

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

---

**Urošević, Sonja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2010**

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

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

*Rights / Prava:* [In copyright/Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Sonja Urošević**

**Primjena induksijskog faktora u usporedbi rezultata komet-testa  
izvodenog u razliitim uvjetima elektroforeze**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2010. godina**

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

## **ZAHVALE**

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

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

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

Veliko hvala Ivoru.

---

## **TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

---

Sveu ilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matemati ki fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### **PRIMJENA INDUKCIJSKOG FAKTORA U USPOREDBI REZULTATA KOMET-TESTA IZVO ENOG U RAZLI ITIM UVJETIMA ELEKTROFOREZE**

Sonja Uroševi

Zoologiski zavod  
Biološki odsjek Prirodoslovno-matemati kog fakulteta  
Sveu ilište u Zagrebu  
Rooseveltov trg 6, Zagreb

Komet-test je osjetljiva, brza i ekonomi na metoda koja detektira ošte enja DNA u pojedina nim stanicama. Zbog svoje jednostavne provedbe, esto je korišten pri utvr ivanju i procjeni genotoksi nog djelovanja. Razli iti uvjeti i na ini provedbe komet-testa, otežavaju uspore ivanje dobivenih podataka i rezultata. Stoga je namjera ovog rada istražiti primjenu normiranja, koja bi omogu ila usporedbu rezultata dobivenih komet-testom izvo enog u razli itim uvjetima elektroforeze. U ovom radu korištene su dvije stani ne linije – PLHC-1 i ZFL te dva modelna genotoksikanta - etil-metanosulfonat (EMS) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). Komet-test je za sve navedene varijable bio izvo en u etiri razli ita uvjeta elektroforeze, ovisno o ja ini (25-35 V) i trajanju (15-20 min). Promatran je genotoksi ni u inak, koji je prikazan kao postotak DNA koja je tijekom elektroforeze migrirala u rep (% tDNA) za obje stani ne linije tretirane s EMS-om i vodikovim peroksidom. Indukcijski faktor (IF) je prikazan kao razlika u % tDNA izme u kontrole i tretiranih grupa.

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

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Klju ne rije i: genotoksi nost, komet-test, induksijski faktor, PLHC-1 stani na linija, ZFL stani na linija, EMS,  $H_2O_2$

Voditelj: Dr. sc. Goran I. V. Klobu ar, red. prof.

Ocenitelji: Dr. Sc. Goran I. V. Klobu ar, red.prof.  
Dr. Sc. Mirjana Pavlica, red.prof.  
Dr. Sc. Domagoj iki , doc.

Rad prihva en: 01.12.2010.

---

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

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

Sonja Uroševi

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

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

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

Thesis deposited in the Central biological library

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

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

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

Thesis accepted: 1st of December 2010.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biomonitoring .....	1
1.2. Komet-test .....	2
1.3. Genotoksi nost .....	4
1.4. Riblje stani ne linije .....	6
1.4.1. Stani na linija PLHC-1 .....	7
1.4.2. Stani na linija ZFL .....	7
1.5. Modelni genotoksi ni agensi .....	8
1.5.1. Etil-metanosulfonat (EMS) .....	8
1.5.2. Vodikov peroksid .....	9
1.6. Cilj istraživanja .....	9
<b>2. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>11</b>
2.1. Priprema PLHC-1 i ZFL stani nih kultura i tretiranje stanica.....	11
2.2. Eksperimentalni uvjeti .....	11
2.3. Komet-test.....	12
2.4. Mikroskopska analiza preparata .....	13
2.5. Statisti ka obrada podataka .....	15
<b>3. REZULTATI .....</b>	<b>16</b>
3.1. PLHC-1 stani na linija.....	16
3.1.1. EMS .....	16
3.1.2. Vodikov peroksid .....	17
3.1.3. Indukcijski faktor .....	19
3.2. ZFL stani na linija .....	20
3.2.1. EMS .....	20
3.2.2. Vodikov peroksid .....	21
3.2.3. Indukcijski faktor .....	23
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
<b>5. ZAKLJU AK.....</b>	<b>28</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>29</b>

# **1. UVOD**

## **1.1. Biomonitoring**

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

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

S ciljem pravovremenog otkrivanja negativnih promjena u okolišu nastalih one iščekanjem i određivanjem stupnja izloženosti organizama one iščekujuće, potrebno je provoditi biološki nadzor okoliša, tj. biomonitoring. Biomonitoring podrazumijeva

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

## 1.2. Komet-test

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

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

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

mjesta osjetljiva na lužnate uvjete te mjesta nepotpunog popravka ošte enja izrezivanjem, od kojih se oboje ispoljavaju kao jednolan ani lomovi (Tice i sur. 2000). Upravo su jednolan ani DNA lomovi naj eš a primarna ošte enja DNA i vrlo osjetljiv biomarker genotoksi nosti (Kammann i sur. 2001). Tako er, ovom je metodom mogu e detektirati i unakrsne veze DNA-DNA i DNA-protein, koje, za razliku od lomova, smanjuju DNA migraciju u usporedbi s kontrolom (Hartmann i sur. 2003). Iako komet-test otkriva lezije koje su nastale nedavno i mogu se popraviti (Frenzilli i sur. 2009), prevelik genotoksi ni pritisak može rezultirati nasljednim promjenama DNA s negativnim posljedicama koje se mogu pokazati tek u narednim generacijama (Schnurstein i Braunbeck 2001).

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

Komet-test je esto korištena metoda procjene genotoksi nosti i u *in vivo* i u *in vitro* sustavima. Uspješno je izveden sa nekoliko ribljih stani nih linija, uklju uju i RTG-2 (Nehls i Segner 2001), RTL-W1 (Nehls i Segner 2001; Rocha i sur. 2009), RTH-149 (Avishai i sur. 2002; Kamer i Rinkevich 2002) i EPC stani ne linije (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Komet-test na stani noj liniji EPC pokazao je jasne razlike u genotoksi nosti ekstrakata morskog sedimenta s razli itih lokacija u Sjevernom i Balti kom moru, a rezultati su povezani s ukupnom koli inom organske tvari u sedimentu i s analiziranim zaga iva ima (Kammann i sur. 2001; Kammann i sur. 2004). Kamer i Rinkevich (2002) su upotrebu komet-testa na ribljim hepatocitima stani ne linije RTH-149 ocijenili kao brzu i osjetljivu metodu prikladnu za otkrivanje genotoksi nog potencijala u programima monitoringa vodenog okoliša. Rezultati Nehlsa i Segnera (2005) tako er upu uju na prikladnost komet-testa sa stani nom linijom RTG-2 kao *in vitro* metode istraživanja genotoksi nog potencijala uzoraka iz okoliša.

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

### **1.3. Genotoksičnost**

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

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

pove ana u estalost bolesti, smanjene prilagodbe i preživljavanje, te na kraju nestanak vrste. Sve te poreme aje zajedno naziva sindromom genotoksi nih bolesti. Ukoliko se ne poprave, nastala ošte enja DNA molekule mogu uzrokovati niz posljedica na razini stanice, organa, jedinke te na kraju i cijele populacije (Lee i sur. 2003). ak i u malim koncentracijama, genotoksikanti mogu djelovati na razini populacije i zajednice i to kroz više generacija. Ošte enje DNA je izvrstan pokazatelj štetnog djelovanja na okoliš jer otvara mogunost preventivnog djelovanja s ciljem zaštite i očuvanja viših razina biološke organizacije, npr. očuvanja populacija ili vrsta, te općenito bolje kvalitete okoliša.

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

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

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

#### **1.4. Ribilje stani ne linije**

Do podataka o toksi nom u inku na molekularnoj i stani noj razini može se u inkovito do i uz pomo stani nih kultura (Bols i sur. 2005). Stani ne kulture, osobito one dobivene iz riba, uspješno se primjenjuju u ekotoksikološkim istraživanjima kao alternativa istraživanjima na živim organizmima (Davoren i sur. 2005). U usporedbi s *in vivo* istraživanjima, stani ne kulture zahtijevaju manju koli inu uzoraka, provedba testa je brža i jeftinija, osjetljiviji su i specifi niji, a interpretacija rezultata je jasnija jer nema nekih dodatnih imbenika koji bi mogli utjecati na njih, kao što su bioakumulacija i proišavanje (Bols i sur. 2005; Davoren i sur. 2005). Osim toga, upotreboom stani nih kultura smanjuje se korištenje i žrtvovanje životinja. Za prouavanje animalnih stanica *in vitro* koriste se dva tipa stani nih kultura: primarne kulture i stani ne linije. Primarne se kulture dobivaju izravno iz tkiva životinje i uobičajeno traju samo nekoliko dana, dok stani ne linije nastaju nakon prvog supkultiviranja primarne kulture i imaju puno duži životni vijek (Bols i sur. 2005).

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

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

#### **1.4.1. Stani na linija PLHC-1**

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

#### **1.4.2. Stani na linija ZFL**

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

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

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

## **1.5. Modelni genotoksi ni agensi**

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

### **1.5.1. Etil-metanosulfonat (EMS)**

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

### **1.5.2. Vodikov peroksid**

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

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

### **1.6. Cilj istraživanja**

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

Specifi ni ciljevi ovog rada bili su:

- optimizirati metodu komet-testa na PLHC-1 i ZFL ribljim stani nim linijama i usporediti njihovu osjetljivost,
- usporediti utjecaj genotoksi nih agensa EMS i vodikovog peroksida,
- primjeniti induksijski faktor s ciljem ujedna avanja dobivenih rezultata komet-testa pri razli itim uvjetima elektroforeze (duljina trajanja i voltaža elektroforeze) i njihove lakše usporedbe

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Priprema PLHC-1 i ZFL stani nih kultura i tretiranje stanica**

PLHC-1 stanice (ATCC CRL-2406) su uzgajane u flaskovima za kulturu stanica površine  $25\text{ cm}^2$  u DMEM/F12 mediju (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) s 5% fetalnog gove eg seruma (eng. *foetal bovine serum* - FBS) (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, USA) na  $30^\circ\text{C}$ . Stanice su presa ivane svakih 3-5 dana u omjeru 1:3.

ZFL stanice su uzgajane u flaskovima za kulturu stanica površine  $25\text{ cm}^2$  u mediju koji se sastoji od 15% F12 (Invitrogen), 35% DMEM (Invitrogen), 50% L15 (Invitrogen) uz dodatak 0.15 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 3.9 g/L Hepes, 10 mg/L inzulina i 5% FBS.

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

### **2.2. Eksperimentalni uvjeti**

- izlaganje genotoksi nom agensu:
  - 1) EMS (etil-metanosulfonat) – 2h  
Koncentracije: 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$
  - 2) vodikov peroksid – 10min  
Koncentracije: 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$

- uvjeti elektroforeze:

**a** = 25 V/15 min

**b** = 25 V/20 min

**c** = 35 V/15 min

**d** = 35 V/20 min

### 2.3. Komet-test

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



**Slika 1. Kadice za elektroforezu, obložene ledom**

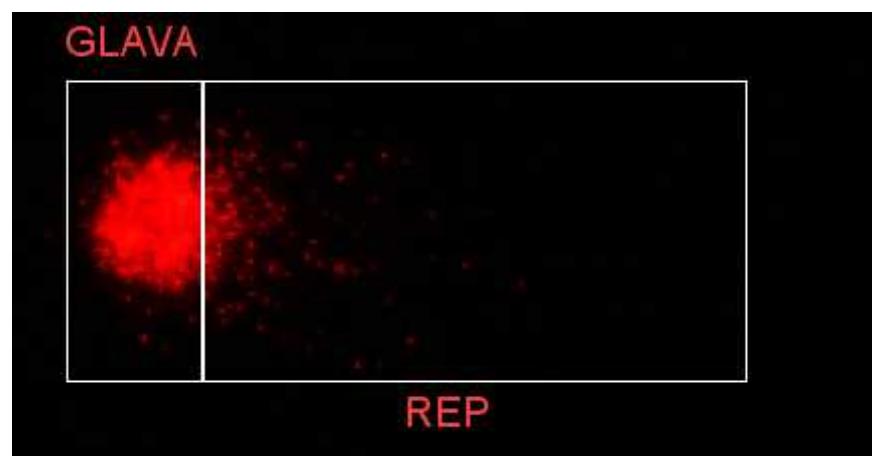
#### **2.4. Mikroskopska analiza preparata**

Prije pregledavanja preparata mikroskopom, stanice su rehidrirane destiliranim vodom i tretirane otopinom fluorescentne boje etidij bromid ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) (EtBr, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Suvišak boje je ispran destiliranim vodom, a preparati su prekriveni pokrovnicama i pregledani Zeiss Axioplan epifluorescencijskim mikroskopom (filter 09: ekscitacija na valnoj duljini 520 nm, emisija na valnoj duljini 610 nm) pri povećanju objektiva 40x. Mikroskop je povezan s CCD kamerom. Po svakom preparatu je pregledano i fotografirano najmanje 50 nasumi no odabranih stanica (slika 2.).

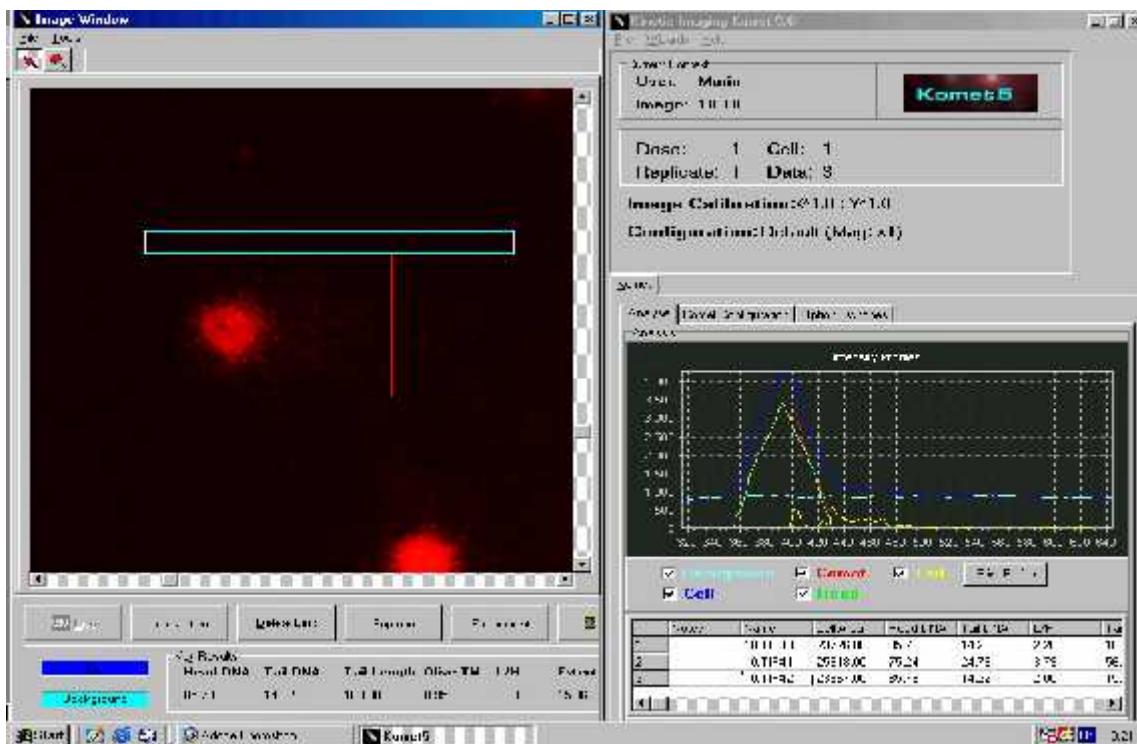


Slika 2. Fluorescencijsko mikroskopska slika PLHC-1 stanica nakon izvedenog komet-testa.

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



Slika 3. «Glava» i «rep» «kometa».



Slika 4. Analiza jezgara pomo u ra unalnog programa Komet 5 Kinetic Imaging

## 2.5. Statisti ka obrada podataka

Za svaku je grupu izra unata srednja vrijednost DNA ošte enja na temelju srednjih vrijednosti svake od replika unutar grupe. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i pripadaju a standardna pogreška ( $\bar{x} \pm SEM$ ). Za statisti ku analizu je korišten Mann-Whitney *U*-test. Statisti ki zna ajni podaci su odre eni sa  $p < 0.05$ . Za PLHC-1 i ZFL stani ne linije i njihove genotoksikante (EMS,  $H_2O_2$ ) je izra unat induksijski faktor (IF) dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije sa srednjom vrijednosti % tDNA kontrole.

### 3. REZULTATI

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

#### 3.1. PLHC-1 stani na linija

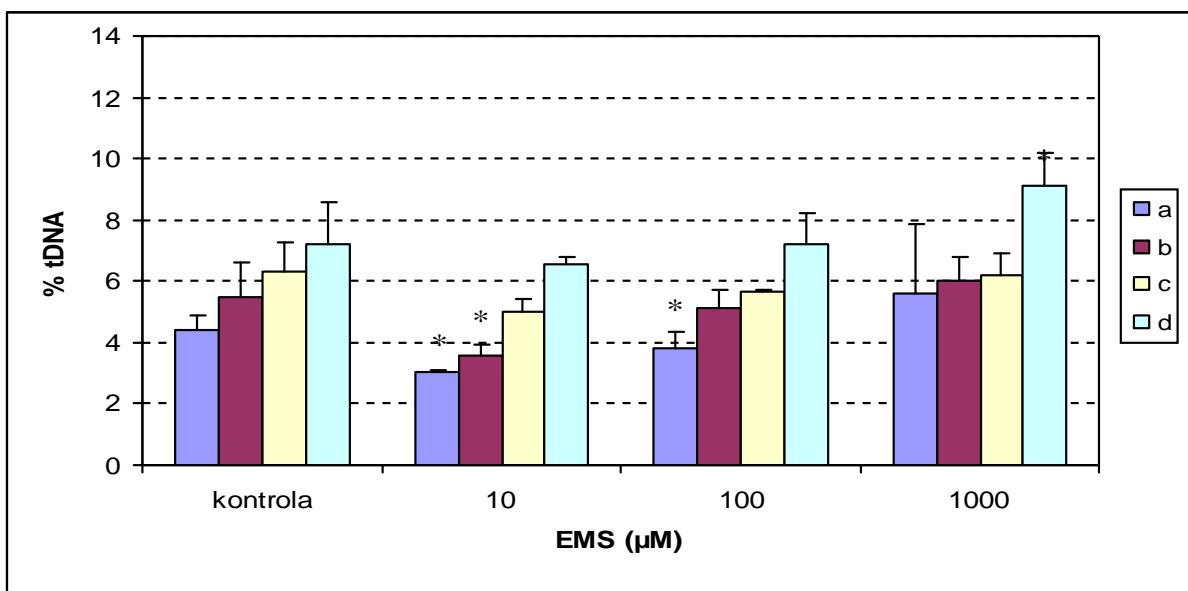
##### 3.1.1. EMS

Prema tablici 1. najveća ošte enje DNA su pokazale stanice tretirane koncentracijom od  $1000 \mu\text{M}$  EMS-a pri uvjetima 35 V elektroforeze (9,1%), dok su stanice tretirane s najmanjom koncentracijom EMS-a ( $10 \mu\text{M}$ ) i u uvjetima 25 V elektroforeze, imale najmanja ošte enja (3%). Na slici 5. je vidljivo povećanje % tDNA ovisno o uvjetima elektroforeze, tj. za svaku grupu stanica tretiranih određenom koncentracijom EMS-a, vidi se gradacija ošte enja. Postotak tDNA raste od uvjeta  $a$  (pri elektroforezi od 25 V provođenoj 15 min) do uvjeta  $d$  (pri elektroforezi od 35 V u trajanju od 20min) u kontroli i pri svim koncentracijama EMS-a. Stoga, najveća ošte enja su pokazale stanice izložene najdulje vrijeme (20min) s najvećom voltagom (35V). Nije primjeđeno znatan porast genotoksičnosti stanica tretiranih EMS-om osim u najvišoj koncentraciji ( $1000 \mu\text{M}$ ) pod uvjetom  $d$  (35 V, 20 min). Naprotiv, uočeno je hormetrički u inak povećanja integriteta DNA u nižim koncentracijama EMS-a ( $10 \mu\text{M}$  – uvjet  $a$  i  $b$ ,  $100 \mu\text{M}$  – uvjet  $a$ )

**Tablica 1. % tDNA ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) u PLHC-1 stanicama dobiven komet-testom nakon izlaganja**

**različitim koncentracijama EMS-a i različitim uvjetima elektroforeze**

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



**Slika 5.** Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ) u ovisnosti o koncentraciji EMS-a ( $\mu\text{M}$ ),  $p < 0.05$  (\*) u usporedbi s kontrolom.

### 3.1.2. Vodikov peroksid

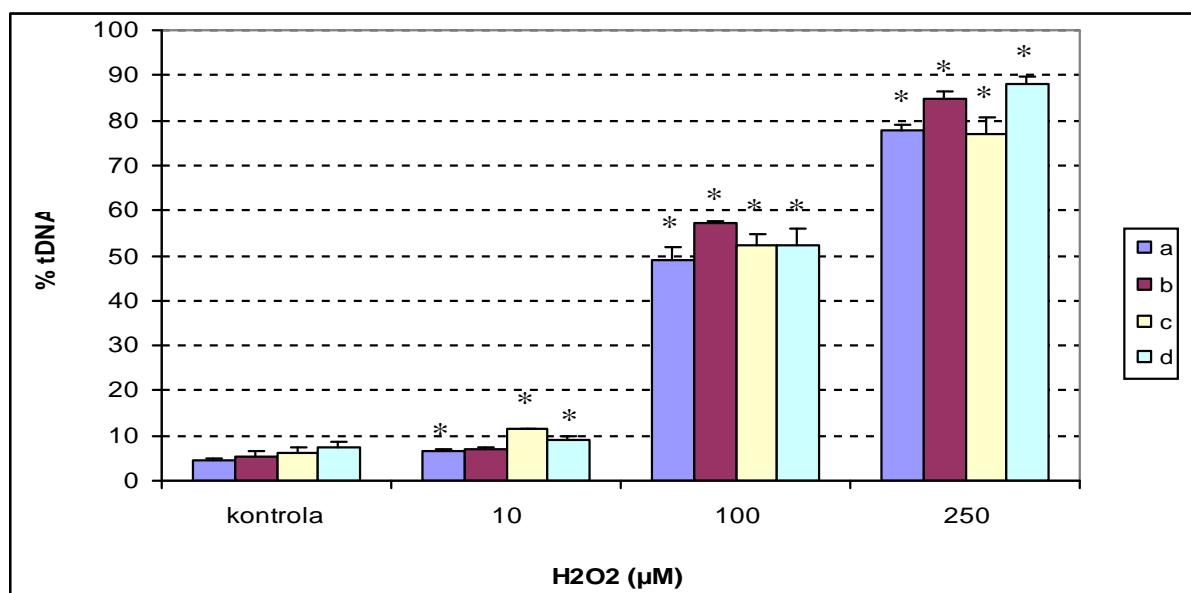
Prema tablici 2. i slici 6., kod stanica tretiranih vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), jasno je uočljiv skok u postotku tDNA između stanica tretiranih s malom koncentracijom vodikovog peroksida ( $10 \mu\text{M}$ ) i onih tretiranih s velikim koncentracijama vodikovog peroksida ( $100 \mu\text{M}$  i  $250 \mu\text{M}$ ). Uspoređujući i utjecaj EMS-a i vodikovog peroksida na istu stanicu liniju (PLHC-1), zapažen je znatno veći postotak ošte enja DNA kod stanica tretiranih s vodikovim peroksidom. Postotak stanica s ošte enjem DNA većim od 50% pri koncentraciji  $100 \mu\text{M}$  vodikovog peroksida prelaze 50%, dok u koncentraciji od  $250 \mu\text{M}$  sve stanice imaju takva velika ošte enja DNA što znači da su vjerojatno mrtve ili u stadiju umiranja. Takvi rezultati ukazuju na veliku citotoksičnost vodikovog peroksida u višim koncentracijama u ovom istraživanju ( $100$  i  $250 \mu\text{M}$ ). Najveće ošte enje su pri najvećim koncentracijama vodikovog peroksida ( $250 \mu\text{M}$ ) gdje su tDNA od ~77% do 88%.

Vidljivo je i povećanje ošte enja promjenom uvjeta elektroforeze od najkratkega vremena i najmanje volataže (a uvjet) do najveće volataže i najduljeg vremena trajanja elektroforeze (d uvjet). Najmanja ošte enja imaju stanice kontrole (~4,42%) i stanice izložene koncentracijama od  $10 \mu\text{M}$  (~6,4%) i to pri a uvjetu elektroforeze. Pri velikim

ošte enjima DNA (jaka citotoksi nost) nema velikih (zna ajnih) razlika izme u rezultata dobivenih u razli itim uvjetima elektroforeze.

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

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



**Slika 6.** Ošte enje DNA u PLHC-1 stanicama prikazano kao % tDNA ( $\bar{x}$   $\pm$  SEM) u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida( $\mu$ M), p  $< 0.05$  (\*) u usporedbi s kontrolom.

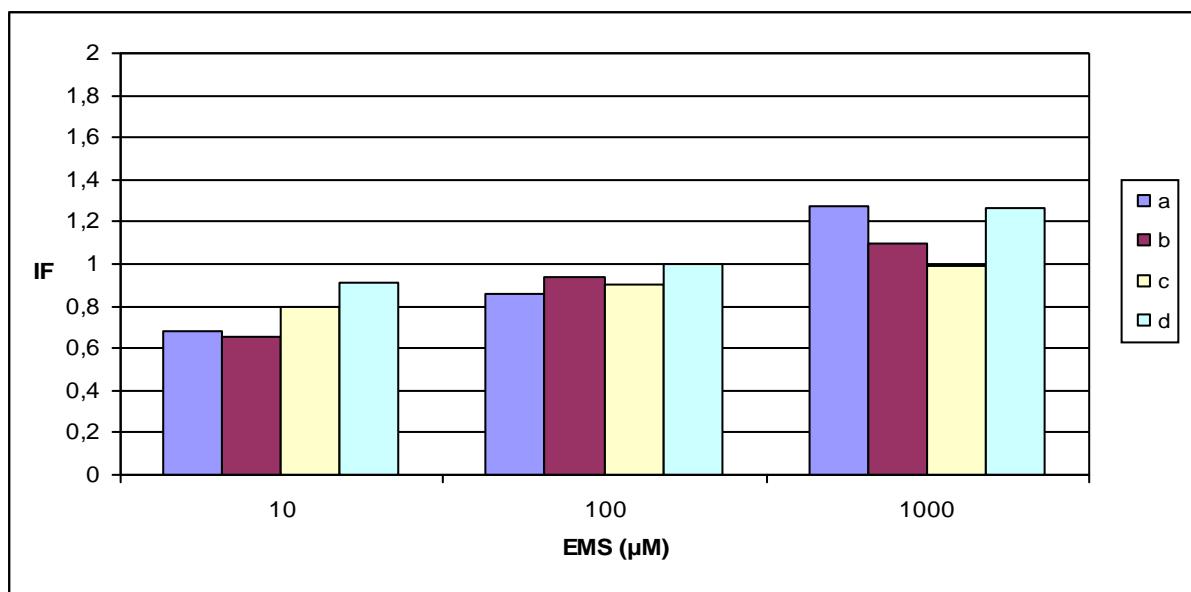
**Tablica 3.** Postotak PLHC-1 stanica sa % tDNA  $>$  50%

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

### 3.1.3. Indukcijski faktor

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

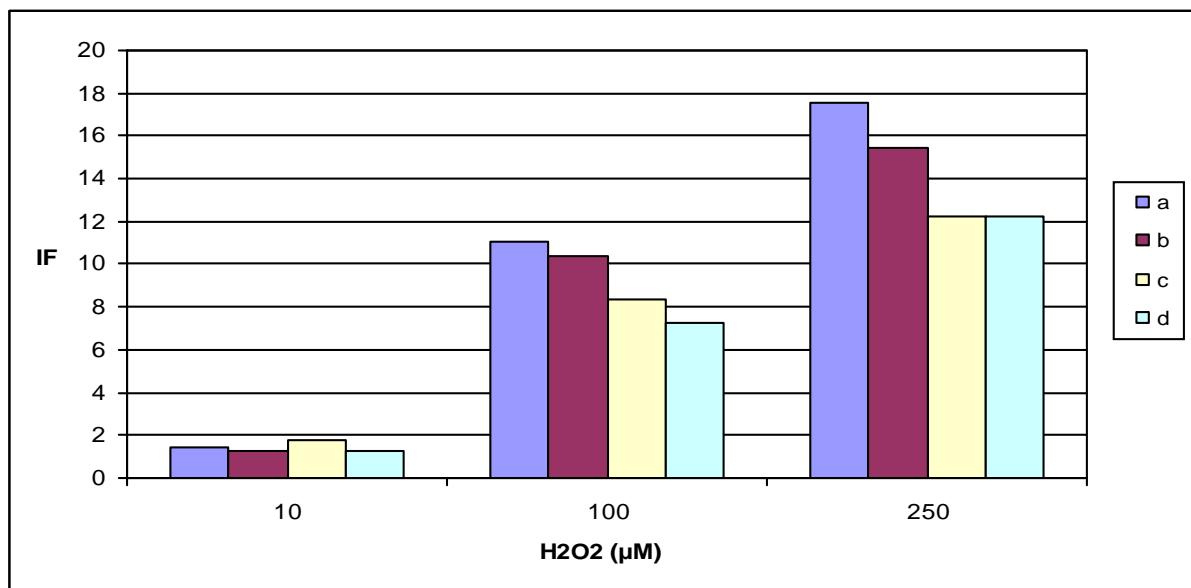
Prema slici 7., jasno je vidljivo podudaranje inducijskog faktora unutar grupa stanica izloženih istim koncentracijama genotoksikanta, neovisno o uvjetima elektroforeze. Omjer između % tDNA kontrole i tretiranih grupa je podjednak u svim uvjetima elektroforeze, tj. IF imaju slične vrijednosti. Najmanji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



Slika 7. Indukcijski faktor PLHC-1 stanica u ovisnosti o koncentraciji EMSa ( $\mu\text{M}$ )

Na slici 8. je prikazan inducijski faktor mjerjen na stanicama PLHC-1, koje su bile izložene razliitim koncentracijama vodikovog peroksidu. Tu se vide veće razlike u vrijednostima inducijskog faktora između grupa tretiranih s  $10 \mu\text{M}$  vodikovim peroksidom i onih tretiranih sa  $100$  i  $250 \mu\text{M}$  vodikovim peroksidom. Pri izlaganju PLHC-1 stanica većim koncentracijama vodikovog peroksidu dolazi do citotoksičnog

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



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

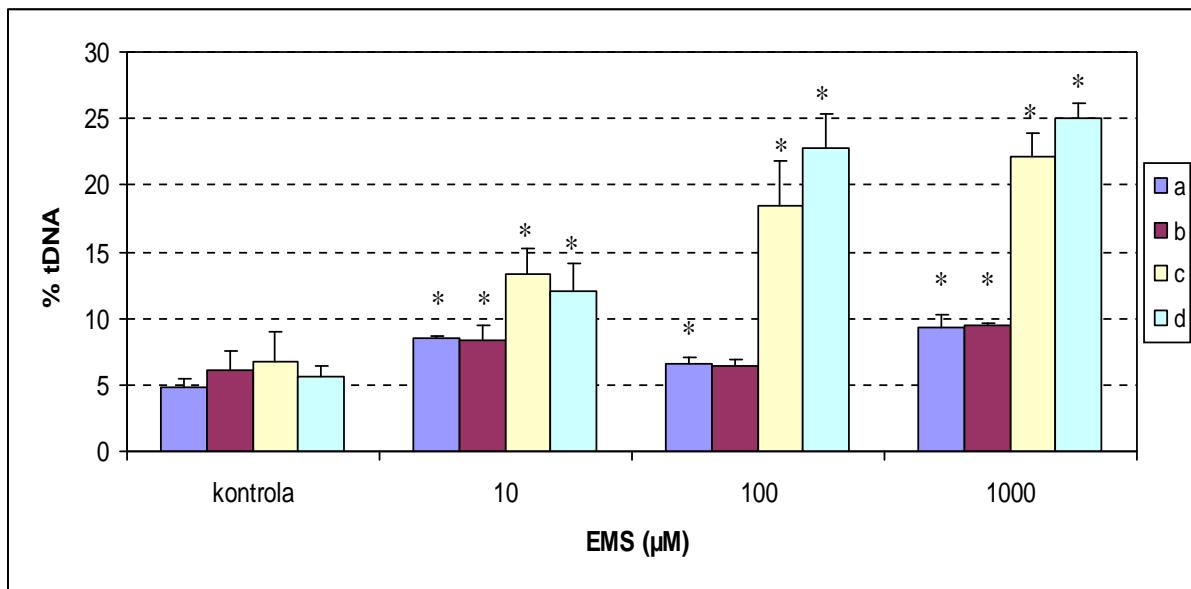
### 3.2. ZFL stani na linija

#### 3.2.1. EMS

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

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

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



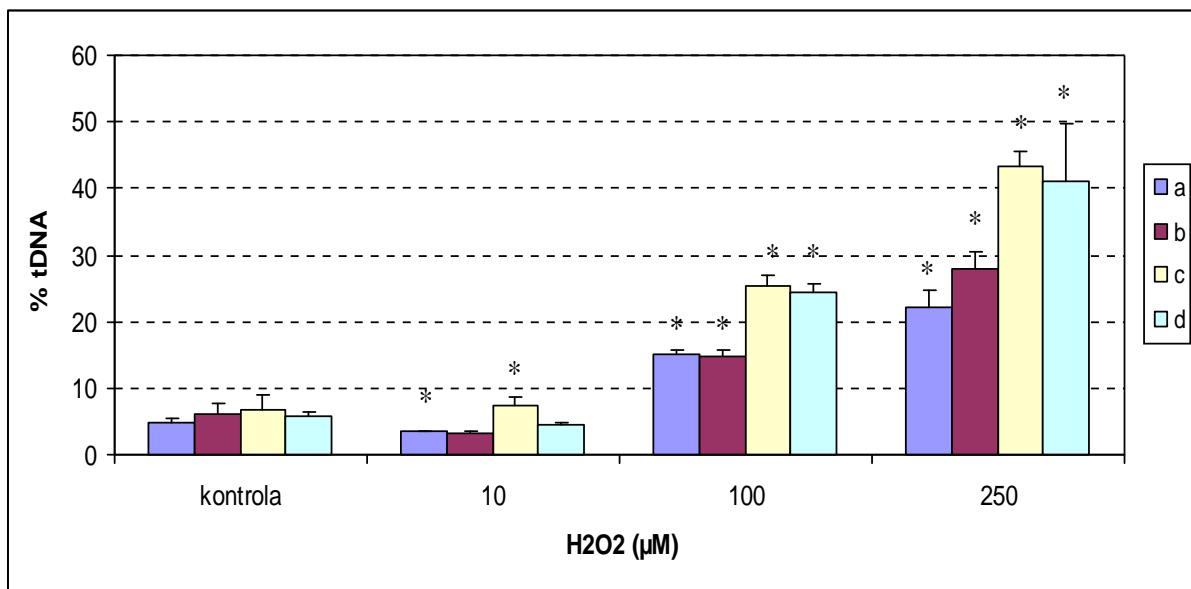
**Slika 9.** Oštećenje DNA u ZFL stanicama prikazano kao % tDNA ( $\bar{x}$  ± SEM) u ovisnosti o koncentraciji EMSa(µM), p < 0.05 (\*) u usporedbi s kontrolom.

### 3.2.2. Vodikov peroksid

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

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

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



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

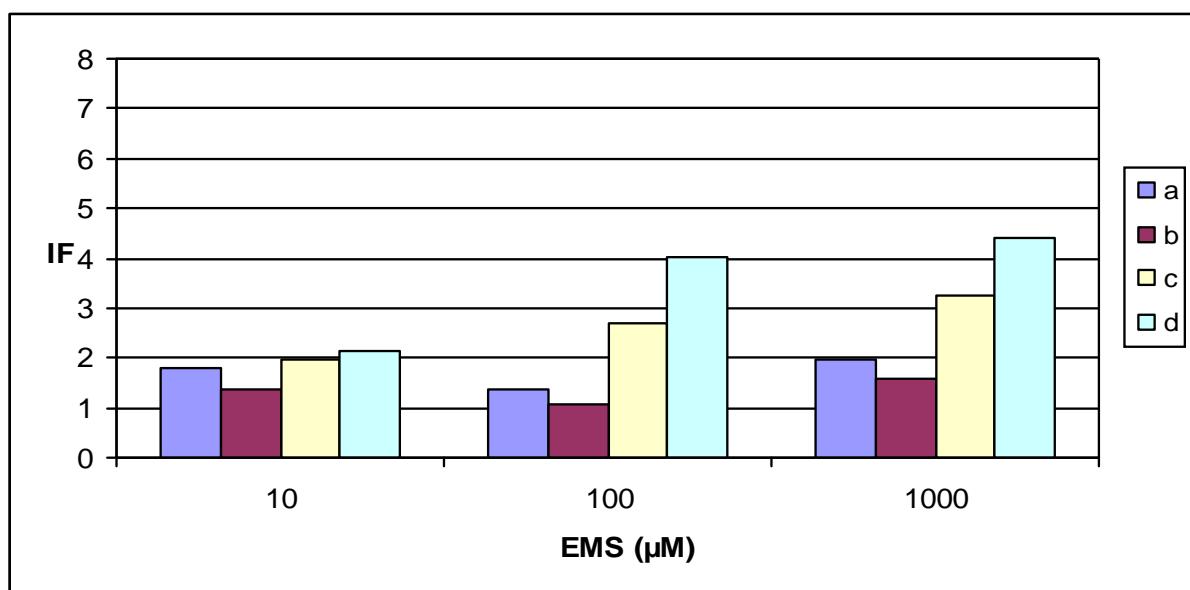
**Tablica 6.** Postotak ZFL stanica sa % tDNA > 50%

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

### 3.2.3. Indukcijski faktor

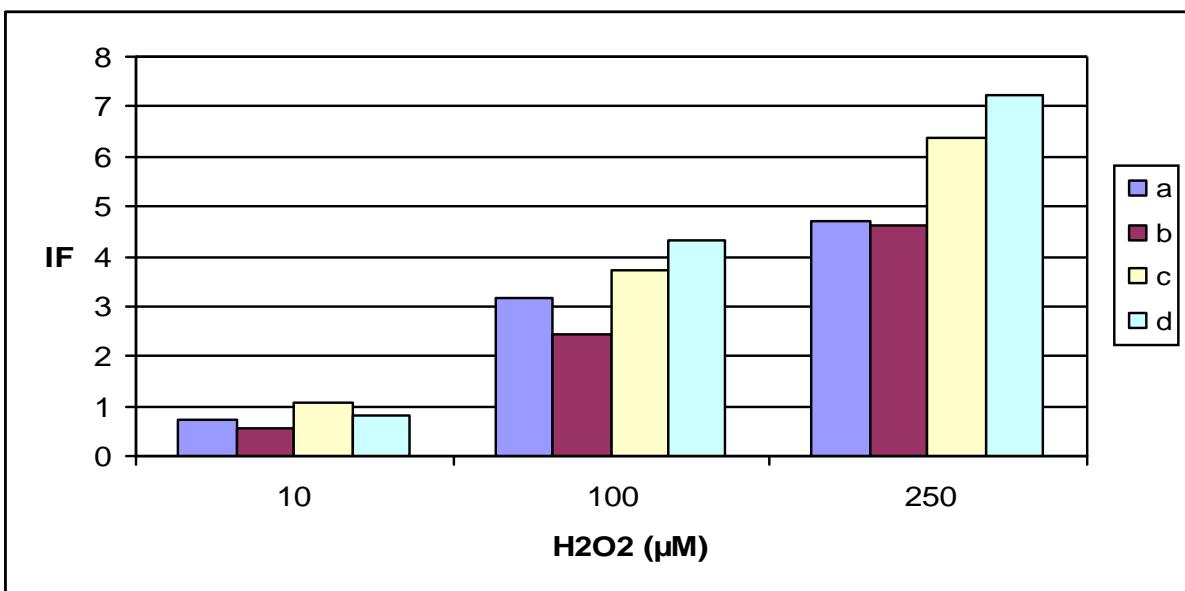
I kod ZFL stanica, IF je izra unat kao razlika u % tDNA izme u kontrole i tretiranih grupa, koja je dobivena dijeljenjem srednje vrijednosti % tDNA svake koncentracije sa srednjom vrijednosti % tDNA kontrole.

Slika 11. prikazuje inducijski faktor mjerен na ZFL stanicama izloženim razli itim koncentracijama EMSa. Za razliku od inducijskog faktora na PLHC-1 stanicama, gdje je bio izrazito pravilan i podjednak po tretiranim grupama, kod ZFL stanica ima odstupanja. Pri koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  inducijski faktor pokazuje ujedna enost neovisno o uvjetima elektroforeze. Pri ve im koncentracijama (100 i 1000  $\mu\text{M}$ ) inducijski faktor je približno sli an za grupe stanica pod *a* i *b* uvjetima elektroforeze i za one grupe stanica pod *c* i *d* uvjetima, dakle prema voltaži.



Slika 11. Indukcijski faktor ZFL stanica u ovisnosti o koncentraciji EMSa ( $\mu\text{M}$ )

Indukcijski faktor prikazan na slici 12., tako er pokazuje podjednake vrijednosti pri niskim koncentracijama vodikovog peroksida (10  $\mu\text{M}$ ). Pove anjem koncentracije vodikovog peroksida dolazi i do ve eg odstupanja, posebice izme u grupa tretiranih s elektroforezom ja ine 25 V (*a* i *b*) i onih tretiranih s 35 V elektroforezom (*c* i *d*).



Slika 12. Indukcijski faktor ZFL stanica u ovisnosti o koncentraciji vodikovog peroksida ( $\mu$ M)

#### **4. RASPRAVA**

Komet-test ili gel elektroforeza pojedina nih stanica (eng. *single cell gel electrophoresis assay* - SCGE) je metoda koja primarno mjeri lomove lanaca DNA u pojedina nim stanicama. Od objavljivanja protokola za izvedbu komet-testa, 1988. godine (Singh i sur.), njegova primjena se proširila na mnoga podru ja – od monitoringa genotoksi nog djelovanja na ljude, radioaktivne biologije do geneti ke ekotoksikologije.

Istraživanja mjerena genotoksi nog djelovanja komet-testom provo ena su u *in vitro* i *in vivo* uvjetima na raznim organizmima - biljke, koluti avci, školjkaši, ribe, vodozemci i sisavci (Cotelle i Ferard 1999). Gujavice su dobar pokazatelj genotoksi nosti one iš enog tla, dok su se školjkaši, ribe i vodozemci pokazali podobnim za procjenu genotoksi nosti vodenog okoliša. Korištenje riba u detektiranju genotoksi nosti rijeka i rije nih sedimenata pokazalo je veliku u inkovitost u *in vitro* uvjetima (Cotelle i Ferard 1999). Nažalost, u mnogim istraživanjima su korišteni razli iti na ini mjerena ošte enja DNA (% DNA u repu, dužina repa, repni moment) što predstavlja veliki problem prilikom uspore ivanja dobivenih rezultata izme u raznih istraživanja. Naj eš a mjera ošte enja DNA u komet-testu je izra unavanje postotka DNA u «repu kometa» jezgara (% tDNA) nakon primijenjene elektroforeze. Kumaravel i Jha (2006) su u *in vitro* i *in vivo* eksperimentima prikazali da su % tDNA i repni moment (Olive tail moment – OTM) najpouzdaniji parametri za mjerjenje ošte enja DNA u komet-testu te da pokazuju dobru korelaciju s odre enom koncentracijom korištenog genotoksikanta. Repni moment obuhva a dužinu «repa kometa» i njegovu gusto u. Problem pri korištenju repnog momenta kao mjere ošte enja DNA je što ne postoje standardne jedinice za njegovo ra unanje pa mu se pridodaju razli ite vrijednosti i interpretacije (Collins i sur. 2008). Osim navedenih mjera ošte enja DNA u komet-testu se koristi i dužina «repa kometa», no kod te mjere je problem što postupak mjerjenja nije ujedna en (mjeri se od sredine ali i od ruba nukleusa/»glave kometa») (Cotelle i Ferard 1999). Osim toga se kod takvog na ina mjerjenja ve pri malim DNA ošte enjima dostiže maksimum dužine «repa kometa», ime se smanjuje iskoristivi raspon testa (Collins i sur. 2008). Neki radovi pri mjerenu rezultata kometa koriste i dodatne parametre kao što su omjer duljine i širine samog «repa kometa». Op enito, % tDNA pokriva najširi raspon ošte enja DNA pa se i preporu a kao najpodobniji parametar za mjerjenje ošte enja DNA (Collins i sur. 2008)

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

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

Usporedujući utjecaj EMS-a i vodikovog peroksidu na istu stanicu liniju, zapažen je znatno veći postotak oštećenja DNA (% tDNA) kod stanica tretiranih s vodikovim peroksidom. Pogotovo kod stanica tretiranih s većim koncentracijama vodikovog peroksidu, gdje srednje vrijednosti oštećenja prelaze i 50% tDNA. Utjecaj na rezultate ima i osjetljivost određene stanične linije. U ovom istraživanju je vidljiva znatnija osjetljivost PLHC-1 stanične linije na genotoksičnost djelovanja vodikovog peroksidu, nego

ZFL stani ne linije. Razlika izme u njihove osjetljivosti je uo ljavija pri tretmanu stanica s ve im koncentracijama vodikovog peroksida, gdje PLHC-1 stanice imaju jako velika ošte enja, ak do 88% tDNA (srednja vrijednost), dok kod ZFL stanica ne prelaze 50% tDNA (srednja vrijednost). Obrnuta situacija uo ena je nakon izlaganja EMSu, gdje su ve u osjetljivost pokazale ZFL stanice.

Usporedba rezultata izme u istraživanja genotoksi nog potencijala koja uklju uju komet-test na odre enoj vrsti stanica nekog odre enog organizma otežana je zbog korištenja razli itih laboratorijskih protokola te mjerena razli itih parametara ošte enja DNA (% DNA u repu, dužina repa, repni moment). Pri istraživanju rezultata komet-testa dolazi i do odre enih odstupanja u samoj metodi izra una i statisti koj analizi. Tako er treba uzeti u obzir da komet-test prikazuje rezultate kao srednju vrijednost ošte enja tretiranih stanica, pri emu ne dolazi do potpunog izražaja raspon odgovora pojedina nih stanica. U ovom radu raspon odgovora, tj. njegov omjer izme u najmanjeg i najve eg postotka ošte enja stanica prikazan je pomo u standardne pogreške.

Potreba za standardizacijom komet-testa na uobi ajeno korištenim vrstama i tipovima stanica radi njegove upotrebe kao biomarkera genotoksi nosti ve je naglašavana (Kim i Hyun 2006; Frenzilli i sur. 2009). S ciljem lakše usporedbe rezultata komet-testa dobivenih u razli itim istraživanjima, predložena je upotreba induksijskog faktora (Bony i sur. 2008, Klobu ar i sur. 2010) koji pokazuje koliko je puta ošte enje DNA kod tretiranih grupa ve e u odnosu na kontrolu. U ovom radu, induksijski faktor je korišten kao sredstvo usporedbe rezultata komet-testa izvo enog u razli itim uvjetima elektroforeze.

Kod PLHC-1 stanica tretiranih EMSom veliko je podudaranje induksijskog faktora unutar grupa stanica izloženih istim koncentracijama genotoksikanta, neovisno o uvjetima elektroforeze. Omjer izme u % tDNA kontrole i tretiranih grupa je podjednak u svim uvjetima elektroforeze (vjerojatno zbog vrlo slabog u inka EMS), tj. induksijski faktori imaju jako sli ne vrijednosti. Najmanji genotoksi ni u inak, a time i najmanji induksijski faktor pokazale su stanice izložene najmanjim koncentracijama i najslabijim elektroforezama. Za razliku od induksijskog faktora na PLHC-1 stanicama, gdje je bio izrazito pravilan i podjednak po tretiranim grupama, kod ZFL stanica ima odstupanja, posebice kod stanica tretiranih ve im koncentracijama toksikanta.

## **5. ZAKLJU AK**

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

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

Primjena induksijskog faktora (IF) u usporedbi rezultata komet-testa na PLHC-1 i ZFL stani nim linijama tretiranim s razliitim koncentracijama EMS-a i vodikovog peroksida izvođenog u razliitim uvjetima elektroforeze nije dala jednoznačne rezultate. Iako su rezultati razliitim trajanjima elektroforeze (15 i 20 min) pri istoj jakosti struje (ista volatza) bili donekle ujednačenog IF-a, razlika u izračunatim induksijskim faktorima između elektroforeze pri 25 i 35 V bila je znatno veća nego primjena IF-a zahtijevati daljnju prilagodbu i istraživanja.

## **6. LITERATURA**

- Anderson S., Sadinski W., Shugart L., Brussard P., Depledge M., Ford T., Hose J., Stegeman J., Suk W., Wirgin I., Wogan G. (1994): Genetic and molecular toxicology: a research framework. *Environ. Health Perspect.* 102: 3-8.
- Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E., Rinkevich B. (2002): Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. *Mutat. Res.* 518: 21-37.
- Babich H., Rosenberg D. W., Borenfreund E. (1991): *In vitro* cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 21: 327-336.
- Bols N. C., Dayeh V. R., Lee L. E. J., Schirmer K. (2005): Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. U: Mommsen T. P., Moon T. W. (ur.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 6, Environmental Toxicology*, Elsevier B. V., str. 43-84.
- Bony S., Gillet C., Bouchez A., Margoum C., Devaux A. (2008) Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89:197–203
- Chapman P. M., Long E. R. (1983): The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14: 81-84.
- Collins A. R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair (Review). *Mol. Biotech.* 26: 249-261.
- Cotelle S., Ferard J. F. (1999): Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34: 246-255.

- Davoren M., Ni Shuilleabhain S., Hartl M.G. J., Sheehan D., O'Brien N. M., O'Halloran J., Van Pelt F. N. A. M., Mothersill C. (2005): Assessing the potential of fish cell lines as tools for the cytotoxicity testing of estuarine sediment aqueous elutriates. *Toxicol. In Vitro* 19: 421-431.
- Devaux A., Personen M., Monod G. (1997): Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 11: 71-79.
- Ejchart A., Sadlej-Sosnowska N. (2003): Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Science Direct, Mutation Research* 534: 85–92.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 37-59.
- Fent K. (2001): Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol. In Vitro* 15: 477-488.
- Fent K., Hunn J. (1996): Cytotoxicity of organic environmental chemicals to fish liver cells (PLHC-1). *Mar. Environ. Res.* 42: 377-382.
- Frenzilli G., Nigro M., Lyons B. P. (2009): The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments: an overview. *Mutat. Res.* 681: 80-92.
- Gocke E., Bürgin H., Müller L., Pfiste T: (2009): Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicology Letters* 190: 254–265.
- Goldberg E. D. (1995): Emerging problems in the coastal zone for the twenty-first century. *Mar. Pollut. Bull.* 31: 152-158.
- Gomez-Gutierrez A., Garnacho E., Bayona J. M., Albaiges J. (2007): Screening ecological risk assessment of persistent organic pollutants in mediterranean sea sediments. *Environ. Int.* 33: 867-876.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Klobu ar G.I.V., Štambuk A., Pavlica M., Serti Peri M., Kutuzovi Hackenberger B., Hylland K. (2010) Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology 19: 77-84

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- Rau M. A., Whitaker J., Freedman J. H., Di Giulio R. T. (2004): Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Toxicol. Pharmacol.* 137: 335-342.
- Reid B. J., Jones K. C., Semple K. T. (2000): Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environ. Pollut.* 108: 103-112.
- Rocha P. S., Luvizotto G. L., Kosmehl T., Böttcher M., Storch V., Braunbeck T., Hollert H. (2009): Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo,Brazil): *In vitro* Comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1842-1848.
- Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. (1999): Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr.* 772: 225-254.
- Schlenk D., Rice C. D. (1998): Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.* 43: 121-129.
- Schnurstein A., Braunbeck T. (2001): Tail moment versus tail length—application of an *in vitro* version of the Comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 187-196.
- Seitz N., Bottcher M., Keiter S., Kosmehl T., Manz W., Hollert H., Braunbeck T. (2008): A novel statistical approach for the evaluation of comet assay data. *Science Direct, Mutation Research* 652: 38–45
- Shahidul Islam M., Tanaka M. (2004): Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 48: 624-649.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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