

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleš KOROŠEC

**PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA ZA PREVERJANJE
GENOTOKSIČNOSTI VODNIH IZLUŽKOV BLATA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE ADAPTATION OF COMET ASSAY FOR SCREENING
GENOTOXICITY OF FAECAL WATER EXTRACTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo, Katedri za prehrano in v Laboratoriju za imunologijo in celične kulture Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 10. 6. 2005 odobrila prijavljeno diplomsko delo in za mentorico imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorja prof. dr. Janeza Salobirja ter za recenzentko prof. dr. Mojco Narat.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Somentor: prof. dr. Janez SALOBIR

Recenzentka: prof. dr. Mojca NARAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Člani: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Korošec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 576.33+575.2:636.4.084(043)=863
KG	prehrana / kometni test / elektroforeza posameznih celic / celice Caco-2 / genotoksičnost vodnih izlužkov / feces
AV	KOROŠEC, Aleš
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica) / SALOBIR, Janez (somentor) / NARAT, Mojca (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA ZA PREVERJANJE GENOTOKSIČNOSTI VODNIH IZLUŽKOV BLATA
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 53 str., 10 pregl., 11 sl., 3 pril., pril. 1 CDROM, 97 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Raziskave povezujejo hrano, bogato z rdečim mesom in živalskimi maščobami ter revno s sadjem in zelenjavo, z nastankom raka na debelem črevesu. Kometni test, s katerim lahko ugotavljamo genotoksične poškodbe, smo uspešno prilagodili za celice Caco-2, na katere smo v modelu <i>in vitro</i> delovali z vodnimi izlužki blata. Le-te smo po različnih metodah pripravili iz blata pujskov, ki so v času predhodnega prehranskega poskusa uživali različno sestavljeno krmo. Poglavitne spremembe kometnega testa so se nanašale na zmanjšanje koncentracije NaOH v elektroforetskem pufru ter skrajšanju časa elektroforeze. Rezultati so pokazali, da vodni izlužki blata povzročajo opazne genotoksične učinke na celice Caco-2, ki so večji takrat, kadar je hrana bolj neuravnotežena tj. brez sadja in zelenjave ali z več mesa. Vegetarijanska prehrana pujskov ne povzroča genotoksičnega blata. Razlike med posameznimi prehranskimi skupinami smo jasno ovrednotili in grafično predstavili. Pridobljene rešitve lahko uporabimo kot dopolnilo testom <i>in vivo</i>, s katerimi lahko povežemo stres na celičnem nivoju z neustrezno prehrano. Možnosti uporabe so tudi v onkologiji, kjer bi lahko z uporabo poceni modelov <i>in vitro</i> dokazovali genotoksičnost človeškega blata in delovali preventivno pri ljudeh z rizičnimi prehranskimi režimi.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 576.33+575.2:636.4.084(043)=863
CX nutrition / comet assay / single cell gel electrophoresis / Caco-2 cell line / faecal water extracts / genotoxicity
AU KOROŠEC, Aleš
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor) / SALOBIR, Janez (co-adviser) / NARAT, Mojca (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI THE ADAPTATION OF COMET ASSAY FOR SCREENING GENOTOXICITY OF FAECAL WATER EXTRACTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 53 p., 10 tab., 11 fig., 3 ann., ann. 1 CDROM, 97 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Scientific reports which link food excessive in red meat, animal fats and without fruits and vegetables, with increased colorectal cancer risk, are becoming well-known all over the world. We have successfully adapted the comet assay for the assessment of genotoxic effects on Caco-2 cell line. Different faecal water extracts, prepared by different methods and from various piglets' faeces, were applied on Caco-2 cells in a model *in vitro*. Key improvements of the comet assay were decrease in NaOH concentration in electrophoresis buffer and shortening of electrophoresis duration. Results show apparent genotoxic effects of faecal water extracts on Caco-2 cell line. Effects were stronger when more unbalanced food was used for piglets' feed. Vegetarian feed did not lead to production of genotoxic faeces in this study. We have clearly shown the differences between various groups using correct statistical analysis. Developed protocol can be used as a supplement for assays *in vivo*, aimed towards detecting cell-level stress. In oncology it may be used as a cheap model for detecting genotoxicity of human feces. In this way we can act preventively in helping people with unhealthy lifestyle.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PREHRANA, PREBAVA IN RAK	3
2.1.1 Mikrobiologija prebavil	4
2.2 KOMETNI TEST ALI ELEKTROFOREZA POSAMEZNIH CELIC	6
2.2.1 Testiranje (anti)genotoksičnosti različnih snovi v pogojih <i>in vitro</i>	7
2.2.2 Ozadje statistične analize rezultatov kometnega testa	8
2.3 CELIČNA LINIJA CACO-2	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 GOJENJE CELIC CACO-2	12
3.1.1 Štetje celic in test viabilnosti	13
3.2 PRILAGAJANJE METODE ZA PRIPRAVO VODNIH IZLUŽKOV BLATA	13
3.2.1 Predhodni prehranski poskus, iz katerega izvirajo vzorci prašičjega blata (Rezar, 2003)	14
3.2.2 Izbira in priprava osnovnih vzorcev blata	15
3.2.2.1 Homogenizacija vzorcev blata in ugotavljanje deleža suhe snovi	15
3.2.2.2 Priprava liofiliziranih vzorcev blata	16
3.2.3 Postopek priprave vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata	17
3.2.4 Postopek priprave vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata	17
3.3 PRILAGAJANJE KOMETNEGA TESTA ZA TESTIRANJE VODNIH IZLUŽKOV	18
3.3.1 Priprava celic Caco-2 in minigelov na mikroskopskih objektivih za uporabo v kometnem testu	18
3.3.2 Postopek kometnega testa	19
3.3.3 Statistična analiza rezultatov kometnega testa	21
4 REZULTATI	23
4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VODNIH IZLUŽKOV BLATA	23
4.2 OPTIMIZACIJA KOMETNEGA TESTA	24
4.3 GENOTOKSIČNOST VODNIH IZLUŽKOV BLATA	24
4.3.1 Izbira vzorcev	24
4.3.2 Ugotovitev najbolj primerne statistične porazdelitve podatkov	28
4.3.3 Izračun razmerij v genotoksičnosti vodnih izlužkov	29
4.3.3.1 Vzorci vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata (poglavje 3.2.3)	30

4.3.3.2	Vzorci vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata (poglavje 3.2.4)	31
4.3.3.3	Razširjeni statistični model	32
4.3.4	Potrditveni poskus s sveže pripravljenimi vzorci	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36
6	POVZETEK	44
7	VIRI	45

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Popolno gojišče za celice Caco-2	12
Preglednica 2: Vzorci blata, uporabljeni za pripravo vodnih izlužkov	15
Preglednica 3: Vsebnost suhe snovi v posameznih vzorcih blata	23
Preglednica 4: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri vzorcih vodnih izlužkov, pripravljenih iz homogeniziranega blata	26
Preglednica 5: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri vzorcih vodnih izlužkov, pripravljenih iz liofiliziranih vzorcev blata	27
Preglednica 6: Vplivi prehranskih skupin na genotoksičnost vodnih izlužkov, pridobljenih iz homogeniziranega blata	30
Preglednica 7: Vplivi prehranskih skupin na genotoksičnost vodnih izlužkov, pridobljenih iz liofiliziranega blata	31
Preglednica 8: Vplivi prehranskih skupin, ponovitve kometnega testa ter načina priprave vodnega izlužka na genotoksičnost vodnih izlužkov	32
Preglednica 9: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri sveže pripravljenih vzorcih	34
Preglednica 10: Vplivi prehranskih skupin in ponovitve kometnega testa na genotoksičnost sveže pripravljenih vodnih izlužkov	35

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Celice Caco-2 pod mikroskopom (Artursson in sod., 2001; Flaherty, 2005)	11
Slika 2: Značilna slika kometa s pripadajočimi razlagami izmerjenih parametrov (Duez in sod., 2004)	20
Slika 3: Tipične slike neustreznih in ustreznih slik jedrne DNA	25
Slika 4: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata	27
Slika 5: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata	28
Slika 6: Prikaz uspešnosti prilagajanja statističnih porazdelitev setom podatkov	29
Slika 7: Krivulje verjetnosti večjih poškodb celic (homogenizirano blato)	31
Slika 8: Krivulje verjetnost večjih poškodb celic (liofilizirano blato)	32
Slika 9: Prikaz variabilnosti živali znotraj določene prehranske skupine	33
Slika 10: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz sveže pripravljenih vzorcev blata	34
Slika 11: Krivulje verjetnosti večjih poškodb celic (sveže pripravljene vzorci)	35

KAZALO PRILOG

Priloga A: Sestava dnevnega obroka za pujske v različnih skupinah (Rezar, 2003)

Priloga B: Vzorci blata iz predhodnega prehranskega poskusa

Priloga C: Zbirka statističnih porazdelitev, uporabljenih za prileganje podatkov kometnega testa

Priloga D: Izvorni podatki kometnega testa s slikami jedrne DNA, skripte za statistično analizo ter uporabljena literatura (CDROM)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DME	osnovno gojišče za celice Caco-2 (Dulbecco's modified essential medium)
DMEM	Eaglovo gojišče po Dulbeccu (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
EMS	etil metan sulfonat (ethyl methane sulphonate)
Et-Br	etidijev bromid (ethidium bromide)
FBS	serum telečjega zarodka (fetal bovine serum)
HANKS	medij za celice Caco-2 brez vsebnosti Mg^{2+} ionov
Milli-Q voda	deionizirana voda z upornostjo $18 M\Omega/cm^2$
mM	milimolarna koncentracija raztopine
LMP agaroz	agaroz z nižano temperaturo želiranja (30 °C)
NMP agaroz	agaroz z običajno temperaturo želiranja (36 °C)
OTM	repni moment po Olivu (Olive tail moment)
TM	repni moment (Tail moment)

1 UVOD

V svoji zgodovini razvoja je imel človek različne tipe prehranjevanja. Hrana v lovsko-nabiralniški družbi je bila sestavljena iz plodov, sadežev divjerastočih rastlin, oreškov ter iz mesa ubitih živali (paleolitska prehrana). Bila je omejena dobrina in njena količina je omejevala število oseb na nekem področju. Pred približno deset tisoč leti je začelo prihajati do pomembnih družbeno-gospodarskih sprememb, predvsem do razvoja poljedelstva in kasneje živinoreje. Količina hrane se je povečala, kar je privedlo do povečanja števila prebivalcev ter ustanavljanja stalnih naselbin. Sestava prehrane se je spremenila – povečal se je delež ogljikovih hidratov iz žit ter mleka udomačenih živali, pestrost živil pa se je znižala. Še večji vpliv je imela industrijska ter kasneje zelena revolucija. Količina pridelane hrane se je silovito povečala z uvedbo traktorjev, umetnih gnojil ter fitofarmaceutskih sredstev, z razvojem izboljšanih kultivarjev ter pojavom gensko spremenjenih rastlin. Z industrijsko pridelavo in predelavo hrane ter vzpostavitvijo globalne logistične verige pridelovalec-potrošnik se je v svetu zmanjšal delež podhranjenih ljudi ter zgodil premik gospodarstva iz pretežno kmetijske v storitveno dejavnosti.

Za evolucijo je deset tisoč let kratka doba. V tem kratkem času se genetski zapis človeka ni mogel prilagoditi na drugačen tip prehranjevanja in življenja. V zahodnem svetu je danes hrane v izobilju, tako rastlinskega kot živalskega izvora. Poleg tega nam je tehnologija razbremenila življenje, zato delo v večini primerov ni več fizično, ampak intelektualno. Prihaja do neskladja med vnosom energije in njeno porabo. Čedalje več je (pre)debelih ljudi, po verodostojnih podatkih več kot milijarda (Puska in sod., 2003), tudi otrok, ki uživajo večje količine hrane, kot bi jo za svojo telesno aktivnost potrebovali. K temu doda svoj pečat tudi družbeno spodbujeno prenašanje ob koncu koledarskega leta, okoli velikonočnih praznikov ter pojavljanje reklamnih akcij za določene prehranske artikle dvomljive prehranske vrednosti. Spremembe v življenjskem slogu in prehranjevanju se odražajo tudi na zdravju ljudi. Čedalje večje število ljudi oboleva in/ali umira zaradi sodobnih degenerativnih nenalezljivih kroničnih bolezni, kot so infarkti, povišan krvni pritisk, različne vrste rakavih obolenj in diabetes tipa 2. Vzroki zanje se v veliki meri skrivajo v neustrezni prehrani s preveč nasičenih maščob, prečiščenih živil (beli sladkor, moka, sol, poliran riž), mesnih izdelkov, sladkarij – torej energijsko bogatih živilih. Uživamo pa premalo svežega sadja, zelenjave ter prehranskih vlaknin, na kar opozarjajo tudi strokovnjaki. S podaljševanjem starost ljudi se bo število obolelih le še povečevalo, kar se bo poznalo na obremenitvi zdravstvenega sektorja ter pritisku na javne finance.

V svetu je bilo do sedaj izvedenih že mnogo raziskav, s katerimi so ugotavljali dobre in slabe lastnosti različnih vrst živil ter načina prehrane. Najbolj informativne so ugotovitve, ki neposredno povežejo določene prehranske navade s fiziološkimi spremembami v telesu. Merjenje oksidativnih poškodb levkocitov v krvi je ena od metod, s katero je možno meriti in povezati stres na celičnem nivoju z neustrezno prehrano. Oksidativne in genotoksične poškodbe celic se pojavljajo tudi v zadnjem delu prebavnega trakta, za katere je vzrok

neposredni stik vsebine črevesja s sluznico. Z poskusi *in vitro* lahko simuliramo dogajanje v debelem črevesu ter (posredno) merimo genotoksični potencial blata (fecesa), katerega sestava in lastnosti so v mnogočem odvisne od zaužite hrane. Pri tem si pomagamo s pripravo vodnih izlužkov blata, ki verodostojno predstavljajo vodno fazo blata. Ta neposredno vpliva na celice epitelija, ki pasivno in aktivno prenašajo in vsrkavajo v njej raztopljene snovi. Z uporabo kometnega testa, ki je ena izmed najboljših metod za preučevanje genotoksičnih vplivov različnih snovi, testiranih v modelih *in vitro*, in ustrezno zasnovanega poskusa, lahko povežemo genotoksičnost vodnih izlužkov blata tudi s prehranskimi navadami in celičnim oksidativnim stresom.

1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA

V tem diplomskem delu smo želeli preveriti sledeče hipoteze:

- V predhodnem prehranskem poskusu na pujskih so *in vivo* preverjali vpliv neuravnotežene prehrane na oksidacijski stres pri živalih. Predvidevamo, da bomo s preizkušanjem našli dovolj občutljiv in zanesljiv postopek *in vitro* za dokazovanje genotoksičnih vplivov neuravnotežene prehrane.
- Po razpoložljivih podatkih v znanstveni literaturi je bila genotoksičnost vodnih izlužkov blata (fekalna voda) v manjšem obsegu preverjena v modelih *in vitro* le z vzorci človeškega blata. Pričakujemo, da bodo opisane metode ustrezne tudi za vzorce prašičjega blata.
- Domnevamo, da se bodo rezultati izbranega postopka *in vitro* ujemali z rezultati predhodnih poskusov *in vivo* na pujskih. Tako predpostavljamo, da bo blato pujskov, ki so bili v času predhodnega prehranskega poizkusa krmljeni s krmo, ki ni bila uravnotežena glede na prehranska priporočila, bolj genotoksično od blata pujskov s priporočeno prehrano.

Namen diplomskega dela je bil vzpostaviti primeren, delujoč in dovolj občutljiv postopek/sistem *in vitro*, ki bi dopolnjeval predhodni prehranski poskus *in vivo*. Prilagodili in optimizirali naj bi postopek kometnega testa za preverjanje genotoksičnosti vodnih izlužkov blata na celicah Caco-2. Cilj je bil analizirati pridobljene podatke kometnega testa po trenutno najboljši statistični metodi in jih razumljivo ter jasno predstaviti. V ta namen smo kritično preverili dosedanje metode ter podali oceno o njihovi primernosti in sporočilni vrednosti. Ker so prebavila pujskov zelo podobna človeškim in ker so bila v predhodnem prehranskem poskusu kot krma živalim uporabljena živila za prehrano ljudi, so lahko ugotovitve dober pokazatelj, kakšne poškodbe in stres na celičnem nivoju lahko povzroči neustrezna prehrana pri ljudeh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PREHRANA, PREBAVA IN RAK

Rak na debelem črevesu je eno najpogostejših malignih obolenj v zahodnem svetu in ocenjeno je, da lahko kar polovico populacije na tem področju do svojega 70. leta starosti doleti vsaj ena vrsta tumorja na debelem črevesu. V Združenih državah Amerike to bolezen letno na novo odkrijejo pri 130 tisoč ljudeh, umre pa jih nad 50 tisoč. V Sloveniji letno odkrijejo nad 1100 novih primerov in po pogostnosti pojavljanja je to drugi najpogostejši rak in hkrati drugi najpogostejši vzrok smrti zaradi rakavega obolenja. Dejavnikov tveganja za visoko obolevnost je več in vključujejo tako starost posameznika, vpliv dednosti (v manjši meri), kot tudi vpliv nezdravega življenjskega okolja, predvsem neustrezne prehrane, ki naj bi bila v 35-70-odstotni povezavi s pojavljanjem malignih tvorbo. Večina epidemioloških raziskav, tudi širšeevropska s preučitvijo življenjskih navad 478040 oseb (Norat in sod, 2005), tako podpira stališče, da naj bi bila ravno energijsko prebogata prehrana z obilo maščob in mastnega mesa ter revna s prehranskimi vlakninami, vitamini in antioksidanti, povezana z nastankom raka na debelem črevesu (DeKok in Maanen, 2000; Davis, 2003; Ocvirk, 2005).

Celice debelega črevesa pri človeku so stalno v stiku s kompleksno, potencialno mutageno, mešanico snovi, ki lahko neposredno izvirajo iz hrane, ali pa so rezultat razgradnih, mikrobnih procesov ter žlez z notranjim izločanjem. To mešanico – človeško blato – naravno naseljuje mnogo vrst bakterij (najpogostejše so iz rodov *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterococcus*), ki lahko iz njegovih sestavin sintetizirajo snovi, ki imajo genotoksično, karcinogeno ali tumorigeno aktivnost. Ker je blato torej končni produkt vseh teh procesov, ga je smiselno bolje preučevati, saj je to najbolj preprosta in neinvazivna metoda ugotavljanja fizikalno-kemijsko-bioloških razmer v debelem črevesu (DeKok in Maanen, 2000; Burns in Rowland, 2004). Blato je v osnovi sestavljeno iz tekoče in trdne faze, ki sta ustrezno pomešani. Ker črevesna sluznica v spodnjem delu črevesa vsrkava vodo (skupaj z raztopljenimi snovi) iz blata in je s tem v direktnem stiku z vodno fazo, domnevajo, da leta bolj verjetno izraža negativne vplive na celice epitela kot pa trdna faza (Davis, 2003).

Merjenje genotoksičnosti fekalne vode oz. vodnih izlužkov blata na človeških kolorektalnih celicah je lahko uporaben biomarker pri preučevanju vpliva prehrane na debelo črevo (Klinder in sod., 2004). Dejansko je to priporočena metoda, saj je smiselno uporabiti tiste celice, ki se lahko odzovejo na neznane komponente iz blata in pri tem spremenijo svoje lastnosti, in ne katere druge (Eisenbrandt in sod., 2002). Do sedaj je bilo objavljenih že precej raziskav na to temo. Venturi in sod. (1997) so prvi preverjali genotoksičnost vodnih izlužkov blata s kometnim testom pri 35 Angležih in Švedih, ki so uživali vsakdanjo hrano po lastnem izboru in navadah. Ugotovili so, da je bilo 11 vzorcev močno genotoksičnih in 19 negenotoksičnih, ter da naj bi razlike v genotoksičnosti vzorcev med osebki različnih narodnosti bile posledica različnih prehranskih navad. Oßwald in sod. (2000) so preučevali variabilnost genotoksičnosti vodnih izlužkov blata pri eni ali več

osebah in prišli do zaključkov, da je variabilnost izlužkov visoka tako pri posamezniku kakor pri več osebah, čeprav so uživali enako hrano. Razloge za to je iskati v tem, da imajo posamezniki različno črevesno mikrofloro, katera potrebuje daljši čas (več kot 9 dni, kot je bilo v poskusu), da se prilagodi na nov tip prehrane. Woods in sod. (2002) so podoben poskus izvedli na skupini Ircev ter prišli do zaključkov, da naj bi bila tretjina vzorcev močno genotoksičnih. Rieger in sod. (1999) so pokazali, da prehrana, bogata z mesom in maščobami, ter revna s prehranskimi vlakninami, povečuje genotoksičnost vodnih izlužkov blata na celice HT29 (celična linija, pridobljena iz adenokarcinoma na debelem črevesu človeka) in lahko prispeva k zvečanju tveganja za nastanek raka na debelem črevesu. Večja stopnja poškodb je bila lahko posledica zmanjšanja koncentracije snovi, ki vežejo kovinske ione, kot so npr. prehranske vlaknine in fitat. Fitat namreč uspešno veže intermediarni ion $\text{Fe}^{2+/3+}$, ki katalizira Fentonovo reakcijo, pri kateri se v debelem črevesu tvorijo reaktivni kisikovi radikali. Le-ti lahko povzročijo oksidativne poškodbe deoksiribonukleinske kisline (DNA). Tako se je z opaznim zvečanjem koncentracije železovih ionov (+42%) v blatu kar za ~13-krat povečala koncentracija hidroksilnih radikalov (Erhardt in sod., 1997). Posledično torej prehrana, prebogata z živalskimi maščobami (zvišujejo količino žolčnih kislin v blatu), rdečim meso (zvišuje delež železovih pigmentov) in prerevna z vlakninami (fitat je kelator železovih ionov in posledično inhibira Fentonovo reakcijo) lahko zveča koncentracijo žolčnih pigmentov in prokarcinogenov v blatu. Vse to lahko povzroči večje tveganje za nastanek in večjo pogostnost kolorektalnih karcinomov (Valko in sod., 2001). Vendar nekateri niso prišli do enakih zaključkov. De Kok in sod. (1999) so predvidevali, da naj bi bile koncentracije žolčnih kislin večje v vodnih izlužkih blata bolnikov z adenokarcinomom kot pri zdravim ljudem. Kljub ustrezno sestavljenemu poskusu, so pokazali, da razlika ni statistično značilna, in da je za neskladja v literaturi krivo preveliko število vplivov (npr. starost, prehranske navade, žolčni kamni, delovanje jeter...), katerih ni mogoče nadzorovati.

2.1.1 Mikrobiologija prebavil

Prebavni trakt sesalcev je ključni organ, ki ekstrahira snovi iz hrane/krmne, in omogoča njihovo vsrkavanje in vključitev v krvni obtok. Kot tak predstavlja posrednika med presnovo osebkov in okoljem, pri čemer vpliv okolja lahko igra pomembno vlogo v zapleteni naravi odnosov v črevesju. Glavna značilnost prebavnega trakta je zmožnost razgrajevanja živil z endogenimi encimi in vsrkavanje pridobljenih hranil. Pomemben del prebave pri monogastričnih živalih je tudi mikrobna fermentacija (Ewing in Cole, 1994). V nadaljevanju si bomo podrobneje pogledali, kako je s prebavili in njihovo fiziologijo pri ljudeh in še posebej pri prašičih.

Mikroflora prebavil je neobhodno povezana s prebavljanjem in igra pri tem zelo pomembno vlogo. Mikroorganizmi kolonizirajo epitelij s pritrditvijo na celice epitelijskega sloja, ki so prekrite z mukoznim slojem. Glede na to, v katerem predelu trakta so mikroorganizmi oz. kakšna je njihova vrstna sestava, so odvisni tudi prevladujoči metabolni procesi v

določenem delu. Tako so pri človeku in prašičih mikroorganizmi številčno najbolj prisotni v slepem in debelem črevesu (10^9 do 10^{11} mikrobnih celic na gram vsebine), v katerega pridejo ostanki hrane, iz katere je bila vsrkana že večina hranil, ki jih je možno hidrolizirati. Debelo črevo omogoča živali čim večjo izrabo energije iz ogljikovih hidratov (t.j. težje prebavljive vrste škroba, ne-škrobni polisaharidi (prehranske vlaknine), sladkorji in oligosaharidi), ki do te faze niso bili prebavljeni, niti absorbirani – prebavljivost se giblje med 30 in 50 %. Proces temelji na združbi fakultativno anaerobnih in anaerobnih bakterij, ki po naravni poti sintetizirajo hidrolitične encime, kateri razgrajujejo ogljikove hidrate do kratkoveržnih maščobnih kislin s fermentacijo. Fermentacija pripomore tudi k prebavi proteinov v hrani in snovi gostiteljevega izvora (encimi trebušne slinavke, mukus in odluščene epitelne celice) (Ewing in Cole, 1994).

Počasno potovanje (20-38 ur) vsebine debelega črevesa z obilico hranil in vode, ustrezno temperaturo (cca. 37 °C) in okolje s primerno vrednostjo pH (slepo črevo: 6-9, preostanek: 8-9) omogoča intenziven razvoj številnih mikroorganizmov. Najpogostejši rodovi bakterij v slepem črevesu in debelem črevesu prašiča so naslednji: *Lactobacillus* (Gram+), *Streptococcus* (Gram+), *Eubacterium* (Gram+), *Bacteroides* (Gram-), *Selenomonas* (Gram-) in *Clostridia* (Gram+). Ocenjujejo, da je v celotnem prebavnem traktu nad 1200 (Zoetendal in sod., 2006) različnih vrst bakterij (skupno število nad 10^{14} celic, kar je 10-krat več od števila evkariontskih celic v telesu), katerim se pridružujejo še določene kvasovke. 70 do 80 odstotkov vrst bakterij ni možno gojiti v pogojih *in vitro*. Zelo verjetno je torej, da imajo omenjene bakterije, tako znane kot še neznanе, pomemben vpliv na metabolizem, fiziologijo in zdravje gostitelja. Celotna združba je v dinamičnem ravnotežju znotraj sebe in v razmerju z gostiteljem, pojavlja pa se vrstna selekcija, ki je deloma endogene kemične narave in predvsem posledica prehranskih navad, vplivov okolja oz. starosti osebka, ki daje prednost določenim skupinam bakterij. Za svoj metabolizem bakterije izkoriščajo različne vire dušika in ogljikovih hidratov, ki izvirajo iz prehrane, ali pa so endogenega izvora in predstavljajo odvečne produkte presnove. Med zadnje spadajo indoli, skatol, fenol, H_2S , CO_2 , amini, amoniak in hlapne maščobne kisline, kot so očetna, propionska in maslena. Produkti mikrobne razgradnje polisaharidov so že naštetе hlapne maščobne kisline, ki se jim včasih pridruži še mlečna kislina, če krma vsebuje večji delež škroba. Te hlapne kisline se absorbirajo (več kot 95%) in prispevajo k energijski bilanci prašiča. Poleg tega lahko bakterije v debelem črevesu sintetizirajo nekatere vitamine iz skupine B ter vitamin K, ki preidejo v krvotok živali, kljub temu pa dnevne potrebe s tem niso v celoti pokrite. Končni produkt prebave je feces (blato), ki poleg vode vsebuje še neprebavljene ostanke hrane, izločke prebavnih žlez, epiteljske celice gastrointestinalnega trakta, anorganske soli, bakterije (predstavljajo 8-16% organske mase, ki se izloči) ter produkte njihovega metabolizma. S spremembo krme pride tudi do spremembe sestave, strukture in videza fecesa, o čemer lahko sklepamo na primernost krme (Ewing in Cole, 1994; McDonald, 1995; Jones in Marchesi, 2006).

Zanimivo je primerjati gastrointestinalni trakt prašiča in človeka med seboj. Mnogi privzemajo, da sta si funkcionalno podobna, vendar temu ni čisto tako. Čeprav spodnji del

črevesja pri obeh opravlja bolj ali manj podobno vlogo (regulacija količine elektrolitov in vode v organizmu), se razlikujeta predvsem v variabilnosti metanogene aktivnosti. Pri ljudeh je le-ta zelo različna in odvisna od prehranskih navad, medtem ko je znotraj populacije prašičev podobna, vzrok za to pa je možno povezati tudi z enotno pripravljeno krmo za vse živali. Nadaljnja pomembna razlika med obema sistemoma je, da pri prašičih v debelem črevesu najdemo tudi pomembne vampne celulolitične mikroorganizme (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Prevotella ruminicola*, *Clostridium herbivorans*, *Butyrivibrio spp.* ...), ki jih ni mogoče najti pri človeku. Razlike se pojavljajo tudi na vrstem nivoju (Varel in Yen, 1997).

2.2 KOMETNI TEST ALI ELEKTROFOREZA POSAMEZNIH CELIC

Ena pomembnejših metod za ugotavljanje in merjenje stopnje induciranih poškodb dednine v evkariontskih celicah je zagotovo elektroforeza posameznih celic (*single cell gel electrophoresis*, SCGE) ali kometni test (*Comet assay*). Metoda je občutljiva, zanesljiva ter omogoča hitro detekcijo dvo- ali eno-verižnih prelomov, alkalno labilnih mest ter mest z zakasnjnim popravilanjem v DNA (Rojas in sod., 1999). S širokim spektrom možnih aplikacij je postal ključni test za ugotavljanje genotoksičnosti. Nepogrešljiv je pri raziskovanju temeljnih vidikov nastankov poškodb DNA ter celičnih odzivih nanje (Collins in sod., 1997), uporaben pa je tudi pri reševanju (ne)vsakdanjih problemov, kot je npr. ugotavljanje poškodb DNA pri najstnikih zaradi zlorabe lepil v omamne namene (Çok in sod., 2004) ali pa spoznanje, da etanolni ekstrakt iz listov rožmarina, ki je znana začimbna rastlina, deluje varovalno na celice Caco-2 (Slameňová in sod., 2002).

Zgodovinski razvoj elektroforeze posameznih celic z uporabo agaroznih minigelov oz. kometnega testa se je začel v letu 1984, ko sta Ostling in Johanson (1984) uvedla minigele ter s tem izdatno izboljšala občutljivost odkrivanja poškodb DNA v posameznih celicah. S tem sta odpravila največjo pomanjkljivost izvornega postopka, iznajdenega nekaj let nazaj. V letu 1988 so Singh in sod. (1988) metodo nadgradili s tem, da so elektroforezo minigelov izvajali pod alkalnimi pogoji ($\text{pH} > 13$). S to izboljšavo so bili sposobni detektirati poleg dvoverižnih tudi enoverižne prelome na DNA ter alkalno nestabilna mesta, kar je pripomoglo k še večji občutljivosti metode. Preskok iz nevtralnega v alkalno območje pH je bil pomemben, saj skoraj vse genotoksične snovi povzročajo precej več enoverižnih poškodb DNA, ki so prej ostale nedetektirane (Tice, 1995). V osnovi se protokol začne z vklopom preučevane suspenzije celične kulture v sloj agaroze z nizko temperaturo tališča na objektniku z več sloji, nadaljuje z alkalno lizo, vključujoč detergente ter visoke koncentracije soli, ter zaključi s kratkotrajno elektroforezo pri alkalnih pogojih. Alkalna liza odstrani vso celično vsebino razen DNA, ki ostane zaradi preostalega nizkega deleža nanj vezanih nehistskih proteinov še vedno pretežno v superzviti obliki. V alkalnih pogojih elektroforeze pa pride do odvijanja DNA, ki se začne pri mestih prelomov v verigi. Celice z višjo stopnjo poškodb DNA tako pod vplivom električnega toka kažejo povečano stopnjo migracije nukleinske kisline iz jedra v smeri anode, kar je vidno kot

pojav "kometnega repa" (Rojas in sod., 1999) in lepo prikazano na Sliki 2 na 20. strani. Podrobnejši opis kometnega testa in njegove uporabe je moč zaslediti v pregledni literaturi (McKelvey-Martin in sod., 1993; Fairbairn in sod., 1995; Tice, 1995; Anderson in Plewa, 1998; Rojas in sod., 1999; Singh, 2000; Tice in sod., 2000; Collins, 2004).

2.2.1 Testiranje (anti)genotoksičnosti različnih snovi v pogojih *in vitro*

S kometnim testom dokazujemo poškodbe DNA v tarčnih celicah, zato je pravilna izbira teh ključnega pomena za uspešno delo. Načeloma ni ovir za uporabo različnih evkariontskih celic, zato so za namene ugotavljanja genotoksičnosti različnih kemikalij uporabljali pestro množico normalnih ali transformiranih celic človeškega, živalskega in rastlinskega izvora. Največ dela s človeškimi celicami je bilo opravljenega z limfociti in levkociti, celice pa so bile pridobljene tudi iz drugih tkiv in organov, kot npr. raznih povrhnjic in sluznic, rotil, trebušne slinavke, limfne žleze itd. Preprostejše je delo s celičnimi kulturami, ki jih gojimo rutinsko v poznanih optimalnih pogojih, in so že dodobra preučene. Pri vseh je kritični moment za izvedbo kometnega testa priprava celične suspenzije, pri kateri moramo pridobiti nepoškodovane in metabolno aktivne celice, ki so vedno v enaki fazi rasti. Pri celičnih kulturah v ta namen pogosto uporabljamo encima tripsin in kolagenazo, za pridobivanje celične suspenzije iz tkiv pa je primerno maceriranje izbranih tkiv v ustreznem pufru (Rojas in sod., 1999).

Do sedaj je bilo v modelih *in vitro* z namenom odkrivanja genotoksičnih ali mutagenih snovi preverjenih že mnogo vrst snovi od raznih kovin (Al, As, Cd, Co, Zn), pesticidov (acetoklor, alaklor, atrazin, lindan, paraquat), snovi iz široke uporabe (kofein, mentol, etanol, vitamina C in E), preverjali so tudi vpliv elektromagnetnih valov ter še mnogo drugih stvari (Rojas in sod., 1999). V današnjem času, kjer odkrivamo nove in nove spojine ali jih umetno sintetiziramo, in katerih delovanje na žive organizme ni znano, so področja uporabe kometnega testa dejansko neomejena.

Eno izmed pomembnih področij je testiranje antioksidantov in podobnih biološko aktivnih snovi ter ugotavljanje njihovih antagonističnih tj. zaščitnih delovanj proti znanim genotoksinom in/ali citotoksinom (npr. benzo[a]piren, ciklofosamid, H₂O₂, aflatoksin B₁, aromatski heterociklični amini, kadmij, svinec). Antimutagene snovi delimo, skladno s Kada in Shimoj (1987), v dve skupini, in sicer desmutagene, ki delujejo neposredno na mutagene, preprečujejo njihovo aktivacijo ali promovirajo detoksifikacijo, ter bioantimutagene, ki delujejo po poškodbi DNA in pospešujejo njeno popravljanje ter povečajo natančnost podvajanja. Tako je bilo ugotovljeno s preizkusi na celicah HepG2 (celična linija, pridobljena iz tumorja na jetrih človeka), da je večina citoprotektivnih snovi, uporabljenih kot antioksidanti, rastlinskega izvora. Poglavitni med njimi so polifenoli, flavonoidi, likopen in določne snovi iz soje, ki lovijo reaktivne kisikove spojine, organske perokside ter druge elektrofilne molekule, ki lahko poškodujejo DNA (Mersch-Sundermann in sod., 2004). Celice morajo vzdrževati ustrezno ravnotežje med količino

prostih radikalov in antioksidantov, da obdržijo strukturno integriteto celičnih sestavin, vendar lahko povečan delež prvih povzroči poškodbe občutljivih bioloških struktur, kot so DNA, lipidi in proteini, kar lahko pomembno pripomore k nastanku sodobnih degenerativnih bolezni (Heaton in sod., 2002). Likopen, navzoč v zrelem paradižniku, tako dokazano zmanjšuje oksidativne poškodbe DNA (Pool-Zobel in sod., 1997; Park in sod., 2005). Podobno je bilo ugotovljeno za flavonoide, med njimi kvercetin, miricetin in kampferol (Duthie in Dobson, 1999) in za vitamin E (Şardaş in sod., 2001; Kan in sod., 2002), čeprav ima le-ta lahko tudi pro-oksidativen vpliv (Duthie in sod., 1997a). Zaradi množice raziskav na to temo in različnih ugotovitev prihaja do neskladij v znanstveni literaturi. Zadnji pregled literature na področju raziskovanja antioksidantov in njihovih koristnih vplivov na oksidativno poškodovano DNA sta opravila Møller in Loft (2006), kjer sta ugotovila, da antioksidanti sicer zmanjšujejo stopnjo poškodb DNA, vendar v manjši meri, kot so domnevali poprej.

Postopek preverjanja vplivov antioksidantov ali drugih snovi poteka običajno tako, da raziskovalci za določen čas predhodno tretirajo celice s primerno koncentracijo znane kemikalije, ki povzroča poškodbe, zraven pa dodajo antioksidant ali pa ne. S kometnim testom tako primerjajo odziv tretiranih celic na dodatek antioksidanta, ki naj bi zmanjšal poškodbe DNA (Robichová in Slameňová, 2002; Kassie in sod., 2003; Volkovová in sod., 2006). Vsekakor pa naj bi preverjanje potencialnih antioksidativnih snovi in drugih snovi z možnimi varovalnimi lastnostmi potekalo skladno z jasnimi priporočili z namenom standardizacije in boljše medsebojne primerjave rezultatov (Verhagen in sod., 2003). Enako naj bi veljalo tudi za preverjanje genotoksičnih učinkov karcinogenov, kjer obstajajo uveljavljena priporočila (Albertini in sod., 2000).

2.2.2 Ozadje statistične analize rezultatov kometnega testa

Opisovanje bioloških pojavov je ponavadi zapleteno in običajno ne ponuja enoznačnih rešitev. Velikokrat je potrebno upoštevati kaotično naravo živega sveta, ki ga ni mogoče v celoti in natančno zaobjeti s končnim številom enačb, in katerega (še) ni mogoče dovolj zadovoljivo simulirati z računalniškimi modeli. Spomnimo se samo na računalniško predvidevanje 3D oblike proteinov (Folding@Home..., 2006) ter silno množico informacij o genetiki in metabolizmu relativno preprostega mikroorganizma, kot je npr. *Escherichia coli*. Pri odstiranju tančic skrivnosti narave ter ugotavljanju dejstev nam je tako v veliko pomoč statistika, s katero lahko iz na videz nepregledne množice podatkov izvečemo na prvi pogled neopazne, a bistvene poudarke, ter z njimi operiramo dalje.

Vsak resen znanstveni eksperiment mora biti ustrezno statistično podprt pred in po zaključku same študije. Imeti mora jasno opredeljeno, katero spremenljivko bomo spreminjali, kakšni naj bi bili pričakovani rezultati, kako bomo sestavili poskus, da bomo izničili vse nezaželene dejavnike, ki bi negativno vplivali na verodostojnost rezultatov, s katerimi statističnimi orodji in metodami bomo obdelali rezultate, kako bo s statistično

značilnostjo, ali imajo statistično značilne razlike tudi biološko podlago, ali bo poskus ponovljiv itd. (Lovell, 1997; Verhagen in sod., 2003).

Tudi za kometni test so zahteve podobne. Glede na to, da je enota vizualnega ocenjevanja ena celica oz. njeno jedro, ter da je možno med eno ponovitvijo testa oceniti tudi do dva tisoč celičnih jeder, pričakujemo dorečeno statistično analizo teh podatkov. Vendar temu ni tako. Že leta 1995 je prihajalo do dvomov vodilnih strokovnjakov na tem področju (Tice, 1995) o kakovosti dotedanjih analiz. Raziskovalci so uporabljali mnogo različnih parametričnih in neparametričnih statističnih metod, vendar s premalo védenja o njihovi primernosti in dejanski pravilnosti. Težava se je najprej pojavila pri načinu ocenjevanja poškodb. Najbolj preprosto je vizualno ocenjevanje poškodb jeder z ocenami od 0 (nepoškodovano) do 4 (razsuto jedro) (Collins in sod., 1995), ki ima to prednost, da je hitro, enostavno in ne zahteva dragih aparatov za računalniški zajem slik (Duthie in sod., 1997b; Collins, 2004), je ponovljivo (García in sod., 2004), vendar je po drugi strani lahko subjektivno ter da premalo informacij (Dehon in sod., 2004). Z razvojem tehnologije in uporabo programov za analizo digitaliziranih slik kometov npr. KineticImaging Komet 5 (Single cell..., 2001) se je natančnost ocenjevanja kometov precej povečala, vendar je dokazano, da oba načina dajeta podobne končne rezultate (Duthie in sod., 1997b; Heaton in sod., 2002; Park in sod., 2005). Enostavno je tudi primerjati povprečne vrednosti, mediano ali kako drugo reprezentativno statistiko določenega parametra (npr. delež DNA v glavi komet ali pa repni moment) med posameznimi skupinami in kasneje izvesti analizo variance (Duez in sod., 2003), vendar pri tem obvezno pride do izgube informacij o celostnih lastnostih populacije merjenih celičnih jeder. Ena izmed njih je npr. porazdelitev stopnje poškodb znotraj populacije celic, ki je pomemben podatek. Na začetku in tudi kasneje se je predpostavljalo, da so vrednosti določenega parametra, največkrat repnega momenta, porazdeljene normalno. Zato so uporabljali analizo variance (ANOVA) z določenimi post-testi (Singh, 2000; Glej in sod., 2005) v statističnem programu GraphPad Prism[®] (GraphPad Prism 4.0 Help, 2004) ali podobnem, s katerimi so primerjali posamezne skupine med seboj ter ugotavljali statistično značilne razlike med njimi. Nekateri raziskovalci so že kmalu spoznali, da je porazdelitev hi-kvadrat (χ^2 , priloga C) boljše za opis podatkov repnega momenta (Bauer in sod., 1998), vendar analize podatkov, ki bi upoštevale odstopanja od normalne porazdelitve oz. na splošno nesimetrične porazdelitve, ter izračun statistik iz njih, niso uporabile vseh možnosti, ki jih te porazdelitve ponujajo. Zasilna rešitev teh težav je bila mogoča z uporabo matematičnih transformacij, ki nesimetrično porazdeljene podatke pretvorijo v približno normalno porazdeljene, primerne za nadaljnjo obdelavo. Ena od njih je logaritmiranje, za katero je bilo pokazano, da zveča moč in zanesljivost statistične analize, opravljene na podatkih repnih momentov ocenjenih celičnih jeder (Wiklund in Agurell, 2003). Ker pa vsaka transformacija prikrije pravo naravo izvornih podatkov, so boljše tiste metode, ki operirajo z originalnimi podatki. V iskanju bolj primerne porazdelitve podatkov repnega momenta so raziskovalci pokazali, da je Weibullova porazdelitev (priloga C) še bolj primerna, t.j. bolj natančno opiše podatke kot porazdelitev χ^2 , vendar trditve niso dovolj utemeljili (Ejchart in Sadlej-Sosnowska, 2003). Dehon in sod. (2004) so celo predlagali, da je primerno

uporabiti kombiniranje dveh normalnih porazdelitev za opis parametra repnega momenta, glede na to, da sta člena *DNA v repu* in *dolžina repa* (slika 1, str. 20) porazdeljena normalno (Bauer in sod., 1998).

Ena večjih težav je tudi primerjanje rezultatov zaporedno izvedenih kometnih testov. Pri tem lahko prihaja do odstopanj v izvedbi poskusa, kot so uporaba različno starih ali metabolno različnih testnih celic, nihanj v kakovosti priprave minigelov in rokovanju s celicami, ter rahlo različnih elektroforetskih časih. Nadvse pomembna je tudi konstantna temperatura raztopin med alkalno lizo in elektroforezo (Speit in sod., 1999). Vse to lahko vodi k slabo ponovljivim rezultatom, ki jih je težko analizirati in interpretirati. Ena izmed rešitev je vključitev internih kontrol kometnega testa, s katerimi sicer preverjamo uspešnost postopka, v statistično analizo. S tem kalibriramo odzive preizkušanih snovi relativno na negativno (in pozitivno) kontrolo, katerih odzivi so v posameznih ponovitvah najbolj stabilni. Omenjen metodološki postopek pride v poštev predvsem takrat, ko je potrebno analizirati veliko število vzorcev (DeBoeck in sod., 2000).

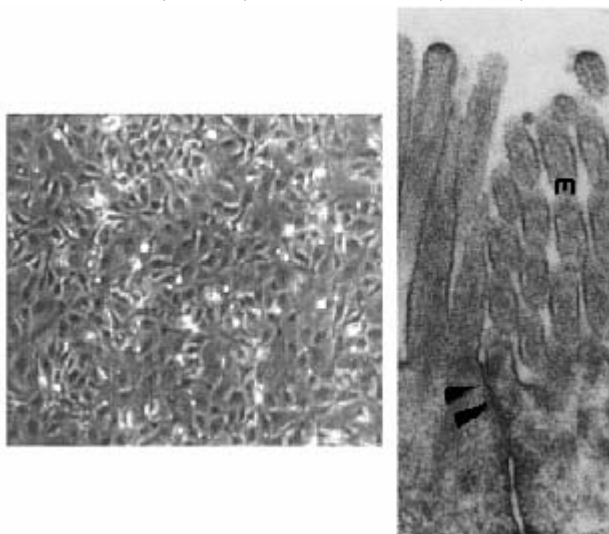
Raziskovalci običajno nimajo dovolj časa za izvedbo zapletenih statističnih analiz in uporabijo preverjene in lažje metode. Poleg zgoraj opisanih parametričnih metod je možno izvesti analizo tudi brez poznavanja porazdelitve podatkov s t.i. neparametričnimi statističnimi metodami. Mann-Whitney test je tako neparametrična različica t testa, Kruskal-Wallis pa običajne analize variance. Njihova prednost je večja statistična moč in občutljivost, slabost pa nezmožnost preverjanja več vplivov ali ponovljenih meritev (Duez in sod., 2003; GraphPad Prism 4.0 Help, 2004). Kljub temu jih raziskovalci precej uporabljajo in z njimi statistično analizirajo podatke iz kometnega testa (DeBoeck in sod., 2000; Dehon in sod., 2004; Lah in sod., 2005a).

Zadnji predlog za analizo podatkov iz kometnega testa so pripravili Verde in sod. (2006) in temelji na analizi preživetja, ki ima za sabo dolgo zgodovino obdelovanja nesimetrično porazdeljenih ne-negativnih podatkov. Uporablja se v medicini in inženirskih vedah, kjer se npr. preučuje dejavnike, ki vplivajo na dolžino življenja ljudi, ali čas delovanja elektronskih komponent. Koncept preživetja temelji na dejstvu, da živi organizmi (ali kaj podobnega) začnejo odmirati od trenutka delovanja določenega "seleksijskega" vpliva (npr. toksična kemična snov). Ključni podatek pri tem je potekli čas od začetka delovanja nekega vpliva do smrti organizma. Ti časi so krajši pri bolj selektivnem vplivu in daljši pri manj selektivnem vplivu, njihova porazdelitev pa je običajno porazdeljena po Weibullovi statistični porazdelitvi. Vse to je možno prenesti tudi na podatke iz kometnega testa, kjer tarčne celice tretiramo z določenimi genotoksičnimi snovmi. Pri kometnem testu gre za ugotavljanje stopnje poškodb še živih celic, katere je možno opisati s parametri, kot sta repni moment (po Olivu) in odstotek DNA v repu. Bolj kot je neka snov genotoksična, večje bodo vrednosti izbranega parametra v celotni populaciji merjenih celičnih jeder, in obratno. Pri analizi preživetja bo bolj selektiven vpliv povzročil hitrejše odmiranje organizmov in s tem krajše čase, ter obratno. Torej gre pri analizi preživetja in kometnem testu v osnovi za podobno stvar, le lastnost preučevanca (seleksijski pritisk ali

genotoksičnost) ima na merjene parametre drugačen vpliv (negativni ali pozitivni). Zato je možno izsledke analize preživetja koristno uporabiti tudi pri analizi kometnega testa, kjer primerjamo posamezne skupine ocenjenih kometov med seboj ali proti negativni kontroli. Statistična enota za ocenjevanje vplivov je tako posamezna skupina celic oz. vzorec in ne posamezna celica (Wiklund in Agurell, 2003).

2.3 CELIČNA LINIJA CACO-2

Celice linije Caco-2 se v zadnjem času zelo pogosto uporabljajo v različnih disciplinah znanosti, predvsem pa so nepogrešljive pri preučevanju prenosa različnih snovi skozi celični enosloj. Celična linija Caco-2 je bila izolirana iz dobro razvitega humanega adenokarcinoma debelega črevesa pri 72-letnem pacientu. V primernem gojišču celice spontano diferencirajo in izražajo strukturne in funkcionalne lastnosti zrelih enterocitov. Zato te celice predstavljajo edinstven in idealen *in vitro* model človeških enterocitov. V konfluentni rasti celice polarizirajo, tvorijo tesne stike in mikrovile na apikalni strani, ter začnejo izražati pestro encimatsko aktivnost (hidrolaze, transportne sisteme za sladkorje, aminokisljine), poleg tega pa sintetizirajo proteine prekomembranskega transportnega sistema. Celice Caco-2 dosežejo konfluentno rast v 3-6 dneh in stacionarno fazo rasti v 10 dneh, medtem ko je diferenciacija zaključena v približno treh tednih po konfluenci. Diferencirane celice izražajo visoko aktivnost alkalne fosfataze, sukrazne izomaltaze ter membranskih peptidaz (aminopeptidaze N, P in W, dipeptidil peptidaza IV, peptidil dipeptidaza A, endopeptidaza, γ -glutamyl transpeptidaza), ki so značilni za mikroresice, ki na apikalni strani spominjajo na krtačo. V tem stadiju tvorijo epitelno membrano s podobnimi značilnostmi kot je epitelij debelega črevesa, vendar izražajo transportne proteine, ki so navadno v sluznici tankega črevesa (Fogh in sod., 1977; Pinto in sod., 1983; Hauri in sod., 1985; Howell in sod., 1992; Laitinen, 2006).



Slika 1: Levo: Celice Caco-2 pod mikroskopom (Flaherty, 2005)

Desno: Celice pod transmisijskim elektronskim mikroskopom z mikroresicami (m) in tesnimi stiki (▶) (Artursson in sod., 2001)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 GOJENJE CELIC CACO-2

Celična kultura Caco-2 (BS TLC 87) izvira iz inštituta "Istituto Zooprofilatico Sperimentale" v Brescii, Italija.

Celice smo gojili v popolnem gojišču, katerega sestava je opisana v Preglednici 1. Eaglovo gojišče po Dulbeccu za gojenje celic Caco-2 (DMEM) smo pripravili po navodilih proizvajalca v sterilnem kabinetu in sterilizirali s filtracijo (membrana s porami premera 0,22 μm). pH gojišča naj bi po filtraciji znašal od 7 do 7,2. Do uporabe je bilo gojišče shranjeno v hladilniku pri 4 °C. Popolno gojišče za celice Caco-2 je bilo po aseptičnem postopku pripravljeno isti dan, ko smo ga potrebovali, in je bilo do neposredne uporabe shranjeno v hladilniku.

Preglednica 1: Popolno gojišče za celice Caco-2

sterilno gojišče DMEM:	
- pripravljeno gojišče DMEM v prahu (Sigma D-6655)	
- natrijev bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma S-5761)	3,7g
- destilirana voda	do 1000 ml
serum telečjega zarodka (FBS) (Hyclone)	10% (v/v)
antibiotik gentamicin sulfat (Sigma)	0,01% (v/v)

Gojenje celic je potekalo po ustaljenem postopku – v inkubatorju pri 37 °C, 5% CO_2 atmosferi in visoki vlažnosti. Visoka relativna vlažnost zraka (nad 90% oz. nasičena) je pomembna za preprečevanje izhlapevanja vode iz gojišča in ohranjanja njegove osmolarnosti (Camenisch in sod., 1998; Flaherty, 2005). Gojišče smo celicam menjali na vsaka dva ali tri dni, vsekakor pa takrat, ko je spremenilo barvo iz rožnato-rdeče v rumeno tj. ko je bilo izrabljeno. DMEM gojišče namreč vsebuje pH indikator fenol rdeče, ki spremeni barvo ob zadostnem znižanju vrednosti pH. S tem lahko posredno nadziramo razmere v gojišču in preprečimo odmiranje celic zaradi lastnih metabolnih produktov.

V približno sedmih dneh so celice dosegle konfluenco in prekrile dno plastične posode za gojenje tkivnih kultur, zato jih je bilo potrebno presaditi in hkrati ustrezno razredčiti (približno 5 \times). V ta namen smo uporabili običajen postopek s tripsinizacijo (Narat, 2003). Pri vsakem presajanju smo del celic nasadili v plošče s 24 luknjami, kar smo jih čez sedem dni uporabili v poskusu, del celic pa smo ohranjali v gojitvenih stekleničkah za naslednje poskuse. V našem primeru smo uporabili celice iz pasaj 3-18.

3.1.1 Štetje celic in test viabilnosti

Za uspešno vzdrževanje celične kulture in za vsak poskus je nujno potrebno poznati število oz. koncentracijo celic (Narat, 2003). Pomembno je, da v posamezne poskuse vključimo celice, ki so si čim bolj podobne. To med drugim dosežemo tudi s tem, da nasadimo v posamezne jamice 24-lukenjskih gojitvenih plošče vedno enako število celic. Zato jih moramo vsakič pred nasajanjem prešteti.

Za potrebe kometnega testa morajo biti celice, na katere smo delovali z vodnimi izlužki blata in neko znano genotoksično snovjo kot pozitivno kontrolo, še vedno pretežno žive (viabilnost nad 70%), saj je le tako ocenjevanje rezultatov kometnega testa verodostojno – preprečimo lažno pozitivne rezultate. To pomeni, da moramo po tretiranju celic z genotoksičnimi snovi, in pred izvedbo kometnega testa preveriti viabilnost celic.

Postopek ugotavljanja viabilnosti celic opravimo po standardnem postopku (Narat, 2003), upoštevajoč nekatere njegove omejitve (Collins, 2004). Osnova razlikovanja med živimi oz. nepoškodovanimi in mrtvimi celicami je vgrajevanje barvila Tripan modro v celično membrano, ki je opazno le pri mrtvih ali poškodovanih celicah (te se obarvajo modro). V ta namen smo zmešali 50 μ l suspenzije celic, ki je bila namenjena vključitvi v tretji sloj minigela (poglavje 3.3.1), s 50 μ l raztopine barvila Tripan modro. Nato smo pripravili števno ploščico (Neubauerjev hemocitomer) ter nanесли ustrezno količino mešanice. Pod mikroskopom smo prešteli vse celice (žive in mrtve), ki so bile v mreži števne komore, in izračunali viabilnost po enostavni formuli.

$$\text{viabilnost} = \left(\frac{\text{št. živih celic}}{\text{št. vseh celic}} \right) \times 100\% \quad \dots(1)$$

3.2 PRILAGAJANJE METODE ZA PRIPRAVO VODNIH IZLUŽKOV BLATA

Za pripravo vodnih izlužkov blata smo predvideli dva postopka. Prvi je ponovitev postopka po Rieger in sod. (1999), drugi pa je postopek, ki smo ga sami zasnovali na osnovi številnih predhodnih poskušanj v laboratoriju.

Rieger in sod. (1999) so pripravili vodne izlužke iz homogeniziranega liofiliziranega blata, ki je bilo do začetka priprave shranjeno pri -80 °C. Nato so blato rekonstituirali z dvakrat destilirano vodo, ponovno homogenizirali in centrifugirali 2 uri pri $36000 \times g$ in 4 °C. Supernatant so pazljivo odpipetirali, označili ter nato uporabili pri inkubaciji celic HT29.

Mi smo postopek za pripravo vodnih izlužkov spremenili. Predvideli smo naslednji postopek oz. ključne točke, ki smo ga/jih med samimi poskusi do določene mere spreminjali. Začetno homogenizirano blato smo razredčili z enkratno do dvakratno količino deionizirane vode Milli-Q ter homogenizirali na vrtinčniku (vorteksu). Sledila je približno 30-minutna inkubacija te mešanice pri 37 °C. Vzorce smo za tem inkubirali v

termostatirani vodni kopeli z občasnim vorteksiranjem ali pa v termostatirani ultrazvočni kopeli, nato pa vsaj pol ure centrifugirali pri minimalno 20000×g. Supernatant smo pazljivo odlili oz. odesali v ustrezne plastične mikrocentrifugirke po Eppendorfu ter shranili do uporabe pri -70 °C. Podobne metode so poznane iz literature (Rafter in sod., 1987; Venturi in sod., 1997), vendar je pri tej šlo za optimizacijo metode za naše vzorce.

Poglavitni cilj pri obeh postopkih je na enostaven način pridobiti čim več in čimbolj kakovostnega in verodostojnega vodnega izlužka, ki ga nato uporabimo pri inkubaciji celic Caco-2.

3.2.1 Predhodni prehranski poskus, iz katerega izvirajo vzorci prašičjega blata (Rezar, 2003)

Blato, ki smo ga preiskovali v tej diplomski nalogi, izvira iz prehranskega poskusa, ki ga je izvedla dr. Vida Rezar v letu 2003 (Rezar, 2003). V prehranskem poskusu je preučevala, kaj je s stališča oksidacijskega stresa bolj škodljivo: obrok z masnim mesom ali obrok brez sadja in zelenjave. V ta namen so uhlevili 48 rastočih pujskov (2 ponovitvi po 24 živali) s povprečno maso 11 kg, ki so jih razdelili v 6 poskusnih skupin po 8 živali. Uhlevili so jih v individualne kletke, ki omogočajo ločeno zbiranje blata in seča.

Živali v različnih skupinah so dobivale izokalorične krmne obroke. V času prilagajanja (9 dni) so bile vse živali krmljene z uravnoteženim obrokom (Pripor), nato pa so skupine 22 dni dobivale naslednje obroke:

- Pripor Obrok, uravnotežen glede na prehranska priporočila – vsebuje priporočeno količino pečenega pustega mesa, sadja in zelenjave.
- +Mašč Obrok kot Pripor, le da so pečeno pusto meso in del škroba izokalorično zamenjali s pečenim masnim mesom.
- -SadZel Obrok kot Pripor, le da so sadje in zelenjavo izokalorično zamenjali s škrobom.
- +Mašč-SadZel Obrok kot Pripor, le da so pečeno pusto meso ter sadje izokalorično zamenjali s pečenim masnim mesom.
- +Meso Obrok kot Pripor, le da je vseboval 2-kratno priporočeno količino pečenega pustega mesa, ki je izokalorično zamenjalo del škroba.
- Vegi Obrok kot Pripor, le da so pečeno pusto meso izokalorično in izobeljakovinsko zamenjali s termično obdelano in razmaščeno sojo (sojinimi tropinami).

Osnovna krmna mešanica za vse skupine je bila sestavljena iz različnih količin koruznega škroba, pšenične moke in otrobov, sojinih tropin (razmaščena in termično obdelana soja), sladkorja, posnetega in polnomastnega mleka v prahu in olja oljne ogrščice. Posamezne poskusne skupine so kot dodatek dobivale še pusto ali mastno meso ter dodatke sadja in zelenjave (cvetača, paradižnik, jabolka, rdeča paprika). Natančna sestava dnevnega obroka posamezne skupine je opisana v Prilogi A.

3.2.2 Izbira in priprava osnovnih vzorcev blata

Na koncu posamezne ponovitve poskusa, opisanega v poglavju 3.2.1, je bilo vsakemu pujsku odvzeto tudi blato. Enkratni izloček blata posameznega pujska je bil shranjen v plastične mikrocentrifugirke, označen ter shranjen v zamrzovalniku pri -70 °C. Preglednica z vsemi vzorci blata, njihovimi osnovnimi oznakami in masami je v Prilogi B.

Od opisanih vzorcev blata smo za začetni poskus *in vitro* izbrali tri vzorce blata pujskov iz skupine "Pripor" (njihov obrok je bil uravnotežen glede na prehranska priporočila) in tri vzorce blata iz skupine "-SadZel" (obrok s škrobom namesto sadja in zelenjave). Po predhodnih rezultatih (Rezar, 2003) naj bi bila razlika v genotoksičnosti vodnih izlužkov blata med danima skupina največja. Na koncu poskusa smo za potrditev celotnega postopka (od priprave vodnih izlužkov do izvedbe kometnega testa) izbrali še nekaj vzorcev blata iz drugih skupin. Vse izbrane vzorce prikazuje Preglednica 2.

Preglednica 2: Vzorci blata, uporabljeni za pripravo vodnih izlužkov

	skupina	oznaka vzorca	oznaka osnovnega vzorca blata	masa (g)
Optimizacija	Pripor	P1	A2-10	30,5
		P2	A2-20	37
		P3	B2-22	14
	-SadZel	SZ1	A2-1	20
		SZ2	A2-11	33
		SZ3	B2-10	25
Potrditev	Pripor	P	A2-13	23
	-SadZel	SZ	B2-19	23
	+Meso	M	A2-8	26
	Vegi	V	A2-17	27

3.2.2.1 Homogenizacija vzorcev blata in ugotavljanje deleža suhe snovi

Za pripravo kakovostnih vodnih izlužkov blata je potrebno blato pred nadaljnjimi postopki homogenizirati. S tem zagotovimo, da ima tako pripravljeni vzorec čimbolj enake fizikalno-kemijske lastnosti po celotnem svojem volumnu in je z njim mogoče najbolj enostavno rokovati.

V ta namen smo uporabili homogenizacijo s tekočim dušikom, s katero na enostaven način spremenimo oz. zdrobimo kompakten vzorec (blato, meso...) v droben granulat oz. prah. Še zamrznjeno blato (vsak vzorec posebej) smo na kuhinjski deski najprej sesekljali na majhne koščke in nato prenesli v plastično posodo, obloženo s stiroporjem. Po dodatku ustreznega volumna tekočega dušika so koščki blata v celoti zmrznili, nakar smo jih s keramičnim batom strli. Dodatno mletje je potekalo s paličnim kuhinjskim mešalnikom z ustreznim nastavkom. Pridobljeni prah smo nato pretresli v dvojne plastične vrečke, ustrezno označili ter shranili v zamrzovalniku pri -20 °C do uporabe.

Za pravilno rekonstitucijo blata in dodajanje ustrezne količine vode Milli-Q je bilo potrebno ugotoviti delež suhe snovi (oz. delež vode) v vzorcih blata. Metoda (Eaton in sod., 1995) temelji na principu dehidracije vzorca s sušenjem pri povišani temperaturi. V ta namen smo v stehtano keramično posodico (tehtič) zatehtali 1 gram fino drobljenega kremenčevega peska ter ga dve uri sušili v sušilniku pri 105 °C. Tehtič s kremenčevim peskom smo nato natančno stehtali ter mu dodali 1 gram homogeniziranega vzorca blata. Po ponovnem tehtanju smo vse skupaj postavili nazaj v sušilnik in sušili tri ure pri 105 °C, nakar smo tehtič postavili v eksikator, da se ohladi. Tehtič nato ponovno stehtamo in izračunamo delež suhe snovi po naslednji enačbi:

$$\%SS = \frac{(masa\ tehtiča\ in\ blata\ pred\ sušenjem - masa\ tehtiča\ in\ blata\ po\ sušenju)}{(masa\ tehtiča\ in\ blata\ pred\ sušenjem - masa\ tehtiča\ brez\ vzorca)} \times 100\% \quad \dots(2)$$

Odstotek vode v določenem vzorcu je tako preostanek do stotih odstotkov.

3.2.2.2 Priprava liofiliziranih vzorcev blata

Za ponovitev postopka pridobivanja vodnih izlužkov blata skladno z Rieger in sod. (1999) smo morali pripraviti liofilizirane vzorce blata. Tako smo v označene stehtane plastične krožnike odmerili cca. deset ali več gramov zamrznjenega homogeniziranega vzorca blata. Po ponovnem tehtanju smo jih vstavili v ustrezno pripravljen in nastavljen liofilizator (Christ Alpha 1-4, Martin Christ, Nemčija) s temperaturo kondenzatorja -44 °C in podtlakom 3,69 milibarov. Po 23 urah so bili vzorci liofilizirani, nakar smo jih natančno stehtali in pretresli v označene plastične vrečke ter shranili do uporabe v zamrzovalniku pri -20 °C. Obenem smo ponovno izračunali delež suhe snovi v posameznem vzorcu skladno z naslednjo enačbo:

$$\%SS = \frac{(masa\ pladnja\ in\ blata\ pred\ liofilizacijo - masa\ pladnja\ in\ blata\ po\ liofilizaciji)}{(masa\ pladnja\ in\ blata\ pred\ sušenjem - masa\ pladnja\ brez\ vzorca)} \times 100\% \quad \dots(3)$$

3.2.3 Postopek priprave vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata

Osnovni postopek je opisan v poglavju 3.2. S spreminjanjem različnih pogojev ekstrakcije vodnih izlužkov je prihajalo do različnih težav, ki bodo natančneje pojasnjene v poglavju Razprava in sklepi. Kot ustrezen se je izkazal spodaj opisani postopek:

V stehane in označene mikrocentrifugirke po Eppendorfu z volumnom 1,5 ml smo odmerili po 0,5 grama zmrznjenega homogeniziranega blata, katerega smo tekom odmerjanja imeli na ledeni plošči, da ni prihajalo do prezgodnjega odtajevanja. Za en vzorec blata smo pripravili vsaj dve mikrocentrifugirki, saj smo tako pridobili več vodnega izlužka. Nato smo vsakemu vzorcu dodali 2-krat toliko vode Milli-Q, kolikor jo je sam prvotno že vseboval (npr. če ima določen vzorec blata 30% suhe snovi, se enemu gramu blata doda 1,4 ml vode Milli-Q). Mikrocentrifugirke smo potem zaprli ter vstavili v napravo za razbijanje celic (Mini BeadBeater™, Biospec products, ZDA) ter stresali 20 sekund pri 4200 tresljajih na minuto. Zatam smo vzorce pol ure inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C z občasnim mešanjem na vrtničniku. Po končani inkubaciji je sledilo ponovno stresanje pri enakih pogojih kot zgoraj ter kratka ohladitev mikrocentrifugirk s hladno vodo. Centrifugiranje (Sigma 3K18, Nemčija) vzorcev je potekalo dve uri pri 29000×g ter pri 4 °C. Supernatant posameznega vzorca smo nato pazljivo odstranili in porazdelili v nove označene mikrocentrifugirke tako, da je količina vodnega izlužka v eni predvidoma zadošča za enkratno nadaljnjo uporabo. Shranili smo jih v zamrzovalniku pri -20 °C.

Inkubacija vzorcev blata je bila možna tudi v ultrazvočni komori (Kambič laboratorijska oprema, Slovenija) pri 37 °C za pol ure, kjer smo na ta način preverjali vpliv ultrazvoka na kakovost priprave vodnih izlužkov. Pri tem smo začetno in končno stresanje mikrocentrifugirk z vzorci v Mini BeadBeater™-ju zamenjali z osnovnim vorteksiranjem.

3.2.4 Postopek priprave vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata

Postopek, ki so ga pred časom razvili Rieger in sod. (1999), smo poskusili ponoviti s pripravo vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata. Podoben je postopku priprave vodnih izlužkov iz homogeniziranih vzorcev blata, ki je opisan v poglavju 3.2.3. V posamezne mikrocentrifugirke smo odmerili po 0,15 grama določenega liofiliziranega vzorcev blata in mu dodali 1 mililiter vode Milli-Q. Po izdatnem stresanju z razbijalcem celic (20 sekund pri 4200 o/min) smo vzorce potopili v termostatirano vodno kopel ter jih pol ure inkubirali pri 37 °C. Po ponovnem stresanju smo jih eno in pol ure ultracentrifugirali pri 29000×g ter 4 °C. Supernatant smo nato pazljivo in v primernih količinah odpipetirali v posamezne mikrocentrifugirke ter shranili v zamrzovalniku pri -20°C.

3.3 PRILAGAJANJE KOMETNEGA TESTA ZA TESTIRANJE VODNIH IZLUŽKOV

3.3.1 Priprava celic Caco-2 in minigelov na mikroskopskih objektivih za uporabo v kometnem testu

Celice Caco-2 smo gojili tako, kot je opisano v poglavju 3.1. Ker rastejo kot pritrjena celična linija, jih je bilo potrebno pred vklapljanjem v agarozni sloj odlepiti od podlage, resuspendirati v posamezne celice, ter ustrezno razredčiti. Celice za testiranje genotoksičnosti vodnih izlužkov blata smo gojili v ustreznih mikrotitrskih ploščah s 24 luknjami. Običajno smo za vsak posamezni vzorec vodnega izlužka, negativno in pozitivno kontrolo porabili dve luknji s celicami.

Za aplikacijo na celice je bilo potrebno najprej pripraviti ustrezne razredčine vodnih izlužkov blata v popolnem gojišču za celice Caco-2. Mikrocentrifugirke z zamrznjenimi vodnimi izlužki, ki so bili shranjene pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo najprej pazljivo odtalili v mlačni vodi, dodobra premešali z vorteksom ter do neposredne uporabe postavili v posodo z ledom. Medtem smo pripravili serijo novih mikrocentrifugirk po Eppendorfu ter vanje odpipetirali ustrezno količino popolnega gojišča, skladno s načrtom – običajno $850\text{ }\mu\text{l}$ za dve luknji. Nato smo v posamezne mikrocentrifugirke dodali še $150\text{ }\mu\text{l}$ (oz. ustrezen volumen do $1000\text{ }\mu\text{l}$) določenega vzorca vodnega izlužka ter jih premešali z vorteksom. Negativno kontrolo smo pripravili iz 1 ml popolnega gojišča brez vsakršnih drugih dodatkov. Pozitivna kontrola je vsebovala $850\text{ }\mu\text{l}$ popolnega gojišča za celice Caco-2 ter $150\text{ }\mu\text{l}$ $2,5\%$ v/v založne raztopine etilmetan sulfonata (EMS; CAS številka 62-50-0), ki smo jo pripravili v 10 mM kalij-natrijevem fosfatnem pufru z NaCl (PBS; $\text{pH}=7,4$). Končna koncentracija EMS je znašala $0,375\%$ v/v oz. $30,2\text{ mM}$. Mikrocentrifugirke s tako pripravljenimi vzorci smo neposredno pred uporabo na celicah ogreli v vodni kopeli na približno $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inkubacija celic z razredčinami vodnih izlužkov blata je potekala tako, da smo najprej iz lukenj s celicami v mikrotitrski plošči popolnoma odstranili izrabljeno gojišče. Nato smo k celicam v posamezni luknji odmerili po $500\text{ }\mu\text{l}$ pripravljenih razredčin ter jih za pol ure postavili v inkubator na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Celicam smo po preteklem času odstranili razredčine ter jim previdno dodali $200\text{ }\mu\text{l}$ $0,25\%$ raztopine tripsina v mediju HANKS, ogrete na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki smo jo pustili delovati približno dve minuti. S tem smo deloma razrahljali povezave med celicami in podlago ter med samimi celicami. Po odstranitvi tripsina smo v posamezno luknjo dodali cca. $800\text{ }\mu\text{l}$ ogretega popolnega gojišča za celice Caco-2 ter le-te previdno resuspendirali. Volumen dodanega gojišča naj bi bil po predhodnih izkušnjah primeren glede na pričakovano število celic v eni luknji (Lah, 2005b). Tako pripravljeno suspenzijo smo nato čim hitreje vklopili v tretji sloj minigela na mikroskopskih objektivih. Obenem smo vzeli nekaj suspenzije ter ugotovili viabilnost celic (poglavje 3.1.1).

Minigele za kometni test smo pripravili na enostransko peskanih mikroskopskih objektivih stekelcih. Minigeli so bili štirislojni, vsak sloj smo naredili iz agaroze z določeno

koncentracijo (agaroz je bila predhodno raztopljena v PBS pufri) in ga čimbolj enakomerno nanesti na prejšnjega.

Za prvi sloj smo uporabili 300 μ l 1% agarozo z običajno temperaturo želiranja (NMP agaroz, Sigma A-9539), katero smo s hematološko razmazovalko razmazali po hrapavi strani objektnika. Sloj se je preko noči pri sobni temperaturi posušil ter je tako tvoril primeren fizični stik med objektnikom ter ostalimi sloji agaroze. Drugi sloj – 500 μ l 0,6% NMP agaroze – smo nanesti na prvega ter ga z gladkim objektnikom enakomerno porazdelili po celotni površini. Sloj smo nekaj minut utrjevali na ledeni plošči. V tretji sloj je bilo potrebno vključiti že pripravljeno celično suspenzijo. To smo storili tako, da smo v čiste in sterilizirane stekleničke zmešali celično suspenzijo iz dveh testnih luknjic ter 0,7% agarozo z znižano temperaturo želiranja (LMP agaroz, Sigma A-9414), ogreto na 37 °C, v razmerju 8:10. Razmerje naj bi bilo ustrezno glede na pretekle izkušnje (Lah, 2005b). Uporabili smo 400 μ l mešanice in jo z novim objektnikom enakomerno poravnali po drugem sloju agaroze. Minigele smo položili na ohlajeno ploščo, prekrili z aluminijevo folijo ter počakali, da je zadnji sloj želiral. Nato smo na tretji sloj nanesti še 400 μ l 0,5% LMP agaroze, jo poravnali z novim objektnikom ter postopali kot prej. Ko je bil minigel zadostno utrjen, je bil pripravljen za alkalno lizo.

3.3.2 Postopek kometnega testa

Izhajali smo iz osnovnega postopka po Duthie s sod. (1997a). Ker se je v predhodnih poskusih izkazalo, da ima postopek nekaj šibkih točk, ki vplivajo na končno kakovost rezultatov ter ponovljivost le-teh, smo optimizirali predvsem sestavo elektroforetskega pufru ter različne čase in kombinacije elektroforeze. Pri vseh poskusih je bila vključena tako negativna kot pozitivna kontrola, katere priprava je opisana v poglavju 3.3.1.

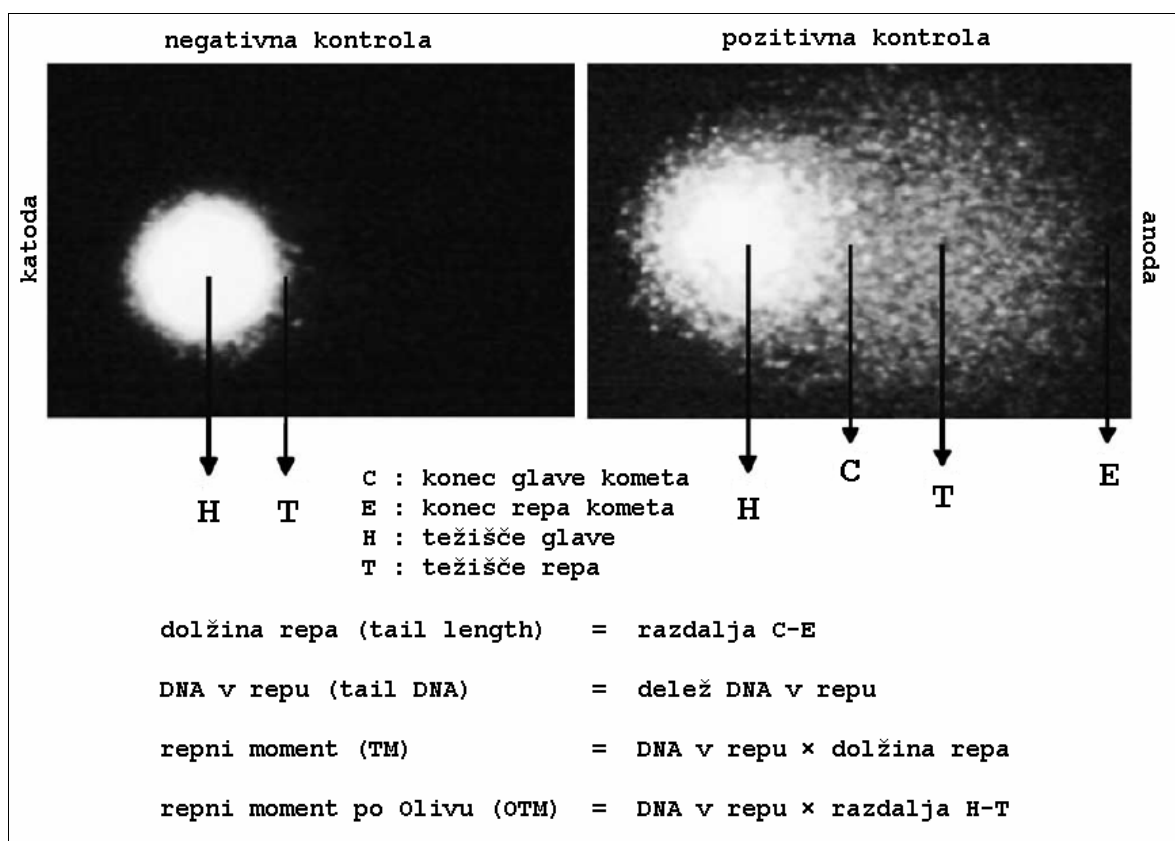
Pred samim začetkom smo pripravili založne raztopine za izvedbo kometnega testa. 1 M raztopina EDTA (etilendiamintetraocetna kislina; Merck) z vrednostjo pH 7,8 je služila lovljenju ionov Mg^{2+} in Ca^{2+} v raztopinah, ki bi sicer motili postopek. 1 M pufer Tris-HCl smo pripravili iz tris-hidroksimetilaminometana (Merck) ter s koncentrirano klorovodikovo kislino (Merck) uravnali vrednost pH na 7,5. Za pripravo elektroforetskega pufru smo potrebovali 10 M raztopino natrijevega hidroksida (Merck). Kalij-natrijev fosfatni pufer (PBS; pH=7,4) smo pripravili po standardnem postopku.

Ko so bili minigeli s celicami pripravljene, je sledila alkalna liza. Raztopino za alkalno lizo smo sveže pripravili na isti dan, kot smo izvajali kometni test, in je bila sestavljena skladno z Duthie in sod. (1997a). En liter raztopine je vseboval 2,5 M NaCl (Merck), 10mM Tris-HCl, 100mM EDTA ter 1% detergenta Triton X-100 (Sigma T-9284) v vodi Milli-Q. pH raztopine smo z NaOH uravnali na 10,0. Minigele z vzorci smo nato za eno uro potopili v hladno (4 °C) raztopino upoštevajoč, da so bili minigeli s pozitivno kontrolo v svoji posodi

in ločeni od ostalih. Z alkalno lizo smo tako odstranili celične proteine ter omogočili neovirano potovanje gole DNA v električnem polju tekom elektroforeze.

Naslednja stopnja kometnega testa je bila spiranje in hkratno odvijanje zvite DNA. Minigele smo 40 minut namakali v ohlajeni (4 °C) raztopini elektroforetskega pufra, ki smo ga dvakrat zamenjali. Sestava elektroforetskega pufra je bila takšna, kakor pri elektroforezi in je bila predmet optimizacije. Na splošno je elektroforetski pufer vseboval 1 mM EDTA ter od 80 do 300 mM NaOH, vrednost pH se je gibala med 13.10 in 13.55, pripravili pa smo ga z vodo Milli-Q.

Elektroforeza je potekala tako, da smo minigele po naključnem vrstnem redu razporedili v dveh kolonah v dveh ali treh elektroforetskih banjicah (Pharmacia GNA 200) ter zalili s hladnim elektroforetskim pufrom tako, da je le-ta segal nekaj milimetrov nad minigele. Z vklopom vira napetosti (Pharmacia EPS 601) ter nastavitvijo njegovih parametrov (načeloma 25V in 300 ali 400 mA, realno nižje) se je začelo potovanje DNA oz. njenih fragmentov v minigelih proti anodi. Elektroforezne banjice smo v tem času pokrili z aluminijevo folijo, prostor pa zatemnili.



Slika 2: Značilna slika kometa s pripadajočimi razlagami izmerjenih parametrov (Duez in sod., 2004)

Po elektroforezi smo stekelca z minigeli 15 minut previdno nevtralizirali z ohlajenim 400 mM Tris-HCl pufrom ter ga ob tem trikrat zamenjali. S tem smo odstranili sledi alkalij in detergenta, ki bi kasneje motila barvanje minigelov z etidijevim bromidom (Et-Br) (McKelvey-Martin in sod., 1993). Minigele smo barvali približno 10 minut v zatemnjenem prostoru (in po potrebi z rumeno osvetlitvijo) v posebni zaščiteni posodi (ohlajeni 400mM Tris-HCl pufer z Et-Br v koncentraciji 2 µg/ml) nakar smo jih 15-20 minut razbarvali oz. spirali s 400 mM pufrom Tris-HCl.

Ocenjevanje rezultatov kometnega testa je potekalo z napredno tehnologijo računalniškega zajema mikroskopskih slik in njihove obdelave. Z epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX50) ter nanj nameščeno digitalno kamero (Hamamatsu Orca 2) smo pri 200-kratni povečavi zajemali visokoločljive slike celičnih jeder oz. migrirane DNA, ki je bila jasno vidna zaradi ekscitacije vrinjenega Et-Br z monokromatsko zeleno svetlobo. Enota ocenjevanja je bilo eno celično jedro in le-teh smo na enem objektniku naključno ocenili približno 50, na en vzorec pa približno 150 ali 200. Celična jedra, ki so bila očitno bolj razbita kot velika večina ostalih ali pa so bila prekrivajoča, nismo upoštevali.

Program za vizualno analizo slik Komet 5 (Single cell..., 2001) je na podlagi slike enega celičnega jedra izračunal vrednosti 34-ih parametrov, s katerimi ga lahko ustrezno opišemo. Izmed teh sta najbolj verodostojna parametra delež DNA v repu ter OTM (repni moment po Olivu). Slika 2 prikazuje njun izračun.

3.3.3 Statistična analiza rezultatov kometnega testa

Podatke, pridobljene s kometnim testom, smo statistično obdelali z odprtokodnim programskim paketom R, različice 2.3.1 (R Development Core Team, 2006). Uporabili smo analizo podatkov kometnega testa, ki jo je opisal Verde in sod. (2006), in uporabljala posplošene linearne mešane modele (GLMM), natančneje, analizo preživetja. Da bi ugotovili, katera statistična porazdelitev najbolje opiše podatke iz kometnega testa (repni moment (po Olivu) in odstotek DNA v repu), smo prilegali različne porazdelitve podatkom z metodo največjega verjetja, za mero uspešnosti pa smo vzeli AIC t.j. Akaikejev informacijski kriterij. AIC ima za dani set podatkov najmanjšo vrednost pri tisti porazdelitvi, ki najbolje opiše dane podatke. V statistični model smo vključili sistematski vpliv skupine, načina pridobitve vodnih izlužkov, ponovitve ter predpostavili, da je vpliv živali naključen t.j. da živali, iz katerih smo pridobili vodne izlužke blata, prihajajo iz večje populacije, kjer lahko prihaja do naključnih odstopanj. V okviru analize preživetja se za naključni vpliv uporablja izraz *frailty*.

Podatki kometnega testa so lahko porazdeljeni po različnih statističnih porazdelitvah (Priloga C), kar lahko prikažemo na naslednji način:

OTM ~ Stat.porazdelitev(*parameter1*, *parameter2*, ...)

Prvi in najbolj informativni parameter (povprečje, lokacija, oblika...) določene statistične porazdelitve, ki se izkaže za najbolj primerno, vzamemo v nadaljnji model, ki je sledeč:

$$\log(y_{ijk}) = \mu + S_i + N_j + P_k + z_{ijkl}$$

y_{ijk} = lokacijski parameter, odvisen od posameznih vplivov

μ = logaritem približnega povprečja kontrolne skupine

S_i = logaritem relativnega vpliva i-te skupine; $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

N_j = logaritem relativnega vpliva j-tega načina ekstrakcije vodnega izlužka; $j = 1, 2$

P_k = logaritem relativnega vpliv k-te ponovitve kometnega testa; $k = 1, 2$

z_{ijkl} = naključni vpliv živali

Eksponentirane vrednosti t.j. $\exp(S_i)$, $\exp(N_j)$ in $\exp(P_k)$ so koeficienti, ki predstavljajo razmerje posameznega vpliva med preučevano in kontrolno skupino (običajno negativno kontrolo ali prvo skupino izmed več preučevanih) podatkov kometnega testa. Tako npr. vrednost koeficienta 1,3 pomeni, da vpliv i-te ($i \neq 1$) skupine posredno povzroča 1,3-krat večje poškodbe na DNA kot vpliv kontrolne ($i=1$) skupine.

Originalni podatki in skripte za statistično obdelavo se nahajajo na priloženem CD-ju.

4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA PRIPRAVE VODNIH IZLUŽKOV BLATA

Za določitev ustrezne količine vode, ki smo jo dodali vzorcem blata, smo morali ugotoviti deleže suhe snovi oz. odstotek vode v posameznem vzorcu. To smo naredili na začetku poskusov ter ob liofilizaciji vzorcev, pri katerih smo izračunali zahtevane parametre po enačbah 2 ali 3, omenjenih na strani 16. Rezultati so podani v Preglednici 3.

Preglednica 3: Vsebnost suhe snovi v posameznih vzorcih blata

Skupina	Vzorec	% suhe snovi (Enač.2) ¹	% suhe snovi (Enač. 3) ²	% vode ¹	% vode ²
Pripor	P1	26,34	28,01	73,66	71,99
	P2	24,56	25,16	75,44	74,16
	P3	34,34	36,10	65,66	63,90
-SadZel	SZ1	35,63	39,27	64,37	60,73
	SZ2	30,93	19,63 ³	69,07	80,37
	SZ3	31,84	34,52	68,16	65,48
Pripor	P	35,95	/	64,05	/
-SadZel	SZ	36,07	/	63,93	/
+Meso	M	30,84	/	69,16	/
Vegi	V	28,15	/	71,85	/

¹ Rezultat ločene ugotovitve odstotka suhe snovi vzorcev na začetku poskusa.

² Rezultat po liofilizaciji vzorcev blata.

³ Rezultat se ne sklada s pričakovanji.

Med posameznimi vzorci so precejšnje razlike in odstotki suhe snovi se gibljejo v pričakovanih intervalih.

Po večkratnih poskušanjih smo ugotovili, katere so ključne točke postopka in določili sledeči protokol kot najprimernejši za pripravo vodnih izlužkov blata, ter smo ga uporabili v vseh nadaljnjih poskusih. Postopek je natančno opisan v poglavju 3.2.

- V mikrocentrifugirke po Eppendorfu odmerimo po 0,5 g zmrznjenega homogeniziranega blata ali 0,15 g liofiliziranega blata, vsak vzorec posebej in priporočljivo v paralelkah.
- Homogeniziranemu blatu dodamo dvakratno količino vode Milli-Q, kot jo že vsebuje sam po sebi. Liofiliziranemu blatu dodamo 1 ml vode Milli-Q.
- Mikrocentrifugirke z blatom izdatno premešamo, pol ure inkubiramo v vodni kopeli pri 37 °C, ter ponovno izdatno premešamo.
- Vzorce dve uri centrifugiramo pri 29000×g in 4 °C.
- Supernatant posameznega vzorca odstranimo v nove mikrocentrifugirke, označimo in shranimo pri -20 °C.

4.2 OPTIMIZACIJA KOMETNEGA TESTA

V sklopu diplomskega dela je bilo izvedenih dvajset ponovitev kometnega testa pri katerih smo preverjali genotoksičnost vodnih izlužkov blata. Le-te smo pripravljali po različnih postopkih z namenom ugotoviti najbolj optimalno kombinacijo priprave vodnih izlužkov in izvedbe kometnega testa. Ko smo ugotovili najboljšo kombinacijo, smo pripravili vodne izlužke iz vseh izbranih vzorcev blata (Preglednica 2) po navedenih metodah (poglavje 3.2.3 in 3.2.4) ter izvedli kometni test. Na ta način smo lahko primerjali genotoksične vplive vodnih izlužkov vseh vzorcev pri enakih pogojih. Zaradi obilice podatkov ter kombinacij priprav vodnih izlužkov blata in izvedb kometnega testa, ki niso dali primerne rezultata (Slika 3, A-D, str. 25), bodo podrobneje predstavljeni le rezultati zadnjih štirih ponovitev. Te so vključevale vse vzorce vodnih izlužkov, pridobljenih z optimalnimi metodami, medtem ko so preostale ponovitve preverjale le omejen set vzorcev vodnih izlužkov blata.

Vodilo pri optimizaciji kometnega testa je bilo izvesti postopek, pri katerem bi se jasno videla razlika med negativno (Slika 3-E) in pozitivno (Slika 3-F) kontrolo ter med negativno kontrolo in vzorci vodnih izlužkov blata (če sploh obstajajo).

Ključne izboljšave kometnega testa so bile naslednje:

- Zmanjšali smo koncentracijo NaOH v elektroforetskem pufri s 300 mM na 150 do 250 mM ter hkrati skrajšali čas poteka elektroforeze z nad 30 minut na 15 do 25 minut. Koncentracija NaOH in čas elektroforeze sta medsebojno odvisna – manjša koncentracija, krajši čas in obratno. Priporočljivo razmerje med njima je 10:1 (mM:min).
- S pravilno povezavo napajalnikov in elektroforeznih banjic ter ustreznim volumnom elektroforetskega pufra smo zagotovili primerno napetost in tok med izvajanjem elektroforeze in posledično pridobili kakovostne slike jedrne DNA.
- Pokazali smo, da je naključno razporejanje minigelov v elektroforezne banjice ter popolna napolnitev le-teh ne vplivata bistveno na rezultate kometnega testa.

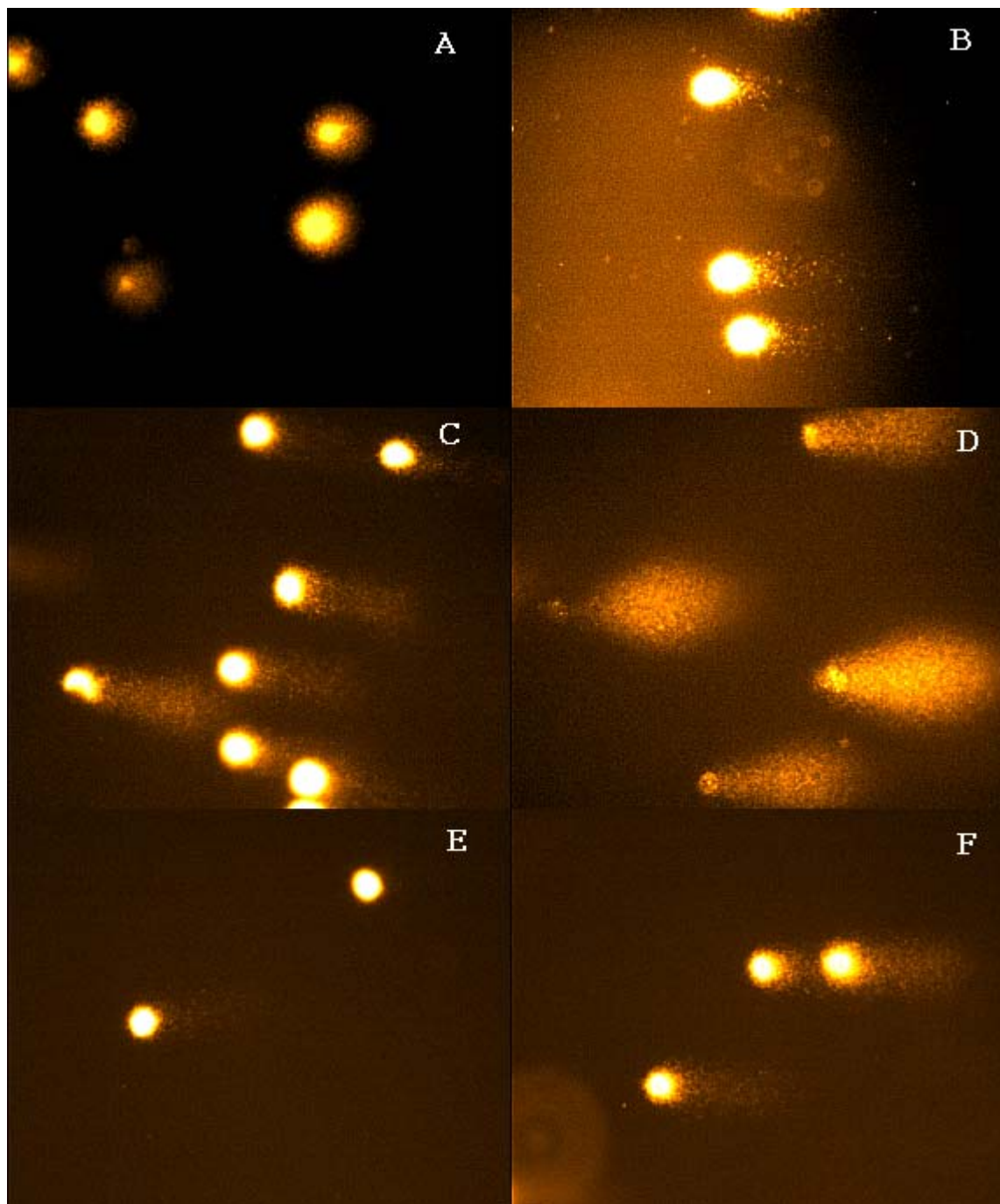
Optimizirani postopek kometnega testa je sicer natančneje opisan v poglavju 3.3.

4.3 GENOTOKSIČNOST VODNIH IZLUŽKOV BLATA

4.3.1 Izbira vzorcev

Vodne izlužke blata smo pripravili iz vzorcev blata po metodah 3.2.3 in 3.2.4 ter analizirali s kometnim testom, opisanim v poglavju 3.3.2. Izvedli smo dve ponovitvi z istimi izlužki. Redčitve vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata so bile v obeh ponovitvah enake, pri vzorcih iz liofiliziranega blata pa smo drugo ponovitev pripravili z redkejšimi redčinami

(enaka koncentracija vodnega izlužka tako iz liofiliziranega blata kakor tudi iz homogeniziranega blata). Na ta način smo preverili, ali prihaja do razlik med obema načinoma priprave vodnih izlužkov.



Slika 3: Tipične slike neustreznih (A-D) in ustreznih (E-F) slik jedrne DNA

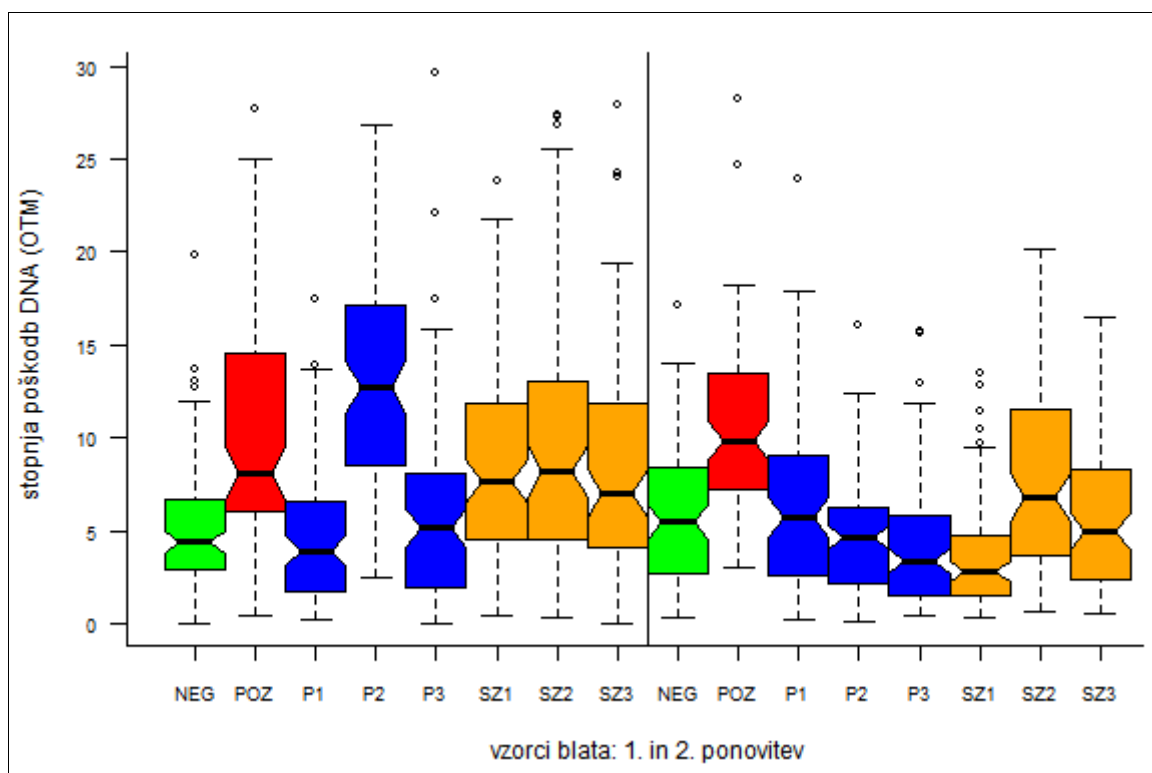
Na slikah 4 in 5 so predstavljeni rezultati, ki smo jih statistično analizirali. V preglednicah 4 in 5 sta v ločenih vrsticah vključeni obe ponovitvi kometnega testa s pripadajočimi podatki. Opisna statistika zajema število ocenjenih kometov pri posamezni skupini in mediano ključnih parametrov s standardno napako. Enostavni pregled porazdelitve podatkov je podan z okvirji z ročaji (*boxplots*). Posamezni okvir predstavlja interval, v katerem leži polovica vseh podatkov tj. polovica vseh vrednosti repnih momentov po Olivu ali %DNA v repu pri določenem vzorcu. Srednja odebeljena črta predstavlja mediano. Ročaj predstavlja območje, v katerem ležijo vrednosti, ki še niso osamelci (krogci), in predstavlja največ 1,5-kratnik zgornjega intervala tj. medkvartilnega intervala. Zožitev oz. zarez okvirja v območju mediane predstavlja območje ocene intervala zaupanja le-te. V primeru, da se zarezi dveh okvirjev z ročaji ne prekrivata, je to močan dokaz (~95% verjetnost), da se mediani statistično značilno razlikujeta, kot je vidno npr. ob primerjavi vzorcev NEG in POZ na Sliki 4.

Preglednica 4: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri vzorcih vodnih izlužkov, pripravljenih iz homogeniziranega blata

	Vzorec	Število analiziranih kometov	OTM		%DNA v repu		
			Me	SD	Me	SD	
	Neg. Kontrola (gojišče)	93	4,39	3,44	15,65	9,00	
		172	3,34	3,57	11,89	7,93	
	Poz. Kontrola (EMS)	94	8,53	7,32	29,32	13,18	
		174	10,62	11,03	27,45	10,16	
	Pripor	P1	131	4,77	3,65	15,86	10,13
			104	5,70	4,27	13,05	9,30
P2		200	9,02	6,88	24,49	12,51	
		159	3,71	3,07	12,54	8,03	
P3		87	4,72	5,53	15,67	11,02	
		102	3,90	3,39	14,52	8,43	
-SadZel	SZ1	151	7,51	5,58	19,53	11,52	
		170	3,63	3,97	12,31	8,44	
	SZ2	136	8,01	7,07	19,52	11,49	
		200	5,34	4,42	14,82	8,24	
	SZ3	151	6,96	5,53	19,88	11,70	
		160	5,35	4,38	14,56	8,51	

Legenda: Me, mediana; SD, standardna deviacija

Pripor, -SadZel – prehranski skupini prašičev



Slika 4: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata

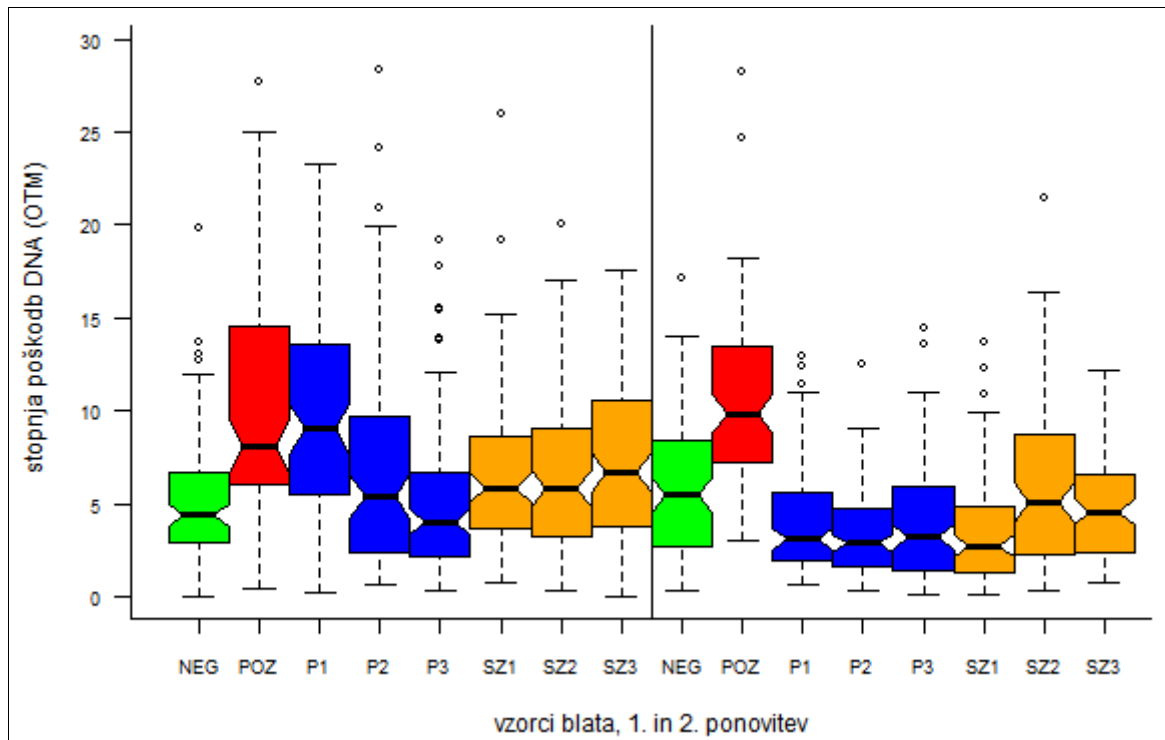
Legenda: NEG, negativna kontrola (gojišče); POZ, pozitivna kontrola (EMS);

P1, P2, P3, SZ1, SZ2, SZ3 – oznake vzorcev vodnih izlužkov

Preglednica 5: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri vzorcih vodnih izlužkov, pripravljenih iz liofiliziranih vzorcev blata

	Vzorec	Število analiziranih kometov	OTM		%DNA v repu	
			Me	SD	Me	SD
	Neg. Kontrola (gojišče)	93	4,39	3,44	15,65	9,00
		172	3,34	3,57	11,89	7,93
	Poz. Kontrola (EMS)	94	8,53	7,32	29,32	13,18
		174	10,62	11,03	27,45	10,16
Pripor	P1	51	9,00	5,95	26,20	19,00
		70	3,06	3,06	13,52	9,05
	P2	158	5,37	5,93	17,66	11,99
		161	2,72	2,90	11,31	8,84
	P3	200	5,49	4,60	17,79	11,47
		100	3,31	3,15	10,07	8,52
-SadZel	SZ1	141	5,47	4,84	16,27	10,87
		171	2,75	2,59	9,99	7,27
	SZ2	155	5,91	4,16	17,27	10,77
		161	4,01	3,92	13,79	8,41
	SZ3	159	6,33	4,40	17,05	10,08
		163	4,52	3,38	13,93	9,60

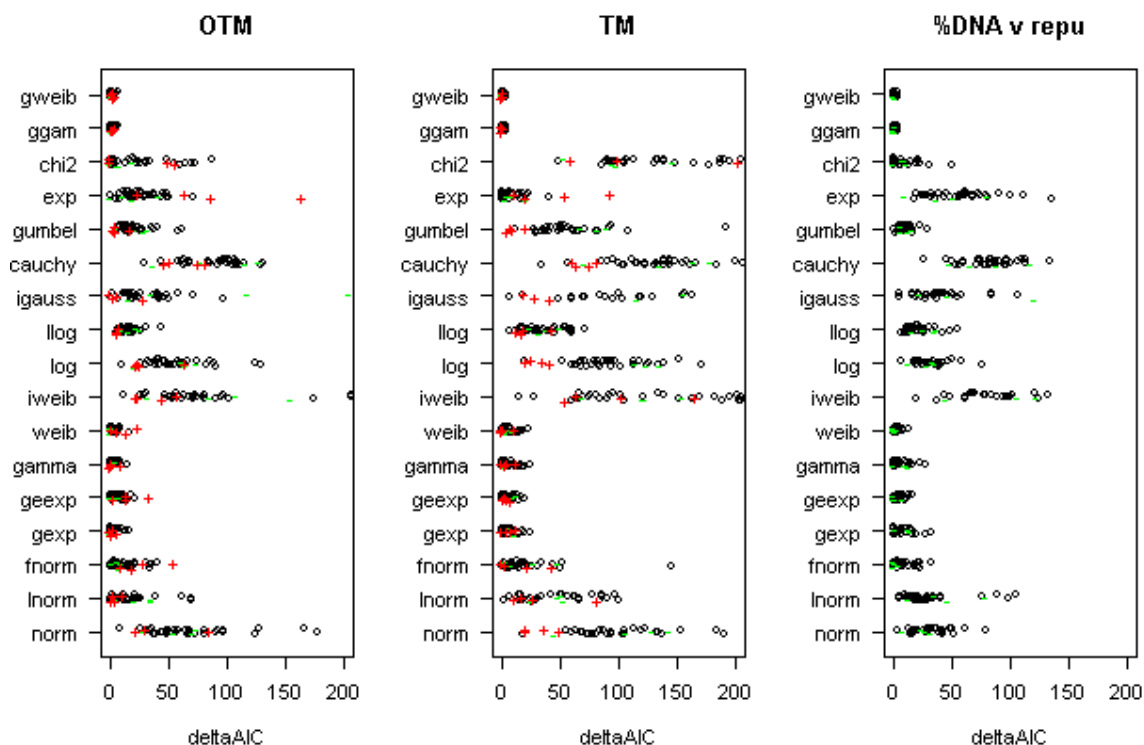
Legenda: kot v Preglednici 4.



Slika 5: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata
 Legenda: kot na Sliki 4.

4.3.2 Ugotovitev najbolj primerne statistične porazdelitve podatkov

Na sliki 6 smo prikazali, katera statistična porazdelitev je najboljša za opis določenega parametra kometnega testa. Preverjali smo vse tri parametre, ki se pojavljajo v literaturi – OTM, TM in %DNA v repu. Nabor statističnih porazdelitev je zajemal vse najbolj pogoste in znane porazdelitve, poseben poudarek je bil na nesimetričnih porazdelitvah, glede na to, da je bilo očitno, da podatki niso porazdeljeni normalno. Vsaka točka na sliki 6 predstavlja en set podatkov. Bolj kot so točke nagnetene blizu ničle, bolj natančno je določena porazdelitev zmožna opisati različne podatke. To še posebej velja za generalizirano gamo in generaliziranega Weibulla – ti dve porazdelitvi se očitno razlikujeta od ostalih, saj sta 3-parametrični in zato zmožni prilagoditi se še tako raznovrstnim podatkom. Od preostalih pa se izkažejo kot primerne še navadna Weibullova porazdelitve, porazdelitev gamma ter razširjeni eksponentni porazdelitvi.



Slika 6: Prikaz uspešnosti prilagajanja statističnih porazdelitev setom podatkov

Legenda: OTM, TM, %DNA v repu – parameter posameznega seta podatkov

deltaAIC – razlika v vrednosti AIC med izbrano porazdelitvijo ter najbolj prilegajočo

o, -, +: seti podatkov (vzorci, negativne kontrole, pozitivne kontrole)

preizkušane statistične porazdelitve: norm – normalna, lnorm – lognormalna, fnorm – zvita normalna, gexp – generalizirana eksponentna, geexp – geometrična ekstremna eksponentna, gamma – gama, weib – Weibullova, iweib – inverzna Weibullova, log – logistična, llog – loglogistična, igauss – inverzna normalna, cauchy – Cauchy, gumbel – Gumbel, exp – eksponentna, chi2 – hi^2 (χ^2), ggam – generalizirana gama, gweib – generalizirana Weibullova; (Priloga C)

4.3.3 Izračun razmerij v genotoksičnosti vodnih izlužkov

Na začetku smo najprej preverili, ali sta ponovitvi kometnega testa med sabo primerljivi tj. da ne obstaja statistično značilni vpliv ponovitve. Tako smo v modelu upoštevali le negativni in pozitivni kontroli ter preverjali vpliv ponovitve. Če bi bila izvedba kometnega testa bistveno drugačna, bi se to poznalo na rezultatu. Izkaže se, da razlika med ponovitvama (gledano izključno kontroli) ni statistično značilna ($p=0,31$), vendar so bile vrednosti OTM v drugi ponovitvi kometnega testa v povprečju za 6% nižje kot v prvi.

4.3.3.1 Vzorci vodnih izlužkov iz homogeniziranega blata (poglavje 3.2.3)

Preglednica 6: Vplivi prehranskih skupin na genotoksičnost vodnih izlužkov, pridobljenih iz homogeniziranega blata

Primerjava oz. vpliv	OTM		TM		%DNA v repu	
	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.
Pripor:NEG	1.22 (0.99, 1.50)	ns	1.27 (1.01, 1.60)	ns	1.16 (1.07, 1.25)	•
-SadZel:NEG	1.40 (1.14, 1.72)	ns	1,45 (1.15, 1.82)	ns	1.20 (1.11, 1.29)	*
POZ:NEG	2.23 (1.73, 2.88)	**	2.71 (2.04, 3.59)	***	2.00 (1.81, 2.20)	***
-SadZel:Pripor	1.15 (0.95, 1.41)	ns	1.14 (0.91, 1.42)	ns	1.04 (0.98, 1.10)	ns
POZ:Pripor	1.85 (1.40, 2.44)	*	2.14 (1.56, 2.92)	*	1.73 (1.59, 1.88)	***
Ponovitev	0.71 (0.69, 0.73)	***	0.89 (0.86, 0.93)	**	0.74 (0.73, 0.76)	***
Živali	/	ns	/	*	/	•

Legenda: razmerje je podano s 95% intervalom zaupanja

OTM, TM, %DNA v repu – parametri kometnega testa

NEG, negativna kontrola; POZ, pozitivna kontrola

Pripor, -SadZel – prehranski skupini

s.z. – statistična značilnost:

je razlika: • ($p < 0,1$); * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$)

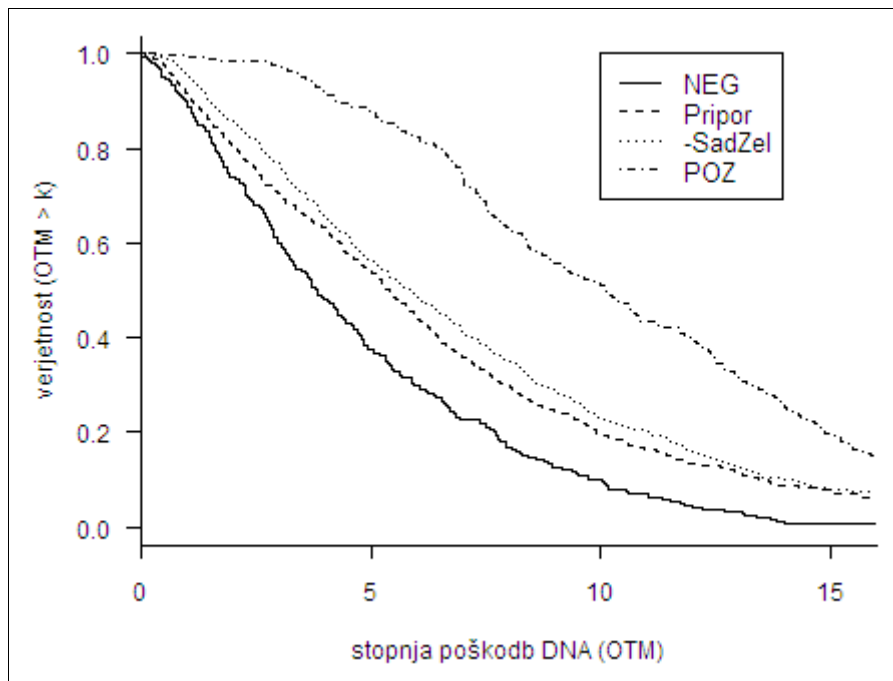
ni razlike: ns ($p > 0,1$)

V Preglednici 6 so zbrani rezultati primerjave genotoksičnosti vodnih izlužkov blata prašičev iz posameznih prehranskih skupin z negativno kontrolo v kometnem testu in med seboj. Prav tako smo ugotovili vpliv ponovitve kometnega testa ter vpliv variabilnosti živali na genotoksičnost vzorcev.

Dobljene številke oz. razmerja so multiplikativne narave ter predstavljajo povprečno razmerje v stopnji poškodb DNA relativno na negativno kontrolo prve ponovitve kometnega testa ali na genotoksičnost vzorca blata živali s priporočeno prehrano. Vrednost nad 1 pomeni, da ima vpliv pozitivni genotoksični učinek na tarčne celice, vrednost med 0 in 1, da ima negativni učinek. Tako npr. vidimo, da so vzorci vodnih izlužkov iz blata živali skupine "Pripor" v povprečju za 22% oz. 1,22-krat bolj genotoksični za celice Caco-2 kot je genotoksično gojišče. Vpliv krme brez sadja in zelenjave je opazen pri vseh merjenih parametrih – genotoksičnost vodnih izlužkov iz blata skupine "-SadZel" je večja glede na primerjani skupini, čeprav ni statistično značilna. Rezultati druge ponovitve testa kažejo na manjše poškodbe DNA na celicah ne glede na izvor vodnega izlužka.

Slika 7 predstavlja nov koncept predstavljanja podatkov kometnega testa. S krivuljami ponazorimo verjetnosti, koliko ocenjevanih kometov ima večje poškodbe kot je izbrana vrednost parametra OTM. Krivulja, ki leži bolj zgoraj, predstavlja vpliv, ki povzroča na celicah večjo verjetnost za genotoksične poškodbe. Tako npr. pri negativni kontroli vidimo, da obstaja cca. 10% verjetnost, da bomo pri ocenjevanju kometov dobili vrednosti repnega momenta po Olivu, ki so večje od 10. V primeru pozitivne kontrole je ta verjetnost ~50%, kar jasno kaže na večjo verjetnost poškodb DNA zaradi delovanja EMS. Če primerjamo preučevani prehranski skupini med seboj, opazimo večjo verjetnost poškodb pri skupini "-SadZel". S tem smo pokazali, da vodni izlužki blata živali, krmljenih s

nepriporočeno krmo, povzročajo na celice Caco-2 v povprečju večjo verjetnost za poškodbe kot pa vodni izlužki iz blata živali s priporočeno prehrano. Razlika med njima obstaja, saj sta krivulji vseskozi ločeni.



Slika 7: Krivulje verjetnosti večjih poškodb celic (homogenizirano blato)

Legenda: NEG, negativna kontrola; POZ, pozitivna kontrola

Pripor, -SadZel – prehranski skupini

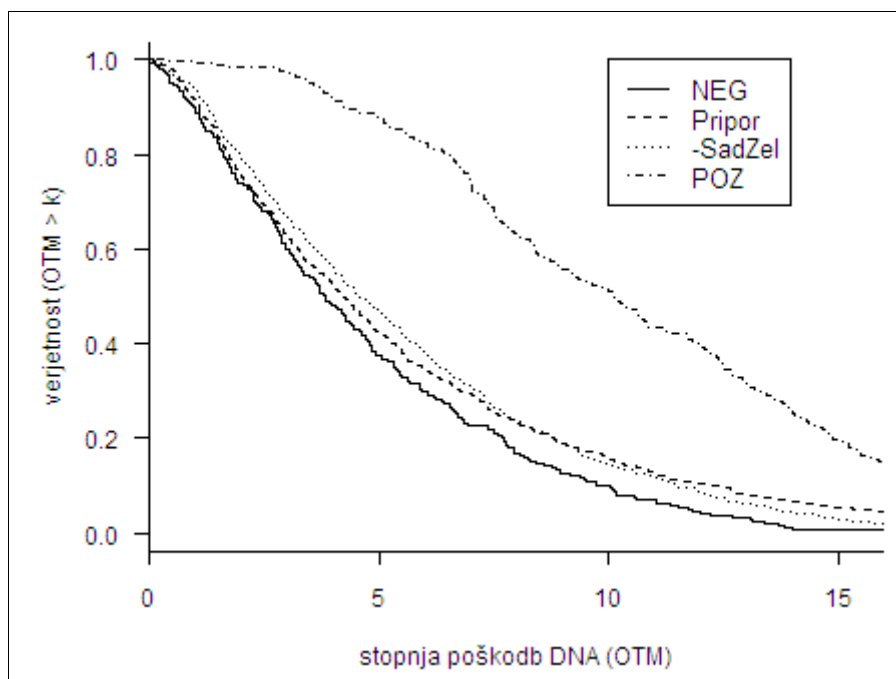
4.3.3.2 Vzorci vodnih izlužkov iz liofiliziranega blata (poglavje 3.2.4)

Rezultati v Preglednici 7 kažejo, da vodni izlužki iz liofiliziranega blata nimajo statistično značilno večje genotoksičnosti na celice Caco-2 kot jo ima samo gojišče. Prav tako vpliv krme brez sadja in zelenjave na genotoksičnost vodnih izlužkov ni opazen.

Preglednica 7: Vplivi prehranskih skupin na genotoksičnost vodnih izlužkov, pridobljenih iz liofiliziranega blata

Primerjava oz.vpliv	OTM		TM		%DNA v repu	
	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.
Pripor:NEG	1.06 (0.95, 1.19)	ns	1.20 (1.05, 1.36)	ns	1.16 (1.06, 1.27)	•
-SadZel:NEG	1.07 (0.96, 1.19)	ns	1.18 (1.05, 1.34)	ns	1.09 (0.99, 1.19)	ns
POZ:NEG	2.24 (1.95, 2.56)	***	2.72 (2.34, 3.17)	***	2.01 (1.80, 2.24)	***
-SadZel:Pripor	1.01 (0.93, 1.10)	ns	0.99 (0.90, 1.09)	ns	0.94 (0.88, 1.00)	ns
POZ:Pripor	2.13 (1.89, 2.41)	***	2.29 (2.00, 2.61)	***	1.73 (1.58, 1.90)	***
Ponovitev	0.66 (0.64, 0.68)	***	0.83 (0.80, 0.87)	***	0.76 (0.74, 0.78)	***
Živali	/	*	/	*	/	*

Legenda: kot pri Preglednici 6



Slika 8: Krivulje verjetnost večjih poškodb celic (liofilizirano blato)

Legenda: kot na Sliki 7

To lahko potrdimo tudi s Sliko 8, kjer krivulji vplivov skupin "Pripor" in "-SadZel" nista bistveno oddaljeni od krivulje negativne kontrole niti nista ločeni, kar kaže na šibko genotoksičnost omenjenih vzorcev.

4.3.3.3 Razširjeni statistični model

Statistični model lahko razširimo in vanj vključimo vse tri parametre – vpliv skupine (obe kontroli in preučevani skupini), ponovitve (dve ponovitvi) ter načina priprave vzorcev vodnih izlužkov blata (običajna homogenizacija ali liofilizacija). Rezultati so prikazani v Preglednici 8.

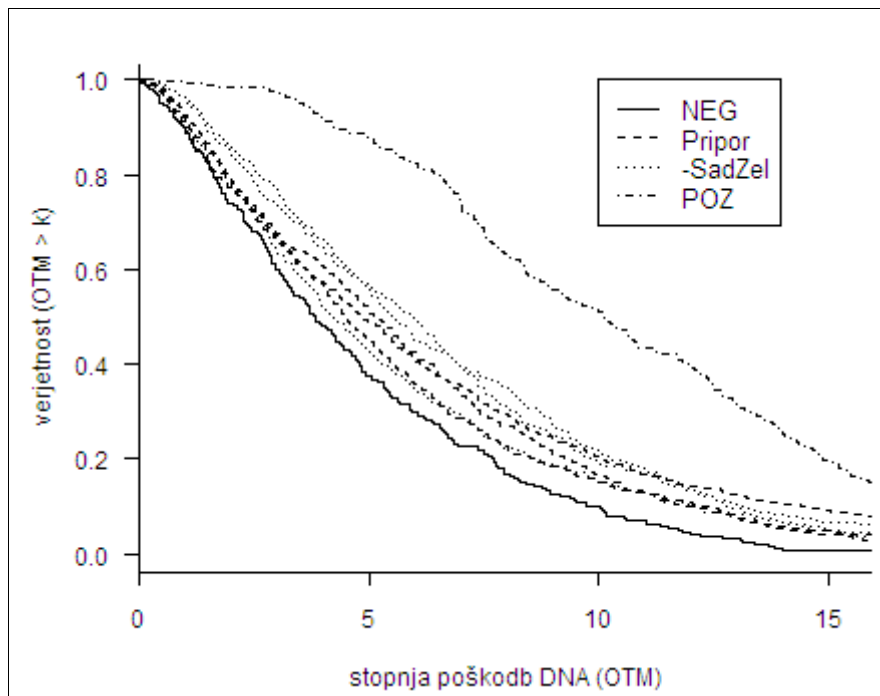
Preglednica 8: Vplivi prehranskih skupin, ponovitve kometnega testa ter načina priprave vodnega izlužka na genotoksičnost vodnih izlužkov

Primerjava oz. vpliv	OTM		TM		%DNA v repu	
	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.
Pripor:NEG	1.25 (1.14, 1.37)	*	1.32 (1.18, 1.49)	*	1.19 (1.12, 1.26)	**
-SadZel:NEG	1.35 (1.23, 1.48)	**	1.40 (1.25, 1.57)	**	1.18 (1.11, 1.25)	**
POZ:NEG	2.24 (1.99, 2.51)	***	2.73 (2.36, 3.15)	***	2.01 (1.86, 2.17)	***
-SadZel:Pripor	1.08 (0.96, 1.23)	ns	1.06 (0.98, 1.15)	ns	0.99 (0.95, 1.03)	ns
POZ:Pripor	1.81 (1.51, 2.16)	**	2.07 (1.83, 2.34)	***	1.69 (1.59, 1.80)	***
Ponovitev	0.65 (0.64, 0.67)	***	0.82 (0.79, 0.85)	***	0.73 (0.72, 0.75)	***
Liofilizacija	0.81 (0.79, 0.83)	***	0.86 (0.84, 0.89)	***	0.93 (0.91, 0.95)	***
Žival	/	*	/	**	/	•

Legenda: kot pri Preglednici 6

V tem primeru pridobimo bolj celostne rezultate. Vpliva skupin "Pripor" in "-SadZel" se bolj ali manj statistično značilno razlikujeta od negativne kontrole pri vseh merjenih parametrih. Genotoksičnost vodnih izlužkov blata živali iz obeh skupin je torej večja kot genotoksičnost gojišča za celice Caco-2. Vodni izlužki iz liofiliziranega blata povzročajo manjše poškodbe DNA na tarčnih celicah kot vodni izlužki iz homogeniziranega blata. Prav tako rezultati druge ponovitve kometnega testa kažejo na manjše poškodbe DNA na celicah Caco-2.

Vpliv živali je opazen in statistično značilen, zato so intervali zaupanja za posamezna razmerja široki. Variabilnost vplivov živali lahko prikažemo na Sliki 9, kjer vsaka krivulja znotraj določene skupine predstavlja posamezno žival. Vidimo, da krivulje znotraj ene skupine ne sovpadajo ter da se krivulje med skupinama deloma prepletajo.



Slika 9: Prikaz variabilnosti živali znotraj določene prehranske skupine

Legenda: kot na Sliki 7

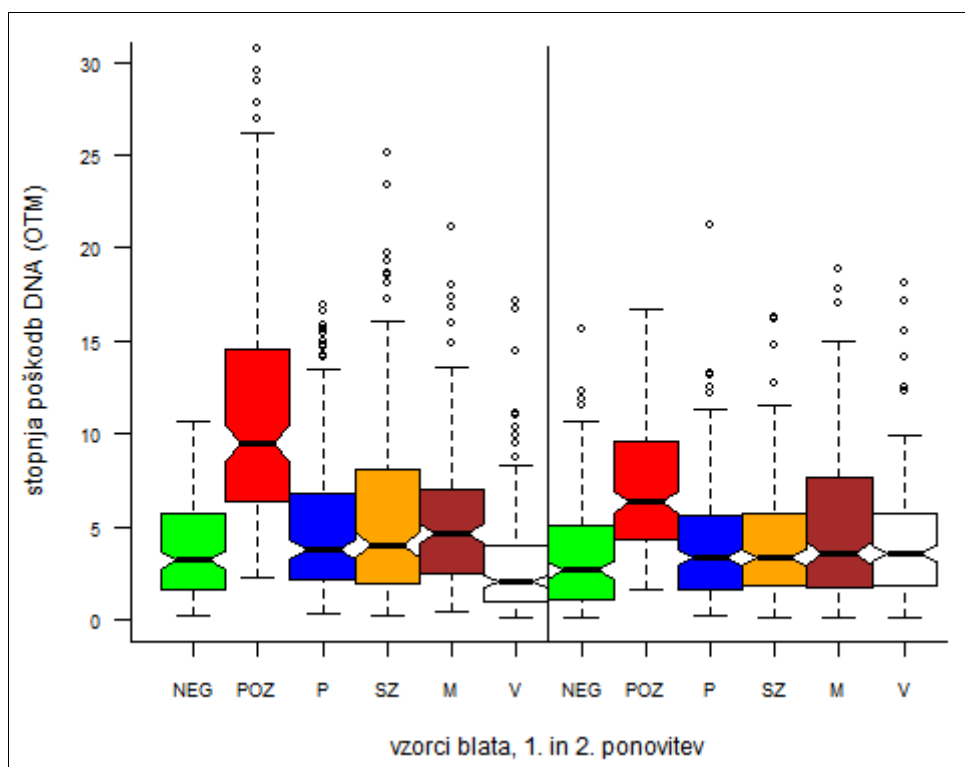
4.3.4 Potrditveni poskus s sveže pripravljenimi vzorci

Za potrditev celotnega postopka smo izbrali nove vzorce blata, pripravili vodne izlužke po opisani metodi s homogenizacijo (poglavje 3.2.3) ter izvedli kometni test s ponovitvijo. V tem primeru smo vzeli štiri skupine in iz vsake skupine le po en vzorec (poglavje 3.2.2) tako, da variabilnost med živali odpade. Opisna statistika pridobljenih podatkov kometnega testa je podana v Preglednici 9, njihov grafični prikaz pa na sliki 10.

Preglednica 9: Opisna statistika za poškodbe jedrne DNA pri sveže pripravljenih vzorcih

	Vzorec	Število analiziranih kometov	OTM		%DNA v repu	
			Me	SD	Me	SD
	Neg. kontrola (gojišče)	194	3,18	2,56	12,72	7,61
		101	2,61	3,29	10,17	8,31
	Poz. kontrola (EMS)	170	9,34	7,36	28,99	11,98
		102	6,37	3,90	22,52	10,16
Pripor	P	200	3,70	3,74	13,34	8,50
		180	3,28	3,15	11,45	8,70
-SadZel	SZ	201	3,92	5,89	14,81	11,69
		161	3,40	3,17	12,23	8,58
+Meso	M	196	4,64	3,67	15,24	8,82
		160	3,44	4,21	14,36	10,46
Vegi	V	195	2,03	2,84	8,73	8,53
		176	3,45	3,20	11,41	8,89

Legenda: kot pri Preglednici 4.



Slika 10: Porazdelitev vrednosti OTM vzorcev vodnih izlužkov iz sveže pripravljenih vzorcev blata

Legenda: NEG, negativna kontrola (gojišče); POZ, pozitivna kontrola (EMS);

P, SZ, M, V – oznake vzorcev vodnih izlužkov

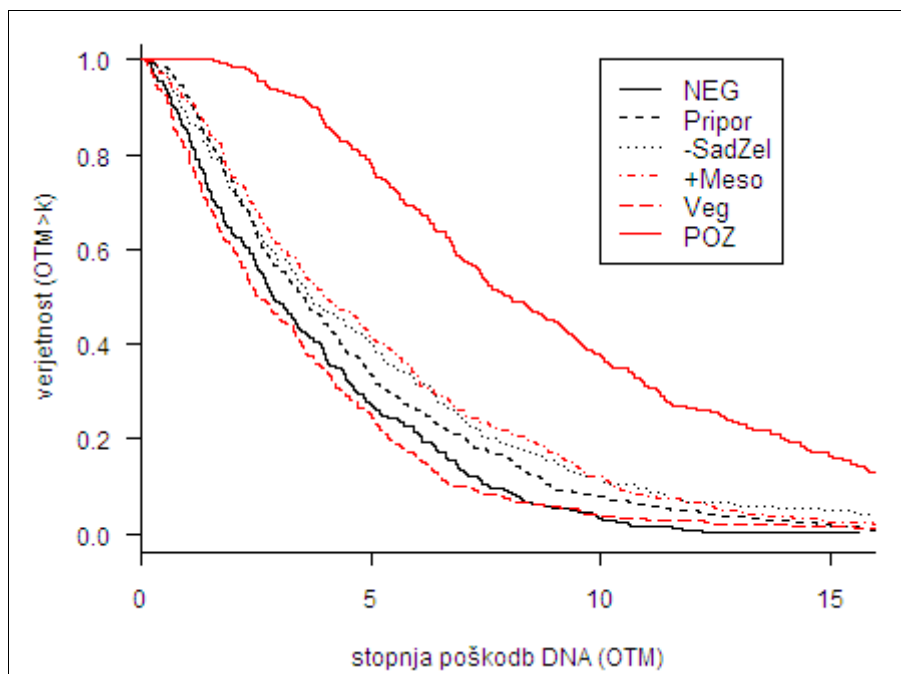
V Preglednici 10 vidimo, da imajo vodni izlužki iz blata skupin "Pripor", "-SadZel" in "+Meso" večje genotoksične učinke na celice Caco-2 kot samo gojišče za celice – razmerja so povsod nad 1. Razlika je pri vseh parametrih statistično značilna. Genotoksičnost

vodnega izlužka iz blata prašiča z vegetarijansko krmo se statistično ne razlikuje od genotoksičnosti negativne kontrole. Če primerjamo prehranske skupine glede na skupino "Pripor" vidimo, da obstajajo razlike med njimi. Tako ima krma brez sadja in zelenjave za posledico večjo genotoksičnost vodnega izlužka blata kakor krma z dvakratno količino pečenega pustega mesa. Razlike lahko vidimo tudi na Sliki 11, kjer opazimo, da krivulja za vegetarijansko skupino poteka celo pod krivuljo skupine s priporočeno prehrano.

Preglednica 10: Vplivi prehranskih skupin in ponovitve kometnega testa na genotoksičnost sveže pripravljenih vodnih izlužkov

Primerjava oz. vpliv	OTM		TM		%DNA v repu	
	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.	razmerje	s.z.
Pripor:NEG	1.23 (1.16, 1.31)	***	1.30 (1.20, 1.41)	**	1.12 (1.07, 1.17)	*
-SadZel:NEG	1.44 (1.36, 1.53)	***	1.49 (1.37, 1.62)	***	1.25 (1.19, 1.31)	***
+Meso:NEG	1.41 (1.32, 1.49)	***	1.42 (1.31, 1.54)	***	1.25 (1.19, 1.31)	***
Vegi:NEG	0.99 (0.93, 1.05)	ns	0.97 (0.89, 1.05)	ns	1.01 (0.96, 1.06)	ns
POZ:NEG	2.58 (2.42, 2.75)	***	2.86 (2.63, 3.12)	***	2.05 (1.95, 2.16)	***
-SadZel:Pripor	1.17 (1.10, 1.24)	**	1.15 (1.06, 1.24)	•	1.12 (1.07, 1.17)	*
+Meso:Pripor	1.14 (1.08, 1.21)	*	1.09 (1.01, 1.18)	ns	1.12 (1.07, 1.17)	*
Vegi:Pripor	0.81 (0.76, 0.85)	***	0.75 (0.69, 0.80)	***	0.90 (0.86, 0.94)	*
POZ:Pripor	2.09 (1.97, 2.22)	***	2.20 (2.06, 2.38)	***	1.84 (1.75, 1.93)	***
Ponovitev	0.89 (0.86, 0.93)	**	0.84 (0.80, 0.88)	***	0.93 (0.91, 0.96)	*

Legenda: kot pri Preglednici 6



Slika 11: Krivulje verjetnosti večjih poškodb celic (sveže pripravljene vzorci)

Legenda: NEG, negativna kontrola; POZ, pozitivna kontrola

Pripor, -SadZel, +Meso, Veg – prehranske skupine

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V današnjem času je "toksičnost" zelo popularna beseda in jo lahko pogosto zasledimo v medijih in znanstveni literaturi. Raziskovalci so prišli do spoznanj, da mnoge snovi oz. kemikalije, ki nas obdajajo v sodobnem svetu, niso neškodljive. Tako je znano, da ftalati, teflon, bromirani zaviralci gorenja, umetno sintetizirani parfumi ter kopica raznovrstnih plastičnih mas na dolgi rok lahko povzročajo resne motnje v delovanju pomembnih notranjih organov, neozdravljive toksikoze, ali povzročajo težave pri reprodukciji. Vsem tem snovem se je možno v veliki meri izogniti s treznim premislekom, poznavanjem njihove škodljivosti in ustreznim ukrepanjem (Generations X, 2005). Večje težave so s pitno vodo in njeno potencialno (geno)toksičnostjo. V zadnjem času je v Sloveniji o pitni vodi veliko govora s strani različnih poznavalcev problematike. Lah in sod. (2005a) so tako pokazali, da pitna voda v Ljubljani v večini zajetij nima genotoksičnega potenciala. Prav tako so drugi raziskovalci preverjali genotoksičnost ustekleničene vode z *Alium* testom, kjer so dobili precej variabilne rezultate. Vsem tem raziskavam je skupno to, da je težko točno in natančno ugotoviti stopnjo genotoksičnosti določenega vzorca, potrebno je uporabljati napredne metode za statistično analizo rezultatov, napake pa so običajno velike.

Poleg varne pitne vode je zdrava in varna hrana neobhodno potrebna za zagotavljanje človekovega zdravja. Z njo se srečujemo vsak dan, daje nam energijo in gradnike za rast in obnovo telesa ter nam omogoča raznovrstna zadovoljstva. Ker prebavni sistem človeka ne deluje s stodontnim izkoristkom, se odvečni produkti prebave izločijo iz telesa kot blato oz. feces, katerega prostornina v celotnem življenju znaša več kubičnih metrov (izračunano po podatkih iz *Eco SanRes guidelines...* (2005)). Sluznica tankega in debelega črevesa je ves ta čas v stiku s kompleksno mešanico odpadnih snovi in se mora neprestano obnavljati, da lahko učinkovito opravlja svojo vlogo. Če zaradi kakršnihkoli vzrokov odpove, lahko pride do nastanka zapletenih seps in posledično celo smrti osebe (Guarner in Malagelada, 2003). Pomembno vlogo igra tudi kopičenje poškodb dednega materiala v celicah, ki so v neposrednem stiku z blatom oz. vodno fazo le-tega. Popravljalni mehanizmi v celicah so sicer zelo učinkoviti in zanesljivi, vendar lahko zaradi delovanja določenih snovi spregledajo napake v DNA. De Kok in van Maanen (2000) sta povzela znanje na tem področju in ugotovila, da obstaja v blatu najmanj pet različnih razredov mutagenov, ki so povezani s tveganjem nastanka raka na debelem črevesu. Heterociklični aromatski amini (HCA) in policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH) so večinoma zunanjsega izvora in izvirajo iz živil, ki so bila podvržena pirolizi (npr. preveč pečeno ali dimljeno meso). Nasprotno so *N*-nitroso spojine, fekapenteni in žolčne kisline notranjega izvora.

Vendar niso vse spojine, ki so posledica metabolnih dogajanj v črevesju, škodljive. Butirat, ki je posledica fermentacije ogljikovih hidratov, na primer izraža varovalno vlogo na celice epitelija. Poleg tega, da služi kot vir energije za kolonocite, ima ključno vlogo pri nadzoru diferenciacije (posredno prek nadzora genske ekspresije), rasti celic debelega črevesa in imel naj bi pozitivno vlogo pri popravljanju DNA (Cummings, 1997). Znano je, da je v študijah *in vivo* luminalna koncentracija butirata obratno povezana z velikostjo induciranih

tumorjev. Vplivi butirata na celice so sicer kompleksni in si lahko nasprotujejo pri normalnih in transformiranih celičnih linijah – obstaja t.i "paradoks butirata". Tovrstno tematiko so preučevali v številnih študijah, ki opisujejo njegovo vlogo (Cummings, 1997; Gibson in sod., 1999; Pryde in sod., 2002; Dzierżewicz in sod., 2002) in vlogo butirata pri pojavljanju kolorektalnih malignomov (Pouillart, 1998). Bakterije v debelem črevesu sintetizirajo tudi druge kratkoverižne maščobne kisline v večjih koncentracijah (acetat, propionat), ki prispevajo k energijski bilanci gostitelja, spodbujajo vsrkavanje vode in natrijevih ionov iz lumna črevesa, zavirajo rast nekaj vrst patogenih bakterij (pri prašičih sta to *Escherichia coli* in *Clostridium difficile*), spodbujajo nastanek imunskih faktorjev, kot so imunoglobulini in dejavniki vnetja in pripomorejo k vzpostavljanju/ohranjanju ustreznih fiziološko-kemijskih pogojev v črevesju (Topping in Clifton, 2001; Guarner in Malagelada, 2003; Montagne in sod., 2003; Whitney, 2005).

Z metodami *in vitro* lahko hitreje in ceneje preučujemo vpliv blata oz. vodnih izlužkov blata in s tem genotoksične poškodbe na tarčnih celicah. Cilj te diplomske naloge je torej bil čim boljša optimizacija priprave vodnih izlužkov blata ter nadaljnja analiza le-teh s kometnim testom. Pri tem smo imeli nemalo tehničnih težav, ki smo jih uspešno reševali s številnimi poskušnji.

Že pri pripravi vodnih izlužkov blata so se pojavljale težave. Iz pregleda literature je bilo jasno, da bodo potrebne velike hitrosti centrifugiranja in dolgi časi, vendar smo menili, da bomo z razredčevanjem blata z vodo Milli-Q uspeli pri nižjih hitrostih pridobiti dovolj veliko količino vodnega izlužka za nadaljnjo analizo. Žal temu ni bilo tako. Vzorci blata so bili shranjeni pri -70 °C že več kot dve leti, preden smo začeli s poskusom. Najprej je bilo potrebno ugotoviti deleže suhe snovi v posameznem vzorcu blata, kar smo storili po opisanem postopku. Rezultati (Preglednica 3) kažejo na veliko variabilnost v odstotkih suhe snovi med vzorci tako med seboj kakor med skupinami. Običajno je odstotek suhe snovi znašal nad 30%, kar se sklada s pričakovanji. Kljub temu nismo mogli pripraviti vodnih izlužkov neposredno iz samega blata, kakor so to počeli drugi raziskovalci. Za to nismo imeli na voljo dovolj zmogljive centrifuge, vendar ni nujno, da bi bili s hitrejšo kaj bolj uspešni (problem vezane vode). Primerjava deležev suhe snovi, ki smo jih izračunali na podlagi ločenih metod kaže, da pri petih vzorcih blata od šestih po liofilizaciji ostane v blatu več suhe snovi kot pri metodi s sušenjem pri povišani temperaturi. Razlog za to se verjetno skriva v tem, da pri nizki temperaturi in tlaku v liofilizatorju ne sublimirajo vse tiste hlapne in/ali tekoče sestavine blata (vključno z vodo), ki jih sicer izzene visoka temperatura. Kljub temu iz Preglednice 3 vidimo, da imajo živali iz skupine s priporočeno prehrano (Pripor) v povprečju redkejšo blato od živali drugih skupin. Priporočena prehrana namreč vključuje sadje in zelenjavo, ki vsebujeta prehranske vlaknine in te vežejo nase določeno količino vode ob potovanju blata skozi prebavni sistem. Navsezadnje se blato živali iz ene in druge skupine razlikuje tudi po videzu in vonju. Blato živali iz prve prehranske skupine (Pripor) je bilo bolj oker-oranžne barve, ki je lahko posledica karotenoidov v krmi. Le-ti so bili opazni tudi pri centrifugiranju vzorcev blata, kjer so se usedli v zgornji del trdne faze in bili vidni kot oranžen obroč. Blato druge skupine živali

(-SadZel) je bilo bolj rjave barve, imelo je izrazitejši vonj ter bilo manj konsistentno. Če pogledamo blato prašiča z vegetarijansko prehrano (Veg), le-ta ni imel izrazitega vonja, njegova barva je bila bolj rjavo-zelena, opazne pa so bile tudi posamezne celulozne lupine sadja.

Med poskušanjem različnih postopkov priprave vodnih izlužkov blata smo povečevali hitrost centrifugiranja ter podaljševali čas. Izkazalo se je, da kljub dvournemu centrifugiranju pri 29000×g ne uspemo pridobiti pri vseh vzorcih blata enake količine vodnega izlužka. Predvsem pri vzorcih blata živali iz skupine "-SadZel" je bilo ločevanje suspenzije blata in vode na tekočo in trdno fazo zelo slabo. Blato smo razredčevali z vodo MilliQ. Količina dodane vode je bila 1-, 1.5- ali 2-kratnik količine vode, ki jo posamezno blato vsebuje. Na ta način smo blato redčili da bi pridobili dovolj vodnega izlužka. Izkazalo se je, da s povečano količino dodane vode dobimo več vodnega izlužka, ki pa je redkejši. Tu nastopi dilema, ali je bolje imeti več manj koncentriranega vodnega izlužka, ki se ga nato porabi več, ali manj bolj koncentriranega vodnega izlužka. Pri pripravi vodnih izlužkov iz novih vzorcev blata smo tako k vzorcem blata dodali dvakratno količino vode ter dobili zadovoljive rezultate. Optimalno bi bilo, da po centrifugiranju dobimo vsaj tolikšno količino vodnega izlužka, kolikor smo dodali vode k določenemu vzorcu blatu. To nam je v pretežni meri tudi uspelo, zato je pripravljane vodnih izlužkov z dvakratno količino dodane vode MilliQ ustrezno. Omeniti pa velja, da ostali raziskovalci npr. Woods in sod. (2002) blata niso redčili z vodo, verjetno ker je bilo le-to običajno sveže in ker so imeli boljše naprave za centrifugiranje.

Uspešno mešanje blata in vode v mikrocentrifugirkah je ključnega pomena za pripravo vodnih izlužkov. Izkazalo se je, da vorteks oz. vrtničnik ni primeren za mešanje vzorcev, saj z njim ponavadi nismo uspeli pripraviti homogene suspenzije iz blata in vode Milli-Q. Zato smo uporabili napravo Mini BeadBeater™ (Biospec products, ZDA), v osnovi namenjeno razbijanju celic, ki s pomočjo osciliranja in linearnega tresenja mikrocentrifugirk v zelo kratkem času dobro premeša njeno vsebino. Pomemben je tudi način in čas inkubacije blata z vodo. Na začetku smo poleg običajne vodne kopeli uporabljali tudi termostatorirano ultrazvočno kopel, vendar se je pokazalo, da smo iz z ultrazvokom tretiranih vzorcev pridobili redkejšo in manj genotoksično vodno izlužke. To smo potrdili s kometnim testom, saj so bili vodni izlužki, pripravljani po običajni metodi (poglavje 3.2.3), bolj genotoksični za celice kot pa slednji. Poleg tega smo uporabili tudi ultrasonifikator z mikrosondo, namenjen razbijanju celic z ultrazvokom. Z njim smo želeli preveriti neposredno delovanje ultrazvoka ob pripravi vodnih izlužkov blata. Sam postopek je potekal uspešno, vendar ni primeren za veliko število vzorcev, saj je rokovanje z napravo zamudno. Z uporabo ultrazvoka pravzaprav kršimo koncept "vodnega izlužka", ki to dejansko ni. Izlužek pridobimo z izluževanjem (ekstrakcijo) vode skupaj z v njej raztopljenimi snovmi iz blata. Uporaba ultrazvoka pa do neke mere verjetno povzroči dezintegracijo netopnih komponent blata in ekstrakcijo tistih snovi, ki se v osnovi ne nahajajo v vodni fazi blata (Nyborg 2001; Piyasena in sod., 2003). Zaradi teh vidikov uporaba ultrazvoka ni priporočljiva.

Z liofilizacijo blata tvegamo, da iz njega med postopkom liofilizacije izženemo določene lahkohlapne snovi, ki bi sicer delovale (geno)toksično na celice. Vodni izlužki, ki smo jih pridobili na ta način (metoda 3.2.4) in ne na običajen (metoda 3.2.3), so bili redkejši, vendar je to bolj posledica večje količine dodane vode Milli-Q (0,15 g liofiliziranega blata in 1,0 ml vode MiliQ). V tem primeru nismo upoštevali predhodno izračunanih deležev suhe snovi v posameznih vzorcih blata in nismo naredili dejanske rekonstitucije originalnega blata tako kot Rieger in sod. (1999), saj smo vsem liofiliziranim vzorcem blata dodali enako količino vode. Na prvi pogled metodološko napako lahko obravnavamo tudi drugače, saj smo se s tem v določeni meri izognili dejstvu, da so pujski v isti prehranski skupini v različnem fiziološkem stanju, imajo rahlo drugačne prehranjevalne navade in s tem rahlo drugačno sestavo blata, vključno z deležem vode v njem.

Optimizacija kometnega testa je potekala po hevrističnih načelih. Izhajali smo iz postopka, ki ga je pripravila Duthie s sod. (1997a). Že na začetku smo opazili, da ima postopek nekaj šibkih točk, zato smo ga poskušali optimizirati. Po podrobnem pregledu in prvih dveh ponovitvah kometnega testa (od dvajsetih) je bilo očitno, da s prejšnjo izvedbo nekaj ni v redu, saj elektroforeza ni ustrezno potekala. Na sliki 3-A vidimo, da kometi nimajo repov, niti jih ni bilo moč opaziti pri ostalih ocenjevanjih minigelov v ponovitvi. Poleg tega je bilo nenavadno, da so bili dejanski pogoji pri elektroforezi (~8V, 260 mA) drugačni od nastavljenih (25V, 300mA). Pričakovana napetost je 0,75 V/cm, zato je nastavljena napetost odvisna od velikosti in oblike elektroforezne banjice. Z nadaljnjim poskušanjem smo ugotovili, da je za prenizko napetost kriv elektroforetski pufar, ki je na začetku vseboval 300 mM NaOH ter 1mM EDTA. Prevelika koncentracija natrijevega hidroksida povzroči veliko ionsko jakost pufra in s tem večjo prevodnost oz. manjšo upornost. Ker je napetost skladno z Ohmovim zakonom definirana kot zmnožek toka in upornosti, je očitno, da se skladno z zmanjšanjem upornosti pufra ob nespremenjenem toku zmanjša elektroforezna napetost. Zato smo morali zmanjšati prevodnost pufra z zmanjšanjem koncentracije NaOH. S 150 mM koncentracijo NaOH smo dosegli veliko boljše rezultate, pH pufra je bil okoli 13,3 in še vedno nad potrebno mejo za uspešnost kometnega testa (pH>13). Druga pomembnejša ugotovitev je, da je elektroforezna napetost odvisna tudi od števila elektroforeznih banjic, priklopljenih na vir napetosti. Izkazalo se je, da ob priklopu dveh banjic na en napajalnik napetost na vsaki pade za približno polovico. Zaradi tega je prihajalo do slabšega potovanja DNA v električnem polju elektroforeze in nezadostnega nastanka repa. Ob vpeljavi koncepta "ena elektroforezna banjica na en napajalnik" so problemi izginili. Poskusili smo tudi s še manjšo koncentracijo NaOH v elektroforetskem pufaru (80 mM), vendar z rezultati nismo bili zadovoljni – repi so bili izrazito predolgi in iz idealne linije, so se prekrivali in bilo jih je težko ocenjevati. Primer kometov z neravnimi repi lahko vidimo na Sliki 3-C. Na koncu optimizacije smo ponovno poskusili izvesti kometni test z večjo (>200 mM) koncentracijo NaOH in bili kar uspešni. Ugotovitve Klaudejeve in sod. (1996) so bile enake kot naše – pri povečani koncentraciji baze je rep kometna krajši in intenzivnejši, pri manjši pa bolj raztegnjen, a manj izrazit. Zamislili smo si, da mora rep znašati dvakratnik premera kometne glave, zato smo stremeli za slikami, kot je tista na Sliki 3-F. Omenimo naj tudi neskladje med postavljanjem stekelc z minigeli

v eni ali dveh kolonah v elektroforetske banjice. Nekateri (Duthie in sod., 1997a; Duthie in sod., 1997b; Battino in sod., 2005) so uporabljali dve koloni, drugi (Şardaş in sod., 2001; Çok in sod., 2004; Lah, 2005b) pa so stekelca postavljali bliže anodi. Mi smo kometni test izvajali z dvema kolonama stekelc, predvsem zaradi ekonomičnosti in prihranka časa.

Čeprav nismo preverili vseh možnih kombinacij pogojev pri elektroforezi, menimo, da ni mogoče enoznačno izbrati najbolj optimalne kombinacije pogojev. Kljub temu pa lahko trdimo, da so primerni pogoji izvedbe kometnega testa naslednji: sestava elektroforetskega pufra – 150-250 mM NaOH ter 1mM EDTA, dejanski pogoji elektroforeze – napetost nad 22V, tok 400 mA, ter čas, ki je desetina milimolarne koncentracije NaOH (t.j. 15-25 minut). Koncentracija in čas sta medsebojno odvisna.

Pri postopku kometnega testa je pomembna tudi zadnja faza, kjer barvamo DNA z etidijevim bromidom. Pri tem moramo paziti na to, da postopek poteka v temnem prostoru, saj se lahko v nasprotnem primeru zmanjša intenziteta svetilnosti DNA ter s tem pride do manjšega kontrasta med ozadjem in kometom. Če se temu pridružijo še neustrezne nastavitve mikroskopa (vidno na Sliki 3-B, kjer je prišlo do premika kamere) in/ali programa za vizualno ocenjevanje kometov (osvetlitev in kontrast na Sliki 3-A nista ustrezna), lahko pride do znatnega znižanja kakovosti in zanesljivosti ocenjevanja mikroskopskih slik. Vilhar (2005) se je v svojem delu poglobila v računalniško ocenjevanje slik kometov in ugotovila, da je pametno vedeti, kako računalnik ocenjuje slike in se pri tem ne zaveda, ali jih oceni prav ali narobe. To vlogo ima raziskovalec, ki pa temu (ni nujno res) ne posveča prevelike pozornosti in v temi laboratorija ure in ure mehanično klika z miško in ocenjuje komete, čakajoč na odrešilno zadnje stekelce.

Z zanesljivimi in natančnimi metodami ocenjevanja pridobimo veliko število natančnih podatkov o lastnostih določenega kometa in posledično vzorca, vendar se je potrebno vprašati, kako je s točnostjo rezultatov po njihovi analizi. V znanstveni srenji je prevladalo stališče, da mora biti postopek kometnega testa individualno prilagojen v vsakem laboratoriju s ciljem pridobivanja veljavnih in ponovljivih rezultatov (Duez in sod., 2004). Vendar so parametri, s katerimi ugotavljamo lastnosti posameznega kometa, precej podvrženi variabilnosti. Ena od takih je dolžina repa kometa, ki se lahko zelo spreminja s spreminjanjem pogojev elektroforeze. Prav tako je problematično ugotavljanje odstotka DNA v repu, saj je potrebno določiti, kje se konča glava kometa in kje začne rep. Na Sliki 3-D lahko opazimo podobno situacijo. Pri večji koncentraciji NaOH v elektroforetskem pufri in posledično bolj intenzivno sijočih repih je to lahko velik problem, ki mu algoritem v programu za analizo slik ni kos. Repni moment po Olivu vsebuje člen, ki ponazarja razliko med centroma največje intenzitete glave in repa. Po pregledu vseh parametrov, ki jih o določenem kometu izmeri/izračuna program KineticImaging Komet 5, smo ugotovili, da je izračunavanje le-teh povezano z velikimi merilnimi napakami. Naj zadnje trditev pojasnimo na konkretnem primeru. Ocenili smo komet, ki ima vrednost OTM 4.96, v repu ima 12.31 odstotka DNA, razdalja med centroma pa znaša 40.29 μm . Vendar izračun ne upošteva standardne deviacije, s katero sta določeni točki centrov intenzitet. Če ju

vključimo v izračun, bomo določili tudi standardno deviacijo vrednosti repnega momenta po Olivu, ki v tem primeru zanaša kar 13.18. Z drugimi besedami to pomeni, da 95%-ni interval zaupanja za konkretno vrednost OTM-ja zanaša (-22.08, 32.06). Torej je vrednost 4.96 le najbolj verjetna vrednost konkretnega repnega momenta po Olivu in tako je tudi z ostalimi kometi.

Če so surovi podatki izračunani z velikimi napakami, pričakujemo, da bo statistika ponudila orodja za njihovo korektno analizo. Lovell (1997) je v svojem delu naštel nekaj metodoloških problemov, ki nastajajo pri analizi podatkov testov mutagenosti *in vitro*. Pomemben poudarek je vprašanje, ali ima statistično značilna razlika med dvema testiranima skupinama podatkov tudi biološko ozadje. Z upoštevanjem napak je možno skonstruirati bolj robustno analizo, s katero dobimo bolj konzervativne rezultate t.j. manj informativne, a bolj zanesljive. V ta namen obstaja področje Bayesovske statistike, vendar je za dejansko uporabo njenih metod dela potrebno poglobljeno znanje, ki ni v dometu večine zainteresiranih znanstvenikov. Zato so raziskovalci do sedaj uporabljali bolj ali manj natančne in ustrezne metode statistične analize podatkov kometnega testa, katere so omenjene v pregledu literature. Tudi tu se je potrebno vprašati, ali so rezultati naštetih metod točni, ali je konkretna metoda sploh ustrezna za analiziranje podatkov in ali delamo tudi pri statistični analizi podatkov približke. Vse to lahko vodi v napake v končnih rezultatih in kasnejšem mlatenju prazne slame v opisovanju in komentiranju le-teh, še posebej, če oseba, ki je izvedla eksperiment, ni tudi sama analizirala svojih podatkov. Mi smo za analizo podatkov kometnega testa uporabili najnovejšo objavljeno metodo (Verde in sod., 2006), s katero smo na enostaven in pregleden način ugotovili razlike med posameznimi skupinami, če obstajajo. Imeli smo možnost izbirati med sedemnajstimi statističnimi porazdelitvami za opis podatkov kometnega testa. Na podlagi rezultatov o preverjanju prileganja različnih statističnih porazdelitev (poglavje 4.3.2) smo se odločili za Weibullovo porazdelitev ter z njo modelirali podatke. Model upošteva vse izmerjene/izračunane vrednosti določenega parametra znotraj seta podatkov in ne le mediane oz. srednje vrednosti. S tem ne pride do izgube informacij, kar je velik napredek.

Če pogledamo naše rezultate vidimo, da smo v veliki meri izpolnili zastavljene cilje. Uspeli smo pridobiti vodne izlužke blata, z njimi delovati na tarčne celice Caco-2 in optimizirati izvedbo kometnega testa. Dobljeni rezultati kažejo, da praktično vsi vodni izlužki blata delujejo genotoksično na celice Caco-2. Razlika je le v tem, da je blato prašičev iz skupin s priporočeno prehrano (Pripor) in vegetarijansko krmo (Vegi), manj genotoksično od blata živali, krmljenih s krmo brez sadja in zelenjave (-SadZel) ali z več mesa (+Meso). Ugotovitev je deloma skladna z Rezar (2003), kjer je raziskovalka dokazala, da prehrana brez sadja in zelenjave negativno vpliva na oksidacijski stres organizma. Z liofilizacijo blata pripravimo vodne izlužke, ki so šibkeje genotoksični, čeprav je to lahko posledica večje razredčitve blata. S Slike 9 lahko razberemo, da prihaja znotraj populacije pujskov do normalnih razlik med njimi ter s tem do variabilnosti genotoksičnosti vodnih izlužkov blata kljub enako sestavljeni krmi. Genotoksičnost vodnih vzorcev je očitna in je predvsem posledica vplivov toksičnih snovi, ki so rezultat

anaerobnega bakterijskega metabolizma peptidov in proteinov (putrefikacije oz. anaerobnega gnitja). Pri tem nastajajo snovi, kot so amoniak, amini, fenoli, tioli, indoli in ostale, ki jih ekstrahiramo v vzorce vodnih izlužkov blata. Le-te nato delujejo na tarčne celice, kjer povzročajo merljive poškodbe. Razlike med posameznimi prehranskimi skupinami niso velike, kar lahko pripišemo uporabi ustrezne statistične analize, ki pravilno upošteva individualno variabilnost živali. Pomembna je tudi ugotovitev Cross in sod. (2006), da je koncentracija *N*-nitrozo komponent, ki so posledica uživanja rdečega mesa, pomembno manjša v vodnih izlužkih blata v primerjavi z homogeniziranim blatom – kljub ustrezno izvedenemu postopku torej v vodno fazo ni mogoče zajeti celokupne količine (geno)toksičnih snovi, ki se sicer pojavijo v blatu. V primeru nadaljnjih raziskav na to temo bi kazalo uporabljati večje število skupin z več različnimi vrstami živil z namenom spoznavanja dejansko optimalne varovane kombinacije vsakdanjih živil.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Celična linija Caco-2 predstavlja ustrezne celice, na katerih je preverjeno možno določati genotoksične vplive različnih snovi. Gojenje in vzdrževanje celic je rutinsko, njihova prednost pa, da izvirajo iz človeka.
- S prilagajanjem pogojev kometnega testa smo v nekaj stopnjah razvili postopek, ki omogoča primerno dokazovanje genotoksičnih učinkov vzorcev vodnih izlužkov blata. Pri tem smo se usmerili predvsem na to, da so pridobljene mikroskopske slike jedrne DNA jasne in kakovostne in s tem ocenjevanje parametrov zanesljivo.
- Najpomembnejša prilagoditev našega postopka v primerjavi z uveljavljenim postopkom (Duthie s sod., 1997a) je zmanjšanje koncentracije NaOH v raztopini za alkalno lizo celic ter skrajšanje časa elektroforeze. Izkaže se, da enoznačnih pogojev ni mogoče določiti, saj različne kombinacije pogojev privedejo do zelo podobnih in ustreznih rezultatov. Tako za pripravo elektroforetskega pufra priporočamo od 150 do 250 milimolarno koncentracija NaOH ter čas elektroforeze od 15 do 25 minut. Številčno razmerje med koncentracijo in časom naj znaša 10:1.
- Uspešnost priprave vodnih izlužkov blata ima ključno vlogo pri kakovosti rezultatov. Z razredčevanjem blata z vodo Milli-Q, izdatnim mešanjem in intenzivnim centrifugiranjem smo uspeli pridobiti vodne izlužke za uporabo v kometnem testu. Izkaže pa se, da je uspešnost priprave vodnih izlužkov precej nestalna, saj obstajajo velika nihanja v pridobljeni količini. Vzrok za to se skriva v naravni variabilnosti živali, od katerih je bilo odvzeto blato.
- Z uporabo najnovejšega pristopa k analizi podatkov kometnega testa smo ugotovili, da kljub ponovljivosti kometnega testa, gledano na interne kontrole, tega ne moremo reči za vzorce vodnih izlužkov. Prihajalo je do različnih odzivov celic na iste vzorce,

zato je potrebno posvetiti veliko skrb izpostavitvi celic vzorcem vodnih izlužkov. Prav tako priporočamo uporabo ledu pri rokovanju z vodnimi izlužki – s tem se zmanjša izhlapevanje lahkih komponent in posledično spremeni sestava vzorca.

- Rezultati kažejo, da imajo vzorci vodnih izlužkov iz blata živali, ki v svoji prehrani niso uživali sadja in zelenjave ali pa so uživali povečane količine mesa, večji genotoksični potencial kot vzorci vodnih izlužkov iz blata živali, krmljenih s priporočeno ali vegetarijansko krmo.
- Z optimizirano metodo vrednotenja genotoksičnosti vzorcev vodnih izlužkov blata bo možno modelirati nove prehranske poskuse, ne samo na prašičih ali drugih testnih organizmih, ampak tudi na ljudeh.

6 POVZETEK

V prehranskih politikah razvitih držav je že nekaj časa zaslediti trend promoviranja zdravega načina življenja in prehranjevanja ljudi. Zdravniki priporočajo uživanje večjih količin sadja in zelenjave (5-krat na dan) in zmanjšanje uporabe rdečega mesa in mesnih izdelkov oz. nadomestitev le-tega s pustim mesom. Smernice temeljijo na čedalje večjem številu znanstvenih raziskav, ki povezujejo povečanje pojavljanja malignih tvorbo na debelem črevesju s prekomernim uživanjem izdelkov iz rdečega mesa. V ta namen so raziskovalci razvili mnogo metod, ki omogočajo ugotavljanje vplivov (ne)primerne prehrane na fiziološki status organizma. Ena izmed njih je tudi merjenje genotoksičnosti vzorcev vodnih izlužkov blata s kometnim testom oz. elektroforezo posameznih celic v gelu. Pri našem delu smo postopek optimizirali in se še posebej posvetili ustrezni statistični analizi rezultatov.

V raziskavi smo uporabili modelne celice Caco-2, stare sedem dni. Iz zamrznjenih vzorcev blata smo po dveh postopkih pripravili vodne izlužke, ki smo jih kasneje ustrezno razredčene dodali celičnemu monosloju in jih pol ure inkubirali pri 37 °C. Negativna kontrola je bila pripravljena samo z gojiščem za celice, medtem ko je pozitivna kontrola kometnega testa vsebovala 30 mM etilmetansulfonat. Pogoje elektroforeze smo morali optimizirati, saj so bili predhodni slabši oz. niso omogočali kakovostne izvedbe. Tako smo ugotovili, da z zmanjšano koncentracijo (150-250 mM) natrijevega hidroksida v elektroforetskem pufru in skrajšanim časom elektroforeze (15-25 minut, razmerje koncentracija:čas je 10:1) uspemo pridobiti komete oz. slike jedrne DNA celic Caco-2, katerih poškodbe je možno kakovostno zmeriti s pomočjo programa za računalniško analizo mikroskopskih slik Komet 5 (KineticImaging, Ltd). S statistično analizo, temelječo na posplošenih linearnih modelih, natančneje analizi preživetja, smo ustrezno ugotovili, kakšen vpliv na genotoksičnost vodnih izlužkov imajo različno sestavljena krma, način priprave vzorcev, ponovitev kometnega testa in posamezne živali znotraj določene prehranske skupine. Rezultati jasno kažejo, da imajo vodni izlužki blata genotoksični učinek na celice Caco-2, in da prihaja do naravnih razlik v genotoksičnosti blata med posameznimi živali. Poleg tega smo pokazali, da izključitev sadja in zelenjave ali povečanje deleža svinjskega mesa v prehrani prašičev vodi v nastanek blata, ki povzroči večje poškodbe dednega materiala tarčnih celic Caco-2 kot sicer priporočena prehrana. Način priprave vodnih izlužkov je pomemben, saj z liofilizacijo pridobimo manj učinkovite vodne izlužke, ki povzročajo primerljivo manjše poškodbe.

Lahko sklepamo, da smo dovolj uspešno optimizirali postopek kometnega testa ter izvedli verodostojno statistično analizo podatkov. Ker se na tem mestu pričakuje pogled naprej, bi kazalo v nadaljnjih raziskavah na tem področju na podoben način optimizirati še kometne teste, kjer bi se preverjalo genotoksičnost blata drugih živali poleg prašičev. Možnosti uporabe so tudi na področju onkologije, kjer bi s preučevanjem lastnosti vodnih izlužkov blata bolnikov s kolorektalnimi karcinomi lahko več doprinesli k postavljanju preventivnih smernic na tem področju.

7 VIRI

- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E.G., Tice R., Waters M.D., Aitio A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in human. *Mutation Research*, 463: 111-172.
- Anderson D., Plewa M.J. 1998. The international comet assay workshop. *Mutagenesis*, 13, 1: 67-73.
- Artursson P., Palm K., Luthman K. 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 27-43.
- Battino M., Ferreira M.S., Armeni T., Politi A., Bompadre S., Massoli A., Bullon P. 2005. *In vitro* antioxidant activities of antioxidant-enriched toothpastes. *Free Radical Research*, 39, 3: 343-350.
- Bauer E., Recknagel R.-D. Fiedler U., Wollweber L., Bock C., Greulich K.O. 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutation Research*, 398: 101-110.
- Burns A.J., Rowland I.R. 2004. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutation Research*, 551: 233-243.
- Camenisch G., Alsenz J., van de Waterbeemd H., Folkers G. 1998. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6: 313-319.
- Çok İ., Şardaş S., Kadioglu E., Ozcagli E. 2004. Assessment of DNA damage in glue sniffers by use of the alkaline comet assay. *Mutation Research*, 557: 131-136.
- Collins A.R., Ag M., Duthie S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, 336: 69-77.
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, 375: 183-193.
- Collins A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.

- Cross A.J., Greetham H.L., Pollock J.R., Rowland I.R., Bingham S.A. 2006. Variability in fecal water genotoxicity, determined using the Comet assay, is independent of endogenous N-nitroso compound formation attributed to red meat consumption. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 3: 179-184.
- Cummings J.H. 1997. The large intestine in nutrition and disease. Bruxelles, Danone Institute.
http://www.danoneinstitute.org/publications/book/pdf/large_intestine.pdf
(10. junij 2006): 161 str.
- Davis C.D. 2003. Low dietary copper increases fecal free radical production, fecal water alkaline phosphatase activity and cytotoxicity in healthy men. *Journal of Nutrition*, 133: 522-527.
- De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Vanda P.A., Kirsch-Volders M. 2000. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Research*, 469, 181-197.
- Dehon G., Bogaerts P., Duez P., Catoire L., Dubois J. 2004. Curve fitting of combined comet intensity profiles: a new global concept to quantify DNA damage by the comet assay. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 73: 235-243.
- De Kok T.M.C.M., van Faassen A., Glinghammar B., Pachen D.M.F.A., Rafter J.J., Baeten C.G.M.I., Engels L.G.J.B., Kleinjans J.C.S. 1999. Bile acid concentration, cytotoxicity, and pH of fecal water from patients with colorectal adenomas. *Digestive Diseases and Sciences*, 44, 11: 2218-2225.
- De Kok T.M.C.M., Maanen J.M.S. 2000. Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutation Research*, 463: 53-101.
- Duez P., Dehon G., Kumps A., Dubois J. 2003. Statistics of the comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis*, 18: 159-166.
- Duez P., Dehon G., Dubois J. 2004. Validation of raw data measurements in the comet assay. *Talanta*, 63: 879-886.
- Duthie S.J., Johnson W., Dobson V.L. 1997a. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutation Research*, 390: 141-151.
- Duthie S.J., Collins A.R. 1997b. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 4: 717-724.

- Duthie S.J., Dobson V.L. 1999. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, 38, 28-34.
- Dzierżewicz Z., Orchel A., Węglarz L., Latocha M., Wilczok T. 2002. Changes in the cellular behaviour of human colonic cell line Caco-2 in response to butyrate treatment. *Acta Biochimica Polonica*, 49, 1: 211-220.
- Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg A.E. (eds.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. New York, American Public Health Association: 2540-2580.
- EcoSanRes guidelines on the use of urine and faeces in crop production. EcoSanRes fact sheet 6. 2005. Stockholm, Stockholm Environment Institute. (13. april 2005)
http://www.ecosanres.org/PDF%20files/Fact_sheets/ESR6lowres.pdf
(21. avgust 2006): 2 str.
- Eisenbrand G., Pool-Zobel B., Baker V., Balls M., Blaauboer B.J., Boobis A., Carere A., Kevekordes S., Lhuguenot J.-C., Pieters R., Kleiner J. 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 193-236.
- Ejchart A., Sadlej-Sosnowska N. 2003. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutation Research*, 534: 85-92.
- Erhardt J.G., Lim S.S., Bode J.C., Bode C. 1997. A diet rich in fat and poor in dietary fiber increases the *in vitro* formation of reactive oxygen species in human feces. *Journal of Nutrition*, 127: 706-709.
- Ewing W.N., Cole D.J.A. 1994. The living gut: An introduction to micro-organisms in nutrition. Dungannon, Context: 220 str.
- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neil K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.
- Flaherty P. Caco-2 culture systems for drug intestinal permeability screening. 2005. Franklin Lakes, BD Biosciences – Discovery Labware. (23. avg. 2005).
http://www.bdbiosciences.com/discovery_labware/docs/caco-2.pdf
(17. februar 2006): 51 str.
- Fogh J., Fogh J.M., Orfeo T. 1977. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59: 221-226. Cit. po: Pinto M., Robin-Leon S., Appay M.D., Keding M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47: 323-330.

Folding@Home Distributed Computing. 2006. Stanford, Stanford University.
<http://folding.stanford.edu> (8. avgust 2006): 2 str.

García O., Mandina T., Lamadrid A.I., Diaz A., Remigio A., Gonzalez Y., Piloto J., Gonzalez J.E., Alvarez A. 2004. Sensivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research*, 556, 25-34.

Generations X. Results of WWF's European family biomonitoring survey. 2005. Brussels, World Wide Fund for Nature (WWF). (5. oktober 2005)
<http://assets.panda.org/downloads/generationsx.pdf> (8. avgust 2006): 60 str.

Gibson P.R., Rosella O., Wilson A.J., Mariadason A.M., Rickard K., Byron K., Barkla D.H. 1999. Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effect of butyrate. *Carcinogenesis*, 20, 4: 539-544.

Glei M., Habermann N., Oßwald K., Seidel C., Persin C., Jahreis G., Pool-Zoobel B.L. 2005. Assessment of DNA damage and its modulation by dietary and genetic factors in smokers using the Comet assay: a biomarker model. *Biomarkers*, 10, 2-3: 203-217.

GraphPad Prism 4.0 Help. 2004. San Diego, GraphPad Software Inc.
<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm> (8. junij 2006)

Guarner F., Malagelada J.-R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519.

Hauri H.-P., Sterchi E.E., Bienz D., Fransen J.A.M., Marxer A. 1985. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 101, 838-851.

Heaton P.R., Ransley R., Charlton C.J., Mann S.J., Stevenson J., Smith B.H.E., Rawlings J.M., Harper E.J. 2002. Application of single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. *Journal of Nutrition*, 132: 1598S-1603S.

Howell S., Kenny A.J., Turner A.J. 1992. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. *Biochemical Journal*, 284, 595-601.

Jones B.V., Marchesi J.R. 2006. Construction and function based screening of metagenomic libraries of the human gut microbiota. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 3-22: S18.

Kada T., Shimo K. 1987. Desmutagens and bioantimutagens – their mode of action. *Bioessays*, 7, 3: 113-116.

- Kan E., Ündeğer Ü., Bali M., Başaran N. 2002. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline comet assay in dialysis patients and the role of vitamine E supplementation. *Mutation Research*, 520: 151-159.
- Kassie F., Mersch-Sundermann V., Edenharder R., Platt K.L., Darroudi F., Lhoste E., Humbolt C., Muckel E., Uhl M., Kundi M., Knasmüller S. 2003. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research*, 523-524: 183-192.
- Klaude M., Erikson S., Nygren J., Ahnström G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363, 89-96.
- Klinder A., Forster A., Caderni G., Femia A.P., Pool-Zobel B.L. 2004. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutrition and Cancer*, 49, 2: 144-155.
- Lah B., Žinko B., Narat M., Marinšek-Logar R. 2005a. Monitoring of genotoxicity in drinking water using *in vitro* comet assay and Ames test. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 2: 139-146.
- Lah B. 2005b. "Praktično delo s kometnim testom in celicami Caco-2". Ljubljana, Bia Separations. (osebni vir, marec-junij 2005)
- Laitinen L. 2006. Caco-2 cell cultures in the assesment of intestinal absorption: Effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices. Academic Dissertation. Helsinki, Faculty of Pharmacy, Drug discovery and Development Technology Center, Division of Biopharmaceuticals and Pharmacokinetics. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/far/farma/vk/laitinen/caco2cel.pdf> (30. maj 2006): 73 str.
- Lovell D.P. 1997. Issues in the experimental design and statistical analysis of *in vitro* mutagenicity tests. *Drug Information Journal*, 31, 345-356.
- McDonald P. 1995. Animal nutrition. 5th ed. New York. J. Wiley & Sons: 607 str.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Méo M.P., Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288: 47-63.
- Mersch-Sundermann V., Knasmüller S., Wu X., Darroudi F., Kassie F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agent. *Toxicology*, 198: 329-340.

- Møller P., Loft S. 2006. Dietary antioxidants and beneficial effects on oxidatively damaged DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 3: 388-415.
- Montagne L., Pluske J.R., Hampson D.J. 2003. A review of interaction between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108, 95-117.
- Narat M. 2003. Imunske tehnologije. Navodila za vaje. 2. izd. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo, Oddelek za zootehniko: 45 str.
- Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M., Overvad K., Olsen A., Tjønneland A., Clavel F., Boutron-Ruault M.-C., Kesse E., Boeing H., Bergmann M.M., Nieters A., Linseisen J., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Tountas Y., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Engeset D., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., González C., Navarro C., Quirós J.R., Sanchez M.-J., Berglund G., Mattisson I., Hallmans G., Palmqvist R., Day N.E., Khaw K.-T., Key T.J., Joaquin M.S., Hémon B., Saracci R., Kaaks R., Riboli E. 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 12: 906-916.
- Nyborg W.L. 2001. Biological effects of ultrasound: development of safety guidelines. Part II: general review. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 27, 3: 301-333.
- Ocvirk J. 2005. Rak debelega črevesa in danke: kaj morate vedeti o bolezni. Ljubljana, Roche farmacevtska družba. (november 2005)
http://www.roche.si/P/PDF/Rak_debelega_crevesa_in_danke.pdf
(24. april 2006): 20 str.
- Ostling O., Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 1: 291-298.
- Oßwald K., Becker T.W., Grimm M., Jahreis G., Pool-Zobel B.L. 2000. Inter- and intra-individual variation of faecal water — genotoxicity in human colon cells. *Mutation Research*, 472: 59-70.
- Park Y.O., Hwang E.-S., Moon T. W. 2005 The effect of lycopene on cell growth and oxidative DNA damage of Hep3B human hepatoma cells. *Biofactors*, 23: 129-139.
- Pinto M., Robin-Leon S., Appay M.D., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47: 323-330.

- Piyasena P., Mohareb E., McKellar R.C. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 207-216.
- Pool-Zobel B.L., Bub A., Müller H., Wollowski I., Rechkemmer G. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18, 9: 1847-1850.
- Pouillart P.R. 1998. Role of butyric acid and its derivatives in the treatment of colorectal cancer and hemoglobinopathies. *Life Sciences*, 63, 20: 1739-1760.
- Pryde S.E., Duncan S.H., Hold G.L., Stewart C.S., Flint H.J., 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 217, 133-139.
- Puska P., Nishida C., Porter D. 2003. Obesity and overweight. Geneve, World Health Organization. (marec 2003)
<http://www.who.int/entity/dietphysicalactivity/media/en/gsf Obesity.pdf>
(13. sep. 2006): 2 str.
- Rafter J.J., Child P., Anderson A.M., Alder R., Eng V., Bruce W.R. 1987. Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45: 559-563.
Cit. po: Oßwald K., Becker T.W., Grimm M., Jahreis G., Pool-Zobel B.L. 2000. Inter- and intra-individual variation of faecal water – genotoxicity in human colon cells. *Mutation Research*, 472: 59-70.
- R Development Core Team. 2006. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing.
<http://www.r-project.org> (27. maj 2006)
- Rezar V. 2003. Vpliv različnih obrokov z mesom, sadjem in zelenjavo na oksidacijski status prašičev. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 100 str.
- Rieger M.A., Parlesak A., Pool-Zobel B.L., Rechkemmer G., Bode C. 1999. A diet in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of “faecal water“. *Carcinogenesis*, 20, 12: 2311-2316.
- Robichová A., Slameňová D. 2002. Effects of vitamins C in E on cytotoxicity induced by *N*-nitroso compounds, *N*-nitrosomorpholine and *N*-methly-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Letters*, 182: 11-18.
- Rojas E., Lopez M.C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254.

- Şardaş S., Yilmaz M., Öztok U., Çakir N., Karakaya A.E. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research*, 490: 123-129.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Singh N.P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455: 111-127.
- Single cell gel electrophoresis analysis. User guide – version 5. 2001. Liverpool, Kinetic Imaging Limited: 306 str.
- Slameňová D., Kubošková K., Horváthová E., Robichová S. 2002. Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Letters*, 177: 145-153.
- Speit G., Trenz K., Schütz P., Rothfuß A., Merk O. 1999. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicology Letters*, 110, 73-78.
- Tice R.R. 1995. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. V: *Environmental mutagenesis*. Phillips D.H., Venitt S. (eds.). Oxford, Bios Scientific Publishers: 315-339.
- 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- Topping D.L., Clifton P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81, 3: 1031-1064.
- Valko M., Morris H., Mazúr M., Raptá P., Bilton R.F. 2001. Oxygen free radical generating mechanisms in colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1527: 161-166.
- Varel V.H., Yen J.T. 1997. Microbial perspective on fiber utilization by swine. *Journal of Animal Science*, 75, 2715-2722.

- Venturi M., Hambly R.J., Glinghammar B., Rafter J.J., Rowland I.R. 1997. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using alkaline comet assay. *Carcinogenesis*, 18, 2353-2359.
- Verde P.E., Geracitano L.A., Amado L.L., Rosa C.E., Bianchini A., Monserrat J.M. 2006. Application of public-domain statistical analysis software for evaluation and comparison of comet assay data. *Mutation Research*, 604: 71-82.
- Verhagen H., Aruoma O.I., van Delft J.H.M., Dragsted L.O., Ferguson L.R., Knasmüller S., Pool-Zobel B.L., Poulsen H.E., Williamson G., Yannai S. 2003. The 10 basic requirements for a scientific paper reporting antioxidant, antimutagenic or anticarcinogenic potential of test substances in in vitro experiments and animal studies in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 603-610.
- Vilhar B. 2005. Help! There is a comet in my computer! A dummy's guide to image analysis used in the comet assay. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. (januar 2005)
<http://www.botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf>
(24. april 2006): 49 str.
- Volkovová K., Dušinská M., Collins A.R. 2006. From oxidative DNA damage to molecular epidemiology. *Journal of Applied Biomedicine*, 4: 39-43.
- Whitney M. Nutrition affects microbiology of the gut and enteric disease. 2005. Minneapolis, University of Minnesota. (13. junij 2005)
<http://www.extension.umn.edu/swine/components/pubs/nutritionmicrobiology.pdf>
(20. junij 2006): 2 str.
- Wiklund S.J., Agurell E. 2003. Aspects of design and statistical analysis in the comet assay. *Mutagenesis*, 18: 167-175.
- Woods J.A., Dunne C., Collins J.K., Shanahan F., O'Brien N.M. 2002. Genotoxicity of fecal water in a free-living Irish population. *Nutrition and Cancer*, 42, 1: 62-69.
- Zoetendal E.G., Booijink C.C.G.M., El Aidy S., Smidt H., Kleerebezem M., De Vos W.H. 2006. Genetic diversity of the microbial community in ileostomy patients. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 3-22: S35.

ZAHVALA

Za pomoč pri nastajanju tega diplomskega dela se zahvaljujem:

- mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno pomoč pri nastajanju tega diplomskega dela, prijazne nasvete in ogromno mero potrpežljivosti,
- asist. Gregorju Gorjancu, univ. dipl. inž. zoot., za neizmerljivo pomoč in uvajanje v statistično obdelavo podatkov. Posredovano znanje in porabljen čas ni bil zaman.
- dr. Barbari Lah, univ. dipl. mikr., za pomoč pri uvajanju v laboratorijsko delo, koristne nasvete ter gojenje celic Caco-2,
- prof. dr. Mojci Narat, vodji Laboratorija za imunologijo in celične kulture, za strokovno recenzijo dela,
- vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo in Katedri za prehrano Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete, za pomoč in nasvete,
- čistilki Anici Osolin za prijazne in vzpodbudne pogovore v zgodnjih jutranjih urah.

PRILOGA A:

Sestava dnevnega obroka za pujske v različnih skupinah (Rezar, 2003)

SESTAVA IN HRANILNA VREDNOST	POSKUSNE SKUPINE ⁽¹⁾					
	Pripor	+Mašč	-SadZel	+Mašč- SadZel	+Meso	Veg
Osnovna mešanica						
- Škrob, g/dan	105	14	148	58	68	79
- Pšenična moka, g/dan	120	120	120	120	120	120
- Pšenični otrobi, g/dan	30	30	30	30	30	30
- Sojine tropine, g/dan	10	10	10	10	10	70
- Sladkor, g/dan	20	20	20	20	20	20
- Posneto mleko v prahu, g/dan	12	12	12	12	12	12
- Polnom. mleko v prahu, g/dan	13	13	13	13	13	13
- Olje oljne orgščice, g/dan	24	24	24	24	24	24
Dodatki:						
- Svinjsko meso, g/dan ⁽²⁾	120	120	120	120	240	-
- Svinjska mast, g/dan ⁽³⁾	-	35	-	35	-	-
- Jabolka, g/dan	230	230	-	-	230	230
- Paradižnik, g/dan	80	80	-	-	80	80
- Rdeča paprika, g/dan	80	80	-	-	80	80
- Cvetača, g/dan	50	50	-	-	50	50
Količina zaužite krme, g/dan	894	838	497	442	977	808
Izračun prehranske vrednosti:						
Presnovna energija, kJ/dan	1528	1528	1528	1528	1528	1528
% energije iz maščob	20	40	20	40	22	20
% energije iz beljakovin	12	15	15	15	22	15
% energije iz ogljikovih hidratov	65	45	65	45	56	65
Beljakovine, g/dan	85	85	85	85	137	60
Maščobe, g/dan	38	74	38	74	47	34
Ogljikovi hidrati, g/dan	250	170	250	170	215	248
Skupne prehranske vlaknine, g/dan	31	31	49	49	59	240

⁽¹⁾ Imena poskusnih skupin so razložena na strani 14.

⁽²⁾ Količina surovega mesa na dan

⁽³⁾ Količina surove maščobe na dan

PRILOGA B:

Vzorci blata iz predhodnega prehranskega poskusa

Ponovitev in številka pujska	Skupina	Oznaka vzorca	Masa (g)
1-1	-SadZel	A2-1	20
1-2	+Mašč	A2-2	16,5
1-3	+Mašč	A2-3	11,5
1-4	+Mašč	A2-4	21,5
1-5	-SadZel	A2-5	10
1-6	+Mašč	A2-6	9
1-7	-SadZel	A2-7	23,5/14
1-8	+Mašč	A2-8	26
1-9	+Mašč	A2-9	12
1-10	Pripor	A2-10	30,5
1-11	-SadZel	A2-11	33
1-12	Veg	A2-12	10,5
1-13	Pripor	A2-13	12/23
1-14	+Mašč	A2-14	-
1-15	Veg	A2-15	-
1-16	Pripor	A2-16	-
1-17	Veg	A2-17	33,5
1-18	+Mašč	A2-18	21,5
1-19	+Mašč	A2-19	14,5
1-20	Pripor	A2-20	37
1-21	+Mašč	A2-21	32
1-22	+Mašč	A2-22	23
1-23	Veg	A2-23	24
1-24	+Mašč	A2-24	-
2-25	Pripor	B2-1	-
2-26	+Mašč	B2-2	24,5/31,5
2-27	Veg	B2-3	14
2-28	Pripor	B2-4	-
2-29	+Mašč	B2-5	-
2-30	+Mašč	B2-6	-
2-31	+Mašč	B2-7	26
2-32	Pripor	B2-8	-
2-33	+Mašč	B2-9	10
2-34	-SadZel	B2-10	25/30
2-35	+Mašč	B2-11	16
2-36	Veg	B2-12	21
2-37	-SadZel	B2-13	-
2-38	+Mašč	B2-14	21
2-39	+Mašč	B2-15	15
2-40	+Mašč	B2-16	26
2-41	Veg	B2-17	28/35
2-42	Veg	B2-18	31/18
2-43	-SadZel	B2-19	23
2-44	-SadZel	B2-20	-
2-45	+Mašč	B2-21	11
2-46	Pripor	B2-22	14
2-47	+Mašč	B2-23	-
2-48	+Mašč	B2-24	18

PRILOGA C:

Zbirka statističnih porazdelitev, uporabljenih za prileganje podatkov kometnega testa

OpenOffice.org dokument:



3-porazdelitve.odt

PDF dokument:



3-porazdelitve.pdf