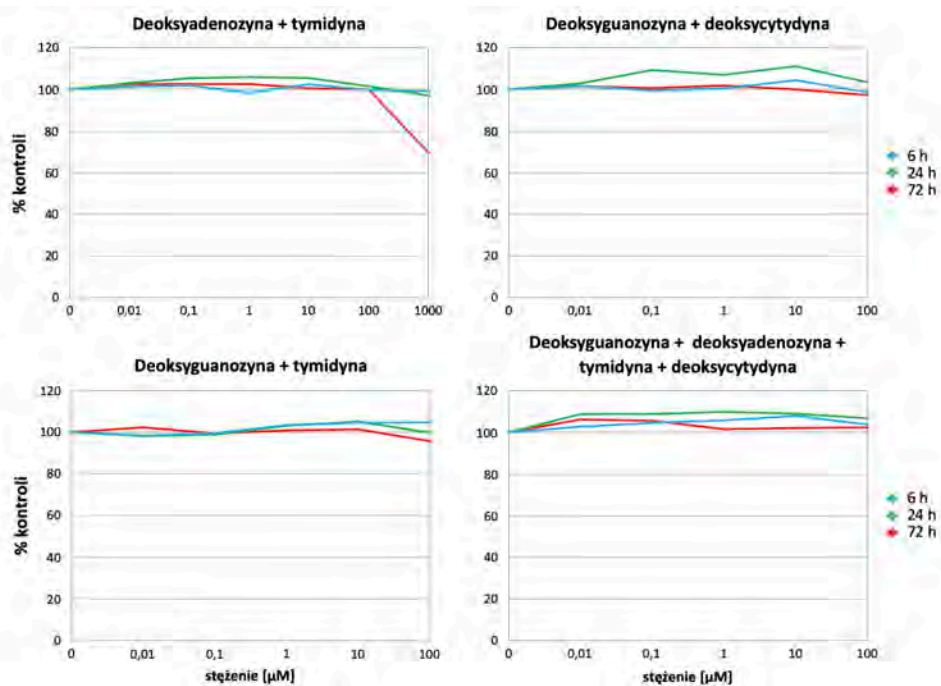
Jako pierwszy zbadany został wpływ deoksyrybonukleozydów, t.j. deoksyadenozyny, deoksyguanozyny, deoksytydyny, tymidyny oraz mieszanin tych związków na wzrost komórek linii HT29 (rys. 15 i 16). Cząsteczki te stanowią prekursor DNA, którego synteza jest niezbędna w celu naprawy uszkodzeń mogących zakłócać prawidłowe funkcjonowanie komórek, ale w szczególności zachodzi podczas replikacji poprzedzającej proliferację. Można byłoby się zatem spodziewać aktywnego pobierania i wykorzystywania egzogennych cząsteczek do syntezy własnych kwasów nukleinowych przez komórki jelita stanowiącego szybko namnażającą się tkankę. Uzyskane wyniki wskazują jednak na niewielki wpływ dodanych deoksyrybonukleozydów na wzrost komórek linii HT29. Przeciwnie, mieszanina deoksyadenozyny z tymidyną w stężeniu 1000 μM przy 72 h inkubacji spowodowała spadek przeżywalności poniżej 80% (rys. 16), w stosunku do komórek kontrolnych. Brak zauważalnego pobudzenia wzrostu w standardowych

warunkach eksperymentu, gdzie nie są wprowadzane dodatkowe czynniki upośledzające metabolizm komórkowy może oznaczać, że komórki jelita pokrywają całkowicie swoje zapotrzebowanie na prekursory DNA wykorzystując syntezę *de novo*. Możliwe jest również, że komórki korzystają z obecnych już w pożywce hodowlanej kwasów nukleinowych i/lub ich pochodnych, a zwiększanie stężenia tych cząsteczek nie ma już wpływu na pobudzenie wzrostu komórek.

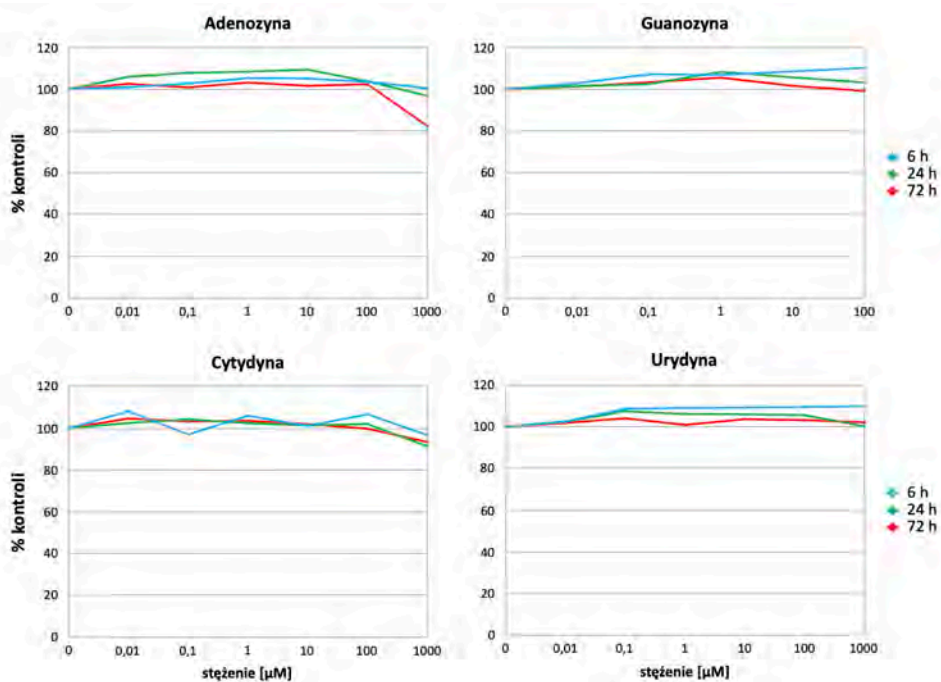
Kolejnym etapem było sprawdzenie wpływu adenozyiny, guanozyiny, cytydyny, urydyny oraz mieszanin tych związków na wzrost komórek linii HT29 (rys. 17 i 18). Rybonukleozydy stanowią zarówno prekursory DNA (difosforany nukleozydów są redukowane przez reduktazę rybonukleotydomową do difosforanów deoksyrybonukleozydów), jak i RNA, które to cząsteczki są cały czas syntetyzowane, bowiem pełnią liczne funkcje regulujące procesy zachodzące w komórkach, a także uczestniczą w replikacji DNA jako primery. Również i w przypadku rybonukleozydów nie zaobserwowano ich wpływu na wzrost komórek jelita. Tak jak w przypadku deoksyrybonukleozydów i ich mieszanin wskazuje to na całkowite pokrywanie zapotrzebowania na te cząsteczki przez syntezę *de novo* prekursorów DNA i RNA przez komórki. Co więcej, jak podają Wei i wsp., płodowa surowica bydlęca (FBS), standardowo dodawana do pożywki hodowlanej w kulturach *in vitro*, jest źródłem wielu rodzajów cząsteczek RNA, a więc w przeprowadzanych eksperymentach pewna ilość tych makromolekuł była już dostępna dla komórek (Wei i in., 2016).



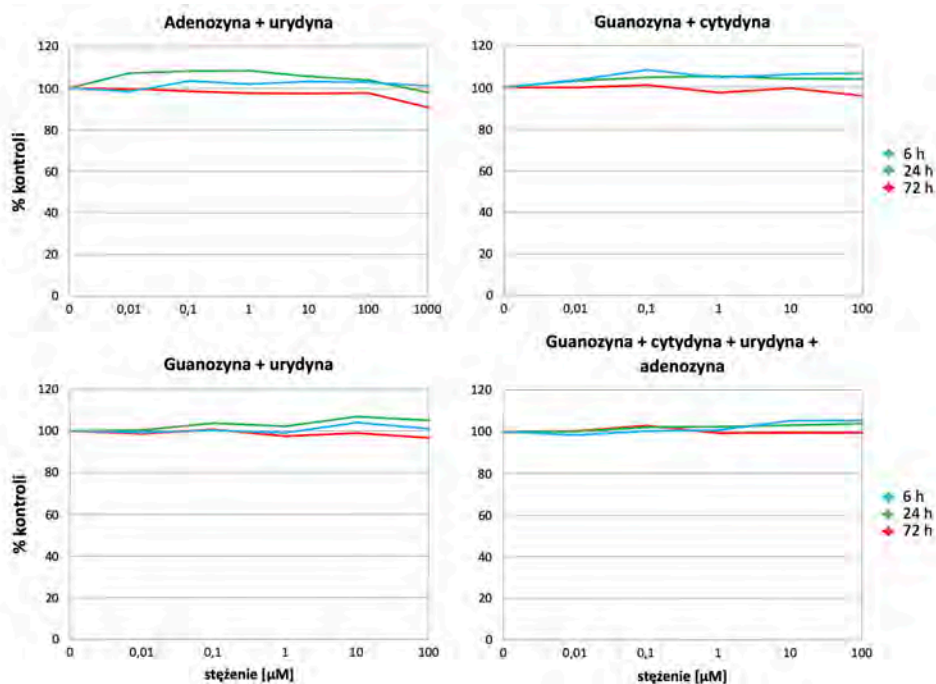
Rys. 15. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych prekursorami DNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.



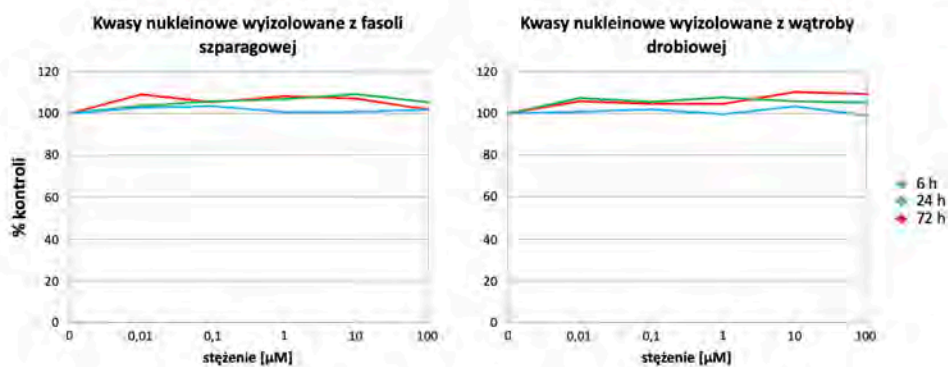
Rys. 16. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych mieszaninami prekursorów DNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 12%.



Rys. 17. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych prekursorami RNA i DNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.



Rys. 18. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych mieszaninami prekursorów DNA i RNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 11%.

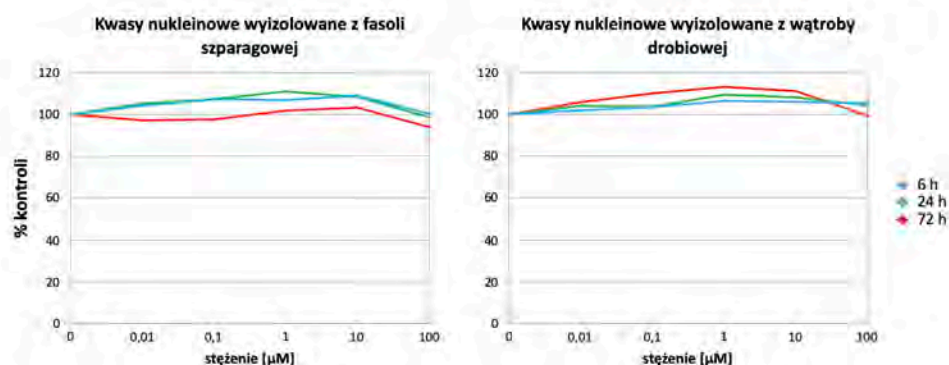


Rys. 19. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z fasoli szparagowej oraz wątroby drobiowej przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 12%.

Dodatek pojedynczych nukleozydów oraz ich mieszanin nie wpłynął na wzrost komórek linii HT29. Tkanka jelita ma jednak kontakt nie tylko z produktami trawienia kwasów nukleinowych, reprezentowanych w niniejszych badaniach przez nukleozydy, ale także z dłuższymi fragmentami łańcuchów polinukleotydowych, które nie uległy całkowitej hydrolizie w przewodzie pokarmowym. Dlatego kolejnym krokiem badawczym było sprawdzenie wpływu wyizolowanych z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych na wzrost komórek linii HT29. Wykorzystano izolaty uzyskane z nasion fasoli szparagowej, reprezentującej produkty pochodzenia roślinnego, oraz izolaty z wątroby drobiowej, jako przedstawiciela produktów pochodzenia zwierzęcego. Kwasy nukleinowe wyizolowane z badanych produktów różniły się istotnie stopniem fragmentacji, co można zaobserwować na elektroforegramie przedstawionym na rys. 13. Wzrost komórek HT29 traktowanych izolatami z fasoli szparagowej, ani izolatami z wątroby drobiowej (rys. 19), nie wskazuje na wpływ dodanych kwasów nukleinowych na stymulację wzrostu komórek jelita. Tak jak w przypadku nukleozydów, prawdopodobnie synteza *de novo* oraz dostępność kwasów nukleinowych w pożywce hodowlanej powodują, że komórki nie są zmuszone do korzystania z dodatkowych, egzogennych źródeł omawianych cząsteczek.

Badania wpływu wyizolowanych z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych na wzrost komórek linii HT29 uzupełniono doświadczeniami przeprowadzonymi z wykorzystaniem normalnej ludzkiej linii CCD 841 CoN, będącej niestransformowanym odpowiednikiem linii HT29. Uzyskane wyniki

również nie wskazują na znaczący wpływ badanych izolatów na wzrost komórek jelita (rys. 20.).

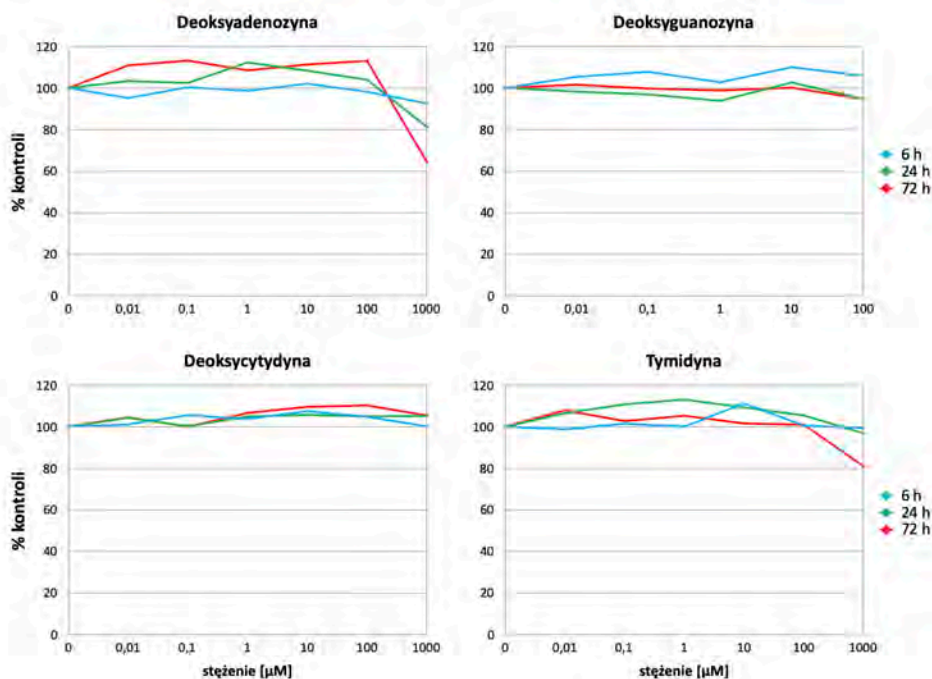


Rys. 20. Krzywe przeżycia dla komórek CCD 841 CoN traktowanych kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z fasoli szparagowej oraz wątroby drobiowej przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 15%.

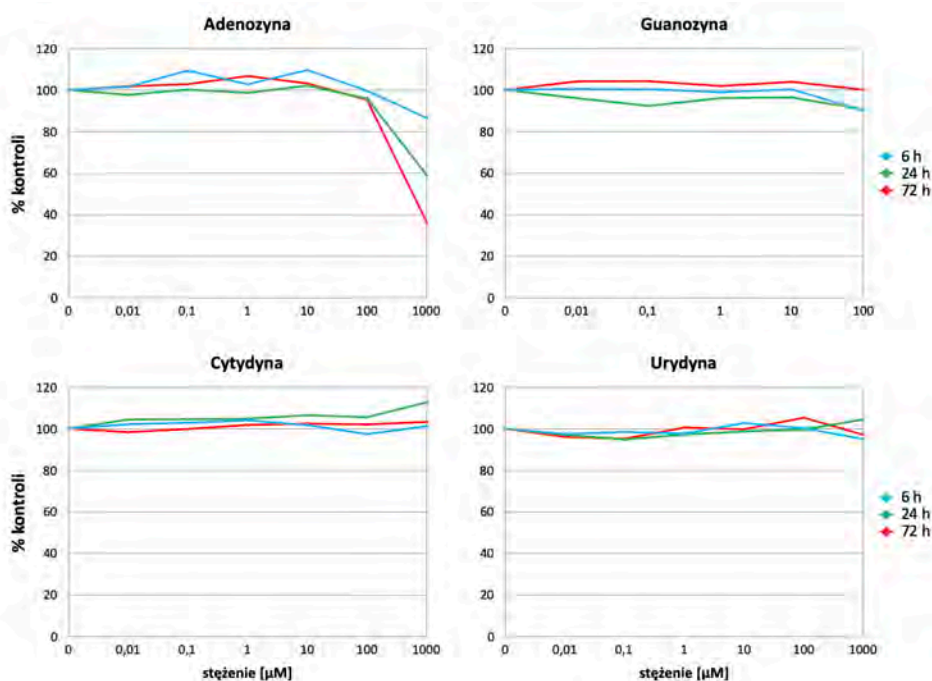
Omówione wcześniej doświadczenia powtórzono także dla komórek linii nowotworowej wątroby HepG2. Wpływ na wzrost komórek sprawdzono dla rybo- i deoksyrybonukleozydów, które stanowią główny metabolit pokarmowych kwasów nukleinowych. Doświadczenia przeprowadzono także dla kwasów nukleinowych wyizolowanych z wątroby drobiowej oraz fasoli szparagowej. W badaniach nie uwzględniono mieszanin dwuskładnikowych, ze względu na brak istotnych różnic w wynikach uzyskanych dla linii HT29 w porównaniu do pojedynczych nukleozydów i mieszanin czteroskładnikowych. Wyniki uzyskane dla komórek HepG2 przedstawione są na kolejnych wykresach (rys. 21-24).

Wyniki otrzymane dla linii HepG2 w większości przypadków wskazują na niewielki wpływ nukleozydów oraz ich mieszanin na wzrost tych komórek. Wątroba jest organem odpowiedzialnym za produkcję i dostarczanie prekursorów kwasów nukleinowych do innych narządów w organizmie. Można więc oczekiwać, że synteza *de novo* omawianych cząsteczek przez hepatocyty jest wystarczająca do pokrycia również ich własnego zapotrzebowania. Nieznaczną stymulację wzrostu można zauważyć jedynie w przypadku zastosowania izolatów z fasoli szparagowej (rys. 24.) co może oznaczać, że komórki wątroby w pewnym stopniu wykorzystywały obecne w izolacie kwasy nukleinowe. W przypadku deoksyadenozyny (rys. 21) oraz adenozyiny (rys. 22) można natomiast

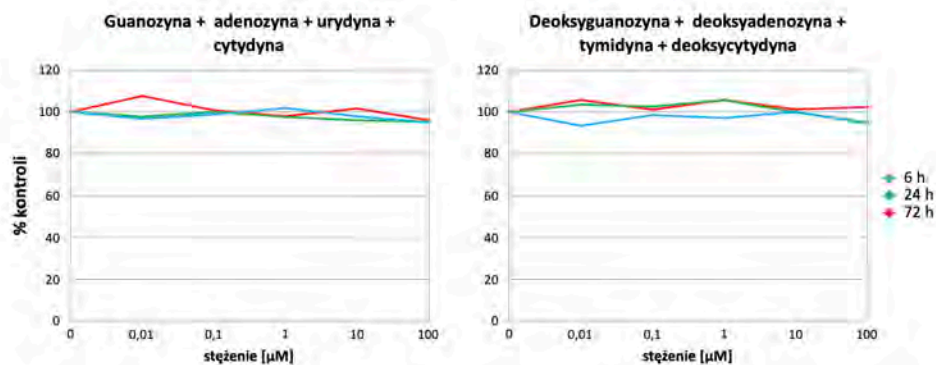
zaobserwować, że dodatek tych związków w stężeniu 1000 μM przy 72 h inkubacji spowodował znaczne ograniczenie wzrostu komórek do poziomu odpowiednio poniżej 70% i 40% kontroli.



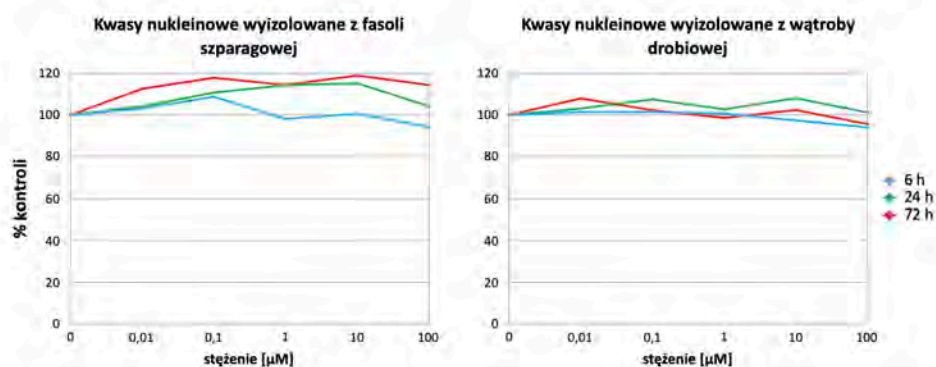
Rys. 21. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych prekursorami DNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 17%.



Rys. 22. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych prekursorami DNA i RNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 12%.



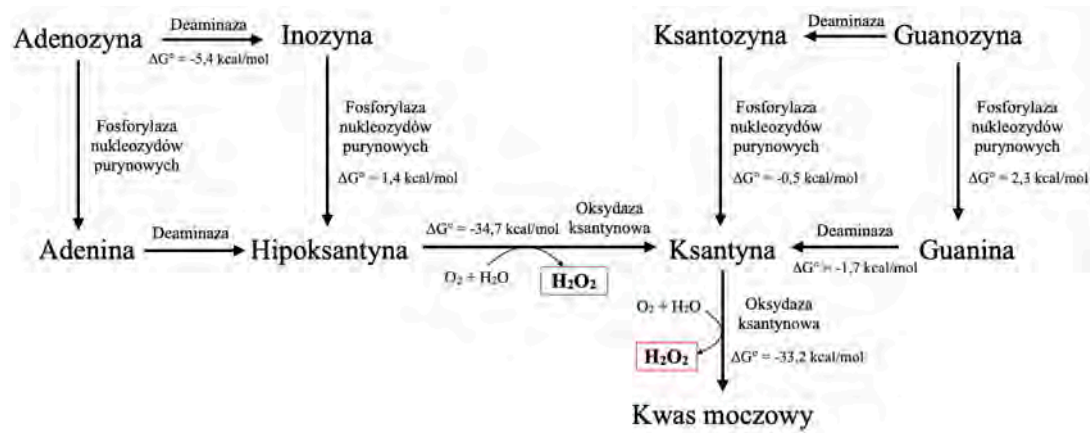
Rys. 23. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych mieszaninami prekursorów DNA i RNA przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 13%.



Rys. 24. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z fasoli szparagowej oraz wątroby drobiowej przez 6, 24 i 72 h. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 13%.

Zmniejszenie wzrostu w przypadku traktowania wysokimi stężeniami dA/A może mieć związek z intensywnym metabolizmem puryn w hepatocytach, prowadzącym do powstania kwasu moczowego. W wyniku tego procesu tworzy się również nadtlenek wodoru (Jin i in., 2012; Yin i in., 2022), który może przyczyniać się do zwiększenia stresu oksydacyjnego w komórkach do poziomu cytotoksycznego. Proces powstawania nadtlenku wodoru z prekursorów purynowych przedstawiono schematycznie na rys. 25. Słaba rozpuszczalność w wodzie deoksyguanozyny oraz guanozyny uniemożliwiła zastosowanie stężenia 1000 μM w pożywce hodowlanej, przez co niemożliwa była ocena wpływu tych związków w takim stężeniu na wzrost komórek. Analizując przemiany przedstawione na rys. 25. można spodziewać się, że dodatek dG i G w wysokim

stężeniu również spowodowałby obniżenie przeżywalności hepatocytów wskutek cytotoksycznego działania H_2O_2 .



Rys. 25. Metabolizm nukleozydów purynowych prowadzący do powstania kwasu moczowego z jednoczesnym utworzeniem nadtlenu wodoru, z uwzględnieniem zmian energii swobodnej Gibbsa (ΔG°) przy pH = 7 (na podstawie Van Kreel, 1985; Jin i in., 2012).

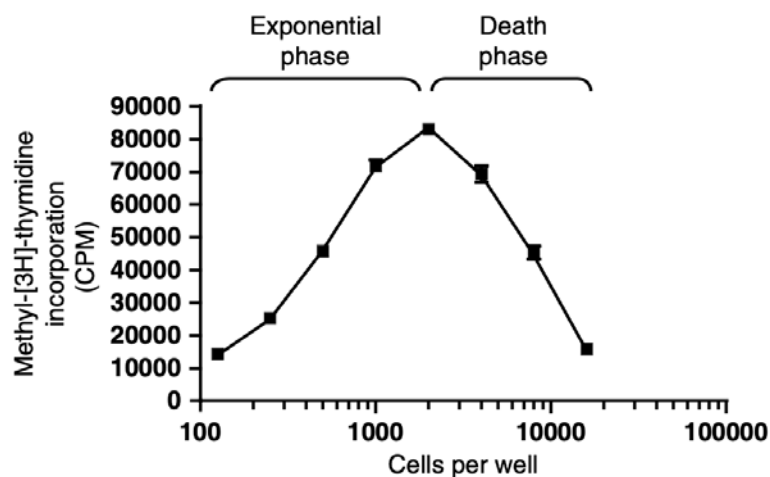
Wspomnianego efektu zmniejszenia przeżywalności nie zaobserwowano natomiast w przypadku linii HT29 (rys. 15 i 17). Powodem może być naturalnie większa odporność komórek jelita na wyższe stężenia substancji pochodzenia żywieniowego, a więc także nukleozwiązków, z którymi w wyniku spożywania pokarmu mają ciągły kontakt. Ponadto, jak podaje Yin i wsp., synteza kwasu moczowego zachodzi głównie w wątrobie, a w mniejszym stopniu w jelitach, które są natomiast odpowiedzialne za wydalanie ok. jednej trzeciej z puli powstającego w organizmie kwasu moczowego (pozostała część usuwana jest przez nerki) (Yin i in., 2022). Zaobserwowane różnice we wzroście mogą więc również wiązać się z intensywniejszym metabolizmem puryn przez komórki wątroby, a więc i większym stresem oksydacyjnym, na który są narażone.

Zarówno nukleozydy, będące głównym produktem trawienia kwasów nukleinowych obecnych w produktach żywnościowych, jak i wyizolowane z fasoli szparagowej i wątroby drobiowej kwasy nukleinowe, poza opisanymi powyżej wyjątkami, nie były toksyczne dla komórek układu pokarmowego. Obserwacje te są zgodne z oczekiwaniami, gdyż badane związki, jako podstawowe, potencjalnie odżywcze składniki obecne we wszystkich niskoprzetworzonych produktach żywnościowych, w użytych stężeniach mieszczących się w zakresie możliwym do

osiągnięcia w przewodzie pokarmowym po spożyciu posiłku, nie powinny wykazywać cytotoksyczności ani w stosunku do komórek jelita grubego, ani wątroby. Należy również podkreślić, że badane makromolekuły nie są ksenobiotykami, ale naturalnymi produktami metabolizmu w organizmie człowieka, tak samo jak lipidy, białka oraz sacharydy.

Uzyskane wyniki mogą sugerować, że w warunkach dostępności składników odżywczych w pożywce, egzogenne kwasy nukleinowe i ich prekursory nie są preferencyjnie wykorzystywane. Może być to związane z samowystarczalnością szlaków anabolicznych będących źródłem endogennych kwasów nukleinowych. W przeprowadzonym eksperymencie oczekiwano jednak, że komórki reprezentujące tkanki przewodu pokarmowego będą aktywnie pobierały dostarczane im egzogenne nukleozydy oraz kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego. Założenie to wynikało z powszechnie udokumentowanej zdolności komórek do wbudowywania egzogennych prekursorów kwasów nukleinowych, co było wykorzystywane m.in. do śledzenia procesu syntezy DNA i RNA. W przypadku DNA było to możliwe dzięki absorbowaniu przez komórki trytowanej tymidyny ($^3\text{H-TdR}$) (Hu i in., 2002), natomiast w przypadku RNA wykorzystywana była znakowana urydyna, m.in. 5-bromourydyna (BrUrd) (Singha i in., 2021). Na rys 26. przedstawiony został przykładowy wykres obrazujący zdolność komórek do inkorporacji znakowanej tymidyny odzwierciedlający również ich przeżywalność. Można się było więc spodziewać, że obecność egzogennych kwasów nukleinowych i ich składowych będzie stymulowała wzrost komórek, ponieważ nie będą one ponosiły kosztów produkcji nukleotydów *de novo*.

Wbrew oczekiwaniom, wyniki uzyskane w teście MTT nie wskazały na wpływ egzogennych nukleozydów oraz wyizolowanych z fasoli szparagowej i wątroby drobiowej kwasów nukleinowych na wzrost komórek układu pokarmowego. Nie oznacza to jednak, że komórki nie wykorzystywały dodanych do pożywki egzogennych cząsteczek. W przypadku jelita, brak egzogennych puryn i pirymidyn pochodzenia żywieniowego aktywuje syntezę *de novo* kwasów nukleinowych. Natomiast obecność pochodzących z żywności puryn zwiększa jednocześnie odzysk, jak i katabolizm tych związków w wątrobie (Grimble, 1994). Potwierdza to,



Rys. 26. Przykładowa krzywa wzrostu komórek nowotworowych COLO-205 wyznaczona na podstawie stopnia inkorporacji ^3H -TdR przez komórki (Griffiths i Sundaram, 2011).

że pochodzące z diety cząsteczki są wykorzystywane przez komórki układu pokarmowego do syntezy własnych kwasów nukleinowych na drodze odzysku, co jednocześnie ogranicza aktywność ścieżki syntezy *de novo*. Stąd też dodane do pożywki egzogenne prekursor kwasów nukleinowych nie musiały spowodować stymulacji wzrostu komórek, a jedynie zahamowały endogenną biosyntezę tych cząsteczek. Wskazuje to także, że w normalnych warunkach komórki dysponują szeregiem mechanizmów zapewniających właściwy poziom tych podstawowych makromolekuł niezbędnych do przeżycia i prawidłowego funkcjonowania. Należy jednak zaznaczyć, że metody zastosowane w niniejszym projekcie doktorskim nie pozwoliły na rozróżnienie, w jakim stopniu egzogenne cząsteczki były wykorzystywane na drodze odzysku, a w jakiej części synteza DNA *de novo* była źródłem składników budujących kwasy nukleinowe w komórkach. Jeszcze innym wyjaśnieniem braku stymulacji wzrostu komórek HT29, CCD 841 CoN i HepG2 przez egzogenne prekursor kwasów nukleinowych może być ich ograniczone wykorzystanie ze względu na ryzyko mutacji. Chemiczna reaktywność puryn i pirymidyn stanowi potencjalne zagrożenie ze strony zmodyfikowanych (np. utlenionych) zasad azotowych, które mogą być pobierane przez komórki, wbudowywane do DNA, i przez to wpływać na ich przeżywalność. Potwierdza to m.in. przeciwnowotworowa aktywność 5-fluorouracylu (5-FU), którego celem jest syntaza tymidylanowa katalizująca syntezę tymidyno-5'-monofosforanu (TMP). Chemoterapeutyczne działanie tego związku wynika więc z jednej strony ze

zdolności do blokowania produkcji TMP *de novo*, ale także z możliwości wbudowywania 5-FU w pulę kwasów nukleinowych obecnych w komórkach (Longley i in., 2003). Można więc oczekiwać, że ze względów bezpieczeństwa komórki pobierają i wykorzystują jedynie część dostępnych, egzogennych składowych kwasów nukleinowych.

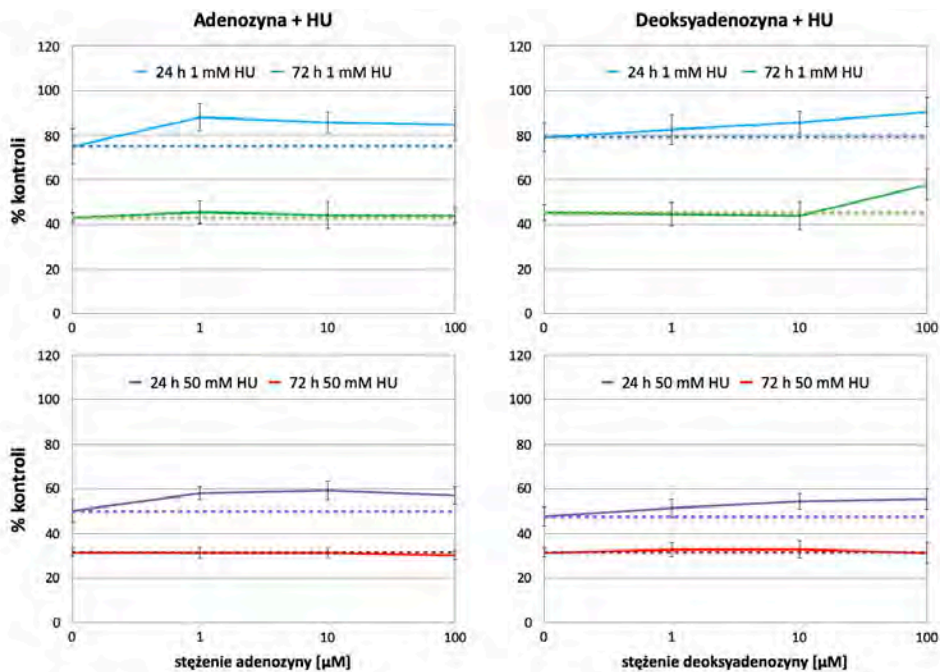
Przeprowadzone badania dowodzą, że dodatek kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych oraz pojedynczych nukleozydów i ich mieszanin w normalnych warunkach nie stymuluje wzrostu komórek. Jednak zdolność do korzystania z egzogennych źródeł cząsteczek budujących ich własne kwasy nukleinowe, a w szczególności do pobierania dostępnych w przewodzie pokarmowym prekursorów pochodzenia żywieniowego, może być szczególnie istotna w warunkach upośledzenia syntezy *de novo*. Aby potwierdzić tę hipotezę, w kolejnym kroku badawczym sprawdzono wpływ nukleozydów oraz wyizolowanych z wątroby drobiowej i fasoli szparagowej kwasów nukleinowych na wzrost komórek jelita oraz wątroby w warunkach zaburzonej endogennej syntezy DNA.

4.7. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na wzrost komórek HT29 i HepG2 z zaburzoną syntezą replikacyjną DNA

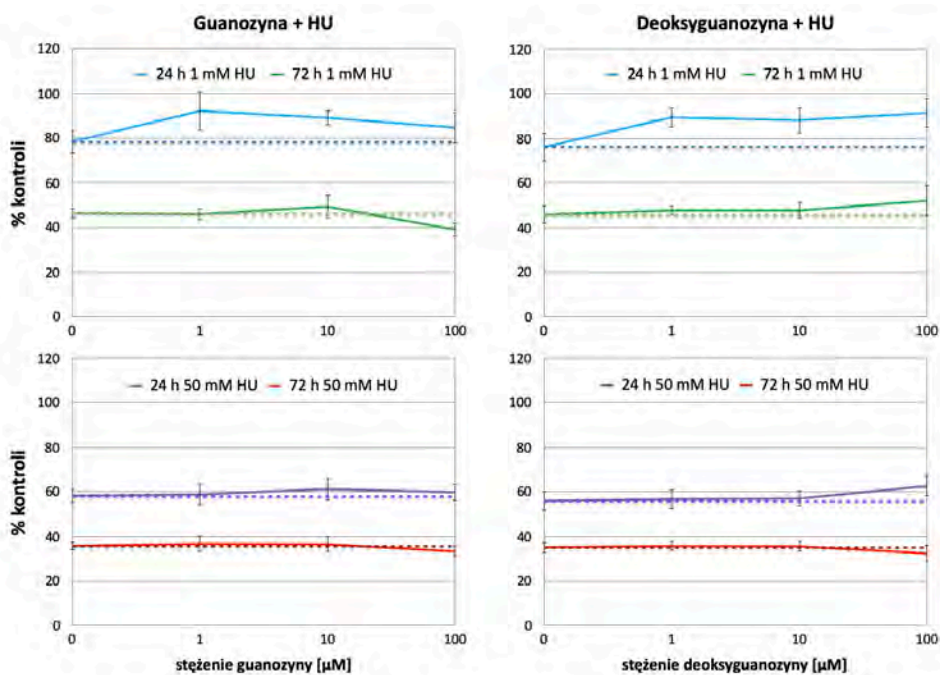
Proces syntezy DNA jest niezbędny m.in. do wzrostu i proliferacji komórek. Zachodzi on zarówno w czasie replikacji, jak i podczas naprawy uszkodzonego DNA. Jak wcześniej wspomniano, oprócz syntezy nukleotydów *de novo*, komórki są zdolne także do odzyskiwania części nukleozydów pochodzących z trawienia kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym (Carver i Walker, 1995). W podrozdziale 4.6 omówiono zdolność komórek jelita oraz wątroby do wykorzystywania egzogennych nukleozydów i kwasów nukleinowych, czyli tych pochodzących z żywności, i wskazano, że nie wpłynęła ona na wzrost komórek w normalnych warunkach hodowli. W kolejnym kroku podjęto badania mające na celu sprawdzenie, czy w sytuacji zaburzonej syntezy DNA dodatek egzogennych kwasów nukleinowych i ich prekursorów będzie miał wpływ na wzrost komórek HT29 oraz HepG2. W tym celu również wykorzystano test MTT, ale w warunkach

upośledzenia syntezy replikacyjnej DNA. Inhibicję syntezy DNA uzyskano poprzez dodanie HU, czynnika blokującego działanie reduktazy rybonukleotydowej (RNR). RNR odpowiedzialna jest za redukcję difosforanów rybonukleozydów do difosforanów deoksyrybonukleozydów (Kunos i in., 2011). Aktywność tego enzymu zapewnia komórce stały dostęp do prekursorów DNA i umożliwia syntezę *de novo* tego biopolimeru. Hamujące działanie HU polega na redukcji wolnego rodnika tyrozyłowego generowanego w podjednostce katalitycznej enzymu obecnego w komórkach ssaków, ale także na bezpośrednim oddziaływaniu na centrum żelazowe, co zaburza prawidłowe działanie RNR. Niewystarczająca dostępność deoksyrybonukleozydów w komórce powoduje zahamowanie syntezy replikacyjnej DNA (Nyholm i in., 1993; Przybyszewski i Kasperczyk, 2006; Singh i Xu, 2016).

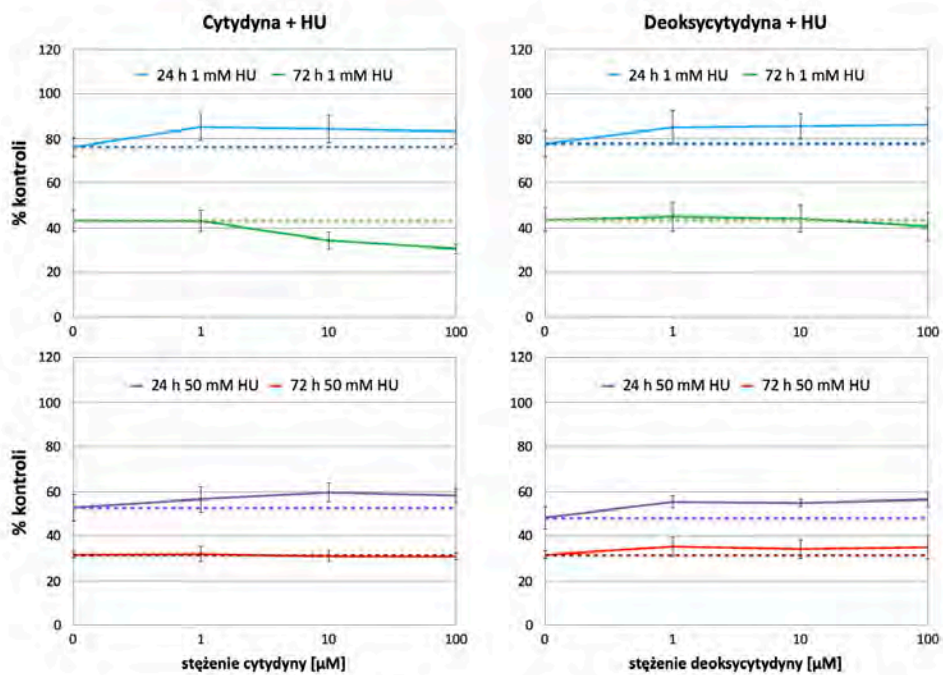
W przeprowadzonych doświadczeniach do komórek najpierw dodawano HU, po czym natychmiast nukleozydy lub wyizolowane z produktów żywnościowych kwasy nukleinowe. Komórki następnie inkubowano przez 24 lub 72 h w obecności 1 mM lub 50 mM HU. Zastosowane w teście 1 mM stężenie oraz 24-godzinny czas inkubacji z HU zostały wybrane na podstawie przeglądu literatury (Wadler i in., 1996; Florensa i in., 2003; Iacomino i in., 2006). Stężenie 50 mM HU oraz 72 h inkubacji stanowiły skrajne warunki w stosunku do wartości literaturowych. W obecnych badaniach stężenia nukleozydów oraz kwasów nukleinowych obejmowały zakres 1-100 μ M. Jak opisano w podrozdziale 4.6, są to wartości nieprzekraczające stężeń możliwych do uzyskania w przewodzie pokarmowym po spożyciu posiłku. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci wykresów zależności wzrostu komórek od stężenia danego prekursora syntezy DNA oraz czasu ekspozycji (rys. 27-32 dla HT29 oraz rys. 33-38 dla HepG2). Przeżywalność komórek traktowanych HU oraz nukleozydami lub wyizolowanymi kwasami nukleinowymi wyrażono jako % przeżywalności w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych jedynie wodą. Przerwanymi liniami zaznaczono na wykresach poziom przeżywalności komórek traktowanych tylko HU.



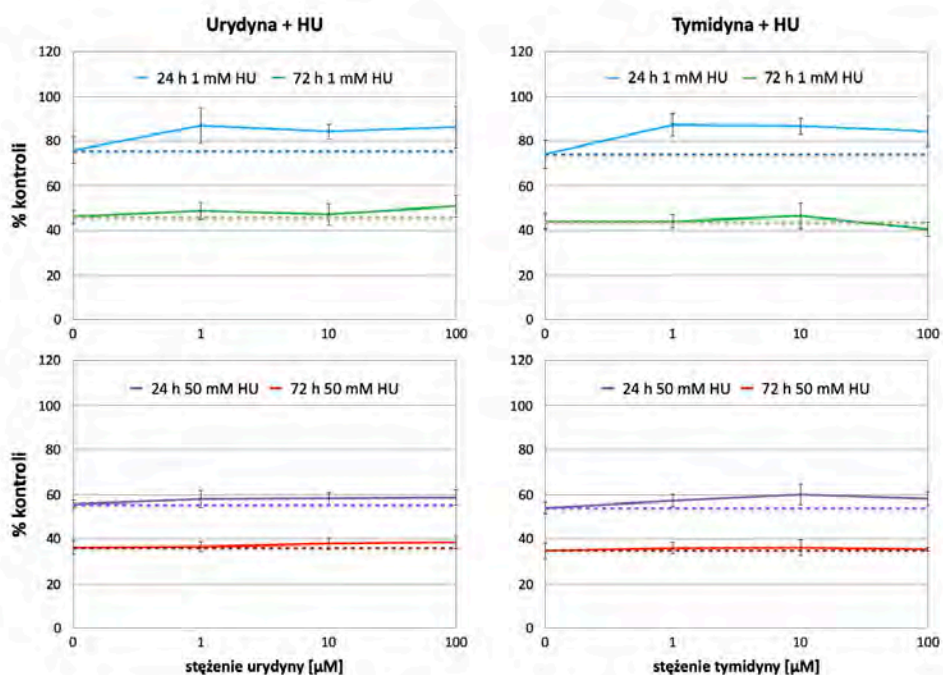
Rys. 27. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych adenozyną i deoksyadenozyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 8%.



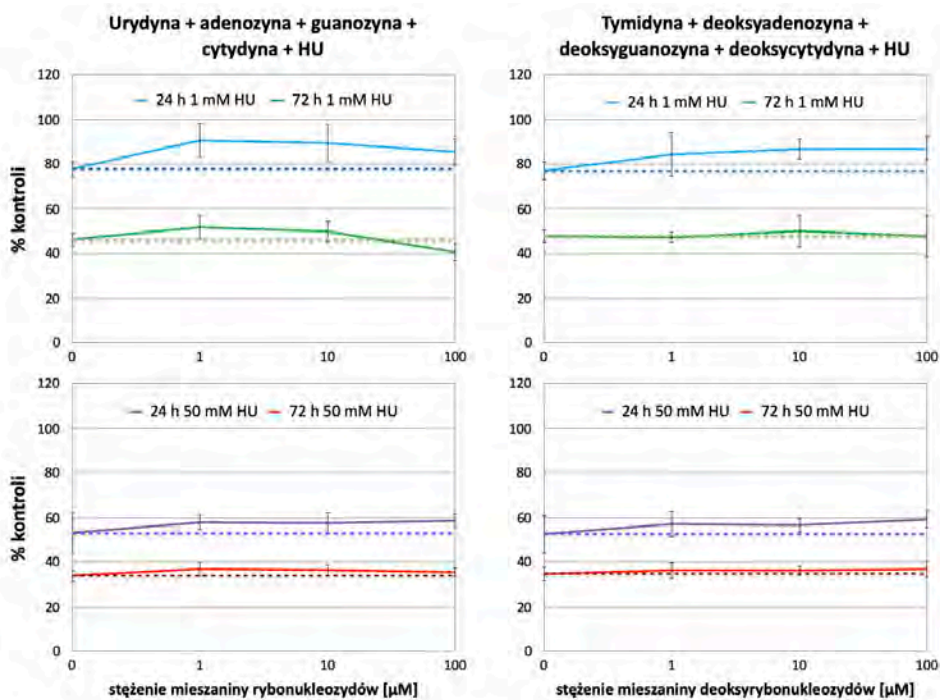
Rys. 28. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych guanozyną i deoksyguanozyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 9%.



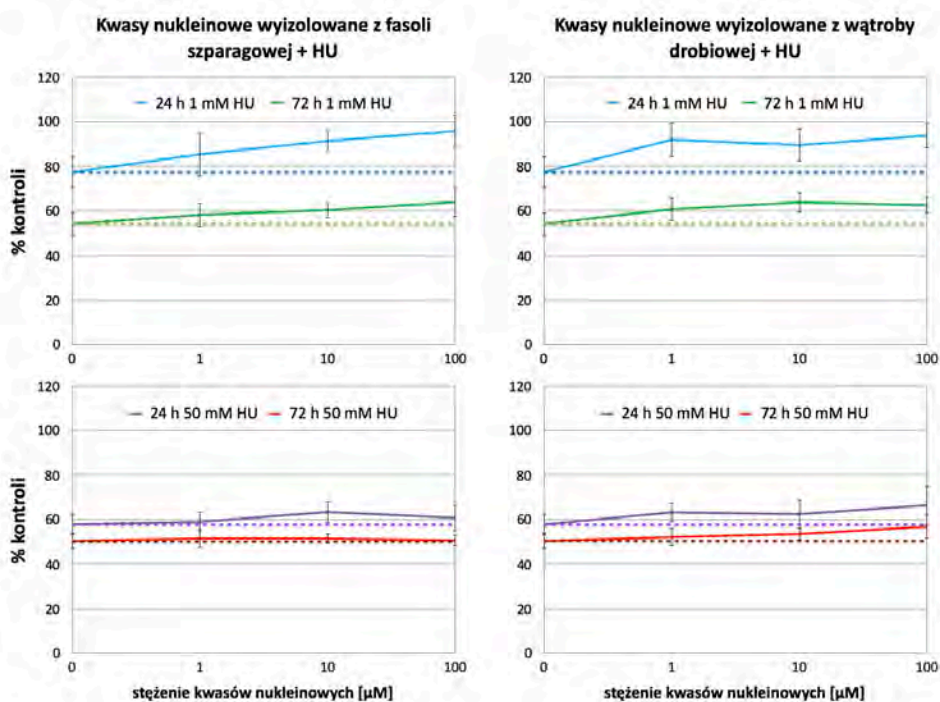
Rys. 29. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych cytydyną i deoksycytydyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 8%.



Rys. 30. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych urydyną i tymidyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.



Rys. 31. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych mieszaninami nukleozydów oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.



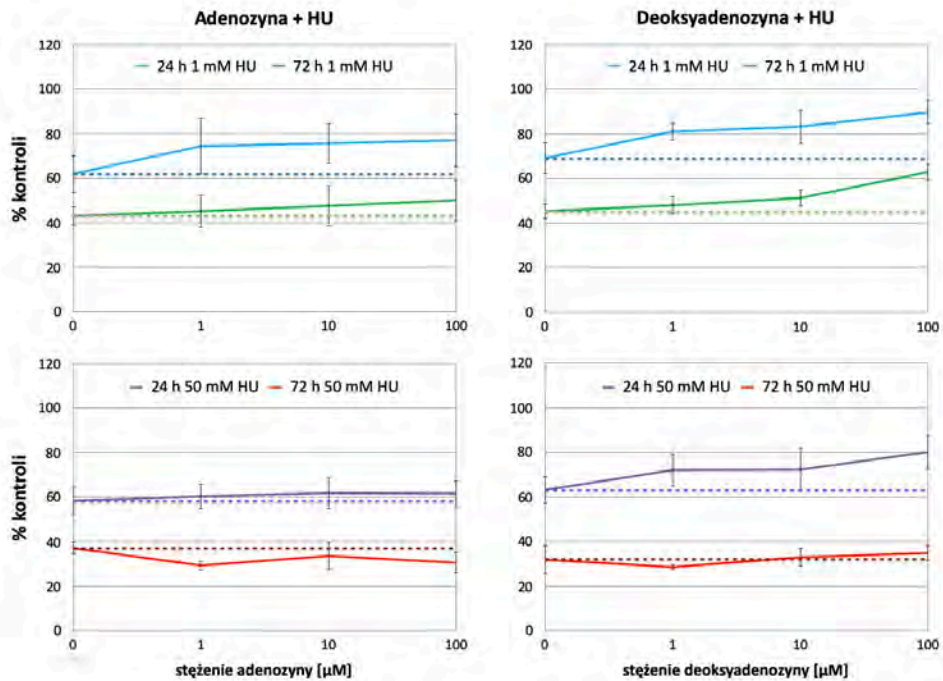
Rys. 32. Krzywe przeżycia dla komórek HT29 traktowanych kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z fasoli szparagowej i wątroby drobiowej oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.

Wyniki uzyskane dla linii HT29 wskazują, że przy niższym stężeniu HU (1 mM) i krótszym czasie inkubacji (24 h) dodatek nukleozydów pobudzał w niewielkim stopniu wzrost komórek w stosunku do komórek traktowanych jedynie HU. Dla A, dA (rys. 27), G, dG (rys. 28), U, T (rys. 30) oraz mieszaniny UAGC (rys. 31) jest to stymulacja rzędu 10-15%, natomiast dla C, dC (rys. 29) i mieszaniny TdAdGdC (rys. 31) maksymalnie 10%, przy czym nie można zaobserwować zależności stężeniowej. Forma dostarczanych nukleozydów nie miała zasadniczego wpływu na wzrost komórek; zarówno deoksyrybonukleozydy, jak i rybonukleozydy, wywołały porównywalny efekt. Dla czasu inkubacji 72 h i stężenia HU 50 mM przeżywalność komórek oscylowała wokół wartości obserwowanej w przypadku komórek traktowanych tylko HU i zawierała się w przedziale 30-60% przeżywalności komórek kontrolnych traktowanych wodą. HU jest również związkiem cytotoksycznym (Singh i Xu, 2016), co może oznaczać, że toksyczne działanie tak wysokiego stężenia HU było silniejsze niż możliwości regeneracyjne komórek jelita.

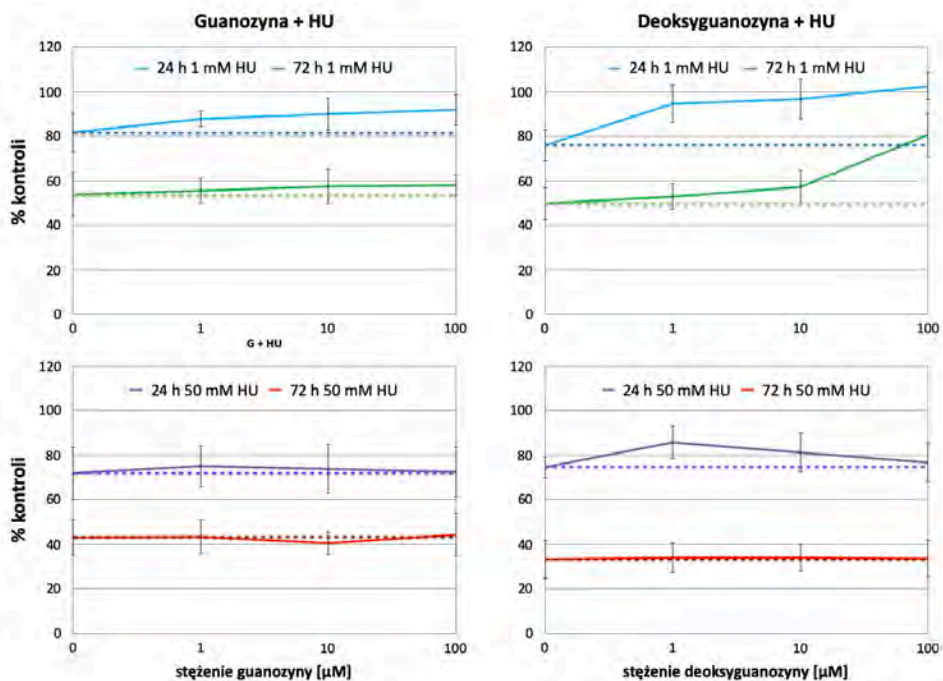
W przypadku komórek traktowanych HU oraz dodatkiem kwasów nukleinowych wyizolowanych z produktów żywnościowych wyniki nie odbiegają znacząco od tych omówionych dla nukleozydów. Dla izolatów z fasoli szparagowej najwyższe zastosowane stężenie spowodowało stymulację wzrostu komórek na poziomie 18,6%, natomiast dla izolatów z wątroby drobiowej była to stymulacja rzędu 16,5% dla komórek traktowanych 1 mM HU przez 24 h (rys. 32). Wartości te były nieznacznie wyższe niż uzyskane w tych samych warunkach traktowania HU dla dG (stymulacja na poziomie 15,4%) (rys. 28). Uzyskane wyniki sugerują, że komórki jelita w warunkach upośledzonej syntezy replikacyjnej DNA są w stanie w pewnym stopniu pobierać i metabolizować egzogenne nukleozydy i kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego. Co więcej, fragmenty kwasów nukleinowych wyizolowane z produktów żywnościowych wydają się być wykorzystywane bardziej efektywnie niż pojedyncze nukleozydy. Tkanka jelita w warunkach *in vivo* ma bezpośredni kontakt z oligonukleotydami pochodzącymi z trawienia kwasów nukleinowych, a omówione wyniki badań *in vitro* wydają się

potwierdzać, że komórki jelita są zdolne pobierać takie obecne w żywności cząsteczki.

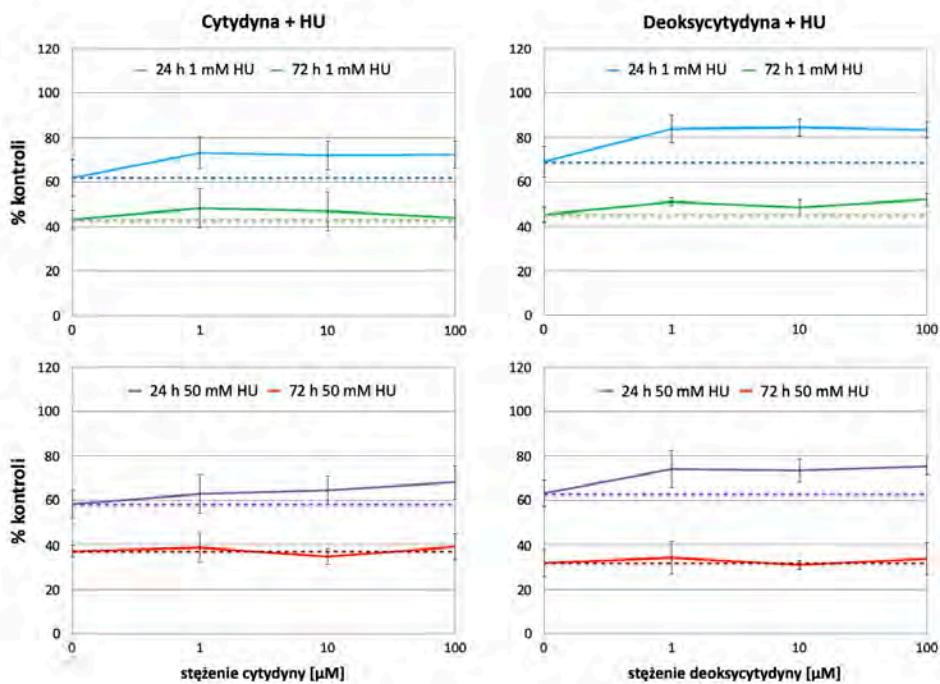
Podobne obserwacje poczyniono także w przypadku linii HepG2 stanowiącej model komórek wątroby. Wątroba jest narządem, do którego kwasy nukleinowe pochodzenia żywieniowego docierają przede wszystkim w formie nukleozydów, będących końcowymi produktami trawienia DNA i RNA w przewodzie pokarmowym. Jak wspomniano we Wstępie (rozdział 4. WYNIKI), to jelito jest główną tkanką, która ma bezpośredni kontakt z dłuższymi fragmentami kwasów nukleinowych, przy czym pojedyncze doniesienia wskazują, że egzogenne fragmenty o długości od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad wykrywane są także w wątrobie (Chowdhury i in., 2004; El-Sanhoty i in., 2006; Guertler i in., 2008; Ran i in., 2009). Można było więc spodziewać się, że to przede wszystkim dodatek nukleozydów będzie miał wpływ na wzrost komórek wątroby. Analogicznie do linii HT29, w celu upośledzenia replikacyjnej syntezy DNA komórki HepG2 najpierw traktowano HU, po czym natychmiast dodawano nukleozydy lub wyizolowane z produktów żywnościowych kwasy nukleinowe. Komórki następnie inkubowano przez 24 lub 72 h w obecności 1 mM lub 50 mM HU. Wyniki przedstawiono w postaci krzywych przeżycia na rys. 33-38.



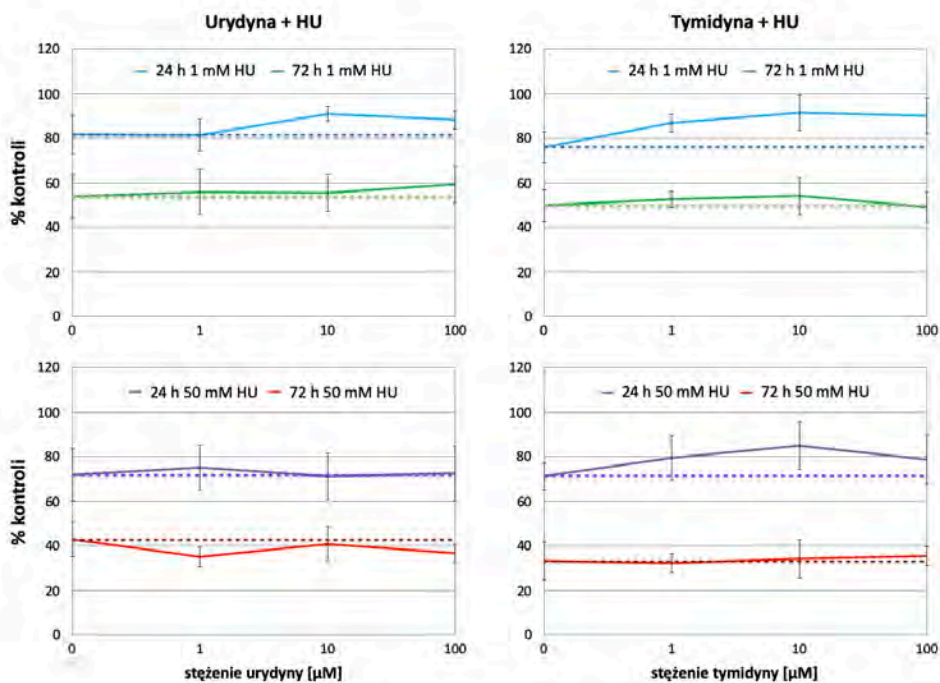
Rys. 33. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych adenozyzną i deoksyadenozyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 13%.



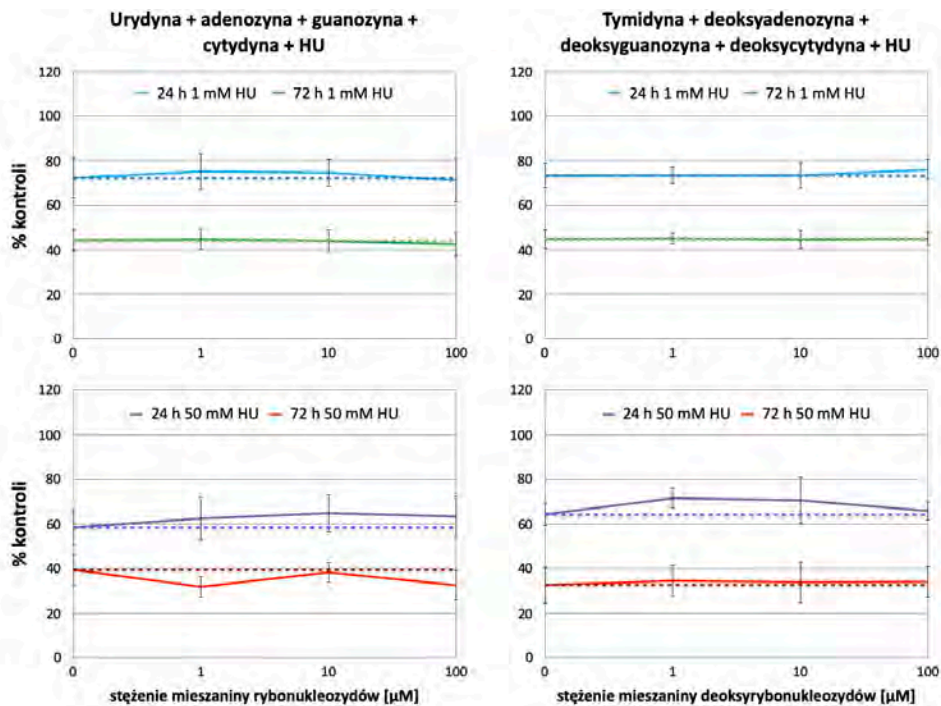
Rys. 34. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych guanozyzną i deoksyguanozyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 12%.



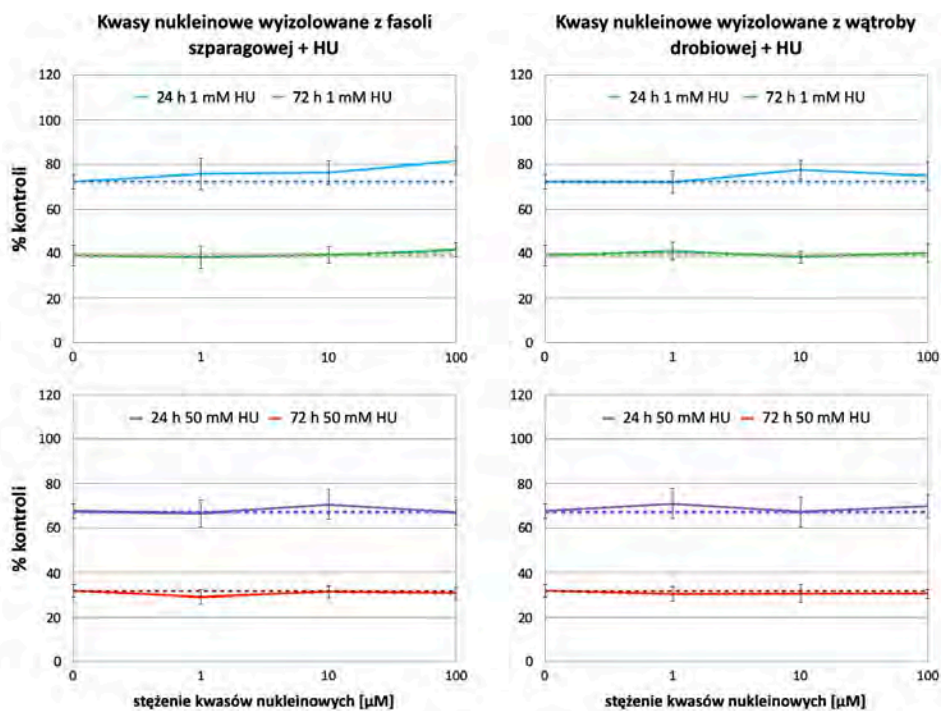
Rys. 35. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych cytydyną i deoksycytyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 10%.



Rys. 36. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych urydyną i tymidyną oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerwane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 13%.



Rys. 37. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych mieszaninami nukleozydów oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 11%.



Rys. 38. Krzywe przeżycia dla komórek HepG2 traktowanych kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z fasoli szparagowej i wątroby drobiowej oraz hydroksymocznikiem przez 24 i 72 h. Przerywane linie przedstawiają poziom przeżycia komórek traktowanych jedynie hydroksymocznikiem w stosunku do komórek traktowanych wodą. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Odchylenia standardowe nie przekraczają 8%.

Podobnie jak w ludzkim modelu jelita, traktowanie nukleozydami komórek linii HepG2 z zaburzoną działaniem HU syntezą replikacyjną DNA wpłynęło na pobudzenie ich wzrostu. Efekt ten był szczególnie widoczny w przypadku zastosowania 1 mM HU i 24-godzinnej inkubacji. Dla najwyższego stężenia dG był to wzrost na poziomie 26,5% (rys. 34), dla dA - 20,6% (rys. 33), natomiast dla dC (rys. 35.) i T (rys. 36) powyżej 14%. Ponadto zastosowanie 100 μ M stężenia dG w obecności 1 mM HU i 24 h inkubacji pozwoliło na osiągnięcie poziomu wzrostu odpowiadającego komórkom traktowanym jedynie wodą (rys. 34). Najwyższe stężenia dA oraz dG wykazały również działanie stymulujące przy 72 h inkubacji z 1 mM HU (ok. 18% wzrost dla dA (rys. 33) oraz 31% dla dG (rys. 34)). Zaobserwowany wzrost przeżywalności wywołany dodatkiem pojedynczych deoksyrybonukleozydów był większy niż ten uzyskany dla komórek linii HT29. Dla stężenia HU 50 mM i 24 h inkubacji dodatek deoksyrybonukleozydów działał stymulująco, natomiast przy inkubacji 72-godzinnej, tak jak w przypadku komórek jelita, nie zaobserwowano zmian w stosunku do komórek traktowanych jedynie HU. Może to oznaczać, że cytotoksyczne działanie tak wysokiego stężenia HU jest silniejsze, niż zdolności regeneracyjne komórek wątroby. Zastosowanie A (rys. 33), G (rys. 34), C (rys. 35) i U (rys. 36) przy stężeniu HU 1 mM i 24-godzinnej inkubacji spowodowało pobudzenie wzrostu komórek rzędu 9-15%. W przypadku zastosowania mieszanin nukleozydów wzrost komórek utrzymywał się na poziomie wzrostu komórek traktowanych HU, niezależnie od stężenia (rys. 37). W przeciwieństwie do komórek jelita, traktowanie kwasami nukleinowymi wyizolowanymi z produktów żywnościowych nie miało znaczącego wpływu na wzrost komórek HepG2 (rys. 38). Warto również zaznaczyć, że wrażliwość komórek HT29 oraz HepG2 na HU była zbliżona. Przy zastosowaniu stężenia 1 mM oraz czasu inkubacji 24 h przeżywalność względem komórek traktowanych wodą wynosiła ok. 75%, natomiast przy 72 h - ok. 46%. Zastosowanie 50 mM przez 72 h doprowadziło do spadku przeżywalności do poziomu ok. 36%. Różnice w odpowiedzi na HU widoczne są natomiast przy stężeniu 50 mM i czasie inkubacji 24 h, gdzie przeżywalność komórek HT29 wynosiła ok. 54%, natomiast HepG2 - 66%.

Uzyskane wyniki wskazują, że komórki wątroby w warunkach upośledzonej syntezy DNA są w stanie pobierać i metabolizować egzogenne nukleozydy w większym stopniu niż komórki jelita. Ponieważ, jak wcześniej wspomniano, dodatek HU wpływa na zahamowanie działania RNR, należałoby spodziewać się, że komórki będą zmuszone do wykorzystywania w większym stopniu egzogennych deoksyrybonukleozydów. W przypadku linii HepG2 można zaobserwować, że rzeczywiście dodatek deoksyrybonukleozydów silniej pobudzał wzrost hepatocytów niż obecność rybonukleozydów. Co więcej, wpływ pojedynczych nukleozydów na wzrost komórek był zdecydowanie silniejszy niż obserwowany w przypadku zastosowania mieszanin oraz izolatów kwasów nukleinowych. Potwierdza to, że pojedyncze nukleozydy, w przeciwieństwie do długołańcuchowych fragmentów kwasów nukleinowych, są formą preferencyjnie wykorzystywaną przez komórki wątroby. Ponieważ HU jest nie tylko inhibitorem RNR, ale także czynnikiem cytotoksycznym (Singh i Xu, 2016), jego obecność prawdopodobnie zmusza komórki wątroby do zwiększonej aktywności regeneracyjnej, a tym samym pobudza je do korzystania z egzogennych źródeł nukleozydów.

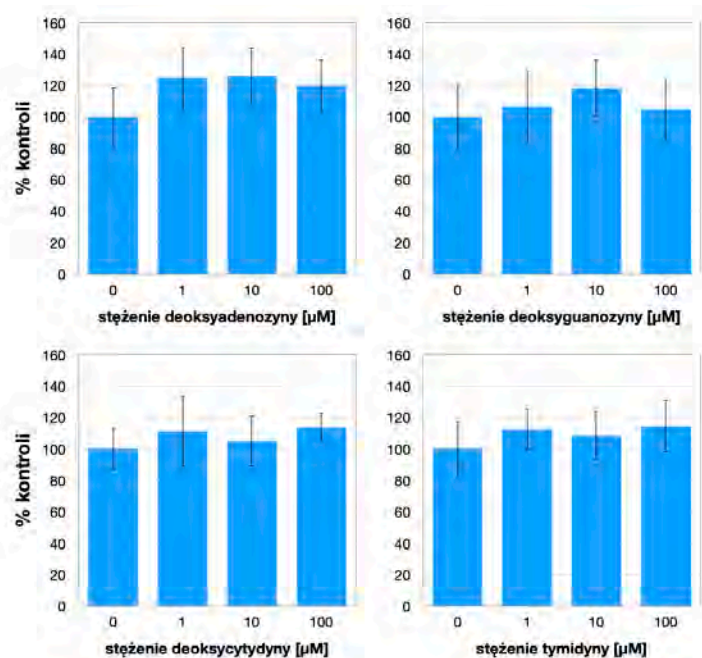
Wątroba może absorbować nukleozydy pochodzące z trawienia kwasów nukleinowych z wykorzystaniem dwóch rodzajów transporterów, tj. CNTs i ENTs, podczas gdy komórki jelita posiadają jedynie transportery CNTs w błonie mającej bezpośredni kontakt z trawionym pokarmem (Young i in., 2013). Być może dzięki temu hepatocyty są w stanie bardziej precyzyjnie regulować wychwytywanie cząsteczek. Ponieważ wspomniane transportery są zdolne do przenoszenia pojedynczych nukleozydów, brak wpływu mieszanin tych związków na wzrost komórek może wskazywać, że cząsteczki te oddziaływały ze sobą w sposób utrudniający ich absorpcję. Wątroba jest głównym narządem odpowiedzialnym za metabolizm komponentów kwasów nukleinowych w organizmie oraz dostarczanie prekursorów kwasów nukleinowych do organów z niedoborem szlaków biosyntezy *de novo*, co może uzasadniać jej lepsze zdolności do wychwytywania i wykorzystywania pojedynczych nukleozydów pochodzących z trawienia kwasów nukleinowych obecnych w żywności.

1 mM HU, co widoczne jest na omówionych wcześniej rysunkach przedstawiających krzywe przeżycia (rys. 27-32). W przypadku linii HepG2 można zaobserwować odwrotny efekt, tzn. głównie dodatek nukleozydów wpłynął na wzrost przeżywalności hepatocytów w obecności HU. Można powiedzieć, że uzyskane wyniki potwierdzają zdolność komórek jelita, naturalnie będących w bezpośrednim kontakcie z trawionym pokarmem, do wykorzystywania nawet dłuższych fragmentów egzogennych kwasów nukleinowych. Natomiast komórki wątroby, do których trafiają przede wszystkim strawione kwasy nukleinowe w formie nukleozydów, w warunkach upośledzonej syntezy replikacyjnej DNA mają zdolność efektywnego wykorzystywania właśnie tych cząsteczek. Uzyskane wyniki wykazały wpływ pokarmowych kwasów nukleinowych i ich prekursorów na wzrost komórek HT29 oraz HepG2, co potwierdziło wstępne założenia dotyczące zdolności wykorzystywania tych cząsteczek przez komórki układu pokarmowego w sytuacji zaburzonej syntezy replikacyjnej DNA.

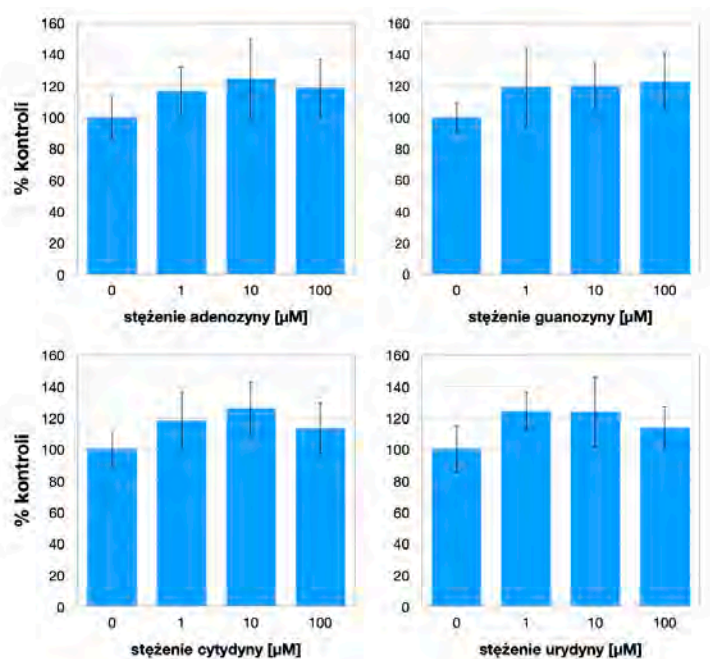
4.8. Ocena wpływu nukleozydów i ich mieszanin oraz wyizolowanych kwasów nukleinowych na zdolność naprawy DNA komórek HT29 z zaburzoną syntezą naprawczą DNA

Synteza DNA w komórce jest niezbędna nie tylko w czasie replikacji, ale także podczas naprawy uszkodzeń DNA. Jak udowodniono w omówionych wcześniej badaniach, komórki są w stanie korzystać z pochodzących z żywności kwasów nukleinowych i/lub ich pochodnych, można się więc spodziewać, że te egzogenne cząsteczki będą miały wpływ także na proces naprawy DNA. Aby sprawdzić zdolność komórek jelita do wykorzystywania egzogennych kwasów nukleinowych oraz nukleozydów do naprawy własnego DNA przeprowadzono test kometowy, podczas którego dodatkowo uszkodzono materiał genetyczny komórek poprzez narażenie ich na działanie czynnika genotoksycznego (H_2O_2). W teście kometowym miarą fragmentacji DNA jest stosunek intensywności fluorescencji ogona, w którym znajduje się pofragmentowany DNA, do głowy komety, zawierającej DNA niepofragmentowany. Oczekiwano więc, że obecność egzogennych kwasów nukleinowych i ich pochodnych wpłynie na zmniejszenie zawartości DNA w ogonach komet. Badania przeprowadzone z zastosowaniem testu

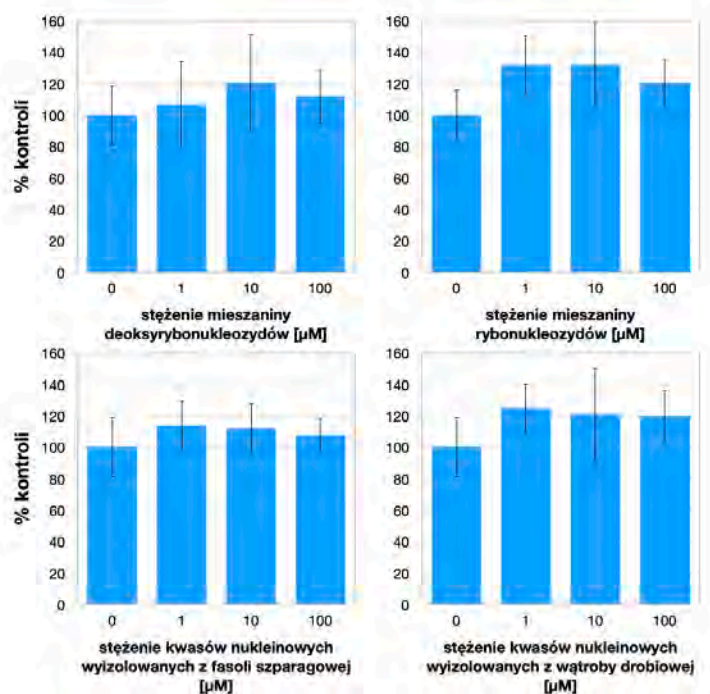
MTT wykazały, że wpływ kwasów nukleinowych na wzrost komórek był widoczny dopiero w warunkach zaburzenia ich metabolizmu działaniem HU. W związku z tym w teście kometowym postanowiono zaburzyć syntezę naprawczą DNA poprzez dodatek kofeiny, która jest inhibitorem tego procesu (Sabisz i Składanowski, 2008), aby zwiększyć czułość testu i sprawdzić, czy w takich warunkach komórki będą zdolne do wykorzystywania kwasów nukleinowych pochodzenia żywieniowego. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w postaci wykresów zależności stopnia fragmentacji DNA komórek traktowanych różnymi stężeniami badanych związków, kofeiną i nadtlenkiem wodoru w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych jedynie kofeiną oraz nadtlenkiem wodoru (rys. 40-42).



Rys. 40. Wyniki testu kometowego dla komórek linii HT29 wyrażone jako stopień fragmentacji DNA komórek traktowanych deoksyrybonukleozydami, kofeiną i nadtlenkiem wodoru w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych kofeiną oraz nadtlenkiem wodoru. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (one way ANOVA) z testem Dunnetta nie wykazała istotnych statystycznie różnic na poziomie $p < 0,05$.



Rys. 41. Wyniki testu kometowego dla komórek linii HT29 wyrażone jako stopień fragmentacji DNA komórek traktowanych rybonukleozydami, kofeiną i nadtlkiem wodoru w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych kofeiną oraz nadtlkiem wodoru. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (one way ANOVA) z testem Dunnetta nie wykazała istotnych statystycznie różnic na poziomie $p < 0,05$.



Rys. 42. Wyniki testu kometowego dla komórek linii HT29 wyrażone jako stopień fragmentacji DNA komórek traktowanych mieszaninami nukleozydów lub izolatami kwasów nukleinowych, kofeiną i nadtlkiem wodoru w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych kofeiną oraz nadtlkiem wodoru. Wyniki są średnią z 3 powtórzeń biologicznych. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (one way ANOVA) z testem Dunnetta nie wykazała istotnych statystycznie różnic na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki testu kometowego przeprowadzonego na komórkach linii HT29 traktowanych nadtleniem wodoru i kofeiną wskazują na brak statystycznie istotnego wpływu nukleozydów oraz wyizolowanych z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych na stopień fragmentacji DNA komórek. Z jednej strony uzyskane wyniki mogłyby wskazywać, że komórki jelita nie korzystały z dostarczanych im egzogennych kwasów nukleinowych albo stężenie H₂O₂ i/lub kofeiny było zbyt wysokie dla skutecznej naprawy wywołanych uszkodzeń. W przypadku wszystkich badanych związków można jednak zaobserwować powtarzający się trend przeciwny do postawionych założeń, tj. stopień fragmentacji DNA wydaje się być nieco wyższy niż w komórkach kontrolnych, niezależnie od stężenia oraz formy dostarczanych kwasów nukleinowych. Może to oznaczać, że obecność egzogennych nukleozydów oraz kwasów nukleinowych stymulowała komórki do rozpoczęcia naprawy uszkodzonego DNA. Taki wniosek wynika z mechanizmów procesów naprawy, podczas których początkowym etapem jest usunięcie uszkodzonych zasad azotowych lub nukleotydu poprzez rozcięcie łańcucha polinukleotydowego w miejscu uszkodzenia (Chatterjee i Walker, 2017). Powoduje to tymczasowe pęknięcie łańcucha fosforanowocukrowego, szczególnie w warunkach wysokiego pH na etapie rozwijania chromatyny w teście kometowym, co zwiększy zawartość DNA w ogonie. Obserwowany efekt mógłby być więc wynikiem inicjacji procesów naprawczych, które doprowadziły do powstania większej ilości fragmentów DNA w komórkach traktowanych H₂O₂. Jednym z powodów zatrzymania naprawy na etapie rozcięcia nici polinukleotydowej może być zbyt krótki czas inkubacji komórek z badanymi związkami. Wskazywałoby to na konieczność przeprowadzenia szeregu eksperymentów uwzględniających różne czasy inkubacji, co mogłoby pozwolić na określenie czasu niezbędnego do naprawy DNA przez komórki w przyjętych warunkach doświadczenia.

Innym wytłumaczeniem, którego rozważenie sugerują doniesienia literaturowe (Sabisz i Skladanowski, 2008), jest działanie kofeiny na procesy naprawcze. Wykazano, że związek ten może wpływać na naprawę DNA na różnych płaszczyznach, m.in. zaburzać proces rekombinacji homologicznej czy inaktywować kinazy ATM/ATR (*ataxia telangiectasia mutated/ ataxia telangiectasia and*

Rad3-related protein), które są odpowiedzialne za aktywację punktów kontrolnych w cyklu komórkowym wywołanych uszkodzeniami DNA. Kofeina jest także zdolna do bezpośredniej interkalacji w DNA, a jej powinowactwo jest większe do uszkodzonych regionów, co potencjalnie może prowadzić do zakłóceń w naprawie poprzez maskowanie uszkodzonych miejsc lub wadliwe rozpoznawanie uszkodzeń DNA przez białka zaangażowane w naprawę (Sabisz i Skladanowski, 2008; Chung 2021). Prawdopodobne jest więc, że wielokierunkowe działanie kofeiny mogło zaburzać wspomniany proces na różnych etapach, a tym samym jej obecność utrudniała prawidłowe zakończenie naprawy DNA w komórkach. Najnowsze badania przeprowadzone przez Diehla i wsp. dostarczają danych pozwalających na jeszcze inne wytłumaczenie zaobserwowanych zmian w stopniu fragmentacji komórkowego DNA. Autorzy wykazali, że inhibicja działania wspomnianej wcześniej kinazy ATR inhibitorem AZ20 wpływa na zwiększenie śmierci komórek po traktowaniu ich guaniną oraz zwiększa wrażliwość na obecność innych egzogennych prekursorów nukleotydów, tj. adeniny, deoksyadenozyny oraz tymidyny. Wskazuje to, że zaburzenie puli dostępnych pochodnych kwasów nukleinowych może powodować stres replikacyjny, a aktywność wspomnianej wcześniej kinazy ATR jest niezbędna do przetrwania braku równowagi nukleotydowej (Diehl i in., 2022). W świetle przytoczonych badań uzyskane przeze mnie wyniki mogą wskazywać, że obecność kofeiny, również będącej inhibitorem kinazy ATR, mogła wpłynąć na zaobserwowany efekt zwiększenia stopnia fragmentacji DNA w komórkach traktowanych kwasami nukleinowymi oraz ich prekursorami. Przeprowadzony test kometowy nie pozwolił na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków dotyczących zdolności komórek modelowych jelita do wykorzystywania pokarmowych kwasów nukleinowych i ich pochodnych w syntezie naprawczej DNA, przynajmniej w systemie zawierającym kofeinę. W świetle wspomnianych, ostatnio opublikowanych obserwacji, zasadne wydaje się przeprowadzenie dodatkowych badań, tj. testu kometowego bez kofeiny oraz uwzględniającego różne czasy inkubacji komórek z kwasami nukleinowymi i ich prekursorami, oraz zastosowanie innych technik pozwalających na dokładniejsze śledzenie procesu naprawy. Jednym z takich testów jest UDS (*unscheduled DNA*

synthesis), który umożliwia badanie naprawy DNA według mechanizmu wycinania nukleotydów (NER - *nucleotide excision repair*) i ilościową ocenę wbudowywania znakowanych nukleozydów (Kelly i Latmier, 2005). Wyniki uzyskane w teście kometowym przeprowadzonym z dodatkiem kofeiny wydają się natomiast potwierdzać, że dodatek egzogennych kwasów nukleinowych i ich prekursorów w sytuacji zaburzenia mechanizmów naprawy DNA wpływa na zwiększenie stopnia fragmentacji materiału genetycznego komórek.

5. PODSUMOWANIE

Kwasy nukleinowe należą do podstawowych składników każdej komórki. Składające się z nukleotydów DNA i RNA, najlepiej znane ze swojego udziału w procesie kodowania i syntezy białek, są także zaangażowane w regulację wielu procesów metabolicznych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Badania naukowe dotyczące kwasów nukleinowych skupiają się przede wszystkim na ich roli genetycznej. Jednakże cząsteczki te, tak samo jak lipidy, białka czy sacharydy, są nieodłącznymi składnikami żywności. Pomimo tego badania nad ich rolą odżywczą są ograniczone. Doniesienia literaturowe skupiają się przede wszystkim na możliwości uzupełniania diety kwasami nukleinowymi zwierząt hodowlanych w celu poprawy ich dobrostanu, wzbogacaniu nukleotydami mieszanek dla niemowląt, a w ostatnich latach także na możliwości suplementacji sportowców wspomnianymi cząsteczkami. Coraz większym zainteresowaniem cieszą się także niekodujące, regulatorowe cząsteczki miRNA, które występują w szczególnie dużej ilości i zróżnicowaniu w mleku kobiecym. Chociaż kwasy nukleinowe są obecne we wszystkich produktach żywnościowych, zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych, w tym także przetworzonych i poddanych obróbce kulinarnej, ich zawartość nie jest uwzględniana w tabelach wartości odżywczych ani w zaleceniach żywieniowych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu pokarmowych kwasów nukleinowych oraz ich pochodnych na wzrost i zdolność naprawy uszkodzeń DNA komórek ludzkiego układu pokarmowego dla wybranych produktów żywnościowych reprezentujących odmienne królestwa i różniących się zawartością oraz jakością obecnych w nich kwasów nukleinowych.

Część eksperymentalna została podzielona na dwa bloki badawcze. W części analitycznej wykorzystano produkty pochodzenia zwierzęcego, tj. udo, pierś i wątrobę drobiową, produkty pochodzenia roślinnego, tj. fasolę szparagową, seler naciowy, kalarepę i ziemniaka, oraz przedstawiciela grzybów, tj. pieczarkę. Za pomocą techniki bloczków parafinowych przygotowano preparaty mikroskopowe badanych produktów, które po wybarwieniu pozwoliły na wizualizację jąder komórkowych w produktach zwierzęcych i nasionach fasoli

szparagowej, a w przypadku zastosowania fluorochromu SYBR Green także w pieczarce. Uzyskane wyniki ujawniły różnice w rozmieszczeniu, wielkości oraz ilości jąder komórkowych w badanych produktach. Dodatkowo, zastosowanie alternatywnej metody z wykorzystaniem kriostatu pozwoliło na skrócenie procedury otrzymywania skrawków tkanek niezbędnych do przygotowania preparatów mikroskopowych oraz umożliwiło pominięcie etapu utrwalania próbek. Test kometowy pozwolił na ocenę stopnia fragmentacji DNA znajdującego się w jądrach komórkowych badanych produktów żywnościowych. Produkty roślinne charakteryzowały się mniej pofragmentowanym DNA niż produkty zwierzęce. Największe różnice były widoczne pomiędzy wysokocząsteczkowym materiałem genetycznym fasoli szparagowej a pofragmentowanym do rozmiaru nukleosomalnego DNA wątroby drobiowej. Przeprowadzona w kolejnym kroku izolacja kwasów nukleinowych komercyjnymi zestawami charakteryzowała się niższą wydajnością niż ekstrakcja z zastosowaniem rozpuszczalników organicznych. Profile fragmentacji kwasów nukleinowych otrzymane z zastosowaniem elektroforezy agarozowej ujawniły obecność głównie długich fragmentów powyżej 10 000 pz w nasionach fasoli, natomiast wątroba drobiowa charakteryzowała się zawartością większej ilości krótkich fragmentów polinukleotydowych o długości ok. 200 pz. Wykazano także, że wpływ na fragmentację kwasów nukleinowych miała zastosowana metoda izolacji. Pomiar stężenia kwasów nukleinowych w uzyskanych izolatach wskazał na wyższą zawartość omawianych cząsteczek w wątrobie w porównaniu do nasion fasoli szparagowej. Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano jeden produkt żywnościowych pochodzący z królestwa roślin, tj. fasolę szparagową, która różniła się istotnie zawartością oraz jakością kwasów nukleinowych w stosunku do drugiego wybranego produktu, tj. wątroby drobiowej, reprezentującej produkty pochodzenia zwierzęcego.

W części biologicznej jako materiał badawczy wykorzystano oprócz wyizolowanych z produktów żywnościowych kwasów nukleinowych także pojedyncze nukleozydy, jako cząsteczki reprezentujące końcowe produkty trawienia kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym. Testy *in vitro* przeprowadzono na komórkach linii ludzkiego układu pokarmowego, tj. HT29 (komórki gruczołaka

jelita grubego), CCD 841 CoN (prawidłowe komórki jelita grubego) oraz HepG2 (komórki raka wątrobowokomórkowego). Wyniki uzyskane w teście MTT wykazały, że w warunkach niezaburzonego procesu syntezy DNA ani dodatek kwasów nukleinowych, ani pojedynczych nukleozydów, nie wpłynął na wzrost komórek. Nie oznacza to jednak, że badane składniki produktów żywnościowych nie były wykorzystywane przez komórki układu pokarmowego. Jak podaje literatura, brak egzogennych puryn i pirymidyn pochodzenia żywieniowego aktywuje syntezę *de novo* kwasów nukleinowych w jelicie, natomiast obecność pochodzących z żywności puryn zwiększa jednocześnie odzysk, jak i katabolizm tych związków w wątrobie (Grimble, 1994). Może to wskazywać, że komórki badanych linii wykorzystywały dostarczane im kwasy nukleinowe na drodze odzysku, blokując jednocześnie biosyntezę *de novo*, czego jednak nie było można prześledzić za pomocą zastosowanej metody. Aby sprawdzić wpływ badanych związków na wzrost komórek w warunkach zaburzonej syntezy replikacyjnej DNA przeprowadzono test MTT z dodatkiem hydroksymocznika, który jest inhibitorem reduktazy rybonukleotydowej. Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność komórek do wykorzystywania egzogennych kwasów nukleinowych, co było widoczne w postaci pobudzenia wzrostu w stosunku do komórek kontrolnych traktowanych jedynie hydroksymocznikiem. Zaobserwowano, że komórki linii HT29 wykorzystują preferencyjnie obecność długołańcuchowych kwasów nukleinowych, niezależnie, czy były to dłuższe cząsteczki wyizolowane z fasoli szparagowej, czy krótkie fragmenty pochodzące z wątroby drobiowej. Wzrost komórek HepG2 był natomiast silniej stymulowany przez pojedyncze nukleozydy. Uzasadnić można to faktem, że w warunkach *in vivo* tkanka jelita ma kontakt zarówno z krótszymi, jak i długimi łańcuchami polinukleotydowymi pochodzącymi z trawienia kwasów nukleinowych w przewodzie pokarmowym, podczas gdy do wątroby opisywane cząsteczki trafiają przede wszystkim w formie pojedynczych nukleozydów.

Ostatnim etapem badań było sprawdzenie zdolności komórek HT29 do wykorzystywania egzogennych kwasów nukleinowych w syntezie naprawczej DNA. Komórki poddano działaniu czynnika genotoksycznego, tj. nadtlenu wodoru, a dodatkowo zastosowano kofeinę będącą inhibitorem procesu naprawy

DNA. Naprawę uszkodzeń komórkowego DNA śledzono przy pomocy testu kometowego. Uzyskane wyniki pokazały, że obecność badanych związków nie wpłynęła na zmniejszenie fragmentacji DNA komórek HT29 wywołanej H_2O_2 w obecności kofeiny. Co więcej, zaobserwowano powtarzający się trend sugerujący, że stopień fragmentacji DNA był nieco wyższy niż w komórkach kontrolnych. W świetle ostatnich badań (Diehl i in., 2022) zaobserwowany efekt można wytłumaczyć prawdopodobnym powstaniem stresu replikacyjnego w wyniku zaburzenia puli dostępnych prekursorów kwasów nukleinowych. Aktywność kinazy ATR w komórkach jest niezbędna do przetrwania stresu replikacyjnego, natomiast w warunkach eksperymentu działanie wspomnianej kinazy zaburzono dodatkiem kofeiny. Mogło to dodatkowo zahamować syntezę DNA i przyczynić się do obserwowanego wzrostu stopnia fragmentacji DNA w stosunku do komórek kontrolnych. Uzyskane wyniki wskazują, że w celu określenia zdolności wykorzystania pokarmowych kwasów nukleinowych w syntezie naprawczej DNA przez komórki układu pokarmowego należałoby dobrać inne warunki eksperymentu lub zastosować odmienne techniki badawcze.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej potwierdziły obecność kwasów nukleinowych (w postaci jąder komórkowych) w produktach żywnościowych różnego pochodzenia oraz wykazały, że produkty te różnią się zawartością oraz stopniem fragmentacji znajdujących się w nich kwasów nukleinowych. Omówione wyniki dowiodły również, że komórki zastosowane jako modele ludzkiego układu pokarmowego były zdolne do wykorzystywania pokarmowych kwasów nukleinowych oraz ich prekursorów w sytuacji zaburzonej syntezy replikacyjnej DNA. Uzyskane wyniki dowodzą powszechności kwasów nukleinowych w produktach żywnościowych i wskazują, że cząsteczki te nie są obojętne dla ludzkiego układu pokarmowego. Potwierdza to konieczność dalszych badań nad tymi makromolekułami i wskazuje na potrzebę weryfikacji dotychczasowego sposobu postrzegania kwasów nukleinowych, które są nie tylko nośnikami informacji genetycznej, ale także potencjalnie odżywczymi składnikami żywności.

WYKAZ LITERATURY

- Aarthy R., Mani S., Velusami S., Sundarsingh S., Rajkumar T. (2015). Role of Circulating Cell-Free DNA in Cancers. *Mol Diagn Ther*, 19, 339–350.
- Alamnie G., Andualem B. (2020). Biosafety Issues of Unintended Horizontal Transfer of Recombinant DNA. W: Genetic Transformation in Crops. (Praca zbiorowa pod redakcją Kin-Ying To). IntechOpen.
- Alsaweed M., Hartmann P. E., Geddes D. T., Kakulas F. (2015). MicroRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. *Int J Environ Res Public Health*, 12, 13981–14020.
- Alsaweed M., Lai C. T., Hartmann P. E., Geddes D. T., Kakulas F. (2016). Human milk cells contain numerous miRNAs that may change with milk removal and regulate multiple physiological processes. *Int J Mol Sci*, 17, 956.
- An R., Jia Y., Wan B., Zhang Y., Dong P., Li J., Liang X. (2014). Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms. *PloS one*, 9, e115950.
- Arslan A., Ilhak O. I., Calicioglu M. (2006). Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique. *Meat Sci*, 72, 326-330.
- Axelsson I., Flodmark C. E., Rähä N., Tacconi M., Visentin M., Minoli I., Moro G., Warm A. (1997). The influence of dietary nucleotides on erythrocyte membrane fatty acids and plasma lipids in preterm infants. *Acta Paediatr*, 86, 539–544.
- Baier S. R., Nguyen C., Xie F., Wood J. R., Zemleni J. (2014). MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. *J Nutr*, 144, 1495-1500.
- Baldwin S. A., Yao S. Y., Hyde R. J., Ng A. M., Foppolo S., Barnes K., Ritzel M. W., Cass C. E., Young J. D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem*, 280, 15880–15887.
- Bauer T., Weller P., Hammes W. P., Hertel C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *Eur Food Res Technol*, 217, 338–343.
- Baranowska M., Suliborska K., Chrzanowski W., Kusznierewicz B., Namieśnik J., Bartoszek A. (2018). The relationship between standard reduction potentials of catechins and biological activities involved in redox control. *Redox Biol*, 17, 355-366.
- Bardoń A., Shugar D. (1980). Properties of purified salivary ribonuclease, and salivary ribonuclease levels in children with cystic fibrosis and in heterozygous carriers. *Clin Chim Acta*, 101, 17–24.
- Bergerová E., Godálová Z., Siekel P. (2011). Combined effects of temperature, pressure and low pH on the amplification of DNA of plant derived foods. *Czech J Food Sci*, 29, 337-345.
- Bettio L. E. B., Gil-Mohapel J., Rodrigues A. L. S. (2016). Guanosine and its role in neuropathologies. *Purinergic Signal*, 12, 411–426.
- Bhat H., Ahmad I., Asmi O., Shah F., Bhat B., Hussain T., Hafeez M., Rashid S., Razak N., Hussain R. A. (2020). RNA: DNA ratio as an indicator of growth, nutritional status and condition of fish: A review. *J Entomol Zool Stud*, 8, 654-658.
- Blakley R. (1998). Nucleotides. W: Biochemistry. (Praca zbiorowa pod redakcją G. L. Zubay). Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 629-665.

Bronkhorst A. J., Ungerer V., Diehl F., Anker P., Dor Y., Fleischhacker M., Gahan P. B., Hui L., Holdenrieder S., Thierry A. R. (2021). Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. *Hum genet*, 140, 565–578.

Brooker R. J. (2005). *Molecular Structure of DNA and RNA*. W: *Genetics: Analysis and Principles*. McGraw-Hill, Nowy Jork, 227-252.

Brunser O., Espinoza J., Araya M., Cruchet S., Gil A. (1994). Effect of dietary nucleotide supplementation on diarrhoeal disease in infants. *Acta Paediatr*, 83, 188–191.

Buck R. H., Thomas D. L., Winship T. R., Cordle C. T., Kuchan M. J., Baggs G. E., Schaller J. P., Wheeler J. G. (2004). Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 2: Immune cell development. *Pediatr Res*, 56, 891–900.

Cai X., Bao L., Wang N., Ren J., Chen Q., Xu M., Li D., Mao R., Li Y. (2016). Dietary nucleotides protect against alcoholic liver injury by attenuating inflammation and regulating gut microbiota in rats. *Food Funct*, 7, 2898-2908.

Cai Y., Feng L., Wang X. (2018). Targeting the tumor promoting effects of adenosine in chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 126, 24-31.

Cai Y., Yu X., Hu S., Yu J. (2009). A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genom Proteom Bioinform*, 7, 147–154.

Carver J. D., Cox W. I., Barness L. A. (1990). Dietary nucleotide effects upon murine natural killer cell activity and macrophage activation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 14, 18-22.

Carver J. D., Walker A. W. (1995). The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem*, 2, 58-72.

Chatterjee N., Walker G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, 58, 235–263.

Che L., Hu L., Liu Y., Yan C., Peng X., Xu Q., Wang R., Cheng Y., Chen H., Fang Z., Lin Y., Xu S., Feng B., Chen D., Wu D. (2016). Dietary Nucleotides Supplementation Improves the Intestinal Development and Immune Function of Neonates with Intra-Uterine Growth Restriction in a Pig Model. *PLoS one*, 11, e0157314.

Chen Q., Zhang F., Dong L., Wu H., Xu J., Li H., Wang J., Zhou Z., Liu C., Wang Y., Liu Y., Lu L., Wang C., Liu M., Chen X., Wang C., Zhang C., Li D., Zen K., Wang F., Zhang Q., Zhang C.-Y. (2021). SIDT1-dependent absorption in the stomach mediates host uptake of dietary and orally administered microRNAs. *Cell Res*, 31, 247–258.

Chen X., Ba Y., Ma L., Cai X., Yin Y., Wang K., Guo J., Zhang Y., Chen J., Guo X., Li Q., Li X., Wang W., Zhang Y., Wang J., Jiang X., Xiang Y., Xu C., Zheng P., Zhang J., Li R., Zhang H., Shang X., Gong T., Ning G., Wang J., Zen K., Zhang J., Zhang C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18, 997–1006.

Chiofalo B., Lo Presti V., Savoini G., D'Alessandro E., Chiofalo V., Liotta L. (2011). Nucleotides in Broiler Chicken Diet: Effect on Breast Muscles Quality. *Czech J Food Sci*, 29, 308-317.

Choi C. H. J., Hao L., Narayan S. P., Auyeung E., Mirkin A. (2013). Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 7625-7630.

Chowdhury E. H., Mikami O., Murata H., Sultana P., Shimada N., Yoshioka M., Guruge K. S., Yamamoto S., Miyazaki S., Yamanaka N., Nakajima Y. (2004). Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. *J Food Prot*, 67, 365–370.

Chung W. H. (2021). Pleiotropic Effects of Caffeine Leading to Chromosome Instability and Cytotoxicity in Eukaryotic Microorganisms. *J Microbiol Biotechnol*, 31, 171–180.

Clifford A. J., Story D. L. (1976). Levels of Purines in Foods and Their Metabolic Effects in Rats. *J Nutr*, 106, 435–442.

Cieśliewicz J., Koziara Z., Ćwiklińska W., Bartoszek A. (2021). The Toolbox of Methods for Multidirectional Characterization of Dietary Nucleic Acids; Verification for Raw and Processed Food Products. *Food Anal Methods*, 14, 1482–1497.

Collins A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol*, 26, 249261.

Cosgrove M., Davies D. P., Jenkins H. R. (1996). Nucleotide supplementation and the growth of term small for gestational age infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 74, F122–F125.

Cotta M. A. (1990). Utilization of nucleic acids by *Selenomonas ruminantium* and other ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 56, 3867–3870.

Crane J. K., Shulgina I., Naeher T. M. (2007). Ecto-5'-nucleotidase and intestinal ion secretion by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Purinergic Signal*, 3, 233–246.

Cui D., Daley W. P., Fratkin J. D., Haines D. E., Lynch J. C., Naftel J. P., Yang G. (2011a). Muscle. W: Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. (Praca zbiorowa pod redakcją D. Cui). Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 98-114.

Cui D., Daley W. P., Fratkin J. D., Haines D. E., Lynch J. C., Naftel J. P., Yang G. (2011b). Digestive Glands and Associated Organs. W: Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. (Praca zbiorowa pod redakcją D. Cui). Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, 304-322.

Cutler J. I., Auyeung E., Mirkin C. A. (2012). Sphercial Nucleic Acids. *J Am Chem Soc*, 134, 1376-1391.

Cutter A. R., Hayes J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, 589, 2914-2922.

Daneshmand A., Kermanshahi H., Mesgaran M. D., King A. J., Ibrahim S. A., Klasing K. C. (2017). Combination of purine and pyrimidine nucleosides influences growth performance, gut morphology, digestive enzymes, serum biochemical indices and immune functions in broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol*, 228, 186–193.

de Freitas M. C., Ricci-Vitor A. L., Freire R. V., Caperuto E. C., Vanderlei L. C. M., Lira F. S., Rossi F. E. (2018). Oral adenosine 5'-triphosphate supplementation improved hemodynamic and autonomic parameters after exercise in hypertensive women. *J Exerc Rehabil*, 14, 671–679.

DeLucchi C., Pita M. L., Faus M. J., Molina J. A., Uauy R., Gil A. (1987). Effects of dietary nucleotides on the fatty acid composition of erythrocyte membrane lipids in term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 6, 568–574.

Diehl F. F., Miettinen T. P., Elbashir R., Nabel C. S., Darnell A. M., Do B. T., Manalis S. R., Lewis C. A., Vander Heiden M. G. (2022). Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation. *Nat Cell Biol* 24, 1252–1264.

Ding T., Song G., Liu X., Xu M., Li Y. (2021). Nucleotides as optimal candidates for essential nutrients in living organisms: A review. *J Funt Foods*, 82, 104498.

Dominguez-Alvarez J., Mateos-Vivas M., Rodríguez-Gonzalo E., García-Gómez D., Bustamante-Rangel M., Zamarréño M.-M. D., Carabias-Martínez R. (2017). Determination of nucleosides and nucleotides in food samples by using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Trends Analyt Chem*, 92, 12-31.

Dos Santos Nunes de Moura H. P., Jäger R., Purpura M., Rathmacher J. A., Fuller J. C. Jr, Rossi F. E. (2021). Dose Response of Acute ATP Supplementation on Strength Training Performance. *Front Sports Act Livin*, 3, 780459.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). (2014). Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA Journal*, 12, 106.

El-Sanhoty R. M. El S. S., El-Maged A. D. A., Ramadan M. F. (2006). Safety assessment of genetically modified potato spunta: Degradation of DNA in gastrointestinal tract and carryover to rat organs. *J Food Biochem*, 30, 556–578.

Feng B., Sosa R. P., Mårtensson A. K. F., Jiang K., Tong A., Dorfman K. D., Takahashi M., Lincoln P., Bustamante C. J., Westerlund F., Nordén B. (2019). Hydrophobic catalysis and a potential biological role of DNA unstacking induced by environment effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116, 17169–17174.

Finkel S. E., Kolter R. (2001). DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs. *J Bacteriol*, 183, 6288–6293.

Fleck A., Munro H. N. (1962). The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochim Biophys Acta*, 55, 571–583.

Florensa R., Bachs O., Agell N. (2003). ATM/ATR-independent inhibition of cyclin B accumulation in response to hydroxyurea in nontransformed cell lines is altered in tumour cell lines. *Oncogene*, 22, 8283–8292.

Fujikawa K., Kamiya H., Yakushiji H., Nakabeppu Y., Kasai H. (2001) Human MTH1 protein hydrolyzes the oxidized ribonucleotide, 2-hydroxy-ATP. *Nucleic Acids Res*, 29, 449–454.

Gad H., Koolmeister T., Jemth A. S., Eshtad S., Jacques S.A., Ström C. E., Svensson L. M., Schultz N., Lundbäck T., Einarsdottir B.O., Saleh A., Göktürk C., Baranczewski P., Svensson R., Berntsson R.P., Gustafsson R., Strömberg K., Sanjiv K., Jacques-Cordonnier M. C., Desroses M., Gustavsson A. L., Olofsson R., Johansson F., Homan E. J., Loseva O., Bräutigam L., Johansson L., Höglund A., Hagenkort A., Pham T., Altun M., Gaugaz F. Z., Vikingsson S., Evers B., Henriksson M., Vallin K. S., Wallner O. A., Hammarström L. G., Wiita E., Almlöf I., Kalderén C., Axelsson H., Djureinovic T., Puigvert J. C., Häggblad M., Jeppsson F., Martens U., Lundin C., Lundgren B., Granelli I., Jensen A. J., Artursson P., Nilsson J. A., Stenmark P., Scobie M., Berglund U. W., Helleday T. (2014). MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature*, 508, 215–221.

Giannecchini M., Matteucci M., Pesi R., Sgarrella F., Tozzi M. G., Camici M. (2005). Uptake and utilization of nucleosides for energy repletion. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 797–808.

Gibson R. A., Hawkes J. S., Makrides M. (2005). Dietary nucleotides do not alter erythrocyte long-chain polyunsaturated fatty acids in formula-fed term infants. *Lipids*, 40, 631–634.

Gillman R., Floro K. L., Wankell M., Hebbard L. (2021). The role of DNA damage and repair in liver cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*, 1875, 188493.

Głowacki R. W. P., Pudlo N. A., Tuncil Y, Luis A. S., Sajjakulnukit P., Terekhov A. I., Lyssiotis C. A., Hamaker B. R., Martens E. C. (2020). A Ribose-Scavenging System Confers Colonization Fitness on the Human Gut Symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron* in a Diet-Specific Manner. *Cell Host Microbe*, 27, 79–92.e9.

Głazowska J., Stankiewicz U., Bartoszek A. (2017). Absorpcja, metabolizm i rola biologiczna kwasów nukleinowych obecnych w żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 24, 18–32.

Griffiths M., Sundaram H. (2011). Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay. *Methods Mol Biol*, 731, 451–465.

Grimble G. K. (1994). Dietary nucleotides and gut mucosal defence. *Gut*, 35(1 Suppl), S46–S51.

- Grimble G. K. (1996). Why are dietary nucleotides essential nutrients? *Br J Nutr*, 76, 475–478.
- Gryson N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Anal Bioanal Chem*, 396, 2003–2022.
- Guertler P., Lutz B., Kuehn R., Meyer H. H. D., Einspanier R., Killermann B., Albrecht C. (2008). Fate of recombinant DNA and Cry1Ab protein after ingestion and dispersal of genetically modified maize in comparison to rapeseed by fallow deer (*Dama dama*). *Eur J Wildl Res*, 54, 36–43.
- Gutiérrez-Castrellón P., Mora-Magaña I., Díaz-García L., Jiménez-Gutiérrez C., Ramírez-Mayans J., Solomon-Santibáñez G. A. (2007). Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*, 98 Suppl 1, S64–S67.
- Han D. S. C., Lo Y. M. D. (2021). The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet*, 37, 758–770.
- Hasan H. R., Al-Issa Y. A. H. (2011). A Study of Rnase Enzymes in Saliva Samples from Women with Breast Tumors. *Med J Islamic World Acad Sci*, 19, 21-26.
- Hawkes J. S., Gibson R. A., Roberton D., Makrides M. (2006). Effect of dietary nucleotide supplementation on growth and immune function in term infants: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 60, 254–264.
- Hawley D. M., Crisp M., Hodes M. E. (1983). Tissue specificity of human phosphodiesterase. II. Intestinal mucosa. *Clin Chim Acta*, 130, 39–45.
- Herbel W., Montag A. (1987). Nucleostoffe in proteinreichen Lebensmitteln. *Lebensm Unter Forsch*, 185, 119–122.
- Holst S. C., Landolt H.-P. (2018). Sleep-wake neurochemistry. *Sleep Med Clin*, 13, 137–146.
- Hombach S., Kretz. M. (2016). Non-coding RNAs: classification, biology and functioning, *Adv Exp Med Biol*, 937, 3-17.
- Hong E., Lee S. Y., Jeong J. Y., Park J. M., Kim B. H., Kwon K., Chun H. S. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *J Sci Food Agric*, 97, 3877-3896.
- Hossain Md. S., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., Sony N. M. (2017). Dietary cytidine monophosphate enhances the growth, blood characteristics, innate and adaptive immune functions and stress resistance of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 473, 366-374.
- Hu V. W., Black G. E., Torres-Duarte A., Abramson F. P. (2002). 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *FASEB J*, 16, 1456–1457.
- Huang H., Pham Q., Davis C. D., Yu L., Wang T. T. Y. (2020). Delineating effect of corn microRNAs and matrix, ingested as whole food, on gut microbiota in a rodent model. *Food Sci Nutr*, 8, 4066– 4077.
- Huang L, Zhang Y, Du X, An R, Liang X (2022) *Escherichia coli* Can Eat DNA as an Excellent Nitrogen Source to Grow Quickly. *Front Microbiol*, 13, 894849.
- Iacomino G., Medici M. C., Napoli D., Russo G. L. (2006). Effects of histone deacetylase inhibitors on p53/Cdc20 expression in HT29 cell line. *J Cell Biochem*, 99, 1122-1131.
- Ibáñez de Aldecoa A. L., Zafra O., González-Pastor J. E. (2017). Mechanisms and Regulation of Extracellular DNA Release and Its Biological Roles in Microbial Communities. *Front Microbiol*, 8, 1390.
- Imafidon G. I., Sosulski F. W. (1990). Nucleic acid nitrogen of animal and plant foods. *J Agric Food Chem*, 38, 118-120.

Izumi H., Kosaka N., Shimizu T., Sekine K., Ochiya T., Takase M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *J Dairy Sci*, 95, 4831–4841.

Jakubek P., Cieślęwicz J., Bartoszek A. (2020). Cząsteczki mikroRNA - nowy biologicznie aktywny składnik mleka kobycego. *Postepy Hig Med Dosw*, 74, 103-115.

Jakubovics N. S., Shields R. C., Rajarajan N., Burgess J. G. (2013). Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol*, 57, 467–475.

Jin M., Yang F., Yang I., Yin Y., Luo J. J., Wang H., Yang X. F. (2012). Uric acid, hyperuricemia and vascular diseases. *Front Biosci - Landmark*, 17, 656–669.

Johannessen L. E., Spilsberg B., Wiik-Nielsen C. R., Kristoffersen A. B., Holst-Jensen A., Berdal K. G. (2013). DNA-fragments are transcytosed across CaCo-2 cells by adsorptive endocytosis and vesicular mediated transport. *PLoS One*, 8, e56671.

Jonas D. A., Elmadfa I., Engel K.-H., Heller K. J., Kozianowski G., Konig A., Muller D., Narbonne J. F., Wackernagel W., Kleiner J. (2001). Safety Considerations of DNA in Food. *Ann Nutr Metab*, 45, 235–254.

Kamel N. F., Hady M. M., Ragaa N. M., Mohamed F. F. (2021). Effect of nucleotides on growth performance, gut health, and some immunological parameters of broiler chicken exposed to high stocking density. *Livest Sci*, 253, 104703.

Kaneko K., Aoyagi Y., Fukuuchi T., Inazawa K., Yamaoka N. (2014). Total Purine and Purine Base Content of Common Foodstuffs for Facilitating Nutritional Therapy for Gout and Hyperuricemia. *Biol Pharm Bull*, 37, 709–721.

Kasai F., O'Brien P. C. M., Ferguson-Smith M. A. (2012). Reassessment of genome size in turtle and crocodile based on chromosome measurement by flow karyotyping: close similarity to chicken. *Biol Lett*, 8, 631–635.

Kelly C. M., Latimer J. J. (2005). Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Methods Mol Biol*, 291, 303–320.

Khorasanizadeh S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116, 259–272.

Khosravinia H., Murthy H. N., Parasad D. T., Pirany N. (2007). Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *Afr J Biotechnol*, 6, 481-486.

Kleinjan M., van Herwijnen M. J., Libregts S. F., van Neerven R. J., Feitsma A. L., Wauben M. H. (2021). Regular Industrial Processing of Bovine Milk Impacts the Integrity and Molecular Composition of Extracellular Vesicles. *J Nutr*, 151, 1416–1425.

Kojima-Yuasa A., Goto M., Yoshikawa E., Morita Y., Sekiguchi H., Sutoh K., Usumi K., Matsui-Yuasa I. (2016). Protective Effects of Hydrolyzed Nucleoproteins from Salmon Milt against Ethanol-Induced Liver Injury in Rats. *Mar Drugs*, 14, 232.

Koletzko B., Baker S., Cleghorn G., Neto U. F., Gopalan S., Hernell O., Hock Q. S., Jirapinyo P., Lonnerdal B., Pencharz P., Pzyrembel H., Ramirez-Mayans J., Shamir R., Turck D., Yamashiro Y., Zong-Yi D. (2005). Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41, 584–599.

Konečná B., Gaál Kovalčíková A., Pančíková A., Novák B., Koval'ová E., Celec P., Tóthová E. (2020). Salivary Extracellular DNA and DNase Activity in Periodontitis. *Appl Sci*, 10, 7490.

Kosaka N., Izumi H., Sekine K., Ochiya T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1, 7.

Kreuz B. S., Rocha G. C., Campos P. H. R. F., Silva F. F., Hannas M. I., Albino L. F. T., Borges S. O., Calderano A. A. (2020). Effects of dietary nucleotide supplementation on growth performance and physiology of broiler chickens under pre- and post-inflammatory challenge. *Rev Bras de Zootech*, 49, e20200117.

Krishna G., Gopalakrishnan G. (2016). Alternative *in vitro* models for safety and toxicity evaluation of nutraceuticals. W: *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. (Praca zbiorowa pod redakcją Gupta R. C.), Academic Press, 355-385.

Kustanovich A., Schwartz R., Peretz T., Grinshpun A. (2019). Life and Death of Circulating Cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*, 20, 1057–1067.

Kunos C. A., Ferris G., Pyatka N., Pink J., Radivoyevitch T. (2011). Deoxynucleoside Salvage Facilitates DNA Repair During Ribonucleotide Reductase Blockade in Human Cervical Cancers. *Radiat Res*, 176, 425–433.

Lanznaster D., Dal-Cim T., Piermartiri T. C., Tasca, C. I. (2016). Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. *Aging Dis* 7, 657–679.

Lassek E., Montag A. (1990). Nucleostoffe in kohlenhydratreichen Lebensmitteln. *Lebensm Unters Forsch*, 190, 17–21.

Leach J. L., Baxter J. H., Molitor B. E., Ramstack M. B., Masor M. L. (1995). Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. *Am J Clin Nutr*, 61, 1224–1230.

Leleiko N. S., Martin B. A., Walsh M., Kazlow P., Rabinowitz S., Sterling K. (1987). Tissue-specific gene expression results from a purine- and pyrimidine-free diet and 6-mercaptopurine in the rat small intestine and colon. *Gastroenterology*, 93, 1014-1020.

Leroux C., Chervet M. L., German J. B. (2021). Perspective: Milk microRNAs as Important Players in Infant Physiology and Development. *Adv Nutr*, 12, 1625–1635.

Lewandowska J., Bartoszek A. (2011). DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy – multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis*, 26, 475-487.

Li G., Zhu P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett.*, 589, 2893-2904.

Li H., Zhang B., Lu X., Tan X., Jia F., Xiao Y., Cheng Z., Li Y., Silva D. O., Schrekker H. S., Zhang, K., Mirkin C. A. (2018). Molecular spherical nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, 4340–4344.

Li Z., Xu R., Li N. (2018). MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutr Metab*, 15, 68.

Liu Y., Zhang Y., Dong P., An R., Sue C., Ge Y., Wei L., Liang X. (2015). Digestion of Nucleic Acids Starts in the Stomach. *Sci Rep*, 5, 11936.

Longley D., Harkin D., Johnston P. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3, 330–338.

López-Navarro A. T., Gil A., Sánchez-Pozo A. (1995). Deprivation of dietary nucleotides results in a transient decrease in acid-soluble nucleotides and RNA concentration in rat liver. *J Nutr*, 125, 2090–2095.

Luo Y., Wang P., Wang X., Wang Y., Mu Z., Li Q., Fu Y., Xiao J., Li G., Ma Y., Gu Y., Jin L., Ma J., Tang Q., Jiang A., Li X., Li M. (2017). Detection of dietetically absorbed maize-derived microRNAs in pigs. *Sci Rep*, 7, 645.

Lusk R. W. (2014). Diverse and widespread contamination evident in the unmapped depths of high throughput sequencing data. *PLoS One*, 9, e110808.

- Mæhre H. K., Dalheim L., Edvinsen G. K., Elvevoll E. O., Jensen I. J. (2018). Protein Determination-Method Matters. *Foods*, 7, 5.
- Magnani M., Stocchi V., Serafini N., Piatti E., Dachà M., Fornaini G. (1983). Pig red blood cell hexokinase: regulatory characteristics and possible physiological role. *Arch Biochem Biophys*, 226, 377–387.
- Manova V., Gruszka D. (2015). DNA Damage and Repair in Plants - From Models to Crops. *Front Plant Sci*, 6, 885.
- Martínez-Augustin O., Boza J. J., Del Pino J. I., Lucena J., Martínez-Valverde A., Gil, A. (1997). Dietary nucleotides might influence the humoral immune response against cow's milk proteins in preterm neonates. *Biol Neonate*, 71, 215–223.
- Mathew A., Grdisa M., Johnstone R. M. (1993). Nucleosides and glutamine are primary energy substrates for embryonic and adult chicken red cells. *Biochem Cell Biol*, 71, 288–295.
- Mc Naughton L., Bentley D. J., Koepfel P. (2006). The effects of a nucleotide supplement on salivary IgA and cortisol after moderate endurance exercise. *J Sports Med Phys Fitness*, 46, 84–89.
- Mc Naughton L., Bentley D., Koepfel P. (2007). The effects of a nucleotide supplement on the immune and metabolic response to short term, high intensity exercise performance in trained male subjects. *J Sports Med Phys Fitness*, 47, 112–118.
- McCanless A., Hultgren A., Escalante C., Ardt A., Valverde R. A. (2019). Effect of Two Digestive Enzymes and pH on the dsRNA of Endornaviruses of Bell Pepper and Melon Under in vitro Conditions. *Ann Microbiol*, 69, 1583–158.
- McNeill E. M., Hirschi K. D. (2020). Roles of Regulatory RNAs in Nutritional Control. *Annu Rev Nutr*, 40, 77–104.
- Melnik B. C., John S. M., Schmitz G. (2013). Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. *Nutr J*, 12, 103.
- Melnik B. C., Schmitz G. (2017). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 31, 427–442.
- Melnik B. C., Stadler R., Weiskirchen R., Leitzmann C., Schmitz G. (2023). Potential Pathogenic Impact of Cow's Milk Consumption and Bovine Milk-Derived Exosomal MicroRNAs in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 6102.
- Melnik B. C., Stremmel W., Weiskirchen R., John S. M., Schmitz G. (2021). Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules*, 11, 851.
- Michalopoulos G. K., Bhushan B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18, 40–55.
- Mirkin C. A., Laramy C., Skakuj K. (2019). The power of spheres. *Nature*, 576, 3-7.
- Mohamed F. F., Hady M. M., Kamel N. F., Ragaa N. M. (2020). The impact of exogenous dietary nucleotides in ameliorating *Clostridium perfringens* infection and improving intestinal barriers gene expression in broiler chicken. *Vet Anim Sci*, 10, 100130.
- Morandi F., Horenstein A. L., Rizzo R., Malavasi F. (2018). The role of extracellular adenosine generation in the development of autoimmune diseases. *Mediat Inflamm*, article ID 7019398.
- Morley D. J., Hawley D. M., Ulbright T. M., Butler L. G., Culp J. S., Hodes M. E. (1987). Distribution of phosphodiesterase I in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 35, 75–82.
- Mouritsen O. G., Khandelia H. (2012). Molecular mechanism of the allosteric enhancement of the umami taste sensation. *FEBS J*, 17, 3112–3120.

Nadal A., De Giacomo M., Einspanier R., Kleter G., Kok E., McFarland S., Onori R., Paris A., Toldra M., Van Dijk J., Wal J.-M., Pla M. (2018). Exposure of livestock to GM feeds: Detectability and measurement. *Food Chem Toxicol*, 117, 13-35.

Nagafuchi S., Totsuka M., Hachimura S., Goto M., Takahashi T., Yajima T., Kuwata T., Kaminogawa S. (2002). Dietary nucleotides increase the mucosal IgA response and the secretion of transforming growth factor beta from intestinal epithelial cells in mice. *Cytotechnology*, 40, 49–58.

Nakamoto M., Shuto E., Hosaka T., Sakai T. (2011). Dietary deoxynucleic acid induces type 2 T-helper immune response through toll-like receptor 9 in mice. *Eur J Nutr*, 50, 421–426.

Navarro J., Maldonado J., Narbona E., Ruiz-Bravo A., García Salmerón J. L., Molina J. A., Gil A. (1999). Influence of dietary nucleotides on plasma immunoglobulin levels and lymphocyte subsets of preterm infants. *Biofactors*, 10, 67–76.

Nawaz M. A., Mesnage R., Tsatsakis A. M., Golokhvast K. S., Yang S. H., Antoniou M. N., Chung G. (2019). Addressing concerns over the fate of DNA derived from genetically modified food in the human body: A review. *Food Chem Toxicol*, 124, 423–430.

Nenkov M., Ma Y., Gaßler N., Chen Y. (2021). Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Cells and the Microenvironment: Implication for Therapy. *Int J Mol Sci*, 22, 6262.

Nestor A. L., Willey J., Allison D. C. (2001). 18 - Tissue Culture, Cell Growth, and Analysis. W: Surgical Research. (Praca zbiorowa pod redakcją Souba W. W. i Wilmore D. G.). Academic Press, 193-206.

Nyholm S., Thelander L., Gräslund A. (1993). Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry*, 32, 11569–11574.

Ortega M. A., Nunez M. C., Gil A., Sánchez-Pozo A. (1995). Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats. *J Nutr*, 125, 1413–1418.

Ostojic S. M., Idrizovic K., Stojanovic M. D. (2013). Sublingual nucleotides prolong run time to exhaustion in young physically active men. *Nutrients*, 5, 4776–4785.

Otandault A., Anker P., Al Amir Dache Z., Guillaumon V., Meddeb R., Pastor B., Pisareva E., Sanchez C., Tanos R., Tusch G., Schwarzenbach H., Thierry A. R. (2019). Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Annal Oncol*, 30, 374–384.

Pastor-Anglada M., Mata-Ventosa A., Pérez-Torras S. (2022). Inborn Errors of Nucleoside Transporter (NT)-Encoding Genes (*SLC28* and *SLC29*). *Int J Mol Sci*, 23, 8770.

Pastor-Anglada M., Urtasun N., Pérez-Torras S. (2018). Intestinal Nucleoside Transporters: Function, Expression, and Regulation. *Compr Physiol*, 8, 1003–1017.

Perricone V., Comi M., Bontempo V., Lecchi C., Cecilliani F., Crestani M., Ferrari A., Savoini G., Agazzi A. (2020). Effects of nucleotides administration on growth performance and immune response of post-weaning piglets. *Ital J Anim Sci*, 19, 295-301.

Philip A., Ferro V. A., Tate R. J. (2015). Determination of the potential bioavailability of plant microRNAs using a simulated human digestion process. *Mol Nutr Food Res*, 59, 1962–1972.

Pickering L. K., Granoff D. M., Erickson J. R., Masor M. L., Cordle C. T., Schaller J. P., Winship T. R., Paule C. L., Hilty M. D. (1998). Modulation of the immune system by human milk and infant formula containing nucleotides. *Pediatrics*, 101, 242–249.

Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A. (1997). Krótka charakterystyka głównych surowców przemysłu spożywczego, ich odbiór i czyszczenie. W: Ogólna Technologia Żywności. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 46-80.

Piskata Z., Servusova E., Babak V., Nesvadbova M., Borilova G. (2019). The Quality of DNA Isolated from Processed Food and Feed via Different Extraction Procedures. *Molecules*, 24, 1188.

Pita M. L., Fernández M. R., De-Lucchi C., Medina A., Martínez-Valverde A., Uauy R., Gil A. (1988). Changes in the fatty acids pattern of red blood cell phospholipids induced by type of milk, dietary nucleotide supplementation, and postnatal age in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 7, 740–747.

PNEN 13784:2003. Artykuły żywnościowe - Metoda kometowa DNA do wykrywania napromieniania żywności - Metoda skringowa.

Pourrut B., Pinelli E., Mendiola V. C., Silvestre J., Douay F. (2015). Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. *Mutagenesis*, 30, 37-43.

Przybyszewski W. M., Kasperczyk J. (2006). Rodnikowy mechanizm ubocznej toksyczności hydroksymocznika. *Postepy Hig Med Dosw*, 60, 516-526.

Purpura M., Rathmacher J. A., Sharp M. H., Lowery R. P., Shields K. A., Partl J. M., Wilson J. M., Jäger R. (2017). Oral Adenosine-5'-triphosphate (ATP) Administration Increases Postexercise ATP Levels, Muscle Excitability, and Athletic Performance Following a Repeated Sprint Bout. *J Am Coll Nutr*, 36, 177–183.

Querci M., Van den Bulcke M., Zel J., Van den Eede G., Broll H. (2010). New approaches in GMO detection. *Anal Bioanal Chem*, 396, 1991–2002.

Ran T., Mei L., Lei W., Aihua L., Ru H., Jie S. (2009), Detection of transgenic DNA in tilapias (*Oreochromis niloticus*, GIFT strain) fed genetically modified soybeans (Roundup Ready). *Aquac Res*, 40, 1350-1357.

Rath E., Haller D. (2022). Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury. *Mucosal Immunol*, 15, 595–604.

Reece J. B., Urry L. A., Cain M. L., Wasserman S. A., Minorsky P. V., Jackson R. B. (2016). Odżywianie zwierząt. W: *Biologia Campbella*. (Praca zbiorowa pod redakcją Jacka Daberta). Dom Wydawniczy REBIS, Poznań, 892-914.

Riera J., Pons V., Martinez-Puig D., Chetrit C., Tur J. A., Pons A., Drobnic F. (2013). Dietary nucleotide improves markers of immune response to strenuous exercise under a cold environment. *J Int Soc Sports Nutr*, 10, 20.

Rizzi A., Raddadi N., Sorlini C., Nordgard L., Nielsen K. M., Daffonchio D. (2012). The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety of GMOs. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 52, 142-161.

Rospleszcz S., Dermyski D., Müller-Peltzer K., Strauch K., Bamberg F., Peters A. (2020). Association of serum uric acid with visceral, subcutaneous and hepatic fat quantified by magnetic resonance imaging. *Sci Rep*, 10, 442.

Sabisz M., Składanowski A. (2008). Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Curr Pharm Biotechnol*, 9, 325–336.

Sakai T., Taki T., Nakamoto A., Tazaki S., Arakawa M., Nakamoto M., Tsutsumi R., Shuto E. (2015). Dietary ribonucleic acid suppresses inflammation of adipose tissue and improves glucose intolerance that is mediated by immune cells in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *J Nutr Sci Vitaminol*, 61, 73–78.

Sánchez-Pozo A., Morillas J., Moltó L., Robles R., Gil A. (1994). Dietary nucleotides influence lipoprotein metabolism in newborn infants. *Pediatr Res*, 35, 112–116.

Santa P., Garreau A., Serpas L., Ferriere A., Blanco P., Soni C., Sisirak V. (2021). The Role of Nucleases and Nucleic Acid Editing Enzymes in the Regulation of Self-Nucleic Acid Sensing. *Front Immunol*, 12, 629922.

Sauer N., Mosenthin R., Bauer E. (2011). The role of dietary nucleotides in single-stomached animals. *Nutr Res Rev*, 24, 46–59.

Schaller J. P., Kuchan M. J., Thomas D. L., Cordle C. T., Winship T. R., Buck R. H., Baggs G. E., Wheeler J. G. (2004). Effect of dietary ribonucleotides on infant immune status. Part 1: Humoral responses. *Pediatr Res*, 56, 883–890.

Schubbert R., Lettmann C., Doerfler W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol Gen Genet*, 242, 495–504.

Sensoy I. (2021). A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models. *Curr Res Food Sci*, 4, 308–319.

Shiau S.-Y., Gabaudan J., Lin Y.-H. (2015). Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing low fish meal. *Aquac Rep*, 2, 77-81.

Siahanidou T., Mandyla H., Papassotiriou I., Anagnostakis D. (2004). Serum lipids in preterm infants fed a formula supplemented with nucleotides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 38, 56–60.

Singh A., Xu Y. J. (2016). The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*, 7, 99.

Singha M., Spitalny L., Nguyen K., Vandewalle A., Spitale R. C. (2021). Chemical methods for measuring RNA expression with metabolic labeling. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 12, e1650.

Singhal A., Kennedy K., Lanigan J., Clough H., Jenkins W., Elias-Jones A., Stephenson T., Dudek P., Lucas A. (2010). Dietary nucleotides and early growth in formula-fed infants: a randomized controlled trial. *Pediatrics*, 126, e946–e953.

Skalsky R. L., Cullen B. R. (2010). Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol*, 64, 123–141.

Skinner O. S., Blanco-Fernández J., Goodman R. P., Kawakami A., Shen H., Kemeny L. V., Joesch-Cohen L., Rees M. G., Roth J. A., Fisher D. E., Mootha V. K., Jourdain A. A. (2023). Salvage of ribose from uridine or RNA supports glycolysis in nutrient-limited conditions. *Nat Metab*, 5, 765–776.

Spisak S., Solymosi N., Ittzes P., Bodor A., Kondor D., Vattay G., Bartak B. K., Sipos F., Galamb O., Tulassay Z., Szallasi Z., Rasmussen S., Sicheritz-Ponten T., Brunak S., Molnar B., Csabai I. (2013). Complete genes may pass from food to human blood. *PLoS One*, 8, e6980.

Sterczala A. J., DuPont W. H., Comstock B. A., Flanagan S. D., Szivak T. K., Hooper D. R., Kupchak B. R., Lee E. C., Volek J. S., Maresh C. M., Kraemer W. J. (2016). Physiological Effects of Nucleotide Supplementation on Resistance Exercise Stress in Men and Women. *J Strength Cond Res*, 30, 569–578.

Sudo N., Aiba Y., Takaki A., Tanaka K., Yu X. N., Oyama N., Koga Y., Kubo C. (2000). Dietary nucleic acids promote a shift in Th1/Th2 balance toward Th1-dominant immunity. *Clin Exp Allergy*, 30, 979–987.

Superchi P., Saleri R., Borghetti P., De Angelis E., Ferrari L., Cavalli V., Amicucci P., Ossiprandi M. C., Sabbioni A. (2012). Effects of dietary nucleotide supplementation on growth performance and hormonal and immune responses of piglets. *Animal*, 6, 902–908.

Sweatt J. D., Nestler E. J., Meaney M. J., Akbarian S. (2013). Chapter 1 - An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. W: Epigenetic Regulation in the Nervous System. Academic Press, San Diego, 3–33.

Szweykowska A., Szweykowski J. (2008). 4. Ukształtowanie i budowa ciała roślin telomowych. W: Botanika. Morfologia. Tom I. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 112-234.

Tahmasebi-Kohyani A., Keyvanshokoo S., Nematollahi A., Mahmoudi N., Pasha-Zanoosi H. (2012). Effects of dietary nucleotides supplementation on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance and acute stress response. *Fish Physiol Biochem*, 38, 431–440.

Tan C., Ji Y., Zhao X., Xin Z., Li J., Huang S., Cui Z., Wen L., Liu C., Kim S. W., Deng J., Yin Y. (2021). Effects of dietary supplementation of nucleotides from late gestation to lactation on the performance and oxidative stress status of sows and their offspring. *Anim Nutr*, 7, 111-118.

Teng Y., Ren Y., Sayed M., Hu X., Lei C., Kumar A., Hutchins E., Mu J., Deng Z., Luo C., Sundaram K., Sriwastva M. K., Zhang L., Hsieh M., Reiman R., Haribabu B., Yan J., Jala V. R., Miller D. M., Van Keuren-Jensen K., Merchant M. L., McClain C. J., Park J. W., Egilmez N. K., Zhang H. G. (2018). Plant-Derived Exosomal MicroRNAs Shape the Gut Microbiota. *Cell Host Microbe*, 24, 637–652.e8.

Tie H.-M., Jiang W.-D., Feng L., Wu P., Liu Y., Kuang S.-Y., Tang L., Zhou X.-Q. (2021). Dietary nucleotides in the diets of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) suppress *Aeromonas hydrophila* induced intestinal inflammation and enhance intestinal disease-resistance via NF- κ B and TOR signaling. *Aquaculture*, 533, 736075.

Tie H.-M., Wu P., Jiang W.-D., Liu Y., Kuang S.-Y., Zeng Y.-Y., Jiang J., Tang L., Zhou X.-Q., Feng L. (2019). Dietary nucleotides supplementation affect the physicochemical properties, amino acid and fatty acid constituents, apoptosis and antioxidant mechanisms in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) muscle. *Aquaculture*, 502, 312-325.

Uauy R., Stringel G., Thomas R., Quan R. (1990). Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 10, 497–503.

Uberti F., Ruga S., Morsanuto V., Galla R., Farghali M., Molinari C. (2020). Role of Ribonucleotides in Improving Muscle Cell Function. *J Food Sci Nutr Res*, 3, 231-251.

van Herwijnen M. J. C., Driedonks T. A. P., Snoek B. L., Kroon A. M. T., Kleinjan M., Jorritsma R., Pieterse C. M. J., Hoen E. N. M. N., Wauben M. H. M. (2018). Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Front Nutr*, 5, 81.

Van Kreel B. K. (1985). The estimation of the apparent standardised free energy change ΔG°_{pH} of a biochemical reaction from the standard free energy of formation and apparent free energy of ionization of the participating molecules and its application to the reaction of purine metabolism. *Biochem Educ*, 3, 125-130.

Van der Colff L., Podivinsky E. (2008). Cooking DNA: the effect of ‘domestic’ cooking methods on detection of GM potato. *Int J Food Sci Technol*, 43, 2105–2112.

Vásquez-Garibay E., Méndez-Estrada C., Romero-Velarde E., García-Iglesias M. T., Campollo-Rivas O. (2004). Nutritional support with nucleotide addition favors immune response in severely malnourished infants. *Arch Med Res*, 35, 284–288.

Ventura L., Giovannini A., Savio M., Dona M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D., Balestrazzi A. (2013). Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92, 1-9.

Verma A. (2014). Chapter 12 - Animal Tissue Culture: Principles and Applications. W: Animal Biotechnology. (Praca zbiorowa pod redakcją Verma A. S. i Singh A.). Academic Press, 211-231.

Wadler S., Horowitz R., Rao J., Mao X., Schlesinger K., Schwartz E. L. (1996). Interferon augments the cytotoxicity of hydroxyurea without enhancing its activity against the M2 subunit of ribonucleotide reductase: effects in wild-type and resistant human colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 38, 522–528.

Wang L., Hu W., Wang J., Qian W., Xiao H. (2016). Low serum uric acid levels in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica: An updated meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord*, 9, 17–22.

Wang L., Liu J., Lv H., Zhang X., Shen L. (2015). Effects of Nucleotides Supplementation of Infant Formulas on Plasma and Erythrocyte Fatty Acid Composition: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0127758.

Wang L., Mu S., Xu X., Shi Z., Shen L. (2019). Effects of dietary nucleotide supplementation on growth in infants: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Nutr*, 58, 1213–1221.

Wasmund K., Pelikan C., Schintlmeister A., Wagner M., Watzka M., Richter A., Bhatnagar S., Noel A., Hubert C. R. J., Rattei T., Hofmann T., Hausmann B., Herbold C. W., Loy A. (2021). Genomic insights into diverse bacterial taxa that degrade extracellular DNA in marine sediments. *Nat Microbiol*, 6, 885–898.

Wei Z., Batagov A. O., Carter D. R., Krichevsky A. M. (2016). Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Sci Rep*, 6, 31175.

Weickmann J. L., Elson M., Glitz D. G. (1981). Purification and characterization of human pancreatic ribonuclease. *Biochemistry*, 20, 1272–1278.

Weigel D., Glazebrook J. (2008). Fixation, embedding, and sectioning of plant tissues, *Cold Spring Harb Protoc*, 3.

Williams J. A. (2018). Pancreatic Ribonuclease. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2018.20

Williams J. A. (2021). Pancreatic DNase. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, DOI: 10.3998/panc.2021.14

Witwer K. W., Hirschi K. D. (2014). Transfer and functional consequences of dietary microRNAs in vertebrates: concepts in search of corroboration: negative results challenge the hypothesis that dietary xenomiRs cross the gut and regulate genes in ingesting vertebrates, but important questions persist. *Bioessays*, 36, 394–406.

Wolf T., Baier S. R., Zempleni J. (2015). The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *J Nutr*, 145, 2201–2206.

Woltil H. A., van Beusekom C. M., Siemensa A. D., Polman H. A., Muskiet F. A., Okken A. (1995). Erythrocyte and plasma cholesterol ester long-chain polyunsaturated fatty acids of low-birth-weight babies fed preterm formula with and without ribonucleotides: comparison with human milk. *Am J Clin Nutr*, 62, 943–949.

Wu B., Roseland J. M., Haytowitz D. B., Pehrsson P. R., Ershow A. G. (2019). Availability and quality of published data on the purine content of foods, alcoholic beverages, and dietary supplements. *J Food Compos Anal*, 84, 103281.

Wu C., Yang Z., Song C., Liang C., Li H., Chen W., Lin W., Xie Q. (2018). Effects of dietary yeast nucleotides supplementation on intestinal barrier function, intestinal microbiota, and humoral immunity in specific pathogen-free chickens. *Poult Sci*, 97, 3837–3846.

Xie C.-y., Wang Q., Li G., Fan Z., Wang H., Wu X. (2019). Dietary supplement with nucleotides in the form of uridine monophosphate or uridine stimulate intestinal development and promote nucleotide transport in weaned piglets. *J Sci Food Agric*, 99, 6108–6113.

Xu M., Liang R., Guo Q., Wang S., Zhao M., Zhang Z., Wang J., Li Y. (2013). Dietary nucleotides extend the life span in Sprague-Dawley rats. *J Nutr Health Aging*, 17, 223–229.



- Xu M., Liang R., Li Y., Wang J. (2017). Anti-fatigue effects of dietary nucleotides in mice. *Food Nutr Res*, 61, 1334485.
- Yang T., Liu R., Luo Y., Hu S., Wang D., Wang C., Pandey M. K., Ge S., Xu Q., Li N., Li G., Huang Y., Saxena R. K., Ji Y., Li M., Yan X., He Y., Liu Y., Wang X., Xiang C., Varshney R. K., Ding H., Gao S., Zong X. (2022). Improved pea reference genome and pan-genome highlight genomic features and evolutionary characteristics. *Nat Genet*, 54, 1553–1563.
- Yao W., Mei C., Nan X., Hui L. (2016). Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*, 590, 142–148.
- Yau K. I., Huang C. B., Chen W., Chen S. J., Chou Y. H., Huang F. Y., Kua K. E., Chen N., McCue M., Alarcon P. A., Tressler R. L., Comer G. M., Baggs G., Merritt R. J., Masor M. L. (2003). Effect of nucleotides on diarrhea and immune responses in healthy term infants in Taiwan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 36, 37–43.
- Yeung J. W. Y., Leung K. M. Y. (2013). Effects of animal size and nutritional status on the RNA/DNA ratio in different tissues of the green-lipped mussel *Perna viridis*. *J Mar Biol Assoc UK*, 93, 217–225.
- Yin H., Liu N., Chen J. (2022). The Role of the Intestine in the Development of Hyperuricemia. *Front Immunol*, 13, 845684.
- Young J. D., Jarvis S. M., Clanachan A. S., Henderson J. F., Paterson A. R. (1986). Nitrobenzylthioinosine: an in vivo inhibitor of pig erythrocyte energy metabolism. *Am J Physiol*, 251, C90–C94.
- Young J. D., Yao S. Y., Baldwin J. M., Cass C. E., Baldwin S. A. (2013). The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med*, 34, 529–547.
- Zarakowska E., Gackowski D., Foksinski M., Olinski R. (2014). Are 8-oxoguanine (8-oxoGua) and 5-hydroxymethyluracil (5-hmUra) oxidatively damaged DNA bases or transcription (epigenetic) marks? *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 764/765, 58–63.
- Zhang L., Chen T., Yin Y., Zhang C. Y., Zhang Y. L. (2019). Dietary microRNA-A Novel Functional Component of Food. *Adv Nutr*, 10, 711–721.
- Zhang N., Yin Y., Xu S. J., Chen, W. S. (2008). 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*, 13, 1551–1569.
- Zhang P., Wu W., Chen Q., Chen M. (2019). Non-Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform*, 16, 20190027.
- Zhang Q., Zhang J., Zen K., Zhang C. Y. (2012). Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res*, 22, 107–126.
- Zhang Y., Chen C., Choi H., Chaisson C., Hunter D., Niu J., Neogi T. (2012). Purine-rich foods intake and recurrent gout attacks. *Ann Rheum Dis*, 71, 1448–1453.
- Zhang Y., Chen S., Yuan M., Xu Y., Xu H. (2022) Gout and Diet: A Comprehensive Review of Mechanisms and Management. *Nutrients*, 14, 3525.
- Zhang Y., Li C., Liu Y., Wang X., Dong P., Liang X. (2016a). Mechanism of Extraordinary DNA Digestion by Pepsin. *Biochem Biophys Res Commun*, 472, 101–107.
- Zhang Y., Wang X., Pan X., Liu Y., Wang H., Dong P., Liang X. (2016b). The Effects of Food Components on the Digestion of DNA by Pepsin. *Int J Food Sci Nut*, 67, 797–805.
- Zöllner, E. J., Klepsch, D. M., Zahn, R. K. (1974). Different deoxyribonucleases in human submandibular saliva. *J Dent Res*, 53, 1499.

Zöllner E. J., Klepsch D. M., Zahn R. K., Knepper R. (1975). Deoxyribonuclease in human parotid saliva. *Enzyme*, 19, 60–64.

Zubay G. L. (1998a). Structures of Nucleic Acids and Nucleoproteins. W: *Biochemistry*. (Praca zbiorowa pod redakcją G. L. Zubay). Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 733-759.

Zubay G. L. (1998b). RNA Synthesis and Processing. W: *Biochemistry*. (Praca zbiorowa pod redakcją G. L. Zubay). Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, 818-848.

DOROBEK NAUKOWY

Publikacje

- Ginovyan M., Javrushyan H., Petrosyan G., Kusznierevich B., Koss-Mikołajczyk I., **Koziara Z.**, Kuczyńska M., Jakubek P., Karapetyan A., Sahakyan N., Maloyan A., Bartoszek A., Avtandilyan N. (2023). Anti-cancer effect of Rumex obtusifolius in combination with arginase/nitric oxide synthase inhibitors via downregulation of oxidative stress, inflammation, and polyamine synthesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 158, 106396
- Baranowska M., **Koziara Z.**, Suliborska K., Chrzanowski W., Wormstone M., Namieśnik J., Bartoszek A. (2021). Interactions between polyphenolic antioxidants quercetin and naringenin dictate the distinctive redox-related chemical and biological behaviour of their mixtures. *Sci Rep*, 11, 12282
- **Koziara Z.**, Kościelak A., Bartoszek A. (2021). Kwasy nukleinowe - niedoceniane składniki żywności. *Laboratorium - Przegląd Ogólnopolski*, 2, 34-39
- Cieślewicz J., **Koziara Z.**, Ćwiklińska W., Bartoszek A. (2021). The Toolbox of Methods for Multidirectional Characterization of Dietary Nucleic Acids; Verification for Raw and Processed Food Products. *Food Anal Methods*, 14, 1482–1497
- **Koziara Z.**, Baranowska M., Bartoszek-Pączkowska A., Namieśnik J. (2019). Comparison of Redox Properties of Flavonoid Aglycones and Corresponding Glycosides and Their Mixtures in the Cellular Model. *Proceedings*, 11, 1-4

Wystąpienia konferencyjne - prezentacje ustne

- **Koziara Z.**, Bartoszek A. The impact of dietary nucleic acids and their components on the growth of human alimentary tract cells *in vitro*. 6th IMEKO FOODS, Dubrownik, Chorwacja, 7-9.11.2022
- **Koziara Z.**, Baranowska M., Bartoszek A. Interactions between flavonols and flavanones in support of the food synergy concept. ROS Roundabout - Many Exit Options, COST Action 16112 NutRedOx meeting, Gdańsk, 19-21.09.2021
- **Koziara Z.**, Bartoszek A. Nucleic acids as the abundant dietary meat component. 67th International Congress of Meat Science and Technology, kongres hybrydowy, Kraków, 23-27.08.2021

- **Koziara Z.**, Baranowska M., Bartoszek-Pączkowska A., Namieśnik J. Comparison of Redox Properties of Flavonoid Aglycones and Corresponding Glycosides and Their Mixtures in the Cellular Model. Natural Products and the Hallmarks of Chronic Diseases, COST Action 16112 NutRedOx meeting, Luksemburg, 25-27.03.2019

Wystąpienia konferencyjne - prezentacje posterowe

- **Koziara Z.**, Bartoszek A. Przegląd technik izolacji i ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych w żywności. XLV Konferencja Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN Żywność w strategii Zielonego Ładu, Gdańsk, 1-2.07.2021
- **Koziara Z.**, Bartoszek A. Nucleic acids - underrated food components. 4th European Summer School on Nutrigenomics, virtual edition, Camerino, Włochy, 21-25.06.2021
- **Koziara Z.**, Bartoszek A. Charakterystyka kwasów nukleinowych w wybranych produktach żywnościowych. XXVIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne, Gdańsk, 28-29.09.2020

Pozostałe aktywności

- Współorganizacja konferencji „ROS Roundabout - Many Exit Options”, COST Action 16112 NutRedOx meeting, Gdańsk, 19-21.09.2021
- Współprowadzenie zajęć dla dzieci w ramach Politechniki Wielu Pokoleń, Czarlina, 7-8.07.2021, 25-26.08.2021
- Udział w szkoleniu “Cell migration workshop: concepts, mechanisms and techniques”, Lusófona University, Lizbona, Portugalia, 01-02.10.2019
- Udział w szkoleniu “Food metabolites and the impact of microbiota workshop”, Lusófona University, Lizbona, Portugalia, 30.09.2019
- Współorganizacja Bałtyckiego Festiwalu Nauki, stanowisko „Kuchnia molekularna z produktów ubocznych”, Gdańsk, 22.05.2019
- Współorganizacja szkolenia „Comet Assay Course”, Gdańsk, 05-07.02.2019