

KOMETNI PRESKUS V MODELNI PREHRANSKI RAZISKAVI[‡]

Romana MARINŠEK LOGAR^{a)}, Tanja PAJK^{c)} in Karl SALOBIR^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, doc., dr., mag.

^{b)} Isti naslov, prof., dr.

^{c)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za živilstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

Delo je prispelo 2000-02-29, sprejeto 2000-04-10.

Received February 29, 2000, accepted April 10, 2000.

IZVLEČEK

Prehrana je pomembno povezana z nastajanjem prostih radikalov v organizmu in zaščito pred njimi. Tako na primer večkrat nenasičene maščobne kisline povečujejo obremenitev organizma s prostimi radikali. Antioksidativne snovi proste radikale nevtralizirajo. Uvedli smo kometni test (elektroforeza posameznih celic v gelu) za *in vivo* testiranje poškodb jedrne DNK pri laboratorijskih miših. Poskusne živali štirih skupin in kontrolne skupine so dobivale krmo enake osnovne sestave, toda vsaka z drugo vrsto maščob: 1) 10% sončničnega olja, bogatega z oleinsko kislino, 2) 10% sončničnega olja, 3) 10% ogrščičnega olja, 4) 10% svinjske masti, 5) kontrola, 2% sončničnega olja bogatega z oleinsko kislino. Oljem, masti in krmi nismo dodali nobenih antioksidantov. Energijski delež maščob v krmi je bil pri kontrolni skupini 16%, pri ostalih skupinah pa 32%. V poskusu smo ugotovili različne stopnje poškodb levkocitne DNK. Največjo stopnjo poškodb DNK (2,72) so imele miši prve skupine, ki so dobivale sončnično olje, bogato z oleinsko kislino. V kontrolni skupini je bila stopnja poškodb DNK najmanjša (1,56). Podatki so bili obdelani s programskim paketom SAS/STAT (1990). Rezultati so pokazali, da je s kometnim testom mogoče razlikovati kakovost prehranskih maščob z vidika nastajanja prostih radikalov.

Ključne besede: prehrana ljudi / maščobe / antioksidanti / oksidacijski stres / DNK / kometni preskus

COMET ASSAY IN NUTRITION INVESTIGATION MODEL[§]

ABSTRACT

Food is strongly connected with the formation of free radicals in human or animal body. It is also important for the protection against them. Polyunsaturated fatty acids for instance increase the free radicals load of the organism. Antioxidants neutralize free radicals. The comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis) was introduced for the *in vivo* testing of nuclear DNA damage in laboratory mice. Four groups of test animals and one control group were fed with fodder of the same basic composition but with different fats included: 1) 10% oleic acid rich sunflower oil, 2) 10% sunflower oil, 3) 10% rape oil, 4) 10% lard, 5) control group, 2% oleic acid rich sunflower oil. No antioxidants were added to the oils, lard or feeds. The energy ratio of fats in fodder was 16% in the control group and 32% in the rest test groups. Different degrees of mice leucocyte

[‡] Delo je nastalo v okviru CRP projekta Prehranski vplivi na kakovost živil živalskega izvora, komplementarna vrednost rastlinskih živil in metode za merjenje kakovosti z vidika vplivov na zdravje porabnikov, V4-9118-0402-98, ki sta ga financirala Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Ministrstvo za znanost in tehnologijo RS Slovenije.

[§] The work is a part of CRP project entitled Feeding Influences on the Quality of Food of Animal Origin and the Nutritional Complementary Value of the Foods of Plant Origin, V4-9118-0402-98, financed by the Ministry of agriculture, forestry and nutrition and the Ministry of science and technology.

DNA damage were detected in the experiment. The highest degree of DNA damage (2.72) was found in the group fed with oleic acid rich sunflower oil. The lowest degree of DNA damage was found in the control group. Data were processed with the SAS/STAT (1990) program package. The results obtained indicate that comet assay is sensitive enough to differentiate the quality of nutritional fats from the view of free radicals formation.

Key words: human nutrition / fats / antioxidants / oxidative stress / DNA / comet assay

UVOD IN PREGLED OBJAV

Poleg pozitivnih vplivov, ki jih imajo na človekovo zdravje, nenasičene maščobne kisline povečujejo prooksidacijsko obremenitev organizma in so tako vključene v mehanizem nastanka celičnih okvar pri oksidacijskem stresu (RDA, 1989). Oksidacijski stres je opredeljen kot stanje, pri katerem prooksidacijski/antioksidacijski sistem organizma pride iz ravnotežja, tako da nastaja več oksidantnih prostih radikalov, kot jih organizem v normalni aerobni presnovi zmore nevtralizirati (Esterbauer, 1996).

Relativna peroksidacijska zmogljivost nenasičenih maščobnih kislin se povečuje z večanjem števila dvojnih vezi (RDA, 1989). S povečanim vnosom nenasičenih maščobnih kislin v organizem je povezano večje nastajanje prostih radikalov in večja potreba po antioksidacijski zaščiti (Esterbauer, 1996). Produkti lipidne peroksidacije pospešujejo propad celičnih membran in povzročijo poškodbe jedrnega dednega materiala (DNK), kar v končni fazi lahko vodi v razvoj kroničnih bolezni (npr. rakavih obolenj) ali celo do direktne celične smrti.

Antioksidanti celice ščitijo pred prostimi radikali in sodelujejo pri popravljalnih mehanizmih, s katerimi organizem do neke mere nevtralizira učinke prostih radikalov (WHO/FAO, 1994). Pri lipidni peroksidaciji lahko antioksidanti preprečijo njeno sprožitev z odstranjevanjem prostih radikalov. Antioksidanti lahko razgradijo perokside v produkte, ki niso radikali, ali odstranjujejo intermediarne radikale in tako pretrgajo verižno reakcijo (Šuput in Kamarič, 1998). Antioksidacijsko obrambo človeškega telesa najbolj učinkovito opravljajo vitamin E, katerega delovanje podpirata vitamin C in selen. Med antioksidacijske snovi prištevamo še: ubikinon (koencim Q₁₀), ki skupaj z α -tokoferolom ščiti LDL-holesterol pred oksidacijo (WHO/FAO, 1994), vitamin A in B₂, flavonoide in sintetične antioksidante.

Kljub delovanju antioksidantov se nekateri prosti radikali izognejo nevtralizaciji z antioksidanti in tako povzročajo celične poškodbe v človeškem telesu. DNK je neprestano izpostavljena oksidacijskim poškodbam. Poškodbe DNK molekul lahko preučujemo in vrednotimo z nekaterimi uveljavljenimi metodami, kot so: test kromosomskih aberacij, test izmenjave sestrskih kromatid in mikronukleusni test. (Fučić, 1997). Poškodbe DNK molekul lahko merimo tudi prek njenih oksidacijskih produktov (npr. 8-hidroksi gvanina in 8-hidroksideoksi gvanozina) s HPLC tehniko (Halliwell in Aruoma, 1997; Pool-Zobel in sod., 1997; Esterbauer, 1995). Med novejšie metode merjenja poškodb DNK pa štejemo kometni test ali elektroforezo posameznih celic v gelu (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE, Singh in sod., 1988; Tice in Velazquez, 1998). S to metodo spremljamo poškodbe DNK (predvsem lome DNK verig) v posameznih celicah in jih lahko precej natančno ovrednotimo. Za analizo so najbolj primerne celice, ki so že naravno suspendirane (npr. krvne celice z jedri, največkrat so to levkociti), in celične kulture. Če celice, ki jih nameravamo testirati s kometnim testom, niso suspendirane, jih moramo z ustreznim postopkom, ki celičnih jeder ne sme poškodovati, ločiti med seboj. Za vsako vrsto tkiva je potrebno izbrati ustrežno metodo celične disociacije (Miyame in sod., 1998).

V predstavljenem delu smo želeli preskusiti primernost kometnega testa za dokazovanje stopnje oksidacijskega stresa, ki ga povzročijo različno nenasičene maščobe v modelnem prehranskem poskusu. Kometni test je kot analitska metoda uveljavljen predvsem pri proučevanju in spremljanju genotoksičnih učinkov jonizirajočih sevanj in učinkov kemičnih

kancerogenih snovi na človeka in živali. Na področju prehranskih raziskav, kjer so direktni učinki posameznih sestavin hrane na jedrni dedni material pogosto slabše izraženi, so izkušnje testiranja teh učinkov s kometnim testom majhne. Tovrstne poskuse največkrat opravljajo *in vitro*, kjer genotoksične učinke opazujejo na celičnih kulturah (Duthie in Dobson, 1999), redko pa so izvedeni na živalskih modelih (Turley in sod., 1998), ki so sicer mnogo primernejši, saj ne odražajo le učinka testirane snovi na eno vrsto celic, ampak vključujejo ves mehanizem interakcij neke snovi z organizmom.

MATERIAL IN METODE DELA

Prehranski poskus z različno nenasičenimi maščobami

Za uvedbo kometnega testa, s katerim smo želeli *in vivo* preskušati učinke prostih radikalov na jedrno DNK smo poiskali primeren živalski model (bele laboratorijske miši moškega spola, stare osem tednov, linija Hsd Hn : NMRI) in ustrezno vrsto testnih celic (levkociti). Miši smo razdelili v pet skupin. Poskusna krma, ki je imela za vse skupine enako osnovno sestavo, je pri prvi skupini vsebovala 10% sončničnega olja, bogatega z oleinsko kislino, pri drugi skupini 10% sončničnega olja, pri tretji skupini 10% ogrščičnega olja, pri četrti skupini 10% svinjske masti in pri peti skupini (kontrola) 2% sončničnega olja, bogatega z oleinsko kislino. Delež energije iz maščob je bil pri prvi, drugi, tretji in četrti skupini 32,33%, pri kontrolni skupini pa 15,65%.

Iz druge, tretje, četrte in pete skupine smo 17., 23., 29., 31. in 42. dan prehranskega poskusa žrtvovali po eno miš in opravili kometne teste. Od te sheme je odstopala prva skupina, kjer je bila ena miš žrtvovana 17. dan, ostale štiri pa 23. dan prehranskega poskusa. Kri smo odvzeli iz vratnih žil miši tik pred kometnim testom. Živali smo pred žrtvovanjem kratkotrajno omamili z etrom. Kri smo natočili v 3 ml epruvete Vacutainer (Brand, 367652), ki imajo že dodan antikoagulant (K_3EDTA), in takoj izolirali levkocite.

Kometni test z mišjimi levkociti

Levkocite smo izolirali po metodi, ki sta jo opisala Johnstone in Thorpe (1990). Najprej smo lizirali eritrocite. 0,5 ml krvi smo v centrifugirki nežno zmešali s 4,5 ml medija RPMI 1640 in 0,5 ml FBS (serum govejega zarodka). Centrifugirali smo pri 300 x g in 4° C 5 min. Supernatant smo zavrgli. Sedimentu smo dodali 5 ml ACK pufra za lizo eritrocitov. Nato smo suspenzijo ročno stresali 5 min. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri 600 x g, 5 min, 4° C. Supernatant smo zavrgli. Sediment smo zmešali s 4,5 ml medija RPMI 1640 in 0,5 ml FBS. Centrifugirali smo pri 600 x g, 5 min, 4° C. Supernatant smo zavrgli. Sedimentu smo dodali 0,5 ml 10 mM PBS (pH=7,2-7,4) in suspenzijo rahlo stresali. Levkocite smo izolirali sterilno in ob najmanjšem možnem izpostavljanju svetlobi, da ne bi povzročili dodatnih poškodb DNK z UV žarki.

Delež med postopkom poškodovanih levkocitov smo ugotavljali z izključitvenim barvanjem z 0,6% barvilom Trypan (Wilson, 1986). Izolirane levkocite smo zmešali z barvilom v prostorninskem razmerju 2:1. Po 5 minutah smo s štetjem v Neubauerjevi števni komorici pri 400-kratni mikroskopski povečavi določili skupno število levkocitov in število poškodovanih levkocitov (le-ti se obarvajo modro) ter izračunali njihov odstotek v vzorcu.

Izolirane levkocite smo v obliki večplastnih minigelov nanesti na mikroskopske objektive. 400 μ L 1% NMP (normal melting point) agaroze smo ročno s plastično razmazovalko za hematološke vzorce razmazali po posebnih mikroskopskih objektivih s hrapavo površino. Na posušen prvi sloj smo nanesti 700 μ L 0,6% NMP agaroze in jo enakomerno porazdelili po celotni površini s polaganjem drugega objektiva. Drugi sloj agaroze smo utrdili na ledeni plošči (10 min). Odstranili smo zgornji objektiv. Izolirane levkocite smo zmešali z 0,6% LMP (low melting point) agarozo pri 37° C v razmerju 1:5. 500 μ L dobljene mešanice smo nanesti kot tretji

sloj na spodnja agarozna sloja in nanj položili drug objektnik. Naneseni sloj smo 10 min utrjevali na ledeni plošči. Odstranili smo zgornji objektnik in nanesli še 500 μ L 0,5% LMP agaroze pri 37° C. Premaz smo pokrili z drugim objektnikom in ga utrdili na ledeni plošči (10 min). Nato smo ga odstranili.

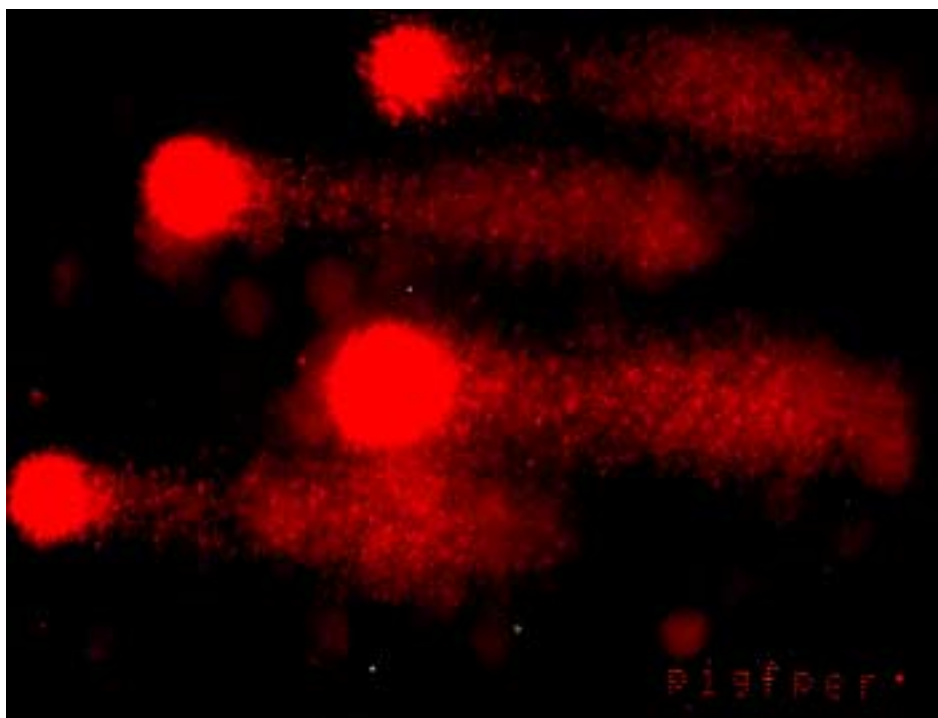
Kot negativno kontrolo smo v vsaki seriji kometnih preskusov uporabili levkocite miši iz kontrolne skupine. Za pozitivno kontrolo smo v vsaki seriji poskusov na levkocitih kontrolne skupine miši umetno izzvali poškodbe jedrne DNK tako, da smo ustrezne minigele pred alkalno celično lizo potopili v raztopino H₂O₂ (500 μ M H₂O₂ v 10 mM PBS) pri 4° C za 5 min. Nato smo jih sprali z raztopino za alkalno celično lizo in v nadaljnjem postopku z njimi ravnali tako, kot z vsemi ostalimi vzorci.

Vse pripravljene minigele smo položili v ohlajeno raztopino 10% dimetilsulfoksida, 1% Triton X-100, 0,03 M NaOH, 1,2 M NaCl in 0,5% N-lavrilsarkozinata v mili Q vodi. Alkalna liza je potekala eno uro pri 4° C.

Dalje smo minigele spirali v ohlajenem elektroforetskem pufri (2mM EDTA in 30mM NaOH) pri 4° C eno uro. Elektroforeza je nato potekala 20 min v temi pri 25V in konstantnih 300 mA.

Minigele smo nevtralizirali v 400 mM pufri TRIS-HCl (pH=7,5) 15 min v temi.

Jedro DNK v minigelih smo barvali v ohlajeni raztopini Et-Br (2 μ g/ml Et-Br v 400 mM pufri TRIS- HCl) pri 4° C 20 min v temi. Barvilo smo spirali s pufrom TRIS-HCl 20 min v temi.



Slika 1. Poškodovana jedra prašičjih levkocitov. (Stopnja poškodbe je 4.)

Figure 1. The damaged nuclei of pig leucocytes. (The degree of damage is 4.)

Rezultate kometnega preskusa smo opazovali in vrednotili z epifluorescentnim mikroskopom. Individualna jedra celic in kometi so dobro vidni in primerni za vrednotenje pri 200-kratni povečavi pri ekscitacijski svetlobi valovnih dolžin med 515 in 560 nm in emisijskem filtru 590 nm. Poškodbe jedrne DNK so sorazmerne z dolžino kometnega repa in z močjo fluorescentnega signala v repu. Ocenjevali smo jih tako, da smo različnim oblikam kometov glede na dolžino repa in močjo fluorescence pripisali vrednosti od 1 do 5 (Miyame in sod., 1998; Tice in Vazques, Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 76(2000)1

1998). Vrednost 1 pomeni nepoškodovano jedro DNK, od vrednosti 2 do 5 pa se poškodbe stopnjujejo. Določali smo tudi delež poškodovanih jeder (jeder s kometnim repom) v vsakem vzorcu. Stopnjo poškodb DNK molekul smo določili 100 naključno izbranim jedrom vsake poskusne miši.

Statistična obdelava rezultatov kometnega preskusa

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili proceduro GLM (General linear models) v programskem paketu SAS/STAT (1990). Pri obdelavi podatkov smo v statističnem modelu upoštevali vpliv skupine in vpliv časa odvzema krvi. Razlike med skupinami smo iz vrednotili s pomočjo Tukeyevega preskusa.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Povprečno stopnjo poškodb DNK v posamezni ponovitvi kometnega preskusa smo izrazili kot vsoto poškodb stotih jeder, ki smo jo delili s 100. Povprečne stopnje poškodb DNK pri petih poskusnih skupinah smo sešteli in delili s 5. V vsaki poskusni skupini je bilo 5 miši.

Povprečna stopnja poškodb DNK po petih ponovitvah kometnega preskusa za vsako poskusno skupino je bila največja pri prvi skupini (sončnično olje bogato z oleinsko kislino) in je padala po naslednjem vrstnem redu: tretja skupina (ogrščično olje), četrta skupina (svinjska mast), druga skupina (sončnično olje) in kontrolna skupina. Rezultate prikazuje preglednica 1.

Prva poskusna skupina (sončnično olje, bogato z oleinsko kislino) ima statistično značilno večjo povprečno stopnjo poškodb DNK kot druga (sončnično olje), četrta (svinjska mast) in peta (kontrola) poskusna skupina. Tretja poskusna skupina (ogrščično olje) se statistično značilno ne razlikuje od nobene skupine.

Preglednica 1. Povprečne stopnje poškodb DNK in statistično značilne razlike med posameznimi poskusnimi skupinami

Table 1. Mean degrees of DNA damages and statistically significant differences between test groups

	Povprečna stopnja poškodb DNK Mean degree of DNA damage
1. skupina (sončnično olje bogato z oleinsko kislino) 1 st group (oleic acid rich sunflower oil)	2,27 ^a ± 0,08
2. skupina (sončnično olje) 2 nd group (sunflower oil)	1,78 ^b ± 0,43
3. skupina (ogrščično olje) 3 rd group (rape seed oil)	1,92 ^{ab} ± 0,23
4. skupina (svinjska mast) 4 th group (lard)	1,80 ^b ± 0,36
5. skupina (kontrola) 5 th group (control)	1,56 ^b ± 0,17

Vrednosti, označene z različnimi nadpisi (a,b), se med seboj statistično značilno razlikujejo ($P \leq 0,05$).

Values, labelled with different superscripts (a,b), differ significantly ($P \leq 0,05$).

Kometni preskus v izvedeni modelni raziskavi z maščobami različne nenasičenosti kaže razlike v stopnji poškodb DNK med poskusnimi skupinami miši, vendar razlike v dokazanih stopnjah oksidacijskih poškodb DNK niso v skladu s pričakovanji in jih najbrž ne smemo pripisati samo razlikam v maščobnokislinski sestavi maščob. Poudariti je treba, da smo uporabili maščobe z definirano (analizirano) maščobnokislinsko sestavo, brez dodatka antioksidantov, za katere pa ne vemo, kakšna je dejanska vsebnost njihovih lastnih antioksidantov. Kometni preskus je bil v taki modelni raziskavi prvič uporabljen, zato moramo rezultate previdno razlagati. Glede na stopnjo nenasičenosti maščobnih kislin v posameznih uporabljenih maščobah in njihovo peroksidno število bi od skupin, ki so dobivale 10% maščob v krmi, pričakovali večje poškodbe v skupini miši, ki je imela krmi dodano sončnično olje in manjše poškodbe v skupini z dodanim sončničnim oljem, bogatim z oleinsko kislino. Rezultat pa je bil ravno obraten. Pri sončničnem olju, bogatem z oleinsko kislino, smo dokazali največjo stopnjo poškodb DNK, in sicer 2,27, kar absolutno gledano ni velika poškodba glede na najvišjo vrednost 5. Tak rezultat bi bil lahko povezan z drugimi, nemerjenimi ali neznanimi vplivi v poskusu. Prehranske maščobe vsebujejo tudi lastne in dodane antioksidante, ki z zaužitjem tudi organizem ščitijo pred oksidacijskim stresom. Podatkov o vsebnosti antioksidantov pri posameznih uporabljenih maščobah nismo imeli. Drugi nemerjeni dejavnik vpliva med prehranskim poskusom je bila telesna dejavnost živali, ki je bila opazno največja v skupini miši, ki je dobivala sončnično olje bogato z oleinsko kislino. Zaradi nestrpnosti med živalmi prav te skupine se je opazno povečala telesna dejavnost, s tem pa verjetno tudi oksidativna obremenitev živali. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno poskusne živali vzdrževati v ločenih kletkah ali uporabiti le samičke, ki so med seboj strpnije.

Sam kometni preskus je časovno zelo zahteven. Šele ob zelo dobri usposobljenosti vsaj dveh oseb in računalniško podprti avtomatski analizi mikroskopske slike bi bilo možno primerjalno analizirati večje število vzorcev, kar bi izboljšalo zanesljivost rezultatov.

Uvedba kometnega preskusa v modelni prehranski poskus pomeni novo analitsko kakovost v slovenskih prehranskih raziskavah. Kometni preskus ima biooznačevalni značaj, kar pomeni, da odraža resnične biološke učinke neke prehranske sestavine na celični ravni. Rezultat kometnega preskusa pri preučevanju oksidacijskega stresa kot posledice prehrane vedno pokaže razliko med stopnjo prehranske obremenitve s prooksidativnimi sestavinami hrane ter stopnjo antioksidativne zaščite in delovanjem popravljalnih mehanizmov, s katerimi razpolagajo celice (Gedik in sod., 1992). Zaradi tega lahko spremljamo učinke prooksidativnih snovi v hrani, ki se odražajo na genotoksični ravni, kadar je prooksidacijsko/antioksidacijsko razmerje porušeno v dobro prooksidantov, po drugi strani pa učinke antioksidantov v hrani na stopnjo oksidacijskega stresa oz. genotoksičnosti (Green in sod., 1994).

ZAKLJUČKI

Rezultati so pokazali, da krmne maščobe z različnimi stopnjami nenasičenosti povzročijo različne stopnje poškodb mišje jedrne DNK. S tem smo dokazali, da je s kometnim preskusom mogoče razlikovati kakovost prehranskih maščob z vidika nastajanja prostih radikalov. Samo izvedbo preskusa je mogoče in bo potrebno še izboljšati in predvsem preiti na hitrejšo, manj naporno in bolj zanesljivo ocenjevanje poškodb DNK z računalniško podprto analizo mikroskopske slike. Za večjo občutljivost in zanesljivost kometnega preskusa v prehranskih poskusih bo potrebno izključiti dejavnike, ki lahko prispevajo k dodatni, nekontrolirani oksidativni obremenitvi poskusnih živali (telesna dejavnost, stresna stanja, hormonsko in zdravstveno stanje).

VIRI

- Duthie, S.J./ Dobson, V.L. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur. J. Nutr.*, 38(1999), 28-34.
- Esterbauer, H. Estimation of peroxidative damage. *Path. Biol.*, 44(1996), 25-28.
- Fučič, A. Metoda komete: novi pristup genotoksikološkim izraživanjima. *Arh. hig. rada toksikol.*, 48(1997), 413-419.
- Gedik, C.M./ Ewen, S.W.B. Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(1992), 313-320.
- Green, M.H.L./ Lowe, J.E./ Waugh, A.W.W./ Aldridge, K.E./ Cole, J./Arlett, C.F. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat. Research*, 316(1994), 91-102.
- Halliwell, B./ Aruoma, O.I. Free radicals and antioxidants: The need for in vivo markers of oxidative stress. V: Antioxidant methodology – In vivo and in vitro concepts (Ur.: Aruoma, O.I./ Cuppett, S.L.) Champaign, Illinois, USA, AOCS Press, 1977, 1-23.
- Johnstone, A./ Thorpe, R. Immunochimistry in practice. 2nd ed. Oxford. Blackwell Scientific Publications, 1990, 306 s.
- Miyame, Y./ Yamamoto, M./ Sasaki, Y.F./ Kobayashi, H./ Igarashi-Soga, M./ Shimoi, K./ Hayashi, M. Evaluation of tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat. Res.*, 418(1998), 131-140.
- RDA. Recommended Dietary Allowances. 10th ed. Washington, National Academy Press, 1989, 44-49 in 99-104.
- Pool-Zobel, B.L./ Bub, A./ Rechkemmer, G. Application of the comet assay to study oxidative DNA damage in human cells. V: Antioxidant methodology - *In vivo* and *in vitro* concepts (Ur.: Auroma, O.I./ Cuppett, S.L.). Champaign, Illinois, USA, AOCS Press, 1997, 39-51.
- SAS/STAT User's Guide. Version 6. 4th Edit. Cary, SAS, Institute INC., 1990, 1600 s.
- Singh, N. P. / McCoy, M.T./ Tice, R.R./ Schneider, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1988), 184-191.
- Šuput D./ Kamarič L. Prosti radikali. V: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. Ljubljana. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 1998, 23-43.
- Tice, R./ Vazquez, M. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. [Http://www.kineticimaging.com/kidocs/kompetpro.doc.](http://www.kineticimaging.com/kidocs/kompetpro.doc.), 1998.
- Turley, E./ Armstrong, N. C./ Wallace, J.M.W./ Gilmore, W.S./ McKelvey-Martin, V.J./ Allen, J.M./ Strain, J.J. Effect of cholesterol feeding on DNA damage in male and female Syrian hamsters. *Ann. Nutr. Metab.*, 43(1999), 47-51.
- WHO/FAO, Fats and oils in human nutrition. Non-glyceride constituents of fats. Rome, 1994, 99-102.
- Wilson, A.P. Cytotoxicity and viability assay. V: Animal cell culture (Ur.: Freshney, R. I.), Washington, IRL Press, 1986, 183-215.