



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

**Προσδιορισμός Μεταλλαξιογόνων Χημικών Παραγόντων στη
Διατροφική Αλυσίδα**

Αθηνά Οικονομίδη

Επιβλέπων καθηγητής: Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Πάτρα, Μάρτιος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του της φοιτήτριας Αθηνάς Οικονομίδη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας της δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση της συγγραφέα. Η δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών της δικαιωμάτων.



Προσδιορισμός Μεταλλαξιογόνων Χημικών Παραγόντων στη Διατροφική Αλυσίδα

Αθηνά Οικονομίδη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Αλέξανδρος Γεωργακίλας

Ανδρέας Σκορίλας

Πάτρα, Μάρτιος 2025

*Στη μητέρα και την αδελφή μου, τις παντοτινές συνοδοιπόρους μου σε κάθε χαρά και
δυσκολία.*

*Ιδιαίτερως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντά μου, κο Γεωργακίλα, για την καθοδήγηση,
την υπομονή και κατανόηση που επέδειξε καθ' όλο το διάστημα της συνεργασίας μας.*

Περίληψη

Τα μεταλλαξιογόνα είναι χημικά μόρια που μπορούν να αλλάξουν τη διάταξη του DNA προκαλώντας καρκινογένεση. Αυτή η καρκινογόνος επίδραση των μεταλλαξιογόνων που εισέρχονται στο σώμα μέσω των προϊόντων διατροφής έχει απασχολήσει σοβαρά την επιστημονική κοινότητα.

Η εμφάνιση μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής μπορεί να είναι φυσική ή λόγω συνθηκών μαγειρέματος ή επεξεργασίας. Πολλά χημικά συστατικά εμπλέκονται στην επεξεργασία προϊόντων διατροφής, όπως συντηρητικά, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων, αρκετοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες εισχωρούν στο τελικό προϊόν διατροφής είτε σκόπιμα είτε κατά λάθος. Η παρουσία αυτών των μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής προκαλεί σοβαρή ανησυχία, διότι οδηγεί σε μεταλλαξιογένεση ακολουθούμενη από καρκινογένεση.

Η μελέτη των μεταλλαξιογόνων τροφίμων περιλαμβάνει συμπληρωματικές προσεγγίσεις όπως συστήματα χημικών μοντέλων που προσδιορίζουν τη δομή των καρκινογόνων και τον τρόπο δράσης τους, μοντέλα κυτταροκαλλιέργειας ζώων και ανθρώπων που επαληθεύουν την εφαρμογή της χημείας σε ένα σύστημα *in vivo*, ζωικά *in vivo* μοντέλα καρκινογένεσης και πρόσθετα επιδημιολογικές μελέτες μήτρες που ενσωματώνουν βιοδείκτες που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας άλλες μεθόδους.

Η αναζήτηση των μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες και η ανάπτυξη τεχνικών για την ταυτοποίηση, καθώς και την ανίχνευση μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής είναι απαραίτητη. Στο μέλλον, είναι απαραίτητες μέθοδοι για τον εντοπισμό και την ανίχνευση αυτών των μεταλλαξιογόνων παραγόντων, καθώς και για τον εντοπισμό νέων και πιο ισχυρών μικροοργανισμών που μπορούν να μετατρέψουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες σε μη μεταλλαξιογόνους.

Λέξεις – Κλειδιά

Μεταλλαξιογόνοι παράγοντες, τρόφιμα, μεταλλάξεις, πρόσθετα τροφίμων.

Abstract

Mutagens are chemical molecules that can change the arrangement of DNA causing carcinogenesis. This carcinogenic effect of mutagens entering the body through food products has been of serious concern to the scientific community.

The occurrence of mutagens in food products can be natural or due to cooking or processing conditions. Many chemical ingredients are involved in the processing of food products, such as preservatives, which can cause mutagenicity. During food processing, several mutagens enter the final food product either intentionally or accidentally. The presence of these mutagens in food products is of serious concern because it leads to mutagenesis followed by carcinogenesis.

The study of food mutagens includes complementary approaches such as chemical model systems that identify the structure of carcinogens and their mode of action, animal and human cell culture models that verify the application of chemistry in an in vivo system, animal in vivo models of carcinogenesis and additional epidemiological matrix studies that incorporate biomarkers identified using other methods.

The search for micro-organisms that have the ability to transform mutagenic factors and the development of techniques for identification as well as detection of mutagens in food products is essential. In the future, methods to identify and detect these mutagens, as well as to identify new and more potent micro-organisms that can transform mutagens into non-mutagens are necessary.

Keywords

Mutagens, food, mutations, food additives.

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια	x
1 Εισαγωγή	1
2 Μεταλλάξεις	3
2.1 Ορισμός	3
2.2 Μεταλλαξιογόνοι παράγοντες	5
2.2.1 Φυσικοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες	6
2.2.2 Χημικοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες	10
3 Μεταλλαξιογόνα στα τρόφιμα	11
3.1 Εισαγωγικά στοιχεία	11
3.2 Μεταλλαξιογόνα Επεξεργασμένων Τροφίμων	16
3.2.1 Τα παράγωγα N-Nitroso	16
3.2.2 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	17
3.2.3 Ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες	21
3.3 Πρόσθετα τροφίμων	23
3.4 Μεταλλαξιογόνες ουσίες προσυσκευασμένων τροφίμων	26
3.5 Μεταλλαξιογόνα που σχηματίζονται από κρέας σε χαμηλότερες θερμοκρασίες	27
3.6 Σχηματισμός μεταλλαξιογόνου που περιλαμβάνει υδατάνθρακες	28
3.7 Φυτικά Φλαβονοειδή	28
3.8 Μεταλλαξιογόνος δραστηριότητα σε εκχυλίσματα τροφίμων και ποτών	30
3.9 Μεταλλαξιογόνες ουσίες από τις συσκευασίες τροφίμων	31
3.9.1 Αλκυλιωμένα Ιμιδαζόλια	31
3.9.2 Φουράνιο	32
3.9.3 Βενζοφαινόνη	33
3.9.4 Φθαλικός δι(2-αιθυλεξυλεστέρας)	35
3.9.5 1,4-διοξάνη	37
3.10 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταλλαξιογένεση	38
3.11 Μεταβολική εκτίμηση μεταλλαξιογόνων	39
4 Ανίχνευση Μεταλλαξιογόνων	41
4.1 Εισαγωγικά στοιχεία-Μηχανισμοί	41
4.2 Μέθοδοι μελέτης μεταλλαξιογόνων τροφίμων	42
4.3 Προσδιορισμός μεταλλαξιογόνων από δείγματα τροφίμων	44
4.4 Χημική παραγωγή	47
4.5 Ανάλυση μεταλλαξιογόνων	47
4.6 Δοκιμή μεταλλαξιογένεσης	50
4.7 Μικροβιακός μετασχηματισμός μεταλλαξιογόνων	53
4.8 Μεταβολική οδός μικροβιακής μετατροπής	55
5 Εργαλεία QSAR	58
5.1 Εισαγωγικά στοιχεία	58
5.2 Ορισμός QSAR	59
5.3 Εργαλεία QSAR	59

5.4 Μεταλλαξιογένεση και (Q)SAR.....	66
5.5 Πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames από το QSAR	67
5.6 Κορυφαία εργαλεία QSAR για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames..	68
5.6.1 Derek Nexus (Lhasa limited, UK): QSAR που βασίζεται σε κανόνες	68
5.6.2 Sarah Nexus (Lhasa limited, UK): QSAR βάσει στατιστικών	69
5.6.3 CASE ultra (MultiCASE Inc., ΗΠΑ): QSAR βάσει στατιστικών	70
5.6.4 Εφαρμογή μοντέλου Leadscape. LSMA (Leadscape Inc., ΗΠΑ): QSAR βάσει στατιστικών	70
5.6.5 TIMES_AMES (Πανεπιστήμιο Μπουργκάς, Βουλγαρία): QSAR που βασίζεται σε κανόνες	71
5.6.6 Toxtree (Istituto Superiore di Sanità, Ιταλία): QSAR που βασίζεται σε κανόνες 72	
5.6.7 ADMEWORKS (FUJITSU KYUSHU SYSTEMS LIMITED, Ιαπωνία): QSAR βάσει στατιστικών.....	72
5.6.8 ChemTunes•ToxGPS (molecular networks GmbH and Altamira LLC, USA): QSAR βάσει στατιστικών	73
5.6.9 MUT_Risk (simulations plus Inc., USA): QSAR βάσει στατιστικών	73
5.6.10 StarDrop auto-Modeller (Optibrium ltd., UK) βάσει στατιστικών	74
5.6.11 T.E.S.T (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ): μοντέλο συναίνεσης.....	74
5.6.12 VEGA (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Ιταλία): μοντέλο συναίνεσης.....	75
5.6.13 Αξιολόγηση της προγνωστικής ισχύος των εργαλείων QSAR.....	76
5.7 Η εφαρμογή του QSAR στο ICH-M7	76
Συμπεράσματα.....	80
Βιβλιογραφία.....	82

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Μετάλλαξη.	3
Εικόνα 2: Επιδιόρθωση του DNA.	4
Εικόνα 3: Ανασυνδυασμός.	5
Εικόνα 4: Δομές διαφόρων μεταλλαξιογόνων παραγώγων N-Nitroso.	17
Εικόνα 5: Δομές διαφόρων μεταλλαξιογόνων Πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.	18
Εικόνα 6: Δομές διαφόρων μεταλλαξιογόνων ετεροκυκλικών αμινών.	22
Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ΕΝΑ.	25
Εικόνα 8: Δομή βενζοφαινόνης.	34
Εικόνα 9: Δομή DEHP και κύριοι μεταβολίτες.	36
Εικόνα 10: Δομή 1,4-διοξάνιο.	37

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

AF-2: 2-(2-φουρυλ)-3-(5-νιτροφουρυλ)ακρυλαμίδιο

DNMP: 2-Methyl-1,4-Dinitro pyrrole

ENA: Αιθυλνιτρολικό Οξύ

FAO: Food and Agriculture Organization

FEMA: Flavor and Extract Manufacturers Association

HPLC: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

NNAL: 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη

NNK: -(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη

NNN: N'-νιτροσονορνικοτίνη

PAHs: Polycyclic aromatic hydrocarbons: πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

SAM: μεθυλ-δότης S-αδενοσυλομεθειονίνη

PRS: φυσίγγιο προπυλσουλφονικού οξέος

1 Εισαγωγή

Η ποικιλία των χημικών ουσιών που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι τεράστια, όπως και οι ποικίλες ιδιότητές τους. Είναι γνωστό ότι χημικές ουσίες με καρκινογόνο δράση σε μοντέλα τρωκτικών μπορούν να βρεθούν σε πολλά τρόφιμα που καταναλώνονται συνήθως από διάφορες πηγές, όπως φυτά, μικροοργανισμούς, μολύνσεις, χρήσεις προσθέτων και αντιδράσεις που εμφανίζονται κατά την αποθήκευση, την επεξεργασία και το μαγείρεμα. Επιπλέον, καρκινογόνες ουσίες μπορούν να σχηματιστούν ενδογενώς, από υλικά τροφίμων (Kobets et al., 2022).

Αρκετές σειρές στοιχείων δείχνουν ότι οι διατροφικές συμπεριφορές μπορούν να συμβάλλουν στον κίνδυνο καρκίνου στον άνθρωπο. Ένας τρόπος που συμβαίνει αυτό είναι μέσω της κατάποσης μεταλλαξιογόνων τροφών. Οι σποραδικοί καρκίνοι προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις γονιδίου-περιβάλλοντος όπου το περιβάλλον περιλαμβάνει ενδογενείς και εξωγενείς εκθέσεις. Οι μεταλλαξιογόνοι παράγοντες των τροφίμων προκαλούν διαφορετικούς τύπους βλάβης στο DNA, όπως για παράδειγμα αλλοιώσεις νουκλεοτιδίων και μεγάλες χρωμοσωμικές εκτροπές (Molognoni et al., 2020).

Τα περισσότερα μεταλλαξιογόνα αρχίζουν τη δράση τους σε επίπεδο DNA σχηματίζοντας συμπλέγματα καρκινογόνου-DNA, που προκύπτουν από την ομοιοπολική δέσμευση ενός καρκινογόνου ή μέρους ενός καρκινογόνου σε ένα νουκλεοτίδιο. Ωστόσο, η επίδραση των μεταλλαξιογόνων τροφίμων στην καρκινογένεση μπορεί να τροποποιηθεί από κληρονομικά χαρακτηριστικά, δηλαδή, γονίδια χαμηλής διείσδυσης που επηρεάζουν την έκθεση μεταλλαξιογόνων του DNA μέσω μεταβολικής ενεργοποίησης και αποτοξίνωσης ή κυτταρικών αποκρίσεων στη βλάβη του DNA μέσω μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA ή κυτταρικού θανάτου (De Dea Lindner, 2017).

Υπάρχουν ορισμένοι σαφώς προσδιορισμένοι (π.χ. αφλατοξίνη) και ύποπτοι (π.χ. Ν-νιτροζαμίνες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες ή ετεροκυκλικές αμίνες) μεταλλαξιογόνοι παράγοντες τροφίμων. Τα όργανα-στόχοι για αυτούς τους παράγοντες είναι πολυάριθμα, αλλά υπάρχει εξειδίκευση οργάνου-στόχου για τον καθένα. Ωστόσο, η μεταλλαξιογένεση δεν είναι η μόνη οδός που συνδέει τις διατροφικές εκθέσεις και τους καρκίνους. Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι επιγενετικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA, προκαλούν

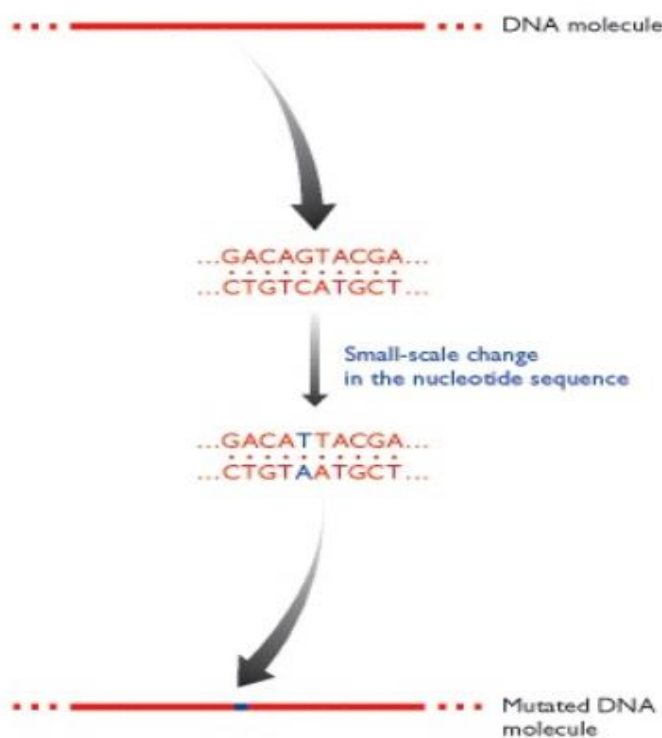
καρκίνο και μπορούν να τροποποιηθούν από διατροφικά συστατικά. Επίσης, η βλάβη του DNA μπορεί να είναι έμμεση προκαλώντας οξειδωτική βλάβη του DNA (Honma et al., 2020).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας για τον προσδιορισμό των μεταλλαξιογόνων χημικών παραγόντων στη διατροφική αλυσίδα.

2 Μεταλλάξεις

2.1 Ορισμός

Ως μετάλλαξη ορίζεται μια αλλαγή στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων μιας περιοχής ενός γονιδιώματος, η οποία συμβαίνει τυχαία από σφάλματα στην αντιγραφή του DNA ή οφείλεται στη δράση μεταλλαξιογόνων παραγόντων, όπως χημικές ουσίες και ακτινοβολία, οι οποίες αντιδρούν με το DNA και αλλάζουν τη δομή των νουκλεοτιδίων (Εικόνα 1) (Brown, 2023).

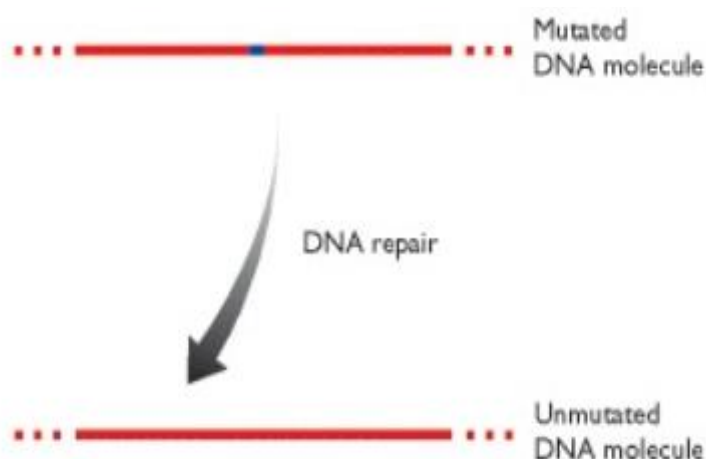


Εικόνα 1: Μετάλλαξη (Brown, 2023).

Οι μεταλλάξεις συνήθως δημιουργούν ένα διαφορετικό φαινότυπο, συμβάλλοντας στη δημιουργία γενετικής ποικιλότητας στον ανθρώπινο πληθυσμό. Παρόλα αυτά, ευθύνονται για πολλές κληρονομικές ασθένειες, αλλά και πολλές μορφές καρκίνου.

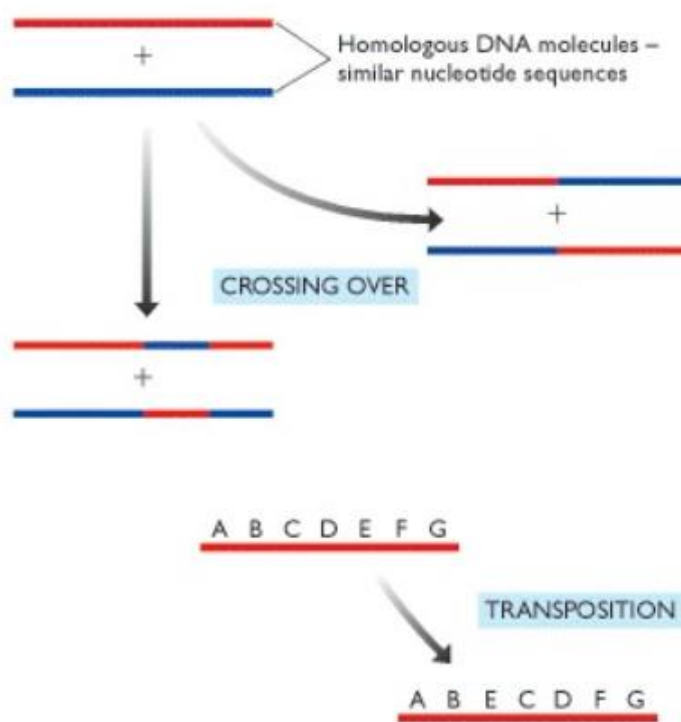
Ο αριθμός των μεταλλάξεων που συμβαίνουν σε ένα κύτταρο ελαχιστοποιείται από τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, με αποτέλεσμα η πιθανότητα λάθους να είναι 1 στα 10

τρισεκατομμύρια. Ορισμένα ένζυμα επιδιόρθωσης εντοπίζουν στο DNA νουκλεοτίδια με ασυνήθιστες δομές, τα οποία αντικαθίστανται πριν από την αντιγραφή, ενώ άλλα ένζυμα επιδιόρθωσης ελέγχουν και διορθώνουν σφάλματα στο νεοσυντιθέμενο DNA (Εικόνα 2) (Brown, 2023).



Εικόνα 2: Επιδιόρθωση του DNA (Brown, 2023).

Μεταλλάξεις προκύπτουν και από τον ανασυνδυασμό, όπου σημειώνεται ανταλλαγή τμημάτων ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης ή με τη μετατόπιση ενός κινητού στοιχείου από τη μία θέση στην άλλη εντός ενός χρωμοσώματος ή μεταξύ χρωμοσωμάτων (Εικόνα 3) (Brown, 2023).



Εικόνα 3: Ανασυνδυασμός (Brown, 2023).

Τόσο η μετάλλαξη όσο και ο ανασυνδυασμός μπορούν να έχουν δραματικές επιπτώσεις στο κύτταρο, καθώς μία μετάλλαξη σε ένα βασικό γονίδιο μπορεί να προκαλέσει το θάνατο του κυττάρου, εάν η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το μεταλλαγμένο γονίδιο είναι ελαττωματική (Brown, 2023).

2.2 Μεταλλαξιογόνοι παράγοντες

Όπως προαναφέρθηκε, ορισμένες μεταλλάξεις γίνονται αυθόρμητα κατά την αντιγραφή και αποφεύγουν τη δράση των DNA πολυμεράσεων.

Άλλες μεταλλάξεις προκύπτουν επειδή ένα μεταλλαξιογόνο έχει αντιδράσει με το DNA, προκαλώντας μια δομική αλλαγή που επηρεάζει την ικανότητα σύζευξης βάσεων του νουκλεοτιδίου. Οι μεταλλάξεις αυτές προκαλούνται από χημικούς και φυσικούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες (Γεωργίου, 2008).

Ως μεταλλαξιογόνο ορίζεται ένας χημικός ή φυσικός παράγοντας που προκαλεί μεταλλάξεις. Ο ορισμός αυτός είναι σημαντικός, διότι διακρίνει τα μεταλλαξιογόνα από άλλους τύπους

περιβαλλοντικών παραγόντων που προκαλούν βλάβες στα κύτταρα με άλλους τρόπους εκτός από την πρόκληση μεταλλάξεων. Τα μεταλλαξιογόνα προκαλούν μεταλλάξεις με τρεις διαφορετικούς τρόπους (Ψαρράκος και συν., 2012):

- Ορισμένοι παράγοντες δρουν ως ανάλογα βάσεων και χρησιμοποιούνται λανθασμένα ως υποστρώματα όταν συντίθεται το DNA.
- Άλλοι παράγοντες αντιδρούν απευθείας με το DNA, προκαλώντας δομικές αλλαγές που οδηγούν σε λανθασμένη αντιγραφή της αλυσίδας κατά την αντιγραφή του DNA.
- Υπάρχουν μεταλλαξιογόνοι παράγοντες οι οποίοι δρουν έμμεσα στο DNA. Δεν επηρεάζουν, δηλαδή, οι ίδιοι τη δομή του DNA, αλλά αντίθετα προκαλούν τη σύνθεση χημικών ουσιών από το ίδιο το κύτταρο, όπως για παράδειγμα τα υπεροξειδία, που έχουν άμεση μεταλλαξιογόνο δράση.

2.2.1 Φυσικοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες

Η ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελεί μεταλλαξιογόνο παράγοντα και έχει διάφορες επιδράσεις στο DNA ανάλογα με το είδος της ακτινοβολίας και την έντασή της. Ορισμένοι τύποι ιοντίζουσας ακτινοβολίας δρουν άμεσα στο DNA, ενώ άλλοι δρουν έμμεσα διεγείροντας το σχηματισμό μορίων, όπως τα υπεροξειδία στο κύτταρο (Γεωργίου, 2008).

Οι βλάβες βάσεων και οι θραύσεις μιας αλυσίδας του DNA επιδιορθώνονται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους. Σε περίπτωση ανεπιτυχούς επιδιόρθωσης όμως μπορεί να προκληθεί αλλαγή στην αλληλουχία των βάσεων του γενετικού υλικού και συνεπώς μετάλλαξη. Οι θραύσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA επιδιορθώνονται πιο δύσκολα και μπορεί να οδηγήσουν σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες, αλλά και σε μετάλλαξη λόγω ελλείμματος βάσεων στην περίπτωση που τμήμα του DNA δεν επανασυνδεθεί και παραμένει ελεύθερο.

Το αποτέλεσμα των μεταλλάξεων ποικίλλει και μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση μιας τροποποιημένης πρωτεΐνης και την αύξηση ή μείωση των επιπέδων μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης (Ψαρράκος και συν., 2012).

Η ιοντίζουσα ακτινοβολία μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες που θα καταστούν εμφανείς στην επόμενη διαίρεση του κυττάρου, στη φάση της μετάφασης. Οι

χρωμοσωματικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν μια ποικιλία ανταλλαγών των θραυσμάτων του DNA μεταξύ διαφορετικών χρωμοσωμάτων, μεταξύ των χρωματίδων του ίδιου χρωμοσώματος ή ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας. Διακρίνονται σε χρωμοσωματικές ανωμαλίες και χρωματιδικές ανωμαλίες, ανάλογα με το εάν η βλάβη συνέβη κατά τη G1 φάση ή τη G2 φάση, αντίστοιχα. Η εμφάνιση άτυπων χρωμοσωμάτων σε κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο (Ψαρράκος και συν., 2012).

Η έκταση της βλάβης των χρωμοσωμάτων που θα εκδηλωθεί κατά την πρώτη μίτωση μετά την ακτινοβολήση είναι ο παράγοντας που συσχετίζεται καλύτερα με τον κυτταρικό θάνατο. Μετά από την εφάπαξ απορρόφηση σημαντικής δόσης ιοντίζουσας ακτινοβολίας που θα προκαλέσει εκτεταμένη βλάβη στο DNA προκαλείται άμεση νέκρωση του κυττάρου (Γεωργίου, 2008).

Χαμηλότερες τιμές δόσης που θα οδηγήσουν σε σχετικά μικρότερη, αλλά μη επιδιορθώσιμη βλάβη του DNA, θα προκαλέσουν άμεση απόπτωση. Η απόπτωση είναι σημαντικός ελεγχόμενος μηχανισμός κυτταρικού θανάτου που θεωρείται μέσο των πολυκύτταρων οργανισμών για την απόρριψη ανεπιθύμητων ή κατεστραμμένων κυττάρων και ορίζεται βάσει αυστηρών μορφολογικών κριτηρίων που περιλαμβάνουν συμπύκνωση της χρωματίνης και συρρίκνωση του πυρήνα, κ.α.

Στην περίπτωση που η δόση της ακτινοβολίας είναι μικρή και προκαλέσει περιορισμένη αρχική βλάβη του DNA, δραστηριοποιούνται μηχανισμοί για την επιβίωση του κυττάρου, όπως ανακοπή του κυτταρικού κύκλου για την αποτελεσματικότερη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών.

Σε χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας, η άμεση ή έμμεση θανάτωση ενός κυττάρου ή και ακόμη ενός μικρού αριθμού κυττάρων σε ένα ιστό ή όργανο του σώματος, δεν αναμένεται να έχει δυσμενή επίπτωση στη λειτουργία του οργάνου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η προκαλούμενη έκπτωση της λειτουργίας αντισταθμίζεται από τον οργανισμό, ενώ τα νεκρά κύτταρα σταδιακά αντικαθίστανται (Γεωργίου, 2008).

Οι βλάβες όμως που οδηγούν σε τροποποίηση του γενετικού υλικού ενός μεμονωμένου σωματικού κυττάρου και δεν επιδιορθώνονται πλήρως είναι πιθανόν να έχουν μακροπρόθεσμα σοβαρή επίπτωση στην υγεία του ατόμου που έχει εκτεθεί στην ακτινοβολία. Στην περίπτωση που η επιδιόρθωση της βλάβης από τους μηχανισμούς του κυττάρου δεν είναι τέλεια, η μερικώς επιδιορθωμένη βλάβη στο DNA αποτελεί μετάλλαξη η οποία μπορεί κατά τον πολλαπλασιασμό να μεταβιβαστεί σε θυγατρικά κύτταρα. Στην

περίπτωση που η βλάβη συντελεί σε αναπαραγωγικό κύτταρο του οργανισμού, τότε αυτή πιθανόν να οδηγήσει σε τροποποίηση του γενετικού κώδικα και να μεταβιβαστεί στους απογόνους. Οι βλάβες που οδηγούν σε τροποποίηση του γενετικού κώδικα καλούνται κληρονομήσιμες βλάβες (Γεωργίου, 2008).

Σε πολύ μεγάλες δόσεις και μεγάλους ρυθμούς δόσεων ακτινοβολίας, η ποιότητα και η έκταση της βλάβης αυξάνεται με αποτέλεσμα τη βαριά δυσλειτουργία και τον άμεσο θάνατο μεγάλου πληθυσμού κυττάρων ενός ιστού ή οργάνου. Οι βλάβες αυτές, μορφολογικές και λειτουργικές, είναι συνήθως εκτεταμένες και προκαλούν την άμεση ή βραχυπρόθεσμη εμφάνιση σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων.

Οι πρώιμες αντιδράσεις ενός ιστού σε δόση ακτινοβολίας μεγαλύτερης από το κατώφλι δόσης, είναι αυτές που εμφανίζονται τις πρώτες ώρες, ημέρες ή και εβδομάδες μετά την ακτινοβολήση. Αυτές μπορεί να είναι φλεγμονώδεις λόγω της απελευθέρωσης διαφόρων κυτταρικών παραγόντων ή να οφείλονται σε καταστροφή του πλακώδους επιθηλίου ή σε μεγάλη απώλεια κυττάρων (Γεωργίου, 2008).

Η πρώτη καταγραφή της χρήσης φυσικών μεταλλαξιογόνων χρονολογείται από τη δεκαετία του 1920 όταν οι επιστήμονες χρησιμοποίησαν ράδιο σε μύγες φρούτων και ανακάλυψαν τις μεταλλαξιογόνους επιδράσεις του (Kharkwal et al., 2004). Πάνω από 70% μεταλλαγμένων ποικιλιών που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα γίνεται με τη χρήση φυσικών μεταλλαξιογόνων (Oladosu et al., 2016).

Από τη δεκαετία του 1950, η ακτινοβολία γάμμα έχει γίνει το πιο δημοφιλές φυσικό μεταλλαξιογόνο. Οι ακτίνες γάμμα χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό σε ποσοστό 64%, ενώ ακολουθούν οι ακτίνες X (Beyaz & Yildiz, 2017). Ο λόγος για την επικρατούσα χρήση του είναι η ευρεία διαθεσιμότητά του και ευελιξία στη χρήση για διαφορετικούς σκοπούς όπως η αναπαραγωγή μεταλλάξεων, η ακτινοβολήση τροφίμων και ιατρικές χρήσεις. Οι ακτίνες γάμμα έχουν το μικρότερο μήκος κύματος από όλα τους φυσικούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες και ως εκ τούτου, διαθέτουν περισσότερα ενέργεια από άλλους φυσικούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες. Οι ακτίνες γάμμα έχουν διαφορετικές πηγές για εμπορική παραγωγή. Παραδείγματα τέτοιων πηγών είναι ραδιοϊσότοπα κοβαλτίου-60 (^{60}Co) και καίσιο-137 (^{137}Cs). Το κάλιο-40 είναι ένα φυσικό ισότοπο που εκπέμπει γάμμα ακτίνες που βρίσκονται στο περιβάλλον (Mba & Shu, 2012).

Τα ^{60}Co και ^{137}Cs έχουν διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα όταν χρησιμοποιείται ως πηγή ακτίνων γάμμα. Το ^{137}Cs έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής οπότε διασπάται σχετικά πιο αργά από ^{60}Co , καθώς το ^{60}Co έχει χρόνο ημιζωής 5,3 χρόνια ενώ

το ^{137}Cs έχει χρόνο ημιζωής 30 χρόνια. Αντίθετα, το ^{137}Cs θα πρέπει να εκτίθεται 4 φορές περισσότερο για να δώσει το ίδιο αποτέλεσμα δόσης του ^{60}Co (Mba & Shu, 2012).

Το 1895, ο Wilhelm Conrad Roentgen ανακάλυψε την ακτινογραφία. Η ακτινογραφία έχει χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό στην κλινική διάγνωση. Οι ακτίνες X είναι γνωστό ότι προέρχονται από ηλεκτρόνια και αυτά τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται ηλεκτρικά σε υψηλό κενό και στη συνέχεια κατευθύνονται προς έναν στόχο, όπως για παράδειγμα ένα φράγμα βολφραμίου, χρυσού ή μολυβδαινίου και παράγεται η ακτινοβολία. Για επαγωγή μετάλλαξης σε καλλιέργειες, χρησιμοποιούνται ακτίνες X με μικρότερα μήκη κύματος καθώς έχουν μεγαλύτερη διείσδυση ικανότητα (Spencer-Lopes et al., 2018).

Το 1934 ο Altenberg ανακάλυψε για πρώτη φορά τη μεταλλαξιογόνο επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η ακτινοβολία UV είναι συστατικό του ηλιακού φωτός και είναι η μεγαλύτερη φυσική πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας. Στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, η υπεριώδης ακτινοβολία εντοπίζεται μεταξύ ακτίνων X και ορατού φωτός, όπου έχει μεγαλύτερο μήκος κύματος από τις ακτίνες X, αλλά μικρότερο μήκος κύματος από το ορατό φως. Ανάλογα με το μήκος κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας, χωρίζεται σε τρεις διαφορετικές σειρές: UV-A, UV-B και UVC.

Η UV-C έχει την υψηλότερη ενέργεια και επηρεάζεται κυρίως από το στρώμα του όζοντος στη στρατόσφαιρα. Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει περιορισμένη διείσδυση στους ιστούς, Ως εκ τούτου, οι χρήσεις της είναι περιορισμένες για ορισμένες εφαρμογές. Ωστόσο, η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται ως μεταλλαξιογόνο σε καλλιέργεια ιστών (Olawuyi et al., 2016; Spencer-Lopes et al., 2018).

Τα νετρόνια βρίσκονται μέσα στον ατομικό πυρήνα και είναι σταθερά μόνο μέσα σε αυτό. Η έξοδος των νετρονίων από τον πυρήνα τους θα ενεργοποιήσει την απελευθέρωση διαφόρων κινητικών ενεργειών. Τα νετρόνια κατηγοριοποιούνται ως αργά (θερμικά) νετρόνια, ενδιάμεσα νετρόνια και γρήγορα νετρόνια, σύμφωνα με την ενέργεια που απελευθερώνεται (Spencer-Lopes et al., 2018). Η ακτινοβολία γρήγορων νετρονίων είναι μια μοναδική προσέγγιση επαγόμενης μεθόδου μεταλλαξιογένεσης μεθόδους, καθώς τα γρήγορα νετρόνια είναι ικανά να διαγράψουν μερικές έως αρκετά εκατομμύρια βάσεις DNA, και επίσης έχουν ως αποτέλεσμα την αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων. Η χρήση τους, όμως, έχει περιοριστεί λόγω έλλειψης τεχνικών δοσιμετρίας (Kumawat et al., 2019).

Τα σωματίδια άλφα, αποτελούνται από δύο πρωτόνια και δύο νετρόνια και εκπέμπονται από ραδιενεργά άτομα όπως το ράδιο και το πλουτώνιο. Ακριβώς όπως τα σωματίδια άλφα, τα σωματίδια βήτα επίσης έχουν μάζα. Τα σωματίδια βήτα εκπέμπονται από ραδιενεργά

ισότοπα όπως ο φώσφορος-32 και θείο-35 είναι ικανά να παράγουν μεταλλάξεις σε φυτά. Η ικανότητα διείσδυσης αυτών των σωματιδίων είναι μικρότερη από αυτή των ακτίνων Χ και ακτίνων γάμμα, αλλά το πρόβλημα της χαμηλής διείσδυσης μπορεί να ξεπεραστεί με την έγχυση αυτών των σωματιδίων απευθείας στα κύτταρα των φυτών. Οι δυσκολίες, όμως, στον υπολογισμό των εσωτερικών δόσεων σωματιδίων βήτα που απαιτείται για την πρόκληση μεταλλάξεων έχουν περιορίσει τη χρήση τους στην αναπαραγωγή μεταλλάξεων (Spencer-Lopes et al., 2018).

2.2.2 Χημικοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι ισχυροί μεταλλαξιογόνοι, καρκινογόνοι και κυτταροτοξικοί παράγοντες. Παραδόξως, οι κυτταροτοξικές ιδιότητες ορισμένων από τις ενώσεις αυτές αξιοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στη θεραπεία του καρκίνου (Bignold, 2009). Μερικοί αλκυλιωτικοί παράγοντες, όπως ο μεθυλ-δότης S-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM), ο οποίος παρά το ότι εμπλέκεται σε περίπου 40 μεταβολικές αντιδράσεις σε θηλαστικά είναι ένας αδύναμος παράγοντας μεθυλίωσης ικανός να σχηματίζει προσαγωγές σε DNA, σχηματίζονται ενδογενώς ως φυσικά προϊόντα του οργανισμών. Μία σημαντική πηγή περιβαλλοντικής έκθεσης των ανθρώπων σε αλκυλιωτικές ενώσεις, ιδιαίτερα στις καρκινογόνες 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (NNK), 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη (NNAL) και η N'-νιτροσονορνικοτίνη (NNN), είναι ο καπνός του τσιγάρου (Bignold, 2009).

Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι ηλεκτρόφιλες ενώσεις με συγγένεια για πυρηνόφιλα κέντρα σε οργανικά μακρομόρια στα οποία συνδέονται ομοιοπολικά. Στο DNA αυτές οι ενώσεις σχηματίζουν ομοιοπολικά συνδεδεμένα αλκυλικά προϊόντα προσθήκης στις βάσεις και στους φωσφοδιεστέρες.

Τα χημικά μεταλλαξιογόνα στις πρώτες μελέτες ονομάστηκαν «ραδιομιμητικά» λόγω της ομοιότητας των αποτελεσμάτων τους σε σύγκριση με τις επιπτώσεις της ακτινοβολίας στα βιολογικά συστήματα (Bignold, 2009).

3 Μεταλλαξιογόνα στα τρόφιμα

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Καθώς το ενδιαφέρον για την πιθανή σχέση μεταξύ διατροφής και καρκίνου έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, το ίδιο έχουν αυξηθεί και οι προσπάθειες να προσδιοριστεί εάν μπορεί να υπάρχουν χημικές καρκινογόνες ουσίες στα τρόφιμα. Από τη δεκαετία του 1970, ήταν ήδη γνωστό ότι η παρουσία συμπληρωμάτων διατροφής σε επεξεργασμένα ή κονσερβοποιημένα τρόφιμα θα μπορούσε να προκαλέσει καρκίνους (Fiolet et al., 2018; Kim et al., 2019). Τα τρόφιμα περιέχουν έναν τεράστιο αριθμό ξεχωριστών χημικών συστατικών. Οι περισσότερες από αυτές τις χημικές ουσίες υπάρχουν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά εάν υπάρχουν ισχυρές καρκινογόνες ουσίες, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε τρόφιμα που καταναλώνονται συχνά, προκαλούν ανησυχία (Merugu et al., 2023).

Η έναρξη της καρκινογόνου διαδικασίας μπορεί να περιλαμβάνει μια αλλαγή στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου. Επομένως, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι οι χημικές ουσίες που αλλάζουν το DNA, δηλαδή που προκαλούν μεταλλάξεις, θα έχουν μεγάλη πιθανότητα να είναι εκκινητές καρκινογένεσης. Το γεγονός ότι το DNA είναι χημικά παρόμοιο σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς σημαίνει ότι ακόμη και χημικές ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις στα βακτήρια αποτελούν πιθανές καρκινογόνες ουσίες στον άνθρωπο (Dong et al., 2020).

Η συσχέτιση μεταξύ μεταλλαξιογένεσης και καρκινογένεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατηγορία της χημικής ουσίας που ερευνάται. Για ορισμένες κατηγορίες χημικών καρκινογόνων ουσιών, όπως οι αρωματικές αμίνες, οι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και οι άμεσοι αλκυλιωτικοί παράγοντες, φαίνεται να υπάρχει υψηλός βαθμός συσχέτισης. Ωστόσο, είναι δύσκολο να ανιχνευθεί η μεταλλαξιογόνος δράση ορισμένων τύπων καρκινογόνων ουσιών, ιδιαίτερα ενώσεων υψηλής χλωρίωσης. Επομένως, πρέπει να πραγματοποιείται προσεκτική εξέταση της δομής και των πιθανών μεταβολιτών της υπό δοκιμή χημικής ουσίας, όταν αξιολογείται η σημασία μιας θετικής ή αρνητικής δοκιμής μεταλλαξιογένεσης.

Η χρησιμότητα των δοκιμών μεταλλαξιογένεσης στον εντοπισμό χημικών καρκινογόνων ουσιών και η επακόλουθη απομάκρυνση αυτών των ενώσεων από προϊόντα στα οποία

εκτίθενται οι άνθρωποι μπορεί να επεξηγηθεί από πολλά ιστορικά παραδείγματα. Αυτά περιλαμβάνουν τα συντηρητικά τροφίμων 2-(2-φουρυλ)-3-(5-νιτροφουρυλ)ακρυλαμίδιο (AF-2), το οποίο χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην Ιαπωνία, το επιβραδυντικό φλόγας χημικό τρις(2, 3-διβρωμοπροπυλ)φωσφορικό άλας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε παιδικά ενδύματα ύπνου στις Ηνωμένες Πολιτείες και το συστατικό βαφής μαλλιών 2, 4-διαμινοανισόλη. Το γεγονός ότι οι απλές δοκιμές μεταλλαξιογένεσης προέβλεψαν σωστά τη δυνατότητα καρκινογένεσης αυτών των χημικών ουσιών ενισχύει την πεποίθησή ότι τα σωστά ερμηνευμένα δεδομένα μεταλλαξιογένεσης μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών (Gibis et al., 2016).

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη από τις δοκιμασίες μεταλλαξιογένεσης είναι η δοκιμή ενσωμάτωσης πλακών σαλμονέλας, κοινώς γνωστή ως δοκιμή Ames. Σε αυτή τη δοκιμασία, μια χημική ουσία ελέγχεται για την ικανότητά της να προκαλεί μεταλλάξεις σε διαφορετικά στελέχη ενός βακτηρίου (*Salmonella typhimurium*). Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα και μεταλλαξιογόνα δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το DNA. Απαιτούν αλλοίωση από ένζυμα για να ενεργοποιηθούν. Αυτή η διαδικασία «μεταβολικής ενεργοποίησης» συνήθως δεν μπορεί να επιτευχθεί από ένζυμα που υπάρχουν στα βακτήρια. Ως εκ τούτου, στο τεστ *Salmonella*, ένα εκχύλισμα συκωτιού θηλαστικού (συνήθως από αρουραίο) προστίθεται για να παρέχει τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη μεταβολική ενεργοποίηση (Park et al., 2015).

Πολλά μεταλλαξιογόνα συστήματα δοκιμών εκτός του *S. typhimurium* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο χημικών ουσιών. Οι δοκιμασίες μεταλλαξιογένεσης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χημικών ουσιών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη τόσο των μεταλλαξιογόνων παραγόντων, τα οποία ενισχύουν τη μεταλλαξιογόνο δράση άλλων χημικών ουσιών, όσο και των αναστολέων της μεταλλαξιογένεσης (Park et al., 2015).

Η γνώση ότι μια χημική ουσία είναι ένας μεταλλαξιογόνος παράγοντας ή ένας αναστολέας της μεταλλαξιογένεσης μπορεί να παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της μεταβολικής μοίρας και των γενετικών αλληλεπιδράσεων των χημικών ουσιών. Ειδικές *in vitro* επιδράσεις των τροποποιητών της μεταλλαξιογένεσης, όπως η αναστολή ενός συγκεκριμένου μεταβολικού ενζύμου, για παράδειγμα, μπορεί να μην λειτουργούν ή μπορεί ακόμη και να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα σε ζωντανούς οργανισμούς. Ωστόσο, όπου παρατηρείται τροποποίηση της μεταλλαξιογένεσης, ο μηχανισμός θα πρέπει να διευκρινιστεί (Merugu et al., 2023).

Όπως προαναφέρθηκε, τα μεταλλαξιογόνα είναι χημικά μόρια που μπορούν να αλλάξουν τη διάταξη του DNA αντιδρώντας με πουρίνες και πυριμιδίνες, προκαλώντας περαιτέρω βλάβη στη δομή του DNA μέσω αλλαγής βάσης, μετάλλαξης μετατόπισης πλαισίου και τελικά να οδηγήσει στην κατάρρευση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Τα μεταλλαξιογόνα μπορούν επίσης να προκαλέσουν χρωμοσωμική εκτροπή και ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων και έτσι η εμφάνιση μεταλλαξιογόνων στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση. Αυτή η καρκινογόνος επίδραση των μεταλλαξιογόνων που εισέρχονται στο σώμα μέσω των προϊόντων διατροφής έχει απασχολήσει σοβαρά την επιστημονική κοινότητα. Τα κυριότερα μεταλλαξιογόνα στα τρόφιμα απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τα κυριότερα μεταλλαξιογόνα στα τρόφιμα.

Είδος Μεταλλαξιογόνου	Κύριο τρόφιμο στο οποίο ανιχνεύεται	Κύριο βιολογικό αποτέλεσμα	Δράση	Αναφορά
Παράγωγα N-Nitroso	Τυρί, μύρα και κρέατα συντηρημένα με νιτρικά-νιτρώδη	Προκαλούν καρκίνο της ρινικής κοιλότητας, του οισοφάγου και του στομάχου σε διάφορα ζωικά μοντέλα.	Δρουν ως αλκυλιωτικοί παράγοντες, αλλοιώνοντας το DNA γεγονός που τελικά οδηγεί σε καρκίνο.	Miller and Miller (1986)
Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες	Τρόφιμα στα κάρβουνα (κρέας, ψάρι)	Προκαλούν καρκινογένεση στον άνθρωπο.	Προκαλούν μεταλλάξεις σε ογκογονίδια και γονίδια καταστολής.	Sugimura et al. (1979)
Ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες	Καμένα τρόφιμα (κρέας, ψάρι)	Προκαλούν καρκίνο του μαστού, του παχέος εντέρου, του ορθού, του στομάχου, του οισοφάγου και του πνεύμονα.	Έχουν πολύπλοκες δομές με αρωματικούς δακτυλίους που περιέχουν άζωτο και σχηματίζονται μέσω χημικών αντιδράσεων μεταξύ αμινοξέων, κρεατινίνης και	Takayama et al. (1984)

			σακχάρων κατά το μαγείρεμα.	
Πρόσθετα τροφίμων	Κρέας, μοσχάρι, χοιρινό	Προκαλούν προβλήματα υγείας, όπως άσθμα, καρδιακές παθήσεις, καρκίνο και παχυσαρκία.	Τα πρόσθετα τροφίμων μπορεί να είναι προκαλούν μεταβολικές διαταραχές που οδηγούν σε καρκινογένεση.	Sambu et al. (2022)
Κατάλογος ειδικών μεταλλαξιογόνων ουσιών που βρέθηκαν από συγκεκριμένα επεξεργασμένα τρόφιμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας				
MeIQx, PhIP, DiMeIQx	Κοτόπουλο και χοιρινό στη σχάρα, ψάρια ψητά, μπιφτέκια κρέατος	Προκαλούν καρκίνο του πεπτικού συστήματος και καρκίνο του αναπαραγωγικού συστήματος στον άνθρωπο.	Προκαλούν βλάβες στο DNA που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου.	Tikkanen et al. (1993)
NDMA	Καπνιστό και αποξηραμένο στη φωτιά κρέας, μπέικον, μπύρα	Προκαλεί καρκίνο του στομάχου, του ήπατος, της ουροδόχου κύστης και του προστάτη.	Μετατρέπεται στην αμιδική του μορφή και δρα ως ισχυρός αλκυλιωτικός παράγοντας.	Cross and Sinha (2004)
Βενζοπυρένιο	Κρέας στη σχάρα, χάμπουργκερ και κοτόπουλο	Προκαλεί καρκίνο του πνεύμονα και του δέρματος.	Παράγει αντιδραστικά ειδών οξυγόνου και προκαλεί μιτοχονδριακή βλάβη.	Cross and Sinha (2004)
DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, AaC, MeAaC	Ωμό μοσχαρίσιο συκώτι, αρνίσιο νεφρό, μοσχαρίσια γλώσσα	Προκαλούν βλάβη στο DNA και χρωμοσωμικές εκτροπές.	Αντιδρούν με την κρεατίνη, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα σε υψηλές θερμοκρασίες 150–300 °C λόγω της αντίδρασης Maillard.	Khan et al. (2009)

Η εμφάνιση μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής μπορεί να είναι φυσική ή λόγω συνθηκών μαγειρέματος ή επεξεργασίας. Πολλά χημικά συστατικά εμπλέκονται στην

επεξεργασία προϊόντων διατροφής, όπως συντηρητικά, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες. Τα συντηρητικά είναι γνωστό ότι επιβραδύνουν ορισμένες χημικές αντιδράσεις των τροφίμων, ενισχύοντας έτσι τις αντιμικροβιακές ιδιότητες (Wójciak et al., 2014). Ωστόσο, περιστασιακά η παρουσία νιτρωδών ως συντηρητικών τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μεταλλαξιογόνων ενώσεων (Molognoni et al., 2020).

Επομένως, τέτοια συντηρητικά θα πρέπει είτε να χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα σε ελάχιστες συγκεντρώσεις είτε σε συνδυασμό με άλλα συντηρητικά έτσι ώστε να μην προκαλούν βλάβη κατά την κατανάλωση. Ακατάλληλες συγκεντρώσεις και συνδυασμοί θα μπορούσαν να οδηγήσουν στο σχηματισμό μεταλλαξιογόνων ενώσεων όπως το Αιθυλνιτρολικό Οξύ (ENA) και η 2-Methyl-1,4-Dinitro pyrrole (DNMP) (Pérez- Prior et al., 2009).

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένο κίνδυνο διαφόρων καρκίνων κατά την κατανάλωση ακατάλληλα μαγειρεμένων ή επεξεργασμένων τροφίμων, κυρίως κρέατος (Bartkiene et al., 2017; Molognoni et al., 2019). Αυτά τα μεταλλαξιογόνα (ENA, DNMP) έδειξαν τον διαφορετικό βαθμό αντιδραστικότητας και αποδείχθηκαν μεταλλαξιογόνα ή καρκινογόνα όταν δοκιμάστηκαν έναντι των στελεχών TA98 και TA100 της *Salmonella typhimurium* με ή χωρίς τη χρήση ενεργοποίησης μέσω μεταβολισμού (Motta et al., 2020). Διάφοροι αρωματικοί παράγοντες τροφίμων που μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις ή καρκινογόνες επιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή εκχυλισμάτων ζώου βόειου κρέατος και αρωμάτων κρέατος. Η παραγωγή τέτοιων αρωματικών παραγόντων εξαρτάται από την ποικιλία του κρέατος, τα φυτικά υλικά και τελικά τις συνθήκες επεξεργασίας (Shabbir et al., 2014).

Η ζύμωση, η οποία είναι ένα απαραίτητο βήμα στην επεξεργασία των προϊόντων διατροφής που βοηθά στην απόκτηση καλύτερων προϊόντων διατροφής όσον αφορά την ασφάλεια, το ενισχυμένο άρωμα και έχει επίσης ευρεία αποδοχή. Στα προϊόντα τροφίμων επεξεργασίας κρέατος διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη μικροοργανισμών, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, βοηθά στον έλεγχο της διαδικασίας ζύμωσης. Αυτό παρείχε τη βάση για την εφαρμογή μικροοργανισμών στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων για τον έλεγχο πολλών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλαξιογόνων σε επεξεργασμένα ή κονσερβοποιημένα τρόφιμα (De Dea Lindner, 2017).

Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι διάφορες χημικές ουσίες που εμπλέκονται στα επεξεργασμένα τρόφιμα αντιδρούν μεταξύ τους κάτω από διάφορες συνθήκες και συνθήκες για να προκαλέσουν αρκετούς μεταλλαξιογόνους ή καρκινογόνους παράγοντες (Molognoni et al., 2020).

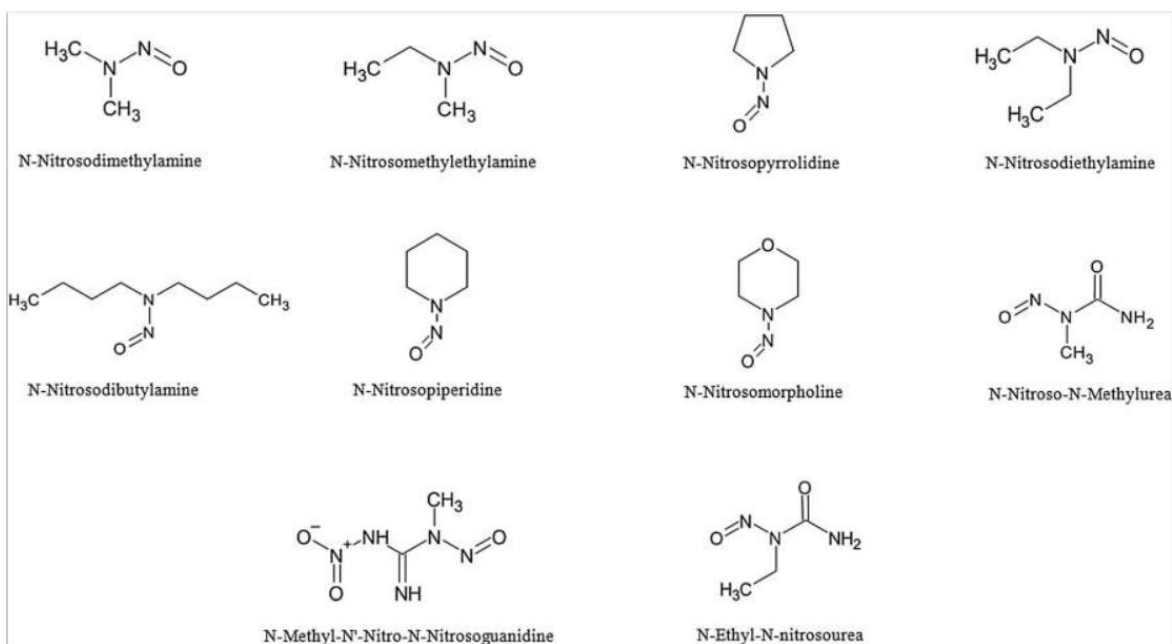
3.2 Μεταλλαξιογόνα Επεξεργασμένων Τροφίμων

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων, αρκετοί μεταλλαξιογόνοι παράγοντες εισχωρούν στο τελικό προϊόν διατροφής είτε σκόπιμα είτε κατά λάθος. Η παρουσία αυτών των μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής προκαλεί σοβαρή ανησυχία, διότι οδηγεί σε μεταλλαξιογένεση ακολουθούμενη από καρκινογένεση.

3.2.1 Τα παράγωγα N-Nitroso

Τα παράγωγα N-Nitroso αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματικά μεταλλαξιογόνα όταν μετατρέπονται στην αμιδική τους μορφή, επειδή μπορούν στη συνέχεια να δράσουν ως ισχυροί αλκυλιωτικοί παράγοντες. Η αμιδική μορφή των παραγώγων N-Nitroso μπορεί να σχηματιστεί με αντίδραση μεταξύ νιτρικών και αμινών ή αμιδίων προϊόντων διατροφής που σχηματίζονται με καταβολισμό πρωτεϊνών ή οποιωνδήποτε άλλων συστατικών τροφίμων. Η N-Nitrosodimethylamine είναι ένα παράγωγο N-Nitroso που βρίσκεται συνήθως σε τυριά, μύρα και κρέατα διατηρημένα με νιτρικά νιτρώδη μαζί με άλλα ισχυρά μεταλλαξιογόνα όπως η N-νιτροσοπυρρολιδίνη και η N-νιτροσοπιπεριδίνη (Εικόνα 4) (Miller and Miller, 1986).

Οι νιτροζαμίνες υπάρχουν σε πολλά γεωργικά προϊόντα, θαλασσινά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας και προϊόντα κρέατος, επεξεργασμένα κρέατα, έλαια, μαργαρίνη, πάστα σόγιας, σάλτσα σόγιας, καρυκεύματα, σάλτσα και αλκοολούχα ποτά (Park et al., 2015).



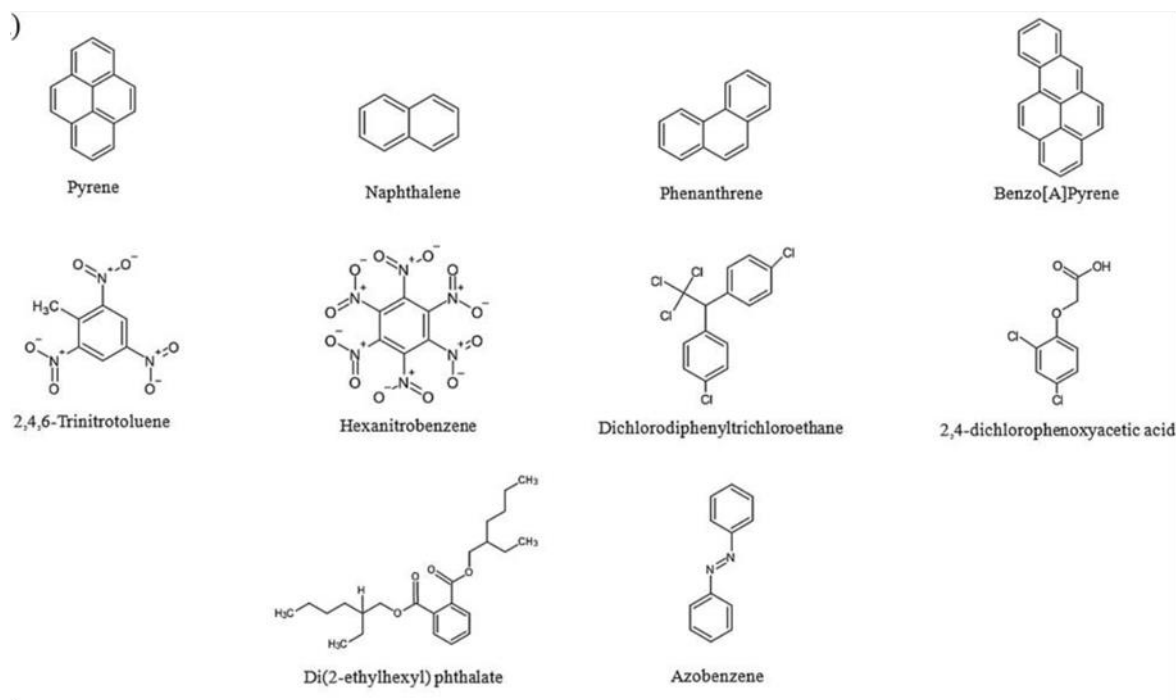
Εικόνα 4: Δομές διαφόρων μεταλλαξιογόνων παραγόντων N-Nitroso (Park et al., 2015).

Τα παράγωγα N-Nitroso βρίσκονται σε επεξεργασμένο καπνιστό ή αποξηραμένο στη φωτιά κρέας επειδή σε υψηλή θερμοκρασία το άζωτο που υπάρχει στην περιβάλλουσα ατμόσφαιρα μετατρέπεται σε οξειδίο του αζώτου που ακολουθείται από αντίδραση με αμίνες που υπάρχουν στο κρέας. Το ανθρώπινο σώμα απορροφά σχεδόν 36–140 μg παραγόντων N-Nitroso κυρίως μέσω του μπίκον και της μύρας. Μια μελέτη ανέφερε τον σχηματισμό «νιτροσοαζετιδινο-2-καρβοξυλικού οξέος» στο στομάχι εάν η διατροφή περιέχει περισσότερα νιτρώδη και ελεύθερα αμινοξέα. Αυτά τα παράγωγα N-Nitroso που είναι γνωστό ότι προκαλούν καρκίνο ή μετάλλαξη μπορούν να ελεγχθούν περιορίζοντας τις ευνοϊκές συνθήκες για τον σχηματισμό τους στα τρόφιμα (Park et al., 2015).

3.2.2 Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) εμφανίζονται σε προϊόντα διατροφής που υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω ψησίματος με κάρβουνο, επειδή μπορεί να λιώσει το λίπος που υπάρχει στα τρόφιμα (όπως το κρέας ή το ψάρι) (Hamidi et al., 2016). Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας ορισμένα συστατικά δημιουργούν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να παράγουν σημαντική ποσότητα PAHs στα τρόφιμα (Wang et al., 2019).

Η χρήση βρώσιμων ελαίων μπορεί επίσης να προσθέσει PAHs σε υλικά τροφίμων που αντικατοπτρίζουν τη μέθοδο σχηματισμού τους (Ingenbleek et al., 2019). Μπορεί επίσης να προστεθεί στο τελικό προϊόν διατροφής λόγω της πυρόλυσης λαδιού, ξύλου, σκουπιδιών και άνθρακα (Kim et al., 2021). Παρατηρείται άμεση προσθήκη μέσω του αέρα, του νερού και του εδάφους (Göker et al., 2021).



Εικόνα 5: Δομές διαφόρων μεταλλαξιγόνων Πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (Shukla et al., 2014).

Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας τα PAHs μετατρέπονται σε βενζοπυρένιο το οποίο μπορεί να επηρεάσει το DNA σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης μαζί του (Εικόνα 5) (Sugimura et al., 1979). Η εμφάνιση βενζοπυρενίου σε επεξεργασμένα τρόφιμα ως προς τη συγκέντρωση είναι χαμηλή (1–10 ng/g) (Miller and Miller 1986). Ωστόσο, αναφέρθηκε ότι το βρασμένο σε κάρβουνο βοδινό κρέας μπορεί να περιέχει έως και 8-50 µg/kg (Krone and Iwaoka, 1983).

Σύμφωνα με τους Lijinsky and Shubik (1964) το βόειο κρέας που ψήνεται στη σχάρα σε φωτιά με αέριο ή κάρβουνο περιείχε μια ποικιλία πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs). Το βενζο[α]πυρένιο βρέθηκε σε μπριζόλα ψημένη σε κάρβουνο σε επίπεδα έως και 8 µg/kg (Lijinsky και Shubik, 1964). Η πηγή των PAH που προέρχονται

από το ψήσιμο με κάρβουνο ήταν ο καπνός που παράγεται όταν το πυρολυμένο λίπος έσταζε από το κρέας στα αναμμένα κάρβουνα. Έτσι, τα κρέατα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά απέκτησαν τα υψηλότερα επίπεδα αυτών των χημικών ουσιών. Όταν το κρέας μαγειρεύτηκε με τρόπο που απέτρεπε την έκθεση στον καπνό που παράγεται από το λίπος που στάζει, αυτή η πηγή μόλυνσης είτε μειώθηκε είτε εξαλείφθηκε (Lijinsky and Ross, 1967).

Οι PAHs έχουν επίσης βρεθεί σε μια ποικιλία καπνιστών τροφίμων και στον καβουρδισμένο καφέ. Τα λαχανικά μπορούν εύκολα να μολυνθούν από PAH από τον αέρα, το έδαφος ή το νερό. τα ψάρια και τα οστρακοειδή μπορούν να αφομοιώσουν τέτοιες χημικές ουσίες από το θαλάσσιο περιβάλλον τους (Howard and Fazio, 1980). Ωστόσο, εκτός εάν τα λαχανικά ή τα θαλασσινά λαμβάνονται από πολύ μολυσμένα περιβάλλοντα, η κύρια πηγή PAHs θα είναι το κάπνισμα ή το μαγείρεμα των τροφίμων.

Για να προσδιοριστεί ποιο συστατικό ή συστατικά των ψαριών και του κρέατος συμβάλλουν στη μεταλλαξιογόνο δράση που παράγεται από το μαγείρεμα, έχουν διεξαχθεί μελέτες για να εξεταστεί η μεταλλαξιογένεση των συμπυκνωμάτων καπνού από διάφορες ουσίες. Ο καπνός που λαμβάνεται από πυρολυμένες πρωτεΐνες, όπως η λυσοζύμη και η ιστόνη, βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνος στο *S. typhimurium*, ενώ τα συμπυκνώματα καπνού από πυρολυμένο DNA, RNA, άμυλο ή φυτικό έλαιο ήταν ελάχιστα μεταλλαξιογόνα. Η πυρόλυση της τρυπτοφάνης είχε ως αποτέλεσμα περισσότερη μεταλλαξιογόνο δράση από οποιοδήποτε άλλο κοινό αμινοξύ, αλλά σχεδόν όλα τα αμινοξέα που δοκιμάστηκαν απέδωσαν κάποια μεταλλαξιογόνο δράση όταν πυρολύθηκαν (Nagao et al., 1977).

Οι αναλύσεις έχουν επιβεβαιώσει ότι τουλάχιστον μερικά από τα μεταλλαξιογόνα προϊόντα πυρόλυσης αμινοξέων υπάρχουν σε μαγειρεμένα τρόφιμα. Για παράδειγμα, το Trp-P-1 έχει βρεθεί στο «πολύ καλά» ψητό μοσχαρίσιο κρέας και το Glu-P-2 σε ψητές σουπιές, αν και αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% της συνολικής μεταλλαξιογόνου δράσης στα εκχυλίσματα αυτών των τροφίμων. Ομοίως, οι σαρδέλες ψημένες σε σκούρο καφέ χρώμα περιέχουν Trp-P-1, Trp-P-2 και Phe-P-1, αν και το μεγαλύτερο μέρος της μεταλλαξιογόνου δράσης σε αυτά τα ψάρια οφειλόταν στην παρουσία άλλων ενώσεων (Yamaizumi et al., 1980). Κομμάτια βόειου κρέατος ή κοτόπουλου ψημένα στη σχάρα σε υψηλή φλόγα αερίου περιείχαν AaC και MeAaC (Matsumoto et al., 1981).

Σε ψητές σαρδέλες απομονώθηκαν τα μεταλλαξιογόνα 2-αμινο-3-μεθυλιμιδαζο[4, 5-f]κινολίνη (IQ) και η 2-αμινο-3, 4-διμεθυλιμιδαζο[4, 5-f]κινολίνη (MeIQ), τα οποία είναι εξαιρετικά ισχυρά μεταλλαξιογόνα του στελέχους *S. typhimurium* TA98 (Kasai et al., 1980).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση σε HCAs και PAH μπορεί να προκαλέσει καρκίνο σε ζωικά μοντέλα (Sugimura et al., 2004). Σε πολλά πειράματα, τα τροφικά που τρέφονταν με δίαιτα συμπληρωμένη με HCA ανέπτυξαν όγκους του μαστού, του παχέος εντέρου, του ήπατος, του δέρματος, των πνευμόνων, του προστάτη και άλλων οργάνων (Ito et al., 1991). Τρωκτικά που τρέφονταν με PAH ανέπτυξαν επίσης καρκίνους, συμπεριλαμβανομένης της λευχαιμίας και των όγκων του γαστρεντερικού σωλήνα και των πνευμόνων. Ωστόσο, οι δόσεις των HCA και των PAH που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μελέτες ήταν πολύ υψηλές, ισοδύναμες με χιλιάδες φορές τις δόσεις που θα καταλάωνε ένα άτομο σε μια κανονική διατροφή.

Μελέτες πληθυσμού δεν έχουν τεκμηριώσει οριστική σχέση μεταξύ της έκθεσης σε HCA και PAH από μαγειρεμένα κρέατα και καρκίνου στον άνθρωπο. Μια δυσκολία με τη διεξαγωγή τέτοιων μελετών είναι ότι μπορεί να είναι δύσκολο να προσδιοριστεί το ακριβές επίπεδο έκθεσης σε HCA και/ή PAH που λαμβάνει ένα άτομο από μαγειρεμένα κρέατα. Αν και τα διατροφικά ερωτηματολόγια μπορούν να παρέχουν καλές εκτιμήσεις, ενδέχεται να μην καταγράφουν όλες τις λεπτομέρειες σχετικά με τις τεχνικές μαγειρέματος που είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκθεσης σε HCA και PAH. Επιπλέον, η ατομική διακύμανση στη δραστηριότητα των ενζύμων που μεταβολίζουν τα HCA και τους PAH μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές έκθεσης, ακόμη και μεταξύ των ατόμων που προσλαμβάνουν την ίδια ποσότητα αυτών των ενώσεων. Επίσης, οι άνθρωποι μπορεί να έχουν εκτεθεί σε PAH από άλλες περιβαλλοντικές πηγές, όχι μόνο από τρόφιμα.

Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει λεπτομερή ερωτηματολόγια για να εξετάσουν την κατανάλωση κρέατος και τις μεθόδους μαγειρέματος των συμμετεχόντων (Abid et al., 2014). Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η υψηλή κατανάλωση καλοψημένου, τηγανητού ή ψητού κρέατος συσχετίστηκε με αυξημένους κινδύνους καρκίνου του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του προστάτη (Cross et al., 2005; Sinha et al., 2009). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έχουν βρει συσχέτιση με κινδύνους καρκίνου του παχέος εντέρου ή του προστάτη (Bylsma et al., 2015).

Το 2015, μια ανεξάρτητη ομάδα εμπειρογνομόνων που συγκλήθηκε από τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έκρινε ότι η κατανάλωση κόκκινου κρέατος είναι «πιθανώς καρκινογόνος για τον άνθρωπο», βασισμένη σε μεγάλο βαθμό σε δεδομένα από τις επιδημιολογικές μελέτες και στην ισχυρή στοιχειά από μηχανιστικές μελέτες. Ωστόσο, η IARC δεν κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι HCA και οι PAH συσχετίστηκαν με τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου (Le et al., 2016).

Επί του παρόντος, καμία ομοσπονδιακή οδηγία δεν αφορά την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν HCA και PAH. Το Παγκόσμιο Ταμείο Έρευνας για τον Καρκίνο/Αμερικανικό Ινστιτούτο Έρευνας για τον Καρκίνο εξέδωσε μια έκθεση το 2007 με διατροφικές οδηγίες που συνιστούσαν τον περιορισμό της κατανάλωσης κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος. Ωστόσο, δεν δόθηκαν συστάσεις για τα επίπεδα HCA και PAH στο κρέας (Knize and Felton, 2005).

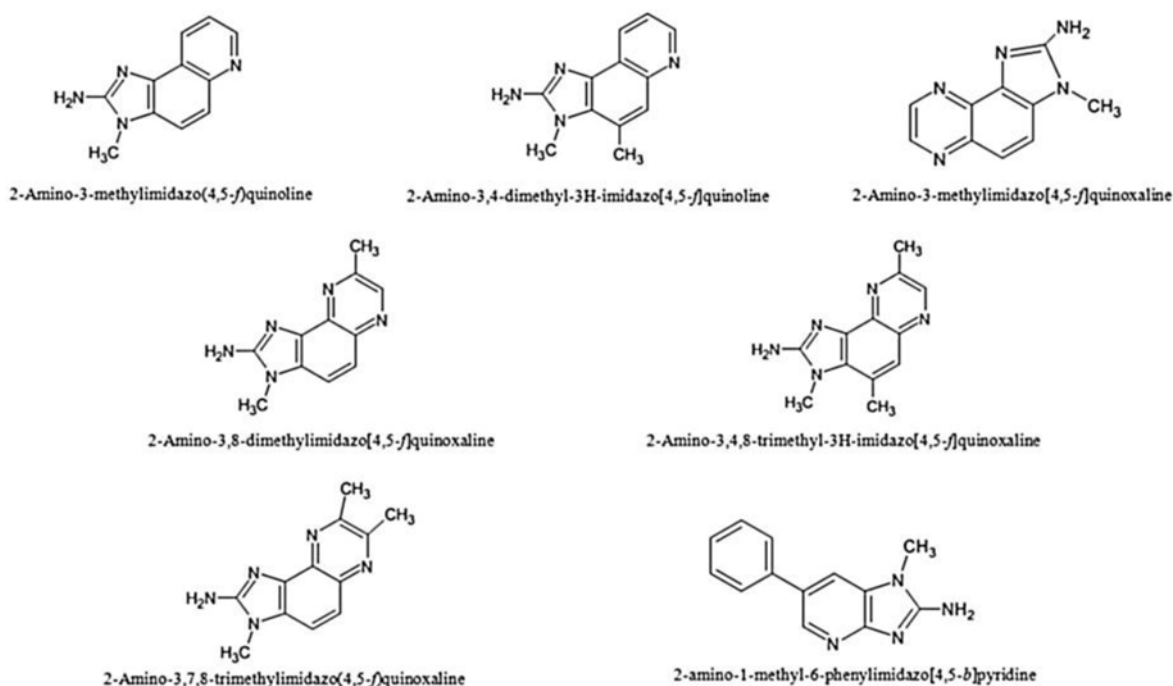
Παρόλο που δεν υπάρχουν συγκεκριμένες οδηγίες για την κατανάλωση HCA/PAH, τα ενδιαφερόμενα άτομα μπορούν να μειώσουν την έκθεσή τους χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους μαγειρέματος. Η αποφυγή της άμεσης έκθεσης του κρέατος σε ανοιχτή φλόγα ή μια ζεστή μεταλλική επιφάνεια και η αποφυγή παρατεταμένων χρόνων μαγειρέματος, ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του σχηματισμού HCA και PAH.

Η χρήση φούρνου μικροκυμάτων για το μαγείρεμα του κρέατος πριν από την έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί επίσης να μειώσει σημαντικά τον σχηματισμό HCA μειώνοντας τον χρόνο που το κρέας πρέπει να έρθει σε επαφή με υψηλή θερμοκρασία για να τελειώσει το μαγείρεμα (Knize and Felton, 2005).

3.2.3 Ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες

Τα πιο αξιοσημείωτα μεταλλαξιογόνα είναι οι ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες (Εικόνα 6). Αυτά ταξινομούνται περαιτέρω σε δύο κατηγορίες, τύπου IQ και τύπος μη IQ. Ο τύπος IQ είναι εκείνοι των οποίων οι αμινο-λειτουργικές ομάδες είναι ανθεκτικές στην επεξεργασία νιτρώδων, ενώ ο τύπος μη-IQ είναι εκείνοι των οποίων οι αμινο-λειτουργικές ομάδες δεν είναι ανθεκτικές στην επεξεργασία με νιτρώδη (Tsuda et al., 1985).

Τα μεταλλαξιγόνα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι εξαιρετικά σταθερά. Ως εκ τούτου, παραμένουν στα προϊόντα διατροφής για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα (Wakabayashi et al., 1992). Η αμινομεθυλμιδαζοφουροπυριδίνη, μια πολύ γνωστή ετεροκυκλική αμίνη, αποτελείται από οξυγόνο και μπορεί να εμφανιστεί σε 4 ισομερή λόγω της τοποθέτησης του οξυγόνου και της N-μεθυλ-ομάδας (Knize et al., 1990).



Εικόνα 6: Δομές διαφόρων μεταλλαξιγόνων ετεροκυκλικών αμινών (Wakabayashi et al., 1992).

Οι ενώσεις όπως η κρεατίνη, τα αμινοξέα και τα σάκχαρα αντιδρούν μεταξύ τους σε υψηλές θερμοκρασίες 150–300 °C λόγω της αντίδρασης Maillard (Dong et al., 2020). Αν και μια αυξημένη θερμοκρασία δεν έχει καμία άμεση επίδραση, η διάρκεια της εφαρμοζόμενης θερμοκρασίας είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό HAA. Η δραστηριότητα του νερού και το pH είναι επίσης εξίσου υπεύθυνα για το σχηματισμό HAA κατά τη διαδικασία μαγειρέματος (Oz, 2021). Μια μελέτη αποκάλυψε επίσης ότι οι πολικοί τύποι HAA όπως η ιμιδαζοκινολίνη και η ιμιδαζοκινοξαλίνη παράγονται σε θερμοκρασία περίπου 150–250 °C. Στους 250 °C λόγω πυρόλυσης αμινοξέων, σχηματίζονται μη πολικοί τύποι HAA (διπυριδοϊμιδαζόλη ή πυριδοϊνδόλη) λόγω πυρόλυσης αμινοξέων (Barzegar et al., 2019). Σχηματίζεται μια θερμοκρασία μεταξύ 100 και 300 °C τύπου IQ (Θερμικό HAA) και

σχηματίζεται θερμοκρασία πάνω από 300 °C τύπου μη IQ (πυρολυτικό ΗΑΑ). Για παράδειγμα, μια μελέτη αποκάλυψε ότι περισσότερο ΗΑΑ σχηματίζεται στην επιφάνεια του κρέατος παρά στο εσωτερικό μέρος. Ο πιθανός λόγος θα μπορούσε να είναι η μεταφορά νερού και διαλυμένων ουσιών στην επιφάνεια λόγω τριχοειδούς δράσης (Alaejos and Afonso, 2011).

Ο σχηματισμός ΗΑΑ μπορεί να ελεγχθεί αυξάνοντας την περιεκτικότητα σε ζάχαρη των τροφίμων (Meurillon and Engel, 2016). Αυτές οι ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες επηρεάζουν επίσης το DNA σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης με αυτό.

Λόγω της θερμότητας, συμβαίνει πυρόλυση με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών. Αμινοξέα όπως η τρυπτοφάνη, το γλουταμινικό οξύ και η φαινυλαλανίνη δημιουργούν ισχυρούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες κατά την πυρόλυση. Trp-P-1 (3-αμινο-1,4-διμεθυλ-5H-πυριδο[4,3-b]ινδόλη), Trp-P-2(3-αμινο-1-μεθυλ-5H-πυριδο[4,3]ινδόλη), Glu-P-1(2-αμινο-6-μεθυλδιπυριδο-[1,2-a:3',2'd]ιμιδαζόλη) και Glu-P-2 (2-αμινοδιπυριδο-[1,2-a:3',2'd]ιμιδαζόλη) είναι μεταλλαξιογόνα που σχηματίζονται μέσω πυρόλυσης τρυπτοφάνης και γλουταμινικού οξέος αντίστοιχα. Οι ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες παράγονται επίσης από γεύσεις κρέατος και εκχυλίσματα βόειου κρέατος που είναι γνωστά ως «επεξεργασμένες γεύσεις τροφίμων» (Stavric et al., 1997).

Οι πιο κοινές ετεροκυκλικές αμίνες στο μαγειρεμένο κρέας είναι οι 2-αμινο-3,8-διμεθυλιμιδαζο [4,5-f]-κινολαλίνη (MeIQx), 2-αμινο-1-μεθυλ-6-φαινυλιμιδαζο[4,5-b]πυριδίνη (PhIP); DiMeIQx (Συνδυασμός 2-αμινο-3,4,8-τριμεθυλιμιδαζο[4,5-f]κινολαλίνης (4,8-DiMeIQx) και 2-αμινο-3,7,8-τριμεθυλιμιδαζο[4,5-f]κινολαλίνης (7,8-DiMeIQx). Η ημερήσια κατανάλωση PhIP είναι 43–110 ng/ημέρα και αυτή του MeIQx είναι 14–47 ng/ημέρα (Cantwell et al., 2004). Αυτές οι ουσίες είναι υπεύθυνες για την καρκινογένεση του καρκίνου του εντέρου (Ito et al., 1997).

3.3 Πρόσθετα τροφίμων

Τα πρόσθετα αρώματος και γεύσης είναι απαραίτητα για τη βιομηχανία λόγω του χαμηλού κόστους, των αισθητηριακών λειτουργιών που παρέχονται και του χρόνου σε βιομηχανοποιημένα και ημιβιομηχανικά τρόφιμα (Santos et al., 2020). Έχουν μια σύνθετη σύνθεση που αποτελείται από διαλύτες, αρωματικά, συντηρητικά, βαφές, γλυκαντικά,

ενισχυτικά γεύσης και οξέα τροφίμων και ταξινομούνται στη βιομηχανία σε φυσικά και συνθετικά (Sales et al., 2018).

Σε διεθνές επίπεδο, οι κανόνες χρήσης για αρωματικά μικροσυστατικά ορίζονται από τους οργανισμούς ασφάλειας τροφίμων Food and Agriculture Organization (FAO) και Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) (Sales et al., 2018).

Επιστημονικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα μικροσυστατικά αρώματος και γεύσης, όταν καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες ή/και για μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να είναι επιβλαβή για το πεπτικό σύστημα και να προκαλέσουν ερεθισμό και ναρκωτικές επιδράσεις στα θηλαστικά (Ramesh and Muthuraman, 2018). Ωστόσο, οι υπηρεσίες ασφάλειας τροφίμων αναφέρουν έλλειψη πληροφοριών σχετικά με τις πιθανές κυτταροτοξικές, γονιδιοτοξικές και μεταλλαξιογόνες ιδιότητες αυτών των προσθέτων (Sales et al., 2018).

Η αξιολόγηση τέτοιων παραμέτρων είναι σημαντική για την καθοδήγηση της κατασκευής ή/και της τροποποίησης καθιερωμένων προτύπων για τη χρήση/πρόσληψη προσθέτων τροφίμων και για τον προσδιορισμό του Δείκτη Ημερήσιας Πρόσληψης (IDA) για τα μικροσυστατικά (Santos et al., 2020). Επιπλέον, είναι απαραίτητο να διαπιστωθεί τοξικότητα σε κυτταρικό επίπεδο των διαφόρων κατηγοριών προσθέτων τροφίμων, λόγω της γνώσης ότι ορισμένοι τύποι καρκίνου οφείλονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενδογενών και περιβαλλοντικών παραγόντων, ο πιο αξιοσημείωτος από τους οποίους είναι η διατροφή, ιδίως όταν περιέχουν πολλά επεξεργασμένα τρόφιμα (Koca et al., 2015).

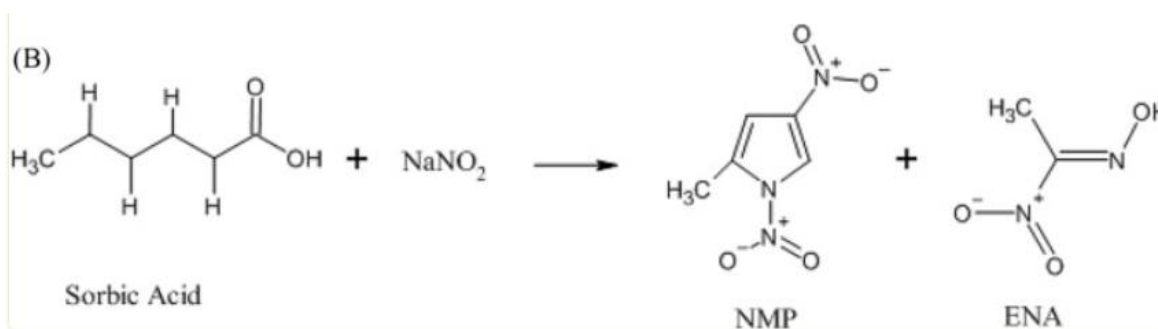
Στη Βραζιλία, τα συνθετικά αρώματα τροφίμων βρίσκονται σε καταστήματα ποικιλίας και σούπερ μάρκετ, ωστόσο, πωλούνται χωρίς όρια ποσότητας, σε πολύ προσιτό κόστος και χωρίς έλεγχο των πραγματικών συγκεντρώσεων που χρησιμοποιούνται σε επεξεργασμένα τρόφιμα (Santos et al., 2020). Μεταξύ των αρωμάτων τροφίμων είναι τα αρώματα και τα αρωματικά συνθετικά πρόσθετα σοκολάτας, τα οποία στη χώρα αυτή, εκτός από τη βιομηχανία, χρησιμοποιούνται ευρέως σε μικρά εργοστάσια τροφίμων, αρτοποιεία και ζαχαροπλαστεία, στην παραγωγή γλυκών τροφίμων των πιο ποικίλων τύπων που καταναλώνονται ευρέως από παιδιά και ενήλικες.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η χημική σύνθεση των υγρών αρωμάτων σοκολάτας, γενικά, αποτελείται από αιθυλική αλκοόλη (διαλύτης), αιθυλική βανίλια (αρωματικό), κόμμι ξανθάνης (ομογενοποιητής), βενζοϊκό οξύ και διακετυλο 2,3 - βουταδιόνη (αραιωτικά), βενζοϊκό κάλιο και σορβικό κάλιο (συντηρητικά), γλουταμινικό μονοκάλιο και

διγλουταμινικό μαγνήσιο (αρώματα), σιρόπι καλαμποκιού, κιτρικό οξύ και τρυγικό οξύ (οξέα τροφίμων) και καραμέλα IV (χρωστική ουσία) (Brasil, 2007). Η διαφοροποίηση μεταξύ των εμπορικών σημάτων/κατασκευαστών αρωμάτων σοκολάτας οφείλεται κυρίως στη συγκέντρωση αιθυλικής βανίλιας που, μαζί με τα συστατικά γλουταμινικού μονοκαλίου και διγλουταμινικού μαγνησίου στη σύνθεση, χαρακτηρίζει τη σοκολατένια γεύση του τροφίμου (Sherwood and Boitano, 2016).

Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι οι χημικές ενώσεις που υπάρχουν στα πρόσθετα σοκολάτας προκάλεσαν τοξικότητα σε κυτταρικό επίπεδο σε διαφορετικές βιοδοκιμές (Silva et al., 2017; Sales et al., 2018). Έτσι, καθίσταται σημαντικό να αξιολογούνται εμπορευματοποιημένα διαλύματα γεύσης σοκολάτας για να ελεγχθεί η κυτταροτοξική, γονοτοξική και μεταλλαξιογόνος τους δυνατότητα.

Τα πρόσθετα τροφίμων αποδείχθηκαν ισχυρά και αποτελεσματικά μεταλλαξιογόνα. Το σορβικό οξύ και το νιτρώδες νάτριο ήταν γνωστά και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα συντηρητικά τροφίμων. Αρκετές οργανικές χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται σε παρασκευάσματα τροφίμων όπως το αζοδικαρβοναμίδιο, το καρδινένιο, η κυστεΐνη, το ερυθροβικό οξύ, το οξικό φουρφουρύλιο, η μαλτόλη, το 3-προπυλιδενοφθαλίδιο, η ρουτίνη και η 2,4,5-τριυδροξυβουτυροφαινόνη, που είναι αδύναμες μεταλλαξιογόνες ενώσεις. Το σορβικό οξύ χρησιμοποιήθηκε στα μαγειρεμένα τρόφιμα για να αυξήσει τη διάρκεια ζωής τους, να προστατεύσει τα τρόφιμα από μικροβιακή μόλυνση και να αυξήσει την ποιότητα των τροφίμων. Αλλά αργότερα διαπιστώθηκε ότι το σορβικό οξύ αντιδρά με το νιτρώδες νάτριο με αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταλλαξιογόνων ενώσεων όπως το ENA και το NMP. Αυτές οι δύο ενώσεις, το ENA και το DNMP, αποδείχθηκε ότι είναι ισχυροί αλκυλιωτικοί παράγοντες που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή του DNA (Pérez-Prior et al., 2010).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση του ENA (Pérez-Prior et al., 2009).

Τα πρόσθετα τροφίμων χρησιμοποιούνται για διάφορους λόγους, για να αυξήσουν τη γεύση των τροφίμων, να διατηρήσουν τα τρόφιμα για μεγάλη διάρκεια και να βελτιώσουν την υφή των τροφίμων. Ένα πολύ γνωστό και ευρέως χρησιμοποιούμενο πρόσθετο τροφίμων είναι το «2-(2-φουρυλ)-3-(5-νιτρο-2-φουρυλ)ακρυλαμίδιο (AF 2)», μια εξαιρετικά μεταλλαξιογόνος ένωση που έχει χρησιμοποιηθεί σε προϊόντα διατροφής ως συντηρητικό.

3.4 Μεταλλαξιογόνες ουσίες προσυσκευασμένων τροφίμων

Αρκετά συστατικά που ήταν απαραίτητα για την επεξεργασία τροφίμων αποδείχθηκαν στην πραγματικότητα μεταλλαξιογόνες, αλλά και καρκινογόνες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτά τα συστατικά είναι μη τοξικά όταν υπάρχουν μεμονωμένα και σε κανονικές συνθήκες, αλλά μπορεί να είναι επιβλαβή όταν συνδυάζονται με άλλα συστατικά ή δυσμενείς συνθήκες μαγειρέματος ή επεξεργασίας, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταλλαξιογόνων μορφών.

Μια τέτοια μεταλλαξιογόνος ένωση που αναγνωρίστηκε ως καρκινογόνος σε τρόφιμα που είναι ήδη μαγειρεμένα ήταν οι ετεροκυκλικές αμίνες (Felton et al., 1992; Wakabayashi et al., 1992). Μια μελέτη ανέφερε επίσης ότι η καραμέλα, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική ουσία σε ποτά, μείγματα σάλτσας, σούπες κ.λπ., έχει επίσης μεταλλαξιογόνο δράση (Krone and Iwaoka, 1983). Η παρουσία λιπαρών οξέων στα τρόφιμα όταν θερμαίνονται μαζί με την κρεατίνη αποδείχθηκε ότι αυξάνει τη μεταλλαξιογένεση των προϊόντων διατροφής (Yoshida and Okamoto, 1980). Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα λιπίδια και τα αποικοδομημένα ενδιάμεσα τους που υπάρχουν στα τρόφιμα συμβάλλουν σε περισσότερη μεταλλαξιογένεση από οποιοδήποτε άλλο συστατικό των θρεπτικών συστατικών των τροφίμων.

Επίσης, αναφέρθηκε ότι η φωσφορική κρεατίνη και η τρυπτοφάνη ήταν επίσης υπεύθυνες για την επιτάχυνση του μεταλλαξιογόνου αποτελέσματος (Taylor et al., 1985). Με τον ίδιο τρόπο, η προσθήκη ιόντων αμμωνίου σε προϊόντα διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες αυξάνει επίσης τη μεταλλαξιογένεση (Iwaoka et al., 1981). Ως εκ τούτου, αναφέρθηκε ότι το επίπεδο του καρβονυλίου, καθώς και των αζωτούχων συστατικών στο

δείγμα τροφίμου, ήταν υπεύθυνο για το επίπεδο μεταλλαξιογένεσης στα τελικά προϊόντα διατροφής (Krone et al., 1986).

Επομένως, όλα τα κύρια θρεπτικά συστατικά των τροφίμων (υδατάνθρακες, αμινοξέα, λίπη και λιπίδια) μπορεί να δημιουργήσουν μεταλλαξιογόνες ενώσεις όταν αντιδρούν μεταξύ τους σε οποιαδήποτε συγκεκριμένη κατάσταση. Στην περίπτωση των αμινοξέων, κυρίως η κρεατινίνη και η τρυπτοφάνη εμπλέκονται στον σχηματισμό μεταλλαξιογόνων ενώσεων. Στη μελέτη των Nerín et al. (2016) παρατηρήθηκε η είσοδος επιβλαβών ουσιών λόγω της πλαστικής συσκευασίας που χρησιμοποιείται σε προϊόντα τροφίμων για μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.5 Μεταλλαξιογόνα που σχηματίζονται από κρέας σε χαμηλότερες θερμοκρασίες

Το απλό βράσιμο του ζωμού βόειου κρέατος σε θερμοκρασίες περίπου 100°C έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό βακτηριακών μεταλλαξιογόνων (Vithayathil et al., 1978). Στην πραγματικότητα, ο σχηματισμός μεταλλαξιογόνων στο ζωμό βοείου κρέατος έχει ανιχνευθεί σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο 68°C (Dolara et al., 1979). Το τηγάνισμα των ψαριών στους 190°C παράγει μεταλλαξιογόνο δράση (Krone and Iwaoka, 1981). Μεταλλαξιογόνος δράση προκύπτει επίσης όταν τα χάμπουργκερ ψήνονται, ακόμη και όταν η θερμοκρασία της επιφάνειας δεν υπερβαίνει τους 130°C (Weisburger and Spingarn, 1979).

Ένα μέρος της μεταλλαξιογόνου δράσης που σχηματίζεται από θερμαινόμενο εκχύλισμα βοείου κρέατος ή από τηγανητό βόειο κρέας βρέθηκε ότι οφείλεται σε μια χημική ουσία με μοριακό βάρος 198, η οποία έχει πλέον αποδειχθεί ότι είναι IQ (Kasai et al., 1980). Το MeIQx, μια άλλη ετεροκυκλική μεταλλαξιογόνος ένωση που δεν έχει ταυτοποιηθεί ως αμινοξύ ή πρωτεϊνικό πυρόλυμα, έχει επίσης βρεθεί στο τηγανητό βόειο κρέας (Kasai et al., 1981). Ωστόσο, η θερμοκρασία τηγανίσματος δεν προσδιορίστηκε. Οι Weisburger and Spingarn (1979) πρότειναν ότι αυτό το μεταλλαξιογόνο, που σχηματίζεται στο βόειο κρέας σε μέτριες θερμοκρασίες, μπορεί να προκύψει από μια αντίδραση αμαύρωσης μεταξύ των σακχάρων και των αμινών παρά από την πυρόλυση των πρωτεϊνών.

3.6 Σχηματισμός μεταλλαξιογόνου που περιλαμβάνει υδατάνθρακες

Στη μελέτη των Spingarn et al. (1980) παρατηρήθηκε ότι το τηγάνισμα των πατατών και το ψήσιμο του ψωμιού έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταλλαξιογόνου δράσης. Το «μαύρισμα» των τροφίμων προκύπτει από την αντίδραση των αμινών με τα σάκχαρα. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο συστήματος για την αντίδραση αμαύρωσης, οι Spengarn και Garvie (1979) βρήκαν ότι η μεταλλαξιογόνος δράση εμφανίστηκε όταν οποιοδήποτε από τα έξι διαφορετικά σάκχαρα, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης, υποβλήθηκαν σε αναρροή με υδροξείδιο του αμμωνίου. Αρκετά εργαστήρια έχουν βρει ότι η θέρμανση ενός μίγματος του αμινοξέος λυσίνη με γλυκόζη σε θερμοκρασίες μεταξύ 100°C και 121°C έχει ως αποτέλεσμα προϊόντα που είναι μεταλλαξιογόνα (Powrie et al., 1981). Η αύξηση της μεταλλαξιογόνου δράσης με το χρόνο παραλληλίστηκε με την αύξηση του καφέ χρώματος (Shinohara et al., 1980). Η μεταλλαξιογόνος δράση θα μπορούσε επίσης να παραχθεί χρησιμοποιώντας ορισμένα αμινοξέα εκτός της λυσίνης ή χρησιμοποιώντας φρουκτόζη αντί γλυκόζης (Powrie et al., 1981).

Οι χρωμοσωμικές εκτροπές είναι αλλοιώσεις στις δομές των χρωμοσωμάτων που μπορούν να παρατηρηθούν μέσω μικροσκοπίου. Τέτοιες εκτροπές δεν είναι πιθανό να είναι κληρονομήσιμες. Η σημασία της επαγωγής τους σε κύτταρα *in vitro* δεν είναι ξεκάθαρη, ιδιαίτερα για χημικές ουσίες που δεν μπορούν να προκαλέσουν κληρονομικές μεταλλάξεις ή *in vivo* χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

3.7 Φυτικά Φλαβονοειδή

Μεταξύ των πιο διαδεδομένων από τα γνωστά φυσικά μεταλλαξιογόνα που είναι φυσιολογικά συστατικά πολλών τροφίμων είναι τα μεταλλαξιογόνα φλαβονοειδή. Μεταξύ των αγλυκόνων φλαβονόλης που έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταλλαξιογόνες για το *S. typhimurium* είναι η κερκετίνη, η καμφερόλη και η γαλανγκίνη (Bjeldanes and Chang, 1977). Τόσο η κερσετίνη όσο και η καμφερόλη έχει αναφερθεί ότι προκαλούν μεταλλάξεις στα κύτταρα κινέζικου χάμστερ V79 και κληρονομικές μεταλλάξεις (υπολειπόμενοι θανατηφόροι που συνδέονται με το φύλο) στη μύγα *Drosophila melanogaster* (Watson, 1982).

Σε ορισμένα μεταλλαξιγόνα φυτικά προϊόντα που καταναλώνονται από τον άνθρωπο, οι μεταλλαξιγόνες ουσίες που απομονώθηκαν αναγνωρίστηκαν ως φλαβονοειδή. Για παράδειγμα, το μεγαλύτερο μέρος της μεταλλαξιγόνου δράσης ενός όξινου υδρόλυσης του πράσινου τσαγιού θα μπορούσε να οφείλεται σε τρία φλαβονοειδή: την καμφερόλη, την κερσετίνη και τη μυρικετίνη (Uyeta et al., 1981). Τα φλαβονοειδή kaempferol και isorhamnetin βρέθηκαν να είναι υπεύθυνα για το μεγαλύτερο μέρος της μεταλλαξιγόνου δράσης που βρέθηκε στα ιαπωνικά τουρσιά (Takahashi et al., 1979). Το μεταλλαξιγόνο στο μπαχαρικό του σουμάκ βρέθηκε ότι είναι η κερσετίνη (Seino et al., 1978).

Στη μελέτη του ο Brown (1980) ανέφερε ότι οι βρώσιμες μερίδες των περισσότερων φυτικών τροφίμων περιέχουν φλαβονοειδή γλυκοσίδες, ιδιαίτερα κερκετίνη και καμφερόλη. Εκτίμησε ότι η μέση ημερήσια πρόσληψη φλαβονοειδών στη δίαιτα των ΗΠΑ είναι περίπου 1 g και ότι η ημερήσια πρόσληψη μεταλλαξιγόνων φλαβονοειδών γλυκοσιδών μπορεί να είναι ισοδύναμη με περίπου 50 mg κερκετίνης. Περίπου το 25% της πρόσληψης φλαβονοειδών προέρχεται από τσάι, καφέ, κακάο, μαρμελάδες φρούτων, κόκκινο κρασί, μπύρα και ξύδι (Brown, 1980).

Λόγω της μεταλλαξιγόνου δράσης και της ευρείας κατανομής ορισμένων φλαβονοειδών, ιδιαίτερα της κερκετίνης, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η δυνατότητα καρκινογένεσης αυτών των χημικών ουσιών. Επί του παρόντος, τα δεδομένα σχετικά με την καρκινογένεση της κερκετίνης είναι αντιφατικά. Στη μελέτη των Pamukcu et al. (1980) αναφέρθηκε ότι η προσθήκη 0,1% κερσετίνης στη διατροφή αλμπίνο Νορβηγικών αρουραίων για 58 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα την πρόκληση όγκων στο επιθήλιο του εντέρου και της ουροδόχου κύστης. Ωστόσο, όταν οι Saito et al. (1980) τάισαν 2% κερκετίνη σε ποντίκια ddY καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των ζώων, δεν βρήκαν σημαντική αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του όγκου.

Οι φλαβονόλες υπάρχουν συχνά στα φυτά με τη μορφή γλυκοσιδών. Για παράδειγμα, η ρουτίνη είναι ένας γλυκοζίτης της κερκετίνης που μπορεί να υδρολυθεί για να απελευθερώσει κερκετίνη με ενζυματική ή χημική επεξεργασία. Μια τέτοια υδρόλυση, με τη μεσολάβηση των εντερικών βακτηρίων, συμβαίνει όταν οι γλυκοσίδες καταναλώνονται σε τρόφιμα. Η ρουτίνη και άλλοι γλυκοσίδες μεταλλαξιγόνων φλαβονοειδών έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταλλαξιγόνοι στο *S. typhimurium* μετά από θεραπεία με εκχυλίσματα που περιέχουν γλυκοσιδάση της μούχλας *Aspergillus niger* (Nagao et al., 1981).

3.8 Μεταλλαξιογόνος δραστηριότητα σε εκχυλίσματα τροφίμων και ποτών

Αρκετές ουσίες τροφίμων έχουν αναφερθεί ότι περιέχουν μεταλλαξιογόνο δράση, αν και οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες που ευθύνονται για αυτή τη δραστηριότητα δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί. Για παράδειγμα, ο καφές είναι μεταλλαξιογόνος στο στέλεχος TA100 της *Salmonella typhimurium*, είτε παρασκευάζεται, είτε είναι στιγμιαίος είτε χωρίς καφεΐνη. Αν και η καφεΐνη έχει αναφερθεί ότι είναι μεταλλαξιογόνος στα βακτήρια, δεν θα μπορούσε να ευθύνεται για τη μεταλλαξιογένεση του καφέ, καθώς ο ντεκαφεϊνέ καφές ήταν εξίσου μεταλλαξιογόνος με τον κανονικό καφέ και η ίδια η καφεΐνη δεν ανιχνεύτηκε ως μεταλλαξιογόνο υπό τις συνθήκες δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν (Nagao et al., 1979).

Το μαύρο τσάι, το πράσινο τσάι και το καβουρδισμένο τσάι ήταν μεταλλαξιογόνα στο στέλεχος TA100 *S. typhimurium* απουσία πρόσθετων ενζύμων. Όταν προστέθηκαν εκχυλίσματα *Aspergillus niger* ή ανθρώπινα κόπρανα που περιέχουν ένζυμα ικανά να υδρολύουν γλυκοσίδες, τσάι έγινε μεταλλαξιογόνος στο στέλεχος TA98 του *S. typhimurium*. Η όξινη υδρόλυση του πράσινου ή μαύρου τσαγιού προκάλεσε επίσης την απελευθέρωση μεταλλαξιογόνου δράσης. Οι φλαβονόλες κερσετίνη, καμπφερόλη και μυρισετίνη έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι ευθύνονται για το μεγαλύτερο μέρος της μεταλλαξιογόνου δράσης ενός προϊόντος υδρόλυσης οξέος του πράσινου τσαγιού (Uyeta et al., 1981). Ο χυμός σταφυλιού βρέθηκε επίσης να είναι μεταλλαξιογόνος στο στέλεχος TA98, αν και μόνο όταν δοκιμάστηκε με εκχυλίσματα κοπράνων που περιέχουν γλυκοσιδάσες (Tamura et al., 1980).

Μεταλλαξιογόνος δράση έχει επίσης ανιχνευθεί σε συμπυκνώματα 17 από τα 27 κοινώς καταναλωθέντα κινεζικά αλκοολούχα ποτά, ως επί το πλείστον που έχουν υποστεί ζύμωση από ρύζι, κολλώδες ρύζι και κριθάρι (Lee and Fong, 1979). Τα μεταλλαξιογόνα αποστάγματα ήταν αυτά που είχαν αποσταχθεί μόνο μία φορά ή στα οποία είχαν προστεθεί βότανα ή κρέας. Τα εξατμισμένα υπολείμματα από 12 από τα 13 ούισκι Ιαπωνίας, Σκωτίας και Βόρειας Αμερικής βρέθηκαν να περιέχουν μεταλλαξιογόνο δράση. Αυτή η δραστηριότητα δεν απαιτούσε την προσθήκη γλυκοσιδασών ή ενζύμων θηλαστικών. Ήταν μεταλλαξιογόνο στο στέλεχος TA100 του *S. typhimurium*, αλλά όχι στο TA98,

υποδεικνύοντας ότι επάγει αντικατάσταση ζεύγους βάσεων και όχι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου. Μερικά γαλλικά μπράντι και κονιάκ μήλου ήταν επίσης μεταλλαξιογόνα όταν συμπυκνώθηκαν ή κλασματοποιήθηκαν (Nagao et al., 1981).

3.9 Μεταλλαξιογόνες ουσίες από τις συσκευασίες τροφίμων

3.9.1 Αλκυλιωμένα Ιμιδαζόλια

Η 2-μεθυλιμιδαζόλη (2-MI) και η 4-μεθυλιμιδαζόλη (4-MI) σχηματίζονται κατά τη ζύμωση και το μαγείρεμα με αμμωνία απλών σακχάρων (Chan, 2004; Wu et al., 2015). Έχουν αναγνωριστεί ως υποπροϊόντα σε τρόφιμα που περιλαμβάνουν χρωστικές καραμέλας (Κλάση III και IV) και σιρόπια με χρώμα καραμέλας, κόλα, μελάσα με αμμωνία, κρασί, σάλτσα Worcestershire και σάλτσα σόγιας (Vollmuth, 2018). 4-MI έχει επίσης ανιχνευθεί στο γάλα από αγελάδες που τρέφονται με αμμωνία ζωοτροφών (Muller et al., 1998). Τα αλκυλιωμένα ιμιδαζόλια μπορούν επίσης να σχηματιστούν κατά τη θερμική επεξεργασία φυσικών συστατικών που δεν περιέχουν χρωματισμό καραμέλας, επομένως μέχρι 466 μg/kg 4-MI και έως 135 μg/kg 2-MI ανιχνεύθηκαν στο ψημένο κριθάρι, τη βύνη και τη σκόνη κακάο (Mottier et al., 2011).

Οι 2-MI και 4-MI ήταν καρκινογόνες σε μελέτες με τρωκτικά. Συγκεκριμένα, ο 2-MI προκάλεσε υπερτροφία θυλακικών κυττάρων του θυρεοειδούς σε ποντίκια και υπερπλασία σε αρουραίους σε 15 ημέρες (Chan et al., 2008). Σε μια μελέτη 2 ετών με ζωοτροφές, υπήρχαν κάποιες ενδείξεις καρκινογόνου δράσης του 2-MI σε αρσενικούς αρουραίους με βάση αυξημένες συχνότητες νεοπλασμάτων θυλακικών κυττάρων του θυρεοειδούς αδένος και σαφείς ενδείξεις καρκινογόνου δραστηριότητας σε θηλυκούς αρουραίους με βάση αυξημένες συχνότητες θυλακικών κυττάρων του θυρεοειδούς αδένος νεοπλάσματα. Επιπλέον, αυξημένες συχνότητες ηπατοκυτταρικού αδενώματος σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους μπορεί να σχετίζονται με την έκθεση.

Σε βιοδοκιμασίες NTP, 4-MI που χορηγήθηκαν σε ομάδες αρσενικών και θηλυκών ποντικών σε δίαιτα που περιείχε 312 ppm (που ισοδυναμεί με 80 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα) και μεγαλύτερη για 106 εβδομάδες, αύξησε τα περιστατικά πνευμονικού

κυψελιδικού/βρογχιολικού αδενώματος σε όλες τις δοσολογημένες ομάδες γυναίκες, κυψελιδικό/βρογχιολικό καρκίνωμα στους άνδρες χορηγήθηκε 1250 ppm, και κυψελιδικό/βρογχιολικό αδένωμα ή καρκίνωμα (σε συνδυασμό) σε άρρενες που τρέφονται με 1250 ppm και σε γυναίκες που τρέφονται με 625 και 1250 ppm.

Η συνολική EDI για 4-MI για τον πληθυσμό των ΗΠΑ κυμαίνεται από 0,13 έως 0,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα, με τα ανθρακούχα ποτά τύπου κόλα να είναι τα υψηλότερα στην κατανάλωση (Folner et al., 2015). Η μέση διατροφική πρόσληψη για 4-MI στην Ευρώπη εκτιμήθηκε ότι είναι μεταξύ 0,4 έως 3,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα (Fierens et al., 2018). Το EDI 4-MI από χρώματα καραμέλας κυμαίνεται από 6 έως 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα για την Κλάση III και 7 έως 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα για την Κλάση IV (Vollmuth, 2018).

Δεν βρέθηκαν επιδημιολογικές μελέτες που να αξιολογούν τον κίνδυνο καρκίνου στον άνθρωπο για 2-MI ή 4-MI (IARC, 2013).

Το IARC ταξινομεί τα 2-MI και 4-MI ως πιθανώς καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Το JECFA περιορίζει το ενώ το επίπεδο 4-MI σε 200 και 250 mg/kg σε χρώματα καραμέλας Κατηγορίες III και IV, αντίστοιχα. Η EFSA προτείνει ADI 300 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για όλες τις κατηγορίες καραμελέ χρώματος. Η FDA και η EFSA κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε επίπεδα που υπάρχουν σε χρώματα καραμέλας το 4-MI δεν αναμένεται να είναι ανησυχητικό για την ανθρώπινη υγεία (Vollmuth, 2018).

3.9.2 Φουράνιο

Το φουράνιο (οξακυκλοπενταδιένιο) είναι ένας πτητικός ρύπος που σχηματίζεται σε ορισμένα τρόφιμα κατά τη διάρκεια τεχνικών θερμικής επεξεργασίας, όπως η κονσερβοποίηση και το βάζο, όπου το φουράνιο δεν μπορεί να διαφύγει (Yaylaya, 2006). Οι πηγές για τον σχηματισμό του φουρανίου περιλαμβάνουν την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ή την αποσύνθεση υδατανθράκων ή αμινοξέων, αλλά η σχετική συμβολή αυτών των διεργασιών στα πραγματικά τρόφιμα δεν είναι γνωστή (Moro et al., 2012; EFSA CONTAM Panel, 2017). Η ανάλυση περίπου 300 δειγμάτων τροφίμων βρήκε επίπεδα φουρανίου που κυμαίνονται από μη ανιχνεύσιμα (κάτω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου) έως 175 ppb (FDA, 2009). Ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα βρέθηκαν σε τρόφιμα που

ψήνονται (π.χ. καφές, κακάο, ξηροί καρποί, φρυγανισμένο ψωμί, ποπ κορν) ή θερμαίνονται σε κλειστά δοχεία.

Σε μελέτες καρκινογένεσης σε τρωκτικά, το φουράνιο, που χορηγήθηκε σε αρουραίους με καθετηριασμό σε δόση 8 mg/kg σωματικού βάρους, 5 ημέρες/εβδομάδα, προκάλεσε υψηλή συχνότητα χολαγγειοκαρκινωμάτων τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά, σε χαμηλότερες δόσεις αυτοί οι όγκοι επανακλασθέντες (IARC, 1995; Von Tungeln et al., 2017).

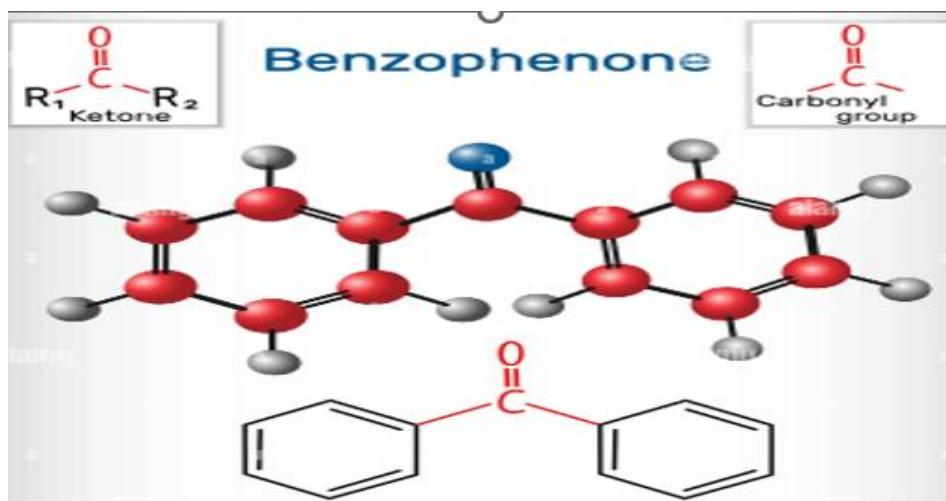
Το φουράνιο σχηματίζεται σε μια ποικιλία θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων με θερμική αποδόμηση των φυσικών συστατικών των τροφίμων. Η μέση διατροφική έκθεση στο φουράνιο στην Ευρώπη μπορεί να είναι τόσο υψηλή όσο 1,23 και 1,01 μg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για ενήλικες και βρέφη 3 έως 12 μηνών, αντίστοιχα (EFSA CONTAM Panel, 2017). Στις ΗΠΑ, οι υπολογισμοί του FDA υπολόγισαν ότι οι μέσες ημερήσιες εκθέσεις σε φουράνιο κυμαίνονταν από 0,26 μg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για ενήλικες έως 0,41 μg/kg/ημέρα για βρέφη που κατανάλωναν παιδικές τροφές και 0,9 μg/kg/ημέρα για εκείνα που κατανάλωναν βρεφικό γάλα.

Επί του παρόντος, τα δεδομένα σχετικά με τις επιδράσεις του φουρανίου στον άνθρωπο είναι περιορισμένα και δεν έχει διερευνηθεί καμία συσχέτιση με την καρκινογένεση του φουρανίου στον άνθρωπο.

Η IARC ταξινόμησε το φουράνιο ως πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο, ενώ η EFSA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η έκθεση στο φουράνιο υποδηλώνει ανησυχία για την υγεία, λόγω αβεβαιοτήτων σχετικά με την ικανότητα καρκινογένεσης του φουρανίου (IARC, 1995; EFSA CONTAM Panel, 2017).

3.9.3 Βενζοφαινόνη

Η βενζοφαινόνη (διφαινυλκετόνη) είναι μια αρυλκετόνη που μπορεί να εμφανιστεί σε τρόφιμα φυσικά ή λόγω μετανάστευσης από τη συσκευασία ή τη χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων (Εικόνα 7).



Εικόνα 8: Δομή βενζοφαινόνης (IEFCA, 2011).

Φυσικά, η βενζοφαινόνη εμφανίζεται κυρίως στα σταφύλια σε συγκεντρώσεις έως 0,13 mg/kg, είναι επίσης συστατικό βανίλιας (έως 0,48 mg/kg), φρούτου του πάθους (0,045 mg/kg) και παπάγιας (λιγότερο από 0,01 mg/kg). Η βενζοφαινόνη μπορεί να μεταναστεύσει στα τρόφιμα από συσκευασίες από χαρτόνι όταν χρησιμοποιείται ως φωτοεκκινητής για μελάνια εκτύπωσης UV ή από πλαστικές συσκευασίες τροφίμων όταν χρησιμοποιείται ως φίλτρο UV. Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων βενζοφαινόνης που μετανάστευσαν στα τρόφιμα κυμαίνονταν από 0,01 έως πάνω από 5 mg/kg, με τα υψηλότερα επίπεδα, 7,3 mg/kg, να ανιχνεύονται σε προϊόντα ζαχαροπλαστικής με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Ως αρωματικός παράγοντας, η βενζοφαινόνη χρησιμοποιείται σε αναλογία 0,5 έως 1,28 mg/kg σε μη αλκοολούχα ποτά και σε 2 mg/kg σε τρόφιμα γενικά (IARC, 2019).

Η μακροχρόνια χορήγηση βενζοφαινόνης από το στόμα σε δίαιτα έως και 1250 ppm, ισοδύναμο με 60 mg/kg σωματικού βάρους σε αρουραίους και 160 mg/kg σωματικού βάρους σε ποντίκια, παρήγαγε ορισμένες ενδείξεις καρκινογόνου δράσης εμφανούς από τις αυξήσεις των περιπτώσεων λευχαιμίας μονοπύρηνων κυττάρων και νεφρικό σωληναριακό αδένωμα σε αρσενικούς αρουραίους καθώς και όγκους του ήπατος σε αρσενικά ποντίκια και ιστιοκυτταρικό σάρκωμα σε θηλυκά ποντίκια (IEFCA, 2011).

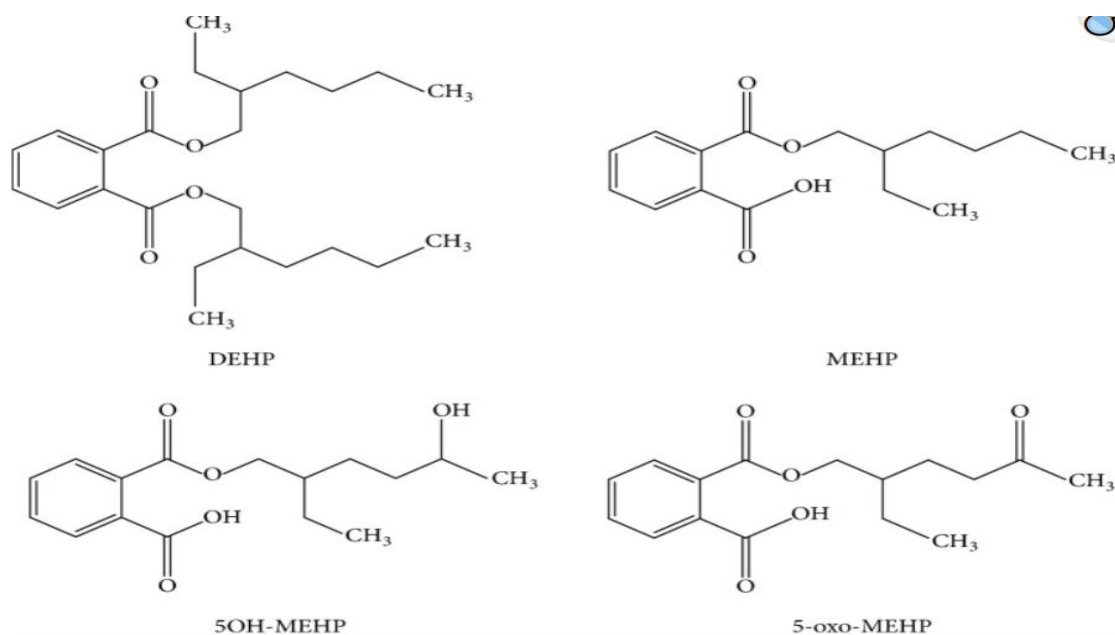
Οι συνδυασμένες διατροφικές εκθέσεις σε βενζοφαινόνη κυμαίνονται από 8,5 μg/kg σωματικού βάρους/ημέρα σε ενήλικες έως 22 μg/kg σωματικού βάρους/ημέρα στα παιδιά (EFSA CEP Panel, 2017). Παρόμοια ευρήματα έγιναν σε μια μελέτη που αφορούσε τον πληθυσμό της Ταϊβάν, όπου οι μέσες ημερήσιες δόσεις βενζοφαινόνης από διατροφικές

εκθέσεις εκτιμήθηκαν ότι κυμαίνονται από 4,54 έως 25,8 $\mu\text{g/kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα (Chen et al., 2022). Η κατά κεφαλήν ημερήσια πρόσληψη βενζοφαινόνης με βάση τη χρήση της ως αρωματικό συστατικό υπολογίστηκε σε 0,2 $\mu\text{g/kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα στις ΗΠΑ και 0,4 $\mu\text{g/kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα στην Ευρώπη. Η IARC εκτίμησε ότι η διατροφική έκθεση στη βενζοφαινόνη από την κατανάλωση σταφυλιών μοσχάτου είναι περίπου 0,3 $\mu\text{g/kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα (IARC, 2019).

Η IARC (2019) ταξινομήσε τη βενζοφαινόνη ως πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο, δηλώνοντας ότι, ενώ τα στοιχεία καρκινογένεσης από τρωκτικά είναι αδύναμα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η συνάφεια του καρκινογόνου MoA για τον άνθρωπο. Η EFSA υπολόγισε την TDI για τη βενζοφαινόνη σε 0,03 mg/kg σωματικού βάρους και το τρέχον όριο μετανάστευσης από τη συσκευασία στα τρόφιμα είναι 0,6 mg/kg . Παρά τα συμπεράσματα που έγιναν από την JECFA και την EFSA ότι η βενζοφαινόνη δεν δημιουργεί ανησυχίες για την ασφάλεια στα τρέχοντα επίπεδα πρόσληψης όταν χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας, η FDA δεν επιτρέπει πλέον τη χρήση της συνθετικής βενζοφαινόνης (FDA, 2018).

3.9.4 Φθαλικός δι(2-αιθυλεξυλεστέρας)

Ο δι(2-αιθυλεξυλ)φθαλικός εστέρας (DEHP) παράγεται με αντίδραση 2-αιθυλεξανόλης με φθαλικό ανυδρίτη και χρησιμοποιείται κυρίως ως πλαστικοποιητής στην παραγωγή πολυβινυλοχλωριδίου (Εικόνα 8). Λόγω της ευρείας παρουσίας του στα υλικά συσκευασίας, το DEHP μολύνει κυρίως τα τρόφιμα με έκπλυση. Οι συγκεντρώσεις DEHP στα τρόφιμα κυμαίνονται από 0,001 έως 7,5 mg/kg , με τα υψηλότερα επίπεδα DEHP, να ξεπερνούν τα 0,3 mg/kg και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να φτάνουν τα 17 mg/kg , να αναφέρονται σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, συγκεκριμένα έλαια, γάλα, βούτυρο, τυρί, μαγιονέζα, φρέσκο κρέας και προϊόντα ψαριών. Στα αναψυκτικά, το DEHP εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,00003 έως 0,0035 $\mu\text{g/L}$ (IARC, 2019).



Εικόνα 9: Δομή DEHP και κύριοι μεταβολίτες (Rowdhwal and Chen, 2018).

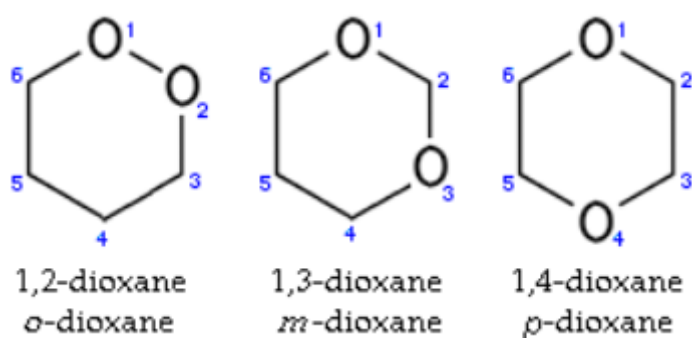
Η έκθεση του γενικού πληθυσμού στο DEHP συμβαίνει κυρίως μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, του κρέατος, των δημητριακών, των ψαριών και των θαλασσινών. Η EDI κυμαίνεται από 0,45 έως 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους την ημέρα στην Ευρώπη και από 1 έως 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους την ημέρα στις ΗΠΑ, με μέσο όρο 0,673 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ημέρα}$. Οι παγκόσμιες εκθέσεις στο DEHP έχουν μειωθεί με τα χρόνια, από 4,40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα τα χρόνια πριν από το 2000 σε 2,23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα το 2015–2017, ωστόσο τα παιδιά εξακολουθούν να έχουν τα υψηλότερα επίπεδα έκθεσης, φθάνοντας τα 5,50 $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{ημέρα}$ (Qu et al., 2022).

Υπάρχουν μόνο περιορισμένα δεδομένα που αξιολογούν τη συσχέτιση μεταξύ του καρκίνου του ανθρώπου, ιδιαίτερα του καρκίνου του μαστού, του προστάτη και του θυρεοειδούς, και της έκθεσης ειδικά στο DEHP (IARC, 2019). Δεν βρέθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής έκθεσης σε φθαλικές ενώσεις και του καρκίνου του μαστού σε μια πρόσφατη πληθυσμιακή μελέτη (Morgan et al., 2017).

Η IARC ταξινομήσε το DEHP ως πιθανώς καρκινογόνο για τον άνθρωπο, ενώ η EFSA εξήγαγε TDI για φθαλικές ενώσεις 0,05 mg/kg σωματικού βάρους την ημέρα (EFSA CEP Panel, 2019).

3.9.5 1,4-διοξάνη

Το 1,4-διοξάνιο (1,4-διαιθυλενοδιοξειδίο) είναι ένα μόριο μονού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο, το οποίο χρησιμοποιείται κυρίως ως διαλύτης και σταθεροποιητής. Μπορεί να εμφανιστεί σε ορισμένα τρόφιμα, όπως το κρέας, οι ντομάτες, οι γαρίδες και ο καφές ως φυσικό συστατικό, ως υλικό επαφής από συσκευασίες τροφίμων ή μολυσμένο νερό. Η ανάλυση των προϊόντων διατροφής στην Ιαπωνία, αποκάλυψε ότι η περιεκτικότητα σε 1,4-διοξάνη κυμαινόταν από 3 έως 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Nishimura et al., 2004).



Εικόνα 10: Δομή 1,4-διοξάνιο (Kano et al., 2004).

Η χορήγηση 1,4-διοξανίου σε πόσιμο νερό προκάλεσε ηπατοκυτταρικά αδενώματα ή καρκινώματα σε αρουραίους και ποντίκια και των δύο φύλων και σε αρσενικά ινδικά χοιρίδια (Kano et al., 2004). Άλλα όργανα-στόχοι καρκινογένεσης ήταν η ρινική κοιλότητα σε αρουραίους και των δύο φύλων, ο μαστικός αδένας στους θηλυκούς και η κοιλιακή κοιλότητα στους αρσενικούς αρουραίους, η χοληδόχος κύστη σε αρσενικά ινδικά χοιρίδια.

Οι διατροφικές εκθέσεις στην 1,4-διοξάνη είναι μια δευτερεύουσα οδός έκθεσης, σε αντίθεση με την εισπνοή. Ο FDA εκτίμησε ότι η κατά κεφαλήν διαιτητική πρόσληψη 1,4-διοξανίου είναι χαμηλή, κατά μέσο όρο στα 0,6 $\mu\text{g}/\text{άτομο}/\text{ημέρα}$. Οι αναλύσεις ιαπωνικών τροφίμων αποκάλυψαν EDI 1,4-διοξανίου κατά μέσο όρο από 0,44 έως 4,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα. Η SCF διαπίστωσε ότι μια εκτιμώμενη μέγιστη έκθεση στο 1,4-διοξάνιο ως συστατικό πρόσθετων τροφίμων, πολυσορβικά, στο ψωμί κυμαίνεται μεταξύ 0,008 και 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα.

Δεν υπάρχουν επί του παρόντος διαθέσιμες επιδημιολογικές μελέτες που να διερευνούν τη συσχέτιση της στοματικής έκθεσης των ανθρώπων στην 1,4-διοξάνη και τον καρκίνο.

Το IARC εκχώρησε το 1,4-διοξάνιο σε μια ομάδα χημικών ουσιών που είναι πιθανώς καρκινογόνες για τον άνθρωπο. Η SCF διαπίστωσε ότι η έκθεση σε 1,4-διοξάνη σε πρόσθετα τροφίμων είναι σημαντικά χαμηλότερη από την καθιερωμένη NOAEL των 10 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, και επομένως δεν προκαλεί τοξικολογική ανησυχία (IARC, 2019).

3.10 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταλλαξιογένεση

Λίγες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τόσο ο χρόνος όσο και η θερμοκρασία έχουν επίδραση στη μεταλλαξιογένεση. Σε θερμοκρασία τηγανίσματος (150–300 °C) η μεταλλαξιογένεση αυξάνεται και στη συνέχεια γίνεται σταθερή. Θερμοκρασία πάνω από 140 °C βρέθηκε ότι είναι υπεύθυνη για την ενίσχυση της μεταλλαξιογένεσης στην περίπτωση του τηγανισμένου μοσχαρίσιου κιμά (Bjeldanes et al., 1983). Η παρουσία μεταλλαξιογόνων δοκιμάστηκε σε ψητό κοτόπουλο και χοιρινό κρέας, ψητά ψάρια και μπιφτέκια κρέατος σε ατμόσφαιρα 180–200 °C για 80–90 λεπτά και φλόγα αερίου για 10–15 λεπτά (ψητό ψάρι) (Tikkanen et al., 1993). Αυτά τα μεταλλαξιογόνα σχηματίστηκαν λόγω της πυρόλυσης των πρωτεϊνών που υπάρχουν στα τρόφιμα. Η μέση εκτιμώμενη πρόσληψη 2-αμινο-1-μεθυλ-6-φαινυλμιδαζο [4,5-b]πυριδίνης (PhIP) βρέθηκε να είναι περίπου 0,4-16 μg/ημέρα (Wakabayashi et al., 1992).

Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η θέρμανση αυξάνει τη μεταλλαξιογένεση των προϊόντων διατροφής (Krone and Iwaoka, 1983). Μια μελέτη ανέφερε ότι όταν τα δείγματα τροφίμων πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, μειώθηκε ο κίνδυνος μεταλλαξιογένεσης με κάθε επόμενο πλύσιμο. Ως εκ τούτου, ήταν προφανές ότι οι πρόδρομοι των μεταλλαξιογόνων μπορούν να εκχυλιστούν με πλύσιμο με απεσταγμένο νερό (Krone et al., 1986).

Ο χρόνος είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει επίσης το επίπεδο μεταλλαξιογένεσης στα τρόφιμα. Το εκχύλισμα βρασμένου βοείου κρέατος έδειξε αυξημένη μεταλλαξιογένεση σε λιγότερο από 30 ώρες βρασμού. Στο σύστημα τηγανισμένης σόλας βρέθηκε ότι η θέρμανση σε θερμοκρασία 125 °C για 18 λεπτά ενίσχυσε τη μεταλλαξιογένεση. Τόσο ο χρόνος όσο και η θερμοκρασία βρέθηκαν να ευθύνονται για

τη μεταλλαξιγένεση, αλλά η επίδραση της θερμοκρασίας βρέθηκε να είναι πιο επικίνδυνη σε σύγκριση με τον χρόνο (Krone et al., 1986).

3.11 Μεταβολική εκτίμηση μεταλλαξιγόνων

Ο σχηματισμός μεταλλαξιγόνων μέσω του μεταβολισμού μπορεί να αναγνωριστεί με εξειδικευμένη μέθοδο στη δοκιμή AMES, δηλαδή με μέθοδο προεπώασης. Σε αυτή τη μέθοδο, το υλικό τροφής προεπώάζεται με στελέχη *Salmonella* παρουσία ηπατικών ενζύμων (παρασκεύασμα μικροσωμάτων ήπατος αρουραίου) που επιτρέπει τον σχηματισμό τυχόν μεταλλαξιγόνων μεταβολιτών από το μητρικό υλικό τροφής. Ορισμένες ενώσεις μπορεί να ανιχνευθούν πιο αποτελεσματικά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο προεπώασης. Αυτές οι ενώσεις ανήκουν σε χημικές κατηγορίες που περιλαμβάνουν αλειφατικές νιτροζαμίνες μικρής αλυσίδας, δισθενή μέταλλα, αλδεΐδες, αζωχρωστικές ενώσεις, αλκαλοειδή πυρολιζιδίνης και νιτροενώσεις.

Οι ετεροκυκλικές αμίνες βρέθηκαν να ενεργοποιούνται με τη βοήθεια του κυτοχρώματος P450s. Το κυτόχρωμα P450 βοηθά τις ετεροκυκλικές αμίνες να μετατραπούν σε υδροξυλαμινομάδα από αμινομάδα. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι το κυτόχρωμα P450IA2 είναι ο πιο αποτελεσματικός ενισχυτής των ετεροκυκλικών αμινών (Cross and Sinha, 2004). Ακολουθεί η μετατροπή της υδροξυλαμίνης σε εστέρες από οξικό οξύ, προλίνη και τελευταίο, αλλά όχι λιγότερο σημαντικό θειικό οξύ. Τέλος, αυτά τα μεταλλαξιγόνα θα δράσουν ως μολυντές του DNA. Αυτή ακριβώς η ιδιότητα της ετεροκυκλικής αμίνης, ότι μπορεί να εισέλθει και να συνδεθεί με μόρια DNA, διευκρινίστηκε με τη μέθοδο 32P-postlabeling (Wakabayashi et al., 1992).

Η ενεργοποίηση των ετεροκυκλικών αμινών συμβαίνει επίσης λόγω της οξείδωσης ενός ηλεκτρονίου που οδηγεί στο σχηματισμό μιας ουσίας ελεύθερων ριζών. Αυτό συμβαίνει λόγω εξωηπατικού ιστού και κατάλυσης με τη βοήθεια της προσταγλανδίνης H (Cross and Sinha, 2004). Η Trp-P-2, μια ετεροκυκλική αμίνη, βρέθηκε επίσης να ενεργοποιείται με 13-οξική 12-O-τετρα-δεκανοϋλοφορβόλη. Τα παράγωγα N-νιτροσοαμίνης που επίσης αποδείχθηκε ότι είναι ισχυρά μεταλλαξιγόνα ενεργοποιήθηκαν επίσης με τη βοήθεια του κυτοχρώματος P-450 (Crespi et al., 1991).

4 Ανίχνευση Μεταλλαξιογόνων

4.1 Εισαγωγικά στοιχεία-Μηχανισμοί

Όταν εισέλθουν στο σώμα, τα μεταλλαξιογόνα των τροφίμων συνήθως υφίστανται μεταβολική ενεργοποίηση και αποτοξίνωση από ενδογενή ένζυμα των οποίων οι ρόλοι είναι να απαλλάσσουν το σώμα από ξένες ενώσεις. Μερικές φορές τα χημικά τροποποιημένα μεταλλαξιογόνα που είναι πιο αντιδραστικά συνδέονται με το DNA παρά με τα εκκριτικά μόρια φορείς. Αυτή η σύνδεση μπορεί στη συνέχεια να προκαλέσει σφάλματα κωδικοποίησης κατά τη στιγμή της αντιγραφής του DNA. Ωστόσο, υπάρχουν πλεονάζοντες μηχανισμοί επιδιόρθωσης DNA που μπορούν να επιδιορθώσουν τα σφάλματα, οι οποίοι υποβοηθούνται από κυτταρικές διεργασίες που πυροδοτούν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και έτσι επιτρέπουν περισσότερο χρόνο για την επιδιόρθωση του DNA. Αυτές οι διαδικασίες του κυτταρικού κύκλου πυροδοτούνται από βλάβη του DNA. Ωστόσο, εάν τα σφάλματα DNA δεν επιδιορθωθούν, μπορεί να προκαλέσουν σημειακές μεταλλάξεις, διαγραφές, εισαγωγές ή χονδροχρωμοσωμικές ανωμαλίες. Εάν εμφανιστούν μεγάλες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, τότε υπάρχουν ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA, τα οποία υποβοηθούνται από άλλες πρωτεΐνες, που καθυστερούν τον κυτταρικό κύκλο. Εάν η βλάβη στο DNA επιμένει, τα κύτταρα υφίστανται κυτταρικό θάνατο εκτός εάν υπάρχει επιλεκτικό κλωνικό πλεονέκτημα (Goldman and Shields, 2003).

Ορισμένες διατροφικές εκθέσεις μπορεί εύλογα να τροποποιήσουν τις επιδράσεις των μεταλλαξιογόνων τροφών. Για παράδειγμα, τα αλκοολούχα ποτά επάγουν ανισόμορφο του κυτοχρώματος P450 (CYP)2E1,3 το οποίο ενεργοποιεί μεταβολικά τις N-νιτροζαμίνες, ενώ η κατάποση της βιταμίνης C αποτρέπει το σχηματισμό N-νιτροζαμινών. Η έκθεση σε ορισμένους μεταλλαξιογόνους παράγοντες τροφίμων όπως οι PAH μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση του CYP1A1, το οποίο στη συνέχεια προκαλεί αυξημένη μεταβολική ενεργοποίηση αυτών των ενώσεων.

Τα γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορούν να ταξινομηθούν ως πρωτοογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια. Τα πρώτα είναι φυσιολογικά λειτουργικά γονίδια που ρυθμίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη, αναπαραγωγή και διαφοροποίηση των κυττάρων,

αλλά συμβάλλουν στην καρκινογένεση όταν μεταλλάσσονται με τέτοιο τρόπο που οδηγεί σε ανεξέλεγκτη γονιδιακή έκφραση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Οι ογκοκατασταλτικοί παράγοντες ρυθμίζουν επίσης τη φυσιολογική ανάπτυξη, αντιγραφή και διαφοροποίηση των κυττάρων, αλλά συμβάλλουν στην καρκινογένεση όταν μια μετάλλαξη οδηγεί σε απώλεια λειτουργίας. Για μεταλλαξιογόνους παράγοντες τροφίμων που οδηγούν σε καρκίνο, η διακύμανση μεταξύ των ατόμων διέπεται από γενετικούς πολυμορφισμούς όπου η συχνότητα της γενετικής παραλλαγής είναι 1% στον πληθυσμό ενδιαφέροντος. Ο σποραδικός κίνδυνος καρκίνου συνήθως τροποποιείται από γενετικούς πολυμορφισμούς σε γονίδια χαμηλής διείσδυσης (ο κίνδυνος του γενετικού χαρακτηριστικού είναι . 1 αλλά , 2), και οι κίνδυνοι αυτών των γονιδίων εντοπίζονται συχνότερα στο πλαίσιο της έκθεσης και όχι ως κύρια επίδραση.

Αν και η αύξηση του κινδύνου καρκίνου που σχετίζεται με πολυμορφισμούς σε γονίδια χαμηλής διείσδυσης είναι μικρή, ο αποδιδόμενος κίνδυνος στον πληθυσμό είναι μεγάλος λόγω της υψηλής συχνότητας των παραλλαγών (Shields and Harris, 2000).

4.2 Μέθοδοι μελέτης μεταλλαξιογόνων τροφίμων

Η διαπίστωση του ρόλου των μεταλλαξιογόνων τροφίμων στην καρκινογένεση απαιτεί τη διαθεσιμότητα και την ερμηνεία διαφορετικών πειραματικών και ανθρώπινων εμπειρικών στοιχείων. Η μελέτη των μεταλλαξιογόνων τροφίμων περιλαμβάνει συμπληρωματικές προσεγγίσεις όπως συστήματα χημικών μοντέλων που προσδιορίζουν τη δομή των καρκινογόνων και τον τρόπο δράσης τους, μοντέλα κυτταροκαλλιέργειας ζώων και ανθρώπων που επαληθεύουν την εφαρμογή της χημείας σε ένα σύστημα *in vivo*, ζωικά *in vivo* μοντέλα καρκινογένεσης και πρόσθετα επιδημιολογικές μελέτες μήτρες που ενσωματώνουν βιοδείκτες που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας τις άλλες μεθόδους (Goldman and Shields, 2003).

Οι διαφορετικοί τύποι μεθόδων για τη μελέτη των μεταλλαξιογόνων τροφίμων πρέπει να ερμηνεύονται στα πλαίσια του ενός του άλλου, των χρησιμοποιούμενων δόσεων και των οργάνων-στόχων. Για παράδειγμα, η προβλεψιμότητα για ανθρώπινη καρκινογένεση οποιασδήποτε μεμονωμένης μεθόδου (π.χ. *in vitro* κυτταροκαλλιέργεια ή πειραματική

μελέτη σε ζώα) είναι χαμηλή και η συμφωνία μεταξύ διαφορετικών πειραματικών συστημάτων είναι μεταβλητή.

Μεθοδολογίες προσυμπτωματικού ελέγχου υψηλής απόδοσης για τα μηχανιστικά και τοξικολογικά τελικά σημεία αναπτύσσονται για χρήση μη πειραματικών συστημάτων και επιδημιολογικών μελετών. Η υψηλή απόδοση μπορεί να αναφέρεται στην ικανότητα εντοπισμού μεγάλου αριθμού κυτταρικών επιδράσεων σε ένα μόνο πείραμα ή την εφαρμογή μια ανάλυση σε μεγάλο αριθμό υποκειμένων. Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν γονιδιωματικές οθόνες μεγάλης κλίμακας που βασίζονται σε μικροσυστοιχίες και πρωτεομικές οθόνες βασισμένες σε ηλεκτροφόρηση γέλης 2-D με φασματομετρική ανίχνευση μάζας ή εκρόφηση/ιονισμό λέιζερ ενισχυμένη με επιφάνεια. Η γονιδιωματική και οι πρωτεομικές μέθοδοι είναι εύλογα χρήσιμες για τον έλεγχο για τοξικολογικές επιδράσεις και προηγούμενα καρκινογόνα συμβάντα *in vitro* και *in vivo* πειραματικές μελέτες. Ορισμένες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν σε μεγάλο αριθμό επιδημιολογικών υποκειμένων. Ωστόσο, η ερμηνεία των δεδομένων όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός σημείων δεδομένων για γνωστά και άγνωστα γονίδια ή πρωτεΐνες αμφισβητεί τα τρέχοντα στατιστικά μοντέλα και απαιτεί νέες προσεγγίσεις στην ερμηνεία των δεδομένων (Goldman and Shields, 2003).

Οι δοκιμές βιοδεικτών χρησιμοποιούνται συχνά για την αξιολόγηση της έκθεσης σε μεταλλαξιογόνους παράγοντες τροφίμων και του τρόπου με τον οποίο το σώμα ανταποκρίνεται σε αυτές τις εκθέσεις. Κάθε ανάλυση που εκτελείται σε βιολογικό υγρό ή ιστό μπορεί να θεωρηθεί ως ανάλυση βιοδεικτών. Είναι σημαντικό ότι η έκθεση σε αυτό το πλαίσιο αναφέρεται στην έκθεση σε κυτταρικό και μακρομοριακό επίπεδο και όχι σε ό,τι μπορεί να είναι στα τρόφιμα ή σε διατροφικές συμπεριφορές. Μια σημαντική εννοιολογική προσέγγιση είναι να εξεταστεί η βιολογικά αποτελεσματική δόση ενός μεταλλαξιογόνου, η οποία είναι ένα μέτρο της επίδρασης του μεταλλαξιογόνου στο DNA. Η βιολογικά αποτελεσματική δόση είναι ένας φαινότυπος της ανταπόκρισης ενός ατόμου στην έκθεση. Συγκεκριμένα, το καθαρό αποτέλεσμα της μεταβολικής ενεργοποίησης και αποτοξίνωσης, της έλλειψης επιδιόρθωσης του DNA και της έλλειψης πυροδοτούμενου κυτταρικού θανάτου.

Τα ερωτηματολόγια και οι δοκιμές βιοδεικτών είναι ως επί το πλείστον συμπληρωματικά και είναι πιο ισχυρά όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Η χρήση βιοδεικτών στην επιδημιολογία βελτιώνει τις εκτιμήσεις έκθεσης (π. -νιτροζαμίνες) και υπολογίζει τη συνολική επιβάρυνση μιας ιδιαίτερης έκθεσης όταν υπάρχουν πολυάριθμες πηγές [π.χ.

βενζο(α)πυ-ρένιο (BaP) από τη διατροφή, τον αέρα, τον καπνό και το επάγγελμα] (Goldman and Shields, 2003).

Ποικίλες αναλύσεις είναι διαθέσιμες για την ταυτοποίηση καρκινογόνων-μακρομοριακών προϊόντων προσθήκης σε ανθρώπινους ιστούς. Αυτές περιλαμβάνουν τη δοκιμασία 32P-μετασέμανση/χρωματογραφία νουκλεοτιδίων, ανοσοπροσδιορισμούς όπως ανοσοϊστοχημεία, φασματοσκοπία φθορισμού, αέρια χρωματογραφία/φασματοσκοπία μάζας και ηλεκτρική χημική ανίχνευση. Αυτές οι μέθοδοι εκμεταλλεύονται νέες μεθοδολογίες, συμπεριλαμβανομένων των ραδιοσημάνσεων που ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλές δόσεις και των ανιχνευτών φθορισμού. Κάθε μία από αυτές τις δοκιμές προσθήκης έχει τη χρησιμότητα και τους περιορισμούς της και όλες αμφισβητούνται από την ευαισθησία ή/και την ειδικότητα (Goldman and Shields, 2003).

Άλλες δοκιμασίες βιοδεικτών έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των βιολογικών συνεπειών της έκθεσης σε μεταλλαξιογόνο. Ένας μη ειδικός προσδιορισμός είναι η μέτρηση της μεταλλαξιογένεσης των ούρων, όπου εκχυλίσματα ανθρώπινων ούρων χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό μετάλλαξης σαλμονέλας. Οι επίσης αδελφές χρωματιδικές ανταλλαγές και οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορούν να μετρηθούν σε καλλιεργημένα λεμφοκύτταρα, αλλά αυτά είναι πιθανώς πολύ μη ειδικά για να είναι χρήσιμα στην αξιολόγηση των διατροφικών επιδράσεων. Η μελέτη μεταλλάξεων στο γονίδιο καταστολής όγκου p53 είναι κατάλληλη για τη μελέτη της αιτιολογίας, της έκθεσης και της ευαισθησίας του καρκίνου, επειδή το p53 εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης της γονιδιωματικής σταθερότητας, προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), επιδιόρθωσης DNA και ελέγχου κυτταρικού κύκλου. Η συχνότητα μετάλλαξης p53 στον καρκίνο ποικίλλει ανάλογα με τη θέση οργάνου και τον ιστολογικό υποτύπο, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι καρκίνοι εμφανίζονται μέσω διαφορετικών οδών και εκθέσεων σε κυτταρικό επίπεδο (Goldman and Shields, 2003).

4.3 Προσδιορισμός μεταλλαξιογόνων από δείγματα τροφίμων

Η μεταλλαξιογόνος δράση μιας χημικής ουσίας στα βακτήρια υποδεικνύει πιθανή γονοτοξικότητα και πιθανή καρκινογένεση στα θηλαστικά. Για τον έλεγχο καρκινογόνου

δράσης, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν συστήματα κυττάρων θηλαστικών. Όποτε άλλα συστήματα δοκιμών υποδεικνύουν επίσης γονοτοξική δραστηριότητα, είναι πιο πιθανό ένα βακτηριακό μεταλλαξιογόνο να μπορεί να δράσει ως καρκινογόνο.

Αρκετά από τα μεταλλαξιογόνα πυρολύματα αμινοξέων ή πρωτεϊνών έχουν δοκιμαστεί για καρκινογένεση *in vivo*. Νεοπλασματικά οζίδια, τα οποία υποτίθεται ότι είναι προκαρκινικές αλλαγές, βρέθηκαν στο συκώτι των αρουραίων Wistar, δεδομένου του βασικού κλάσματος από πυρολυμένη τρυπτοφάνη σε ποσοστό 0,2% στη διατροφή (Matsukura et al., 1981). Ούτε νεοπλασματικά οζίδια ούτε όγκοι του ήπατος είχαν παρατηρηθεί προηγουμένως σε αυτό το στέλεχος αρουραίων σε αυτό το εργαστήριο. Η υποδόρια ένεση Trp-P-1 (1,5 mg μία φορά την εβδομάδα για 20 εβδομάδες) προκάλεσε σαρκώματα σε χάμστερ και σε αρουραίους Fischer. Το Trp-P-2 δεν προκάλεσε όγκους ούτε σε χάμστερ ούτε σε αρουραίους κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες (Ishikawa et al., 1979). Οι Trp-P-1 και Trp-P-2 παρήγαγαν ηπατικούς όγκους σε ποντικούς CDF1 (BALB/c × DBA) που τρέφονταν με δίαιτα που περιείχε 0,02% από οποιαδήποτε από αυτές τις χημικές ουσίες (Matsukura et al., 1981). Μερικοί από αυτούς τους όγκους του ήπατος έκαναν μετάσταση στον πνεύμονα. Τα θηλυκά ποντίκια ήταν πιο ευαίσθητα σε αυτές τις καρκινογόνες ουσίες από ότι τα αρσενικά. Έξι από τα εννέα θηλυκά ACI αρουραίους που τρέφονταν με 0,1% Trp-P-2 στη διατροφή τους ανέπτυξαν νεοπλασματικά οζίδια στο ήπαρ και ένας από τους έξι ανέπτυξε αιμαγγειοενδοθηλιακό σάρκωμα του ήπατος (Hosaka et al., 1981). Κανένα από τα ζώα ελέγχου δεν ανέπτυξε τέτοιους όζους ή όγκους.

Η ταυτοποίηση αρκετών από τις μεταλλαξιογόνες ενώσεις που βρέθηκαν σε προϊόντα πυρόλυσης πρωτεϊνών και αμινοξέων ήταν ένας ακριβής προγνωστικός παράγοντας καρκινογένεσης. Ωστόσο, η παρουσία μιας καρκινογόνου χημικής ουσίας σε ένα πυρολυμένο μείγμα αμινοξέων ή πρωτεϊνών δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το καρκινογόνο θα υπάρχει και σε μαγειρεμένα τρόφιμα.

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι για την εξαγωγή μεταλλαξιογόνων από τα τρόφιμα. Μια μελέτη ανέφερε την εκχύλιση μεταλλαξιογόνων με ανάμειξη των κονσερβοποιημένων τροφίμων με μεθανόλη που ακολουθείται από διήθηση χρησιμοποιώντας φίλτρο Whatman No.1. Αργότερα, η μεθανόλη αφαιρέθηκε από το διήθημα χρησιμοποιώντας έναν περιστροφικό εξατμιστή και αναμίχθηκε με απεσταγμένο νερό, τέσσερις φορές το βάρος του δείγματος τροφής. Το ληφθέν μίγμα στη συνέχεια κατανεμήθηκε με τη βοήθεια διχλωρομεθανίου (DCM-CH₂Cl₂) αφού ρυθμίστηκε το pH στο 2,5. Το pH της υδατικής

στιβάδας ρυθμίστηκε στο 10 και τελικά, εκχυλίστηκε με DCM. Μετά την εκχύλιση, ξηράνθηκε, εξατμίστηκε και τελικά διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) (Krone and Iwaoka, 1983).

Το λίπος μπορεί να απομακρυνθεί από το προϊόν διατροφής με ομογενοποίηση σε ακετόνη που ακολουθείται από εκχύλιση εξανίου. Αυτή η διαδικασία ακολουθήθηκε από DCM για τον διαχωρισμό των αλκαλικών ουσιών. Το ληφθέν προϊόν συμπυκνώθηκε περαιτέρω μέσω εξάτμισης χρησιμοποιώντας ατμό αζώτου και αργότερα αποθηκεύτηκε σε μεθανόλη (Tikkanen et al., 1993).

Στη μελέτη των Khan et al. (2009) επιχειρήθηκε η εξαγωγή μεταλλαξιγόνων από τα δείγματα τροφίμων. Με τη βοήθεια 1 M NaOH προστέθηκε στην κενή στήλη (φυσίγγιο προπυλσουλφονικού οξέος (PRS)) και εκλούστηκε με οξικό αιθυλεστέρα στο φυσίγγιο PRS και ακολούθησε έκπλυση με μεθανόλη: νερό (4:6 v/v). Το φυσίγγιο PRS στη συνέχεια συζεύχθηκε με το φυσίγγιο C8 και στη συνέχεια απορροφήθηκε από οξικό αμμώνιο, τελικά ξεπλύθηκε με νερό και εκλούστηκε με μεθανόλη: αμμωνία (9:1 v/v). Ο διαλύτης στη συνέχεια εξατμίστηκε και το προκύπτον διαλύθηκε σε 4,7,8-TriMeIQx σε μεθανόλη (Khan et al., 2009).

Στη μελέτη των Krone and Iwaoka (1983) γίνεται αναφορά της χρήσης της μεθόδου υδατικής εκχύλισης για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων στο δείγμα τροφής. Σε αυτή τη μέθοδο, τα κατεψυγμένα τρόφιμα αναμίχθηκαν με απεσταγμένο νερό και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε θειικό νάτριο (Na_2SO_4) με ρύθμιση του pH στο 2,5 και στη συνέχεια διήθηση. Αργότερα το ληφθέν διήθημα στη συνέχεια εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας DCM διατηρώντας το pH του διαλύματος. Τα τελικά προϊόντα διαλύθηκαν σε DMSO (Krone and Iwaoka, 1983).

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί και η εκχύλιση μεταλλαξιγόνων με την εκτέλεση διαδικασίας εκχύλισης υγρού-υγρού. Σε αυτή τη διαδικασία, το δείγμα αναμίχθηκε με HCl και ακολούθησε η εκχύλισή του χρησιμοποιώντας DCM. Μετά τον διαχωρισμό, δύο στοιβάδες DCM απορρίφθηκαν και η περαιτέρω διαδικασία διεξήχθη χρησιμοποιώντας μια υδατική στιβάδα. Σε αυτό το υδατικό στρώμα, προστέθηκε φρέσκο DCM μετά από ρύθμιση του pH στο 13 με τη βοήθεια NaOH. Το ληφθέν προϊόν ξηράνθηκε πλήρως για περαιτέρω χρήση. Τα μεταλλαξιγόνα εκχυλίστηκαν επίσης χρησιμοποιώντας διαλύματα με ακετονιτρίλιο και μυρμηκικό οξύ. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για να ληφθεί το

υπερκείμενο στο οποίο προστέθηκαν θειικό μαγνήσιο και ενεργός άνθρακας αντίστοιχα και φυγοκεντρήθηκε ξανά. Τέλος, ολόκληρο το μίγμα του διαλύματος ξηράνθηκε υπό άζωτο και αποθηκεύτηκε σε 70% μεθανόλη συμπληρωμένη με 0,1% μυρμηκικό οξύ (Stavric et al., 1997).

4.4 Χημική παραγωγοποίηση

Προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία μεταλλαξιγόνων σε οποιοδήποτε δείγμα τροφίμου, θα πρέπει να μετατραπεί σε μια μορφή που μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με HPLC ή LC/GC-MS. Η παρουσία μεταλλαξιγόνων MeIQx, PhIP και DiMeIQx στα επεξεργασμένα τρόφιμα ανιχνεύθηκε με τη μορφή βρωμιούχου 3,5-δισ(τριφθορομεθυλ)βενζυλίου. Πιο αναλυτικά, 100 μ L βρωμιούχου 3,5-δισ (τριφθορομεθυλ)βενζυλίου προστέθηκαν σε 2 mL ακετονιτριλίου (δείγμα αναφοράς) και 0,5 mL δισοπροπυλαιθυλαμίνης (δείγμα δοκιμής) για να ληφθούν τα παράγωγά του. Όλα τα χημικά, τα δείγματα αναφοράς και τα δείγματα δοκιμής εκχυλίστηκαν στην παράγωγη μορφή τους με τη βοήθεια εξανίου. Τα μεταλλαξιγόνα στα δείγματα τροφίμων ανιχνεύθηκαν επίσης με τη μορφή παραγώγων επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη. Για να ληφθεί αυτό το παράγωγο, τα δείγματα τροφίμων αναμίχθηκαν με 5 mL εξανίου μαζί με 50 μ L επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη. Μεταξύ των δύο, βρέθηκε ότι τα παράγωγα επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη έδωσαν το καλύτερο αποτέλεσμα στο GC-MS και τα δείγματα βρέθηκαν να ανιχνεύθηκαν σε συγκέντρωση 5 mg/L. Τα παράγωγα βρωμιούχου 3,5-δισ(τριφθορομεθυλ)-βενζυλίου βρέθηκαν ικανοποιητικά για την ανίχνευση ευαίσθητων μεταλλαξιγόνων και έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την αναπαραγωγιμότητα. Μεταλλαξιγόνα 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx και MeIQx ανιχνεύθηκαν σε τόσο χαμηλή συγκέντρωση έως 10 μ L και PhIP σε συγκέντρωση 70 μ g/L με τη μορφή παραγώγου 3,5-δισ(τριφθορομεθυλ)-βενζυλοβρωμιδίου (Tikkanen et al., 1993).

4.5 Ανάλυση μεταλλαξιγόνων

Τα δείγματα τροφίμων μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας τεχνικές ανάλυσης όπως HPLC ή LC/GC-MS για την ανίχνευση και την αξιολόγηση συγκεκριμένων μεταλλαξιγόνων. Όλες οι μεταλλαξιγόνες ετεροκυκλικές αμίνες όπως, DMIP, MeIQx, 4,8-DiMeIQx και PhOQ, ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας LC-MS/MS με πηγή ψεκασμού τουρμποϊόντων που λειτουργεί θετικά, στήλη LC συμμετρίας C8 (150 mm × 2,1 mm I.D, 5 μm μέγεθος σωματιδίων).

Τα παράγωγα βρωμιούχου 3,5-δισ(τριφθορομεθυλ)βενζυλίου και παράγωγα επταφθοροβουτυρικού ανυδρίτη ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS/MS) με αρνητικό ιονισμό και χρόνο λειτουργίας 75 λεπτά, 25 m μη πολική στήλη ULTRA-2 0,2 mm I.D, πάχος φιλμ 0,11 μm και η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 270 °C για 3 λεπτά και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 320 °C στους 10 °C/λεπτό, το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο, ο μικρότερος χρόνος διαχωρισμού ήταν 0,35 λεπτά και ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 1,0 μL (Tikkanen et al., 1993).

Μεταλλαξιγόνα που σχηματίστηκαν από αντιδράσεις sorβικού οξέος-νιτρώδους νατρίου ταυτοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας TLC και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με μεθόδους περιοχής φωτός UV, n-εξάνιο: οξικό οξύ: οξικό αιθυλεστέρα: χλωροφόρμιο (45:6::10:1) κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε με στήλη μBondpeak, το αραιωτικό ήταν νερό: μεθανόλη (85:15), τα προϊόντα ανιχνεύθηκαν στους 254 nm με ρυθμό ροής 1,5 mL/min (Namiki et al., 1981). Η χρήση της τεχνικής HPLC/LC-MS αναφέρθηκε επίσης στην ταυτοποίηση μεταλλαξιγόνων για τα δείγματα τροφίμων (Khan et al., 2009).

Η ηλεκτροχημική τεχνική είναι μια άλλη προσέγγιση που επίσης βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματική στον προσδιορισμό της ετεροκυκλικής αμίνης (Wakabayashi et al., 1992). Η χρήση HPLC σε συνδυασμό με ηλεκτροχημική ανίχνευση αναφέρθηκε επίσης στην ανίχνευση μεταλλαξιγόνων (Takahashi et al., 1985). Μόνο LC χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό του μεταλλαξιγόνου ENA με στήλη Bondapak C18. Για την κινητή φάση, νερό: μεθανόλη σε αναλογία 85:15 χρησιμοποιήθηκε με ρυθμό ροής 1,5 mL/min. Η ανίχνευση των μεταλλαξιγόνων έγινε χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο UV στα 254 nm (Namiki et al., 1981).

Μια μελέτη ανέφερε την εφαρμογή LC-MS για τον προσδιορισμό μεταλλαξιγόνων, στην οποία χρησιμοποιήθηκε 20% ακετονιτρίλιο + 80% οξικό οξύ για την παρασκευή του

αποθεματικού διαλύματος. Πριν από την LC-MS, το δείγμα καθαρίστηκε χρησιμοποιώντας φυσίγγιο εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) συνδεδεμένο με ρητίνη HEMA (μεθακρυλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας), έναν κατιονικό εναλλάκτη. Ένα δείγμα αναμειγμένο με 0,06% μυρμηκικό οξύ και 20% ακετονιτρίλιο φορτώθηκε στη στήλη. Αργότερα, η στήλη πλύθηκε με 0,1 N HOI ακολουθούμενο από 20% μεθυλική αλκοόλη σε 0,1 N HCl + 1 mL νερό. Μεταλλαξιγόνα (ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες) που δεσμεύτηκαν στη στήλη εκλούστηκαν χρησιμοποιώντας 40% ακετονιτρίλιο + 0,5 N ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου-υδροξειδίου του αμμωνίου με pH 9,4. Το έκλουσμα στη συνέχεια ξηράνθηκε για περαιτέρω εργασία (Stavric et al., 1997).

Για την ανίχνευση μεταλλαξιγόνων με χρήση LC-MS, χρησιμοποιήθηκε στήλη PLRP-S βασισμένη σε πολυμερές με αντλία LC-600 και ανιχνευτή UV SPD-10A. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στα 0,7 mL/min. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές κινητές φάσεις: φάση A με 0,05% μυρμηκικό οξύ + 5 mM οξικό αμμώνιο σε νερό σε pH 3,2, ενώ φάση B με 0,06% μυρμηκικό οξύ + 49,82% ακετονιτρίλιο + 3 mM οξικό αμμώνιο pH 3,8 σε νερό. Η κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε στο σύστημα βαθμίδωσης ξεκινώντας με 18% της φάσης B για 1 λεπτό και στη συνέχεια μετατοπίστηκε στο 25% της φάσης B με ρυθμό 14% ανά λεπτό για 3,4 λεπτά. Στη συνέχεια η κλίση αυξήθηκε στο 50% με ρυθμό 1,9% ανά λεπτό για 7 λεπτά και τελικά στο 18% για 28 λεπτά. Κατά τη χρήση της στήλης TSK-GEL ODS-80TM, ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στα 0,6 mL/min και χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα κινητής φάσης βαθμίδωσης. Η κινητή φάση A περιέχει 0,15% μυρμηκικό οξύ + 15 mM οξικό αμμώνιο σε pH 3,1, ενώ η φάση B περιέχει 0,15% μυρμηκικό οξύ + 15 mM οξικό αμμώνιο + 50% ακετονιτρίλιο. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε 12% της φάσης B για 1 λεπτό, στη συνέχεια 51% για 14 λεπτά, και τελικά 70% για 5 λεπτά (Stavric et al., 1997).

Στη μελέτη των Binstok et al. (1998) εφαρμόστηκε το GC-MS με ηλεκτρονικό ανιχνευτή κρούσης 70 eV. Το μεθυλοσιλοξάνιο χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα διαλυτών, ενώ το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο φορέας. Για την ανίχνευση του μεταλλαξογόνου DNMP οι συνθήκες ήταν 100 °C αρχική θερμοκρασία, η οποία αυξήθηκε στους 250 °C με ρυθμό 8 °C ανά λεπτό. Ο ρυθμός ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 mL/min με όγκο έγχυσης 1 μL μαζί με οξικό αιθυλεστέρα. Ο χρόνος συγκράτησης ήταν 10,68 λεπτά. Για την ανίχνευση του μεταλλαξογόνου ENA, η αρχική θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 40 °C και η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 250 °C στους 10 °C ανά λεπτό. Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στο 1 mL/min. Ο όγκος ένεσης ήταν 1 μL ενώ ο χρόνος ιόντων παρατηρήθηκε ως 2,18

λεπτά. Ποσοτικά το ΕΝΑ προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας HPLC με αυτόματο εγχυτήρα, ολοκληρωτή και φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή μεταβλητού μήκους κύματος. Κινητή φάση νερού: χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη (85:15) για την εκτέλεση HPLC με ρυθμό ροής 1 mL/min με 1 μ L όγκου έγχυσης. Η ανίχνευση του μεταλλαξιογόνου επιτεύχθηκε στα 254 nm και ο χρόνος κατακράτησης καταγράφηκε στα 6,5 λεπτά (Binstok et al., 1998).

Η ανίχνευση μεταλλαξιογόνων όπως το DNMP και το NMAP έγινε με τεχνική HPLC χρησιμοποιώντας κινητή φάση μεθανόλης-νερού (1:9). Ο ρυθμός ροής διατηρήθηκε στα 2 mL/min με πίεση περίπου 15 psi. Η ανίχνευση μεταλλαξιογόνων έγινε στα 254 nm (Shu et al., 1991). Στη μελέτη των Molognoni et al. (2020) αναφέρεται η χρήση HPLC–DAD (ανιχνευτής συστοιχίας διόδων), φασματόμετρο AC-200F NMR (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός), 5500 QTRP υβριδικό τετραπολικό φασματοφωτόμετρο μάζας παγίδας ιόντων με ηλεκτροψεκασμό ιονιστή και 1290 infinity HPLCES- /MS/MS, 7100 τριχοειδές ηλεκτροφόρηση (CE) με DAD. Για την HPLC, η στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν δι-ισοπροπυλ-3-αμινοπροπυλ σιλάνιο συνδεδεμένο με υδροξυλιωμένο πυρίτιο, φαινυλ-εξύλιο ή C18 (Molognoni et al., 2020).

4.6 Δοκιμή μεταλλαξιογένεσης

Το 1966, οι Ames and Whitfield πρότειναν στελέχη αυξότροφων ιστιδίνης για τη διαλογή χημικών για μεταλλαξιογόνους παράγοντες χρησιμοποιώντας μέθοδο δοκιμής σημείου που χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως από τους Szybalski, Iyer and Szybalski για διαλογή μεταλλαξιογόνων με ένα στέλεχος *E. coli*. Η δοκιμή κηλίδας χρησιμοποιεί επιλεκτική πλάκα μέσου άγαρ που έχει σπαρθεί με τον εξεταζόμενο οργανισμό (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Αργότερα, αναπτύχθηκε η πιο ευαίσθητη διαδικασία προσδιορισμού ενσωμάτωσης πλακών. Αυτή η μέθοδος ενίσχυσε σημαντικά την ικανότητα των εργαστηρίων να δοκιμάζουν χημικές ουσίες για μεταλλαξιογένεση (Ames et al., 1975). Το 1983 εισήχθησαν επιπλέον στελέχη στόχοι όπως το στέλεχος μετατόπισης πλαισίου (TA97) και ένα στέλεχος που φέρει μια μετάλλαξη ώχρας σε ένα πλασμίδιο πολλαπλών αντιγράφων (TA102) στη μέθοδο που ασκήθηκε τότε. Το τεστ σαλμονέλας επικυρώθηκε επιστημονικά σε μια μελέτη

300 γνωστών χημικών ουσιών μέχρι το 1977 (Maron and Ames, 1983). Στη συνέχεια επικυρώθηκε παγκοσμίως και η χρήση του ξεκίνησε σε διάφορες χημικές βιομηχανίες.

Η μεταλλαξιογένεση οποιασδήποτε ένωσης δοκιμάστηκε μέσω της μεθόδου δοκιμής μεταλλαξιογένεσης *Salmonella*. Η μέθοδος ενσωμάτωσης πλακών χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μεταλλαξιογονικότητας των ύποπτων μεταλλαξιογόνων όπως MeIQx, PhIP και DiMeIQx, ενώ η μεταλλαξιογόνος δράση προσδιορίστηκε με υπολογισμό των re-vertants/g (Maron and Ames, 1983). Το στέλεχος δοκιμής *Salmonella typhimurium* TA98 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο μεταλλαξιογόνων. Η μέγιστη μεταλλαξιογόνος δράση παρατηρήθηκε σε επεξεργασμένα προϊόντα ψαριών σε σύγκριση με άλλα προϊόντα διατροφής, όπως μπιφτέκια κρέατος, ψητό κοτόπουλο και χοιρινό. Μερικά από τα δείγματα ψαριών έδειξαν ακόμη και την υψηλότερη συγκέντρωση PhIP με 0,5-5,5 ng/g ψαριού, αλλά ο παράγοντας που προκαλεί ισχυρή μεταλλαξιογόνο δραστηριότητα των ψαριών είναι ακόμα ασαφής (Tikkanen et al., 1993).

Για να επιταχυνθεί η διαδικασία της δοκιμής μεταλλαξιογένεσης προστέθηκε μεταβολική ενεργοποίηση μεταλλαξιογόνων. Για παράδειγμα, η προσθήκη ενισχυμένων ηπατικών μικροσωμάτων ενισχύει τη μεταβολική ενεργοποίηση. Μια μελέτη ανέφερε τη χρήση του τεστ Ames για τον προσδιορισμό της μεταλλαξιογένεσης των προϊόντων διατροφής μέσω της χρήσης του στελέχους *Salmonella typhimurium* 1538, TA98 και TA100 ως δοκιμαστικών οργανισμών (Krone and Iwaoka, 1983). Τα δείγματα τροφής δοκιμάστηκαν παρουσία και απουσία παρασκευάσματος μικροσωμάτων ήπατος αρουραίου που προκλήθηκε από Aroclor (80 μ L). Μεταξύ των δειγμάτων τροφίμων που μελετήθηκαν, τα τηγανητά κομμάτια ψαριού βρέθηκαν να είναι πιο μεταλλαξιογόνα με αναλογία μεταλλαξιογόνου δραστηριότητας (MAR) 1,8 για το όξινο οξύ, ενώ 2,2 για το βασικό εκχύλισμα. Ωστόσο, αυτό θεωρήθηκε επίσης ως μη μεταλλαξιογόνο επειδή τα κριτήρια που χρησιμοποίησαν έδειξαν θετική ανταπόκριση έως MAR 2,5.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι εάν τα δείγματα τροφίμων θερμάνθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα αυξάνεται ο κίνδυνος μεταλλαξιογένεσης. Το βόειο κρέας και τα σχετικά προϊόντα διατροφής (ζωμός βόειου κρέατος με MAR 13) βρέθηκε ότι είναι πιο μεταλλαξιογόνο σε σύγκριση με άλλα προϊόντα διατροφής, όπως ο ροζ σολομός (με MAR 17.6).

Στην περίπτωση των κονσερβοποιημένων τροφίμων, παρατηρήθηκε ότι η προεπεξεργασία με ατμό και κατάψυξη είναι επιβλαβής για την ανθρώπινη υγεία, καθώς ενισχύει την τάση μεταλλαξιογένεσης. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν κατά τη διεξαγωγή βιοδοκιμασίας χρησιμοποιώντας στέλεχος *Salmonella typhimurium* TA98 με ομογενοποίηση ήπατος αρουραίου S-9 που προκαλείται από Aroclor για να προκληθεί μεταβολική ενεργοποίηση και τα αποτελέσματα αναφέρθηκαν ως αναστροφικές αποικίες (Stavric et al., 1997).

Οι χημικές ουσίες τροφίμων που είναι θετικές με τη δοκιμή AMES είναι γενικά καρκινογόνες, αλλά η συσχέτιση δεν είναι οριστική. Υπάρχουν ορισμένες καρκινογόνες χημικές ουσίες που σχηματίζονται από την επεξεργασία τροφίμων που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή *Salmonella* AMES επειδή δρουν μέσω διαφόρων άλλων, μη γονιδιοτοξικών μηχανισμών ή μηχανισμών που απουσιάζουν σε αυτό το βακτηριακό είδος. Διαπιστώθηκε επίσης ότι ορισμένα ειδικά μεταλλαξιογόνα που δεν ανιχνεύονται πάντα με τη μέθοδο ενσωμάτωσης / προεπάσης πλακών και απαιτούν εναλλακτικές διαδικασίες (OECD 2020).

Η χρησιμότητα των δοκιμών μεταλλαξιογένεσης στον εντοπισμό χημικών καρκινογόνων ουσιών και η επακόλουθη απομάκρυνση αυτών των ενώσεων από προϊόντα στα οποία εκτίθενται οι άνθρωποι μπορεί να επεξηγηθεί από πολλά ιστορικά παραδείγματα. Αυτά θα περιλαμβάνουν τα συντηρητικά τροφίμων 2-(2-φουρυλ)-3-(5-νιτροφουρυλ)ακρυλαμίδιο (AF-2), το οποίο χρησιμοποιήθηκε εκτενώς στην Ιαπωνία, το επιβραδυντικό φλόγας χημικό τρις(2, 3-διβρωμοπροπυλ)φωσφορικό άλας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε παιδικά ενδύματα ύπνου στις Ηνωμένες Πολιτείες και το συστατικό βαφής μαλλιών 2, 4-διαμινοανισόλη. Το γεγονός ότι οι απλές δοκιμές μεταλλαξιογένεσης προέβλεψαν σωστά τη δυνατότητα καρκινογένεσης αυτών των χημικών ουσιών ενισχύει την θεωρία ότι τα δεδομένα μεταλλαξιογένεσης μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών (Maron and Ames, 1983).

Όπως προαναφέρθηκε, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη από τις δοκιμασίες μεταλλαξιογένεσης είναι η δοκιμή ενσωμάτωσης πλακών σαλμονέλας, κοινώς γνωστή ως δοκιμή Ames. Σε αυτή τη δοκιμασία, μια χημική ουσία ελέγχεται για την ικανότητά της να προκαλεί μεταλλάξεις σε διαφορετικά στελέχη του βακτηρίου *Salmonella typhimurium*. Τα περισσότερα χημικά καρκινογόνα και μεταλλαξιογόνα δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το DNA, ενώ απαιτείται αλλοίωση από ένζυμα για να ενεργοποιηθούν. Αυτή η διαδικασία

«μεταβολικής ενεργοποίησης» συνήθως δεν μπορεί να επιτευχθεί από ένζυμα που υπάρχουν στα βακτήρια. Ως εκ τούτου, στο τεστ *Salmonella*, ένα εκχύλισμα συκωτιού θηλαστικού προστίθεται για να παρέχει τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη μεταβολική ενεργοποίηση (Maron and Ames, 1983).

Πολλά μεταλλαξιογόνα συστήματα δοκιμών εκτός του *S. typhimurium* έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο χημικών ουσιών. Οι δοκιμασίες μεταλλαξιογένεσης έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ χημικών ουσιών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ανακάλυψη τόσο των μεταλλαξιογόνων παραγόντων, τα οποία ενισχύουν τη μεταλλαξιογόνο δράση άλλων χημικών ουσιών, όσο και των αναστολέων της μεταλλαξιογένεσης. Η γνώση ότι μια χημική ουσία είναι ένας μεταλλαξιογόνος παράγοντας ή ένας αναστολέας της μεταλλαξιογένεσης παρέχει ένα χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση της μεταβολικής μοίρας και των γενετικών αλληλεπιδράσεων των χημικών ουσιών (Maron and Ames, 1983).

4.7 Μικροβιακός μετασχηματισμός μεταλλαξιογόνων

Για τον βιομετασχηματισμό μεταλλαξιογόνων τροφίμων, όπως ENA και DNMP, που σχηματίστηκαν λόγω αντίδρασης μεταξύ νιτρώδους και σορβικού, το μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001. Αυτό το στέλεχος προτιμήθηκε λόγω της χρήσης του μικροβίου ως καλλιέργεια εκκίνησης σε η διαδικασία ζύμωσης του κρέατος (Molognoni et al., 2019). Το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη επανενεργοποιήθηκε μια νύχτα πριν από το πείραμα και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε δύναμη 3800 g στους 4 °C για 10 λεπτά. Το ληφθέν σφαιρίδιο πλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES (4-(2-υδροξυαιθυλ)-1-πιπεραζινοαιθανοσουλφονικό οξύ 0,1 mol/L. Η κυτταρική πυκνότητα αξιολογήθηκε με τη βοήθεια ενός φασματοφωτόμετρου μέσω του υπολογισμού της μετάδοσης ή της απορρόφησης του φωτός για να ληφθούν ~ 108 κύτταρα/mL. 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος HEPES χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή κυτταρικού εναιωρήματος. Για τη διερεύνηση της ικανότητας μικροβιακής μεταμόρφωσης του στελέχους *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001, η καλλιέργεια που αναπτύχθηκε με την προαναφερθείσα μέθοδο εμβολιάστηκε με το δοκιμαστικό μεταλλαξιογόνο δείγμα (ENA και DNMP). Τα δείγματα δοκιμής που

χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μεταλλαξιογόνου ήταν δύο τύπων: το ένα παρήχθη χημικά στο εργαστήριο και το άλλο προέρχεται από μορταδέλα. Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν προφανές ότι το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 ήταν ικανό να αποικοδομεί ισχυρούς μεταλλαξιογόνους παράγοντες, όπως το ENA και το DNMP, που παρήχθησαν από την αντίδραση μεταξύ νιτρώδους και σορβικού. Το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 αναφέρθηκε επίσης για την αποικοδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων καθώς και βιογενών αμινών (Bartkiene et al., 2017).

Επιπλέον, αναφέρθηκε για την παραγωγή νιτρορεδουκτάσης, ενός ενζύμου που έχει την ικανότητα να δρα ως καταλύτης στην αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων ($\text{NADH} \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$). Αυτή η αντίδραση βοηθά στη μετατροπή της C-nitro ομάδας της ένωσης σε C-νιτρώδη μορφή μέχρι να σχηματιστούν υποκατάστατες αμίνες. Το αποτέλεσμα αξιολογήθηκε με βάση την ανίχνευση NMAP στο μέσο αντίδρασης. Το δείγμα δοκιμής ανέφερε επίσης την απώλεια της μεταλλαξιογόνου δράσης του DNMP κατά τη δοκιμή μεταλλαξιογένεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 μπορεί να αποικοδομήσει ~80% του μεταλλαξιογόνου περιεχομένου των δειγμάτων τροφίμων σε διάστημα 5 λεπτών, το οποίο βασίστηκε στην κινητική ανάλυση. Επιπρόσθετα, αναφέρθηκε ότι όταν προστέθηκαν εξωτερικά 100 μg/kg μεταλλαξιογόνων, το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 μετέτρεψε το 100% των μεταλλαξιογόνων σε διάστημα 20 λεπτών (Molognoni et al., 2019).

Στη μελέτη των Motta et al. (2020) παρουσιάστηκε η λειτουργία του μη ευαίσθητου στο οξυγόνο ενζύμου νιτρορεδουκτάσης τύπου I B για τη βιομετατροπή του DNMP σε NMAP. Ο τύπος I σημαίνει ότι το ένζυμο μπορεί να μειώσει την νιτροομάδα είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου και το B αντιπροσωπεύει ότι το ένζυμο χρησιμοποιεί NADH και NADPH ως πηγή ηλεκτρονίων. Οι οργανισμοί που βρέθηκαν υπεύθυνοι για τη δραστηριότητα ήταν ο *Staphylococcus xylosus* LYOCARNI SXH-01, ο *Lactobacillus fermentum* LB-UFSC 0017 και ο *Lactobacillus casei* LB-UFSC 0019 (Motta et al., 2020).

Η μελέτη των Shu et al. (1991) παρουσίασε την ικανότητα μετατροπής διαφόρων μικροβίων υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες του DNMP σε NMAP. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη ήταν εντερικής προέλευσης, επομένως συλλέχθηκαν από κόπρανα. Το δείγμα αραιώθηκε έως 25 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 0,1 M σε pH 7,6. Σε αυτό προστέθηκαν 10 mg DNMP διαλυμένα σε 0,5 mL DMSO. Αργότερα τα

παρασκευασμένα δείγματα διατηρήθηκαν σε αναερόβια κατάσταση για 24 ώρες και ακολούθησε εκχύλιση με τη βοήθεια οξικού αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο *Bacillus thtaiotaomicron* VPI, το κύριο ανθρώπινο εντερικό βακτήριο έχει την ικανότητα να μεταβολίζει το DNMP. Αυτό προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η τιμή Rf βρέθηκε να είναι 0,26 για το DNMP. Ο σχηματισμός του NMAP προσδιορίστηκε μέσω φασμάτων μάζας CI, NMR και φασματικών δεδομένων UV. Εντερικά βακτηριακά είδη όπως *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* και *Peptostreptococcus* sp. Έδειξαν θετικά αποτελέσματα για το μεταβολισμό DNMP. Αναφέρθηκε επίσης ότι μέσα σε 10–20 λεπτά το στέλεχος *Bacillus thtaiotaomicron* VPI ξεκίνησε τη μετατροπή του DNMP σε NMAP και έφτασε σε σταθερή κατάσταση σε 4 ώρες (Shu et al., 1991).

Το PhIP, μια από τις άφθονες ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες που βρίσκονται στο μαγειρεμένο κρέας, μπορεί να αποικοδομηθεί με τη βοήθεια της ανθρώπινης μικροχλωρίδας του εντέρου. Ένας τέτοιος αποτελεσματικός μικροοργανισμός είναι το *Eubacterium hallii*. Διαπιστώθηκε ότι στο εγγύς κόλον το *E. hallii* μαζί με άλλη μικροχλωρίδα μπορεί να μετατρέψει το PhIP σε PhIP-M1 με 300 φορές αυξημένη αποτελεσματικότητα (Fekry et al., 2016). Τέλος, στη μελέτη των Beer et al. (2019) αναφέρθηκε η μετατροπή άλλων ετεροκυκλικών αρωματικών ενώσεων όπως AaC, Trp-P-1, harman, norharman, PhIP, MeIQx και MeIQ με τη βοήθεια της μικροχλωρίδας των ανθρώπινων κοπράνων.

4.8 Μεταβολική οδός μικροβιακής μετατροπής

Λίγες μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο μικροβιακός μετασχηματισμός μεταλλαξιγόνων λαμβάνει χώρα μέσω ορισμένων μεταβολικών οδών. Η οδός αποτελείται από αντίστροφη ροή ηλεκτρονίων λόγω της παράλειψης της C-nitro ομάδας και της παρουσίας της N-nitro ομάδας στο NMAP. Αυτή η αντίδραση περιλάμβανε επακόλουθη μετατόπιση δύο ηλεκτρονίων, ενώ η μετατόπιση μόνο ενός ηλεκτρονίου μπορεί να προκαλέσει ρίζες υπεροξειδίου που μπορούν να αναμορφώσουν το DNMP. Το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 χρειάστηκε μόνο 30 λεπτά για τον μετασχηματισμό του DNMP υπό όλες τις πειραματικές συνθήκες. Η νιτρορεδουκτάση από αυτό το στέλεχος μπορεί να

καταλύσει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NAD(P)H για τη δημιουργία συστατικών όπως NMAP, NPYR, κ.λπ. (Molognoni et al., 2020).

Παρόμοια με το DNMP, το ENA μειώθηκε επίσης σε μορφές που έχουν λιγότερη ή καθόλου μεταλλαξιογόνο δράση από το στέλεχος *Lactobacillus bulgaricus* LB-UFSC 001 χρησιμοποιώντας νιτρορεδουκτάση και αυτό έγινε εμφανές με την παρουσία NO_2^- , NO_3^- και ορισμένων ενδιάμεσων νιτριλίων Οξειδίου της ακετόνης (ACNO). Αναλυτικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η μετατροπή του ENA συμβαίνει λόγω πυρηνόφιλης προσβολής μέσω άνθρακα και όχι από άζωτο του ACNO. Τα σταθερά ενδιάμεσα που σχηματίζονται στην αντίδραση έχουν ισχυρό δεσμό C=O, επομένως είναι ικανά να σχηματίσουν τελικό προϊόν ακετυλοχολίνη (ACH). Αυτή η παρατήρηση έδειξε ότι μαζί με τη νιτρορεδουκτάση, οι υδραλάσεις του νιτριλίου λειτούργησαν επίσης για τη βιομετατροπή του ENA. Το τελικό προϊόν ACH είναι μη μεταλλαξιογόνο, επομένως χρησιμοποιείται ως κλινικό προϊόν για την αναστολή της ουρεάσης (Fournier et al., 2006).

Το NDMA (N-Nitrosodimethylamine), ένα ισχυρό καρκινογόνο που βρίσκεται στο πόσιμο νερό, μπορεί να μεταβολιστεί μέσω της οδού T4MO. Αυτή η οδός μετατρέπει το NDMA σε NTDMA (N-νιτροδιμεθυλαμίνη) και στη συνέχεια σε φορμαλδεΰδη και N-νιτρομεθυλαμίνη. Αυτά τα αποτελέσματα ελήφθησαν χρησιμοποιώντας *Pseudomonas mendocina* (Fournier et al., 2006).

Μια ετεροκυκλική αρωματική αμίνη, μπορεί να μετατραπεί σε PhIP-M1 με τη βοήθεια μιας μικροχλωρίδας του εντέρου που ονομάζεται *E. hallii*. Η μετατροπή λαμβάνει χώρα μέσω της οδού μεταβολισμού της γλυκερίνης. Η γλυκερίνη μεταβολίζεται στο έντερο σε 3-υδροξυπροπιοναλδεΰδη (3-HPA) με τη βοήθεια οργανισμών όπως το *Lactobacillus reuteri* και το είδος *Enterococcus*. Το ενδιάμεσο 3-HPA στη συνέχεια αντιδρά με το PhIP για να σχηματίσει PhIP-M1. Η οδός της βιομετατροπής απαιτεί αφυδατάση γλυκερόλης/διόλης (GDH) (Fekry et al., 2016).

Στη μελέτη των Zhang et al., (2019) αναπτύχθηκε η οδός και αναφέρθηκε η δράση δύο ενζύμων για τη μετατροπή του PhIP σε PhIP-M1. Το PhIP βρίσκεται στο έντερο με τη μορφή PhIP-G (PhIP-glucuronide) το οποίο μεταβολίζεται σε PhIP με τη βοήθεια ενός ενζύμου βήτα-γλυκουρονιδάση (B-GUS), που εκκρίνεται από το *Faecalibacterium prausnitzii*. Στη συνέχεια, το PhIP μετατρέπεται σε PhIP-M1 μετά από αντίδραση με το 3-HPA, το οποίο σχηματίζεται από τη γλυκερίνη με τη βοήθεια ενός άλλου ενζύμου

αφυδρατάση γλυκερόλης/διόλης (GDH), που εκκρίνεται από τα *E. hallii*, *Flavonifractor plautii*, *Blautia obeum* και *Lactobacillus reuteri*. Είναι ο συνδυασμός του μικροβιώματος που παράγει B-GUS και GDH που βοηθά στη βιομετατροπή ενός πιθανού μεταλλαξιογόνου PhIP.

Στη μελέτη των Beer et al. (2019) αναφέρθηκε η αποικοδόμηση διαφόρων ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών όπως AaC, Trp-P-1, harman, norharman, PhIP, MeIQx και MeIQ με τη συμμετοχή της ρευτερίνης. Όταν η γλυκερίνη μεταβολίζεται στο έντερο, με τη βοήθεια μικροοργανισμών του εντέρου, σχηματίζει 3-HPA, ακρολεΐνη και ρευτερίνη. Το Reuterin αντιδρά με αυτές τις ενώσεις και οδηγεί στη βιομετατροπή τους. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει αφυδάτωση, αναγωγή, οξείδωση, μικροβιακή αναγωγή και μικροβιακή υδροξυλίωση.

Από την αξιολόγηση διαφόρων προϊόντων διατροφής, ήταν προφανές ότι αρκετές χημικές ουσίες όπως N-nitroso, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες, φαινολικές ενώσεις, φλαβονοειδή, πρόσθετα τροφίμων, κινίνες και τα παράγωγά τους μπορούν να εισέλθουν στα τρόφιμα είτε ηθελημένα ή ακούσια και μπορεί να προκαλέσουν μεγάλη βλάβη στο μεταβολικό σύστημα. Ωστόσο, πολλές τέτοιες χημικές ουσίες υπάρχουν στα τρόφιμα των οποίων η συγκέντρωση είναι πολύ χαμηλή για ανίχνευση ή ποσοτικοποίηση. Αυτά τα μεταλλαξιογόνα σχηματίζονται κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινες συνθήκες. Αυτά τα μεταλλαξιογόνα μπορούν να εξαχθούν και να αναλυθούν χρησιμοποιώντας αναλυτικές τεχνικές όπως HPLC, LC-MS και GC-MS.

5 Εργασία QSAR

5.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Ο όρος «γεύση τροφίμων» αναφέρεται σε μια φυσική ή συνθετική χημική ουσία που υπάρχει ως αρωματικό συστατικό των τροφίμων. Είναι σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους χημικές ουσίες που αποτελούνται κυρίως από άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο και θείο και συχνά έχουν συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες. Στην Ιαπωνία, για παράδειγμα, οι περισσότερες γεύσεις τροφίμων ταξινομούνται σε 18 τύπους ανάλογα με τη χημική τους δομή και επί του παρόντος, έχουν καταχωρηθεί περίπου 3.230 μεμονωμένες γεύσεις τροφίμων (Okamura et al., 2015). Εν τω μεταξύ, περίπου 2300 γεύσεις και 2500 γεύσεις χρησιμοποιούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη, αντίστοιχα, και περίπου 1800 γεύσεις είναι κοινές και στις τρεις περιοχές (Konishi et al., 2014). Ο λόγος για την ανισότητα μεταξύ των περιοχών είναι η διαφορά στην αξιολόγηση ασφάλειας.

Παρόλο που στην καθημερινή χρήση αναμειγνύονται και χρησιμοποιούνται έως και εκατοντάδες αρώματα, η ποσότητα κάθε γεύσης που προστίθεται στα τρόφιμα είναι της τάξης του επιπέδου ppb ή ppm. Επομένως, δεν υπάρχει ανησυχία για τη γενική τοξικότητα αυτών των ουσιών, επειδή πολλές ουσίες έχουν ένα επίπεδο κάτω από το οποίο δεν παρατηρούνται τοξικές επιδράσεις (Honma et al., 2016). Ωστόσο, όσον αφορά τη μεταλλαξιογένεση, προκύπτουν ανησυχίες για την υγεία ακόμη και με ελάχιστες ποσότητες. Οι μεταλλαξιογόνες χημικές ουσίες βλάπτουν το DNA, προκαλούν μεταλλάξεις και προκαλούν καρκίνο (Chatterjee & Walker, 2017). Δεδομένου ότι ο κίνδυνος καρκινογένεσης δεν φτάνει ποτέ στο μηδέν, η πρόσληψη μεταλλαξιογόνων χημικών ουσιών απαιτεί αυστηρό έλεγχο, ακόμη και σε εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες.

Η Μικτή Επιτροπή Εμπειρογνομόνων FAO/ΠΟΥ για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA) δηλώνει ότι οποιαδήποτε τοξικότητα, συμπεριλαμβανομένης της μεταλλαξιογένεσης, δεν προκαλεί ανησυχία εάν το επίπεδο έκθεσης είναι κάτω από το όριο ανησυχίας τοξικότητας (TTC) (Kroes et al., 2000). Ωστόσο, η παρουσία ή η απουσία μεταλλαξιογένεσης δημιουργεί συχνά πρόβλημα εάν η αξιολόγηση της έκθεσης δεν διενεργηθεί κατάλληλα. Επομένως, η αξιολόγηση της ασφάλειας των γεύσεων των τροφίμων απαιτεί σχετικές δοκιμές μεταλλαξιογένεσης.

Το τεστ βακτηριακής αντίστροφης μετάλλαξης (δοκιμή Ames) είναι μια σημαντική δοκιμή μεταλλαξιογένεσης, αλλά απαιτεί περίπου 2 g δείγματος για μια μελέτη εύρεσης δόσης (Mortelmans & Zeiger, 2000). Από την άλλη πλευρά, η ποσότητα της γεύσης που παράγεται βιομηχανικά είναι εξαιρετικά μικρή, καθιστώντας συχνά αδύνατη τη δοκιμή. Εξάλλου, η περίεργη μυρωδιά ορισμένων γεύσεων μερικές φορές δυσκολεύει την πραγματοποίηση της δοκιμής στο εργαστήριο. Ως εκ τούτου, απαιτείται ένα αποτελεσματικό εργαλείο διαλογής που αξιολογεί έγκαιρα και με ακρίβεια τη μεταλλαξιογένεση των γεύσεων χωρίς τη διενέργεια δοκιμής Ames.

5.2 Ορισμός QSAR

Η (Quantitative) Σχέση Δομής-Δραστηριότητας (Quantitative) Structure–Activity Relationship (Q)SAR) είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την πρόβλεψη των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων των χημικών ουσιών με βάση τη δομή τους χωρίς τη διενέργεια τοξικολογικών μελετών (Benigni & Bossa, 2011). Πιο αναλυτικά, ένα QSAR είναι ένα μαθηματικό μοντέλο που συσχετίζει ποσοτικά ένα ποσοτικό αριθμητικό μέτρο της χημικής δομής, όπως για παράδειγμα μια φυσικοχημική ιδιότητα, με μια φυσική ιδιότητα ή με ένα βιολογικό αποτέλεσμα, όπως για παράδειγμα ένα τοξικολογικό τελικό σημείο.

Έχει επενδυθεί μεγάλη προσπάθεια στην ανάπτυξη εργαλείων SAR (Q) για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames (μεταξύ άλλων τοξικολογικών καταληκτικών σημείων) λόγω των μεγάλων ποσοτήτων δεδομένων δοκιμών Ames που έχουν ήδη συσσωρευτεί (Honma et al., 2020). Πολλά εργαλεία SAR (Q) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης υποψήφιων φαρμακευτικών προϊόντων, χημικών τροφίμων, βιομηχανικών χημικών, περιβαλλοντικών ρύπων κ.λπ. (Felton et al., 2007). Η κατευθυντήρια γραμμή ICH-M7 συνιστά τη χρήση δύο εργαλείων SAR (Q) που αλληλοσυμπληρώνονται, ένα με βάση κανόνες και ένα με βάση στατιστικά, για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης του Ames (Jacobson-Kram & Contera, 2007).

5.3 Εργαλεία QSAR

Το Derek Nexus είναι ένα εμπορικό λογισμικό βασισμένο στη γνώση που αναπτύχθηκε από τη Lhasa Limited, UK (Barber et al., 2016; Williams et al., 2016). Περιλαμβάνει κανόνες γνώσης που δημιουργήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη πληροφορίες που σχετίζονται με δομικό συναγερμό (SA), παραδείγματα χημικών ενώσεων και μεταβολικές ενεργοποιήσεις και μηχανισμούς. Αυτοί οι κανόνες γνώσης αναπτύσσονται συνεχώς με την παροχή δεδομένων και γνώσεων από ιδιωτικές εταιρείες, πανεπιστήμια, δημόσια ερευνητικά ιδρύματα και μη κερδοσκοπικούς οργανισμούς. Το Derek Nexus συγκρίνει το χημικό ερώτημα με τα τοξικοφόρα (δηλαδή, μια δομή που υποτίθεται ότι εμπλέκεται στη μεταλλαξιογένεση) που κωδικοποιείται στη βάση γνώσεων. Εάν το ερώτημα ενεργοποιεί μια SA, το Derek Nexus κατατάσσει την πιθανότητα μεταλλαξιογένεσης (βέβαιη, πιθανή, εύλογη, διφορούμενη, αμφίβολη, απίθανη, αδύνατη, ανοιχτή, αντικρουόμενη, τίποτα για αναφορά) εφαρμόζοντας έναν «κανόνα συλλογισμού». Όταν είναι «βέβαιο», «πιθανό», «εύλογο» ή «αμφίβολο», η χημική ουσία του ερωτήματος προβλέπεται ως θετική στη δοκιμή Ames. Το Derek Nexus ενημερώνεται περίπου μία φορά το χρόνο.

Το CASE Ultra είναι ένα λογισμικό πρόβλεψης τοξικότητας που βασίζεται σε QSAR που αναπτύχθηκε από την MultiCASE Inc., ΗΠΑ. Το CASE Ultra χρησιμοποιεί μια στατιστική μέθοδο για την αυτόματη εξαγωγή ειδοποιήσεων με βάση τα δεδομένα εκπαίδευσης χρησιμοποιώντας τεχνολογία μηχανικής εκμάθησης. Τα δεδομένα που απαιτούνται για την εκπαίδευση είναι οι χημικές δομές και οι ετικέτες τοξικότητάς τους (Landry et al., 2019). Ο βαθμός τοξικότητας που προβλέπεται για την υπό εξέταση χημική ουσία εξαρτάται όχι μόνο από την καθορισμένη προειδοποίηση, αλλά και από το δομικό περιβάλλον γύρω από την προειδοποίηση. Τα δομικά χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος συναγερμού ονομάζονται «διαμορφωτές» και αυτό μαθαίνεται αυτόματα από τα δεδομένα εκπαίδευσης. Σε αυτόν τον αλγόριθμο, για την κατασκευή ενός μοντέλου QSAR με συνεχή καταληκτικά σημεία τοξικότητας, χρησιμοποιούνται διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι.

Το ICH κυκλοφόρησε πρόσφατα την κατευθυντήρια γραμμή ICH-M7 για την αξιολόγηση και τον έλεγχο των μεταλλαξιογόνων ουσιών σε φαρμακευτικά προϊόντα για τον περιορισμό του πιθανού καρκινογόνου κινδύνου (ICH-M7, 2017). Αυτή η κατευθυντήρια γραμμή επιτρέπει τη χρήση των εργαλείων SAR (Q) για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames για την αρχική αξιολόγηση των προσμείξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα. Αυτή η προσέγγιση είναι λογική επειδή τα φαρμακευτικά

προϊόντα έχουν συνήθως πολύ χαμηλά επίπεδα ουσιών, γεγονός που τα καθιστά δύσκολο να απομονωθούν και να καθαριστούν για τη δοκιμή Ames.

Η δοκιμή μεταλλαξιογένεσης Ames για χημικές ουσίες γεύσης είναι επίσης δύσκολη να διενεργηθεί στις περισσότερες περιπτώσεις. Όπως προαναφέρθηκε, αυτό οφείλεται στις πολύ χαμηλές ποσότητες παραγωγής, που δυσκολεύουν την απόκτηση επαρκούς ποσότητας χημικής ουσίας για τη διεξαγωγή της τοξικολογικής μελέτης, και στην έντονη μυρωδιά, που καθιστά επίπονη τη διεξαγωγή της πραγματικής δοκιμής στο εργαστήριο. Κατά συνέπεια, η ασφάλεια πολλών χημικών γευστικών ουσιών δεν έχει αξιολογηθεί με ακρίβεια.

Στη μελέτη των Ono et al. (2012) αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των εργαλείων SAR (Q) υπολογίζοντας τη μεταλλαξιογένεση Ames 367 χημικών ουσιών γεύσης (για τις οποίες ήταν διαθέσιμα αποτελέσματα δοκιμών Ames) χρησιμοποιώντας τρία (Q) εργαλεία SAR, συμπεριλαμβανομένων των Derek for Windows και MultiCASE, που είναι παλιά μοντέλα των Derek Nexus και CASE Ultra, αντίστοιχα. Και τα τρία εργαλεία SAR (Q) είχαν χαμηλή (14–39%) ευαισθησία (την ικανότητα ενός εργαλείου SAR (Q) να ανιχνεύει σωστά τις θετικές χημικές ουσίες Ames), καθώς και χαμηλή (32–39%) θετική τιμή πρόβλεψης (η συχνότητα των σωστών θετικών προβλέψεων) (Ono et al., 2012). Αυτά τα αποτελέσματα υποδήλωναν ότι η εφαρμογή των εργαλείων SAR (Q) για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης των χημικών γεύσεων του Ames ήταν ακόμη πρόωρη.

Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, η προγνωστική ισχύς των εργαλείων SAR Ames (Q) έχει βελτιωθεί. Οι Honma et al. (2020) διεξήγαγαν το Ames/(Q) SAR International Challenge Project με 12 (Q) προμηθευτές SAR για να επικυρώσουν και να βελτιώσουν την πρόβλεψη μεταλλαξιογένεσης Ames των εργαλείων τους από το 2014 έως το 2017. Μια μεγάλη νέα βάση δεδομένων δοκιμών Ames (12.140 χημικές ουσίες) στο ινστιτούτο του βελτίωσε την ικανότητα πρόβλεψης των εργαλείων SAR (Q), οδηγώντας στην επιτυχία του έργου. Η Lhasa limited και η MultiCASE Inc. συμμετείχαν επίσης σε αυτό το έργο και αυτή η μελέτη χρησιμοποιήθηκε στα Derek Nexus και CASE Ultra για να αποκτήσουν υψηλότερη ισχύ πρόβλεψης από ό,τι με τα παλιά τους μοντέλα του 2012 (Honma et al., 2019).

Η κατευθυντήρια γραμμή ICH-M7 συνιστά τη χρήση δύο εργαλείων SAR (Q) που αλληλοσυμπληρώνονται, ένα με βάση κανόνες και ένα στατιστικά, για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης του Ames και αναφέρει ότι μια αρνητική πρόβλεψη και από τα δύο

εργαλεία SAR (Q) θα πρέπει οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει μεταλλαξιογόνος ανησυχία (ICH-M7, 2017).

Στη μελέτη των Honma et al. (2020), χρησιμοποιήθηκε το Derek Nexus έκδοση 6.0.1 ως εργαλείο SAR που βασίζεται σε κανόνες και το CASE Ultra έκδοση 1.6.2.1 ως εργαλείο QSAR που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία. Ωστόσο, η έκδοση 1.6.2.1 CASE Ultra είναι εξοπλισμένη τόσο με ενότητες που βασίζονται σε στατιστικά στοιχεία όσο και με μια ενότητα βασισμένη σε κανόνες (GT_EXPERT). Αυτός μπορεί να είναι ο λόγος για τον οποίο το CASE Ultra απέδωσε περισσότερες χημικές ουσίες θετικής γεύσης από το Derek Nexus. Ως εκ τούτου, ο έλεγχος σε αυτή τη μελέτη μπορεί να θεωρηθεί ως ένας συνδυασμός δύο SAR που βασίζονται σε κανόνες και ενός QSAR βάσει στατιστικών, το οποίο είναι πιο συντηρητικό από αυτό που συνιστά το ICH-M7. Αυτή η προσέγγιση απέκλεισε 3575 χημικές ουσίες γεύσης (91%) ως μη μεταλλαξιογόνες ουσίες που είναι σύμφωνο με την μελέτη των Landry et al. (2019) ότι περίπου το 85% των νέων βιομηχανικών χημικών ουσιών είναι αρνητικά στη δοκιμή Ames. Λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιότητες των χημικών ουσιών γεύσης (χαμηλό μοριακό βάρος, περιορισμένα στοιχεία, περιορισμένη χημική δομή), είναι λιγότερο πιθανό να είναι μεταλλαξιογόνες από τις γενικές βιομηχανικές χημικές ουσίες. Ως εκ τούτου, η απουσία μεταλλαξιογένεσης στο 91% των γεύσεων στη μελέτη των Honma et al. (2020) είναι αξιόπιστη και δείχνει τη συνάφεια των συνδυασμένων εργαλείων SAR (Q) για τον έλεγχο της μεταλλαξιογένεσης Ames των χημικών ουσιών γεύσης.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ανησυχίες για τη μεταλλαξιογένεση των υπόλοιπων 367 χημικών (9%). Σύμφωνα με το ICH-M7, εάν μια χημική ουσία προβλέπεται ότι έχει δυνατότητα μεταλλαξιογένεσης από τουλάχιστον ένα από τα δύο (Q) εργαλεία SAR, θεωρείται μεταλλαξιογόνο. Επομένως, για να επαληθευτεί η μεταλλαξιογένεση αυτών των 367 χημικών ουσιών, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί πραγματικά η δοκιμή Ames. Από αυτές, 75 χημικές ουσίες προβλέφθηκαν θετικές και στα δύο εργαλεία SAR (Q), τα οποία είναι πιθανό να είναι μεταλλαξιογόνα στη δοκιμή Ames. Από αυτές, επιλέχθηκαν δέκα χημικές ουσίες και πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές Ames και εννέα χημικές ουσίες ήταν θετικές (90%), υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός των εργαλείων SAR (Q) μπορεί να αναγνωρίσει με ακρίβεια μεταλλαξιογόνες χημικές ουσίες γεύσης (Honma et al., 2020).

Μετά τη δοκιμή Ames, υπολογίστηκε εκ νέου η μεταλλαξιογένεση Ames των δέκα χημικών ουσιών από την τελευταία έκδοση του Derek Nexus (έκδοση 6.1.0) και του CASE Ultra

(έκδοση 1.8.0.2). Η μόνη μονάδα που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία σε αυτήν την έκδοση του CASE Ultra είναι η GT1_BMUT. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τον Derek Nexus ήταν τα ίδια με αυτά της προηγούμενης έκδοσης, ενώ το CASE Ultra 1.8.0.2 έδωσε αρνητικές προβλέψεις για 4-μεθοξυ-2,5-διμεθυλ-3(2H)-φουρανόνη (IV) και 2,5-Οξικός διμεθυλ-4-οξο-3(5H)-φουρυλεστέρας (V), και ασαφής για μυρμηκικό φουρφορυλεστέρας (VII). Αυτές οι τρεις χημικές ουσίες έχουν δομή φουρανίου και ο μεταλλαξιογόνος μηχανισμός τους παραμένει ασαφής (Honma et al., 2020).

Η 2-[(μεθυλθειο) μεθυλ]-2-βουτενάλη (I) και η 4-μεθυλ-2-πεντενάλη (III), που είναι αλειφατικές ανώτερες αλδεΐδες που περιέχουν α, β-ακόρεστο καρβονύλιο, ήταν θετικά στο TA100 τόσο παρουσία όσο και απουσία S9mix. Η 4-μεθυλ-2-πεντενάλη (III) έδειξε ισχυρή μεταλλαξιογένεση με 1340 RAV σε TA100 απουσία S9mix. Τα α, β-ακόρεστα καρβονύλια είναι δις ηλεκτρόφιλα που μπορούν να αντιδράσουν με πλούσια σε ηλεκτρόνια βιολογικά μακρομόρια. Εκτός από τον άνθρακα της λειτουργικής ομάδας καρβονυλίου, ο β-άνθρακας είναι θετικά πολωμένος λόγω της σύζευξης με την καρβονυλική ομάδα, καθιστώντας τον μια προτιμώμενη θέση για μια πυρηνόφιλη επίθεση όπως η κλασική προσθήκη τύπου Michael (Koleva et al., 2008). Εκτός από τα κοινά δομικά τους χαρακτηριστικά, αυτά τα α, β-ακόρεστα καρβονύλια μπορούν το καθένα να αλληλεπιδράσει με το DNA με τον δικό του τρόπο, προκαλώντας διαφορετικές γονοτοξικές και μεταλλαξιογόνες αντιδράσεις, πιθανώς μέσω σχηματισμού κυκλικού προϊόντος προσθήκης, μεταλλάξεων μετατόπισης πλαισίου, θραύσεων κλώνου και διασύνδεσης. Εκτός από τις άμεσες αλληλεπιδράσεις, μπορούν να συμβούν και άλλα μονοπάτια μεταβολικής ενεργοποίησης, όπως η μεταβολική εποξειδωση και ο σχηματισμός ριζών.

Η 4'-μεθοξυκινναμαλδεΐδη (II) είναι μια αρωματική αλδεΐδη και έχει α, β-ακόρεστη καρβονυλική δομή. Επειδή όμως παρουσίασε ασθενή μεταλλαξιογένεση μόνο παρουσία S9mix, ο μεταλλαξιογόνος μηχανισμός του αναμένεται να είναι διαφορετικός από αυτόν των προηγούμενων χημικών ουσιών (I, III). Μπορεί να μετατραπεί σε θεικό συζυγές από μια θεική τρανσφεράση, (ένα ένζυμο Φάσης II), και στη συνέχεια η θεική ομάδα μπορεί να διασπαστεί για να δημιουργήσει ιόντα ανθρακικού. Ως εκ τούτου, πρέπει να σημειωθεί ότι η ικανότητα μεταλλαξιογένεσής του μπορεί να είναι πιο έντονη in vivo όπου τα ένζυμα Φάσης II είναι πιο ενεργά (Jin et al., 2014).

Ο οξικός 2,5-διμεθυλ-4-οξο-3(5H)-φουρυλεστέρας (V) και ο μυρμηκικός φουρφορυλεστέρας (VII) ταξινομούνται ως εστέρες, αλλά η μεταλλαξιογόνος δράση τους

αναμένεται να περιλαμβάνει εποξειδωση διπλού δεσμού. Ο βήτα-φαινυλογλυκιδικός εστέρας μεθυλεστέρας (VIII) έχει επίσης εποξική δομή και αναμένεται να εμφανίζει τον ίδιο μεταλλαξιογόνο μηχανισμό. Αυτές οι χημικές ουσίες ασκούν τη μεταλλαξιογόνο δράση τους χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Το 3-ακετυλο-2,5-διμεθυλοφουράνιο (VI), το οποίο ταξινομείται ως κετόνη αλλά έχει δομή φουρανίου, εμφανίστηκε ως ισχυρό θετικό χωρίς S9mix. Συγκεκριμένα, η 4-μεθοξυ-2,5-διμεθυλ-3(2H)-φουρανόνη (IV) ήταν η μόνη αρνητική σε αυτή τη μελέτη. Αυτή η χημική ουσία έχει επίσης δομή φουρανίου και είναι αρκετά παρόμοια με τον οξικό 2,5-διμεθυλ-4-οξο-3(5H)-φουρυλεστέρα (V). Οι μόνες διαφορές είναι η οξική ομάδα και η μεθοξυ ομάδα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ασυνεπές επειδή η ομάδα μεθόξυ θεωρείται γενικά ομάδα ενίσχυσης της μεταλλαξιογένεσης (Ahlberg et al., 2016).

Η 6-μεθοξυκινολίνη (IX) και η 2-μεθυλκινολίνη (X) έδειξαν ισχυρή θετική και θετική απόκριση, αντίστοιχα, παρουσία του S9mix. Η κύρια μεταβολική οδός για τη μεταλλαξιογένειά τους είναι η 3,4-εποξειδωση με μεταβολική ενεργοποίηση (Benigni & Bossa, 2011). Ως αποτέλεσμα, ο μεταβολίτης που ανοίγει τον δακτύλιο ασκεί τη μεταλλαξιογένειά του δεσμεύοντας ομοιοπολικά με το DNA. Η 6-μεθοξυκινολίνη (IX) αναμένεται να είναι πιο μεταλλαξιογόνος από την κινολίνη λόγω της μεθοξυ ομάδας στη θέση 6, η οποία είναι μια ομάδα που ενισχύει τη μεταλλαξιογένεση (Ahlberg et al., 2016). Δεδομένου ότι η μεθυλική ομάδα της 2-μεθυλκινολίνης (X) είναι επίσης ενισχυτική της μεταλλαξιογένεσης, η μεταλλαξιογόνη δράση της αναμένεται να είναι μεταξύ 6-μεθοξυκινολίνης (IX) και κινολίνης.

Οι γεύσεις τροφίμων που παρουσιάζουν μεταλλαξιογένεση σε (Q) SAR ή δοκιμές Ames ενδέχεται να παρουσιάζουν κίνδυνο καρκινογένεσης στους ανθρώπους, ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες. Επομένως, απαιτείται περαιτέρω αξιολόγηση της in vivo μεταλλαξιογένεσης.

Επί του παρόντος, υπάρχουν περισσότερες από 100.000 βιομηχανικές χημικές ουσίες που παράγονται και υπάρχουν στο περιβάλλον. Ορισμένες από αυτές μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Δεδομένης της ταχείας επέκτασης του αριθμού των βιομηχανικών χημικών ουσιών, διεθνείς οργανισμοί και ρυθμιστικές αρχές έχουν εκφράσει την ανάγκη για αποτελεσματικά εργαλεία ελέγχου για τον έγκαιρο και ακριβή εντοπισμό χημικών ουσιών με πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις χωρίς τη διεξαγωγή πραγματικών τοξικολογικών μελετών (Honma et al., 2020).

Η σχέση δομής-δραστηριότητας ((Q)SAR) είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την πρόβλεψη των πιθανών δυσμενών επιπτώσεων μιας χημικής ουσίας με βάση τη χημική της δομή. Σημαντική προσπάθεια έχει αφιερωθεί στην ανάπτυξη μοντέλων SAR (Q) για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames, μεταξύ άλλων τοξικολογικών καταληκτικών σημείων, λόγω του σημαντικού όγκου των απαραίτητων δεδομένων δοκιμής Ames που έχουν ήδη συσσωρευτεί. Το International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) κατευθυντήρια γραμμή M7 για την αξιολόγηση και τον έλεγχο μεταλλαξιογόνων ουσιών στα φαρμακευτικά προϊόντα ιδρύθηκε το 2014. Είναι η πρώτη διεθνής κατευθυντήρια γραμμή που αφορά τη χρήση του (Q) SAR αντί για πραγματικές τοξικολογικές μελέτες για την αξιολόγηση της ανθρώπινης υγείας. Επομένως, το (Q) SAR για τη μεταλλαξιογένεση Ames απαιτεί πλέον υψηλότερη προγνωστική ισχύ για τον εντοπισμό μεταλλαξιογόνων χημικών ουσιών (Honma et al., 2020).

Τον Ιούλιο του 2015, η Chemical Abstracts Service (CAS), μια παγκόσμια αρχή για τις χημικές πληροφορίες, και το τμήμα πληροφοριών της American Chemical Society ανακοίνωσαν την καταχώριση εκατομμυρίων χημικών ουσιών στη βάση δεδομένων της. Μόλις πέντε χρόνια αργότερα, ο αριθμός των καταχωρισμένων χημικών ουσιών ξεπέρασε τα 200 εκατομμύρια. Επί του παρόντος, από αυτές τις χημικές ουσίες, περίπου 100.000 είδη χημικών ουσιών παράγονται βιομηχανικά και υπάρχουν στο περιβάλλον και αυτός ο αριθμός αυξάνεται. Από αυτές τις χημικές ουσίες που απελευθερώνονται στο περιβάλλον, μερικές μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ανθρώπινη υγεία ή να επηρεάσουν το παγκόσμιο περιβάλλον ή το οικοσύστημα, για παράδειγμα καταστρέφοντας τους φυσικούς πόρους. Επομένως, υπάρχει ανάγκη κατάλληλης αξιολόγησης και διαχείρισης αυτών των χημικών ουσιών. Στην Παγκόσμια Διάσκεψη Κορυφής για την Αειφόρο Ανάπτυξη (WSSD) που πραγματοποιήθηκε το 2002 στο Γιοχάνεσμπουργκ της Νότιας Αφρικής, υπήρξε συμφωνία σχετικά με το ότι οι χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται και παράγονται με τρόπους που οδηγούν στην ελαχιστοποίηση σημαντικών δυσμενών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, χρησιμοποιώντας διαφανείς επιστημονικές διαδικασίες αξιολόγησης κινδύνου και επιστημονικές διαδικασίες διαχείρισης κινδύνου, λαμβάνοντας υπόψη την προληπτική προσέγγιση (Honma et al., 2020).

Η ασφάλεια των χημικών ουσιών τυπικά αξιολογείται με βιολογικές δοκιμές με χρήση ζώων, κυττάρων θηλαστικών, μικροοργανισμών κ.λπ. Ωστόσο, η δοκιμή τόσο μεγάλης

ποσότητας χημικών ουσιών με αυτόν τον τρόπο δεν είναι ρεαλιστική όταν λαμβάνεται υπόψη η εργασία, ο χρόνος, το κόστος και η καλή διαβίωση των ζώων. Για την επίτευξη του στόχου, απαιτείται ένα αποτελεσματικό εργαλείο διαλογής ικανό να εντοπίζει έγκαιρα και με ακρίβεια τις επιβλαβείς χημικές ουσίες.

5.4 Μεταλλαξιγένεση και (Q)SAR

Όσον αφορά την τοξικότητα των χημικών ουσιών, πολλές ουσίες έχουν ένα επίπεδο κάτω από το οποίο δεν παρατηρούνται τοξικές επιδράσεις, δηλαδή ένα όριο. Έτσι, εάν το επίπεδο έκθεσης είναι αρκετά χαμηλότερο από το όριο, οι κίνδυνοι για την υγεία από την τοξικότητα της ουσίας μπορεί να θεωρηθούν μηδενικοί. Είναι Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (ADI) ή Επιτρεπόμενη Ημερήσια Έκθεση (PDE). Από την άλλη πλευρά, μεταξύ των πολλών τύπων τοξικότητας, η μεταλλαξιγένεση είναι ένας βασικός μηχανισμός στις ογκογόνες διεργασίες μέσω χημικών ουσιών και βασίζεται στη χημική αντιδραστικότητα μεταξύ DNA και χημικών ουσιών με αποτέλεσμα μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη είναι μια μη αναστρέψιμη και μόνιμη αλλαγή. Ακόμη και μία μετάλλαξη στο γονιδίωμα έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει καρκινικά κύτταρα. Επομένως, δεν μπορεί να εκχωρηθεί μια τιμή κατωφλίου (Honma et al., 2020).

Υπάρχει ένας άλλος όρος που ονομάζεται «γονοτοξικότητα», ο οποίος έχει ευρύτερο ορισμό από τη μεταλλαξιγένεση. Μια γονοτοξική ουσία καταστρέφει το DNA ή το χρωμόσωμα, προκαλώντας δομικές ή ποσοτικές αλλαγές στο γονιδίωμα, αλλά δεν προκαλεί πάντα μετάλλαξη. Μια ουσία που είναι γονοτοξική αλλά όχι μεταλλαξιογόνος έχει την ικανότητα να βλάπτει το DNA, αλλά δεν υπάρχουν άμεσες ενδείξεις ότι θα προκαλέσει μόνιμη γενετική αλλαγή που σχετίζεται με την καρκινογένεση. Έχει επίσης δηλωθεί ότι μπορούν να οριστούν οριακές τιμές για γονιδοτοξικές ουσίες που δεν είναι μεταλλαξιογόνες. Ως εκ τούτου, ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης, η αξιολόγηση της μεταλλαξιγένεσης, ιδίως της παρουσίας ή της απουσίας της, είναι σημαντική για την αξιολόγηση του κινδύνου καρκίνου από χημικές ουσίες. Η δοκιμή Ames, μία από τις τυπικές δοκιμές μεταλλαξιγένεσης, απαιτείται σταθερά για τον έλεγχο της ασφάλειας χημικών ουσιών όπου η έκθεση είναι εξαιρετικά χαμηλή (Honma et al., 2020).

Στον τομέα του (Q) SAR που σχετίζεται με την αξιολόγηση των επιπτώσεων των χημικών ουσιών στην ανθρώπινη υγεία, οι μελέτες για την πρόβλεψη μεταλλαξιογένεσης Ames (Q) SAR είναι οι πιο προηγμένες και η μέθοδος έχει ήδη χρησιμοποιηθεί στην πράξη. Ο λόγος για μια τέτοια πρόοδο, εκτός από την προαναφερθείσα σημασία του τεστ Ames, είναι ότι οι μεταλλαξιογόνες χημικές ουσίες έχουν γενικά ηλεκτροφιλικές χημικές δομές, οι οποίες παρέχουν μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους η μεταλλαξιογένεση μπορεί να εξηγηθεί χρησιμοποιώντας τη φυσική χημεία. Ακόμη, τα αποτελέσματα από τη δοκιμή Ames έχουν καλή αναπαραγωγιμότητα (80-85%) και είναι συνεπή σε σύγκριση με αποτελέσματα από άλλες τοξικολογικές δοκιμές (Benigni & Bossa, 2011). Από όλες τις δοκιμές τοξικότητας, η δοκιμή Ames έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα συσσωρευμένων ελεγμένων δεδομένων. Αυτό το μεγάλο σύνολο αξιόπιστων δεδομένων δοκιμής καθιστά εύκολη την ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης SAR (Q).

Η τοξικότητα μιας χημικής ουσίας έχει γενικά ποσοτικό τρόπο, επομένως ο αρχικός σκοπός της πρόβλεψης τοξικότητας χρησιμοποιώντας (Q) SAR είναι η πρόβλεψη της δόσης στην οποία θα παρατηρηθεί ένα αποτέλεσμα (το τελικό σημείο). Εν τω μεταξύ, σε δοκιμές μεταλλαξιογένεσης (δοκιμές γονοτοξικότητας) όπως η δοκιμή Ames, η αξιολόγηση δεν γίνεται ποσοτικά, αλλά τα αποτελέσματα είναι δυαδικά, σχετικά με την παρουσία ή την απουσία (θετική ή αρνητική) μεταλλαξιογένεσης (Honma et al., 2020).

5.5 Πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames από το QSAR

Μελέτες για την πρόβλεψη μεταλλαξιογένεσης ή καρκινογένεσης από τη δομή των χημικών ουσιών διεξάγονται εδώ και πολύ καιρό. Το 1977 οι Miller & Miller επικεντρώθηκαν στην ηλεκτροφιλικότητα των καρκινογόνων αλκυλιωτών. Πρότειναν μια ηλεκτροφιλική θεωρία, δηλώνοντας ότι πολλές καρκινογόνες χημικές ουσίες είναι ηλεκτροφιλικά παράγωγα ή ότι μεταβολίζονται για να γίνουν τέτοια παράγωγα στο ανθρώπινο σώμα και συνδέονται με πυρηνόφιλες ομάδες όπως DNA ή πρωτεΐνες στον ιστό-στόχο για καρκινογένεση, προκαλώντας καρκίνο. Έκτοτε, η μελέτη της χημικής καρκινογένεσης έχει προχωρήσει ραγδαία.

Ο Bruce Ames ανέπτυξε μια σειρά στελεχών σαλμονέλας ευαίσθητα σε καρκινογόνες χημικές ουσίες και καθιέρωσε τη δοκιμή Ames (Ames et al., 1975; McCam et al., 1975). Η

δοκιμή Ames μπορεί να θεωρηθεί ως μοντέλο *in vitro* για την ανίχνευση καρκινογόνων χημικών ουσιών. Οι περισσότερες από τις καρκινογόνες ουσίες από τον μηχανισμό μετάλλαξης έδωσαν θετικά αποτελέσματα στο τεστ Ames και αυτά τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν έγκυρα στο πλαίσιο της υπόθεσης του Millers.

Ακολουθώντας την ηλεκτροφιλική θεωρία του Miller, ο John Ashby και ο Raymond Tennant ανέπτυξαν μια συλλογή δομικής προειδοποίησης (SA) και πρόβλεψη καρκινογένεσης για καρκινογόνες χημικές ουσίες. Η καρκινογόνος SA ορίστηκε ως μια μοριακή λειτουργική ομάδα ή υποδομή που σχετίζεται με την καρκινογόνο δράση χημικών ουσιών. Θεωρήθηκε επίσης ως μεταλλαξιογόνος SA που προκαλεί γονιδιακή μετάλλαξη, η οποία είναι ένα σημαντικό βήμα στην καρκινογένεση. Ο Ashby εντόπισε, από 222 χημικές ουσίες στο Εθνικό Πρόγραμμα Τοξικολογίας των ΗΠΑ, 18 τύπους SA που έδειξαν ισχυρή συσχέτιση με θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές καρκινογένεσης τρωκτικών. Επί του παρόντος, υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μοντέλων QSAR μεταλλαξιογένεσης Ames, βάσει κανόνων και βάσει στατιστικών. Το QSAR που βασίζεται σε κανόνες, όπως εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τον Ashby et al. (1988), είναι μια μέθοδος όπου οι χαρακτηριστικές υποδομές που δίνουν θετικά αποτελέσματα ορίζονται βάσει ήδη γνωστών δεδομένων και τα αποτελέσματα των δοκιμών Ames προβλέπονται ποιοτικά χρησιμοποιώντας έναν καθιερωμένο εμπειρικό κανόνα. Από την άλλη πλευρά, το QSAR που βασίζεται σε στατιστικές βασίζεται σε φυσικοχημικές ιδιότητες που εκφράζονται σε μοριακούς περιγραφείς (αριθμητικά δεδομένα) όπως γεωμετρικοί, ηλεκτρονικοί, φυσικοχημικοί και περιγραφικοί παράγοντες που συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή Ames και χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της δοκιμής αποτελέσματα χρησιμοποιώντας μεθόδους μηχανικής μάθησης.

5.6 Κορυφαία εργαλεία QSAR για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames

5.6.1 Derek Nexus (Lhasa limited, UK): QSAR που βασίζεται σε κανόνες

Το Nexus είναι ένα σύστημα QSAR που βασίζεται σε κανόνες που διατίθεται στο εμπόριο. Οι κανόνες γνώσης που περιλαμβάνονται δημιουργούνται λαμβάνοντας υπόψη τις γνώσεις

που σχετίζονται με το SA, τα παραδείγματα χημικών ενώσεων και τη μεταβολική ενεργοποίηση και μηχανισμό. Αυτοί οι κανόνες γνώσης αναπτύσσονται συνεχώς με την παροχή δεδομένων και γνώσεων από ιδιωτικές εταιρείες, πανεπιστήμια, δημόσια ερευνητικά ιδρύματα και μη κερδοσκοπικούς οργανισμούς. Στο Derek Nexus, μια πρόβλεψη προκύπτει συγκρίνοντας τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων-στόχων που έχουν τοξικοφόρα (με άλλα λόγια, SA που υποτίθεται ότι εμπλέκονται σε τοξικές δράσεις) που κωδικοποιούνται ως δομικά μοτίβα στη βάση γνώσεων του. Η τελική πρόβλεψη προέρχεται από την ύπαρξη τοξικοφόρων στην υπό εξέταση δομή.

Η εγκυρότητα της πρόβλεψης Derek Nexus επιβεβαιώνεται συνήθως με αναφορά σε σχετική βιβλιογραφία και ο χρήστης μπορεί να λάβει μια αξιόπιστη πρόβλεψη. Το κύριο πλεονέκτημα του Derek Nexus είναι η διαφάνεια της πρόβλεψης, το γεγονός ότι οι ομάδες χρηστών δίνουν τις αξιολογήσεις τους κατά την ανάπτυξη κανόνων και η ευκολία με την οποία μπορούν να προστεθούν νέοι κανόνες. Καθώς αυτό το σύστημα είναι ένα σύστημα που βασίζεται σε κανόνες, δεν υπάρχει προδιαγεγραμμένο σύνολο εκπαίδευσης ή εύρος εφαρμογών. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση ταξινόμησης δομής που συμπεριλήφθηκε πρόσφατα, κατέστη δυνατό για τους χρήστες να επαληθεύσουν τις προβλέψεις αρνητικών αποτελεσμάτων τους (Williams et al., 2016). Σε αυτό το σύστημα, οι χημικές ενώσεις που έχουν ειδοποιήσεις με επίπεδο συμπερασμάτων διφορούμενο ή υψηλότερο επεξεργάζονται ως προβλέψεις θετικών αποτελεσμάτων (Honma et al., 2020).

5.6.2 Sarah Nexus (Lhasa limited, UK): QSAR βάσει στατιστικών

Το Lhasa Knowledge Suite περιλαμβάνει επίσης ένα μοντέλο μεταλλαξιογένεσης Ames που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία που ονομάζεται Sarah Nexus. Σε αυτό το μοντέλο, ένα αυτο-οργανωμένο υποθετικό δίκτυο (SOHN) χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας υπόθεσης δραστηριότητας για ενώσεις υπό διερεύνηση με βάση την ύπαρξη υποδομών, των οποίων η σχέση με την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση στο σετ εκπαίδευσης έχει αναγνωρισθεί (Hanser et al., 2014). Οι υποθέσεις ενσωματώνονται και γίνεται μια ολοκληρωμένη πρόβλεψη σχετικά με τη δραστηριότητα των ενώσεων υπό διερεύνηση. Επιπλέον, φαίνεται η αξιοπιστία κάθε πρόβλεψης. Οι προβλέψεις καθορίζονται από την ομοιότητα των υπό διερεύνηση ενώσεων και τα πλησιέστερα δεδομένα στο σύνολο

εκπαίδευσης για κάθε υπόθεση. Στη συνέχεια, ενσωματώνεται η αξιοπιστία κάθε μεμονωμένης υπόθεσης και λαμβάνεται η αξιοπιστία της συνολικής πρόβλεψης και πρόβλεψης για την ένωση. Αυτή η ολοκληρωμένη πρόβλεψη μπορεί να είναι θετική, αρνητική, διφορούμενη ή εκτός του εφαρμοστέου πεδίου εφαρμογής. Για τον χρήστη, εκτός από μια ολοκληρωμένη πρόβλεψη, εμφανίζονται υποθέσεις και παραδείγματα από σχετικά σύνολα εκπαίδευσης, μαζί με σχετικά μεταδεδομένα.

5.6.3 CASE ultra (MultiCASE Inc., ΗΠΑ): QSAR βάσει στατιστικών

Το CASE Ultra είναι ένα λογισμικό πρόβλεψης τοξικότητας που βασίζεται στο QSAR που αναπτύχθηκε από την MultiCASE Inc. στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το CASE Ultra χρησιμοποιεί μια στατιστική μέθοδο ως βάση του και οι ειδοποιήσεις εξάγονται αυτόματα από τα δεδομένα εκπαίδευσης χρησιμοποιώντας τεχνολογία μηχανικής εκμάθησης. Τα δεδομένα που απαιτούνται για την εκπαίδευση είναι οι χημικές δομές και οι ετικέτες τοξικότητάς τους. Ο βαθμός τοξικότητας που προβλέπεται για την υπό εξέταση χημική ουσία εξαρτάται όχι μόνο από την καθορισμένη προειδοποίηση, αλλά και από το δομικό περιβάλλον γύρω από την προειδοποίηση. Το δομικό χαρακτηριστικό του περιβάλλοντος συναγερμού ονομάζεται «διαμορφωτής» και αυτό μαθαίνεται αυτόματα από τα δεδομένα εκπαίδευσης. Σε αυτόν τον αλγόριθμο, για την κατασκευή ενός μοντέλου QSAR με συνεχή καταληκτικά σημεία τοξικότητας, χρησιμοποιούνται διάφορες φυσικοχημικές παράμετροι και περιγραφείς. Τα κύρια μοντέλα της CASE Ultra που σχετίζονται με τη μεταλλαξιογένεση του Ames περιλαμβάνουν τέσσερις ενότητες: GT1_AT_ECOLI, GT1_A7B, PHARM_ECOLI και PHARM_SALM (Honma et al., 2020).

5.6.4 Εφαρμογή μοντέλου Leadscape. LSMA (Leadscape Inc., ΗΠΑ): QSAR βάσει στατιστικών

Αυτό το μοντέλο QSAR για μεταλλαξιογένεση είναι ένα εργαλείο QSAR που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία που αναπτύχθηκε από την Leadscape Inc. σε συνεργασία με την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ. Τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται κατασκευάζονται από σετ εκπαίδευσης δημοσίως δημοσιευμένων δεδομένων

μεταλλαξιογένεσης Ames και οι δομικοί περιγραφείς βασίζονται στα ακόλουθα: προκαθορισμένα δομικά χαρακτηριστικά, αυτόματα δημιουργούμενα χημικά πλαίσια, εξωτερική γνώση και υπολογισμένα χαρακτηριστικά. Επιλεγμένοι περιγραφείς (ανεξάρτητες μεταβλητές) και δεδομένα μεταλλαξιογένεσης Ames (μεταβλητές που ανταποκρίνονται) χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη των αποτελεσμάτων της δοκιμής Ames χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο μερικής λογιστικής παλινδρόμησης. Το μοντέλο εμφανίζει την πιθανότητα να ληφθεί ένα θετικό αποτέλεσμα και τα δομικά χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση. Εμφανίζει επίσης λεπτομερείς πληροφορίες δοκιμής που σχετίζονται με τις χημικές ουσίες στο σετ εκπαίδευσης. Αυτό δίνει τη δυνατότητα στους εμπειρογνώμονες να διεξάγουν λεπτομερείς ανασκοπήσεις του σετ εκπαίδευσης (Honma et al., 2020).

5.6.5 TIMES_AMES (Πανεπιστήμιο Μπουργκάς, Βουλγαρία): QSAR που βασίζεται σε κανόνες

Το εργαλείο TIMES_AMES QSAR περιλαμβάνεται στο λογισμικό OASIS/TIMES, το οποίο διατίθεται στο εμπόριο και παρέχεται από το Πανεπιστήμιο του Μπουργκάς. Το εργαλείο Ames/QSAR περιλαμβάνει SA, τροποποιητές για την εξήγηση άλλων επιδράσεων που σχετίζονται με τη μοριακή δομή και έναν μηχανισμό αλληλεπίδρασης μεταξύ DNA και SA. Χρησιμοποιείται μια βάση κανόνων για τον προσδιορισμό της SA και η αναγνώριση προτύπων (κοινό πρότυπο αντιδραστικότητας βάσει μηχανισμού) χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη μεταλλαξιογένεσης. Το OASIS/TIMES είναι εξοπλισμένο με έναν προσομοιωτή μεταβολισμού του ήπατος που βασίζεται σε μεταβολικές οδούς (Tissue Metabolite Simulator; TIMES). Οι χημικές ουσίες στο σετ που χρησιμοποιούνται σε αυτό το μοντέλο μπορούν να ταξινομηθούν σε αυτές που έχουν μεταλλαξιογόνο δράση χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, σε αυτές που έχουν μεταλλαξιογόνο δράση μετά τη μεταβολική ενεργοποίηση και σε αυτές που δεν είναι μεταλλαξιογόνες ανεξάρτητα από τη μεταβολική ενεργοποίηση. Όταν η μεταλλαξιογένεση Ames υπό την παρουσία S9 αρουραίου προβλέπεται για τις ενώσεις που ζητήθηκαν, εμφανίζεται ο μεταβολίτης που προβλέπεται να έχει μεταλλαξιογένεση, μαζί με έναν μεταβολικό χάρτη της ένωσης. Αυτό είναι το μεγαλύτερο πλεονέκτημα του OASIS/TIMES (Honma et al., 2020).

5.6.6 Toxtree (Istituto Superiore di Sanità, Ιταλία): QSAR που βασίζεται σε κανόνες

Το ToxTree είναι μια εφαρμογή ανοιχτού κώδικα βασισμένη σε Java που κατηγοριοποιεί τις χημικές ουσίες και προβλέπει την τοξικότητά τους χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση δέντρου αποφάσεων. Το ToxTree αναπτύχθηκε από την Ideaconsult Ltd. (Βουλγαρία) βάσει σύμβασης με το Κοινό Κέντρο Ερευνών της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Το ToxTree, δωρεάν διαθέσιμο σε όλους, είναι μια υπηρεσία σχεδιασμένη για επιστημονικούς ερευνητές και άλλα άτομα. Ο κανόνας Benigni/Bossa χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης του Ames (Benigni & Bossa, 2008). Παρόμοια με τον Derek, είναι θεωρητικά δύσκολο να αξιολογηθεί μια χημική ουσία που δεν έχει αρνητικό SA (Honma et al., 2020).

5.6.7 ADMEWORKS (FUJITSU KYUSHU SYSTEMS LIMITED, Ιαπωνία): QSAR βάσει στατιστικών

Το ADMEWORKS είναι ένα συναινετικό μοντέλο που περιλαμβάνει δύο στατιστικά μοντέλα, ένα με υψηλή ευαισθησία και ένα με υψηλή ειδικότητα, που αναπτύχθηκε από τη Fujitsu Kyushu Systems Ltd. Αναπτύχθηκε κυρίως χρησιμοποιώντας τύπους χημικών ενώσεων του 1977 που ελήφθησαν από το Εθνικό Πρόγραμμα Τοξικολογίας των ΗΠΑ. Στην περίπτωση που τα αποτελέσματα από τα δύο στατιστικά μοντέλα συμπίπτουν, δηλαδή και τα δύο είναι θετικά ή αρνητικά, εμφανίζεται το τελικό αποτέλεσμα εκτίμησης. Διαφορετικά δεν θα γίνει πρόβλεψη. Εκτός από το μοντέλο συναίνεσης, τα θετικά SA και τα αρνητικά SA εξάγονται από τα αρχικά δεδομένα και χρησιμοποιούνται ως φίλτρα πριν γίνει μια πρόβλεψη χρησιμοποιώντας το μοντέλο συναίνεσης. Εάν η χημική ένωση περιλαμβάνει οποιαδήποτε θετική ειδοποίηση, ταξινομείται αμέσως ως θετική. Εάν περιλαμβάνει οποιαδήποτε αρνητική ειδοποίηση, ταξινομείται αμέσως ως αρνητική. Εάν δεν περιλαμβάνεται ειδοποίηση στην ένωση, το μοντέλο συναίνεσης θα χρησιμοποιηθεί για την εκτέλεση μιας τελικής πρόβλεψης (Honma et al., 2020).

5.6.8 ChemTunes•ToxGPS (molecular networks GmbH and Altamira LLC, USA): QSAR βάσει στατιστικών

Το μοντέλο ChemTunes βασίζεται σε μια βάση γνώσεων ToxGPS για δεδομένα τοξικότητας *in vivo* και *in vitro* που συλλέγονται από βιβλιογραφία σχετική με τους κανονισμούς και πηγές πρωτογενών πληροφοριών. Οι προβλέψεις εκτελούνται χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο QSAR που βασίζεται σε μηχανισμούς δράσης και ειδοποιήσεις «χημικών ειδών» που ενσωματώνονται χρησιμοποιώντας μια μέθοδο «βάρους αποδείξεων» για ποσοτικά στοιχεία, με βάση τη θεωρία Dempster-Shafer. Σε αυτό το μοντέλο, χρησιμοποιείται μια βάση δομής (χημικά είδη ToxPrint, κ.λπ.), μια βάση χαρακτηριστικών (διπολικές ροπές, διαλυτότητα, logP, κ.λπ.) και κβαντικοί περιγραφείς. Το μοντέλο ChemTunes•ToxGPS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορα τελικά σημεία τοξικότητας που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία. Η προσέγγιση εκτιμά την αβεβαιότητα και περιγράφεται συνδυάζοντας προβλέψεις από πολλαπλά μοντέλα και λαμβάνει υπόψη την αξιοπιστία της πηγής πληροφοριών για κάθε αποδεικτικό στοιχείο. Αν και δεν περιγράφεται εδώ, το σύστημα πρόβλεψης ChemTunes•ToxGPS προετοιμάζει επίσης τιμές εκτίμησης για την αβεβαιότητα σε κάθε πρόβλεψη (Honma et al., 2020).

5.6.9 MUT_Risk (simulations plus Inc., USA): QSAR βάσει στατιστικών

Το MUT Risk είναι μια βαθμολογία ADMET Risk™ που συνοψίζει τις προβλέψεις μεταλλαξιογένεσης χρησιμοποιώντας 10 ξεχωριστά μοντέλα ταξινόμησης συνόλου τεχνητών νευρωνικών δικτύων (αποτελέσματα 10 μεμονωμένων δοκιμών Ames με 5 στελέχη υπό την παρουσία ή την απουσία S9 επίμυος). Για κάθε θετική ταξινόμηση για κάθε ένα από τα πέντε ζεύγη μοντέλων $\pm S9$, προστίθεται ένας βαθμός στη συνολική βαθμολογία. Μια τιμή κατωφλίου που χρησιμοποιείται για την κρίση ορίζεται από έναν χρήστη. Το MUT_Risk-0 κρίνει εάν οι χημικές ενώσεις είναι μεταλλαξιογόνες όταν η βαθμολογία είναι μεγαλύτερη από 0, ενώ το MUT_Risk-1 κρίνει εάν οι ενώσεις είναι μεταλλαξιογόνες όταν η βαθμολογία είναι μεγαλύτερη από 1. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την προσαρμογή της αντιστάθμισης μεταξύ ευαισθησίας και ειδικότητας ως απόκριση σε κάθε εφαρμογή. Κάθε ένα από τα 10 συνεισφέροντα μοντέλα έχει τις δικές του μοναδικές σημαίες εκτός πεδίου εφαρμογής και εκτιμώμενες τιμές αβεβαιότητας (Honma et al., 2020).

5.6.10 StarDrop auto-Modeller (Optibrium Ltd., UK) βάσει στατιστικών

Το StarDrop είναι ένα ολοκληρωμένο εργαλείο QSAR. Διαθέτει το Derek Nexus ως συνάρτηση πρόβλεψης τοξικότητας με βάση τη γνώση και το Auto-Modeller ως συνάρτηση πρόβλεψης βάσει στατιστικών. Στο Auto-Modeller, ένα σύνολο δεδομένων που περιλαμβάνει δομικές πληροφορίες και τις φυσικές τιμές ιδιοτήτων των στόχων πρόβλεψης επιτρέπει τη δημιουργία ενός αρχικού τύπου πρόβλεψης σχεδόν αυτόματα. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει ανάγκη προετοιμασίας περιγραφών και το Modeller περιλαμβάνει μια συνάρτηση για την αυτόματη δημιουργία εννέα τύπων περιγραφέων που σχετίζονται με ολόκληρα μόρια (μοριακό βάρος, τιμές πρόβλεψης logP, κ.λπ.) και 321 τύπους περιγραφέων σε μορφή SMARTS (το αριθμός ατομικών ειδών, χαρακτηριστική ομάδα κ.λπ.). Είναι επίσης εύκολο να προστεθούν πρωτότυποι περιγραφείς και το εύρος εφαρμογών είναι ευρύ. Σε αυτήν την αναλυτική μέθοδο περιλαμβάνονται 10 τύποι συνεχών μοντέλων και τρεις τύποι μοντέλων κατηγορίας, ενώ περιλαμβάνεται και μια συνάρτηση αυτόματης κρίσης του καλύτερου μοντέλου. Το υψηλό επίπεδο αυτοματοποίησης μιας τέτοιας υψηλής ποιότητας ικανότητας επεξεργασίας δομικών πληροφοριών και στατιστικής επεξεργασίας υποστηρίζει όχι μόνο μη ειδικούς στην ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης φυσικών ιδιοτήτων, αλλά και ειδικούς στον εξορθολογισμό των διαδικασιών δοκιμής και λάθους (Honma et al., 2020).

5.6.11 T.E.S.T (Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ): μοντέλο συναίνεσης

Το Εργαλείο Λογισμικού Εκτίμησης Τοξικότητας (T.E.S.T) είναι δωρεάν λογισμικό από την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ που μπορεί να προβλέψει τελικά σημεία για τρεις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, συμπεριλαμβανομένης της μεταλλαξιογένεσης του Ames. Το T.E.S.T κατασκευάστηκε με την πεποίθηση ότι η παροχή προβλεπόμενων αποτελεσμάτων από διαφορετικούς αλγόριθμους θα έκανε την προβλεπόμενη τοξικότητα πιο αξιόπιστη. Συνεπώς, το T.E.S.T περιλαμβάνει μια πλειάδα μοντέλων πρόβλεψης που κατασκευάζονται από μια πλειάδα αλγορίθμων που χρησιμοποιούν το ίδιο σύνολο δεδομένων (Serafimora et al., 2010). Όσον αφορά την

πρόβλεψη της μεταλλαξιογένεσης Ames, μοντέλα που χρησιμοποιούν τους ακόλουθους τέσσερις τύπους αλγορίθμων εγκαθίστανται στο T.E.S.T.:

- 1) Ιεραρχική μέθοδος: Βασισμένη σε στατιστικά στοιχεία QSAR χρησιμοποιώντας μέθοδο ιεραρχικής ομαδοποίησης.
- 2) Μέθοδος FDA: QSAR που βασίζεται σε στατιστικές χρησιμοποιώντας ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης για συλλεγόμενες παρόμοιες ουσίες.
- 3) Μέθοδος πλησιέστερου γείτονα: QSAR που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία χρησιμοποιώντας τα μέσα δεδομένα τριών παρόμοιων ουσιών που συλλέγονται από το σύνολο δεδομένων εκπαίδευσης
- 4) Συναινετική μέθοδος: Οι τιμές που λαμβάνονται με την παραπάνω μέθοδο υπολογίζονται κατά μέσο όρο.

5.6.12 VEGA (Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Ιταλία): μοντέλο συναίνεσης

Το VEGA είναι ένα σύστημα βασισμένο σε Java που αναπτύχθηκε από το Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri της Ιταλίας και είναι διαθέσιμο για δωρεάν λήψη. Το VEGA περιλαμβάνει πολλαπλά μοντέλα QSAR που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά σύνολα δεδομένων και τα αποτελέσματα υπολογισμού του εξάγονται με την ίδια μέθοδο εμφάνισης. Το μοντέλο μεταλλαξιογένεσης (δοκιμή Ames) από την πιο πρόσφατη έκδοση VEGA 1.1.4 περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα μοντέλα (Honma et al., 2020):

- 1) CAESAR: QSAR που βασίζεται σε στατιστικά στοιχεία χρησιμοποιώντας μηχανή υποστήριξης διανύσματος (SVM).
- 2) SarPy: Βασισμένο σε κανόνες QSAR που βασίζεται σε υποδομές.
- 3) ISS: Βασισμένο σε κανόνες QSAR που βασίζεται σε κανόνες Benigni/Bossa.
- 4) KNN: Αναλογία (ανάγνωση) χρησιμοποιώντας istKNN.

Τελικά, ένα μοντέλο συναίνεσης εξάγει ένα αποτέλεσμα με βάση τα αποτελέσματα από αυτά τα τέσσερα μοντέλα.

5.6.13 Αξιολόγηση της προγνωστικής ισχύος των εργαλείων QSAR

Επειδή το αποτέλεσμα της δοκιμής Ames είναι δυαδικό, θετικό ή αρνητικό, η προγνωστική τους ισχύς μπορεί να ποσοτικοποιηθεί αντικειμενικά και να εκτιμηθεί από τη σύμπτωση τους με τα αποτελέσματα υπολογισμού από το QSAR. Για μοντέλα QSAR υψηλής ποιότητας, υψηλή ευαισθησία (ανίχνευση μεταλλαξιογόνων ουσιών σίγουρα), υψηλή αρνητική τιμή πρόβλεψης (αυτή που προβλέπεται ως αρνητική είναι πράγματι αρνητική), υψηλή κάλυψη (δυνατότητα αξιολόγησης όσο το δυνατόν περισσότερες χημικές ουσίες) θεωρούνται σημαντικές. Αυτές οι αριθμητικές τιμές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ισορροπία του συνόλου δεδομένων που αξιολογείται, και επομένως απαιτείται προσοχή. Τα σύνολα δεδομένων που υποβάλλονται στην αξιολόγηση έχουν συνήθως σημαντικό αριθμό αρνητικών δεδομένων. Στην περίπτωση που οι λόγοι θετικού και αρνητικού στο σύνολο δεδομένων είναι 10 και 90%, αντίστοιχα, ακόμη και ένα μοντέλο QSAR με ευαισθησία 40% μπορεί να θεωρηθεί καλό μοντέλο. Η ακρίβεια ισορροπίας και το MCC είναι προγνωστικοί δείκτες, λαμβάνοντας υπόψη την προκατάληψη ενός συνόλου δεδομένων και είναι χρήσιμοι για την αξιολόγηση της προγνωστικής ισχύος του εργαλείου QSAR χρησιμοποιώντας σύνολα δεδομένων από διαφορετικά υποκείμενα αξιολόγησης (Honma et al., 2020).

5.7 Η εφαρμογή του QSAR στο ICH-M7

Η κατευθυντήρια γραμμή ICH-M7 για την αξιολόγηση και τον έλεγχο των μεταλλαξιογόνων προσμερίξεων σε φαρμακευτικά προϊόντα θεσπίστηκε το 2014. Αυτή ήταν η πρώτη διεθνής κατευθυντήρια γραμμή που επέτρεψε τη χρήση του QSAR ως εναλλακτική στα βιολογικά πειράματα για την αξιολόγηση της επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία. Οι προσμίξεις στα φαρμακευτικά προϊόντα βρίσκονται σε ίχνη, αποτελούνται από πολλούς τύπους και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ασταθείς. Ως εκ τούτου, είναι συχνά αδύνατο να εκτιμηθεί η τοξικότητά τους μέσω απομόνωσης, καθαρισμού και βιολογικών πειραμάτων.

Εάν είναι γνωστή η χημική δομή της ουσίας, αυτή η κατευθυντήρια γραμμή που επιτρέπει την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης με χρήση QSAR είναι πολύ ρεαλιστική. Στο ICH-M7, απαιτείται η χρήση εργαλείων QSAR που βασίζονται σε κανόνες και βάσει στατιστικών για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης του Ames.

Η απουσία δομικών ειδοποιήσεων από δύο μεθοδολογίες QSAR (βασισμένες σε κανόνες και βάσει στατιστικών) είναι αρκετή για να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η πρόσμειξη δεν προκαλεί μεταλλαξιογόνο ανησυχία και δεν συνιστάται περαιτέρω δοκιμή. Σε περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα της πρόβλεψης διαφέρουν από το ένα εργαλείο στο άλλο ή η πρόβλεψη δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί λόγω εκτός τομέα, αναφέρεται ότι μπορεί να εξαχθεί ένα συμπέρασμα με βάση την κατάλληλη αναθεώρηση από ειδικούς. Ωστόσο, στην κατευθυντήρια γραμμή, τίποτα δεν περιγράφεται συγκεκριμένα σχετικά με τη συγκεκριμένη στρατηγική για τέτοιες κρίσεις εμπειρογνομόνων (Honma et al., 2020).

Η ίδρυση του ICH-M7 το 2014 άλλαξε τον ρόλο του QSAR από ένα εργαλείο προκαταρκτικής εξέτασης και πρόβλεψης μεταλλαξιογένεσης του Ames σε δοκιμή για την παροχή δεδομένων σχετικά με την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης χημικών ουσιών. Επομένως, απαιτείται μεγαλύτερη προγνωστική ισχύς των εργαλείων QSAR για προβλέψεις μεταλλαξιογένεσης Ames. Ωστόσο, στην πράξη, η ακρίβεια πρόβλεψης πολλών εργαλείων QSAR είναι ανεπαρκής. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία για νέες χημικές ουσίες αναφέρεται ότι είναι 50% ή χαμηλότερη (Hillebrecht et al., 2011).

Για τη βελτίωση της ακρίβειας πρόβλεψης του QSAR, είναι σημαντική η συγκέντρωση των πραγματικών δεδομένων δοκιμής Ames ως δεδομένα εκπαίδευσης. Τα δεδομένα εκπαίδευσης που περιλαμβάνουν μεγάλο όγκο δεδομένων για χημικές ουσίες με μοναδικές δομές θα επεκτείνουν τον χημικό χώρο, θα μειώσουν τα ψευδώς θετικά (FP) και τα ψευδώς αρνητικά (FN) αποτελέσματα και θα βελτιώσουν την ακρίβεια της πρόβλεψης. Η αξιοπιστία τέτοιων δεδομένων δοκιμής είναι επίσης σημαντική. Επί του παρόντος, υπάρχουν περίπου 10.000 χημικές ουσίες των οποίων τα αποτελέσματα των δοκιμών Ames είναι δημόσια διαθέσιμα μέσω διαδικτυακών τοποθεσιών. Πολλοί προγραμματιστές QSAR αναπτύσσουν μοντέλα QSAR που βασίζονται σε αυτές τις βάσεις δεδομένων (Hansen et al., 2009).

Ως αποτέλεσμα τριών δοκιμών του Ames/QSAR International Challenge Project, όλα τα εργαλεία QSAR βελτιώθηκαν σημαντικά. Τα περισσότερα εργαλεία πέτυχαν > 50%

ευαισθησία και ακρίβεια ήταν έως και 80%, που είναι σχεδόν ισοδύναμη με τη διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα των δοκιμών Ames (Honma et al., 2020).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η ακρίβεια πρόβλεψης για τη μεταλλαξιογένεση του Ames είναι περίπου 80 και 77% από το QSAR και από το SMILES-CNN, αντίστοιχα. Τι θα απαιτούνταν για να βελτιωθεί περαιτέρω η ακρίβεια και να επιτευχθεί ακρίβεια πλησιέστερη στο 100%; Η άποψή μου είναι ότι το ζήτημα δεν είναι με το μοντέλο πρόβλεψης, αλλά με τα ίδια τα αποτελέσματα της δοκιμής Ames. Σύμφωνα με την έρευνα δεδομένων δοκιμών Ames από δημόσιους τομείς, η εκτιμώμενη διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα των δοκιμών Ames είναι περίπου 85% (Kamber et al., 2009), που είναι σχεδόν ισοδύναμο με την προγνωστική ισχύ του καλύτερου QSAR ή SMILES-CNN. Σημαίνει ότι η ακρίβεια πρόβλεψης 80% έχει σχεδόν φτάσει σε κορεσμό, και ακόμη κι αν τα μοντέλα QSAR βελτιωθούν με τη συσσώρευση περισσότερων δεδομένων δοκιμής, η περαιτέρω βελτίωση της προγνωστικής ισχύος είναι δύσκολη.

Για τη βελτίωση της ισχύος πρόβλεψης, σημαντικές είναι οι βελτιώσεις των μοντέλων QSAR καθώς και η βελτίωση της μεθοδολογικής αδυναμίας και η αξιολόγηση δεδομένων του τεστ Ames σε μεταλλαξιογόνο μηχανισμό. Για παράδειγμα, τα αποτελέσματα της δοκιμής Ames είναι δυαδικά, είτε θετικά είτε αρνητικά, πράγμα που σημαίνει ότι μια ασθενής θετική απόκριση σε ορισμένες περιπτώσεις θα μπορούσε να κριθεί ως αρνητική. Γενικά, τα θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές Ames έχουν ποσότητα ίση ή μεγαλύτερη από το διπλάσιο του αρνητικού μάρτυρα ως πρότυπό τους για θετικότητα (κανόνας δύο φορές). Όταν η μέγιστη συχνότητα μετάλλαξης είναι 1,9 φορές με εξάρτηση από τη δόση και επαναληψιμότητα, ο κανόνας δίνει μια αρνητική κρίση για το αποτέλεσμα (Honma et al., 2020).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν περιπτώσεις που όταν υπάρχουν πολλαπλά δεδομένα και μόνο ένα από αυτά είναι θετικό, γίνεται συντηρητική κρίση του θετικού χωρίς να λαμβάνονται υπόψη μεταλλαξιογόνοι μηχανισμοί. Αυτά τα ασαφή αποτελέσματα δοκιμών ενσωματώθηκαν στη βάση δεδομένων και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων QSAR. Αυτά τα λανθασμένα δεδομένα εμποδίζουν τις προβλέψεις και αποτελούν πηγή θορύβου στην ανάπτυξη ακριβών μοντέλων QSAR.

Είτε στο QSAR είτε στο AI, εφόσον τα δεδομένα από τα αποτελέσματα βιολογικών δοκιμών χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εκπαίδευσης, η αξιοπιστία των δεδομένων είναι το

πιο σημαντικό στοιχείο όσον αφορά τη βελτίωση της ισχύος πρόβλεψης. Είναι επομένως απαραίτητο να δημιουργηθεί μια μεγάλη βάση δεδομένων αναφοράς που να αποτελείται μόνο από καλά επικυρωμένα αποτελέσματα δοκιμών Ames για τη δημιουργία πιο ακριβών μοντέλων QSAR. Το θετικό αποτέλεσμα από το QSAR μπορεί μερικές φορές να υποδηλώνει τις δομές και τους μηχανισμούς συναγερμού που χρησιμοποιούνται ως βάση για την κρίση. Εάν αυτός ο μηχανισμός είναι σχετικός, υπάρχει ανάγκη να αμφισβητηθεί το πραγματικό αποτέλεσμα της δοκιμής και να επανεκτιμηθεί. Κατά την κρίση των αποτελεσμάτων των δοκιμών, η κρίση των ειδικών με βάση τον μηχανισμό είναι σημαντική, σε αντίθεση με έναν τυπικό ή συντηρητικό τρόπο που βασίζεται σε μια κατευθυντήρια γραμμή (Honma et al., 2020).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πραγματικών αποτελεσμάτων των δοκιμών και των αποτελεσμάτων QSAR μπορεί να οδηγήσει σε σωστή αξιολόγηση. Από αυτήν την αξιολόγηση, δημιουργείται ένα αξιόπιστο σύνολο δεδομένων αναφοράς και τα μοντέλα QSAR μπορούν να αναδιαμορφωθούν χρησιμοποιώντας αυτό το σύνολο δεδομένων. Με την προσθήκη νέων συνόλων δεδομένων εκπαίδευσης και την επανάληψη της διαδικασίας αλληλοσυζήτησης με αποτελέσματα δοκιμών ακολουθούμενη από αναδιαμόρφωση, αναμένεται ότι η προγνωστική ισχύς των εργαλείων QSAR ή/και τεχνητής νοημοσύνης μπορεί να βελτιώνεται συνεχώς και ότι θα ξεπερνούν την κρίση από τα πραγματικά αποτελέσματα των δοκιμών.

Στην πραγματικότητα, χρειάζεται ακόμη χρόνος για να ξεπεράσουν τις πραγματικές δοκιμές από πλευράς αξιοπιστίας οι προβλέψεις *in silico*. Επί του παρόντος, συνιστάται η χρήση των δοκιμών Ames όσο και του QSAR, και το τελικό συμπέρασμα θα πρέπει να προκύψει από τα αποτελέσματα και των δύο τύπων μελετών. Η ποιότητα των δεδομένων των δοκιμών που αναφέρονται μέσω εκθέσεων αξιολόγησης ή επιστημονικών ερευνητικών άρθρων είναι πολυσχιδής και τέτοια αποτελέσματα δεν είναι απλά αξιόπιστα. Η ιδέα είναι να χρησιμοποιηθεί το QSAR, όχι ως εργαλείο πρόβλεψης, αλλά ως εργαλείο υποστήριξης για την τελική αξιολόγηση των πραγματικών αποτελεσμάτων των δοκιμών. Πρακτικά η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της μεταλλαξιογένεσης των αρωμάτων τροφίμων, καθώς και των χημικών ουσιών που προέρχονται από πλαστικές συσκευές/δοχεία και συσκευασίες (Honma et al., 2020)

Συμπεράσματα

Τα μεταλλαξιογόνα είναι χημικά μόρια που έχουν την ικανότητα να βλάπτουν το DNA. Μεταλλαξιογόνες ουσίες μπορούν να εισέλθουν στο σώμα μας κατά την κατανάλωση ακατάλληλα μαγειρεμένων ή επεξεργασμένων προϊόντων διατροφής, όπως η υψηλή θερμοκρασία ή η παρατεταμένη διάρκεια μαγειρέματος. Τα μεταλλαξιογόνα που βρίσκονται στα τρόφιμα μπορούν να ταξινομηθούν σε παράγωγα N-νιτροζο, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες. Τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και πρωτεΐνες είναι πιο επιρρεπή σε μεταλλαξιογόνο σχηματισμό. Οι μικροοργανισμοί βρέθηκαν να είναι ένα ισχυρό όπλο στην καταπολέμηση διαφόρων μεταλλαξιογόνων μέσω του βιομετασχηματισμού.

Πολλά λαχανικά περιέχουν μεταλλαξιογόνα φλαβονοειδή όπως η κερσετίνη και η καμπερόλη. Μεταλλαξιογόνες ουσίες στο κρέας και τα ψάρια παράγονται κατά την πυρόλυση των πρωτεϊνών που συμβαίνει όταν τα τρόφιμα μαγειρεύονται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Το κανονικό μαγείρεμα του κρέατος σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μπορεί επίσης να οδηγήσει στην παραγωγή μεταλλαξιογόνων. Το κάπνισμα τροφίμων, καθώς και το ψήσιμο με κάρβουνο, έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεση μεταλλαξιογόνων και καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών ενώσεων όπως το βενζο[α]πυρένιο στην επιφάνεια του φαγητού.

Παρά το γεγονός ότι η παραγωγή μεταλλάξεων σε βακτηριακές ή άλλες δοκιμές αποτελεί ένδειξη ότι μια χημική ουσία μπορεί να είναι καρκινογόνος στα ζώα, πολλά μεταλλαξιογόνα που ανιχνεύονται σε τρόφιμα δεν έχουν ελεγχθεί επαρκώς για καρκινογένεση. Από αυτά που έχουν δοκιμαστεί, τα δεδομένα σχετικά με την καρκινογένεση της μεταλλαξιογόνου φλαβονόλης κερκετίνης είναι αντικρουόμενα και αρκετά μεταλλαξιογόνα που απομονώνονται από πυρολυμένες πρωτεΐνες ή αμινοξέα φαίνεται να είναι καρκινογόνα. Δεν είναι ακόμη σαφές σε ποιο βαθμό τα μεταλλαξιογόνα που παράγονται από την πυρόλυση πρωτεϊνών ή αμινοξέων βρίσκονται σε κανονικά μαγειρεμένα τρόφιμα.

Εάν τα μεταλλαξιογόνα που διανέμονται ευρέως σε κοινά τρόφιμα διαπιστώνεται σταθερά ότι προκαλούν καρκίνο στα ζώα, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη πολλοί παράγοντες πριν ληφθούν μέτρα για τη μείωση της έκθεσης. Για παράδειγμα, το μαγείρεμα του κρέατος και του ψαριού παράγει μεταλλαξιογόνους παράγοντες, αλλά καταστρέφει επίσης παθογόνους

μικροοργανισμούς και παράσιτα. Επιπλέον, ορισμένα τρόφιμα περιέχουν μεταλλαξιογόνα φλαβονοειδή, αλλά έχουν και υψηλή θρεπτική αξία.

Συμπερασματικά, η αναζήτηση των μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να μετασχηματίζουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες και η ανάπτυξη τεχνικών για την ταυτοποίηση καθώς και την ανίχνευση μεταλλαξιογόνων σε προϊόντα διατροφής είναι απαραίτητη. Στο μέλλον, είναι απαραίτητες μέθοδοι για τον εντοπισμό και την ανίχνευση αυτών των μεταλλαξιογόνων παραγόντων, καθώς και για τον εντοπισμό νέων και πιο ισχυρών μικροοργανισμών που μπορούν να μετατρέψουν μεταλλαξιογόνους παράγοντες σε μη μεταλλαξιογόνους.

Βιβλιογραφία

Ακολουθούν οι βιβλιογραφικές αναφορές (πηγές) της Εργασίας.

Γεωργίου Ε., (2008). Ιατρική Φυσική. Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.

Ψαρράκος Κ., Μολυβδά-Αθανασοπούλου Ε., Γκοτζαμάνη-Ψαρράκου Α., Σιούντας Α., (2012). Επίτομη Ιατρική Φυσική. University Studio Press, Αθήνα.

Abid, Z., Cross, A. J., & Sinha, R., (2014). Meat, dairy, and cancer. The American journal of clinical nutrition, 100 Suppl 1(1), 386S–93S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071597>

Ahlberg E, Amberg A, Beilke LD, Bower D, Cross KP, Custer L, Ford KA, Van Gompel J, Harvey J, Honma M, Jolly R, Joossens E, Kemper RA, Kenyon M, Kruhlak N, Kuhnke L, Leavitt P, Naven R, Neilan C, Quigley DP, Shuey D, Spirkel HP, Stavitskaya L, Teasdale A, White A, Wichard J, Zwickl C, Myatt GJ., (2016). Extending (Q) SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: a case study using aromatic amine mutagenicity. Regul Toxicol Pharmacol, 77:1–12.

Alaejos MS. and Afonso AM., (2011). Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 10:52–108. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00141.x

Ames B. N., Mccann J., & Yamasaki E., (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation research, 31(6), 347–364. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1)

Ashby J, Tennant RW, et al., (1988). Mutation Res, 204:17–115.

Barber C, Cayley A, Hanser T, Harding A, Heghes C, Vessey JD, Werner S, Weiner SK, Wichard J, Giddings A, Glowienke S, Parenty A, Brigo A, Spirkel HP, Amberg A, Kemper R, Greene N., (2016). Evaluation of a statistics-based Ames mutagenicity QSAR model and interpretation of the results obtained. Regul Toxicol Pharmacol, 76:7–20.

Bartkiene E., Bartkevics V., Mozuriene E., Krungleviciute V., Novoslavskij A., Santini A., Rozentale I., Juodeikiene G., Cizeikiene D., (2017). The impact of lactic acid bacteria with antimicrobial properties on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines in cold smoked pork sausages. Food Control. 71:285–292. doi: 10.1016/j.food-cont.2016.07.010.

- Barzegar F., Kamankesh M., & Mohammadi A., (2019). Heterocyclic aromatic amines in cooked food: A review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques. *Food chemistry*, 280, 240–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.058>
- Beer F., Urbat F., Franz C. M. A. P., Huch M., Kulling S. E., Bunzel M., & Bunzel D., (2019). The Human Fecal Microbiota Metabolizes Foodborne Heterocyclic Aromatic Amines by Reuterin Conjugation and Further Transformations. *Molecular nutrition & food research*, 63(10), e1801177. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801177>
- Benigni R., & Bossa C., (2008). Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology. *Mutat Res.* 2008;659:248–61.
- Benigni R., & Bossa C., (2011). Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chem Rev*, 111:2507–36.
- Beyaz R. and Yildiz M., (2017). The use of gamma irradiation in plant mutation breeding. In *Plant Engineering*. InTech. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.69974>
- Bignold L.P., (2009). Mechanisms of clastogen-induced chromosomal aberrations: a critical review and description of a model based on failures of tethering of DNA strand ends to strand-breaking enzymes. *Mutat. Res.* 681: 271–298.
- Binstok G, Campos C, Varela O, Gerschenson LN., (1998). Sorbate-nitrite reactions in meat products. *Food Research International*, 31:581–585. doi: 10.1016/S0963-9969(99)00031-9
- Bjeldanes L. F., & Chang G. W., (1977). Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science (New York, N.Y.)*, 197(4303), 577–578. <https://doi.org/10.1126/science.327550>
- Bjeldanes L. F., Morris M. M., Timourian H., & Hatch F. T., (1983). Effects of meat composition and cooking conditions on mutagen formation in fried ground beef. *Journal of agricultural and food chemistry*, 31(1), 18–21. <https://doi.org/10.1021/jf00115a005>
- Brown J. P., (1980). A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation research*, 75(3), 243–277. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(80\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90029-9)
- Brown T.A., (2023). *Genomes*. CRC Press. 5th Edition.

- Bylsma L. C., & Alexander D. D., (2015). A review and meta-analysis of prospective studies of red and processed meat, meat cooking methods, heme iron, heterocyclic amines and prostate cancer. *Nutrition journal*, 14, 125. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0111-3>
- Cantwell M., Mittl B., Curtin J., Carroll R., Potischman N., Caporaso N., & Sinha R., (2004). Relative validity of a food frequency questionnaire with a meat-cooking and heterocyclic amine module. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 13(2), 293–298. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-270-2>
- Chan P.C., (2004). NTP technical report on the toxicity studies of 2- and 4-Methylimidazole (CAS No. 693-98-1 and 822-36-6) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep*, 67, 1-g12.
- Chan P., Mahler J., Travlos G., Nyska A., Wenk M., (2006). Induction of thyroid lesions in 14-week toxicity studies of 2 and 4-methylimidazole in Fischer 344/N rats and B6C3F1 mice. *Arch. Toxicol*, 80, 169–180.
- Chan, P. C., Sills, R. C., Kissling, G. E., Nyska, A., & Richter, W. (2008). Induction of thyroid and liver tumors by chronic exposure to 2-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Archives of toxicology*, 82(6), 399–412. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0249-7>
- Chatterjee N., & Walker GC., (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen*, 58:235–63.
- Crespi C. L., Penman B. W., Gelboin H. V., & Gonzalez F. J., (1991). A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis*, 12(7), 1197–1201. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.7.1197>
- Cross A. J., & Sinha R., (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis*, 44(1), 44–55. <https://doi.org/10.1002/em.20030>
- Cross A. J., Ferrucci L. M., Risch A., Graubard B. I., Ward M. H., Park Y., Hollenbeck A. R., Schatzkin A., & Sinha R., (2010). A large prospective study of meat consumption and

colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer research*, 70(6), 2406–2414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3929>

De Dea Lindner J., (2017). Characteristics and production of microbial cultures. In: Penna ALB, Nero LA, Todorov SD, editors. *Fermented foods of Latin America: From traditional knowledge to innovative applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. pp. 269–296.

Dolara P., Commoner B., Vithayathil A., Cuca G., Tuley E., Madyastha P., Nair S., & Kriebel D., (1979). The effect of temperature on the formation of mutagens in heated beef stock and cooked ground beef. *Mutation research*, 60(3), 231–237. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(79\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(79)90013-7)

Dong H., Xian Y., Li H., Bai W., & Zeng X., (2020). Potential carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HAAs) in foodstuffs: Formation, extraction, analytical methods, and mitigation strategies. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 19(2), 365–404. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12527>

EFSA ANS Panel, European Food Safety Authority, Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of caramel colours (E 150a,b,c,d) as food additives. *EFSA J.* 2011, 9, 2004.

EFSA CONTAM Panel, European Food Safety Authority, Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food. *EFSA J.* 2017, 15, 5005.

FDA, Food and Drug Administration. An Updated Exposure Assessment for Furan from the Consumption of Adult and Baby Foods; 18 April 2007; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2007.

FDA, Food and Drug Administration. Exploratory Data on Furan in Food: Individual Food Products; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2009.

Fekry M. I., Engels C., Zhang J., Schwab C., Lacroix C., Sturla S. J., & Chassard C., (2016). The strict anaerobic gut microbe *Eubacterium hallii* transforms the carcinogenic dietary heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Environmental microbiology reports*, 8(2), 201–209. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12369>

Felton J. S., Knize M. G., Roper M., Fultz E., Shen N. H., Turteltaub K. W., (1992). Chemical analysis, prevention, and low-level dosimetry of heterocyclic amines from cooked food. *Cancer research*, 52(7 Suppl), 2103s–2107s.

Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA., (2007). Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat Res*, 616:90–4.

Fierens T., Van Holderbeke M., Cornelis C., Jacobs G., Sioen I., De Maeyer M., Vinkx C., & Vanermen G., (2018). Caramel colour and process contaminants in foods and beverages: Part II - Occurrence data and exposure assessment of 2-acetyl-4-(1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)imidazole (THI) and 4-methylimidazole (4-MEI) in Belgium. *Food chemistry*, 255, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.013>

Fiolet T., Srour B., Sellem L., Kesse-Guyot E., Allès B., Méjean C., Deschasaux M., Fassier P., Latino-Martel P., Beslay M., Hercberg S., Lavalette C., Monteiro C. A., Julia C., & Touvier M., (2018). Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ (Clinical research ed.)*, 360, k322. <https://doi.org/10.1136/bmj.k322>

Folmer D. E., Doell D. L., Lee H. S., Noonan G. O., & Carberry S. E., (2018). A U.S. population dietary exposure assessment for 4-methylimidazole (4-MEI) from foods containing caramel colour and from formation of 4-MEI through the thermal treatment of food. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 35(10), 1890–1910. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1508892>

Fournier D., Hawari J., Streger S. H., McClay K., & Hatzinger P. B., (2006). Biotransformation of N-nitrosodimethylamine by *Pseudomonas mendocina* KR1. *Applied and environmental microbiology*, 72(10), 6693–6698. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-06>

Gibis M., (2016). Heterocyclic Aromatic Amines in Cooked Meat Products: Causes, Formation, Occurrence, and Risk Assessment. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 15(2), 269–302. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12186>

Göker G., Kıralan S., Tekin A., & Erdoğan F., (2021). Formation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) during drying process of olive pomace. *Food chemistry*, 345, 128856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128856>

- Goldman, R., & Shields, P. G., (2003). Food mutagens. The Journal of nutrition, 133 Suppl 3, 965S–973S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.3.965S>
- Hamidi E. N., Hajeb P., Selamat J., Abdull Razis A. F., (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and their Bioaccessibility in Meat: a Tool for Assessing Human Cancer Risk. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 17(1), 15–23. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.1.15>
- Hanser T, Barber C, Rosser E, Vessey J, Webb SJ, Werner S., (2014). Self organising hypothesis networks: a new approach for representing and structuring SAR knowledge. J Cheminformatics, 6:21.
- Hillebrecht A, Muster W, Brigo A, Kansy M, Weiser T, Singer T., (2011). Comparative evaluation of in silico systems for Ames test mutagenicity prediction: scope and limitations. Chem Res Toxicol, 24:843–54.
- Honma M., (2016). Threshold of toxicological concern for genotoxic impurities in pharmaceuticals. In: Nohmi T, Fukushima S, editors. Thresholds of genotoxic carcinogens. UK: Academic Press, p. 103–15.
- Honma M., (2020). An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure–activity relationship. Genes and Environ 42, 23. <https://doi.org/10.1186/s41021-020-00163-1>
- Hosaka S., Matsushima T., Hirono I., & Sugimura T., (1981). Carcinogenic activity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b]indole (Trp-P-2), a pyrolysis product of tryptophan. Cancer letters, 13(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(81\)90082-3](https://doi.org/10.1016/0304-3835(81)90082-3)
- Howard J. W., & Fazio T., (1980). Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 63(5), 1077–1104.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 1995; Volume 63.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, (2013). Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking Water; IARC Monographs on the

Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, Volume 101.

ICH-M7 (R1), (2017). ICH Harmonized Guideline. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. <https://www.ich.org/home.html>.

Ingenbleek L., Veyrand B., Adegboye A., Hossou SE., Koné AZ., Oyedele AD., Kisito CSKJ., Dembélé YK., Eyangoh S., Verger P., Leblanc JC., Durand S., Venisseau A, Marchand P., Bizec BL., (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods from the first regional total diet study in Sub-Saharan Africa: contamination profile and occurrence data. Food Control. 103:133–144. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.04.006.

Ishikawa T., S. Takayama, T. Kitagawa, T. Kawachi, M. Kinebuchi, N. Matsukura, E. Uchida, and T. Sugimura, (1979). In vivo experiments on tryptophan pyrolysis products. Pp. 159-167 in E. C. Miller, editor; , J. A. Miller, editor; , I. Hirono, editor; , T. Sugimura, editor; , and S. Takayama, editor. , eds. Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis. Japan Scientific Societies Press, Tokyo; University Park Press, Baltimore, Md.

Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S., & Sugimura, T., (1991). A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). Carcinogenesis, 12(8), 1503–1506. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.8.1503>

Ito N., Hasegawa R., Imaida K., Tamano S., Hagiwara A., Hirose M., & Shirai T., (1997). Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. Mutation research, 376(1-2), 107–114. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(97\)00032-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(97)00032-8)

Iwaoka W. T., Krone C. A., Sullivan J. J., Meaker E. H., Johnson C. A., & Miyasato L. S., (1981). A source of error in mutagen testing of foods. Cancer letters, 11(3), 225–230. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(81\)90112-9](https://doi.org/10.1016/0304-3835(81)90112-9)

Jacobson-Kram D, & Contrera JF., (2007). Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part I: early screening for potential human mutagens. Toxicol Sci, 96:16–20.

- Jin M, Kijima A, Suzuki Y, Hibi D, Inoue T, Ishii Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K, Umemura T., (2011). Comprehensive toxicity study of safrole using a medium-term animal model with gpt delta rats. *Toxicology*, 290:312–21.
- Kamber M, Fluckiger-Isler S, Engelhardt G, Jaeckh R, Zeiger E., (2009). Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis*, 24:359–66.
- Kasai H., Z. Yamaizumi, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Yokoyama T. Miyazawa, N. E. Spingarn, J. H. Weisburger, and S. Nishimura. (1980). Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditions. *Proc. Jpn. Acad.* 56(B):278-283.
- Kasai H., Z. Yamaizumi, T. Shiomi, S. Yokoyama, T. Miyazawa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, and Nishimura S. (1981). Structure of a potent mutagen isolated from fried beef. *Chem. Lett.* 4:485-488.
- Khan M.R., Bertus L.M., Busquets R., & Puignou L., (2009). Mutagenic heterocyclic amine content in thermally processed offal products. *Food Chemistry*, 112:838–843. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.045.
- Kharkwal M. C., Pandey R. N., & Pawar S. E., (2004). Mutation Breeding for Crop Improvement. Jain H.K., Kharkwal M.C. (eds), *Plant Breeding* (pp. 601–645). Springer, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-007-1040-5_26
- Kim S. R., Kim K., Lee S. A., Kwon S. O., Lee J. K., Keum N., & Park S. M., (2019). Effect of Red, Processed, and White Meat Consumption on the Risk of Gastric Cancer: An Overall and Dose-Response Meta-Analysis. *Nutrients*, 11(4), 826. <https://doi.org/10.3390/nu11040826>
- Kim H. J., Cho J. & Jang A., (2021). Effect of charcoal type on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meats. *Food chemistry*, 343, 128453. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128453>
- Knize M. G., Roper M., Shen N. H., Felton J. S., (1990). Proposed structures for an amino-dimethylimidazofuopyridine mutagen in cooked meats. *Carcinogenesis*, 11(12), 2259–2262. <https://doi.org/10.1093/carcin/11.12.2259>

- Knize M. G., & Felton J. S., (2005). Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutrition reviews*, 63(5), 158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2005.tb00133.x>
- Kobets T, Smith BPC, Williams GM., (2022). Food-Borne Chemical Carcinogens and the Evidence for Human Cancer Risk. *Foods*, 11(18):2828. <https://doi.org/10.3390/foods11182828>
- Koleva YK, Madden JC, Cronin MT., (2008). Formation of categories from structure–activity relationships to allow read-across for risk assessment: toxicity of alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds. *Chem Res Toxicol*, 21:2300–12.
- Konishi Y, Hayashi SM, Fukushima S., (2014). Regulatory forum opinion piece: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substances. *Toxicol Pathol*, 42:949–53.
- Kroes R, Galli C, Munro I, Schilter B, Tran L, Walker R, Würtzen G., (2000). Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing. *Food Chem Toxicol*, 38:255–312.
- Krone CA. and Iwaoka WT., (1983). Mutagen formation in processed foods. In: Finley JW, Schwass DE, editors. *Xenobiotics in foods and feeds*. Washington, DC: American Chemical Society. pp. 117–127.
- Krone C. A., Yeh S. M. & Iwaoka W. T., (1986). Mutagen formation during commercial processing of foods. *Environmental health perspectives*, 67, 75–88. <https://doi.org/10.1289/ehp.866775>
- Kumawat S., Rana N., Bansal R., Vishwakarma G., Mehetre S. T., Das B. K., Kumar M., Kumar Yadav S., Sonah H., Sharma T. R. and Deshmukh R., (2019). Expanding avenue of fast neutron mediated mutagenesis for crop improvement. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(6), pp. 164. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8060164>
- Landry C, Kim MT, Kruhlak NL, Cross KP, Saiakhov R, Chakravarti S, Stavitskaya L., (2019). Transitioning to composite bacterial mutagenicity models in ICH M7 (Q) SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol*, 109:104488.
- Le N. T., Michels F. A., Song M., Zhang X., Bernstein A. M., Giovannucci E. L., Fuchs C. S., Ogino S., Chan A. T., Sinha R., Willett W. C., & Wu K., (2016). A Prospective Analysis

of Meat Mutagens and Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study and Health Professionals Follow-up Study. *Environmental health perspectives*, 124(10), 1529–1536. <https://doi.org/10.1289/EHP238>

Lee J. S., & Fong L. Y., (1979). Mutagenicity of Chinese alcoholic spirits. *Food and cosmetics toxicology*, 17(6), 575–578. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90116-0](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90116-0)

Lijinsky W., & Shubik P., (1964). BENZO(A)PYRENE AND OTHER POLYNUCLEAR HYDROCARBONS IN CHARCOAL-BROILED MEAT. *Science (New York, N.Y.)*, 145(3627), 53–55. <https://doi.org/10.1126/science.145.3627.53>

Lijinsky W., & Ross A. E., (1967). Production of carcinogenic polynuclear hydrocarbons in the cooking of food. *Food and cosmetics toxicology*, 5(3), 343–347. [https://doi.org/10.1016/s0015-6264\(67\)83061-x](https://doi.org/10.1016/s0015-6264(67)83061-x)

Maron D. M., & Ames B. N., (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation research*, 113(3-4), 173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9)

Matsukura N., Kawachi T., Morino K., Ohgaki H., Sugimura T., & Takayama S., (1981). Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolyzate. *Science (New York, N.Y.)*, 213(4505), 346–347. <https://doi.org/10.1126/science.7244619>

Matsumoto T., Yoshida D., & Tomita H., (1981). Determination of mutagens, amino-alpha-carbolines in grilled foods and cigarette smoke condensate. *Cancer letters*, 12(1-2), 105–110. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(81\)90045-8](https://doi.org/10.1016/0304-3835(81)90045-8)

Mba C. and Shu Q. Y., (2012). Gamma irradiation. In Q. Shu, B. P. Forster, and H. Nakagawa (Eds.), *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 91–98). CABI. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781780640853.0091>

McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN, (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72:5135–9.

Meurillon M. and Engel E., (2016). Mitigation strategies to reduce the impact of heterocyclic aromatic amines in proteinaceous foods. *Trends in Food Science & Technology*. 50:70–84. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.007.

- Merugu N. K., Manapuram S., Chakraborty T., Karanam S. K., & Imandi S. B., (2023). Mutagens in commercial food processing and its microbial transformation. Food science and biotechnology, 32(5), 599–620. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01240-7>
- Miller A., & Miller E C., (1977). Ultimate chemical carcinogen as reactive mutagenic electrophiles. In Origin of Human Cancer, Hiatt, H. H.; Watson, J. D.; Winsten, J. A., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, pp 605–627.
- Miller E. C. and Miller J. A., (1986). Carcinogens and mutagens that may occur in foods. Cancer, 58(8 Suppl), 1795–1803. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19861015\)58:8+<1795::aid-cnrcr2820581403>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19861015)58:8+<1795::aid-cnrcr2820581403>3.0.co;2-h)
- Molognoni L., Motta G. E., Daguer H., De Dea Lindner J., (2020). Microbial biotransformation of N-nitro-, C-nitro-, and C-nitrous-type mutagens by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus in meat products. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 136, 110964. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110964>
- Morgan M., Deoraj A., Felty Q., & Roy D., (2017). Environmental estrogen-like endocrine disrupting chemicals and breast cancer. Molecular and cellular endocrinology, 457, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.003>
- Moro S., Chipman J.K., Wegener J.W., Hamberger C., Dekant W., Mally A., (2012). Furan in heat-treated foods: Formation, exposure, toxicity, and aspects of risk assessment. Mol. Nutr. Food Res, 56, 1197–1211.
- Mortelmans K., & Zeiger E., (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutation research, 455(1-2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)
- Motta G. E., Molognoni L., Daguer H., Angonese M., da Silva Correa Lemos A. L., Dafre A. L., & De Dea Lindner J., (2020). The potential of bacterial cultures to degrade the mutagen 2-methyl-1,4-dinitro-pyrrole in a processed meat model. Food research international (Ottawa, Ont.), 136, 109441. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109441>
- Mottier P., Mujahid C., Tarres A., Bessaire T., & Stadler R. H., (2017). Process-induced formation of imidazoles in selected foods. Food chemistry, 228, 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.020>

- Müller, L., Sivertsen, T., & Langseth, W. (1998). Ammoniated forage poisoning: concentrations of alkylimidazoles in ammoniated forage and in milk, plasma and urine in sheep and cow. *Acta veterinaria Scandinavica*, 39(4), 511–514. <https://doi.org/10.1186/BF03547777>
- Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., & Sugimura T., (1977). Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer letters*, 2(4-5), 221–226. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(77\)80025-6](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(77)80025-6)
- Namiki M., Osawa T., Ishibashi H., Namiki K., & Tsuji K., (1981). Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 29(2), 407–411. <https://doi.org/10.1021/jf00104a046>
- Nerín C., Aznar M., Carrizo D., (2016). Food contamination during food process. *Trends in Food Science & Technology*. 48:63–68. doi: 10.1016/j.tifs.2015.12.004.
- OECD, (2020). Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- Okamura H, Abe H, Hasegawa-Baba Y, Saito K, Sekiya F, Hayashi S, Mirokuji Y, Maruyama S, Ono A, Nakajima M, Degawa M, Ozawa S, Shibutani M, Maitani., (2015). The Japan flavour and fragrance materials Association's (JFFMA) safety assessment of acetal food flavouring substances uniquely used in Japan. *Food Addit Contam A*, 32:1384–96.
- Oladosu Y., Rafii M. Y., Abdullah N., Hussin G., Ramli A., Rahim H. A., Miah G. and USMAN M., (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(1), pp. 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>
- Olawuyi O. J., Bello B. and Abioye A., (2016). Mutagenic effects of ultraviolet radiation on growth and agronomic characters in maize cultivars. *Molecular Plant Breeding*. DOI: <https://doi.org/10.5376/mpb.2016.07.0001>
- Ono A, Takahashi M, Hirose A, Kamata E, Kawamura T, Yamazaki T, Sato K, Yamada M, Fukumoto T, Okamura H, Mirokuji Y, Honma M., (2012). Validation of the (Q) SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. *Food Chem Toxicol*, 50:1538–46.

Pamukcu A. M., Yalçiner S., Hatcher J. F., & Bryan G. T., (1980). Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer research*, 40(10), 3468–3472.

Park J. E., Seo J. E., Lee J. Y., & Kwon H., (2015). Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food. *Toxicological research*, 31(3), 279–288. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.279>

Pérez-Prior MT., Manso JA., Gómez-Bombarelli R., González-Pérez M., Céspedes IF., García-Santos MP., Calle E., Casado J., (2009). Solvent effects in the decomposition reaction of some products formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite: 1,4-dinitro-2-methylpyrrole and ethylnitrolic acid. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 22:418–424. doi: 10.1002/poc.1477.

Pérez-Prior, M. T., Gómez-Bombarelli, R., González-Pérez, M., Manso, J. A., García-Santos, M. P., Calle, E., Casado, J., (2010). Reactivity of the mutagen 1,4-dinitro-2-methylpyrrole as an alkylating agent. *The Journal of organic chemistry*, 75(5), 1444–1449. <https://doi.org/10.1021/jo902329q>

Qu J., Xia W., Qian X., Wu Y., Li J., Wen S., & Xu S., (2022). Geographic distribution and time trend of human exposure of Di(2-ethylhexyl) phthalate among different age groups based on global biomonitoring data. *Chemosphere*, 287(Pt 2), 132115. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132115>

Ramesh M. and Muthuraman A., (2018). Flavoring and coloring agents: health risks and potential problems. In: A.M. Grumezescu and A.M. Holban, eds. *Natural and artificial flavoring agents and food dyes* London: Academic Press, pp. 1-28. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3.00001-6>

Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed research international*, 2018, 1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>

Saito D., Shirai A., Matsushima T., Sugimura T., & Hirono I., (1980). Test of carcinogenicity of quercetin, a widely distributed mutagen in food. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 1(2), 213–221. <https://doi.org/10.1002/tcm.1770010209>

- Sales I.M.S., Silva J.M., Moura E.S.R., Alves F.D.S., Silva F.C.C., Sousa J.M.C. and Peron A.P., (2018). Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 78, no. 2, pp. 306-310. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.07716>
- Sambu, S., Hemaram, U., Murugan, R., & Alsofi, A. A. (2022). Toxicological and Teratogenic Effect of Various Food Additives: An Updated Review. *BioMed research international*, 2022, 6829409. <https://doi.org/10.1155/2022/6829409> (Retraction published *Bio-med Res Int.* 2024 Jan 9;2024:9792751. doi: 10.1155/2024/9792751.
- Santos F.K.D.S., Marques M.M.M., Van Tilbulrg M.F., Guedes M.I.F., Bueno P.A.A. and Peron A.P., (2020). Toxicity of food flavorings to ex-vivo, in vitro and in vivo bioassays. *Acta Scientiarum. Technology*, vol. 42, no. 2, pp. 44867.
- Seino Y., Nagao M., Yahagi T., Sugimura T., Yasuda T., & Nishimura S., (1978). Identification of a mutagenic substance in a spice, sumac, as quercetin. *Mutation research*, 58(2-3), 225–229. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(78\)90013-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(78)90013-7)
- Serafimova R, Gantik M, Worth A., (2010). Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity. In *JRC Scientific and Technical Reports*, Vol. EUR 24427 EN.
- Shabbir M. A., Raza A., Anjum F. M., Khan M. R., & Suleria H. A., (2015). Effect of thermal treatment on meat proteins with special reference to heterocyclic aromatic amines (HAAs). *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(1), 82–93. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.647122>
- Sherwood C.L. and Boitano S., (2016). Airway epithelial cell exposure to distinct e-cigarette liquid flavorings reveals toxicity thresholds and activation of CFTR by the chocolate flavoring 2, 5-dimethypyrazine. *Respiratory Research*, vol. 17, no. 1, pp. 57. <http://dx.doi.org/10.1186/s12931-016-0369-9> PMid:27184162.
- Shields, P. G. & Harris, C. C., (2000). Cancer risk and low penetrancesusceptibility genes in gene-environment interactions. *J. Clin. Oncol.* 18: 2309–2315.
- Shu Y. Z., Kingston D. G., Van Tassell R. L., & Wilkins T. D., (1991). Metabolism of 1,4-dinitro-2-methylpyrrole, a mutagen formed by a sorbic acid-nitrite reaction, by intestinal

bacteria. Environmental and molecular mutagenesis, 17(3), 181–187.
<https://doi.org/10.1002/em.2850170307>

Shukla SK, Mangwani N, Rao TS, Das S., (2014). 8 - Biofilm-Mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Das S, editor. Microbial biodegradation and bioremediation. Amsterdam: Elsevier.

Silva S.I.O., Santana G.M., Sales I.M.S., Sousa J.M.C. and Peron A.P., (2016). Toxicity in food flavorings at the cellular level associated with each other at different doses. Acta Scientiarum. Biological Sciences, vol. 38, no. 1, pp. 77-84. <http://dx.doi.org/10.4025/actasci-biolsci.v38i1.30475>

Sinha R., Park Y., Graubard B. I., Leitzmann M. F., Hollenbeck A., Schatzkin A., & Cross A. J., (2009). Meat and meat-related compounds and risk of prostate cancer in a large prospective cohort study in the United States. American journal of epidemiology, 170(9), 1165–1177. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp280>

Spencer-Lopes M. M., Jankuloski, L. Mukhtar Ali Ghanim A., Matijevic M. and Kodym A., (2018). Physical mutagenesis. In M. M. Spencer-Lopes, B. P. Forster, and L. Jankuloski (Eds.), Manual on MUTATION BREEDING. Plant Breeding and Genetics Sub programme. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture

Spingarn N. E., & Garvie C. T., (1979). Formation of mutagens in sugar-ammonia model systems. Journal of agricultural and food chemistry, 27(6), 1319–1321.
<https://doi.org/10.1021/jf60226a023>

Spingarn N. E., Slocum L. A., & Weisburger J. H., (1980). Formation of mutagens in cooked foods. II. Foods with high starch content. Cancer letters, 9(1), 7–12.
[https://doi.org/10.1016/0304-3835\(80\)90134-2](https://doi.org/10.1016/0304-3835(80)90134-2)

Stavric B., Lau B. P., Matula T. I., Klassen R., Lewis D., & Downie R. H., (1997). Mutagenic heterocyclic aromatic amines (HAAs) in 'processed food flavour' samples. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 35(2), 185–197. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(96\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(96)00119-6)

Sugimura, T., & Nagao, M. (1979). Mutagenic factors in cooked foods. CRC critical reviews in toxicology, 6(3), 189–209. <https://doi.org/10.3109/10408447909037483>

- Sugimura T., (1986). Past, present, and future of mutagens in cooked foods. Environmental health perspectives, 67, 5–10. <https://doi.org/10.1289/ehp.86675>
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., & Nagao, M., (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. Cancer science, 95(4), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03205.x>
- Takayama, S., Nakatsuru, Y., Masuda, M., Ohgaki, H., Sato, S., & Sugimura, T. (1984). Demonstration of carcinogenicity in F344 rats of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline from broiled sardine, fried beef and beef extract. Gan, 75(6), 467–470.
- Taylor RT., Fultz E., Knize M., (1985). Mutagen formation in a model beef boiling system III. Purification and identification of three heterocyclic amine mutagens-carcinogens. Journal of Environmental Science and Health Part a: Environmental Science and Engineering. 20:135–148.
- Tikkanen L. M., Sauri, T. M., & Latva-Kala, K. J., (1993). Screening of heat-processed Finnish foods for the mutagens 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 31(10), 717–721. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(93\)90142-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90142-1)
- Tsuda M., Negishi C., Makino R., Sato S., Yamaizumi Z., Hirayama T., Sugimura T., (1985). Use of nitrite and hypochlorite treatments in determination of the contributions of IQ-type and non-IQ-type heterocyclic amines to the mutagenicities in crude pyrolyzed materials. Mutation research, 147(6), 335–341. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90002-0)
- Uyeta M., Taue S., & Mazaki M., (1981). Mutagenicity of hydrolysates of tea infusions. Mutation research, 88(3), 233–240. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(81\)90035-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(81)90035-5)
- Vithayathil A. J., Commoner B., Nair S., & Madyastha P., (1978). Isolation of mutagens from bacterial nutrients containing beef extract. Journal of toxicology and environmental health, 4(1), 189–202. <https://doi.org/10.1080/15287397809529655>
- Vollmuth, T.A. (2018). Caramel color safety—An update. Food Chem. Toxicol, 111, 578–596.

- Von Tungeln L.S., Walker N.J., Olson G.R., Mendoza M.C., Felton R.P., Thorn B.T., Marques M.M., Pogribny I.P., Doerge D.R., Beland F.A., (2017). Low dose assessment of the carcinogenicity of furan in male F344/N Nctr rats in a 2-year gavage study. *Food Chem. Toxicol*, 99, 170–181.
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T., (1992). Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer research*, 52(7 Suppl), 2092s–2098s.
- Wang C., Xie Y., Wang H., Bai Y., Dai C., Li C., Xu X., & Zhou G., (2019). Phenolic compounds in beer inhibit formation of polycyclic aromatic hydrocarbons from charcoal-grilled chicken wings. *Food chemistry*, 294, 578–586. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.094>
- Watson W. A., (1982). The mutagenic activity of quercetin and kaempferol in *Drosophila melanogaster*. *Mutation research*, 103(2), 145–147. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(82\)90020-3](https://doi.org/10.1016/0165-7992(82)90020-3)
- Weisburger J. H., and Spingarn N. E., (1979). Mutagens as a function of mode of cooking of meats. Pp. 177-184 in E. C. Miller, editor; , J. A. Miller, editor; , I. Hirono, editor; , T. Sugimura, editor; , and S. Takayama, editor. , eds. *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis*. Japan Scientific Societies Press, Tokyo; University Park Press, Baltimore, Md
- Williams RV, Amberg A, Brigo A, Coquin L, Giddings A, Glowienke S, Greene N, Jolly R, Kemper R, O'Leary-Steele C, Parenty A, Spirkel HP, Stalford SA, Weiner SK, Wichard J., (2016). It's difficult, but important, to make negative predictions. *Regul Toxicol Pharmacol*, 76:79–86.
- Wójciak K. M., Karwowska M., & Dolatowski Z. J., (2014). Use of acid whey and mustard seed to replace nitrites during cooked sausage production. *Meat science*, 96(2 Pt A), 750–756. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.002>
- Wu X., Huang M., Kong F., Yu S., (2015). Short communication: Study on the formation of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in the Maillard reaction. *J. Dairy Sci.* 98, 8565–8571.
- Yaylayan V.A., (2006). Precursors, formation and determination of furan in food. *J. Verbrauch. Lebensm*, 1, 5–9.

Yoshida D. and Okamoto H., (1980). Formation of mutagens by heating creatine or amino acids with addition of fatty acids. *Agricultural and Biological Chemistry*. 44:3025–3027.

Zhang J., Empl M. T., Schneider M., Schröder B., Stadnicka-Michalak J., Breves G., Steinberg P., & Sturla S. J., (2019). Gut microbial transformation of the dietary mutagen MeIQx may reduce exposure levels without altering intestinal transport. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 59, 238–245.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.04.004>