Primjena indukcijskog faktora u usporedbi rezultata komet-testa izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze

Urošević, Sonja

Master's thesis / Diplomski rad

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:372042

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sonja Urošević

Primjena indukcijskog faktora u usporedbi rezultata komet-testa izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze

Diplomski rad

Zagreb, 2010. godina

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za ekotoksikologiju Zoologijskog zavoda te u Laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Görana I. V. Klobučara, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer ekologija.

ZAHVALE

Od srca se zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Goranu I. V. Klobučaru na velikoj pomoći i razumijevanju pri izradi ovog diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem dipl. ing. Maji Šrut na stručnim savjetima, uloženom trudu i velikoj pomoći i podršci prilikom izrade ovog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno mami i tati koji su mi bili velika potpora tokom cijelog studija i bez kojih ovo sve ne bi bilo moguće.

Hvala svim mojim prijateljima koji su uvijek uz mene i koji mi uljepšavaju i obogaćuju život. Posebno hvala Ivani, Vedranu i svim mojim kolegama i BIUSovcima što su mi učinili studij zanimljivijim i lakšim i hvala Blanki na slici koja me pratila tokom cijelog studiranja.

Veliko hvala Ivoru.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

PRIMJENA INDUKCIJSKOG FAKTORA U USPOREDBI REZULTATA KOMET-TESTA IZVOĐENOG U RAZLIČITIM UVJETIMA ELEKTROFOREZE

Sonja Urošević

Zoologijski zavod
Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilište u Zagrebu
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Komet-test je osjetljiva, brza i ekonomična metoda koja detektira oštećenja DNA u pojedinačnim stanicama. Zbog svoje jednostavne provedbe, često je korišten pri utvrđivanju i procjeni genotoksičnog djelovanja. Različiti uvjeti i načini provedbe komet-testa, otežavaju uspoređivanje dobivenih podataka i rezultata. Stoga je namjera ovog rada istražiti primjenu normiranja, koja bi omogućila usporedbu rezultata dobivenih komet-testom izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze. U ovom radu korištene su dvije stanične linije – PLHC-1 i ZFL te dva modelna genotoksikanta - etil-metanosulfonat (EMS) i vodikov peroksid (H_2O_2). Komet-test je za sve navedene varijable bio izvođen u četiri različita uvjeta elektroforeze, ovisno o jačini (25-35 V) i trajanju (15-20 min). Promatran je genotoksični učinak, koji je prikazan kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tDNA) za obje stanične linije tretirane s EMS-om i vodikovim peroksidom. Indukcijski faktor (IF) je prikazan kao razlika u % tDNA između kontrole i tretiranih grupa.

(36 stranica, 12 slika, 6 tablica, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: genotoksičnost, komet-test, indukcijski faktor, PLHC-1 stanična linija, ZFL stanična linija, EMS, H_2O_2

Voditelj: Dr. sc. Goran I. V. Klobučar, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. Sc. Goran I. V. Klobučar, red.prof.
Dr. Sc. Mirjana Pavlica, red.prof.
Dr. Sc. Domagoj Đikić, doc.

Rad prihvaćen: 01.12.2010.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

APPLICATION OF INDUCTION FACTOR IN COMPARISON OF THE RESULTS OBTAINED IN COMET ASSAY UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF ELECTROPHORESIS

Sonja Urošević

Department of Zoology
Faculty of Science
University of Zagreb
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Croatia

Comet assay is a sensitive, quick and inexpensive method that detects DNA damage in single cells. Because of this, it is often used in the assessment of genotoxic effects. Different conditions and ways of implementation of Comet assay have made it difficult to compare given data and results. Thus, the aim of this research is to investigate the standardization that could enable comparison of results given by Comet assay performed in different electrophoretic conditions. In this study, two different cell lines were used – PLHC-1 fish hepatoma cell line and ZFL cell line, as well as two genotoxic agens - ethyl methanesulfonate (EMS) and hydrogen peroxide (H_2O_2). Comet assay was performed for all given variables and in 4 different conditions of electrophoresis, depending on intensity (25-35 V) and duration (15-20 min). Observed genotoxic effect was demonstrated as percentage of DNA that migrated in the tail during the electrophoresis (% tDNA) for both cell lines treated with EMS and H_2O_2. Induction factor (IF) was represented as difference in % tDNA between the control and treated groups.

(36 pages, 12 figures, 6 tables, 62 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central biological library

Key words: genotoxicity, Comet assay, induction factor, PLHC-1 cell line, ZFL cell line, EMS, H_2O_2

Supervisor: Dr. Goran I. V. Klobučar, Prof.

Reviewers: Dr. Sc. Goran I. V. Klobučar, Prof.
Dr. Sc. Mirjana Pavlica, Prof.
Dr. Sc. Domagoj Đikić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 1st of December 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Biomonitoring 1

1.2. Komet-test 2

1.3. Genotoksičnost 4

1.4. Riblje stanične linije 6

1.4.1. Stanična linija PLHC-1 7

1.4.2. Stanična linija ZFL 7

1.5. Modelni genotoksični agensi 8

1.5.1. Etil-metanosulfonat (EMS) 8

1.5.2. Vodikov peroksid 9

1.6. Cilj istraživanja 9

2. MATERIJALI I METODE 11

2.1. Priprema PLHC-1 i ZFL staničnih kultura i tretiranje stanica 11

2.2. Eksperimentalni uvjeti 11

2.3. Komet-test 12

2.4. Mikroskopska analiza preparata 13

2.5. Statistička obrada podataka 15

3. REZULTATI 16

3.1. PLHC-1 stanična linija 16

3.1.1. EMS 16

3.1.2. Vodikov peroksid 17

3.1.3. Indukcijski faktor 19

3.2. ZFL stanična linija 20

3.2.1. EMS 20

3.2.2. Vodikov peroksid 21

3.2.3. Indukcijski faktor 23

4. RASPRAVA 25

5. ZAKLJUČAK 28

6. LITERATURA 29

1. UVOD

1.1. Biomonitoring

Podatke o mogućem negativnom utjecaju onečišćenja na organizme dobivamo putem različitih analiza uzoraka iz okoliša. Kemijske analize mjere koncentraciju kemijskih tvari u zraku, tlu, vodi i živim organizmima, a otkrivaju vrstu onečišćenja u okolišu. Međutim, same kemijske analize često nisu dovoljne za procjenu toksičnosti uzoraka iz okoliša, zbog neizvedivosti prepoznavanja i mjerenja koncentracije svih mogućih toksikanata (Davoren i sur. 2005). Od mnogih zagađivala pronađenih u različitim uzorcima sedimenta, tek se manji dio može otkriti i kvantificirati putem rutinskih kemijskih analiza (Kammann i sur. 2000). Osim toga, toksičnost kemijskih tvari koje dospiju u okoliš, osim o njihovoj koncentraciji, ovisi i o različitim fizikalno-kemijskim karakteristikama medija u kojem se nalaze (temperatura, pH vrijednost, itd.), kao i o njihovoj biološkoj dostupnosti organizmima. Također, veliki broj različitih kemikalija u okolišu može međusobno stupati u razne interakcije čiji rezultat može biti aditivni, antagonistički ili sinergistički toksični učinak. Tako i sudbina i ponašanje organskih zagađivala u okolišu ovisi o različitim čimbenicima. Iz tih je razloga u svrhu procjene utjecaja onečišćenja na okoliš, osim kemijskih analiza, potrebno koristiti i biološke analize koje mjere reakcije organizama na onečišćenje.

Jedan od načina biološke analize različitih komponenti okoliša je provođenje laboratorijskih testova toksičnosti - biotestova. To su standardizirani ekotoksikološki testovi u kojima se prati djelovanje uzoraka vode, sedimenta, tla ili određene kemikalije na organizme/stanice iste vrste u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Biotestovi omogućuju procjenu količine biološki aktivnih tvari u uzorcima iz okoliša prema razini njihova učinka na testne organizme (Chapman i Long 1983), i kao takvi mogu pomoći u procjeni potencijalne toksičnosti složenih smjesa zagađivala prisutnih u okolišu (Kammann i sur. 2000).

S ciljem pravovremenog otkrivanja negativnih promjena u okolišu nastalih onečišćenjem i određivanja stupnja izloženosti organizama onečišćenju, potrebno je provoditi biološki nadzor okoliša, tj. biomonitoring. Biomonitoring podrazumijeva

praćenje stanja bioloških sustava pomoću biomarkera, tj. pokazatelja promjena na molekularnoj odnosno staničnoj i fiziološkoj razini organizma, koji u homeostazi imaju normalne vrijednosti, a s nastupanjem stresa te se vrijednosti mijenjaju. Bilo koju analizu koja ukazuje na interakciju između biološkog sustava i potencijalno štetnog kemijskog, fizikalnog ili biološkog djelovanja nazivamo biomarkerom (WHO 1993). Važnost biomarkera odražava se u činjenici da odgovaraju na biološki raspoložive koncentracije onečišćavala, a promjene uzrokovane onečišćenjem mogu se opaziti relativno rano.

1.2. Komet-test

Jedna od metoda utvrđivanja genotoksičnog djelovanja kojom se analiziraju primarna oštećenja DNA molekule je komet-test. Komet-test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (eng. *single cell gel electrophoresis assay* - SCGE) je jednostavna metoda mjerenja lomova lanaca DNA u eukariotskim stanicama (Collins 2004). Tijekom mikrogel elektroforeze jezgara, fragmenti DNA, ukoliko su prisutni lomovi, migriraju iz jezgre prema anodi. Jezgra s repom nalikuje kometu i postaje vidljiva nakon fluorescentnog bojanja DNA, a postotak DNA u repu upućuje na stupanj genotoksičnosti.

Prvo izravno mjerenje količine oštećene DNA u pojedinačnim stanicama izveli su 1978. godine Rydberg i Johanson. Stanice uklopljene u agarozni gel lizirali su u blago lužnatim uvjetima, čime su postigli djelomičnu denaturaciju DNA. Nakon bojanja akridin oranžom detektirali su dvolančane (zelena boja) i jednolančane lomove (crvena boja). 1984. godine Östling i Johanson su u metodu uveli elektroforezu, koju su proveli u neutralnim uvjetima. Tijekom elektroforeze, fragmenti DNA putovali su prema anodi brže od ostatka jezgre. Prema veličini tih fragmenata određena je količina oštećene DNA, ali zbog neutralnih uvjeta omogućena je detekcija samo dvolančanih lomova (Cotelle i Ferard 1999; Rojas i sur. 1999).

Postupak komet-testa, koji se s manjim izmjenama i prilagodbama koristi i danas, uveli su 1988. godine Singh i sur. Prema tom se protokolu elektroforeza odvija u izrazito lužnatim uvjetima (pH>13) koji osiguravaju prekidanje vodikovih veza i odvajanje lanaca molekule DNA. Na taj je način omogućeno, osim dvolančanih, detektiranje i jednolančanih lomova. Osim DNA lomova koji su uzrokovani genotoksičnim tvarima izravno ili putem reaktivnih međuspojeva (Lee i Steinert 2003), komet-test otkriva i

mjesta osjetljiva na lužnate uvjete te mjesta nepotpunog popravka oštećenja izrezivanjem, od kojih se oboje ispoljavaju kao jednolančani lomovi (Tice i sur. 2000). Upravo su jednolančani DNA lomovi najčešća primarna oštećenja DNA i vrlo osjetljiv biomarker genotoksičnosti (Kammann i sur. 2001). Također, ovom je metodom moguće detektirati i unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein, koje, za razliku od lomova, smanjuju DNA migraciju u usporedbi s kontrolom (Hartmann i sur. 2003). Iako komet-test otkriva lezije koje su nastale nedavno i mogu se popraviti (Frenzilli i sur. 2009), prevelik genotoksični pritisak može rezultirati nasljednim promjenama DNA s negativnim posljedicama koje se mogu pokazati tek u narednim generacijama (Schnurstein i Braunbeck 2001).

Komet-test je vrlo osjetljiva, brza i ekonomična metoda detekcije oštećenja DNA primjenjiva na bilo koji eukariotski tip stanica (Fairbairn i sur. 1995; Mitchelmore i Chipman 1998; Tice i sur. 2000; Lee i Steinert 2003; Frenzilli i sur. 2009). Osim toga, ova metoda otkriva oštećenja u pojedinačnim stanicama te zahtijeva mali broj stanica koje ne moraju biti mitotički aktivne (Cotelle i Ferard 1999; Rojas i sur. 1999; Kammann i sur. 2001; Lee i Steinert 2003; Frenzilli i sur. 2009). Jedini zahtjev je da dovoljan broj pojedinačnih stanica bude održan u suspenziji bez uzrokovanja dodatnih oštećenja (Rojas i sur. 1999).

Komet-test je često korištena metoda procjene genotoksičnosti i u *in vivo* i u *in vitro* sustavima. Uspješno je izveden sa nekoliko ribljih staničnih linija, uključujući RTG-2 (Nehls i Segner 2001), RTL-W1 (Nehls i Segner 2001; Rocha i sur. 2009), RTH-149 (Avishai i sur. 2002; Kamer i Rinkevich 2002) i EPC stanične linije (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Komet-test na staničnoj liniji EPC pokazao je jasne razlike u genotoksičnosti ekstrakata morskog sedimenta s različitih lokacija u Sjevernom i Baltičkom moru, a rezultati su povezani s ukupnom količinom organske tvari u sedimentu i s analiziranim zagađivačima (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Kamer i Rinkevich (2002) su upotrebu komet-testa na ribljim hepatocitima stanične linije RTH-149 ocijenili kao brzu i osjetljivu metodu prikladnu za otkrivanje genotoksičnog potencijala u programima monitoringa vodenog okoliša. Rezultati Nehlsa i Segnera (2005) također upućuju na prikladnost komet-testa sa staničnom linijom RTG-2 kao *in vitro* metode istraživanja genotoksičnog potencijala uzoraka iz okoliša.

Metoda komet-testa svoju je primjenu pronašla u različitim područjima istraživanja, od testiranja genotoksičnosti novih kemikalija, biomonitoringa onečišćenja okoliša, do istraživanja oštećenja i popravaka DNA te različite upotrebe u genetičkoj toksikologiji (Tice i sur. 2000; Collins 2004). Budući da se pokazao kao pogodna metoda za istraživanje genotoksičnog potencijala uzoraka iz okoliša (Cotelle i Ferard 1999), komet-test je korišten i u ovom radu.

1.3. Genotoksičnost

Potencijalno štetno djelovanje onečišćavala može se procijeniti na različitim razinama biološke organizacije: od molekule, stanice, tkiva, organa i organizma, pa do populacije, zajednice i ekosistema. Odgovor na molekularnoj razini prethodi odgovorima na višim organizacijskim razinama, pa je stoga najraniji pokazatelj i upozorenje na promjene u okolišu. Jedno od najučestalijih mjesta djelovanja onečišćenja na molekularnoj razini je DNA molekula. Genotoksične tvari su ksenobiotici koji svojim mutagenim i kancerogenim djelovanjem uzrokuju promjene u genomu koje mogu imati negativne posljedice za normalno funkcioniranje i reprodukciju organizama. Utjecaj genotoksičnih tvari na cjelovitost DNA jedan je od prvih događaja u organizmima izloženima zagađivačima (Frenzilli i sur. 2009). Biomonitoringom DNA oštećenja u prirodi bavi se ekogenotoksikologija. To je znanost o kemijski ili zračenjem izazvanim promjenama genetskog materijala organizama u prirodi (Anderson i sur. 1994).

Većina genotoksikanata je lipofilna pa se u vodenim ekosustavima akumuliraju u biološkoj komponenti (Kleinjans i van Schooten 2002). Održavanje cjelovitosti DNA je bitno za normalno funkcioniranje svih živih bića pa zato postoje razni, vrlo učinkoviti mehanizmi zaštite genetičkog materijala (de Almeida i sur. 2003), uključujući i mehanizme popravka DNA. Nakon oštećenja DNA, stanica ima tri mogućnosti: potpuni popravak oštećenja DNA, nepotpuni popravak oštećenja DNA ili samouništenje (apoptoza). U slučaju nepotpunog popravka dolazi do mutacija i nastanka disfunkcionalnih proteina, teratogeneze (razvojne malformacije), karcinogeneze (rak ili neoplazija) ili klastogeneze (kromosomske aberacije). O tome govori i Kurelec (1993), te navodi niz promjena koje slijede nakon oštećenja DNA molekule, kao što su poremećena funkcija enzima i proteina, promjene u metabolizmu, inhibicija rasta i razvoja, degenerativni procesi i atrofija tkiva i organa, ubrzano starenje, poremećen imunološki odgovor, smanjena reprodukcija,

povećana učestalost bolesti, smanjene prilagodbe i preživljavanje, te na kraju nestanak vrste. Sve te poremećaje zajedno naziva sindromom genotoksičnih bolesti. Ukoliko se ne poprave, nastala oštećenja DNA molekule mogu uzrokovati niz posljedica na razini stanice, organa, jedinke te na kraju i cijele populacije (Lee i sur. 2003). Čak i u malim koncentracijama, genotoksikanti mogu djelovati na razini populacije i zajednice i to kroz više generacija. Oštećenje DNA je izvrstan pokazatelj štetnog djelovanja na okoliš jer otvara mogućnost preventivnog djelovanja s ciljem zaštite i očuvanja viših razina biološke organizacije, npr. očuvanja populacija ili vrsta, te općenito bolje kvalitete okoliša.

Kemikalije mogu oštetiti DNA izravnim djelovanjem (bez metaboličke aktivacije), putem metabolita, stvaranjem reaktivnih vrsta kisika (eng. *reactive oxygen species* - ROS), inhibicijom sinteze i popravka DNA, te putem drugih složenih mehanizama (Lee i Steinert 2003). Do oštećenja DNA dolazi i u normalnim uvjetima, npr. prilikom replikacije i tijekom uobičajenih staničnih procesa kao što su metabolizam i respiracija, no izlaganje kemijskim spojevima i zračenju može znatno povećati količinu tih oštećenja, a time i njihove posljedice.

Međudjelovanje genotoksičnih spojeva s DNA molekulom prvo uzrokuje njene strukturalne promjene koje obuhvaćaju stvaranje lomova lanaca DNA, promjenu baza, stvaranje DNA adukata (kovalentno vezanje kemijskog spoja ili njegovih metabolita za baze i fosfatne skupine u DNA), te unakrsne veze DNA (Shugart i Theodorakis 1994; Devaux i sur. 1997; Kosmehl i sur. 2004). Budući da je stvaranje lomova lanaca DNA povezano s mutagenim i karcinogenim svojstvima okolišnih zagađivala različitih struktura (Frenzilli i sur. 2009), oni se koriste kao biomarkeri genotoksičnosti u biomonitoringu vodenih ekosustava (Mitchelmore i Chipman 1998).

Za određivanje genotoksičnog učinka na stanice koriste se brojne metode kojima se detektira oštećenje molekule DNA kao što su alkalna elucija, alkalno odmatanje, komet-test, kromosomske aberacije, mikronukleus-test i izmjena sestrinskih kromatida. Do sada je većina ekogenotoksikoloških istraživanja rađena na vodenim organizmima, i to uglavnom morskim (Štambuk 2005).

1.4. Riblje stanične linije

Do podataka o toksičnom učinku na molekularnoj i staničnoj razini može se učinkovito doći uz pomoć staničnih kultura (Bols i sur. 2005). Stanične kulture, osobito one dobivene iz riba, uspješno se primjenjuju u ekotoksikološkim istraživanjima kao alternativa istraživanjima na živim organizmima (Davoren i sur. 2005). U usporedbi s *in vivo* istraživanjima, stanične kulture zahtijevaju manju količinu uzoraka, provedba testa je brža i jeftinija, osjetljiviji su i specifičniji, a interpretacija rezultata je jasnija jer nema nekih dodatnih čimbenika koji bi mogli utjecati na njih, kao što su bioakumulacija i pročišćavanje (Bols i sur. 2005; Davoren i sur. 2005). Osim toga, upotrebom staničnih kultura smanjuje se korištenje i žrtvovanje životinja. Za proučavanje animalnih stanica *in vitro* koriste se dva tipa staničnih kultura: primarne kulture i stanične linije. Primarne se kulture dobivaju izravno iz tkiva životinje i uobičajeno traju samo nekoliko dana, dok stanične linije nastaju nakon prvog supkultiviranja primarne kulture i imaju puno duži životni vijek (Bols i sur. 2005).

Stanične su linije, osim navedenih prednosti koje imaju sve stanične kulture, standardizirane, lako dostupne i upotrebljive, njihova priprema i održavanje zahtijeva manje laboratorijskog rada te pružaju neograničene zalihe genetski homogenih stanica (Nehls i Segner 2005; Bols i sur. 2005; Zhou i sur. 2006). Visoki potencijal u ekotoksikologiji pokazale su riblje stanične linije (Fent 2001). Proučavajući utjecaj toksikanata na različite taksonomske grupe, ribe su se pokazale kao jedna od ključnih grupa za istraživanje ekološkog rizika. Ribe predstavljaju najraznolikiju grupu kralježnjaka koja zauzima različite ekološke niše u vodenom sustavu i koja ima značajnu ulogu u kruženju energije između različitih trofičkih nivoa. Utjecaj onečišćavala na ribe može imati veliku važnost i za potencijalni utjecaj na ljudsko zdravlje Stoga, razumijevanje utjecaja toksikanata na ribe može ponuditi značajan uvid u procjeni sveukupnog zdravlja vodenog okoliša (Bols et al., 2005). U istraživanjima se koriste riblje stanične linije radi određivanja relativne toksičnosti različitih spojeva i uzoraka iz okoliša, kod proučavanja interakcija između ekotoksikanata i fizikalnih parametara okoliša, te prilikom razvoja biomarkera (Bols i sur. 2005). Kod procjene uzoraka iz okoliša, riblje stanične linije koriste se u različitim biotestovima radi otkrivanja prisutnosti toksičnih tvari u uzorcima riba, vode i sedimenta. Ti biotestovi uključuju procjenu citotoksičnosti, određivanje aktivnosti arilhidrokarbonskog (eng. *aryl hydrocarbon* - Ah) receptora

mjerenjem CYP1A (eng. *cytochrome P450 1A*) indukcije, procjenu genotoksičnosti, te određivanje okolišnih estrogena i spojeva koji uzrokuju oksidativni stres (Bols i sur. 2005).

1.4.1. Stanična linija PLHC-1

Stanična linija PLHC-1 (eng. *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma line 1), dobivena iz karcinoma ribljih hepatocita vrste *Poeciliopsis lucida*, do sada je korištena u različitim istraživanjima toksikologije vodenog okoliša. PLHC-1 stanice zadržavaju mnoga svojstva potpuno diferenciranih hepatocita te imaju relativno kratko vrijeme duplikacije (24 h). PLHC-1 stanice imaju kapacitet metaboliziranja ksenobiotika, što omogućuje, osim izravnih, otkrivanje i neizravnih toksikanata (Babich i sur. 1991). PLHC-1 stanična linija korištena je u istraživanjima citotoksičnosti (Babich i sur. 1991; Fent i Hunn 1996), lipidne peroksidacije (Rau i sur. 2004) i indukcije metalotioneina (Schlenk i Rice 1998). Fent i Hunn (1996) utvrdili su sličan trend kod istraživanja citotoksičnosti *in vitro* na PLHC-1 staničnoj liniji i akutne toksičnosti kod riba *in vivo*. Prema Pichardo i sur. (2005), nakon izlaganja toksinima cijanobakterija, PLHC-1 stanice su na morfološkoj i biokemijskoj razini pokazale veću osjetljivost nego RTG-2 stanice. PLHC-1 stanice imaju Ah-receptor, zbog čega se uspješno koriste za određivanje CYP1A indukcije različitih spojeva i okolišnih uzoraka (Hahn i sur. 1993; Fent 2001). U nekoliko je istraživanja mjerenje CYP1A indukcije u PLHC-1 stanicama korišteno za procjenu toksičnosti sedimenata (Huuskonen i sur. 1998a, 1998b, 2000; Traven i sur. 2008).

1.4.2. Stanična linija ZFL

Stanična linija ZFL (Zebra fish liver), dobivena iz ribljih hepatocita vrste *Danio rerio*, se uspješno koristi kao model u toksikologiji, farmaciji, istraživanju karcinoma i otkrivanju droga (Zon i Peterson, 2005; Lam i sur., 2006). Stanice vrste *Danio rerio* (zebrice) se zbog svoje male veličine, brze reprodukcije (postižu seksualnu zrelost u 3 mjeseca) i optički transparentnih embrija mogu koristiti ne samo u *in vitro* staničnim analizama, već i u *in vivo*. Zebrice su relativno noviji modelni organizam pa je i proizvedena samo nekolicina staničnih linija. U ranim devedesetim godinama, Collodi i sur. su razvili metode uzgoja kultura stanica iz ranih stadija embrija zebrica i iz organa odraslih riba (škrge, jetra, repna peraja...). Proizveli su ZFL staničnu liniju iz fonda od

~10 normalnih odraslih jetri zebrica. ZF4, prve poznate stanične linije koje mogu biti održavane u mediju koji sadrži serum sisavaca, su proizvedene 24h nakon fertilizacije embrija. Većina poznatih staničnih linija ZFL su netransformirane embrionske linije.

S obzirom na navedeno, PLHC-1 i ZFL stanične linije su vrlo pogodni i osjetljivi biološki materijali za provedbu *in vitro* biotestova u svrhu biomonitoringa.

1.5. Modelni genotoksični agensi

Za ova istraživanja odabrani su etil-metanosulfonat (EMS) i vodikov peroksid (H_2O_2) kao modelni genotoksični agensi.

1.5.1. Etil-metanosulfonat (EMS)

EMS je monofunkcionalni alkilirajući agens koji djeluje direktno na DNA bez metaboličke aktivacije, alkilirajući baze DNA, odnosno dodavajući na baze etilnu skupinu. Oštećenja DNA nakon izlaganju EMS-u dokazana su kod mnogih organizama i tipova stanica komet-testom: kod žarnjaka (Mitchelmore i Hyatt, 2004), biljka (Gichner i sur.1999, Gichner 2000, 2003, Pincheira i sur. 2003), kukaca (Bilbao i sur. 2002) i na staničnim linijama sisavaca (Miyame i sur. 1997). U mnogim slučajevima zabilježen je pravilan doza-odgovor, a prema Stavreva i sur. (1988 (iz Pincheira i sur. 2003) doza-odgovor u oštećenju DNA nakon izlaganja EMS-u sličan je za stanice biljaka i sisavaca. Mikronukleus-test je nakon izlaganja organizama EMS-u pokazao pozitivan odgovor kod biljaka (Patra i sur. 2000), školjkaša (Dopp i sur. 1996, Wrisberg i sur. 1992) i riba (Guha i sur. 2002,2003, Odeigah i Osanyipeju 1995). Mutagena svojstva EMS-a uglavnom su posljedica stvaranja O^6-etilgvanina, iako je najveći broj oštećenja uzrokovano etilacijom dušikovih atoma (Beranek 1990). Većina alkilacija dušikovih atoma baza koje uzrokuje EMS su N^7-alkilgvanin, koji ne blokira polimerizaciju DNA, dok je manji udio oštećenja N^3-alkiladenin, koji spriječava sintezu DNA i vodi u staničnu smrt (Larson i sur. 1985, Boiteux i sur. 1984, Lindahl i sur. 1997, O‘Connor i sur 1988).

1.5.2. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) nije jako reaktivan u vodenoj otopini, no reagirajući sa superoksidnim ionom ($O_2^{\bullet -}$) daje hidroksidni ion ($OH^{\bullet -}$) koji je izuzetno reaktivan i trenutno reagira s gotovo svim organskim molekulama (Livingstone 2001). Tretiranje s vodikovim peroksidom inducira u jednakoj mjeri jednostruke lomove DNA i oksidativne modifikacije baza (Epe i Hegler 1994). Vodikov peroksid u prirodi može nastati djelovanjem sunca u plitkim dijelovima vodenog ekosustava. Vodikov peroksid je prisutan u prirodi, lako prelazi u jako reaktivan kisikov radikal te je lako dostupan pa je iz tih razloga u ovom istraživanju izabran kao modelni oksidirajući genotoksikant. Procijenjeno je da se 1-3% O_2 koje životinja unese u organizam pretvara u slobodne kisikove radikale (Halliwell i Gutteridge 1999). Slobodni kisikovi radikali imaju veliku ulogu u fiziološkoj kontroli staničnih funkcija u biološkim sustavima te se zato stalno stvaraju u živim stanicama (Halliwell i Gutteridge 1999), produkt su normalnog metabolizma kisika, imaju veliku ulogu u staničnim signalnim putevima te su vrlo važni u imunosnom sustavu kao pomoć pri borbi protiv patogena. Slobodni kisikovi radikali uključuju superoksidni ion (O_2^-), hidroksidni ion (OH^-) i perokside organskog i anorganskog porijekla, među kojima i vodikov peroksid. To su većinom vrlo male i jako reaktivne molekule zbog nesparenih elektrona u valentnoj elektronskoj ljusci.

Oštećenja DNA molekule mogu nastati kroz međudjelovanje s kisikovim radikalima i mnogim drugim reaktivnim međuproduktima (Lee i sur. 2003). Oštećenje DNA se smatra najozbiljnijim učinkom slobodnih kisikovih radikala jer se DNA molekula ne sintetizira *de novo* nego nastaje replikacijom pa razne modifikacije baza mogu rezultirati mutacijama i genetskom nestabilnosti (Poulsen 2005).

1.6. Cilj istraživanja

Svrha ovog diplomskog rada je uspostava i standardizacija metode komet-testa na PLHC-1 i ZFL ribljoj staničnoj liniji te primjena indukcijskog faktora kao sredstva usporedbe rezultata komet-testa izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

- optimizirati metodu komet-testa na PLHC-1 i ZFL ribljim staničnim linijama i usporediti njihovu osjetljivost,
- usporediti utjecaj genotoksičnih agensa EMS i vodikovog peroksida,
- primijeniti indukcijski faktor s ciljem ujednačavanja dobivenih rezultata komet-testa pri različitim uvjetima elektroforeze (duljina trajanja i voltaža elektroforeze) i njihove lakše usporedbe

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Priprema PLHC-1 i ZFL staničnih kultura i tretiranje stanica

PLHC-1 stanice (ATCC CRL-2406) su uzgajane u flaskovima za kulturu stanica površine 25 cm^2 u DMEM/F12 mediju (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) s 5% fetalnog goveđeg seruma (eng. *foetal bovine serum* - FBS) (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) na 30°C. Stanice su presađivane svakih 3-5 dana u omjeru 1:3.

ZFL stanice su uzgajane u flaskovima za kulturu stanica površine 25 cm^2 u mediju koji se sastoji od 15% F12 (Invitrogen), 35% DMEM (Invitrogen), 50% L15 (Invitrogen) uz dodatak 0.15 g/L $NaHCO_3$, 3.9 g/L Hepes, 10 mg/L inzulina i 5% FBS.

Za procjenu genotoksičnosti, stanice su nacjepljivane na mikroploču s 24 jamice u 1 mL medija tijekom 24 h kako bi se sve stanice pričvrstile na podlogu. Nakon 24 h, medij je uklonjen i zamijenjen serijskim razrjeđenjima (EMS: 10-1000 μM; vodikov peroksid: 10-250 μM). Napravljene su po tri replike za svaku ispitivanu koncentraciju. Netretirane stanice poslužile su kao kontrola. Stanice su zatim inkubirane 24 h na 28°C (ZFL), tj. 30°C (PLHC-1). Nakon inkubacije stanice su isprane s 1 mL fosfatnog pufera (eng. *phosphate buffer saline* - PBS), tripsinizirane hladnom otopinom 0,4%-tnog tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) u PBS-u te podvrgnute komet-testu. Vijabilnost stanica je procijenjena metodom bojenja tripanskim modrilom, te je za sve testirane koncentracije iznosila preko 95%.

2.2. Eksperimentalni uvjeti

- izlaganje genotoksičnom agensu:

  1) EMS (etil-metanosulfonat) – 2h

  Koncentracije: 10 μM, 100 μM, 1000 μM

  2) vodikov peroksid – 10min

  Koncentracije: 10 μM, 100 μM, 250 μM

- uvjeti elektroforeze:
  - ***a*** = 25 V/15 min
  - ***b*** = 25 V/20 min
  - ***c*** = 35 V/15 min
  - ***d*** = 35 V/20 min

2.3. Komet-test

Komet-test je s manjim izmjenama izveden prema protokolu kojeg su opisali Singh i sur. (1988). Na djelomično brušena predmetna stakalca nanesen je prvi sloj agaroznog gela, 1% NMP (eng. *normal melting point*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) agaroza. Kada se agarozni gel posušio, 50 µl suspenzije stanica je pomiješano s 50 µl 0.5% LMP (eng. *low melting point*) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD) agaroze i stavljeno na predmetna stakalca koja su zatim prekrivena pokrovnicom. Gel je nakon 3 min na 0 °C očvrsnuo, a pokrovnice su uklonjene. Tada je nanesen treći sloj agaroznog gela, 80 µl 0.5% LMP agaroze, stakalca su zatim prekrivena pokrovnicom i ostavljena 3 min na 0 °C da gel očvrsne. Pokrovnice su zatim uklonjene, a predmetna stakalca su uronjena u prethodno priređenu otopinu za liziranje stanica (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% DMSO, 1% Triton X-100, pH 10) tijekom 1 h na 4 °C u mraku. Nakon toga, preparati su isprani destiliranom vodom, odloženi u kadicu za elektroforezu i prekriveni prethodno priređenim hladnim puferom za alkalnu denaturaciju DNA (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13). Nakon 15 min (*a*,*c*), tj. 20 min (*b*,*d*), u istom je puferu provedena elektroforeza na 25 V kod *a* i *b* uvjeta i na 35 V kod *c* i *d* uvjeta. Poslije elektroforeze preparati su isprani hladnim neutralizacijskim puferom (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), 2x5 min. Preparati su zatim fiksirani otopinom metanol:octena kiselina (3:1) tijekom 5 min i pohranjeni u mraku na sobnoj temperaturi.



Slika 1. Kadice za elektroforezu, obložene ledom

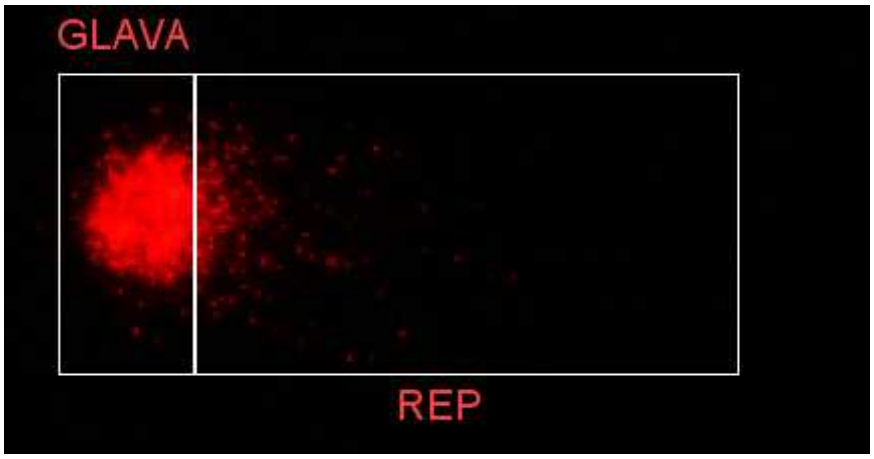
2.4. Mikroskopska analiza preparata

Prije pregledavanja preparata mikroskopom, stanice su rehidrirane destiliranom vodom i tretirane otopinom fluorescentne boje etidij bromid (10 μg/mL) (EtBr, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Suvišak boje je ispran destiliranom vodom, a preparati su prekriveni pokrovnicama i pregledani Zeiss Axioplan epifluorescencijskim mikroskopom (filter 09: ekscitacija na valnoj duljini 520 nm, emisija na valnoj duljini 610 nm) pri povećanju objektiva 40x. Mikroskop je povezan s CCD kamerom. Po svakom preparatu je pregledano i fotografirano najmanje 50 nasumično odabranih stanica (slika 2.).

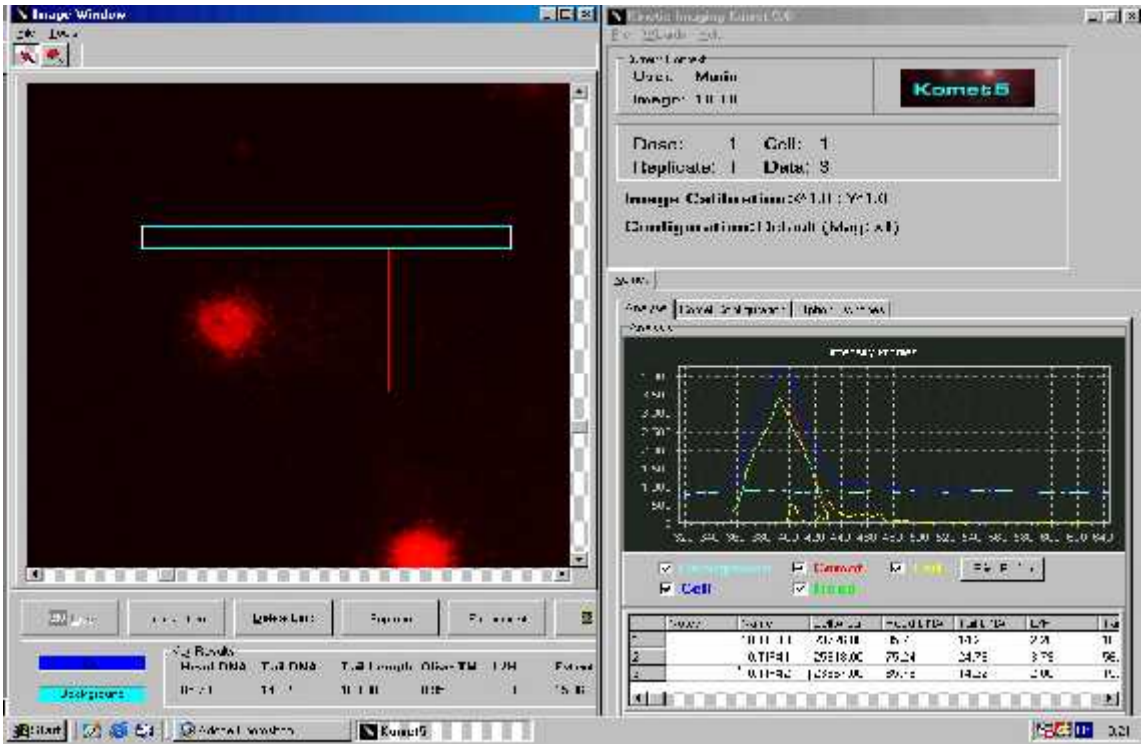


Slika 2. Fluorescencijsko mikroskopska slika PLHC-1 stanica nakon izvedenog komet-testa.

Stanice su zatim analizirane u računalnom programu za analizu slika Komet 5.0 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK). Kao parametar za procjenu oštećenja DNA korišten je postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tail DNA) (slika 3. i 4.).



Slika 3. «Glava» i «rep» «kometa».



Slika 4. Analiza jezgara pomoću računalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging

2.5. Statistička obrada podataka

Za svaku je grupu izračunata srednja vrijednost DNA oštećenja na temelju srednjih vrijednosti svake od replika unutar grupe. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i pripadajuća standardna pogreška ($\overline{x} \pm$ SEM). Za statističku analizu je korišten Mann-Whitney *U*-test. Statistički značajni podaci su određeni sa $p \leq 0.05$. Za PLHC-1 i ZFL stanične linije i njihove genotoksikante (EMS, H_2O_2) je izračunat indukcijski faktor (IF) dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije sa srednjom vrijednosti % tDNA kontrole.

3. REZULTATI

Oštećenje DNA u PLHC-1 i ZFL stanicama mjereno komet-testom prikazano je kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tDNA).

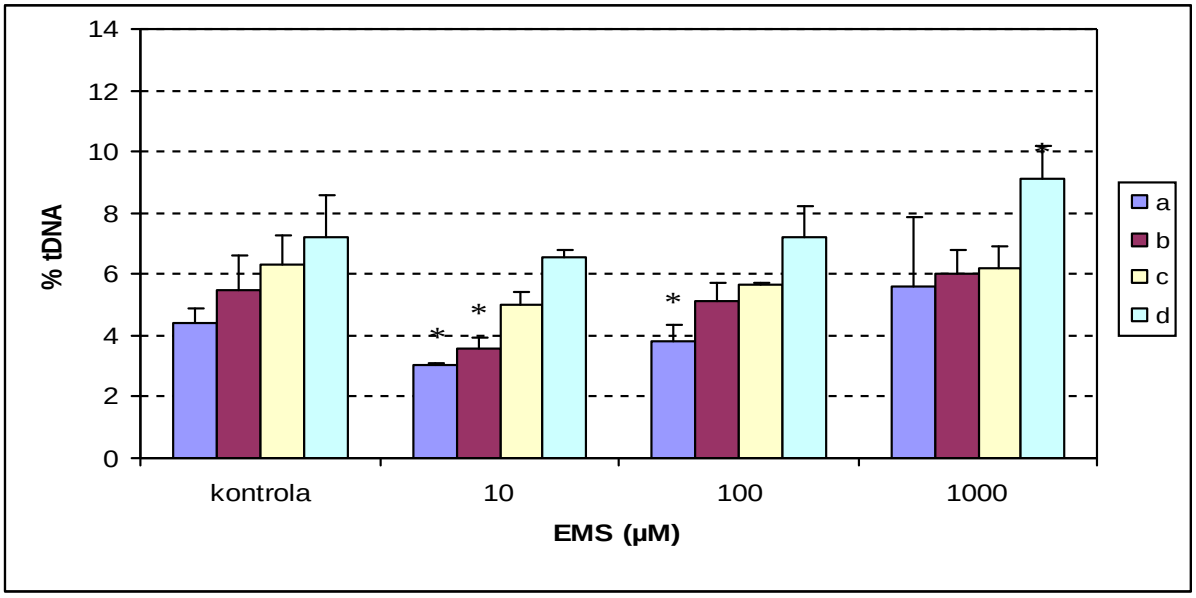
3.1. PLHC-1 stanična linija

3.1.1. EMS

Prema tablici 1. najveće oštećenje DNA su pokazale stanice tretirane koncentracijom od 1000 µM EMS-a pri uvjetima 35 V elektroforeze (9,1%), dok su stanice tretirane s najmanjom koncentracijom EMS-a (10 µM) i u uvjetima 25 V elektroforeze, imale najmanja oštećenja (3%). Na slici 5. je vidljivo povećanje % tDNA ovisno o uvjetima elektroforeze, tj. za svaku grupu stanica tretiranih određenom koncentracijom EMS-a, vidi se gradacija oštećenja. Postotak tDNA raste od uvjeta *a* (pri elektroforezi od 25 V provođenoj 15 min) do uvjeta *d* (pri elektroforezi od 35 V u trajanju od 20min) u kontroli i pri svim koncentracijama EMS-a. Stoga, najveća oštećenja su pokazale stanice izložene najdulje vrijeme (20min) s najvećom voltažom (35V). Nije primjećen značajan porast genotoksičnosti stanica tretiranih EMSom osim u najvišoj koncentraciji (1000 µM) pod uvjetom *d* (35 V, 20 min). Naprotiv, uočen je hormetički učinak povećanja integriteta DNA u nižim koncentracijama EMSa (10 µM – uvjeti *a* i *b*, 100 µM – uvjet *a*)

Tablica 1. % tDNA ($\overline{x}$ ï SEM) u PLHC-1 stanicama dobiven komet-testom nakon izlaganja različitim koncentracijama EMSa i različitim uvjetima elektroforeze

koncentracija	% tDNA			
	25 V/15min	25 V/20min	35 V/15min	35 V/20min
kontrola	4,42387	5,48730	6,28673	7,22297
10 µM	3,01907	3,58160	5,02740	6,55793
100 µM	3,79193	5,14575	5,68833	7,20900
1000 µM	5,61807	6,03680	6,20627	9,14367



Slika 5. Oštećenje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ovisnosti o koncentraciji EMS-a (µM), p ≤ 0.05 (*) u usporedbi s kontrolom.

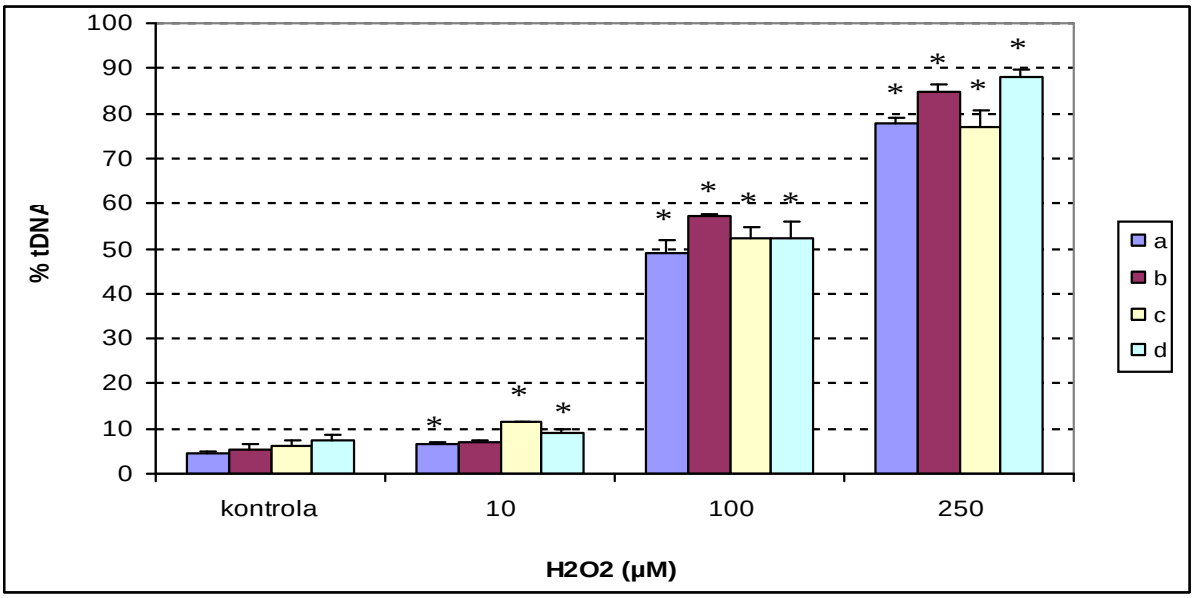
3.1.2. Vodikov peroksid

Prema tablici 2. i slici 6., kod stanica tretiranih vodikovim peroksidom (H_2O_2), jasno je uočljiv skok u postotku tDNA između stanica tretiranih s malom koncentracijom vodikovog peroksida (10 µM) i onih tretiranih s velikim koncentracijama vodikovog peroksida (100 µM i 250 µM). Uspoređujući utjecaj EMSa i vodikovog peroksida na istu staničnu liniju (PLHC-1), zapažen je znatno veći postotak oštećenja DNA kod stanica tretiranih s vodikovim peroksidom. Postotak stanica s oštećenjem DNA većim od 50% pri koncentraciji 100 µM vodikovog peroksida prelaze 50%, dok u koncentraciji od 250 µM sve stanice imaju takva velika oštećenja DNA što znači da su vjerojatno mrtve ili u stadiju umiranja. Takvi rezultati ukazuju na veliku citotoksičnost vodikovog peroksida u višim koncentracijama u ovom istraživanju (100 i 250 µM). Najveća oštećenja su pri najvećim koncentracijama vodikovog peroksida (250 µM) gdje su tDNA od ~77% do 88%. Vidljivo je i povećanje oštećenja promjenom uvjeta elektroforeze od najkraćeg vremena i najmanje voltaže (*a* uvjet) do najveće voltaže i najduljeg vremena trajanja elektroforeze (*d* uvjet). Najmanja oštećenja imaju stanice kontrole (~4,42%) i stanice izložene koncentracijama od 10 µM (~6,4%) i to pri *a* uvjetu elektroforeze. Pri velikim

oštećenjima DNA (jaka citotoksičnost) nema velikih (značajnih) razlika između rezultata dobivenih u različitim uvjetima elektroforeze.

Tablica 2. % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u PLHC-1 stanicama dobiven komet-testom nakon izlaganja različitim koncentracijama vodikovog peroksida i različitim uvjetima elektroforeze

koncentracija	% tDNA			
	25 V/15min	25 V/20min	35 V/15min	35 V/20min
kontrola	4,42387	5,48730	6,28673	7,22297
10 µM	6,40227	6,89641	11,37533	9,08560
100 µM	48,97072	57,11272	52,43491	52,17365
1000 µM	77,70661	84,81069	77,06130	88,17683



Slika 6. Oštećenje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida(µM), p ≤ 0.05 (*) u usporedbi s kontrolom.

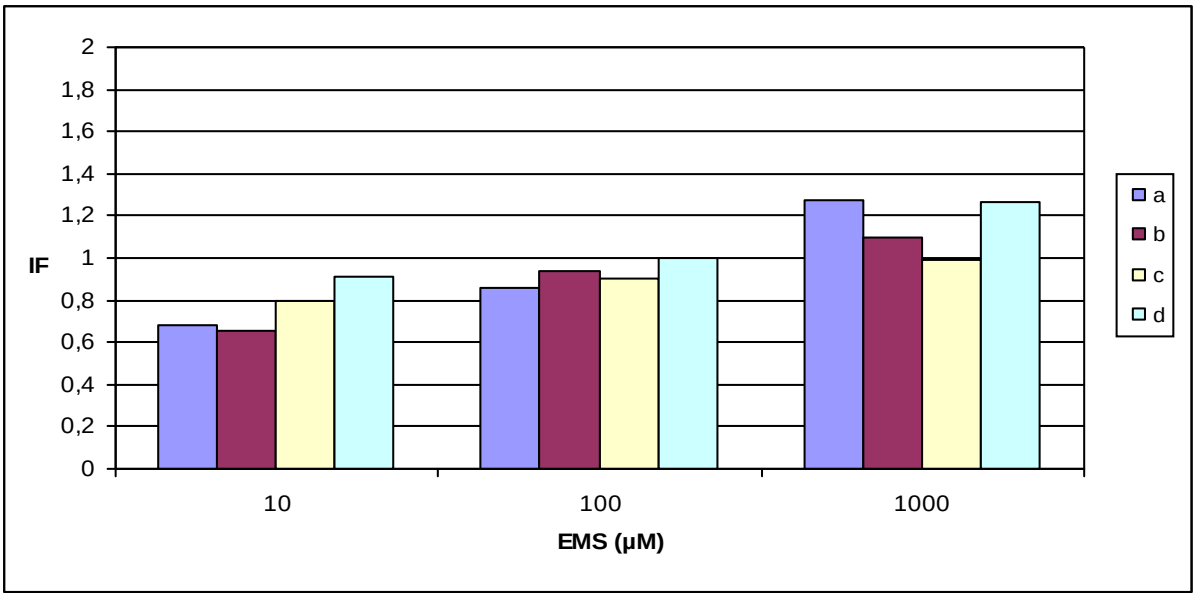
Tablica 3. Postotak PLHC-1 stanica sa % tDNA > 50%

%	EMS				vodikov peroksid			
	kontrola	10 µM	100 µM	1000 µM	kontrola	10 µM	100 µM	250 µM
25 V/15min	0	0	0	0	0	0	54,87	100
25 V/20min	0	0	0	0	0	0	73,55	100
35 V/15min	0	0	0	0,66	0	0	60,45	100
35 V/20min	0	0	0	0	0	0	51,55	100

3.1.3. Indukcijski faktor

Razlika u % tDNA između kontrole i tretiranih grupa prikazana je kao indukcijski faktor (IF), koji je dobiven dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije sa srednjom vrijednosti % tDNA kontrole.

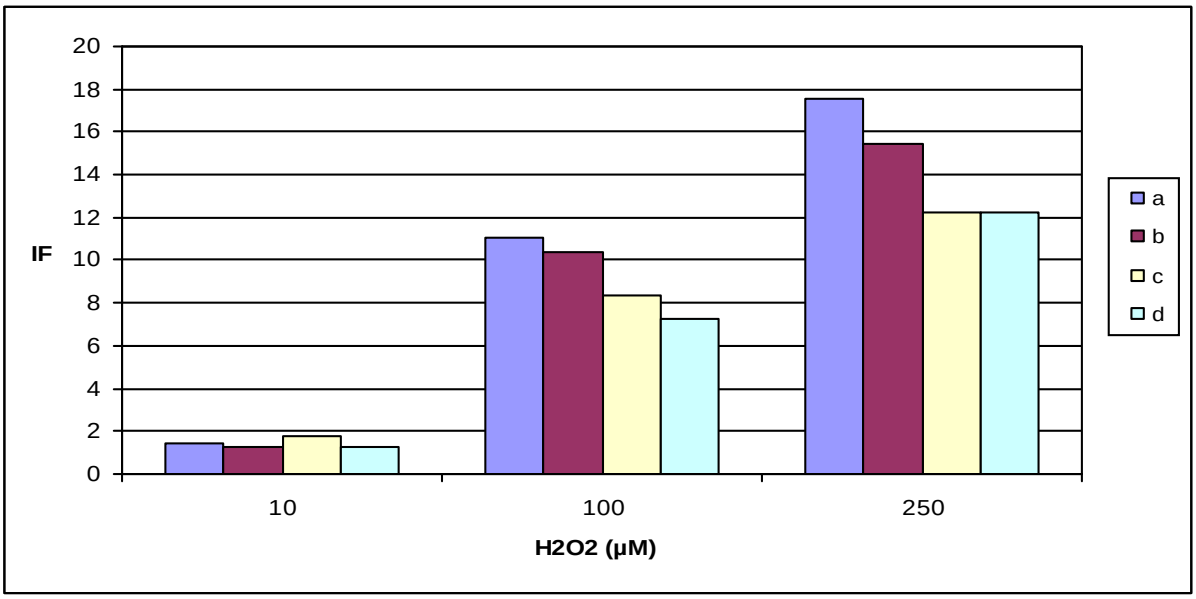
Prema slici 7., jasno je vidljivo podudaranje indukcijskog faktora unutar grupa stanica izloženih istim koncentracijama genotoksikanta, neovisno o uvjetima elektroforeze. Omjer između % tDNA kontrole i tretiranih grupa je podjednak u svim uvjetima elektroforeze, tj. IF imaju jako slične vrijednosti. Najmanji genotoksični učinak, a time i najmanji IF pokazale su stanice izložene najmanjim koncentracijama EMSa (10 µM) pri elektroforezi jačine 25V (*a* i *b* uvjeti). Vidljiv je i blagi, iako statistički neznačajan, porast genotoksičnosti s porastom koncentracija EMSa.



Slika 7. Indukcijski faktor PLHC-1 stanica u ovisnosti o koncentraciji EMSa (µM)

Na slici 8. je prikazan indukcijski faktor mjeren na stanicama PLHC-1, koje su bile izložene različitim koncentracijama vodikovog peroksida. Tu se vide veće razlike u vrijednostima indukcijskog faktora između grupa tretiranih s 10 µM vodikovim peroksidom i onih tretiranih sa 100 i 250 µM vodikovim peroksidom. Pri izlaganju PLHC-1 stanica većim koncentracijama vodikovog peroksida dolazi do citotoksičnog

učinka pa se zbog toga javljaju određena odstupanja zbog velikih oštećenja DNA. Ipak, uočljivo je da je IF sličniji između eksperimentalnih uvjeta s istom voltažom, ali je zanimljivo da je produljenje vremena i povećanje voltaže elektroforeze uzrokovalo većinom smanjenje IF.



Slika 8. Indukcijski faktor (IF) PLHC-1 stanica u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida (µM)

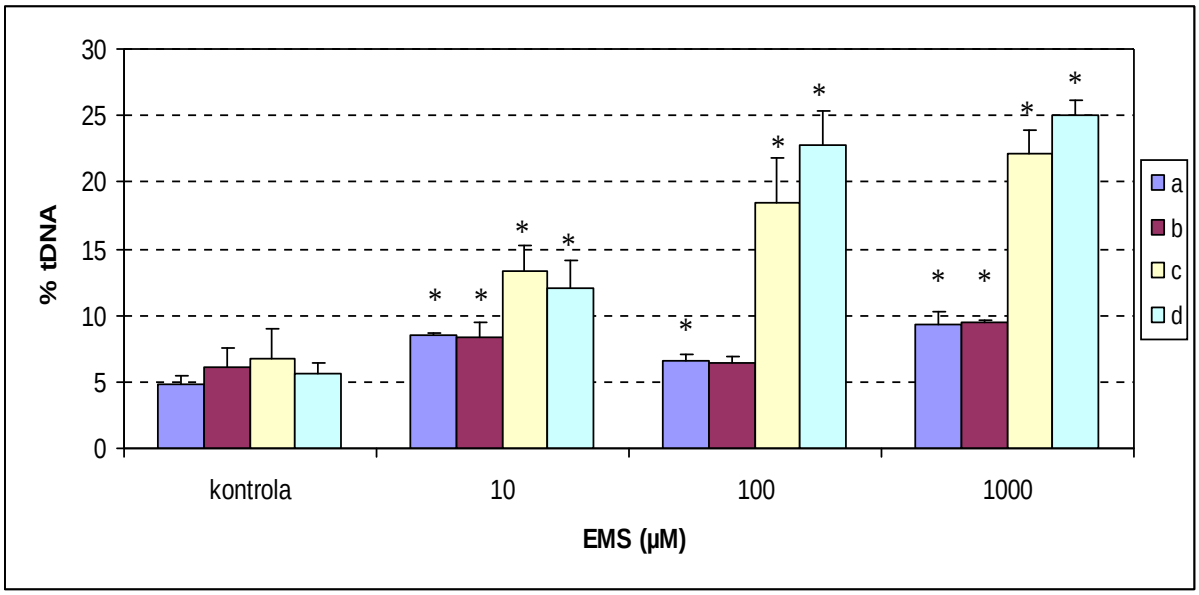
3.2. ZFL stanična linija

3.2.1. EMS

Kod ZFL stanica tretiranih EMSom dolazi do većih oštećenja DNA, nego kod PLHC-1 stanica tretiranih u istim uvjetima. No, sama oštećenja ne prelaze 50% tDNA. Najveći zabilježeni % tDNA imale su stanice izložene 1000 µM koncentracijama EMSa i to u uvjetima elektroforeze s višom voltažom, pri čemu su zabilježene vrijednosti % tDNA od 25%. U *c* i *d* uvjetima elektroforeze (35 V) vidljiva je gradacija oštećenja DNA povećanjem koncentracije EMSa te se vidi značajna razlika naspram *a* i *b* uvjeta s nižom voltažom (25 V), koji imaju značajno manji postotak tDNA, posebice pri većim koncentracijama EMSa.

Tablica 4. % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ZFL stanicama dobiven komet-testom nakon izlaganja različitim koncentracijama EMSa i različitim uvjetima elektroforeze

koncentracija	% tDNA			
	25 V/15min	25 V/20min	35 V/15min	35 V/20min
kontrola	4,733600	6,048245	6,800088	5,658100
10 µM	8,476500	8,32640	13,29547	12,07713
100 µM	6,55360	6,48387	18,43297	22,77789
1000 µM	9,26607	9,51667	22,16033	24,99530



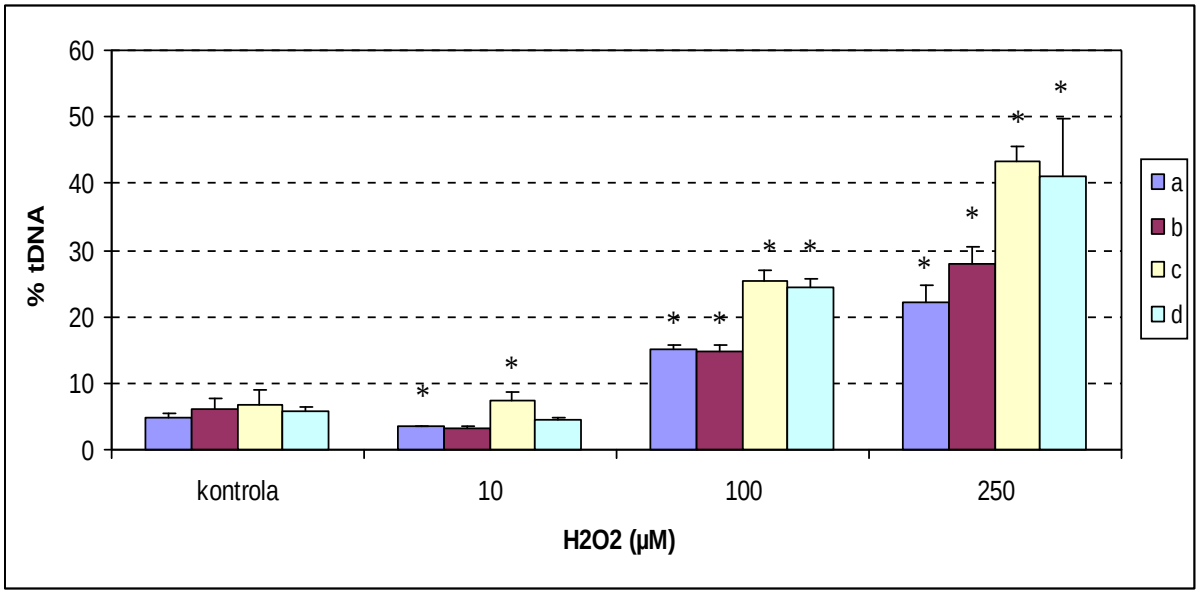
Slika 9. Oštećenje DNA u ZFL stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ovisnosti o koncentraciji EMSa(µM), p ≤ 0.05 (*) u usporedbi s kontrolom.

3.2.2. Vodikov peroksid

Za razliku od PLHC-1 stanica tretiranih vodikovim peroksidom, postotak ZFL stanica s oštećenjem DNA većim od 50% tDNA ne prelazi 50% ukupno analiziranih stanica. Najveća oštećenja su također pri najvećim koncentracijama vodikovog peroksida, tj. pri 250 µM. Povećanjem jačine struje i samog trajanja elektroforeze dolazi i do povećanja oštećenja DNA, pogotovo pri većim koncentracijama genotoksikanta (100 i 250 µM vodikov peroksid), što se i vidi u *c* i *d* uvjetima (35 V) (slika 10.).

Tablica 5. % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ZFL stanicama dobiven komet-testom nakon izlaganja različitim koncentracijama vodikovog peroksida i različitim uvjetima elektroforeze

koncentracija	% tDNA			
	25 V/15min	25 V/20min	35 V/15min	35 V/20min
kontrola	4,733600	6,048245	6,800088	5,658100
10 µM	3,43720	3,31065	7,28907	4,51493
100 µM	14,98300	14,83408	25,36280	24,44462
1000 µM	22,25032	27,87348	43,43083	40,92741



Slika 10. Oštećenje DNA u ZFL stanicama prikazano kao % tDNA ($\bar{x}$ ï SEM) u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida (µM), p ≤ 0.05 (*) u usporedbi s kontrolom.

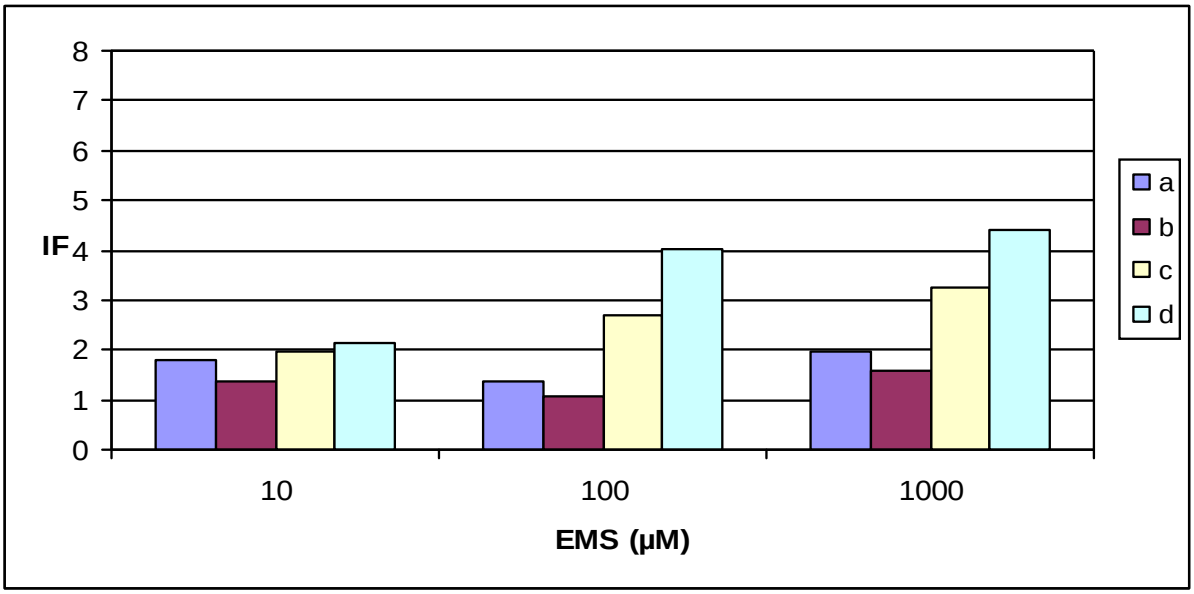
Tablica 6. Postotak ZFL stanica sa % tDNA > 50%

%	EMS				vodikov peroksid			
	kontrola	10 µM	100 µM	1000 µM	kontrola	10 µM	100 µM	250 µM
25 V/15min	0	9,33	0	0,66	0	0	1,33	7,33
25 V/20min	0,66	1,33	0	0,66	0	0	0	7,33
35 V/15min	0	1,33	2	5,33	0	0,66	7,33	30,06
35 V/20min	0	0	6,66	6	0	0	4,66	48,38

3.2.3. Indukcijski faktor

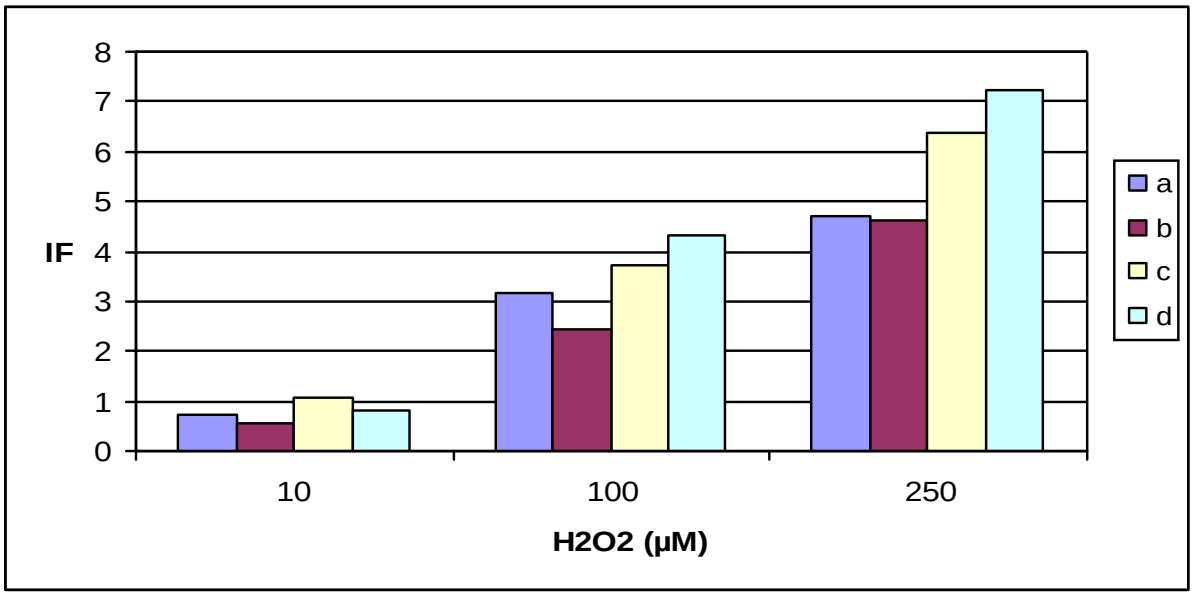
I kod ZFL stanica, IF je izračunat kao razlika u % tDNA između kontrole i tretiranih grupa, koja je dobivena dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije sa srednjom vrijednosti % tDNA kontrole.

Slika 11. prikazuje indukcijski faktor mjeren na ZFL stanicama izloženim različitim koncentracijama EMSa. Za razliku od indukcijskog faktora na PLHC-1 stanicama, gdje je bio izrazito pravilan i podjednak po tretiranim grupama, kod ZFL stanica ima odstupanja. Pri koncentraciji od 10 µM indukcijski faktor pokazuje ujednačenost neovisno o uvjetima elektroforeze. Pri većim koncentracijama (100 i 1000 µM) indukcijski faktor je približno sličan za grupe stanica pod *a* i *b* uvjetima elektroforeze i za one grupe stanica pod *c* i *d* uvjetima, dakle prema voltaži.



Slika 11. Indukcijski faktor ZFL stanica u ovisnosti o koncentraciji EMSa (µM)

Indukcijski faktor prikazan na slici 12., također pokazuje podjednake vrijednosti pri niskim koncentracijama vodikovog peroksida (10 µM). Povećanjem koncentracije vodikovog peroksida dolazi i do većeg odstupanja, posebice između grupa tretiranih s elektroforezom jačine 25 V (*a* i *b*) i onih tretiranih s 35 V elektroforezom (*c* i *d*).



Slika 12. Indukcijski faktor ZFL stanica u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida (µM)

4. RASPRAVA

Komet-test ili gel elektroforeza pojedinačnih stanica (eng. *single cell gel electrophoresis assay* - SCGE) je metoda koja primarno mjeri lomove lanaca DNA u pojedinačnim stanicama. Od objavljivanja protokola za izvedbu komet-testa, 1988. godine (Singh i sur.), njegova primjena se proširila na mnoga područja – od monitoringa genotoksičnog djelovanja na ljude, radioaktivne biologije do genetičke ekotoksikologije.

Istraživanja mjerenja genotoksičnog djelovanja komet-testom provođena su u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na raznim organizmima - biljke, kolutićavci, školjkaši, ribe, vodozemci i sisavci (Cotelle i Ferard 1999). Gujavice su dobar pokazatelj genotoksičnosti onečišćenog tla, dok su se školjkaši, ribe i vodozemci pokazali podobnim za procjenu genotoksičnosti vodenog okoliša. Korištenje riba u detektiranju genotoksičnosti rijeka i riječnih sedimenata pokazalo je veliku učinkovitost u *in vitro* uvjetima (Cotelle i Ferard 1999). Nažalost, u mnogim istraživanjima su korišteni različiti načini mjerenja oštećenja DNA (% DNA u repu, dužina repa, repni moment) što predstavlja veliki problem prilikom uspoređivanja dobivenih rezultata između raznih istraživanja. Najčešća mjera oštećenja DNA u komet-testu je izračunavanje postotka DNA u «repu kometa» jezgara (% tDNA) nakon primijenjene elektroforeze. Kumaravel i Jha (2006) su u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima prikazali da su % tDNA i repni moment (Olive tail moment – OTM) najpouzdaniji parametri za mjerenje oštećenja DNA u komet-testu te da pokazuju dobru korelaciju s određenom koncentracijom korištenog genotoksikanta. Repni moment obuhvaća dužinu «repa kometa» i njegovu gustoću. Problem pri korištenju repnog momenta kao mjere oštećenja DNA je što ne postoje standardne jedinice za njegovo računanje pa mu se pridodaju različite vrijednosti i interpretacije (Collins i sur. 2008). Osim navedenih mjera oštećenja DNA u komet-testu se koristi i dužina «repa kometa», no kod te mjere je problem što postupak mjerenja nije ujednačen (mjeri se od sredine ali i od ruba nukleusa/»glave kometa») (Cotelle i Ferard 1999). Osim toga se kod takvog načina mjerenja već pri malim DNA oštećenjima dostiže maksimum dužine «repa kometa», čime se smanjuje iskoristivi raspon testa (Collins i sur. 2008). Neki radovi pri mjerenju rezultata kometa koriste i dodatne parametre kao što su omjer duljine i širine samog «repa kometa». Općenito, % tDNA pokriva najširi raspon oštećenja DNA pa se i preporuča kao najpodobniji parametar za mjerenje oštećenja DNA (Collins i sur. 2008)

Osim različitih načina mjerenja oštećenja DNA veliki problem predstavljaju velike razlike u korištenim uvjetima elektroforeze komet-testa koje ne dozvoljavaju direktnu usporedbu rezultata čak i kad je upotrijebljena ista mjera oštećenosti DNA. U ovom je radu upotrijebljen komet-test u svrhu procjene oštećenja DNA na PLHC-1 i ZFL staničnim linijama tretiranim genotoksičnim kemikalijama etil-metanosulfonatom (EMS) i vodikovim peroksidom (H_2O_2) s namjerom da dobivene rezultate usporedimo ovisno o različitim uvjetima elektroforeze. Tretirane stanične linije su pokazale veći ili manji genotoksični učinak u odnosu na kontrolne stanice ovisno o koncentraciji modelnog genotoksikanta. Na temelju rezultata dobivenih komet-testom na PLHC-1 i ZFL stanicama, stanice tretirane s najvećim koncentracijama genotoksikanta (1000 µM EMS i 250 µM vodikov peroksid) su pokazale i najveći genotoksični učinak, a one tretirane s najmanjim koncentracijama (10 µM) su pokazale najmanji genotoksični učinak. No, nije samo povećanje koncentracije toksikanta utjecalo na povećanje oštećenja DNA, već je vidljivi utjecaj ostavila i promjena uvjeta elektroforeze.

U ovom radu provedena su 4 različita uvjeta elektroforeze: uvjet *a* je podrazumijavao elektroforezu jačine 25 V u trajanju od 15 min, u uvjetu *b* je korištena ista jačina elektroforeze, ali dužeg trajanja (20 min), dok su kod uvjeta *c* i *d* izvedene elektroforeze jačine 35 V i trajanja 15 min (*c* uvjet), tj. 20 min kod *d* uvjeta. Ovisno o tim uvjetima vidljivo se povećavalo i oštećenje DNA (% tDNA), od najmanjih promjena pri slabijoj elektroforezi, do najvećih oštećenja pri elektroforezi jačine 35 V i trajanja 20min (*d* uvjet). Takva gradacija oštećenja vidljiva je u svim grupama stanica tretiranih određenom koncentracijom toksikanta (EMSa ili vodikovog peroksida) i to kod PLHC-1 stanične linije i kod ZFL stanične linije, s naglaskom na gradaciju pri povećanju voltaže elektroforeze s 25 V na 35 V, gdje su jasno vidljive razlike između uvjeta *a* i *b* naspram uvjeta *c* i *d*. Duljina trajanja elektroforeze nije pokazala znatni utjecaj na rezultate.

Uspoređujući utjecaj EMSa i vodikovog peroksida na istu staničnu liniju, zapažen je znatno veći postotak oštećenja DNA (% tDNA) kod stanica tretiranih s vodikovim peroksidom. Pogotovo kod stanica tretiranih s većim koncentracijama vodikovog peroksida, gdje srednje vrijednosti oštećenja prelaze i 50% tDNA. Utjecaj na rezultate ima i osjetljivost određene stanične linije. U ovom istraživanju je vidljiva znatnija osjetljivost PLHC-1 stanične linije na genotoksično djelovanje vodikovog peroksida, nego

ZFL stanične linije. Razlika između njihove osjetljivosti je uočljivija pri tretmanu stanica s većim koncentracijama vodikovog peroksida, gdje PLHC-1 stanice imaju jako velika oštećenja, čak do 88% tDNA (srednja vrijednost), dok kod ZFL stanica ne prelaze 50% tDNA (srednja vrijednost). Obrnuta situacija uočena je nakon izlaganja EMSu, gdje su veću osjetljivost pokazale ZFL stanice.

Usporedba rezultata između istraživanja genotoksičnog potencijala koja uključuju komet-test na određenoj vrsti stanica nekog određenog organizma otežana je zbog korištenja različitih laboratorijskih protokola te mjerenja različitih parametara oštećenja DNA (% DNA u repu, dužina repa, repni moment). Pri istraživanju rezultata komet-testa dolazi i do određenih odstupanja u samoj metodi izračuna i statističkoj analizi. Također treba uzeti u obzir da komet-test prikazuje rezultate kao srednju vrijednost oštećenja tretiranih stanica, pri čemu ne dolazi do potpunog izražaja raspon odgovora pojedinačnih stanica. U ovom radu raspon odgovora, tj. njegov omjer između najmanjeg i najvećeg postotka oštećenja stanica prikazan je pomoću standardne pogreške.

Potreba za standardizacijom komet-testa na uobičajeno korištenim vrstama i tipovima stanica radi njegove upotrebe kao biomarkera genotoksičnosti već je naglašavana (Kim i Hyun 2006; Frenzilli i sur. 2009). S ciljem lakše usporedbe rezultata komet-testa dobivenih u različitim istraživanjima, predložena je upotreba indukcijskog faktora (Bony i sur. 2008, Klobučar i sur. 2010) koji pokazuje koliko je puta oštećenje DNA kod tretiranih grupa veće u odnosu na kontrolu. U ovom radu, indukcijski faktor je korišten kao sredstvo usporedbe rezultata komet-testa izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze.

Kod PLHC-1 stanica tretiranih EMSom veliko je podudaranje indukcijskog faktora unutar grupa stanica izloženih istim koncentracijama genotoksikanta, neovisno o uvjetima elektroforeze. Omjer između % tDNA kontrole i tretiranih grupa je podjednak u svim uvjetima elektroforeze (vjerojatno zbog vrlo slabog učinka EMS), tj. indukcijski faktori imaju jako slične vrijednosti. Najmanji genotoksični učinak, a time i najmanji indukcijski faktor pokazale su stanice izložene najmanjim koncentracijama i najslabijim elektroforezama. Za razliku od indukcijskog faktora na PLHC-1 stanicama, gdje je bio izrazito pravilan i podjednak po tretiranim grupama, kod ZFL stanica ima odstupanja, posebice kod stanica tretiranih većim koncentracijama toksikanta.

5. ZAKLJUČAK

U ovom diplomskom radu komet-test je optimiziran na ribljim staničnim linijama PLHC-1 i ZFL.

Ustanovljena je veća osjetljivost PLHC-1 stanica na genotoksično djelovanje vodikovog peroksida, dok su ZFL stanice pokazale veću osjetljivost na djelovanje EMSa.

Primjena indukcijskog faktora (IF) u usporedbi rezultata komet-testa na PLHC-1 i ZFL staničnim linijama tretiranim s različitim koncentracijama EMS-a i vodikovog peroksida izvođenog u različitim uvjetima elektroforeze nije dala jednoznačne rezultate. Iako su rezultati različitih trajanja elektroforeze (15 i 20 min) pri istoj jakosti struje (ista voltaža) bili donekle ujednačenog IFa, razlika u izračunatim indukcijskim faktorima između elektroforeze pri 25 i 35 V bila je značajnija te će primjena IFa zahtijevati daljnju prilagodbu i istraživanja.

6. LITERATURA

Anderson S., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G. (1994): Genetic and molecular toxicology: a research framework. Environ. Health Perspect. 102: 3-8.

Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E., Rinkevich B. (2002): Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. Mutat. Res. 518: 21-37.

Babich H., Rosenberg D. W., Borenfreund E. (1991): *In vitro* cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 21: 327-336.

Bols N. C., Dayeh V. R., Lee L. E. J., Schirmer K. (2005): Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. U: Mommsen T. P., Moon T. W. (ur.), Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 6, Environmental Toxicology, Elsevier B. V., str. 43-84.

Bony S., Gillet C., Bouchez A., Margoum C., Devaux A. (2008) Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. Aquat. Toxicol. 89:197–203

Chapman P. M., Long E. R. (1983): The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. Mar. Pollut. Bull. 14: 81-84.

Collins A. R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair (Review). Mol. Biotech. 26: 249-261.

Cotelle S., Ferard J. F. (1999): Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. Environ. Mol. Mutagen. 34: 246-255.

Davoren M., Ni Shuilleabhain S., Hartl M.G. J., Sheehan D., O'Brien N. M., O'Halloran J., Van Pelt F. N. A. M., Mothersill C. (2005): Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. Toxicol. In Vitro 19: 421-431.

Devaux A., Personen M., Monod G. (1997): Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. Toxicol. In Vitro 11: 71-79.

Ejchart A., Sadlej-Sosnowska N. (2003): Statistical evaluation and comparison of comet assay results. Science Direct, Mutation Research 534: 85–92.

Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res. 339: 37-59.

Fent K. (2001): Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicol. In Vitro 15: 477-488.

Fent K., Hunn J. (1996): Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). Mar. Environ. Res. 42: 377-382.

Frenzilli G., Nigro M., Lyons B. P. (2009): The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments: an overview. Mutat. Res. 681: 80-92.

Gocke E., Bürgin H., Müller L., Pfiste T: (2009): Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. Toxicology Letters 190: 254–265.

Goldberg E. D. (1995): Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. Mar. Pollut. Bull. 31: 152-158.

Gomez-Gutierrez A., Garnacho E., Bayona J. M., Albaiges J. (2007): Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in mediterranean sea sediments. Environ. Int. 33: 867-876.

Guzzella L., De Paolis A. (1994): Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 28: 159-165.

Hahn M. E., Lamb T. M., Schultz M. E., Smolowitz R. M., Stegeman J. J. (1993): Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). Aquat. Toxicol. 26: 185-208.

Hartmann A., Aqurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R. R. (2003): Recommendation for conducting
the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis 18: 45-51.

Huuskonen S., Koponen K., Ritola O., Hahn M., Lindström-Seppä P. (1998a): Induction of CYP1A and porphyrin accumulation in fish hepatoma cells (PLHC-1) exposed to sediment or water from a PCB-contaminated lake (Lake Kernaala, Finland). Mar. Environ. Res. 46: 379-384.

Huuskonen S. E., Ristola T. E., Tuvikene A., Hahn M. E., Kukkonen, J. V. K., Lindstrom-Seppa P. (1998b): Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and a midge (*Chironomus riparius*), in monitoring freshwater sediments. Aquat. Toxicol. 44: 47-67.

Huuskonen S. E., Tuvikene A., Trapido M., Fent K., Hahn M. E. (2000): Cytochrome P4501A induction and porphyrin accumulation in PLHC-1 fish cells exposed to sediment and oil shale extracts. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 38: 59-69.

Kamer I., Rinkevich B. (2002): *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. Toxicol. In Vitro 16: 177-184.

Kammann U., Biselli S., Huhnerfuss H., Reineke N., Theobald N., Vobach M., Wosniok W. (2004): Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. Environ. Pollut. 132: 279-287.

Kammann U., Bunke M., Steinhart H., Theobald N. (2001): A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. Mutat. Res. 498: 67-77.

Kammann U., Riggers C. J., Theobald N., Steinhart H. (2000): Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. Mutat. Res. 467: 161-168

Kim I. Y., Hyun C. K. (2006): Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. Ecotoxicol. Environ. Saf. 64: 288–297.

Klobučar G.I.V., Štambuk A., Pavlica M., Sertić Perić M., Kutuzović Hackenberger B., Hylland K. (2010) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (Cyprinus carpio). Ecotoxicology 19: 77-84

Kosmehl T., Krebs F., Manz W., Erdinger W., Braunbeck T., Hollert H. (2004): Comparative genotoxicity testing of Rhine river sediment extracts using the Comet assay with permanent fish cell lines (RTG-2 and RTL-W1) and the Ames test. J. Soils Sediments 4: 84-94.

Kurelec B. (1993): The genotoxic disease syndrome. Mar. Environ. Res. 35: 341-348.

Lee R. F., Steinert S. (2003): Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res. 554: 43-64.

Magi E., Bianco R., Ianni C., Di Carro M. (2002): Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. Environ. Pollut. 119: 91-98.

McCauley D. J., DeGraeve G. M., Linton T. K. (2000): Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs. Environ. Sci. Pol. 3: 133-144.

Mitchelmore C. L., Chipman J. K. (1998): DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. Mutat. Res. 399: 135-147.

Moore C. J. (2008): Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. Environ. Res. 108: 131-139.

Nehls S., Segner H. (2001): Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the Comet assay. Environ. Toxicol. 16: 321-329.

Nehls S., Segner H. (2005): Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 24: 2078-2087.

Notar M., Leskovšek H., Faganeli J. (2001): Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 42: 36-44.

Picer M., Kovač T., Britvić S., Picer N. (2001): The chemical and biogenotoxic characterization of organic xenobiotics in aquatic sediment materials: 1. The application and comparison of chemically non-specific and biogenotoxic methods. Chemosphere 44: 1673-1683.

Pichardo S., Jos A., Zurita J. L.,Salguero M., Camean A. M., Repetto G. (2005): The use of the fish cell lines RTG-2 and PLHC-1 to compare the toxic effects produced by microcystins LR and RR. Toxicol. In Vitro 19: 865-873.

Powers DA (1989): Fish as model systems. Science 7: 246-352.

Rau M. A., Whitaker J., Freedman J. H., Di Giulio R. T. (2004): Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. Toxicol. Pharmacol. 137: 335-342.

Reid B. J., Jones K. C., Semple K. T. (2000): Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. Environ. Pollut. 108: 103-112.

Rocha P. S., Luvizotto G. L., Kosmehl T., Böttcher M., Storch V., Braunbeck T., Hollert H. (2009): Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo,Brazil): *In vitro* Comet assay versus in situ micronucleus assay studies. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72: 1842-1848.

Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J. Chromatogr. 772: 225-254.

Schlenk D., Rice C. D. (1998): Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. Aquat. Toxicol. 43: 121-129.

Schnurstein A., Braunbeck T. (2001): Tail moment versus tail length–application of an *in vitro* version of the Comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 49: 187-196.

Seitz N., Bottcher M., Keiter S., Kosmehl T:, Manz W., Hollert H., Braunbeck T. (2008): A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. Science Direct, Mutation Research 652: 38–45

Shahidul Islam M., Tanaka M. (2004): Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. Mar. Pollut. Bull. 48: 624-649.

Shugart L. R., Theodorakis C. (1994.): Environmental genotoxicity: probing the underlying mechanisms. Environ. Health Perspect. 102: 13-17.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175: 184-191.

Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. (1981): Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). Nature 6: 291-293.

Sullivan C., Mitchelmore C. L., Hale R. C., Van Veld P. A. (2007): Induction of CYP1A and DNA damage in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to biosolids. Sci. Tot. Environ. 384: 221-228.

Šrut M., Traven L., Štambuk A., Kralj S., Žaja R., Mićović V., Klobučar G. (2010): Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the comet assay. Toxicology in Vitro.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y. F. (2000): Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35: 206-221.

Traven L., Žaja R., Lončar J., Smital T., Mićović V. (2008): CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples – *In vitro* evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. Toxicol. In Vitro 22: 1648-1656.

Vahl H. H., Karbe L., Westendorf J. (1997): Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test. Mutat. Res. 394: 81-93.

Waldron M. C., White A. R. (1989): Non-volatile Chemical Mutagens in Sediments of the Kanawha River, West Virginia. Ohio J. Sci. 5: 176-180.

WHO (1993): Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concept and principles. World Health Organisation, Geneva.

Zhou B., Liu C., Wang J., Lam P. K. S.,Wu R. S. S. (2006): Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants – comparison to hepatocytes and gill epithelia. Aquat. Toxicol. 80: 109-118.