

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jana PETKOVIĆ

**CITOTOKSIČNO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE NARAVNIH IN
MINERALNIH VOD NA CELICE HepG2**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC INFLUENCE OF NATURAL AND
MINERAL WATERS ON HepG2 CELLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije. V celoti je bilo opravljeno na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 10. 06. 2005 odobrila temo in naslov diplomske naloge in za mentorico imenovala prof. dr. Darjo Žgur Bertok, za somentorico dr. Bojano Žegura, za recenzentko pa prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Somentorica: dr. Bojana ŽEGURA

Recenzentka: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tatjana AVŠIČ ŽUPANC
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: dr. Bojana ŽEGURA
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

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

Datum zagovora: 8.6.2006

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jana Petković

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 628.1.033 + 663.64: 615.9 (043) = 863
- KG voda/pitna voda/mineralna voda/citotoksičnost/genotoksičnost/celice HepG2/test MTT/ kometni test
- AV PETKOVIĆ, Jana
- SA ŽGUR BERTOK, Darja (mentorica)/ŽEGURA, Bojana (somentorica)/ MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN CITOTOKSIČNO IN GENOTOKSIČNO DELOVANJE NARAVNIH IN MINERALNIH VOD NA CELICE HepG2
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 50 str., 6 pregl., 30 sl., 58 vir.
- IJ Sl
- JI sl/en
- AI Brez vode ni življenja na Zemlji. Kljub temu je vse več vode onesnaženo, kar je v večini primerov posledica človekove dejavnosti. Onesnažila pitnih vod lahko vsebujejo številne škodljive dejavnike, med katerimi imajo mnogi citotoksično in genotoksično delovanje. Dolgotrajno pitje takšnih vod lahko pusti pri ljudeh resne zdravstvene posledice. Zato je pomembno, da neoporečnost vod preverjamo s testi, ki lahko škodljive učinke zaznajo. Takšne teste imenujemo biološki testi. Dva tovrstna testa smo uporabili v diplomski nalogi za testiranje citotoksičnosti in genotoksičnosti naravnih in mineralnih vod na človeških jetrnih celicah HepG2. S testom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) smo preverjali citotoksičnost vzorcev vod, z alkalno različico kometnega testa pa genotoksičnost. Testirali smo 14 koncentriranih vzorcev naravnih in mineralnih vod. Ugotovili smo, da so nekateri izmed vzorcev delovali citotoksično na celice, vendar s testom MTT ne moremo ugotoviti vzroka citotoksičnosti. Rezultati alkalne različice kometnega testa so pri nekaterih vzorcih pokazali statistično značilno zmanjšanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino, pri nekaterih pa povečanje. Test MTT se je izkazal kot primeren in dovolj občutljiv za ugotavljanje citotoksičnosti pitnih vod, alkalna različica kometnega testa pa kot primerna in zadosti občutljiva za ugotavljanje genotoksičnosti pitnih vod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 628.1.033 + 663.64: 615.9 (043) = 863
- CX water/drinking water/mineral waters/cytotoxicity/genotoxicity/HepG2 cells/ /MTT assay/alkaline comet assay
- AU PETKOVIĆ, Jana
- AA ŽGUR BERTOK, Darja (supervisor)/ ŽEGURA, Bojana (co-advisor)/ MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2006
- TI CYTOTOXIC AND GENOTOXIC INFLUENCE OF NATURAL AND MINERAL WATERS ON HepG2 CELLS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 50 p., 6 tab., 30 fig., 58 ref.
- LA Sl
- AL sl/en
- AB There is no life on the Earth without water. In spite of that, more and more water is polluted; in most cases pollution is the consequence of human activities. Drinking water pollutants can contain numerous harmful compounds and many of them are cytotoxic and genotoxic. Long term consuming of such water can have serious health consequences. Therefore it is important to check water quality by tests, which can detect harmful effects. These tests are called bioassays. In our graduation thesis we used two bioassays to determine cytotoxicity and genotoxicity of natural and mineral waters on human hepatocytes, HepG2 cells. Cytotoxicity of water samples was tested using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, while genotoxicity was tested by alkaline comet assay. Fourteen concentrated samples of natural and mineral waters were tested. We found out that some of the samples had cytotoxic influence on cells. However, by using MTT assay the exact cause of cytotoxicity can not be determined. The results of alkaline comet assay showed that some samples caused statistically significant decrease in DNA damage compared to the control group and some of them caused statistically significant increase in DNA damage. The MTT assay and the alkaline comet assay were shown to be appropriate and sensitive enough tools for detecting cytotoxicity and genotoxicity of drinking water, respectively.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ŠKODLJIVI DEJAVNIKI V PITNI VODI	3
2.2 PREVERJANJE KAKOVOSTI PITNE VODE: BIOLOŠKI TESTI.....	5
2.2.1 Test MTT.....	6
2.2.2 Alkalna različica kometnega testa	7
2.3 CELIČNA KULTURA HepG2	8
2.4 RAZISKAVE CITOTOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI.....	9
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 VZORCI	12
3.2 CELIČNA KULTURA HepG2	12
3.3 TEST MTT.....	13
3.4 KOMETNI TEST	14
3.4.1 Priprava in nanos celične suspenzije na objektna stekelca.....	14
3.4.2 Alkalna liza celic	15
3.4.3 Odvijanje DNA in elektroforeza.....	15
3.4.4 Nevtralizacija.....	15
3.4.5 Slikanje jeder celic	15

3.4.6	Merjenje poškodb DNA in analiza rezultatov	15
3.5	Priprava raztopin in pufrov	15
4	REZULTATI	17
4.1	TEST	17
4.2	KOMETNI TEST	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	39
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI	45
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1. Oznake vzorcev.....	12
Preglednica 2. Sestavine medija za gojenje celične kulture HepG2 (50 mL).....	13
Preglednica 3. NMP in LMP agaroz.....	16
Preglednica 4. Raztopina za alkalno lizo.....	16
Preglednica 5. Elektroforetski pufer.....	16
Preglednica 6. Raztopina za nevtralizacijo.....	16

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1. Fotografije jeder celic HepG2 po alkalni različici kometnega testa, ki prikazujejo različno poškodovano DNA (fotografirala Žegura B.).....	7
Slika 2. Fotografija celične kulture HepG2 (fotografirala Žegura B.)	9
Slika 3. Vpliv različnih koncentracij vzorca 1 na preživetje celic HepG2.....	17
Slika 4. Vpliv različnih koncentracij vzorca 2 na preživetje celic HepG2.....	18
Slika 5. Vpliv različnih koncentracij vzorca 3 na preživetje celic HepG2.....	18
Slika 6. Vpliv različnih koncentracij vzorca 4 na preživetje celic HepG2.....	19
Slika 7. Vpliv različnih koncentracij vzorca 5 na preživetje celic HepG2.....	19
Slika 8. Vpliv različnih koncentracij vzorca 6 na preživetje celic HepG2.....	20
Slika 9. Vpliv različnih koncentracij vzorca 7 na preživetje celic HepG2.....	20
Slika 10. Vpliv različnih koncentracij vzorca 8 na preživetje celic HepG2.....	21
Slika 11. Vpliv različnih koncentracij vzorca 9 na preživetje celic HepG2.....	21
Slika 12. Vpliv različnih koncentracij vzorca 10 na preživetje celic HepG2.....	22
Slika 13. Vpliv različnih koncentracij vzorca 11 na preživetje celic HepG2.....	22
Slika 14. Vpliv različnih koncentracij vzorca 12 na preživetje celic HepG2.....	23
Slika 15. Vpliv različnih koncentracij vzorca 13 na preživetje celic HepG2.....	23
Slika 16. Vpliv različnih koncentracij vzorca 14 na preživetje celic HepG2.....	24
Slika 17. Vpliv različnih koncentracij vzorca 1 na poškodbe DNA celic HepG2.....	25
Slika 18. Vpliv različnih koncentracij vzorca 2 na poškodbe DNA celic HepG2.....	26
Slika 19. Vpliv različnih koncentracij vzorca 3 na poškodbe DNA celic HepG2.....	27
Slika 20. Vpliv različnih koncentracij vzorca 4 na poškodbe DNA celic HepG2.....	28
Slika 21. Vpliv različnih koncentracij vzorca 5 na poškodbe DNA celic HepG2.....	29

Slika 22. Vpliv različnih koncentracij vzorca 6 na poškodbe DNA celic HepG2.....	30
Slika 23. Vpliv različnih koncentracij vzorca 7 na poškodbe DNA celic HepG2.....	31
Slika 24. Vpliv različnih koncentracij vzorca 8 na poškodbe DNA celic HepG2.....	32
Slika 25. Vpliv različnih koncentracij vzorca 9 na poškodbe DNA celic HepG2.....	33
Slika 26. Vpliv različnih koncentracij vzorca 10 na poškodbe DNA celic HepG2.....	34
Slika 27. Vpliv različnih koncentracij vzorca 11 na poškodbe DNA celic HepG2.....	35
Slika 28. Vpliv različnih koncentracij vzorca 12 na poškodbe DNA celic HepG2.....	36
Slika 29. Vpliv različnih koncentracij vzorca 13 na poškodbe DNA celic HepG2.....	37
Slika 30. Vpliv različnih koncentracij vzorca 14 na poškodbe DNA celic HepG2.....	38

OKRAJŠAVE

ALS	alkalno labilna mesta (alkali labile sites)
APHA	Ameriško združenje javnega zdravstva (American Public Health Association)
AWWA	Ameriško vodovodno združenje (American Water Works Association)
B(a)P	benzo(a)piren
CHF	klorirani furanoni (chlorinated furanones)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenilindol
DCA	dikloroocetna kislina (dichloroacetic acid)
DMSO	dimetil sulfoksid (dimethylsulfoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSB	prelomi obeh verig DNA (double-strand breaks)
EtBr	etidijev bromid (ethidium bromide)
HAA	halogenirane očetne kisline (halogenated acetic acids)
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for research on cancer)
LMP agaroz	agaroz z nižjo točko taljenja (low melting point agarose)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
MX	3-klor-4-(diklormetil)-5-hidroksi-2(5H)-furanon
NMP agaroz	agaroz z normalno temperaturo taljenja (normal melting point agarose)
OD	optična gostota
PAO	policiklični aromatski ogljikovodiki
PBS	fosfatni pufer (phosphate buffered saline)
PET	polietilen tereftalat (polyethylene terephthalate)
RNA	ribonukleinska kislina
SCGE	test elektroforeze posameznih celic (single-cell gel electrophoresis)
SPD	stranski produkti dezinfekcije
SPK	stranski produkti kloriranja
SSB	prelomi ene verige DNA (single-strand breaks)
TCA	trikloroocetna kislina (trichloroacetic acid)
THM	trihalometani (trihalomethanes)
WEF	Federacija vodnega okolja (Water Environment Federation)

1 UVOD

Voda sestavlja tri četrtine človeškega telesa. Je življenjsko pomembna za normalno delovanje našega organizma in jo kot takšno pri vsakodnevnem pitju vnašamo v organizem v velikih količinah. Voda ni le tekočina, ki jo potrebujemo za življenje, temveč tudi neposredno pozitivno vpliva na zdravje. Voda zaseda sedem desetin Zemljinega površja, vendar človek lahko uporablja le neznamen del te velike količine vodovja, saj potrebuje za življenje samo čisto ali vsaj neonesnaženo sladko vodo. Le-te je vse manj, ljudi pa je zmeraj več.

Onesnaženi so lahko viri pitne vode: podtalnica in površinske vode. Viri onesnaženj so lahko naravnega izvora [anorganske snovi, ki izvirajo iz zemlje (npr. arzen, mangan), organske snovi, ki uhajajo iz zemlje (npr. huminske kisline) in toksini, ki jih proizvajajo nekatere cianobakterije in alge (npr. mikrocistini)], ali pa so posledica človekove dejavnosti [kmetijstvo (pesticidi, gnojila), komunalne in industrijske odpadne vode, neprimerna odlagališča odpadkov in kemijske nesreče]. Do onesnaženja lahko pride tudi pri pripravi in distribuciji pitne vode. V tem primeru so onesnažila lahko stranski produkti dezinfekcije (SPD) vode ali snovi, ki nastanejo, ali se izločajo v vodo pri distribuciji (poliaromatski ogljikovodiki, epoksi smole, ftalati) (Filipič, 2004).

Onesnažena voda lahko pusti negativne posledice na zdravju ljudi in drugih živih bitij. Če je voda kontaminirana z mikroorganizmi, lahko pride do infekcije ali zastrupitve z mikrobnimi toksini. Za druga onesnažila vode, predvsem stranske produkte kloriranja (SPK) je dokazano, da pri poskusnih živalih povzročajo različne vrste rakastih obolenj (adenom, karcinom, holangiokarcinom, adenomatozni polipi, limfom, leukemija itn.) na različnih organih (ledvice, jetra, prebavila, pljuča, koža, trebušna slinavka itn.) (Komulainen, 2004).

Za ugotavljanje kakovosti pitne vode v Sloveniji uporabljamo fizikalno-kemijske in mikrobiološke analize (Program monitoringa ..., 2004). Pomanjkljivost le-teh je, da nam nič ne povedo o medsebojnih vplivih snovi, prisotnih v vzorcu, ki lahko povzročijo povečane ali zmanjšane biološke učinke (npr. sinergizem, aditivnost, antagonizem) (Helma in sod., 1998). Nekaterih snovi s kemijskimi analizami sploh ne ugotavljamo, so pa lahko strupene (Rand, 1995). Nekateri snovi v okolju niso toksične, ampak take postanejo, ko vstopijo v organizem in pride do njihove bioaktivacije (Abel, 1996).

Metode, s katerimi dobimo celovite odgovore o genotoksičnih, citotoksičnih, hormonskih in imunotoksičnih učinkih vseh kemikalij, ki so prisotne v vzorcu (voda, zemlja, zrak) imenujemo biološki testi.

1.1 NAMEN DELA

Ker s fizikalno-kemijskimi analizami ne moremo ugotoviti učinka preiskovanih snovi na žive celice pri monitoringu kakovosti pitnih voda, je zaželena uporaba metod, ki nam to omogočajo. Takšne metode izvajamo na živih celicah ali organizmih in jih imenujemo biološki testi. S temi testi lahko ugotavljamo citotoksičnost in genotoksičnost snovi v vzorcu ter njihov medsebojni vpliv. Vse več virov pitne vode je onesnaženih, poraba vode pa čedalje bolj narašča, tako da lahko v prihodnosti pričakujemo pomanjkanje virov pitne vode. V novejšem času se pri človeku pojavlja vse večje število obolenj neznanega vzroka, kar je verjetno posledica kronične izpostavljenosti onesnažilom v pitni vodi in hrani. Iz teh razlogov je za analizo najbolj pomembne tekočine za ljudi uporaba takšnih testov nujno potrebna.

V naši raziskavi smo hoteli preveriti, ali imajo koncentrirani vzorci naravnih in mineralnih vod citotoksičen in genotoksičen vpliv na človeške jetrne celice HepG2. Testirali smo naravne in mineralne vode. Za preverjanje citotoksičnosti smo uporabili test MTT, za preverjanje genotoksičnosti pa alkalno različico kometnega testa. Oba testa smo izvedli na celični kulturi HepG2. Predvidevali smo, da vzorci vod na celice HepG2 ne delujejo citotoksično kot tudi ne genotoksično.

Rezultati, dobljeni s takšnimi testi, nam lahko pomagajo pri kontroliranju ustreznosti pitne vode in v tem primeru bodo usmerili nadaljne raziskave kvalitete in toksičnosti naravnih in mineralnih vod.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŠKODLJIVI DEJAVNIKI V PITNI VODI

Snovi, prisotne v pitni vodi, imajo lahko različne učinke na žive celice. Lahko pride do celičnih poškodb (citotoksičnost), sprememb dednega materiala (genotoksičnost), sprememb metabolizma itn. Eden izmed najbolj pomembnih učinkov je genotoksičen učinek, saj je tarčna molekula deoksiribonukleinska kislina (DNA). Molekula DNA vsebuje zapise, na podlagi katerih je zasnovana zgradba in funkcionalnost celotnega organizma ne glede na to, ali je organizem sestavljen iz ene ali milijonov celic. Genotoksični dejavniki so kemijske snovi in fizikalni dejavniki, ki so sposobni povzročiti mutacije in druge genetske spremembe v celicah živih organizmov. Dokazano je, da poškodbe DNA vodijo v nastanek raka in drugih kroničnih bolezni, medtem ko mutacije spolnih celic lahko vodijo v nastanek genetskih bolezni potomcev in zmanjšanje plodnosti (Venitt in Philips, 1995). Genotoksični dejavniki nimajo praga delovanja, kar pomeni, da tudi zelo majhne koncentracije lahko povzročijo genetske poškodbe in posledično mutacije ter rakava in druga kronična obolenja (Filipič, 2004).

Genotoksični dejavniki v pitni vodi so po svoji kemijski naravi lahko zelo različni. Med anorganske uvrščamo težke kovine (kadmij, svinec, krom), arzen in nitrate (Filipič, 2004).

Arzen je lahko naravnega izvora ali pa so vir pesticidi in druge snovi. Klasificiran je kot kancerogen za ljudi in povzroča raka kože ter drugih organov. Ima genotoksično delovanje, inducira nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti in zavira popraviljanje poškodb DNA (Filipič, 2004).

Prisotnost nitratov v podtalnici je posledica uporabe gnojil ali puščanja greznic. Sami po sebi niso genotoksični, vendar se v organizmu pretvorijo v kancerogene N-nitroso spojine in nitrite (Filipič, 2004). Nekatere raziskave so pokazale povezavo z rakom želodca in ne-Hodkinovim limfomom (Gulis in sod., 2002).

Pogosta onesnažila virov pitnih vod so tudi hlapne organske spojine (benzen, trikloretilen, toluen itn.), ki se uporabljajo kot topila, dodatki gorivom itn. (Filipič, 2004).

Med potencialna onesnažila pitne vode prav tako uvrščamo pesticide. V virih pitne vode se znajdejo predvsem težko razgradljivi pesticidi, kot so aldrin, endrin, alaklor, atrazin itn. V Sloveniji se v podtalnicah največkrat pojavlja herbicid atrazin in njegovi metaboliti (Filipič, 2004).

V novejšem času se med potencialna kancerogena onesnažila uvrščajo tudi zdravila in sredstva za osebno nego. Nekatera izmed njih so: klofibrat (regulator maščob), ibuprofen (protivnetno zdravilo), statini (uravnavanje holesterola), fluoksetin (antidepresiv), bleomicin (citostatik), β -estradiol (steroid) itn. Ugotovili so, da so močno prisotni v površinskih in podtalnih vodah. Čeprav so okoljske koncentracije zelo majhne (ng/L), so zadosti velike, da povzročijo estrogene učinke in razmnoževalne ter razvojne motnje pri različnih organizmih. Težava je v tem, da postopki čiščenja odpadnih vod in postopki obdelave pitne vode teh snovi vedno ne odstranijo. Zaenkrat še ni podatkov, ali majhne koncentracije teh snovi vplivajo na zdravje ljudi, vendar sta zaskrbljujoči dejstva, da so te

snovi učinkovite pri majhnih koncentracijah in da so v okolju zelo razširjene (Filipič, 2004).

Toksini alg/cianobakterij se vse pogosteje pojavljajo v virih pitnih vod. To je posledica vse pogostejših cvetenj površinskih vod, kar je rezultat onesnaževanja in segrevanja ozračja. V sladkih vodah so najpogostejši proizvajalci toksinov cianobakterije. Obstajajo epidemiološke raziskave, ki kažejo na povezanost zastrupitev in zbolevanje ljudi s prisotnostjo nekaterih cianobakterijskih toksinov v vodi (Filipič, 2004). Cianobakterijske vrste rodu *Anabaena* proizvajajo nevrotoksine imenovane anatoksini. Rod *Mycrocystis* je najbolj znan rod, ki proizvaja mikrocistine, ki so genotoksični hepatokancerogeni (Žegura in sod., 2003). Le-ti že v nanomolarnih koncentracijah povzročajo poškodbe DNA jetrnih celic (Filipič, 2004).

Ene izmed najpogostejših toksičnih snovi v pitni vodi so stranski produkti dezinfekcije (SPD). Za številne med njimi so ugotovili, da so genotoksični in da povzročajo raka pri testnih živalih. Epidemiološke raziskave so pokazale povezanost med SPD in rakom ledvic, verjetno tudi debelega črevesja in rektuma ter povečano tveganje za nastanek reproduktivnih in razvojnih nepravilnosti vključno s spontanimi splavi (Morris in sod., 1992; Klotz in Prysch, 1999). Po definiciji so SPD rezultat reakcije med dezinfekcijskim sredstvom (kemijskim ali fizikalnim) in prekursorji v viru vode. Nastanek SPD in njihova količina je odvisen od vrste ter količine dezinficiensa, vrste in količine prisotnih prekursorjev ter pogojev reakcije. Za dezinfekcijo se najpogosteje uporabljajo klor, ozon, klorov dioksid in kloramini (Morris in sod., 1992). Površinske vode vsebujejo številne organske snovi (npr. huminske kisline), ki so glavni prekursorji za nastanek SPD. Podtalnice vsebujejo manj organskih snovi, zato pri kloriranju le-teh nastaja manj SPD. Če nepredelana voda vsebuje bromidne ione, lahko tekom kloriranja nastanejo stranski produkti, ki vsebujejo brom (IARC, 1991). Skupine SPD, ki jih najbolj intenzivno raziskujejo, so trihalometani (trihalomethanes: THM), halogenirane očetne kisline (halogenated acetic acids: HAA) in klorirani furanoni (chlorinated furanones: CHF) (Komulainen, 2004).

Od THM je kloroform ocenjen kot najbolj kancerogen za poskusne živali. Mednarodna agencija za raziskave raka (International Agency for research on cancer: IARC) je opredelila kloroform kot potencialno kancerogen za ljudi (IARC, 1999). Pri poskusnih živalih povzroča tumorje jeter in ledvic. V primerjavi s človekom je pri glodalcih hitrost metabolizma kloroforma v jetrih večja. Zaenkrat je znano, da kloroform povzroča hipometilacijo DNA in pospešuje razmnoževanje celic v jetrih, vendar predvidevajo, da je to samo eden izmed mehanizmov kancerogeneze (Coffin in sod., 2000). Med THM štejemo še klorodibrom metan, bromodiklor metan in bromoform. Testiranja na poskusnih živalih s temi snovmi so pokazala podobne rezultate kot pri testiranju s kloroformom (Komulainen, 2004).

Od HAA sta najbolj raziskani trikloroocetna kislina (trichloroacetic acid: TCA) in dikloroocetna kislina (dichloroacetic acid: DCA). Glede na to, da se TCA uporablja tudi v industriji ni nujno, da je njena prisotnost v pitni vodi posledica kloriranja. Pri poskusnih živalih je pokazala hepatokancerogeno delovanje. Predvideva se, da je pri miših mehanizem kancerogeneze proliferacija peroksisomov v jetrih (IARC, 1995). Tudi DCA

je hepatokancerogena za miši. Eden izmed vzrokov kancerogeneze je najverjetneje prav tako proliferacija peroksisomov v jetrih, skupaj z drugimi mehanizmi (IARC, 1995).

Med CHF-ji je najbolj preučevana spojina MX ali 3-klor-4-(diklormetil)-5-hidroksi-2(5*H*)-furanon. Amesov test je pokazal, da je ta spojina zelo mutagena, saj ji lahko pripišemo do 60 % mutagenosti klorirane vode (Kronberg in Vartiainen, 1988). Pri poskusnih živalih MX povzroča poškodbe DNA, pri celični kulturi podganjih limfocitov pa povzroča izmenjavo sestrskih kromatid, kar nakazuje na genotoksičnost MX *in vivo* (Hirose in sod., 1999).

2.2 PREVERJANJE KAKOVOSTI PITNE VODE: BIOLOŠKI TESTI

Pitna voda v Sloveniji mora ustrezati Pravilniku o pitni vodi, ki izhaja v Uradnem listu Republike Slovenije. Spremljanje pitne vode in preverjanje njene kakovosti imenujemo monitoring (Pravilnik o pitni vodi, 2004). Kakovost pitne vode v Sloveniji spremlja in preverja Agencija Republike Slovenije za okolje. Monitoring pitne vode vključuje mikrobiološke in fizikalno-kemijske analize (Program monitoringa ..., 2004).

Na videz čista voda primerne okusa in nadzorovana (kakovost) s strani pooblaščenih ustanov še ne pomeni, da je tudi zdravstveno neoporečna. Večina onesnažil je v vodi prisotna v zelo majhnih koncentracijah, ki jih je težko dokazati. Tudi najboljša fizikalno-kemijska analiza lahko poda rezultate le o količini iskanih snovi, nič pa ne pove o njihovih medsebojnih vplivih, ki lahko povzročijo povečane ali zmanjšane biološke učinke (npr. sinergizem, aditivnost, antagonizem) glede na vsoto učinkov posameznih snovi (Helma in sod., 1998). V pitni vodi lahko ostanejo nekatere snovi, ki jih s kemijskimi analizami ne ugotavljamo, so pa strupene ali celo genotoksične (Rand, 1995). Nekatere snovi v okolju niso toksične, po vstopu v organizem pa pride do njihove bioaktivacije in toksičnih učinkov (Abel, 1996). Zaradi vseh omenjenih razlogov se počasi začenjajo uporabljati nove metode, ki dajejo celovite odgovore o genotoksičnih, citotoksičnih, hormonskih in imunotoksičnih učinkih vseh kemikalij, ki so prisotne v nekem mediju. Takšne metode imenujemo biološki testi. Mnoga združenja priporočajo uporabo bioloških testov kot standardnih metod v monitoringu (Ameriško združenje javnega zdravstva - American Public Health Association: APHA, Ameriško vodovodno združenje - American Water Works Association: AWWA, in Federacija vodnega okolja - Water Environment Federation: WEF) (Standard Methods for ..., 1998). V monitoringu v Sloveniji se biološki testi še ne uporabljajo (Pravilnik o pitni vodi, 2004).

Pri bioloških testih žive organizme ali celice izpostavimo testnim vzorcem in spremljamo njihov odgovor. Osnovna predpostavka testov genotoksičnosti je, da je osnova dednega materiala enaka pri vseh živih bitjih. Glede na vrsto genetskih poškodb, ki jih ti testi zaznavajo, jih delimo na tiste, ki zaznavajo primarne poškodbe DNA (izmenjava DNA med sestrskimi kromatidami, prelomi DNA, rekombinacije) in ki zaznavajo mutacije ter kromosomske aberacije (Filipič, 2004). Kot citotoksičen učinek se pri večini standardnih biotestov upošteva 50 % smrtnost, negibnost ali inhibicija rasti (Dizer in sod., 2002). Kot testne organizme uporabljamo bakterije, kvasovke, plesni, kulture sesalskih celic, rastline in za nekatere specifične teste tudi poskusne živali. Uporabljajo se organizmi oziroma celični sistemi, kjer v kratkem času dobimo več generacij iz velike populacije posameznih celic, kar je predpogoj, da lahko spremljamo povečano pogostnost genetskih sprememb. V

primerjavi z živalskimi testi so mnogo enostavnejši in hitrejši. Čas trajanja je od nekaj dni do nekaj tednov (Filipič, 2004).

Za preučevanje citotoksičnosti lahko uporabimo teste, kot so test MTT, bioluminiscenčni test itn., s katerimi lahko spremljamo preživetje celic ali organizmov (Mosmann, 1983; Dizer in sod., 2002). Za preučevanje genotoksičnosti z biološkimi testi lahko uporabimo alkalno različico kometnega testa, Amesov test, test mikrojedera itn. (Maron in Ames, 1984; Singh in sod., 1988; Uhl in sod., 1999; Monarca in sod., 1998).

Težava pri uporabi bioloških testov za ocenjevanje tveganja za nastanek raka zaradi prisotnosti genotoksičnih kancerogenov v pitni vodi je v tem, da so ta onesnažila prisotna v zelo majhnih koncentracijah, ki so navadno pod mejo detekcije bioloških testov. Potrebno je upoštevati, da so ljudje, ki uživajo kontaminirano pitno vodo, izpostavljeni majhnim koncentracijam onesnažil v daljšem časovnem obdobju. Zaradi tega se za testiranje genotoksičnosti vzorci pitnih vod predhodno koncentrirajo z ustrežno metodo (liofilizacija, ekstrakcija s topili ipd.). Največ se uporablja absorpcija raztopljenih organskih snovi na nepolarne smole (Amberlit XAD, Serdolit), ki ji sledi elucija z ustreznimi organskimi topili. Raziskave so pokazale, da je genotoksičnost pitnih vod največkrat povezana s kislimi organskimi snovmi, ki so v glavnem produkti kloriranja. Le-ti so pri nevtralnem ali rahlo bazičnem pH v ionizirani obliki, zato se pred koncentriranjem z absorpcijo na nepolarne smole vodo nakisa, da se zavre ionizacija. Nevtralne organske snovi se vežejo neodvisno od pH. S tem postopkom ekstrahiramo najširši spekter raztopljenih organskih snovi (Filipič, 2004).

Še ena omejitev bioloških testov je ta, da ne pokažejo, katera oziroma katere spojine so odgovorne za učinek preiskovane snovi na testni organizem (Filipič, 2004).

2.2.1 Test MTT

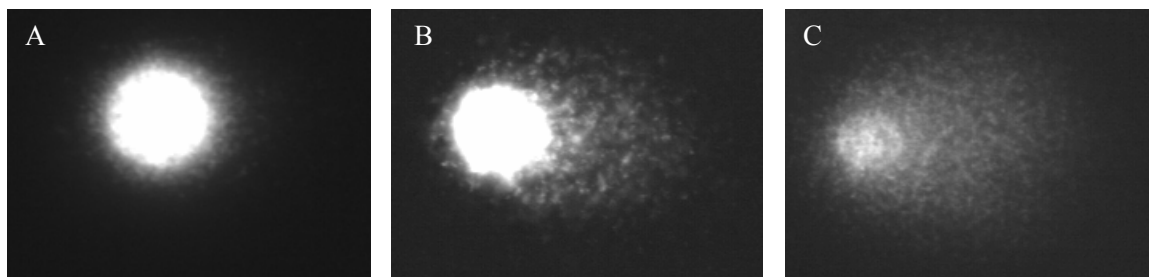
Pri mnogih biotestih so potrebne meritve preživetja in proliferacije celic. Ena izmed možnosti so kolorimetrični testi. Le-ti temeljijo na pretvorbi brezbarvnega substrata v barvni produkt v prisotnosti živih celic. Eden izmed hitrih kolorimetričnih testov, pri katerem je substrat tetrazolijeva sol, je test MTT. MTT ali 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid je rumena vodoodporna substanca. Ko pride v stik z metabolo aktivnimi celicami, jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza reducira v vijoličaste kristale formazana, ki se ne topijo v vodi, topni pa so v dimetil sulfoksidu (DMSO), izopropanolu in podobnih topilih. Optična gostota je sorazmerna s številom celic pri homogeni celični populaciji in jo merimo pri valovni dolžini 570 in referenčni valovni dolžini 690 nm. Ta linearnost pokriva zelo široko območje gostote celic iz česar je razvidno, da test lahko zazna zelo majhno število živih celic (Mosmann, 1983).

Glavna prednost testa je hitrost. Test lahko odčitamo že par minut po dodatku topila v katerem se formazan raztaplja. Sprememba barve je opazna tudi s prostim očesom, kar je zelo koristno, če rezultate potrebujemo takoj (Mosmann, 1983). Slabost metode je v tem, da je primerna samo za celice, ki rastejo v enem sloju ali suspenziji (Mosmann, 1983).

2.2.2 Alkalna različica kometnega testa

Alkalno različico kometnega testa (v nadaljevanju kometni test), ki jo imenujemo tudi test elektroforeze posameznih celic (SCGE: single-cell gel electrophoresis), sta razvila Östling in Johanson leta 1984 (Östling in Johanson, 1984). Celice pomešane z agarozo sta izpostavila elektroforezi pri nevtralnih pogojih, kar je omogočilo zaznavanje prelomov obeh verig DNA (double-strand breaks: DSB). Nekaj let zatem (1988) so Singh in sod. uporabili alkalne pogoje pri testu ($\text{pH} > 13$), kar je omogočilo tudi zaznavanje preloma ene verige (single-strand breaks: SSB), alkalno labilnih mest (alkali labile sites: ALS) in prelomov DNA, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu popravljanja poškodb DNA z izrezovanjem baz ali nukleotidov (Tice in sod., 2000). Pozneje so Olive in sod. opisali različico testa z elektroforezo pri blagih alkalnih pogojih ($\text{pH} = 12,3$), pri kateri se izrazijo ALS, ne pa tudi SSB (Olive in sod., 1990).

Pri različici kometnega testa, ki ga danes večinoma uporabljamo, posamezne celice pomešamo z agarozo, naneseemo na objektna stekelca, liziramo celice z detergenti in veliko koncentracijo soli pri $\text{pH} 10$, potem izpostavimo elektroforezi za kratek čas pri alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13$). Med lizo pride do odstranjevanja celične vsebine, ostane jedro s superzvito DNA. Pri alkalnih pogojih se DNA začne odvijati na mestih prelomov verig. Pri celicah, ki imajo bolj poškodovano DNA, pride do povečane migracije DNA iz jedra proti anodi, kar na videz spominja na rep kometa, zaradi česar je test dobil ime (Slika 1). DNA barvamo s fluorescentnim barvilom, ki se vrine med bazne pare DNA, opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom in nato ocenimo poškodbe DNA (Collins in sod., 1995). Barvila, ki se najpogosteje uporabljajo, so etidijev bromid, propidijev jodid in DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol) (Žegura in Filipič, 2004). Če s kometnim testom zaznamo veliko poškodb DNA, to lahko pomeni, da je DNA zelo poškodovana ali pa je to posledica učinkovitega popravljanja poškodb DNA (Collins in sod., 1997). Pri $\text{pH} 12,6$ in višjem se ALS hitro spremenijo v SSB. Ker večina genotoksičnih snovi inducira večje število SSB kot ALS in DSB, se alkalna različica priporoča kot optimalna za ugotavljanje genotoksičnosti (Tice in sod., 2000).



Slika 1: Fotografije jeter celic HepG2 po kometnem testu, ki prikazujejo različno poškodovano DNA (fotografirala Žegura B.); A: rep kometa je skoraj neopazen, kar pomeni, da je DNA zelo malo poškodovana; B: več DNA je migriralo iz jedra v rep kometa, kar pomeni, da je DNA bolj poškodovana; C: skoraj vsa DNA je v repu kometa, kar pomeni, da je veliko DNA poškodovane.

Za analizo kometov je dostopnih več računalniških programov. Parametri, ki se najpogosteje uporabljajo za izražanje poškodb DNA, so odstotek DNA, ki je migrirala iz glave kometa v rep kometa, dolžina repa (razdalja od DNA v glavi kometa do zadnjega fragmenta DNA v repu, izražena v mikrometrih), Olivin repni moment (produkt odstotka DNA v repu in razdalje od centra repa kometa do centra glave kometa) in razširjeni repni moment (produkt DNA v repu in dolžine repa) (Žegura in Filipič, 2004).

Občutljivost testa lahko povečamo z uporabo inhibitorjev popravljanja DNA poškodb, kar povzroči kopičenje prelomov verig DNA (Collins in sod., 1993).

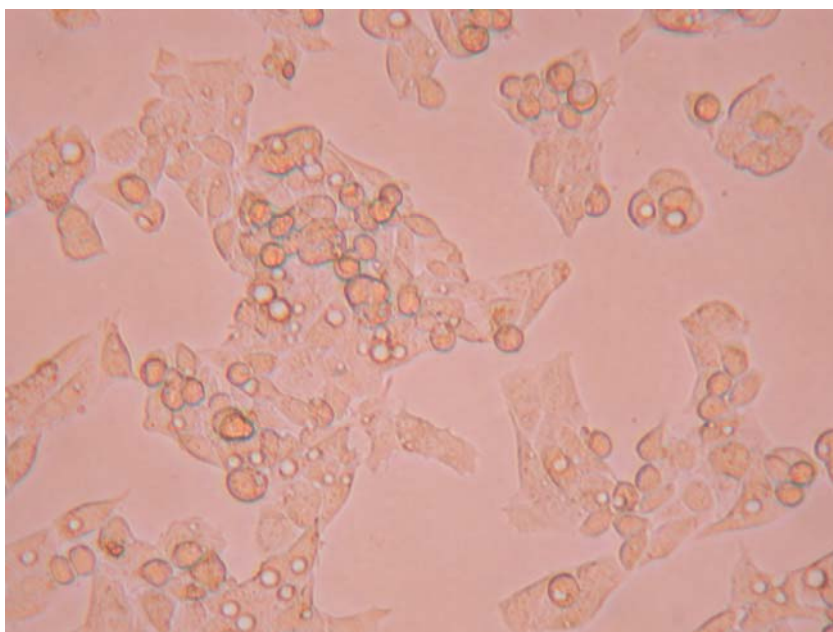
V primerjavi z drugimi testi za ugotavljanje genotoksičnosti, so prednosti kometnega testa predvsem v veliki občutljivosti, kar je pomembno pri ugotavljanju majhnega števila poškodb DNA, fleksibilnosti, manjši ceni, enostavnosti, relativno majhni količini testirane snovi, kratkem času potrebnim za izvedbo testa (Tice in sod., 2000) in v možnosti uporabe skoraj vseh evkariontskih celičnih kultur (Rojas in sod., 1999).

V zadnjih letih se je uporaba kometnega testa povečala in razširila na različna področja. V *in vitro* izvedbi test lahko uporabljamo za ugotavljanje genotoksičnosti, predvsem s sesalskimi celičnimi kulturami in človeškimi limfociti, lahko pa tudi s celičnimi kulturami, ki izvirajo iz drugih tkiv. V medicini se uporablja za ocenjevanje poškodb DNA tumorskih celic pri bolnikih z rakastimi obolenji (Hodgkinova bolezen, ne-Hodgkinov limfom, karcinom skvamoznih celic in adenokarcinom), ki se zdravijo z obsevanjem. Obstajajo ideje, da bi kometni test uporabljali za predvidevanje odziva bolnikov na kemoterapijo ali za preučevanje mehanizma aktivacije novoodkritih zdravil (Rojas in sod., 1999).

Ta test se uporablja tudi za preučevanje popravljalnih procesov DNA, v okoljskem biomonitoringu in monitoringu pri ljudeh (monitoring posameznikov izpostavljenih različnim dejavnikom na delovnem mestu ali okolju) (Rojas in sod., 1999).

2.3 CELIČNA KULTURA HEPG2

Zaradi velikega števila encimov, ki jih izražajo, so jetra glavno mesto biotransformacije ksenobiotikov. Prav zaradi tega se celične kulture, ki izvirajo iz jetrnih celic, veliko uporabljajo v biomedicinskih raziskavah metabolizma ksenobiotikov, vključno s preučevanjem genotoksičnosti. Od celičnih kultur takšnega izvora je HepG2 ena izmed najbolj prilagodljivih. Leta 1972 so jo Aden in sod. izolirali iz primarnega hepatoblastoma 11-letnega argentinskega dečka. Značilnost celične kulture HepG2 je, da ima ohranjene mnoge funkcije, ki se z gojenjem pri primarni kulturi hepatocitov izgubijo. Ena izmed takšnih funkcij je izločanje velikih plazemskih proteinov (Knowles in sod., 1980; Aden in sod., 1979). Celice so ohranile metabolno aktivnost in imajo aktivne metabolne encime I faze (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP2E1) in II faze (glutation-S-transferaza, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza, glukuronosiltransferaza), ki igrajo ključno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenov, ki delujejo na DNA (Knasmüller in sod., 1998). Raziskave so pokazale, da so te celice dobri pokazatelji genotoksičnosti in kancerogenosti različnih substanc. Uporabljajo jih kot modele pri SCGE in testu mikrojedr, vendar morajo pogoji biti standardizirani (Kransmüller in sod., 2004).



Slika 2: Fotografija celične kulture HepG2 (fotografirala Žegura B.)

2.4 RAZISKAVE CITOTOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI

V Sloveniji še ni sistematskih raziskav genotoksičnosti pitnih in embaliranih vod, čeprav posamezne raziskave obstajajo. Filipič in sod. (2004) so izvedli raziskavo mutagenosti ustekleničenih in izvirskih vod. Testiranje so izvedli s standardnim Amesovim testom na bakteriji *Salmonella typhimurium*. Amesov test povratnih mutacij je metoda za določanje kemijskih substanc, ki povzročajo poškodbe genov, ki vodijo v mutacije. Rezultati, ki so jih dobili, so pokazali, da noben od vzorcev ni bil mutagen. Na žalost je omejitev bakterijskih testov in večine testov s sesalskimi celicami, da ne izražajo encimov za metabolno pretvorbo posrednih mutagenov v končno obliko. Zato so nadaljnje raziskave izvedli na človeških jetrnih celicah HepG2, ki tudi *in vitro* ohranjajo aktivnosti encimov I in II faze presnove. Te celice so sposobne pretvarjati indirektno mutagene v končno mutageno obliko brez dodajanja encimov za aktivacijo promutagenov (Knassmüller in sod., 2004). Iz tega razloga bolj odražajo dogajanja v človeškem organizmu in so rezultati testiranja na teh celicah bolj relevantni za predvidevanje učinkov v človeškem organizmu kot rezultati dobljeni z drugimi testnimi sistemi, kjer so kot testni organizmi uporabljene bakterije ali rastline. Pri omenjeni raziskavi so s kometnim testom ugotavljali sposobnost stekleničenih vod (Oda, Izvir, Dana), da povzročijo poškodbe DNA na celicah HepG2. Ugotovili so, da noben od vzorcev ni povzročil povečanja poškodb DNA. V tej raziskavi so z Amesovim testom testirali tudi mutagenost vzorcev, testiranih v naši diplomski nalogi. Uporabili so 10 000 x koncentrirane vzorce in so testirali 3 koncentracije vodnih ekstraktov: 1, 10 in 100 μL /ploščo. Rezultati so pokazali, da koncentrirani vzorci mineralnih in izvirskih vod niso bili mutageni v bakterijskem testnem sistemu na sevih bakterije *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100 (Filipič, 2004).

V drugi študiji so preizkusili različne teste genotoksičnosti na vzorcih pitne vode iz treh zajetij na območju Ljubljane. Kometni test so izvajali na človeških celičnih kulturah

HepG2 in Caco2 ter na celicah praživali *Tetrahymena thermophila*. Vzoredno so genotoksičnost ocenjevali z Amesovim testom na bakteriji *Salmonella typhimurium* (sevi: TA97a, TA100, in TA1535). Rezultati tega testa niso pokazali genotoksičnega delovanja, medtem ko so rezultati dobljeni z alkalno različico kometnega testa pokazali potencialno genotoksično aktivnost na različnih celičnih kulturah (Lah in sod., 2005).

Monarca in sod. (1998) so preučevali mutagenost vzorcev neobdelane in pitne vode iz jezera, ki so bili odvzeti v dveh časovnih obdobjih, poleti in pozimi. Pri tem so uporabili Amesov test na bakteriji *Salmonella typhimurium* (seva: TA98 in TA100) in test mikrojedera na rastlini *Tradescantia*. S pomočjo tega testa lahko ugotavljamo, ali neka snov deluje klastogeno, povzroča spremembe v strukturi kromosoma, kjer pride do pridobitve, izgube ali preureditve delov kromosoma. Rezultati Amesovega testa so pokazali, da so vzorci neobdelane vode vsebovali bakterijske mutagene. Po dezinfekciji vode s klorovim dioksidom je bila mutagenost vode zmanjšana, prav tako po dezinfekciji vode s kombinacijo klorovega dioksida in ozona. Nasprotno rezultate so dobili po dezinfekciji z NaClO, kjer se je mutagenost vzorcev, ki so jih odvzeli pozimi, povečala. Z nobeno neobdelano vodo ni prišlo do povečanega števila mikrojedera, medtem ko se je število mikrojedera povečalo v primeru vode z NaClO, pri vzorcih tretiranih z drugimi dezinfekcijskimi sredstvi pa se je število mikrojedera zmanjšalo v primerjavi s kontrolo. Iz rezultatov raziskave lahko zaključimo, da je za kvaliteto pitne vode zelo pomembno, katero dezinfekcijsko sredstvo bo uporabljeno v ta namen. Ustrezna alternativa za dezinfekcijo z NaClO je dezinfekcija s klorovim dioksidom in ozonom (Monarca in sod., 1998).

V drugi študiji so preverjali genotoksičnost vodovodne klorirane in neobdelane (neklorirane) vode treh mest v Koreji (Seoul, Taejon in Suwon) s pomočjo Amesovega testa na bakteriji *Salmonella typhimurium* (seva: TA98 in TA100) in s testom mikrojedera na kostnem mozgu miši BDF1. Rezultati obeh testov so pokazali, da so vzorci vodovodnih vod iz vseh treh mest delovali genotoksično. Pri testiranju neobdelane (neklorirane) vode, rezultati niso nakazovali genotoksičnega delovanja vode (Toxicity of..., 1995), iz česar je razvidno, da je po vsej verjetnosti vzrok mutagenega delovanja vodovodne vode kloriranje (Park in sod., 2000).

Citotoksično in genotoksično delovanje površinskih rečnih vod in odpadnih vod so ugotavljali z merjenjem bioluminiscence na bakteriji *Photobacterium phosphoreum*, SOS/*umu* testa na bakteriji *Salmonella typhimurium*, sev TA 1535/ pSK1002 in merjenja acetilholinesterazne aktivnosti v mišičnem tkivu ter testa odvijanja DNA v jetrnem tkivu postrvi *Onchorynchus mykiss*. Vzorci testiranih rečnih vod niso inhibirali bioluminiscence pri izbrani bakteriji, kot tudi ne povišali β -galaktozidazno aktivnost bakterij pri SOS/*umu* testu. Rezultati testiranja z odpadnimi vodami pa so pokazali, da te vode inhibirajo oddajanje svetlobe pri bioluminiscentnem testu za več kot 20 %, kot tudi rast bakterij pri SOS/*umu* testu. Rezultati, dobljeni z *umu*-testom, so bili pri večini rečnih vzorcev pod mejo genotoksičnosti, razen tistih vzorcev, ki so bili odvzeti navzdol od mesta izpusta odpadnih vod v reko. Poleg tega so ti vzorci inhibirali tudi acetilholinesterazno aktivnost v mišičnem tkivu in značilno povečali fragmentacijo DNA v jetrnem tkivu testirane vrste postrvi. Vzorci rečnih vod niso bili citotoksični kot tudi ne genotoksični na bakteriji *Salmonella typhimurium* (Dizer in sod., 2002).

Na Kitajskem so ugotavljali, ali ima klorirana pitna voda iz preiskovanega jezera (Dong) in reke (Yangtze) genotoksičen učinek na celično kulturo HepG2 s pomočjo kometnega testa in testa mikrojeder. Rezultati so pokazali, da so vsi vzorci povzročili značilno povečano migracijo DNA pri kulturi HepG2. Tudi število mikrojeder se je po tretiranju kulture HepG2 s klorirano pitno vodo povišalo. Količina poškodb DNA se je spreminjala v odvisnosti od letnega časa odvzema vzorcev. Rezultati so pokazali, da vzorci odvzeti poleti (avgust), povzročajo značilno več poškodb DNA v primerjavi z vzorci odvzetimi tekom hladnejšega dela leta (marec) (Lu in sod., 2004).

Obstajajo tudi študije, kjer so raziskovali učinek embalaže mineralne vode na organizme. Biscardi in sod. (2003) so spremljali sproščanje mutagenih in kancerogenih snovi v mineralno vodo (naravno in gazirano) iz embalaže narejene iz polietilen tereftalata (polyethylene terephthalate: PET). Pri tem so uporabili test mutagenosti na rastlini *Tradescantia*, kjer so ugotavljali nastanek mikrojeder v celicah peloda omenjene rastline in kometni test na človeških levkocitih. Za detekcijo migrirajočih snovi, ki se sproščajo iz embalaže, so uporabili plinsko kromatografijo skupaj z masno spektrometrijo. Vzorci vod so bili skladiščeni v PET embalaži v trajanju od 1 do 12 mesecev. Testirali so tudi neobdelano neustekleničeno vodo in vodovodno vodo. Vsak mesec so naključno vzorčili vodo in jo testirali. Povečanje tvorbe mikrojeder so zaznali samo pri vzorcih, ki so bili skladiščeni 2 meseca. Rezultati testiranja neobdelane vode so bili negativni pri obeh testih, medtem ko so bili vzorci vodovodne vode genotoksični. Po 9 mesecih skladiščenja v PET embalaži so analize s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo pokazale prisotnost negenotoksičnega hepatokancerogena, di (2-etilheksil) ftalata (Biscardi in sod., 2003). Wegelin in sod. (2001) so ugotovili, da se iz PET embalaže v vodo lahko sproščajo tudi acetaldehid in formaldehid, v odvisnosti od pogojev skladiščenja (predvsem, če se voda skladišči na sončni svetlobi) (Wegelin in sod., 2001).

Gilli in sod. (2005) so preučevali toksičnost pitne vode z uporabo naprave s semipermeabilno membrano. Le-ta posnema difuzijski transport hidrofobnih organskih snovi skozi biološke membrane. Naredili so monitoring površinskih vod, ki se predelajo, in nato pitnih vod, ki iz teh nastanejo. Vzorce dobljene s to metodo so ekstrahirali in testirali s testom akutne toksičnosti Microtox ter z Amesovim testom. Vzorce so tudi analizirali s plinsko kromatografijo skupaj z masno spektrometrijo, da bi ugotovili prisotnost organskih onesnažil, predvsem policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAO). Rezultati so pokazali, da so koncentracije PAO manjše pri površinskih vodah, ki se potem predelajo. Ne glede na to, je bila toksičnost vseeno podobna pri obeh vodah, površinskih in pitnih. Vzrok za to bi lahko bila prisotnost drugih onesnažil v vzorcih, ne samo PAO (Gilli in sod., 2005).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORCI

Za vsak posamezan vzorec smo skoncentrirali 50 litrov vode. Pred koncentriranjem smo vodo nakisali s HCl (pH 2). Stekleno kolono smo napolnili z 12 g suhe smole (Serdolit PADIV, Serva, Heidelberh, Nemčija), pretok vzorca prek smole smo uravnali na 40 mL/min. Koncentriranje posameznega vzorca je trajalo približno 20 ur. Absorbirane organske snovi smo eluirali s 300 mL etilacetata s 3 urno ekstrakcijo po Soxhletu, topilo smo odstranili z uparevanjem eluata pri 40 °C pri znižanem tlaku do manjšega volumna ter nato do suhega s tokom dušika. Dobljeni suhi ekstrakt smo raztopili v 5 mL DMSO, kar predstavlja 10 000 x koncentrirane vzorce. Vodo so skoncentrirali na Fakulteti za farmacijo pod vodstvom dr. Aleša Mlinariča.

Koncentrirane vzorce smo v laboratoriju shranili pri temperaturi -20 °C.

Vzorce naravnih in mineralnih vod smo oštevilčili s številkami od 1-14 (Preglednica 1).

Preglednica 1: Oznake vzorcev

Vrsta vode	Številka vzorca
Klorirana vodovodna voda v plastenkah	1
Izvirna voda Oda v steklenicah	2
Mineralna voda v plastenkah	3
Deklorirana vodovodna voda v plastenkah	4
Izvirna voda Oda v plastenkah	5
Izvirna voda Izvir v 1,5 L plastenkah	6
Mineralna voda v steklenici z označenim rokom uporabe do 8.01.2005	7
Mineralna voda v steklenicah z označenim rokom uporabe do 2.09.2005	8
Mineralna voda v plastenkah z označenim rokom uporabe do 25.08.2005 in 2.09.2005	9
Mineralna voda v steklenicah z označenim rokom uporabe do 4.11.2005	10
Mineralna voda v steklenicah z označenim rokom uporabe do 4.07.2005	11
Izvirna voda Izvir v 19 L balonih	12
Mineralna voda v plastenkah z označenim rokom uporabe do 24.09.2005 in 14.10.2005	13
Mineralna voda v plastenkah	14

3.2 CELIČNA KULTURA HEPG2

Celično kulturo HepG2 smo gojili v plastenkah za gojenje celičnih kultur (Corning Costar Corporation, New York, ZDA), v mediju za celične kulture HepG2 (Preglednica 2), pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂.

Celično linijo HepG2 je poklonil dr. Firouz Darroudi (Oddelek za kemijsko mutagenozo; Univerza v Leidnu, Nizozemska) in jo hrani Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka, Večna pot 111, Ljubljana.

Preglednica 2: Sestavine medija za gojenje celične kulture HepG2 (50 mL)

Sestavine	Proizvajalec	Kataložna številka	Količina
Penicilin/streptomycin (10 ⁴ E/ml)	<i>EuroClone</i>	<i>ECB 3001 D</i>	0,5 mL
200 mM L-glutamin	EuroClone	ECD 300 D	1 mL
Fetalni goveji serum (FBS)	EuroClone	EU 5002003	7,5 mL
Williams medij E	Sigma	W-1878	41 mL

3.3 TEST MTT

Za testiranje citotoksičnosti vzorcev vod smo uporabili test MTT, po Mosmannu (1983) z manjšimi modifikacijami. Celice HepG2 smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm². Pri 80 % preraščenosti plošče smo celice presadili; odstranili smo medij in celice sprali z 1x PBS. Odlepljali smo jih z 0,1 % tripsinom za celice HepG2. Ko so se celice odlepile, smo jim dodali medij, da smo ustavili delovanje tripsina. Nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v mediju. Celično suspenzijo smo potem 8-10 x previdno potegnili s pomočjo brizge skozi injekcijsko iglo in na ta način dobili suspenzijo posameznih celic. Nato smo jih nasadili na mikrotitersko ploščo s 96 luknjicami (gostota 10 000 celic/luknjico kar ustreza 50 000 celic/mL). Število celic smo določali s štetjem v Türkovi komori. Predhodno smo celice barvali z raztopino tripan modrega, v razmerju 1:5 (10 µL celične suspenzije in 40 µL barvila).

Po nasaditvi smo celice inkubirali 3-4 ure, da so se pritrdile. Nato smo odstranili celični medij in ga zamenjali s svežim medijem z različnimi koncentracijami vzorcev oziroma s kontrolo. Testirali smo 3 koncentracije vzorcev: 0,1, 1 in 10 µL koncentrata/mL, kar je ekvivalentno 1, 10 in 100 mL vzorca nekoncentrirane vode/mL. Končna koncentracija DMSO v vzorcih je bila 1 %. Naredili smo kontrolo medija, kjer smo celice izpostavili le celičnemu mediju in kontrolo topila, kjer smo celice izpostavili 1 % DMSO, da bi izločili morebiten vpliv topila na celice. Po menjavi medija smo celice inkubirali 20 ur pri 37 °C v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Nato smo dodali 10 % reagent MTT (5 mg/mL). Celice smo v prisotnosti MTT inkubirali še nadaljne 3 ure. Nato smo odstranili supernatant in pazili, da nismo odstranili formazanskih kristalov. Kristale smo nato raztopili v 200 µL DMSO. Po končanem postopku smo merili optično gostoto (OD) pri valovni dolžini 570 nm in referenčnem filtru 690 nm. Količina nastalih formazanskih kristalov oziroma izmerjena OD pri svetlobi valovne dolžine 570 nm z referenčnim filtrom 690 nm je sorazmerna številu živih celic. Vsako koncentracijo vzorca smo naredili v 5 paralelah.

Rezultati so prikazani kot odstotek preživetja celic, ki so bile izpostavljene vzorcem v primerjavi s kontrolno skupino. Odstotek preživetja smo izračunali po naslednji formuli:

$$\text{Odstotek preživetja} = (\text{OD vzorca})/(\text{OD kontrolne skupine}) * 100 \quad \dots(1)$$

OD vzorca: povprečna vrednost OD (570/690) 5 paralel vzorca (celic, tretiranih z vzorcem)

OD kontrolne skupine: povprečna vrednost OD (570/690) 5 paralel kontrolne skupine (celic, tretiranih s kontrolo).

Pri analizi rezultatov smo uporabili program SigmaStat 3.0 (SPSS, Čikago, ZDA). Za analizo razlik med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis).

3.4 KOMETNI TEST

Kometni test smo izvedli po postopku, kot ga je opisal Singh (1988) z manjšimi modifikacijami. Celice HepG2 smo gojili v platenkah za gojenje celičnih kultur s površino 75 cm². Pri 80 % preraščenosti plošče smo odstranili medij, celice sprali z 1x PBS in jih poželi z 0,1 % tripsinom za celice HepG2. Ko so se celice odlepili, smo jim dodali medij, da smo ustavili delovanje tripsina. Nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v mediju. Pri kometnem testu potrebujemo posamezne celice, zato smo celično suspenzijo 8-10 x previdno potegnili s pomočjo brizge skozi injekcijsko iglo.

Celice smo nasadili na plošče s 6 luknjami. Po 3-4 urah, ko so se celice pritrdile, smo jim zamenjali serumski medij s koncentriranimi vzorci in kontrolami. Testirali smo 3 koncentracije vzorcev: 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL, kar je ekvivalentno 0,1, 1 in 10 mL vzorca nekoncentrirane vode/mL. Končna koncentracija DMSO v vzorcih je bila 0,1 %. Naredili smo kontrolo medija (celice smo izpostavili le celičnemu mediju) in kontrolo topila (celice smo izpostavili 0,1 % DMSO v celičnem mediju). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili mutagen benzo(a)piren (B(a)P) s 30 µM koncentracijo. B(a)P smo izbrali kot pozitivno kontrolo, zato ker se nahaja v okolju kot onesnažilo in so organizmi lahko v vsakdanjem življenju v stiku z njim. Za vsako koncentracijo vzorcev, pozitivno in obe negativni kontroli, smo naredili 3 neodvisne poskuse. Po zamenjavi medija smo celice inkubirali 20 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂.

3.4.1 Priprava in nanos celične suspenzije na objektna stekelca

Po 20 urah inkubacije celic z vzorci, smo celice poželi. Celicam smo odstranili medij, jih sprali z 1x PBS in dodali 0,1 % tripsin. Ko so se celice odlepili od podlage, smo jim dodali svež medij in jih nato centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo celicam odstranili supernatant in jih resuspendirali v 60 µL medija. Na peskana objektna stekelca (Gerhard Menzel Glastearbeitung swerk, Brammschweg, Nemčija), ki smo jih pred uporabo čez noč namočili v metanolu, da smo jih razmastili, smo najprej nanесли 80 µL 1 % agaroze z normalno temperaturo taljenja (normal melting point agarose: NMP agarosa) in agarozo pokrili s krovnim stekelcem. Objektnik smo za 5 minut položili na hladno (4 °C), da se je agarosa strdila. Nato smo odstranili krovna stekelca in nanесли drugo plast agaroze, ki je vsebovala 70 µL 1 % agaroze z nižjo točko taljenja (low melting point agarose: LMP agarosa) pomešane s 30 µL celične suspenzije. Objektnike smo pokrili s krovnimi stekelci in jih položili na hladno za 5 minut. Pred začetkom testa smo obe agarosi raztopili v mediju brez seruma z mešanjem in segrevanjem do vrelišča.

3.4.2 Alkalna liza celic

Objektnim stekelcem s celicami smo odstranili krovnike in jih potopili v raztopino za liziranje (pH 10) najmanj za 1 uro pri 4 °C v temi. Zaradi visokega pH (10) se razgradijo proteini in RNA (ribonukleinska kislina), detergenti pa razgradijo celične membrane.

3.4.3 Odvijanje DNA in elektroforeza

Po končanem liziranju celic smo stekelca preložili v elektroforetsko kadičko, enega zraven drugega, tako da so bili deli z gelom obrnjeni v isto smer (proti anodi). Prelili smo jih s sveže pripravljenim na 4 °C ohlajenim elektroforetskim pufrom z visokim pH (13). Alkalno odvijanje je potekalo 20 minut. Temu je sledila elektroforeza. DNA smo izpostavili električnem polju pri napetosti 25 V (0,5-1 V/cm). Tok 300 mA smo uravnali z gladino elektroforetskega pufra. Elektroforeza je potekala 20 minut pri 10 °C v temi.

3.4.4 Nevtralizacija

Po končani elektroforezi smo stekelca preložili v kadičko z nevtralizacijskim pufrom za 15 minut na 4 °C v temi. Do mikroskopiranja smo objektna stekelca shranjevali v plastični kadički, obloženi z vlažno staničevino. S tem smo preprečili, da bi se geli izsušili.

3.4.5 Slikanje jeder celic

Pred mikroskopiranjem smo gele na objektnikih barvali z etidijevim bromidom (EtBr) s koncentracijo 5 µg/ mL (20 µL). Komete smo opazovali pod mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescentno svetlobo (Nikon HB-10104 HF, Japonska). Jedra celic smo slikali pod 400x povečavo s pomočjo črno-bele kamere (Hitachi Denski, Japonska). Ekscitacijski filter za etidijev bromid je 515-560 nm, zaporni pa 590 nm. Za zajemanje slike kometov smo uporabili program Lucia G. Za vsak vzorec in kontrole smo slikali 50 jeder celic. Jedra so v obliki kometov, pri čemer je glava kometa jedro, rep kometa pa DNA, ki je migrirala iz jedra.

3.4.6 Merjenje poškodb DNA in analiza rezultatov

Poškodbe DNA smo merili s programom VisCOM (TillPhotonics Jena, Nemčija). Merili smo odstotek DNA, ki je pri elektroforezi prepotoval iz glave v rep kometa. Čim bolj je DNA poškodovana, tem več je v električnem polju prepotuje iz glave v rep kometa. Odstotek DNA v repu kometa smo računali po formuli:

$$DNA_z = 100 \times \sum I_t / \sum I_H + \sum I_t \quad \dots(2)$$

Pri tem je I_H intenziteta točke v glavi, I_t pa intenziteta točke v repu.

Rezultate smo statistično obdelali s programom GraphPad Prism 3.02 (Richmond, Virginia, ZDA). Za analizo razlik med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnett, pri čemer smo $p < 0,001$ določili kot statistično značilno razliko.

3.5 PRIPRAVA RAZTOPIN IN PUFROV

NMP in LMP agarozo smo pripravili v 1 % končni koncentraciji (Preglednica 3). Agarozo smo raztopili v mediju brez seruma, nato pa segrevali do vrelišča.

Preglednica 3: NMP in LMP agaroz

Sestavine	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
NMP agaroz	Gibco BRL, Paisley	15510-027	100 mg/ 10 mL medija
LMP agaroz	Gibco BRL, Paisley	15517-022	100 mg/ 10 mL medija
Medij brez seruma			10 mL

Agarozo raztopimo v mediju brez seruma z mešanjem, nato segrevamo do vrelišča (mikrovalovna pečica).

Preglednica 4: Raztopina za alkalno lizo celic

Sestavine	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
NaCl	Merck	1.06404.1000	146,4 g
Na ₂ EDTA	Sigma	E-5134	37,2 g
Tris	Merck	1.08382.0100	1,21 g
Destilirana voda			do 1000 ml
Triton®	Sigma	X 100	1 % (10 mL)

Raztopina za alkalno liziranje vsebuje 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris in Triton® v končni koncentraciji 1 %. pH smo uravnali z 10 M NaOH na 10,00. Sestavine smo pripravili v količinah naštetih v Preglednici 4.

Preglednica 5: Elektroforetski pufer

Sestavine	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
10 M raztopina NaOH	Merck	1.06482.1000	30 ml
0,2 M raztopina Na ₂ EDTA	Sigma	E-5134	5 ml
Destilirana voda			do 1000 ml

Elektroforetski pufer vsebuje 300 mM NaOH in 1 mM Na₂EDTA. Sestavine smo pripravili v količinah naštetih v Preglednici 5.

Preglednica 6: Raztopina za nevtralizacijo

Sestavine	Proizvajalec	Kataloška št.	Količina
Tris	Merck	1.08382.0100	48,44 g
Destilirana voda			do 1000 ml

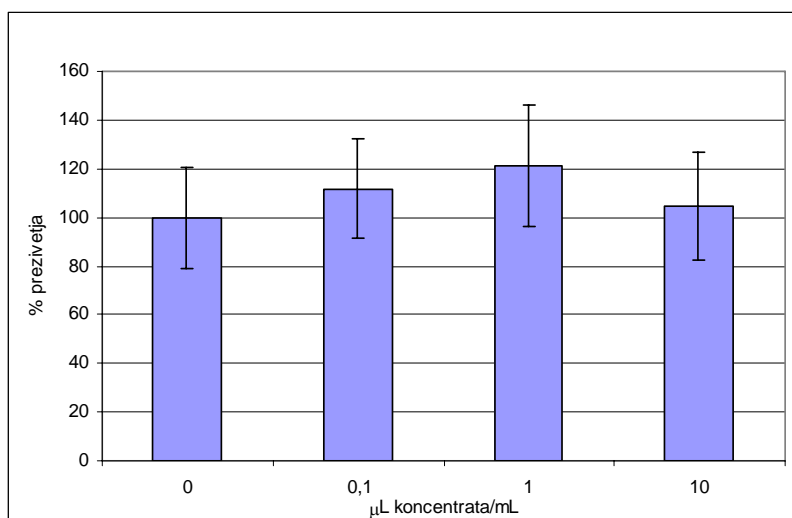
Raztopina za nevtralizacijo vsebuje 0,4 M Tris. pH smo uravnali s HCl (36-38 %) na 7,5. Sestavine smo pripravili v količinah naštetih v Preglednici 6.

Vse raztopine in pufre za kometni test vedno pripravimo sveže, pred uporabo pa jih shranjujemo na 4 °C.

4 REZULTATI

4.1 TEST MTT

Za preverjanje citotoksičnosti vzorcev naravnih in mineralnih vod na človeški celični kulturi HepG2 smo uporabili test MTT. Vsako koncentracijo vzorca smo naredili v 5 paralelah. Pri vsakem testu smo naredili kontrolo medija (celice gojene v celičnem mediju) in kontrolo topila (celice gojene v mediju, ki je vseboval 1 % DMSO). V nobenem primeru nismo ugotovili značilnih razlik med obema kontrolama, zato smo v rezultatih prikazali le kontrolo topila, na katerega smo primerjali rezultate. Rezultate smo prikazali kot povprečne vrednosti in izračunali standardne odklone.

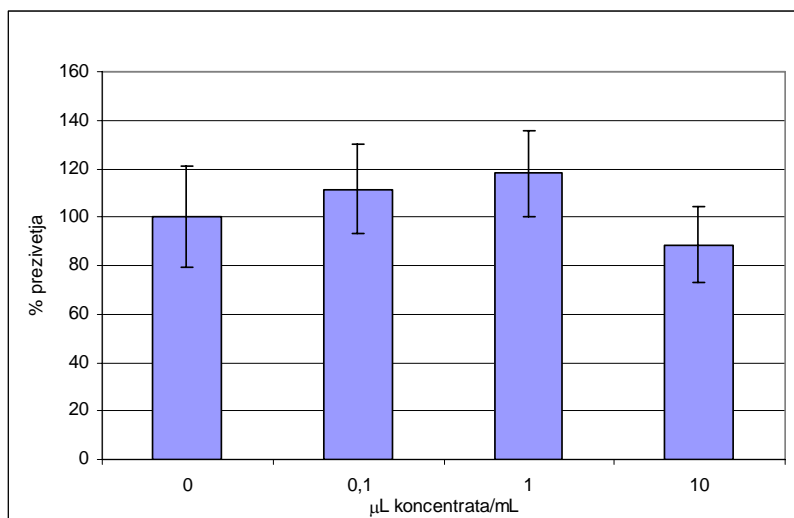


Slika 3: Vpliv različnih koncentracij vzorca 1 na preživetje celic HepG2

Celice HepG2 smo izpostavili vzorcu 1 v 3 koncentracijah (0,1, 1 in 10 µL koncentrata/mL, kar je ekvivalentno 1, 10 in 100 mL vzorca nekoncentrirane vode/mL) za 20 ur in nato ugotavljali citotoksično delovanje vzorca s testom MTT. Celice kontrole smo izpostavili 1 % DMSO (topilo).

Rezultati so podani kot odstotek preživetja glede na kontrolo topila (\pm STD). Za analizo razlik med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis).

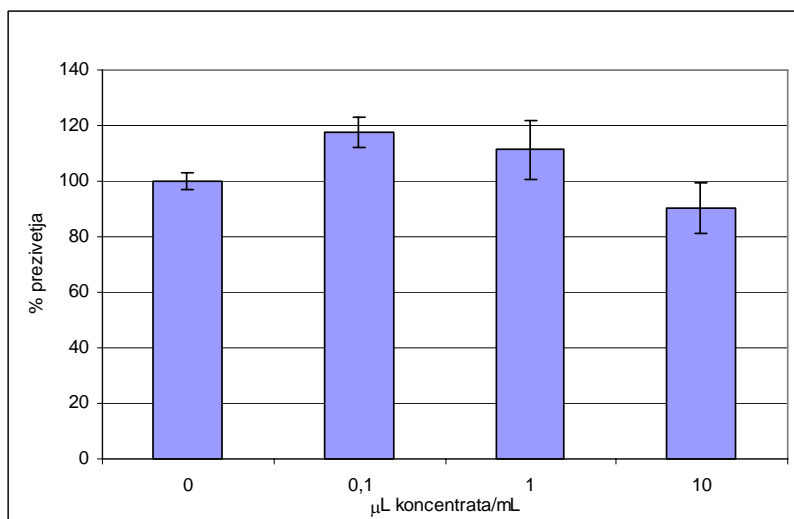
Iz rezultatov je razvidno, da nobena koncentracija vzorca 1 (0,1, 1 in 10 µL koncentrata/mL) ni delovala citotoksično na celice HepG2 po 20 urni izpostavitvi celic vzorcu (Slika 3).



Slika 4: Vpliv različnih koncentracij vzorca 2 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

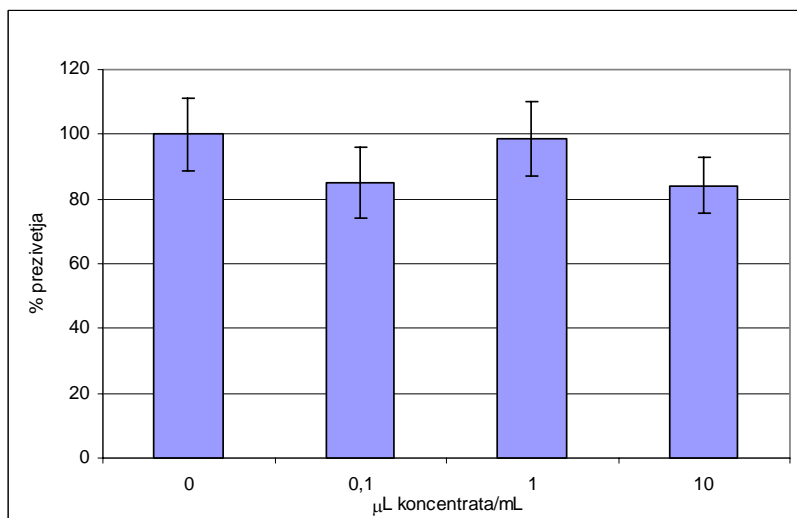
Ugotovili smo, da vzorec 2 pri nobeni testirani koncentraciji ni deloval citotoksično na celice HepG2 (Slika 4).



Slika 5: Vpliv različnih koncentracij vzorca 3 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

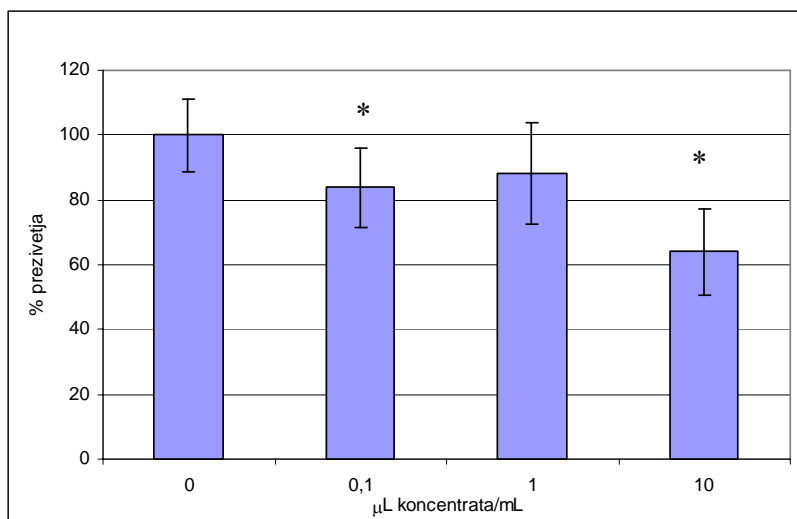
Vzorec 3 ni pri nobeni koncentraciji deloval citotoksično na celice HepG2 po 20 urni izpostavitvi (Slika 5).



Slika 6: Vpliv različnih koncentracij vzorca 4 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

Pri nobeni koncentraciji vzorca 4 nismo opazili statistično značilnega vpliva na preživetje celic (Slika 6).

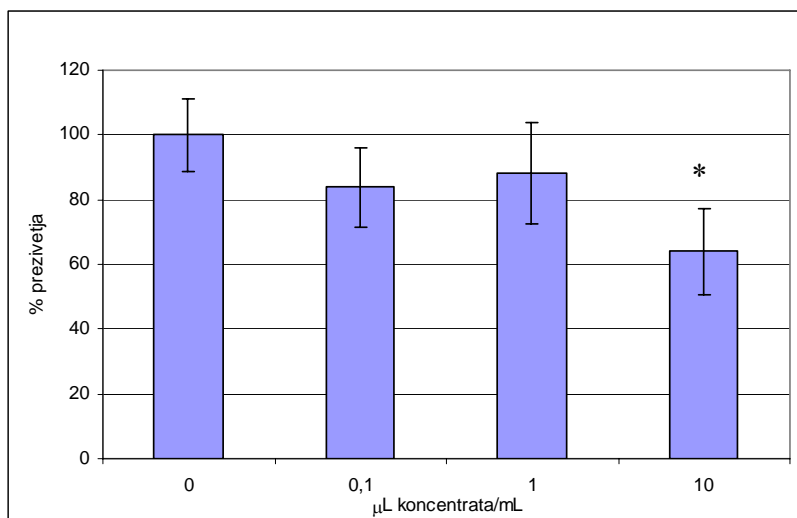


Slika 7: Vpliv različnih koncentracij vzorca 5 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

* prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (test Dunnet, $p < 0,05$).

Vzorec 5 je pri dveh testiranih koncentracijah (0,1 in 10 µL koncentrata/mL) statistično značilno zmanjšal preživetje celic. Odstotek preživetja pri najmanjši koncentraciji (0,1 µL koncentrata/mL) je bil 78,83 % glede na kontrolo, pri največji testirani koncentraciji vzorca 5 pa se je preživetje zmanjšalo na 64,18 % v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 7).

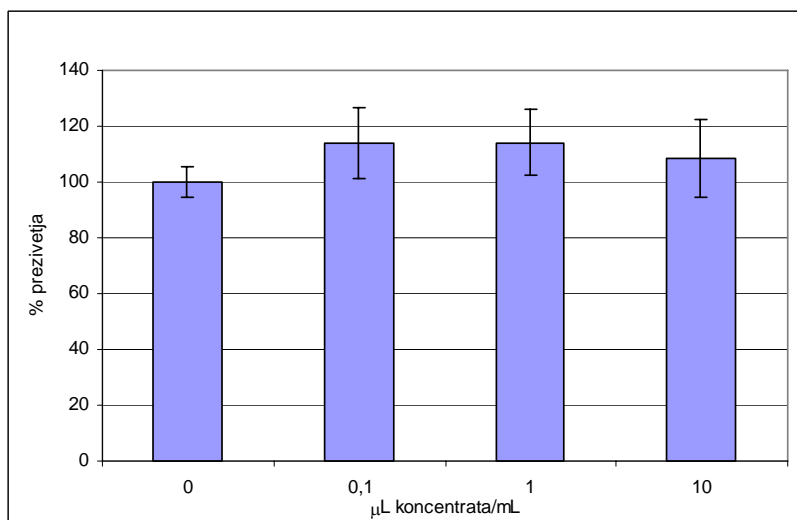


Slika 8: Vpliv različnih koncentracij vzorca 6 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

* prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (test Dunnet, $p < 0,05$).

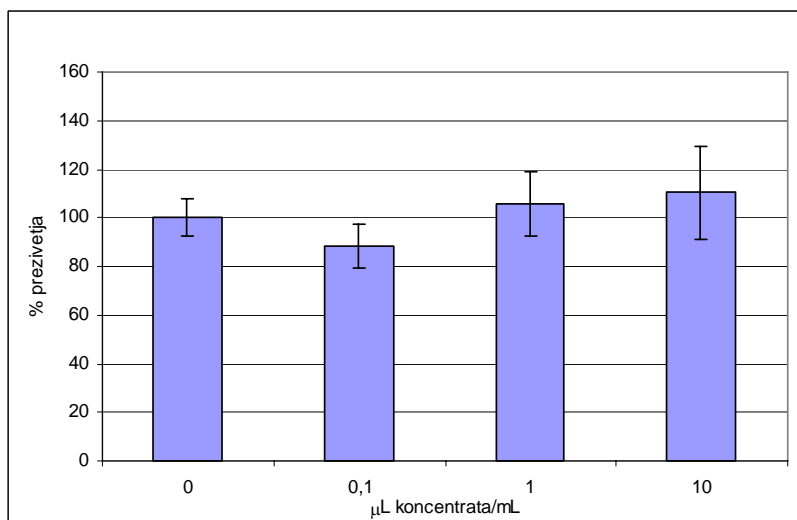
Statistično značilen vpliv vzorca 6 na preživetje celic smo opazili le pri največji koncentraciji vzorca (10 µL koncentrata/mL), kjer je preživel le 63,95 % celic v primerjavi s kontrolno skupino (Slika 8).



Slika 9: Vpliv različnih koncentracij vzorca 7 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

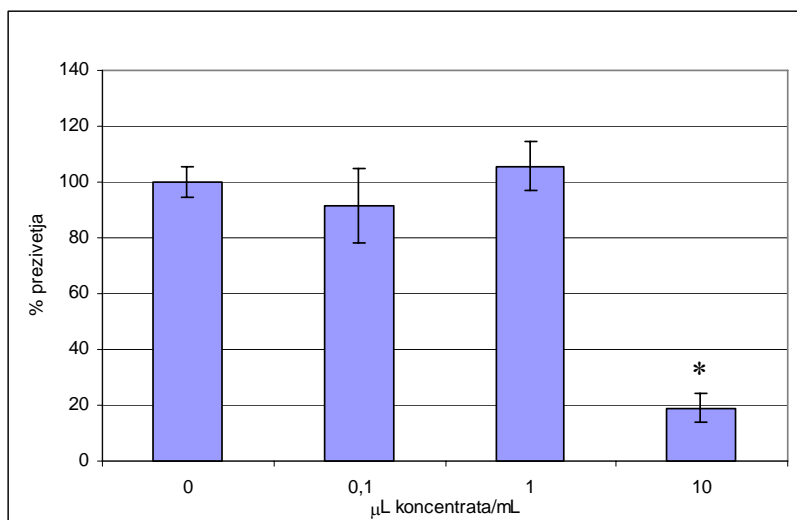
Rezultati so pokazali, da vzorec 7 pri nobeni testirani koncentraciji ni deloval citotoksično na celice HepG2 po 20 urni izpostavitvi (Slika 9).



Slika 10: Vpliv različnih koncentracij vzorca 8 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

Iz rezultatov je razvidno, da vzorec 8 pri nobeni koncentraciji ni deloval citotoksično na celice HepG2 (Slika 10).

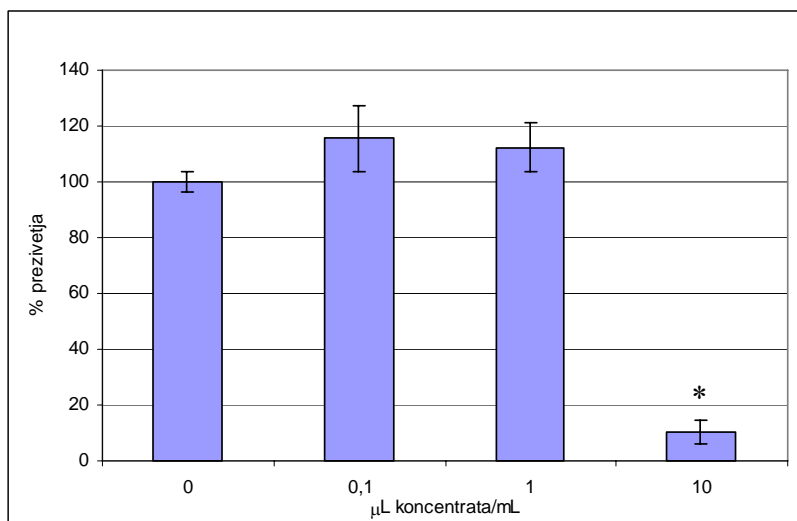


Slika 11: Vpliv različnih koncentracij vzorca 9 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

* prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (test Dunnet, $p < 0,05$).

Rezultati, ki smo jih dobili pri testiranju citotoksičnosti vzorca 9 kažejo, da pri koncentracijah 0,1 in 1 µL koncentrata/mL vzorec ni deloval citotoksično, medtem ko smo pri največji koncentraciji (10 µL koncentrata/mL) opazili močno zmanjšanje preživetja celic. Glede na kontrolno skupino je preživel le 18,94 % celic (Slika 11).

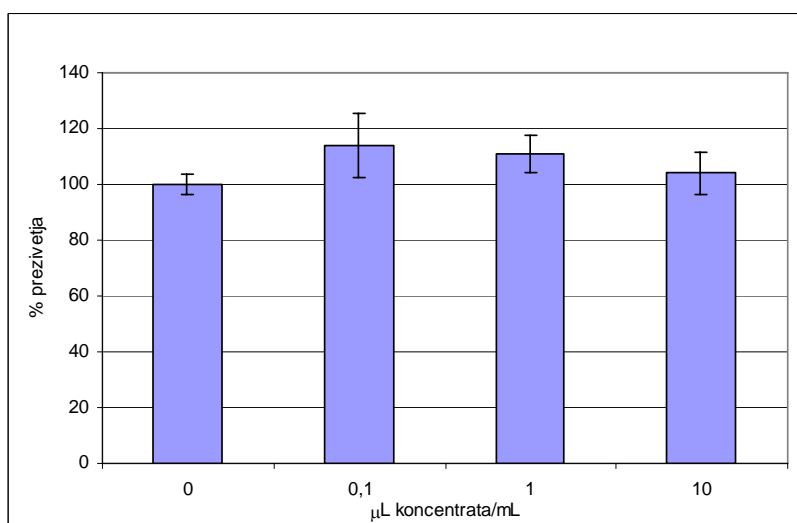


Slika 12: Vpliv različnih koncentracij vzorca 10 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

* prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (test Dunnet, $p < 0,05$).

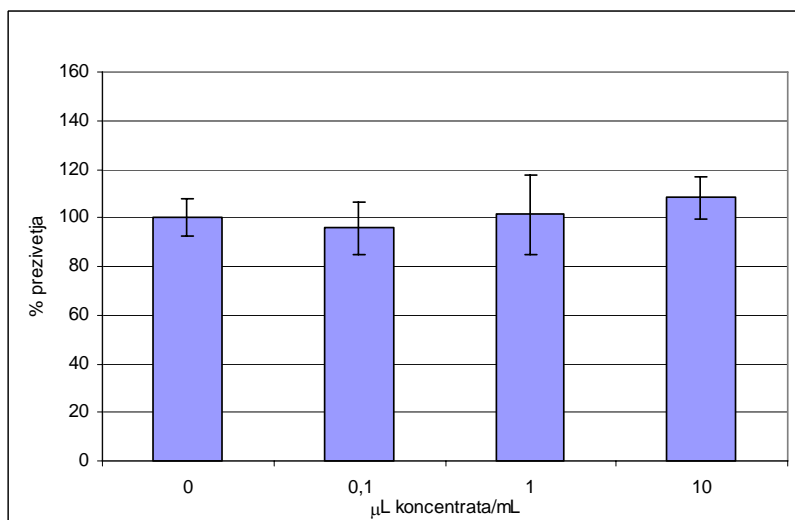
Rezultati, ki smo jih dobili po tretiranju celic HepG2 z vzorcem 10 kažejo, da je testirani vzorec pri največji koncentraciji (10 µL koncentrata/mL) močno zmanjšal preživetje celic. Glede na kontrolno skupino je preživel 10,33 % celic (Slika 12).



Slika 13: Vpliv različnih koncentracij vzorca 11 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

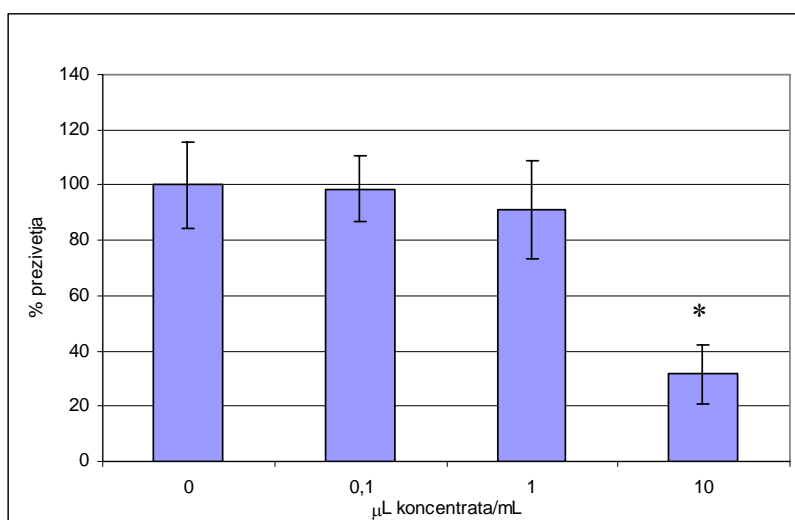
Pri nobeni izmed testiranih koncentracij vzorca 11 (0,1, 1 in 10 µL koncentrata/mL) nismo opazili značilnega vpliva na preživetje celic (Slika 13).



Slika 14: Vpliv različnih koncentracij vzorca 12 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

Iz rezultatov je razvidno, da nobena izmed testiranih koncentracij vzorca 12 ni delovala citotoksično na celice HepG2 po 20 urni izpostavitvi (Slika 14).

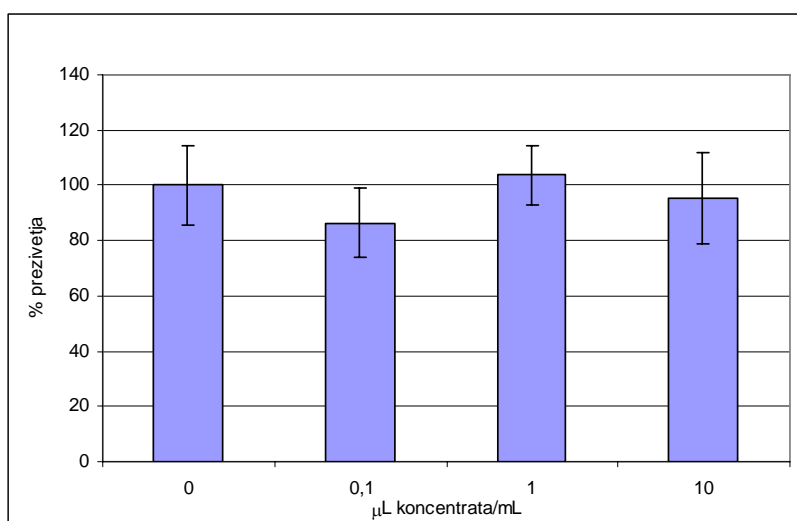


Slika 15: Vpliv različnih koncentracij vzorca 13 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

* prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (test Dunnet, $p < 0,05$).

Pri največji koncentraciji vzorca 13 smo opazili statistično značilen vpliv na preživetje celic. V primerjavi s kontrolno skupino je preživel le 31,52 % celic (Slika 15).



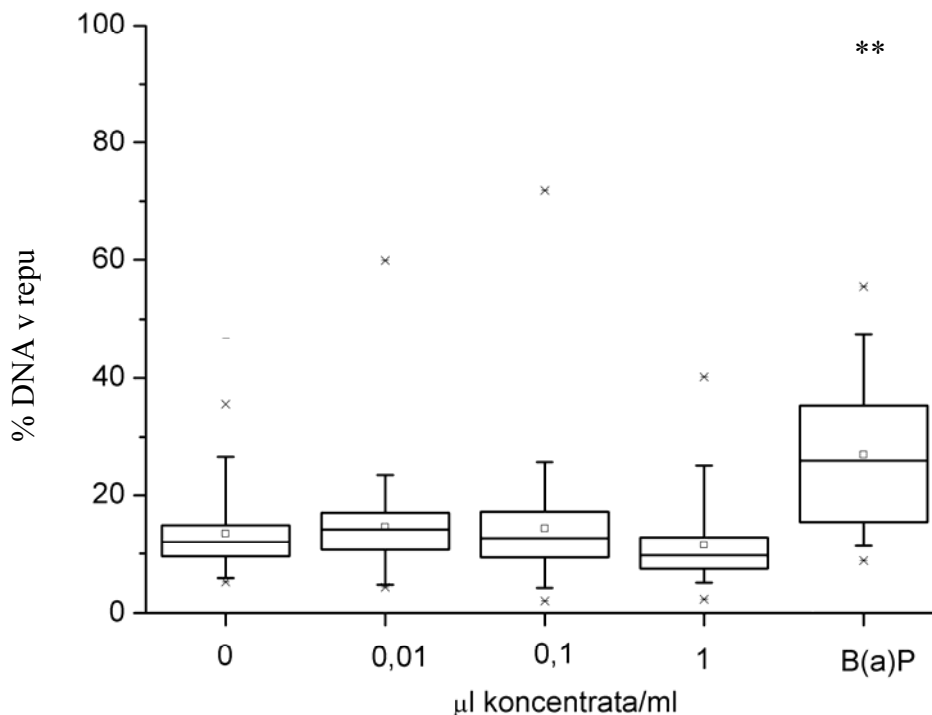
Slika 16: Vpliv različnih koncentracij vzorca 14 na preživetje celic HepG2

Legenda: glej sliko 3

Vzorec 14 ni pri nobeni koncentraciji deloval citotoksično na celice HepG2 po 20 urah izpostavitve (Slika 16).

4.2 KOMETNI TEST

Z alkalno različico kometnega testa smo preverjali genotoksičnost vzorcev naravnih in mineralnih vod na celični kulturi HepG2.

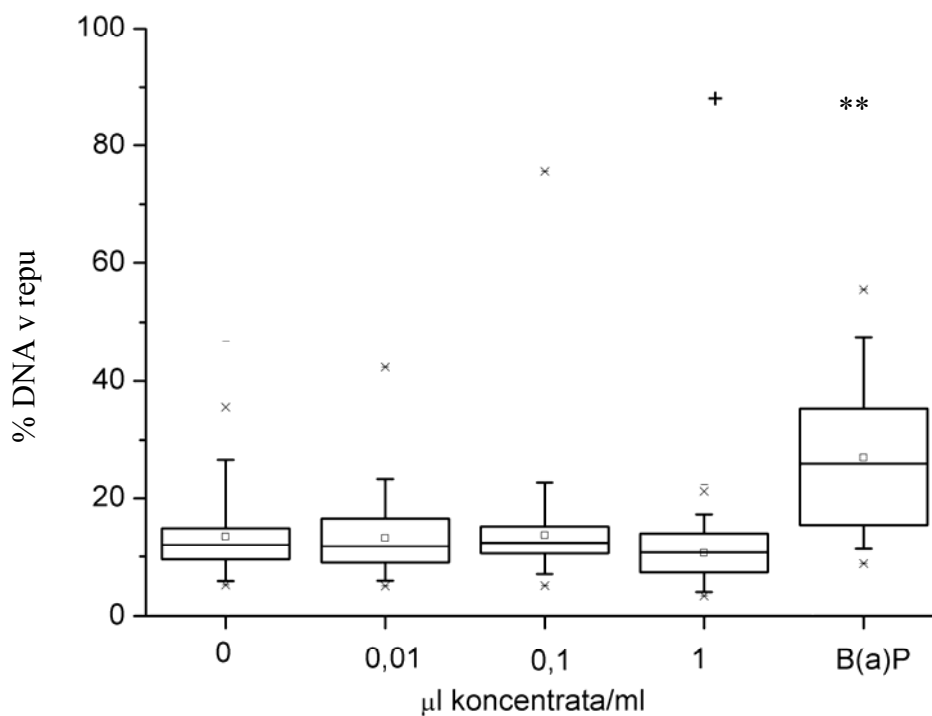


Slika 17: Vpliv različnih koncentracij vzorca 1 na poškodbe DNA celic HepG2

Celice HepG2 smo za 20 ur izpostavili različnim koncentracijam vzorcev vod (1, 0,1 in 0,01 µL koncentrata/mL). Kontrolno skupino smo izpostavili topilu, ki je vsebovalo 0,1 % DMSO. Celice smo izpostavili tudi delovanju 30 µM B(a)P, ki je predstavljal pozitivno kontrolo. Poskus smo ponovili v 3 neodvisnih ponovitvah in v vsakem poskusu analizirali 50 jeder. Rezultati so podani kot odstotek DNA v repu in prikazani kot grafikon kvantilov. Razlike med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnet, pri čemer smo $p < 0,001$ določili kot statistično značilno razliko.

+ prikazuje statistično značilno zmanjšanje (test Dunnet, $p < 0,001$). ** prikazuje statistično značilno povečanje (test Dunnet, $p < 0,001$).

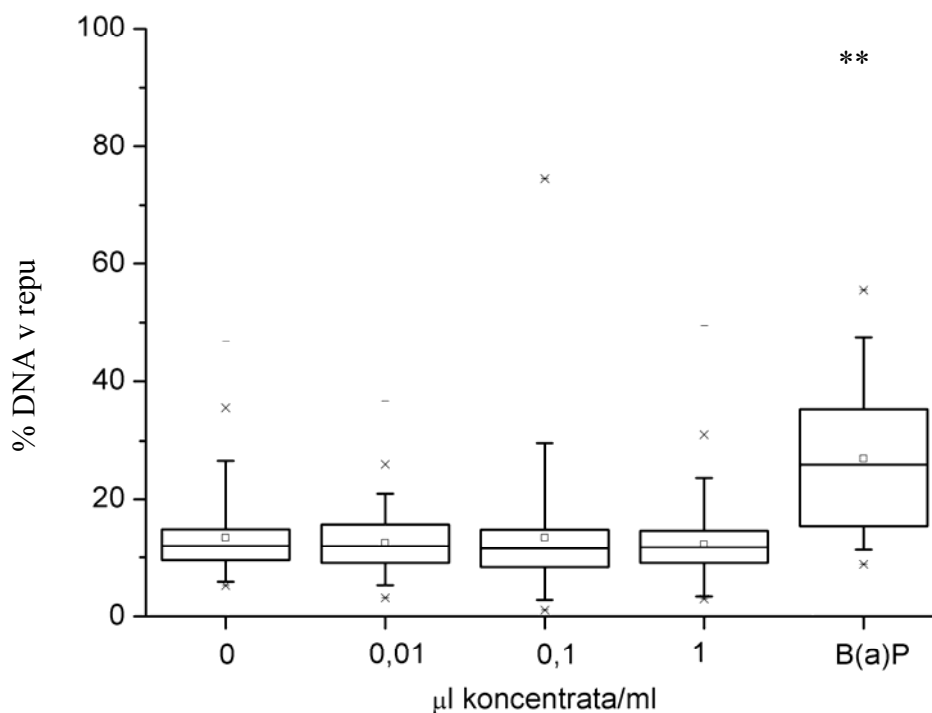
Ugotovili smo, da po 20 urah vzorec 1 pri koncentracijah 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL, ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 17).



Slika 18: Vpliv različnih koncentracij vzorca 2 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

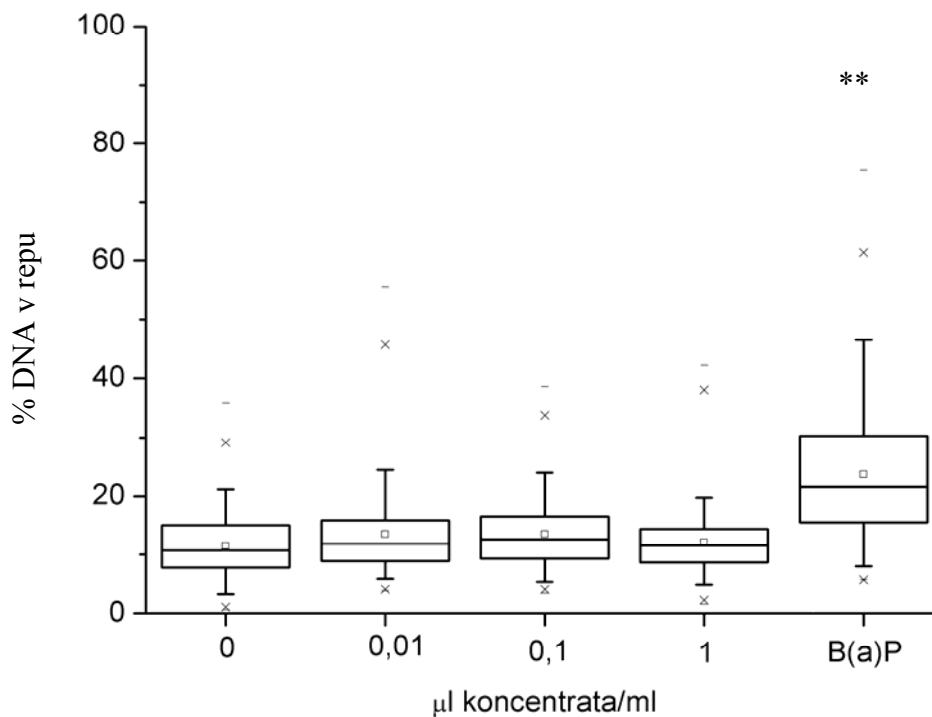
Rezultati so pokazali, da po 20 urah vzorec 2 pri koncentracijah 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL, ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Opazili smo celo značilno zmanjšanje poškodb pri največji koncentraciji (1 µL koncentrata/mL). Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 18).



Slika 19: Vpliv različnih koncentracij vzorca 3 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

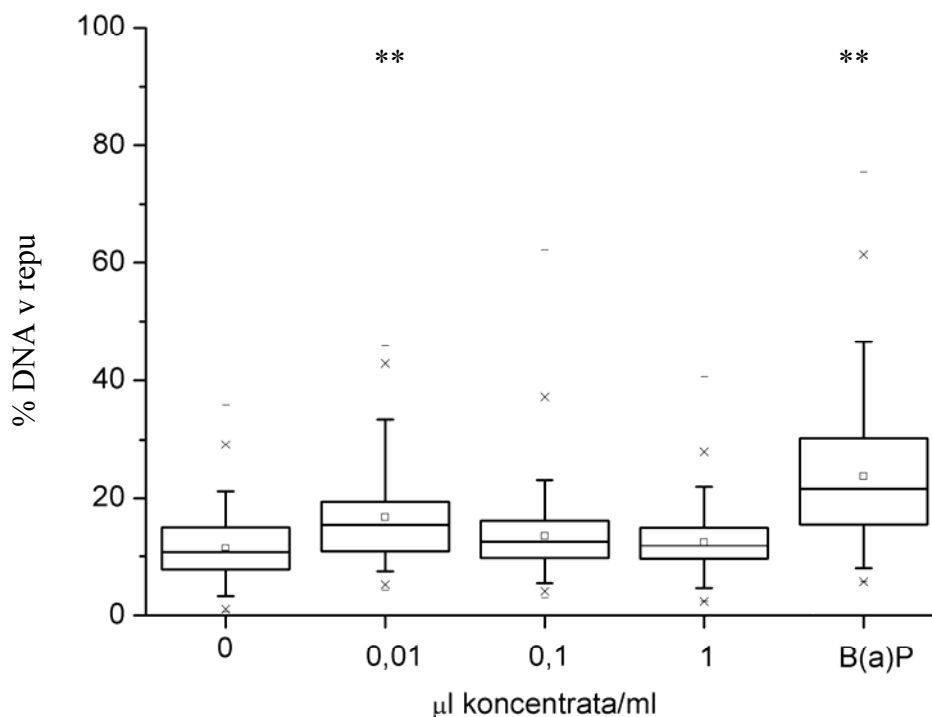
Tudi rezultati, ki smo jih dobili pri testiranju vzorca 3, niso pokazali genotoksičnega delovanja. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 19).



Slika 20: Vpliv različnih koncentracij vzorca 4 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

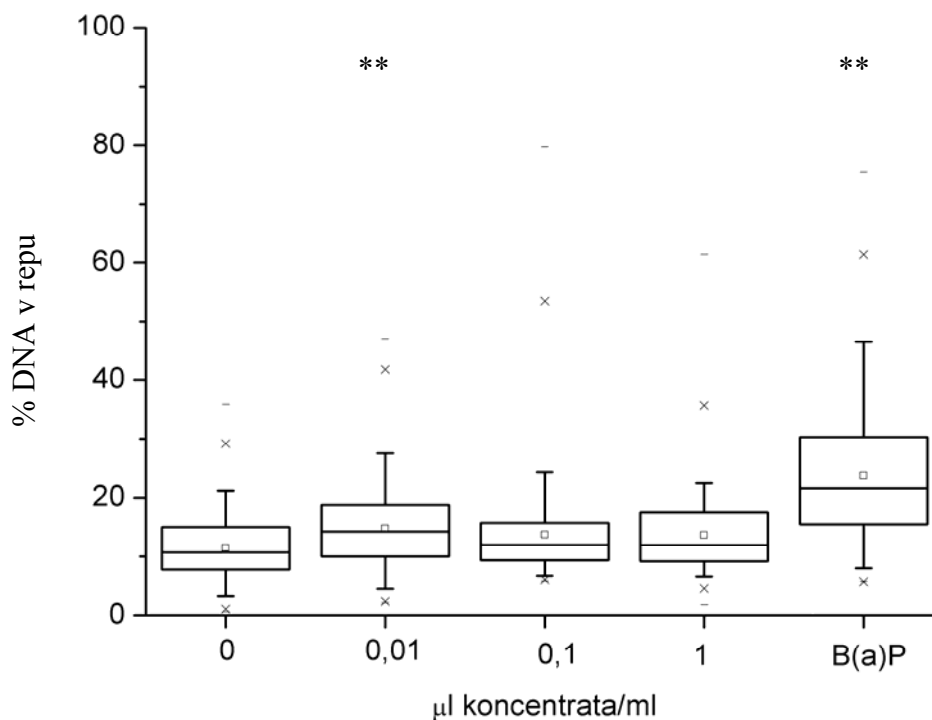
Rezultati so pokazali, da po 20 urah vzorec 1 pri koncentracijah 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL, ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrolne skupine (Slika 20).



Slika 21: Vpliv različnih koncentracij vzorca 5 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

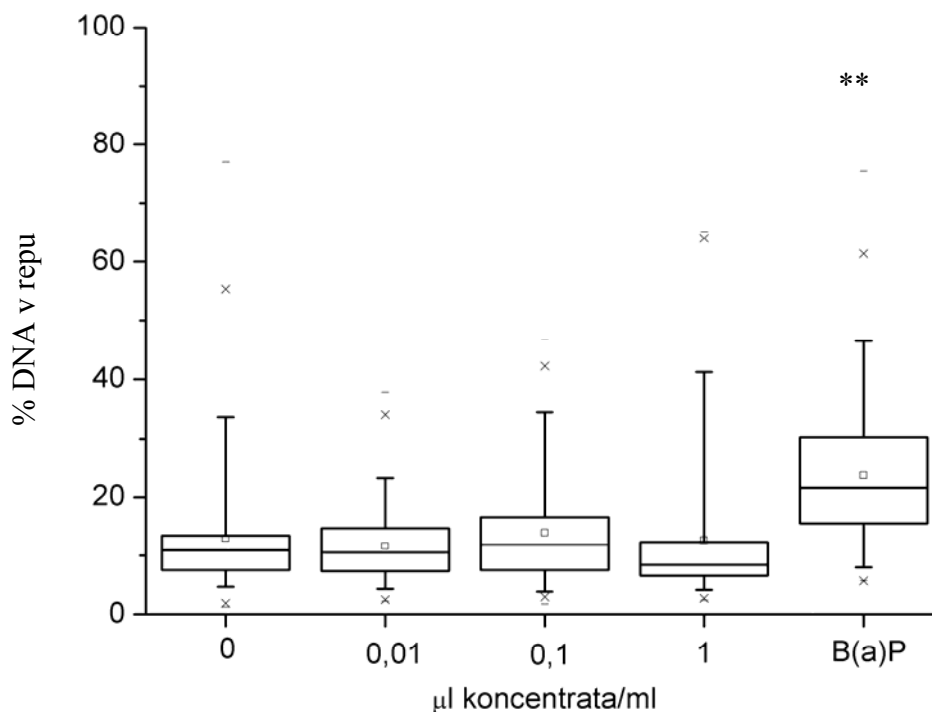
Rezultati, ki smo jih dobili po 20 urnem tretiranju celic HepG2 z vzorcem 5 kažejo, da je testirani vzorec pri koncentraciji 0,01 µL koncentrata/mL statistično značilno vplival na povečanje odstotka DNA v repu v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 21).



Slika 22: Vpliv različnih koncentracij vzorca 6 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

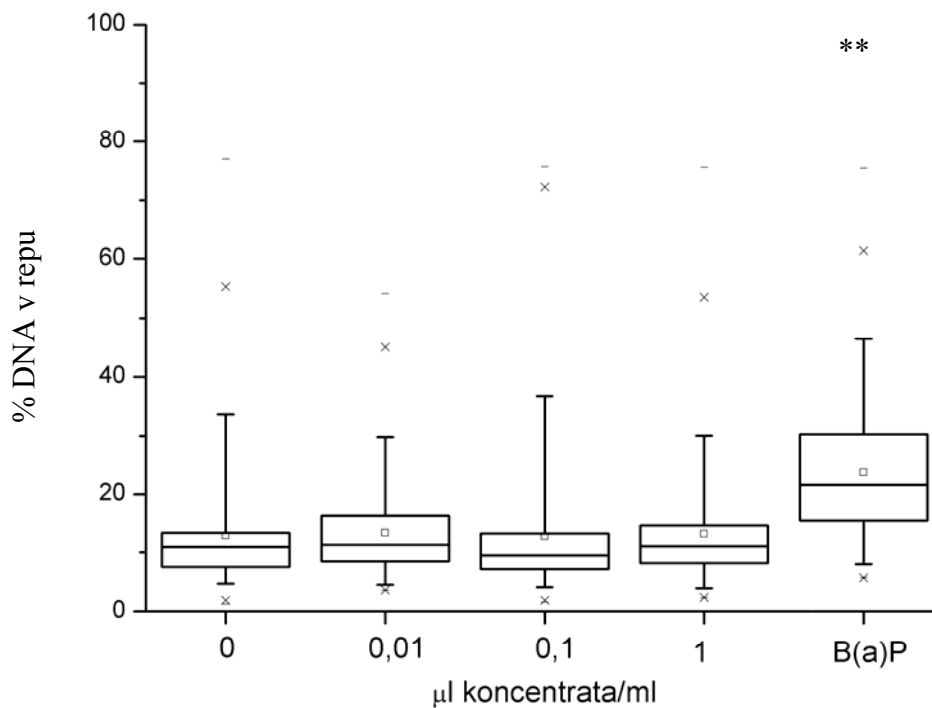
Opazili smo, da je najmanjša koncentracija vzorca 6 (0,01 µL koncentrata/mL) delovala genotoksično na celice HepG2 po 20 urni izpostavitvi v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 22).



Slika 23: Vpliv različnih koncentracij vzorca 7 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

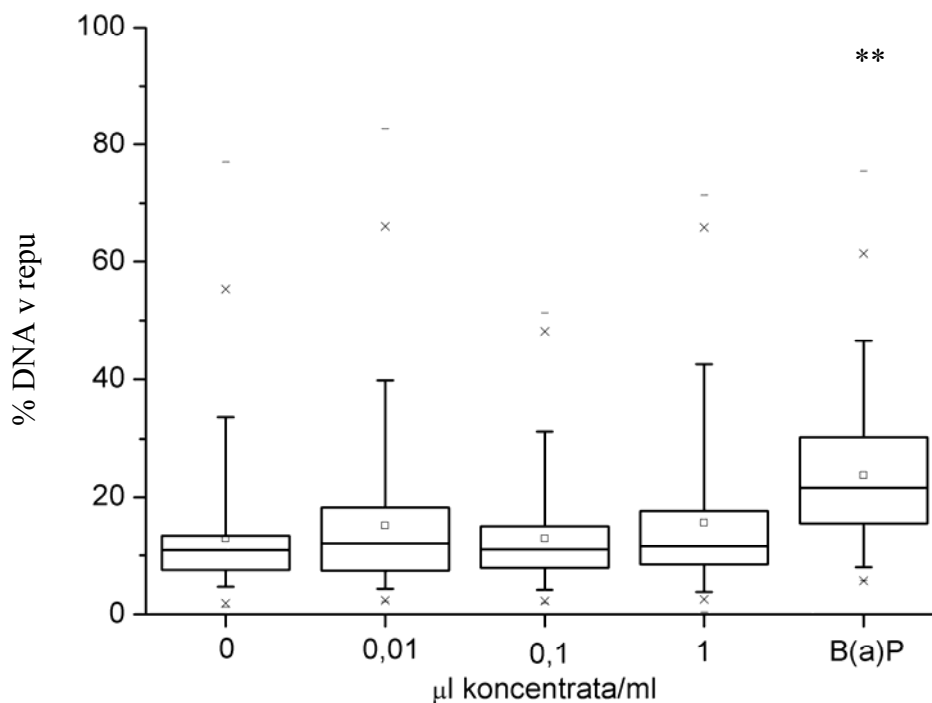
Ugotovili smo, da po 20 urah vzorec 7 pri koncentracijah 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL, ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrolne skupine (Slika 23).



Slika 24: Vpliv različnih koncentracij vzorca 8 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

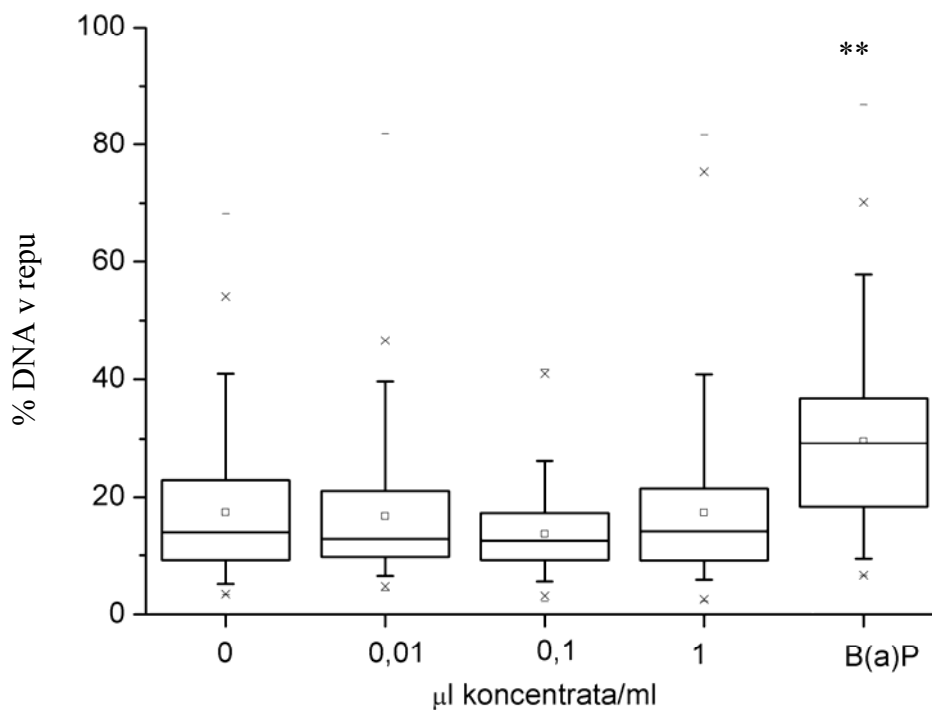
Tudi rezultati, ki smo jih dobili po tretiranju celic z vzorcem 8, niso pokazali genotoksičnega delovanja. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 24).



Slika 25: Vpliv različnih koncentracij vzorca 9 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

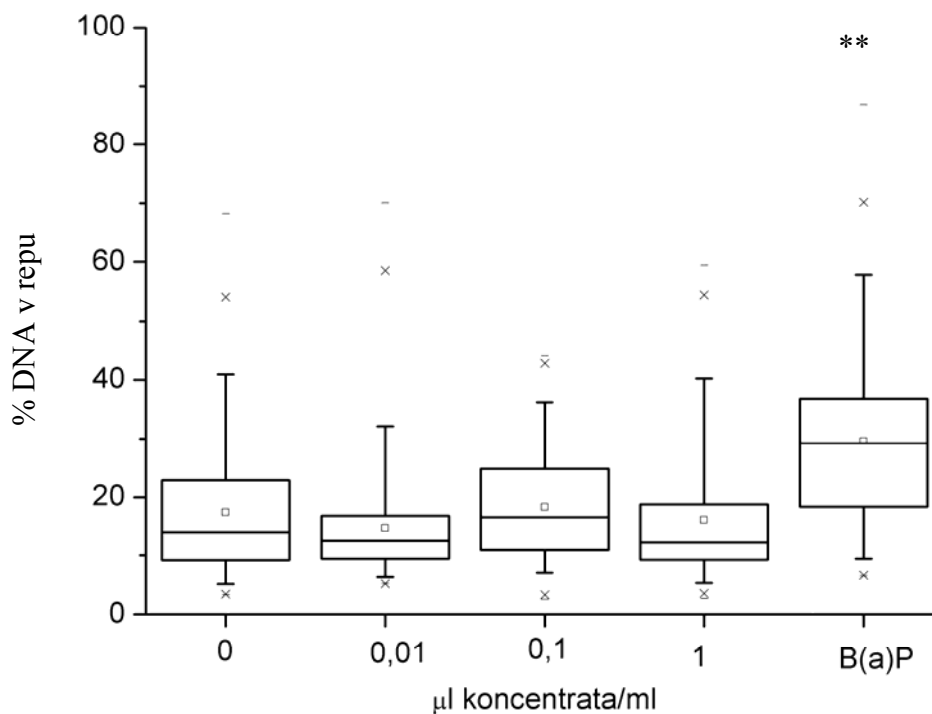
Ugotovili smo, da 20 urno tretiranje celic HepG2 z vzorcem 9 ni pokazalo genotoksičnega vpliva v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 25).



Slika 26: Vpliv različnih koncentracij vzorca 10 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

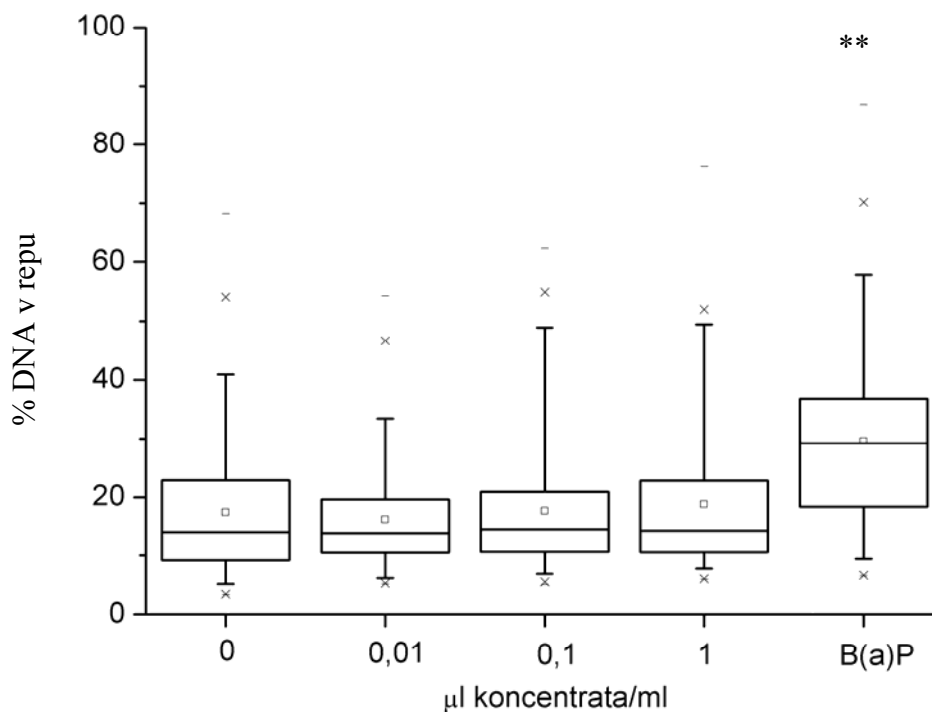
Ugotovili smo, da po 20 urah vzorec 10 pri koncentracijah 0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 26).



Slika 27: Vpliv različnih koncentracij vzorca 11 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

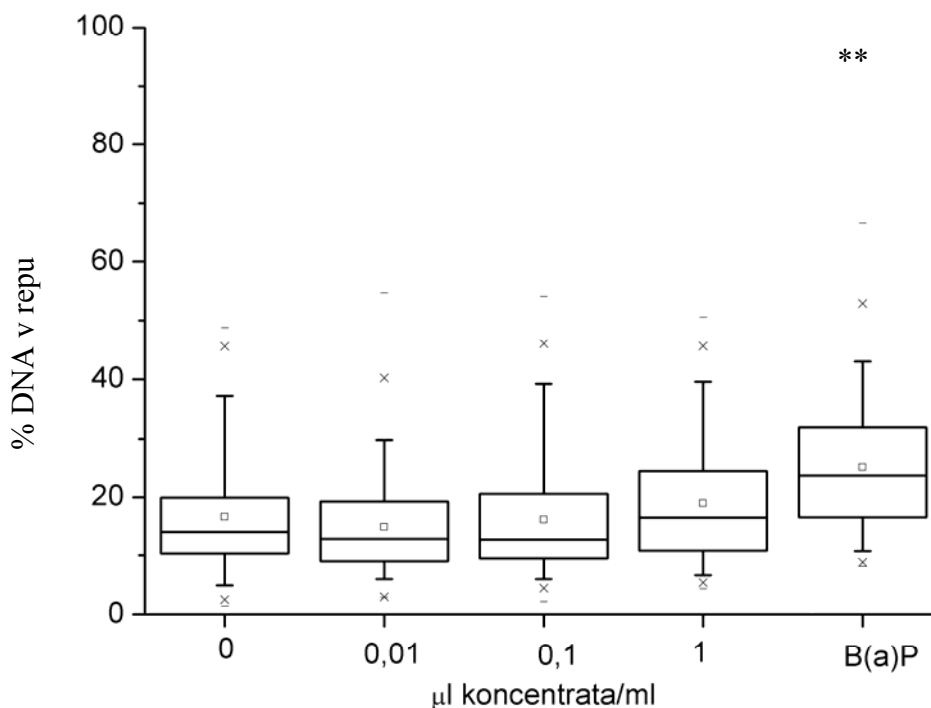
Rezultati so pokazali, da vzorec 11 pri nobeni koncentraciji (0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL) ni povzročil poškodbe DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 27).



Slika 28: Vpliv različnih koncentracij vzorca 12 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

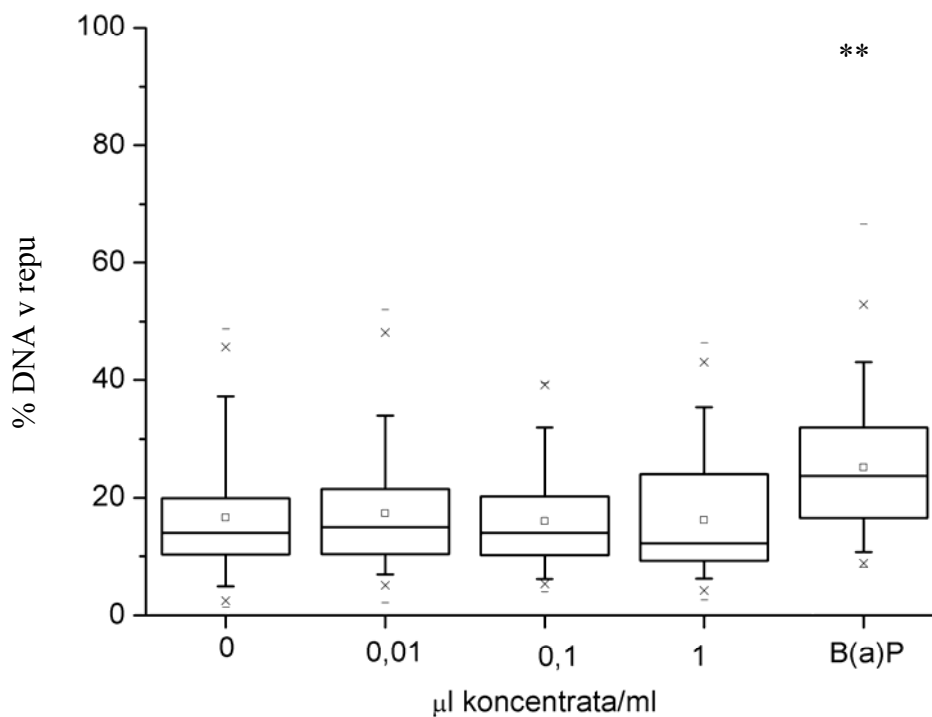
Tudi rezultati, ki smo jih dobili po tretiranju celic z vzorcem 12, niso pokazali genotoksičnega delovanja. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 28).



Slika 29: Vpliv različnih koncentracij vzorca 13 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

Ugotovili smo, da vzorec 13 pri nobeni koncentraciji (0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL) ni povzročil povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 29).



Slika 30: Vpliv različnih koncentracij vzorca 14 na poškodbe DNA celic HepG2

Legenda: glej sliko 17

Rezultati, ki smo jih dobili po 20 urnem tretiranju celic HepG2 z vzorcem 14 kažejo, da testirani vzorec pri nobeni koncentraciji (0,01, 0,1 in 1 µL koncentrata/mL) ni statistično značilno vplival na povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivna kontrola se je statistično značilno razlikovala od negativne kontrole (Slika 30).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V površinske vode, kot so reke, jezera in morja, se izlivajo velike količine onesnaženih vod. V veliki meri so to industrijske ali komunalne odpadne vode, v reke pa se iztekajo tudi onesnažene vode z izpiranjem kmetijskih površin. Glede na to, da se površinske vode ponekod uporabljajo kot vir pitne vode, za kmetijske, rekreacijske in druge aktivnosti, ne bi smele vsebovati zdravju škodljivih snovi. Onesnaženje vodnih ekosistemov ni problem le za ljudi ampak tudi za druga živa bitja (Houk, 1992). Med onesnažili vode so pogosto tudi mutagene in genotoksične snovi (Dearfield in sod., 2002). Genotoksini lahko poškodujejo nosilko primarnih informacij v živih sistemih, molekulo DNA. Najpomembnejša reakcija prizadetih celic ali organizmov je popravljanje poškodb DNA. Popravljalne sposobnosti in kapacitete se razlikujejo od organa do organa in variirajo pri različnih organizmih. Posledice ponavljajočega se genotoksičnega stresa so večja verjetnost nastanka mutacij, pospešeno staranje celic, neučinkovito prilagajanje na spremembe življenjskih pogojev, zmanjšanje plodnosti in v najhujšem primeru kancerogeneza ter smrt (Reifferscheid in Grummt, 2000). Izpostavljenost genotoksinom doprinaša tudi k kopičenju mutacij, ki se bodo izrazile šele pri naslednjih generacijah (Filipič, 2004), kar pomeni, da so ti učinki zelo dolgotrajni in nepovratni. Obstajajo številne metode, s katerimi lahko ugotovimo, do kakšne mere so vode onesnažene. Najbolj neposredna metoda je določanje specifičnih onesnažil s kemijsko analizo (Ohe in sod., 2004). O določenih zelo pogostih onesnažilih je veliko znanega, zato je relativno enostavno ugotoviti njihov vir in predvideti ter obvladati posledice onesnaževanja (White, 2002). V nasprotju s tem se veliko manj pozornosti posveča prepoznavanju neobičajnih, manj zastopanih mutagenov (Ohe in sod., 2004). Na osnovi rezultatov kemijskih analiz ne moremo predvideti biološkega učinka na živa bitja, predvsem zaradi možnih sinergističnih in antagonističnih interakcij (Knasmüller in sod., 1998), kar je tudi pomanjkljivost kemijskih analiz. V zadnjih letih se za določanje onesnaženosti vod vse bolj uveljavlja uporaba bioloških testov, ki pokažejo učinek vseh kemijskih snovi, prisotnih v vzorcu, kot tudi njihove medsebojne interakcije. Biološki testi omogočajo tudi določanje toksičnosti in potencialne mutagenosti brez predhodne identifikacije komponent ali fizikalno-kemijskih raziskav vzorca (Ohe in sod., 2004). V nekaterih državah (Sao Paolo) so biološki testi že vključeni v program monitoringa pitnih vod (Umbuzeiro in sod., 2004), mnogi pa jih predlagajo kot dopolnilne metode kemijskim analizam (Ohe in sod., 2004).

V diplomski nalogi smo z *in vitro* testnimi sistemi preverjali citotoksično in genotoksično delovanje 14 vzorcev naravnih in mineralnih vod na celice HepG2. V pitnih vodah so onesnažila v večini primerov prisotna v zelo majhnih koncentracijah, zato se večinoma biološka testiranja izvajajo na predhodno koncentriranih vzorcih. Vzorci, ki smo jih v nalogi testirali, so bili 10 000 x koncentrirani. Citotoksičnost smo preverjali s testom MTT. Ugotovili smo, da so vzorci 5, 6, 9, 10 in 13 zmanjšali preživetje celic HepG2 v primerjavi s kontrolno skupino. Trije od teh petih citotoksičnih vzorcev so preživelost zmanjšali celo za več kot 50% (vzorci 9, 10 in 13). To pomeni, da so ti vzorci vsebovali eno ali več citotoksičnih snovi, vendar pa nam rezultati testa MTT ne ponujajo odgovora, katere snovi so odgovorne za citotoksičnost testiranih vzorcev. Če bi želeli ugotoviti vzrok zmanjšane preživetja celic, bi morali s kemijskimi analizami v kombinaciji z biološki testi določiti citotoksične sestavine vzorca.

Genotoksičnost vzorcev vod smo preverjali z alkalno različico kometnega testa. Rezultati so pokazali, da je vzorec 2 povzročil celo značilno zmanjšanje poškodb v primerjavi s kontrolno skupino. Po drugi strani sta vzorca 5 in 6 povzročila statistično značilno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Pozitivni rezultat kometnega testa se opredeli na osnovi več kriterijev. Ti obsegajo od koncentracije odvisno povečanje poškodb DNA in odgovarjajoče statistično značilno povečanje poškodovanosti DNA pri eni ali več dozah (Tice in sod., 2000). Vzorca 5 in 6 sta povzročila statistično značilno povečanje poškodb DNA, vendar to povečanje poškodb DNA ni bilo odvisno od doze oziroma koncentracije vzorca, zato na osnovi predlaganih kriterijev za oceno genotoksičnosti ne moremo z gotovostjo trditi niti da sta genotoksična za gojene sesalske celice, niti, da nista. Genotoksičnost vzorcev, ki smo jih testirali v naši diplomski nalogi, je bila predhodno testirana tudi s standardnim Amesovim testom. Rezultati so pokazali, da vzorci mineralnih in izvirskih vod niso delovali genotoksično v bakterijskem testnem sistemu s sevi bakterije *Salmonella typhimurium* TA98 in TA100 (Filipič, 2004).

Alkalna različica kometnega testa je zelo občutljiva metoda za zaznavanje povzročanja poškodb DNA vendar, je njegova pomanjkljivost, da ne moremo natančno določiti narave poškodb, ki jih s testom zaznamo (Horvatova in sod., 1998). Prelomi DNA, ki jih zaznamo so pogosto prehodne poškodbe, ki se v odvisnosti od časa izpostavitve lahko popravijo (Žegura in sod., 2003). V naši nalogi smo celice izpostavili delovanju vzorcev za 20 ur. V tem času lahko pride do poškodb genetskega materiala, ki se bodo ohranile in lahko privedejo do mutacije. Po drugi strani, pa je ta čas dovolj dolg, da pride tudi do popravljanja nastalih poškodb. Slabost uporabe tako dolgega časa izpostavitve je, da nam test ne omogoča vpogleda v to, kaj se s poškodbami DNA dogaja v času izpostavitve. Rezultati, ki jih dobimo, so le odraz stanja ob koncu izpostavitve celic vzorcem. Pri krajšem času izpostavitve celic vzorcem bi lahko dobili povsem drugačne rezultate. Lah in sod. (2005) so pri svoji raziskavi uporabili 20 minutni čas izpostavitve. Pri tako kratkem času izpostavitve opazimo učinke hitro delujočih snovi in ne moremo ugotoviti, če se bodo morebitne spremembe popravile ali obdržale. Karakoc in sod. (1997) so pri raziskavi genotoksičnosti vzorcev rečne vode merili poškodbe DNA po 24, 48 in 72 urah izpostavitve celic. Z daljšim časom izpostavitve so se poškodbe DNA povečevale. Glede na to, da so v omenjeni raziskavi pričakovali genotoksično delovanje, to opravičuje izbiro tako dolgih časov izpostavitve (Karakoc in sod., 1997). Pri izbiri časa izpostavitve, moramo vedeti, kakšne učinke pričakujemo, in v skladu s tem tudi razlagati rezultate. V naši nalogi smo izbrali 20 urni čas izpostavitve, zato ker so nas zanimali predvsem učinki po daljši izpostavljenosti. Na ta način ugotovimo, ali zaznamo poškodbe, ki se izražajo po daljšem času in ostanejo prisotne. Pri izbiri 20-urnega časa izpostavitve smo imeli še en cilj, želeli smo da pride do metabolne aktivacije morebitnih posredno delujočih mutagenov v vodi kot tudi do aktivacije pozitivne kontrole B(a)P. Testirali smo vzorce naravnih in mineralnih vod, za katere smo pričakovali, da imajo na celice pozitiven vpliv in ne škodljiv. Sklepali smo, da 20-urna izpostavitve celic ustreza testiranju genotoksičnosti in citotoksičnosti vzorcev, kot so pitne vode.

Vzorci, ki smo jih v nalogi testirali, so bili 10 000 x koncentrirani. Tekom koncentracije se vzorci lahko zelo spremenijo; ne le koncentracije onesnažil ampak tudi njihova medsebojna razmerja. Možno je tudi, da pride do izgube ene ali več komponent, in zaradi tega do spremenjenega delovanja mešanice (Reifferscheid in Grummt, 2000). Zato je

potrebno pri razlagi rezultatov dobljenih s koncentriranimi vzorci vod to upoštevati in rezultate potrditi z dodatnimi testiranj

Rezultati naloge so pokazali, da je test MTT primeren in dovolj občutljiv za testiranje citotoksičnosti koncentratov pitnih vod, kometni test pa je primerna in dovolj občutljiva metoda za testiranje genotoksičnosti koncentratov pitnih vod. Glede občutljivosti testov se rezultati naše raziskave ujemajo z rezultati drugih raziskav. V svoji raziskavi so Lah in sod. (2005) uporabili 2 različna testa, Amesov test in kometni test. Genotoksičnost so dokazali samo s kometnim testom. V njihovi raziskavi so statistične analize pokazale, da je kometni test bolj občutljiv kot Amesov test pri ugotavljanju genotoksičnosti vzorcev pitnih vod (Lah in sod., 2005). Tudi Monarca in sod. (2004) so dokazali večjo občutljivost kometnega testa v primerjavi z Amesovim testom in nekaterimi drugimi testi genotoksičnosti (Monarca in sod., 2004). Reifferscheid in Grummt (2000) sta testirala površinske vode z različnimi testi (Amesov test, luminometrični *umu* test, test alkalne elucije, test odvijanja DNA, kometni test in test neplanirane sinteze DNA). Ta raziskava je pokazala, da je bil v večini primerov kometni test enako občutljiv kot bakterijski testi. Iz dobljenih rezultatov so zaključili, da za zanesljivo ugotavljanje genotoksičnosti površinskih voda, potrebujemo nabor dveh ali treh testnih sistemov. V prvi fazi priporočajo uporabo kometnega testa, v naslednjih fazah pa Amesov ali *umu* test (Reifferscheid in Grummt, 2000).

Kometni test je možno uporabljati tudi pri monitoringu kvalitete stekleničenih mineralnih vod kot priporočajo Biscardi in sod. (2003). V svoji raziskavi so Biscardi in sod. spremljali učinke PET embalaže na organizme. Razen kometnega testa na človeških levkocitih so uporabili še test mikrojedera na rastlini *Tradescantia*. Ugotovili so, da bi z uporabo teh testov v monitoringu lahko zmanjšali ali celo popolnoma preprečili izpostavljenost genotoksičnim ali kancerogenim onesnažilom stekleničene vode (Biscardi in sod., 2003).

Biološki testi imajo tudi nekatere pomembne pomanjkljivosti. Rezultatov, ki jih dobimo z uporabo bioloških testov, ne moremo neposredno uporabiti za ocenjevanje tveganja za razvoj rakavih in drugih bolezni pri ljudeh (Meier in Daniel, 1990). Ne glede na to, ali pri testu uporabimo celične kulture ali organizme, dobljenih rezultatov ne moremo posplošiti na ljudi. Rezultati pa nam lahko pomagajo, da predvidimo potencialen učinek na ljudi in se na osnovi tega odločimo za uvedbo ustreznih ukrepov, da preprečimo škodljivo delovanje. Specifičnega učinka na ljudi pa ne moremo z gotovostjo dokazati. Druga slabost bioloških testov je, da z njimi ne moremo ugotoviti, katera izmed snovi, prisotnih v vzorcu, deluje citotoksično oziroma genotoksično (Knasmüller in sod., 1998). Kljub temu so biološki testi koristno orodje, s katerim pridobimo informacije o morebitni ogroženosti zdravja, zaradi uživanja onesnažene vode oziroma drugih vzorcev (Meier in Daniel, 1990). Pri testiranju kompleksnih okoljskih vzorcev, kot je voda, je zato preporočljivo dopolniti fizikalno-kemijske in mikrobiološke analize z biološkimi testi. Pri tem je treba uporabljati več različnih testov, katerih občutljivost in specifičnost se dopolnjujeta. Nekateri raziskovalci priporočajo tudi uporabo testov, ki delujejo na različnih trofičnih nivojih (bakterije/rastline/živalske celice) (Helma in sod., 1994), da bi lahko čim boljše predvideli učinek okoljskih vzorcev na ljudi in druge organizme v vsakdanjem življenju, izven kontroliranih laboratorijskih pogojev. Testa, uporabljena v diplomski nalogi (test MTT in kometni test), sta se izkazala kot dovolj občutljiva in specifična za tovrstno uporabo. To potrjujejo tudi druge raziskave (Ohe in sod., 2004; Lah in sod., 2005; Monarca in sod.,

2004). Zato bi bilo smotrno monitoring kvalitete in zdravstvene ustreznosti pitnih in stekleničenih dopolniti z naborom zanesljivih bioloških testov.

Na podlagi rezultatov naše diplomske naloge lahko podamo naslednje sklepe:

- Ugotovili smo, da koncentrirani vzorci naravnih in mineralnih vod delujejo citotoksično na celice HepG2, vendar na podlagi testa ne moremo ugotoviti, katera izmed snovi v vzorcu je vzrok citotoksičnega delovanja.
- S kometnim testom smo po 20-urni izpostavitvi celic pri enem vzorcu pokazali statistično značilno zmanjšanje poškodb DNA, pri dveh statistično značilno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Povečanje poškodb DNA ni bilo odvisno od doze oziroma koncentracije vzorca, zato ne moremo z gotovostjo trditi niti da sta genotoksična za gojene sesalske celice, niti, da nista.
- Test MTT se je izkazal kot primeren in zadosti občutljiv za določanje citotoksičnosti pitnih vod, kometni test pa kot primeren in zadosti občutljiv za določanje genotoksičnosti pitnih vod. Uporabljeni testi bi kot takšne lahko vključili v monitoring pitnih in stekleničenih vod.

6 POVZETEK

Voda je za človeka in druga živa bitja življenjskega pomena. V primerjavi z drugimi tekočinami in hrano, jo ljudje v organizem vnašajo v ogromnih količinah. Vode je na Zemlji sedem desetlin celotne površine, vendar človek lahko uporablja le zelo majhen del te velike količine vodovja, saj za življenje potrebuje neonesnaženo sladko vodo. Ker je le-te vse manj, iz dneva v dan raste število ljudi na svetu, ki so brez neoporečne pitne vode. Viri onesnaženj so različni, lahko so naravnega izvora ali pa so posledica človekovih dejavnosti. Onesnažena voda ima negativen vpliv na zdravje ljudi in drugih živih bitij, predvsem zaradi vsebnosti škodljivih dejavnikov kot so citotoksični in genotoksični dejavniki. Zelo pomembno je pri monitoringu pitnih vod poleg fizikalno-kemijskih in mikrobioloških analiz uporabljati biološke teste, ki lahko tovrstne škodljive učinke zaznajo.

V diplomski nalogi smo ugotavljali citotoksično in genotoksično delovanje naravnih in mineralnih vod na človeške jetrne celice HepG2. Uporabili smo dva testa, test MTT in kometni test. Citotoksičnost smo ugotavljali s testom MTT po postopku, ki ga je opisal Mosmann (1983) z manjšimi modifikacijami. Genotoksičnost smo ugotavljali s kometnim testom po postopku, ki so ga opisali Singh in sod. (1988) z manjšimi modifikacijami. Rezultate obeh testov smo statistično ovrednotili. Za analizo razlik med celicami tretiranimi z vzorci in kontrolnimi celicami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo median odstotka DNA v repu smo uporabili test Dunnett.

S testom MTT smo pri nekaterih vzorcih (vzorci 5, 6, 9, 10 in 13) ugotovili citotoksično delovanje. Z uporabljenim testom ne moremo ugotoviti, kaj je vzrok citotoksičnosti testiranih vzorcev. Da bi ugotovili točen vzrok zmanjšane preživetja celic, bi morali uporabiti fizikalno-kemijske analize.

Pri rezultatih kometnega testa, smo pri vzorcu 2 opazili statistično značilno zmanjšanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino, pri vzorcih 5 in 6 pa smo opazili povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino. Povečanje poškodb DNA ni bilo odvisno od doze oziroma koncentracije vzorca, zato ne moremo z gotovostjo trditi niti da sta genotoksična za gojene sesalske celice, niti, da nista. Genotoksičnost vzorcev, testiranih v naši diplomski nalogi, je bila testirana tudi z Amesovim testom. Rezultati so pokazali, da vzorci niso delovali genotoksično.

V okoljskih vzorcih, kot sta voda in zrak, se lahko znajdejo različna onesnažila. Marsikatera med njimi so lahko škodljiva in predstavljajo tveganje za zdravje živih bitij. Zato potrebujemo ustrezne metode ocenjevanja tveganja za ljudi in okolje, ki nam lahko hkrati pomagajo, da to tveganje učinkovito nadziramo. Metodi, ki smo jih mi uporabili v naši nalogi, sta se izkazali kot občutljivo in zanesljivo orodje za določanje citotoksičnosti in genotoksičnosti naravnih in mineralnih vod. Takšne metode bi bilo potrebno vključiti v programe preverjanja kvalitete pitnih in stekleničenih vod. Zaželeno je uporaba več različnih metod, katerih rezultati bi se medsebojno dopolnjevali. Edino na ta način lahko zmanjšamo tveganje za razvoj bolezni, ki ga onesnaženost, prisotna v današnjem času prinaša s seboj.

7 VIRI

- Abel P. D. 1996. Water pollution biology. 2nd ed. London, Taylor and Francis Ltd: 286 str.
- Aden D. P., Vogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B. B. 1979. Controlled synthesis of HBS Ag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615-616
- Biscardi D., Monarca S., Fusco R. D., Senatore F., Poli P., Buschini A., Rossi C., Zani C. 2003. Evaluation of the migration of mutagens/carcinogens from PET bottles into mineral water by *Tradescantia*/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. *Science of the Total Environment*, 302: 101-108
- Coffin J. C., Ge R., Yang S., Kramer P. M., Tao L., Pereira M. A. 2000. Effects of trihalomethanes on cell proliferation and DNA methylation in female B6C3F1 mouse liver. *Toxicological Sciences*, 58: 234-252
- Collins A. R., Ai-Guo 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., Duthie S. J., Dobson V. L. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14: 1733-1735
- Dearfield K. L., Cimino M. C., McCarroll N. E., Mauer I., Valcovic L. R. 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, 521: 121-135
- Dizer H., Wittekindt E., Fischer B., Hansen P.-D. 2002. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, *umu*-assay and selected biomarkers. *Chemosphere*, 46: 225-233
- Filipič M. 2004. Genotoksične snovi v vodovodni in embalirani vodi: ali se jim lahko popolnoma izognemo. V: Strokovno posvetovanje Kakovost vodovodne in embalirane pitne vode. Pitne vode '04, Ljubljana, 24.-26.11.2004. Komac M. (ur). Ljubljana, Zavod za tehnično izobraževanje: 93-101
- Gilli G., Schilirò T., Pignata C., Traversi D., Carraro E., Baiocchi C., Aigotti R., Giacosa D., Fea E. 2005. Application of semipermeable membrane device for assessing toxicity in drinking water. *Chemosphere*, 61: 1691-1699
- Gulis G.M., Czompolyova S., Cerhan J.R. 2002. En ecologic study of nitrate in municipal drinking water and cancer incidence in Trnava district, Slovakia. *Environmental Research*, 88: 182-187

- Helma C., Knasmüller S., Schulte-Hermann R. 1994. Die Belastung von Wässern mit genotoxischen Substanzen. I. Methoden zur Prüfung der Genotoxizität. Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie, 6: 277-288
- Helma C., Eckl P., Gottmann E., Kassie F., Rodinger W., Steinkeller H., Windpassinger C., Schulte-Hermann R., Knasmüller S. 1998. Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. Environmental Science Technology, 32: 1799-1805
- Hirose A., Nishikawa A., Kinoshita N., Hasegawa R. 1999. 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX): toxicological properties and risk assesment in drinking water. Review in Environmental Health, 14: 103-120
- Horvátová E., Slameňová D., Hlinčíková L., Kumar Mandal T., Gábelová A., Collins A. R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with comet assay. Mutation Research, 409: 163-171
- Houk V. S. 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents-a review. Mutation Research, 277: 91-138
- IARC-International Agency for Cancer Research. 1997. Chlorinated drinking-water, chlorination by-products, some other halogenated compounds, cobalt and cobalt compounds: Summary of data reported and evaluation. Lyon, WHO - International Agency for Cancer Research. (IARC Monographs: Vol. 52)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol52/volume52.pdf>
(17.05.2006): 35 str
- IARC-International Agency for cancer research. 1997. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals: Summary of data reported and evaluation. Lyon, WHO - International Agency for Cancer Research. (IARC Monographs: Vol. 63)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol63/volume63.pdf>
(17.05.2006): 39 str
- IARC-International Agency for cancer research. 1999. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances: Summary of data reported and evaluation. Lyon, WHO - International Agency for Cancer Research. (IARC Monographs: Vol. 73)
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol73/volume73.pdf>
(17.05.2006): 54 str
- Karakoc F. T., Hewer A., Philips D. H., Gaines A. F., Yuregir G. 1997. Biomarkers of marine pollution observed in species of mullet living in two eastern Mediterranean harbours. Biomarkers, 2: 303-309
- Klotz J. B., Prysch L. A. 1999. Neural tube defects and drinking water disinfection by-products. Epidemiology, 10: 380-390

- Knasmüller S., Helma C., Eckl P. M., Gottmann E., Steinkellner H., Kassie F., Haider T., Parzefall W., Schulte-Hermann R. 1998. Investigation on genotoxic effects of groundwater from the Mitterndorfer Senke and from the vicinity of Wiener Neustadt. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 110, 23: 824-833
- Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W. W., Hoelzl C., Bichler J., Majer B. J. 2004. Use of human-derived liver cell for lines the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198: 315-328
- Knowles B. B., Howe C. C., Aden D. P. 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*, 209: 497-499
- Komulainen H. 2004. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. *Toxicology*, 198: 239-248
- Kronberg L., Vartiainen T. 1988. Ames mutagenicity and concentration of the strong mutagen 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5*H*)-furanone and of its geometric isomer E-2-chloro-3(dichloromethyl)-4-oxo-butenoic acid in chlorine-treated tap waters. *Mutation Research*, 206: 177-182
- Lah B., Žinko B., Narat M., Marinšek-Logar R. 2005. Monitoring of genotoxicity in drinking water using *in vitro* comet assay and Ames test. *Food Technology and Biotechnology*, 43: 139-146
- Lu W. Q., Chen D., Wu X. J., Liu A. I., Liu H., Wu J. J., Mersch-Sundermann V. 2004. DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells (HepG2). *Toxicology*, 198: 351-357
- Meier J. R., Daniel F. B. 1990. The role of short term tests for evaluating human health effects associated with drinking water. *Journal American Water Works Association*, 82: 48-56
- Maron D. M., Ames B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 493: 173-215
- Monarca S., Zanardini A., Feretti D., Dalmiglio A., Falistocco E., Manica P., Nardi G. 1998. Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant tests. *Water Research*, 32, 9: 2689-2695
- Monarca S., Zani C., Richardson S. D., Thruston A. D., Moretti M., Feretti D., Villarini M. 2004. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water. *Water Research*, 38: 3809-3819
- Morris R. D., Audet A. M., Angelillo I. F. 1992. Chlorination, chlorination by-products and cancer: A Meta-analysis. *American Journal of Public Health*, 82: 955-963

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567: 109-149
- Olive P. L., Banath J. P., Durand R. E. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 779-783
- Östling O., Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 123: 291-298
- Park J. H., Lee B. J., Lee S. K., Kim K., Lee K. H., Che J. H., Kang K. S., Lee Y. S. 2000. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities. *Mutation Research*, 466: 173-178
- Pravilnik o pitni vodi. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 19: 2155-2166
<http://www.uradni-list.si/1/ulonline.jsp?urlid=200419&dhid=67749>
(5.08.2005)
- Program monitoringa kakovosti podzemne vode za leto 2004. 2004. Ljubljana, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo Republike Slovenije-Agencija Republike Slovenije za okolje
http://www.arso.gov.si/podrocja/vode/programi/program_podzemne_2004.pdf
(28.06.2005): 28 str
- Rand G. M. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology*. 2nd ed. Bristol, Taylor and Francis: 1125 str.
- Reifferscheid G., Grummt T. 2000. Genotoxicity in German surface waters- Result of a collaborative study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123: 67-79
- Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and application. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254
- 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
- Standard methods for the examination of water and wastewater. 1998. 20th ed. Clesceri L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. (eds). American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF): loč. pag.
- Toxicity of complex mixture from water. 1995. V: Risk assesment and risk management of environmental pollutants: Studies on the hazard identification and toxicity evaluation of

- environmental pollutants (III). Taejon, The Korean Research Institute of Chemical Technology: 119-180
- 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
- Uhl M., Helma C., Knasmüller S. 1999. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutation Research*, 441: 215-224
- Umbezeiro G. A., Roubicek D. A., Rech C. M., Sato M. I. Z., Claxton L. D. 2004. Investigating the sources of the mutagenic activity found in the river using *Salmonella* assay and different water extraction procedures. *Chemosphere*, 54: 1589-1597
- Venitt S., Philips D. H. 1995. The importance of environmental mutagens in human carcinogenesis and germline mutations. V: *Environmental mutagenesis*. Philips D. H., Venitt S. (eds). Oxford, Bios Press: 1-19
- Wegelin M., Canonica S., Alder A. C., Marazuela D., Suter M. J. F., Buchell T. H. D., Haefliger O. P., Zenobi R. 2001. Does sunlight change the material and content of polyethylene terephthalate (PET) bottles? *Journal of Water Science Research and Technology AQUA*, 50: 125-133
- White P. A. 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research*, 515: 85-98
- Žegura B., Filipič M. 2004. Application of in vitro comet assay for genotoxicity testing. V: *Methods in pharmacology and toxicology. Optimization in drug discovery, in vitro methods*. Yan Z., Caldwell G.W. (eds). Totowa, Humana Press: 301-313
- Žegura B., Sedmak B., Filipič M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, 41: 41-48

ZAHVALA

Najprej bi se zahvalila prof. dr. Darji Žgur Bertok za prevzem mentorstva in za potrpežljivost ob branju.

Rada bi se zahvalila predsednici komisije prof. dr. Tatjani Avšič Županc in recenzentki prof. dr. Romani Marinšek Logar.

Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Metki Filipič za nasvete pri izvedbi dela in samem pisanju.

Posebej toplo bi se rada zahvalila somentorici dr. Bojani Žegura za pomoč pri iskanju literature, uspešnem izvajanju praktičnega dela in nadaljnemu usmerjanju pri pisanju naloge.

Največja zahvala gre moji družini za vso podporo v času študija.