

Fekalvann og DNA-skade i CaCo-2 celler

DNA-skade i CaCo-2 celler induisert av fekalvann fra vegetardietter og dietter med høyt innhold av rødt- og bearbeidet kjøtt analysert ved kometmetoden.

Tina Helen Hamelten



Veileder: Professor Andrew Collins

Det medisinske fakultet. Avdeling for ernæringsvitenskap

UNIVERSITETET I OSLO

November 2007

Forord

Takk til Professor Andrew Collins og de andre på forskningsgruppen. Dette må være en av universitetets hyggeligste forskningsgrupper.
Behjelpelige, tålmodige og alltid i godt humør.

Takk til andre også som har hjulpet eller prøvd å hjelpe. Og mannen min som synes han fortjener en bachelor etter all tiden han har vært på universitetet i forbindelse med oppgaven.

Oslo, november 2007

Tina Helen Hameltn

Sammendrag

Kolorektalkreft er samlet for begge kjønn den hyppigste kreftformen i Norge. I EU var det den hyppigst diagnostiserte kreftformen i år 2000.

Migrasjonsstudier viser at denne kreftformen er sterkt påvirket av miljø (ernæring regnes som en miljøfaktor) og at det er en kreftform hvor insidensraten endres i løpet av første generasjon.

Det er sterke internasjonale korrelasjoner mellom kolorektalkreft og per capita inntak av kjøtt, fett og fiber.

Stoffer i kjøtt er vist å være kreftfremkallende.

Bruk av fekalvann (den vandige delen av feces) har i ulike studier vist at endring i matinntak gir endring i fekalvanns genotoksisitet ved endret evne til å indusere DNA-skader i dyrkede humane kolonkreft-celler.

Denne oppgaven tar for seg fekalvann fra flere studier hvor forsøkspersoner har spist ulike mengder rødt kjøtt, bearbeidet-kjøtt eller ren vegetardiett. Humane adenokarsinom celler, CaCo-2, ble inkubert med fekalvann fra de ulike diettperiodene. Kometmetoden som gir informasjon om DNA-skader i enkeltceller ble benyttet. Nivå av DNA-trådbrudd, oksiderte puriner og –pyrimidiner samt alkylerte baser ble analysert, hvorav de tre siste ved bruk av reparasjonsenzymmer.

Det var altfor få analyserte prøver i hver studie. Derfor var det vanskelig å finne signifikante sammenhenger. Inkubering med fekalvann gir signifikant mer DNA-skade som DNA-trådbrudd sammenlignet med inkubering med PBS. Det var ingen forskjell mellom vegetardiettene og de andre diettene.

Bearbeidet-kjøtt ser ut til å indusere mer oksiderte pyrimidiner i CaCo-2 celler enn en vegetardiett, men forskjellen er ikke signifikant.

Med i de nye anbefalingene i en ny rapport fra World Cancer Research Fund (WCRF) er å avstå fra bearbeidet kjøtt. Senere studier kunne med fordel se på genotoksisiteten av fekalvann fra studier med mange forsøkspersoner med høyt inntak av bearbeidet kjøtt. Interessant ville det også være å studere ulike produkter av bearbeidet kjøtt hver for seg, som f.eks. bacon, pølse og hamburger og se hvordan høyt inntak av disse påvirker fekalvanns evne til å indusere DNA-skader i humane kolonkreft-celler.

Innhold

Forord.....	3
Sammendrag.....	5
Innhold.....	6
1. Introduksjon.....	8
1.1 Hyppighet av tykk- og endetarmskreft	8
1.2 Genetikk eller miljø?	10
1.3 Kjøttrelaterte stoffer forbundet med kreft	12
1.4 Studier	13
1.5 DNA-skader og kometmetoden	15
1.5.1 Bestemmelse av DNA skader via kometmetoden	15
1.5.2 Bruk av CaCo-2.....	15
1.5.3 Bruk av fekalvann	16
1.5.4 Studier av fekalvann.....	16
2. Mål og hypotese.....	17
3. Utvalg og metode.....	18
3.1 Utvalg	18
3.2 Metode	19
3.2.1 Kometmetoden	19
3.2.2 Reagenser/utstyr	20
3.2.3 Cellekultur.....	22
3.2.4 Detaljert beskrivelse av metoden	22
3.2.5 Analyser.....	24
3.2.6 Statistisk analyse	25
4. Resultater	26
4.1 Undersøkelser før start	26
4.1.1 Optimal enzymkonsentrasjon av Alk A	26
4.1.2 Optimal virketid for enzymene FPG og Endo III.....	28
4.2 Resultater fra eksperimentene	30
4.2.1 PBS-behandlede celler	30
4.2.2 Trådbrudd induisert av fekalvann i de ulike studiene	32

4.2.3	DNA-trådbrudd i PBS-behandlede celler sammenlignet med DNA-trådbrudd for alle fekalvannbehandlede celler	34
4.2.4	Netto enzymsensitive seter for kontrollceller behandlet med PBS- og fekalvannbehandlede celler i de ulike studiene	36
4.2.5	Sammenligning av netto enzymverdi i de tre vegetardiettene	38
5.	Diskusjon	39
5.1	Metode	39
5.2	Resultater; DNA-trådbrudd (bufferverdier), PBS-behandlede celler og Alk A	41
5.3	Rødt kjøtt	45
5.4	Hem	47
5.5	Bearbeidet kjøtt	49
5.6	Fiber/Stivelse	52
5.7	Flavonoider	53
6.	Konklusjon	54
7.	Referanser	55

1. Introduksjon

1.1 Hyppighet av tykk- og endetarmskreft

Kreft i tykk- og endetarm er samlet for begge kjønn i Norge den hyppigste kreftformen^{1, 2}. I 2005 var det 3448 nye tilfeller av disse to krefttypene². Hyppigheten har økt siden registreringen begynte på 50-tallet. I femårsperioden 55-59 var det 3798 tilfeller, mens det i perioden 00-04 var hele 16 734 tilfeller. Dette er mer enn en firedobling. Pr. 31.12.05 var det 23 575 personer som levde med disse krefttypene². Mens kolonkreft er like hyppig hos kvinner og menn er rektalkreft 50 % hyppigere hos menn. Økningen i antall tilfeller av tykk- og endetarmskreft har vært høyere i Norge enn i andre nordiske land. Basert på aldersjusterte insidensrater ligger norske kvinner på topp i Europa når det gjelder forekomst av kolorektalkreft³.

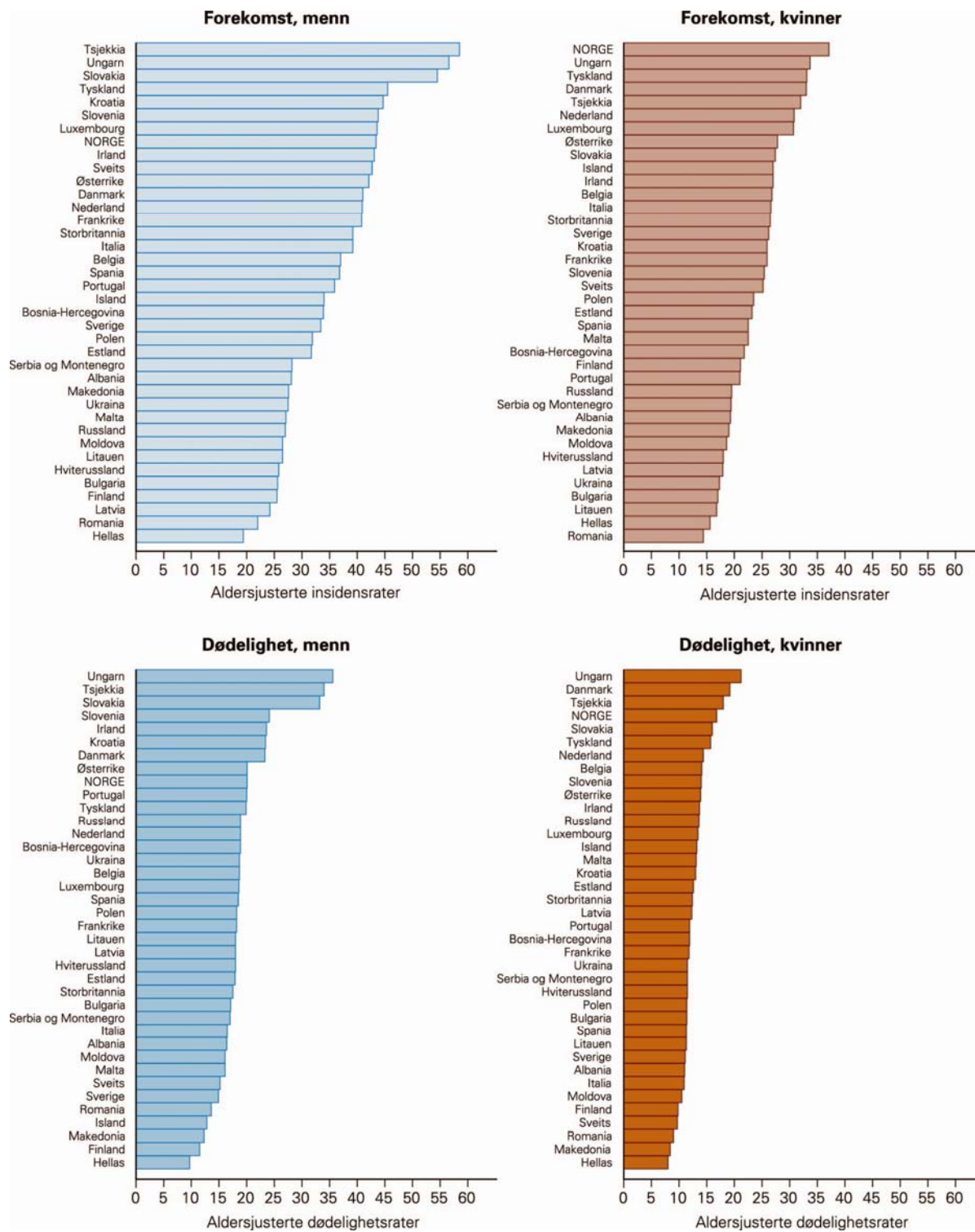
I EU var tykk- og endetarmskreft den kreftformen som hyppigst ble diagnostisert i 2000. Det samlede antallet som ble registrert var 258 000 nye tilfeller⁴.

Hvis vi går videre utover Europa er tykk- og endetarmskreft den 3. vanligst forekommende krefttypen⁵. De høyeste insidensratene finner vi i Nord-Amerika, Australia/New Zealand, Vest- og Øst-Europa og Japan⁵. Insidensen varierer nesten 25-fold mellom høy-insidens land og lav-insidens land⁶.

(Tykk- og endetarmskreft omtales videre som kolorektalkreft)

Den nye rapporten til World Cancer Research Fund (WRCF) forteller at det ikke er noen klar trend for kolorektalkreft mht. globale aldersjusterte rater, men at det i tidligere relativt lavinntektsland som nylig har blitt høy-intektsland har hatt en rask økning i insidensen. Dette inkluderer land som Japan, singapore og østeuropeiske land⁶. Siden midten av 70-tallet er insidensratene doblet i flere av disse landene⁶.

Figur 1 viser forekomst av kolorektalkreft hos menn og kvinner i utvalgte europeiske land.



Figur 1 Estimerte aldersstandardiserte rater av tykktarms- og endetarmskreft etter kjønn for utvalgte europeiske land i 2002. Data fra GLOBOCAN (1)

(Gjengitt med tillatelse. Publisert i Tidsskrift for Den norske lægeforening nr. 20, 2007 s.2682-7. Figur hentet fra s. 2683)

1.2 Genetikk eller miljø?

Mellom 5 og 10 % av kolorektalkreft tilfellene er arvelig betinget. De viktigste arvelige sykdommene er familiær adenomatøs polypose og HNPCC. Videre forekommer 20 % av tilfellene hos personer som har en familiehistorie med denne type kreft ⁶.

I Europeisk kodeks mot kreft sies det at i overkant av 80 % av krefttilfellene i den vestlige befolkningen kan ledes tilbake til miljøårsaker. Miljø er da definert slik at det også inkluderer bl.a. kostholdsvaner og livsstil ⁴.

Ernæring er en av mange miljøfaktorer. Det amerikanske vitenskapsakademiet konkluderte i 1983 at etter røyking var kosthold den viktigste enkeltårsak til kreft ⁴ og det er sterke internasjonale korrelasjoner mellom risiko for tykktarmskreft og per capita inntak av kjøtt, fett og fiber ⁵. Det er også sterke negative assosiasjoner mellom inntak av stivelse og risiko for kolorektalkreft ⁷. Kjøtt og fett er positivt korrelert, mens fiber og stivelse er negativt korrelert med risiko for tykktarmskreft.

Av migrasjonsstudier kan man se at det er en kreftform som er sterkt påvirket av miljø, da insidensen av denne kreftformen øker kraftig i 1. generasjon når personer flytter fra et område med lav risiko til et område med høy risiko ⁵.

Selv innenfor et lands grenser er det forskjell mellom landsdeler. I Norge er det lav forekomst i Finnmark og Troms mens det er høy forekomst i Oslo og på Sør-Vestlandet ⁸. I India som er et land med svært lav forekomst, i underkant av 3 tilfeller pr. 100,000 ⁹, er det forskjeller mellom by og land. Byområdene har dobbel insidensrate sammenlignet med landlige områder ¹⁰. Migrasjonsstudier kan gi mye informasjon. Indere i USA har mye høyere insidensrate enn indere i India. For menn er tallet 26.6 og for kvinner 6.8 per 100,000 ⁹. Iranske kvinner som flytter til Canada nesten dobler sin risiko ⁶, mens det på 80-tallet ble vist at japanske kvinner som flyttet til Hawaii fikk nesten firedoblet risiko. Denne økningen skjedde hos 1.generasjons migranter. Japanere, kinesere og filippinere som migrerer til USA har høyere risiko enn de som ikke reiser fra hjemlandet. Data viser at andre generasjons migranter har nesten samme insidensrate som vertsbefolkningen ⁶.

Japan som har hatt en kraftig økning i insidensen av kolorektalkreft ¹¹ har fra 1961-2002 seksdoblet kjøttinntaket ⁶. Siden 1950 er inntaket av kjøtt i Norge nesten doblet ¹². Norge ligger langt fra Europatoppen i kjøttinntak, faktisk under gjennomsnittet ¹³. Hellas som

ligger svært langt nede på listen over utvalgte europeiske lands forekomst av kolorektalkreft³ har høyere kjøttinntak enn Norge. Fra 1961 til 2002 nesten firedoblet de sitt inntak¹³. Interessant i denne sammenheng er at inntak av bearbeidet kjøtt i form av pølser er undersøkt i utvalgte europeiske land¹⁴. De landene med høyest pølseinntak har høyest forekomst av kolorektalkreft for kvinner. Tyskerne spiser mest pølser etterfulgt av Norge (kvinner), Sverige, Danmark og Nederland. Fire av disse landene ligger, for kvinner, blant de seks landene med høyest forekomst av kolorektalkreft (av 38 land totalt). Samme mønster ses ikke hos menn. Sverige ligger langt nede på forekomst for kvinner (15. plass) og menn (22. plass) selv med et stort pølseinntak^{3, 14}. Se figur 1 for forekomst av kolorektalkreft i utvalgte europeiske land.

1.3 Kjøttrelaterte stoffer forbundet med kreft

Kjemiske stoffer forbundet med kjøtt kan øke kreftrisiko. Fire av disse omtales under.

Heterosykliske aromatiske aminer (HAA= Heterocyclic aromatic amines)

Disse stoffene dannes når muskelvev utsettes for høye temperaturer under tilberedning og aminosyrer reagerer med kreatin. 17 ulike heterosykliske aminer dannet under tilberedning kan utgjøre en kreftrisiko.

Grilling og steking produserer store mengder pga. høy temperatur.

Disse stoffene dannes i alle typer muskelkjøtt, også fisk og kjøtt av fugl ⁶.

Polysykliske aromatiske hydrokarboner (PAH= Polycyclic aromatic hydrocarbons)

Ved ufullstendig forbrenning av kjøtt- materiale dannes disse stoffene. Kjøtt, fisk eller andre matvarer som tilberedes med intens varme over direkte flammer hvor fett drypper ned i flammene vil gi polysykliske aromatiske hydrokarboner i overflaten på matvarene ⁶.

N-nitrosoforbindelser (NOC= N-nitroso compounds)

Flere av disse forbindelsene er karsinogene for mennesker og dyr. Nitritt benyttes til å konservere bearbeidet kjøtt og finnes naturlig i planter. NOC kan dannes i kjøtt under konserveringsprosessen eller i kroppen fra nitritt og nitrat i maten ⁶.

Hem

Hemjern induserer cytotoxiskitet samt hyperproliferasjon i tykktarmen ⁶.

Nivået av NOC i kroppen økes ved inntak av rødt kjøtt, delvis pga. innholdet av hem ⁶.

Hvordan hemoglobin øker NOC i kroppen er uvisst, men forskes på ¹⁵.

En analyse av 365 gener uttrykt i tykktarmen viste at mucosal pentraxin ble nedregulert av hem. Gjenkjenning og fjerning av døende celler er en prosess hvor pentraxin er involvert, s.a. hem kan hindre apoptose av tykktarmsceller ¹⁶.

1.4 Studier

Oversiktsstudier

Selv om det er en sammenheng mellom ulike lands per capita inntak av rødt kjøtt og forekomst av kolorektalkreft viser studier varierende resultater^{17, 18}. Det har vært vanskelig å konkludere med en sammenheng. Nå er det kommet resultater fra en stor europeisk prospektiv kohortestudie med ca. en halv million europeiske menn og kvinner. Resultater viser at fiber, nøtter og frø er negativt assosiert med tykktarmskreft, mens rødt kjøtt og bearbeidet kjøtt øker risikoen¹⁹. Inntak av rødt- og bearbeidet kjøtt økte risikoen for kolorektal kreft med henholdsvis 49 % og 70 % pr. 100g økning i inntak pr. dag²⁰. Andre studier har også vist risikoreduksjon av fiberinntak^{21, 22}. McCullough foretok en prospektiv studie av helkorn, frukt og grønnsaker. De fant at høyere inntak av fiber ikke var relatert til en nedgang i risiko, men at veldig lavt inntak av plantemat kan øke risiko²³. I en pressemelding gitt ut av 'International agency for research on cancer' var det i den europeiske studien vist en 35 % økt risiko for å utvikle kolorektalkreft for de med det høyeste inntaket av rødt- og bearbeidet kjøtt sammenlignet med de som spiste minst²⁴.

Dyrestudier

Man har sett i studier på rotter at hem fra biffkjøtt og blodpudding øker proliferasjonen av tykktarmsepitel, øker den cytolytiske aktiviteten til fekal vann^{25, 26} og fremmer carcinogenesen hos forsøksdyr²⁷. Hem øker utskillelsen i urin av sluttprodukter fra lipidperoksidasjon hos både rotter og mennesker²⁸.

Hos forsøkspersoner fant man at rødt kjøtt økte dannelsen av DNA-adduktet O⁶-carboxymethyl guanine i tykktarmsceller og at økningen korrelerte med totalmengden N-nitrosoforbindelser i feces²⁹.

Humane studier

Bingham et al. fant at ved høyere inntak av rødt kjøtt vil totalmengde N-nitrosoforbindelser i avføringen øke³⁰. Man vet at flere klasser av disse N-nitrosoforbindelsene forårsaker DNA-skade³¹. Størrelsen på den endogene syntesen øker med økende daglig inntak av jern fra kjøtt³². Cross et al. fant at det ikke er protein fra kjøtt eller jern i seg selv som øker den endogene N-nitroseringen, men hemjern³³. Den samme gruppen har gjennomført en kontrollert randomisert kryssoverstudie der de viste at nivået av N-nitrosoforbindelser økte

signifikant på en diett med 420 g rødt kjøtt pr. dag i forhold til 60 g pr. dag. De fant ingen forskjell på en diett med 60 g kjøtt og en vegetarisk diett med like mye protein som dietten med 420 g rødt kjøtt. Tilskudd av 8 mg hemjern økte mengden N-nitrosoforbindelser mens 35 mg Fe²⁺ ikke hadde noen effekt ³⁴. De undersøkte fekalvann fra de samme personene med kometmetoden men fant ingen sammenheng mellom mengde N-nitrosoforbindelser i feces homogenater og fekalvannets genotoksisitet.

Også bearbeidet kjøtt er sett å øke risiko for kolonkreft ^{35, 36}.

Den nye rapporten til World Cancer Research Fund (WCRF) konkluderer med at inntak av bearbeidet kjøtt er en overbevisende årsak til kolorektalkreft ⁶.

1.5 DNA-skader og kometmetoden

DNA består av to lange kjeder av sukkerfosfat som danner en dobbelhelix.

Sukkerfosfatkjedene har sidegrupper kalt baser, hvorav to av disse er puriner og to er pyrimidiner. Hydrogenbindinger holder dobbelhelixen sammen ³⁷.

Trådbrudd, alkylerte- og deaminerte baser, tap av baser og intra- og interstreng kryssbindinger, DNA-addukter er noen typer DNA-skader ³⁷ i tillegg til oksiderte baser ³⁸.

1.5.1 Bestemmelse av DNA skader via kometmetoden

Kometmetoden består av gelelektroforesing av enkeltceller og bestemmer antall trådbrudd i DNA-helixen. Celler inkorporert i agarose lyses slik at membraner og proteiner forsvinner. Lysingen skjer ved hjelp av en høykonsentrert saltløsning med detergent. Tilbake er et nukleoid. Det viklete DNA i nukleoidet vil dersom det er brudd på helixen bevege seg mot plus-polen (anoden) under elektroforese. Avhengig av mengde brudd beveger DNA seg kortere eller lengre og man får det man kaller kometer ved å farge DNA og analysere i fluorescens mikroskop ^{38,39}.

Standard kometmetode viser mengde trådbrudd i DNA i celler ⁴⁰. For å få mer informasjon enn trådbrudd fra kometmetoden kan man benytte reparasjonsenzymmer som gjenkjenner bestemte oksiderte baser i DNA og induserer brudd ved disse basene. Endonuclease III (Endo III) gjenkjenner og induserer brudd ved oksiderte pyrimidiner mens formamidopyrimidine glycosylase (FPG) ⁴¹ gjenkjenner oksiderte puriner hvorav 8-OH-guanine utgjør størsteparten. Enzymet 3-methyladenine DNA glycosylase II (Alk A) gir informasjon om alkylerte skader i DNA ⁴².

1.5.2 Bruk av CaCo-2

CaCo-2 er en human kreftcelle-linje fra adenokarsinom i kolon ⁴³. Denne celletypen innehar flere funksjoner som ligner de i normalt kolonepitel: Funksjonelle mikrovilli og "tight junctions" ⁴⁴ samt at de har enzymaktivitet som metaboliserer xenobiotika ⁴³.

De vokser ikke kun i monolag, men både i bredde og høyde og lager lett klumper, noe som kan tyde på differensiering ⁴⁵.

Cellene ble overlevert fra en tidligere student og dyrket i Dulbecco's modifiserte Eagle's medium. Underveis ble cellene for gamle og byttet ut med CaCo-2 celler mottatt fra et annet laboratorium.

CaCo-2 er brukt i genotoksisitetstester av mycotoxiner⁴⁶. Andre grupper har også brukt CaCo-2 til genotoksisitetstudier sammen med kometmetoden^{47, 48, 49}.

Venturi et al. studerte fekalvanns effekt på CaCo-2 celler og fant at det er store forskjeller mellom individer⁵⁰. Det samme fant Ozwald et al. Det som er interessant er at disse forskjellene ikke ble mindre selv om forsøkspersonene spiste like dietter⁵¹.

1.5.3 Bruk av fekalvann

Fekalvann er den vandige delen av feces og tykktarmscellenes vekstkarakteristikk påvirkes sterkere av stoffer i denne delen av feces enn stoffer i tørrstoffsubstansen⁵². Fekalvann er tidligere brukt sammen med kometmetoden. Ulike dietter er vist å ulikt påvirke fekalvanns genotoksisitet i HT29 celler^{34, 53, 54, 55, 51}. Fra disse studiene er det klart at fekalvanns evne til å indusere skader på DNA varierer med kosten. Fekalvann er sannsynligvis den delen av tykktarmsinnholdet som er i nærmest kontakt med epitelcellene i tarmen⁵⁶.

Fekalvannsgenotoksisitet fra ulike dietter på CaCo-2 er undersøkt av både Hughes et al.⁵⁷ og Yeh et al.⁵⁸ Sistnevnte benyttet fekalvann fra mus og viste en signifikant lavere genotoksisitet av fekalvann fra dietter tilsatt ulike fibertyper.

1.5.4 Studier av fekalvann

Rieger et al. fant at en diett med mye fett og kjøtt men lite fiber økte genotoksisiteten til fekalvann fra forsøkspersoner sammenlignet med en diett rik på grønnsaker og helkornsprodukter. Genotoksisiteten ble målt ved enkeltcelle gelelektose (kometmetoden) etter inkubering med dyrkede humane kreftceller⁵⁴.

Flere studier viser at fekalvannsgenotoksisitet endres ved diettendringer og kan vises ved kometmetoden^{53, 55, 58, 54}. Det er til nå ikke gjennomført studier av fekalvann med kometmetoden hvor det er benyttet reparasjonsenzym og sammenlignet dietter med mye kjøtt/bearbeidet kjøtt og vegetardiett.

2. Mål og hypotese

Fekalvannsgenotoksisitet hos personer som har spist enten vegetarmat eller ulike typer/mengde kjøtt (bearbeidet, høyt nivå rødt kjøtt, lavt nivå rødt kjøtt) i en kontrollert studie er ikke før utført ved hjelp av reparasjonsenzymmer og kometmetoden. Denne oppgaven vil derfor undersøke fekalvann fra personer som i ulike tidsperioder har spist vegetarmat og kjøttmat og sammenligne fekalvannets genotoksiske effekt på humane CaCo-2 celler.

Hypotese

På bakgrunn av de mange studiene som er utført på rødt kjøtt er hypotesen at dietter med mye kjøtt sammenlignet med vegetardiett vil gi høyere grad av genotoksisitet i fekalvannet og dermed større mengde skader på DNA. Da det underveis skjedde en feil fra leverandøren av fekalvann ble det nødvendig å legge til flere hypoteser. I tillegg hypotiseres det at bearbeidet kjøtt vil gi større mengder skade på DNA da det i studier er sett sammenheng mellom inntak og risiko for kolorektalkreft; og at fiber reduserer genotoksisiteten til fekalvann.

3. Utvalg og metode

3.1 Utvalg

Fekalvann fra fire ulike studier ble analysert.

I utgangspunktet var det meningen at fekalvann fra 12 personer i studie 1 og 6 personer fra studie 2 skulle undersøkes. Da prøvegiverne ”sløste” bort prøvene uten å si fra sendte de flere prøver fra to andre studier de har gjennomført. Derfor ble det ferdige utvalget fra fire ulike studier.

Studie 1: Vegetar-studien; Tre diettperioder hvorav den ene bestod av 420 g rødt kjøtt/d, 60 g rødt kjøtt/d eller vegetar. Beskrivelse av studien i referanse ³⁴.

Studie 2: Jerntilskudd-studien; Fire diettperioder: 60 g rødt kjøtt/d, 120 g rødt kjøtt/d, 60 g rødt kjøtt supplementert med 7,8 mg hemjern, 60 g rødt kjøtt supplementert med 35 mg Fe²⁺. Beskrivelse av studien i referanse ³⁴.

Studie 3: Addukt-studien; 420 g rødt kjøtt/d + 30 g fiber/d, vegetar med 30 g fiber, 420 g rødt kjøtt/d + 13g fiber/d. For full beskrivelse se ²⁹.

Studie 4: Bearbeidet kjøtt-studien; 420 g kjøtt/d (menn)/366 g kjøtt/d (kvinner), vegetar. Studien er ikke ferdig og har ingen referanse.

En person fra studie to viste unormalt høyt skadenivå uansett diett og enzym. Personen ble derfor ekskludert fra analysene. Studie 2 har dermed for få personer til å gjøre statistiske analyser.

Fra studie tre har jeg analyserte verdier for tre personer som er sin egen kontroll for to av diettene, vegetardietten og 420g rødt kjøtt/ d + 30 g fiber/d.

3.2 Metode

3.2.1 Kometmetoden

Kometmetoden eller enkeltcelle gelelektroforese måler DNA-skader i ulike celletyper. En celleduspensjon i agarose med lavt smeltepunkt plasseres på mikroskopglass dekket med agarose med høyt smeltepunkt som er latt tørke. Cellene lyses med saltløsning og detergent slik at de fleste proteiner og membraner forsvinner. Mikroskopglasset plasseres deretter i en løsning som vikler opp DNA. Avhengig av mengde DNA-brudd vil DNA bevege seg kortere eller lengre bort fra kjernen mot pluss-polen under elektroforese³⁹. Kometmetoden kan brukes på flere typer celler og teste ulike stoffers gentoksiske effekt³⁸. Man kan få informasjon om ulike typer DNA-skader ved å bruke reparasjonsenzymmer som gjenkjenner bestemte skader som f.eks. oksiderte pyrimidiner og –puriner³⁸.

3.2.2 Reagenser/utstyr

Kjemikalier

PBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	Sigma - Aldrich
Medium (Dulbecco`s modified Eagle`s medium)	Sigma - Aldrich
Trypsin – EDTA solution,	Sigma - Aldrich
Antibiotika (L-glutamine – penicilline- streptomycin)	Sigma - Aldrich
Glycerol, 99 %	Sigma - Aldrich
Triton-X100	Sigma - Aldrich
HEPES	Sigma - Aldrich
BSA (bovint serum albumin)	Sigma-Aldrich
Føtalt kalveserum	Sigma - Aldrich
H ₂ O ₂	Sigma - Aldrich
LMP – agarose	Invitrogen Ltd.
NMP – agarose	Seakem [®] LE Agarose
NaCl	Merck
KCl	Merck
EDTA	Merck
KOH	Merck
HCl	Merck
NaOH	Merck
Trisbase	Merck
DAPI	Sigma – Aldrich

Utstyr

Celle kultur flasker	Corning B.V.
Mikroskopglass	Menzel
Dekkglass	Assistent
Bürcker tellekammer	Bürcker
Stripetter	Corning B.V.
Eppendorfrør 1.5 ml	Sarstedt
Inkuberingsboks	IKEA

Sentrifugerør 15 ml	Corning
Glassbeholder for mikroskopglass	VVR Merck
Pipettespisser	Finntip

Instrumenter

Sentrifuge (BR4i)	Jouan
Sentrifuge (Biofuge fresco)	Heraus
Vortex (MS1 minishaker)	IKA
Pipette (Fastpette)	Labnett
Vannbad	Grant
Vekt (PB602-S)	Mettler-Toledo
pH-meter (Meter5Lab PHM240)	Radiometer
pH-meter (PHM92)	Radiometer
Mikroskop (Nikon Eclipse TS 100)	Nikon
Inkubator (Termaks)	Termaks
Celleinkubator	Forma
Elektroforese strømforsyning (E 835)	Pharmacia biotech
Elektroforese strømforsyning (EPS 600)	Consort

Software

Image analysis (Komet 5.5)	Medical solutions plc
Comet assistant software	Dusinsky R.
SPSS 14.0	SPSS Inc.
Reference manager	National Library of Medicine

Sammensetning av;

Lysisvæske	2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Trisbase, 1 % Triton-X, pH 10
Enzymreaksjonsbuffer	40mM HEPES, 0,1M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA, pH 8
Elektroforesebuffer	1mM EDTA, 0,3 M NaOH
Nøytraliseringsbuffer	0,4 M Trisbase, pH 7,5

3.2.3 Cellekultur

CaCo-2 cellene ble dyrket i Corning-flasker i Dulbecco's modifiserte Eagle's medium tilsatt 10 % føtalt kalveserum og 1 % antibiotika (10.000 U/ml penicillin og 10.000 µg/ml streptomycin). Temperatur 37.5°C, fuktet atmosfære med 5 % CO₂.

3.2.4 Detaljert beskrivelse av metoden

En human kreftcellelinje, CaCo-2, ble dyrket i DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tilsatt 10 % føtalt kalveserum og 1 % antibiotika i 37,5 °C med 5 % CO₂.

Høsting av cellene skjedde mens de fortsatt var subkonfluente. De ble først skylt med PBS før de behandles med 1 % Trypsin-EDTA i 37°C til cellene er løsnet fra flasken. DMEM ble tilsatt for å stanse virkningen av trypsinet og deretter overført til et 15 ml sentrifugerør, sentrifugert ved 4°C, 3 min ved 1100 rpm. Supernatanten ble kastet og cellene resuspendert i nytt medium. Bürcker tellekammer med 20x20 mm dekkglass ble anvendt for å bestemme cellekonsentrasjonen mens røret står på is. Eppendorfrør merket med aktuelle prøvenavn ble tilsatt 900 µl cellesuspensjon med en cellemengde på $16 \cdot 10^4$, eller $4 \cdot 10^4$ celler i 450 µl medium. 100 µl fekalvann fra de ulike diettperiodene eller 100 µl PBS tilsattes sine respektive rør som holdes på is. For å blande ristet jeg rørene på en minishaker før de ble satt i 37,0°C i 30 minutter. Fra varmeskapet ble rørene satt på is, ristet på en minishaker og innholdet nå fordelt på to eppendorfrør etterfulgt av sentrifugering ved 1000 rpm, 5 min., 4°C. Mens rørene sto på is ble supernatanten fjernet for deretter å resuspendere cellepelletten i henholdsvis 280 µl eller 140 µl 1 % LMP-agarose løst i PBS. Mikroskopglass merket med aktuell prøve og enzymbehandling tilsettes to dråper agarose med celler som dekkes med 20x20 mm dekkglass før de settes i kjøleskap for at gelene skal stivne. Mikroskopglassene tas ut fra kjøleskapet, dekkglassene fjernes og settes i lysisløsning. Mikroskopglass med celler fra ulike diettperioder holdes atskilt fra hverandre hvilket også gjelder kontrollcellene som ikke skal behandles med enzymer. Dette gjelder celler som kun skal ligge i lysisvæske samt cellene som først behandles med H₂O₂ i 5 min, 4°C før de skylles med PBS for så å ligge i lysisvæske frem til elektroforese (noen ganger natten over). De andre glassene ligger kun 1t, 4°C i lysisløsningen. Etter lysis ble glassene skylt 3x5 min. i enzymreaksjonsbufferen. Glassene rant deretter av seg og tørket en stund før enzymene FPG, Endo III, Alk A samt reaksjonsbufferen påførtes i en mengde av 50 µl per gel. Dekkglass str.

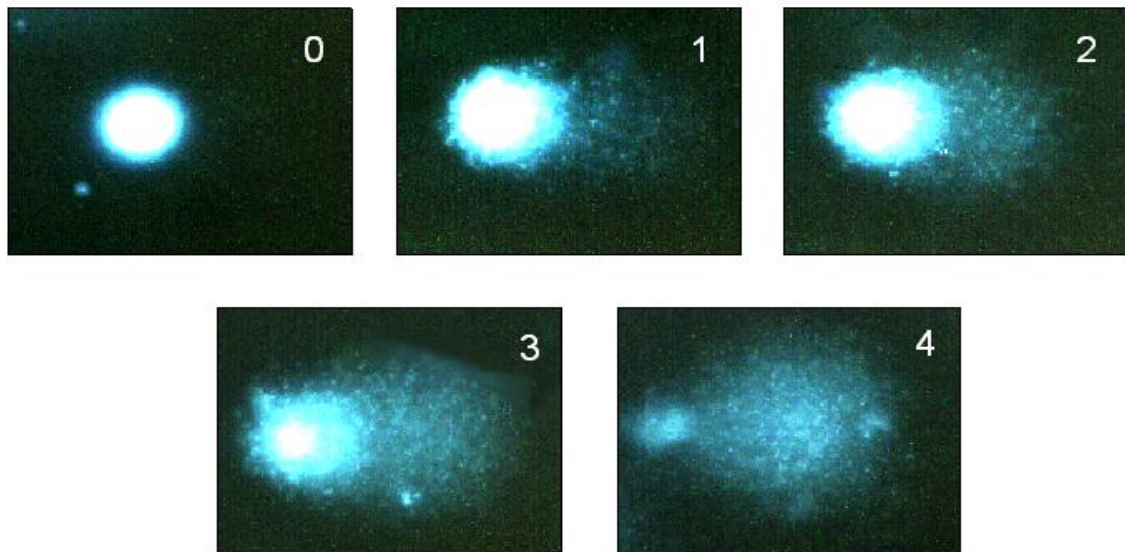
22x22 mm dekker gelene før de legges i fuktige beholdere med forvarmet vann i varmeskap 37,0°C, 45 min. Herfra ble glassene plassert i 4°C kald elektroforesebuffer uten dekkglass i 40 min. for at DNA skulle kveile seg opp. Strømkilden settes på og elektroforesebufferen justeres slik at jeg får en strøm på ca. 300 mA, spenning 25 V i 30 min. Vask med nøytraliseringsbuffer og deretter vann i 4°C, hver seg ca. 10 min. var siste ledd i prosessen. Glassene lot tørke på benken frem til analysering i fluorescensmikroskop.

3.2.5 Analyser

De tørre gelene tilsettes 25 ul hver av fargestoffet DAPI før analyse i et fluorescens mikroskop. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) er et fargestoff som binder til minor groove⁴⁵. Pga. hvordan cellene ser ut i fluorescens mikroskopet kalles de kometer.

Vilkårlige celler fordelt på to geler gis en verdi mellom 0-4 basert på mengde DNA som i elektroforesen er vandret ut fra cellekjernen. Verdi 0: Uskadet celle uten hale, Verdi 4: Nesten all DNA i halen. Figur 2 viser ulike klasser fra 0-4. For hver 100-de celle som analyseres vil hvert glass ha en verdi mellom 0 – 400 ”arbitrary units”.

Cellene i undersøkelsen av optimal konsentrasjon av Alk A ble analysert ved hjelp av Image analysis hvor måleenheten er ”tail intensity” som er et godt mål for DNA skade da det er et lineært forhold mellom resultatet og bruddfrekvens³⁸.



Figur 2. Kometer og deres fem inndelingsklasser

3.2.6 Statistisk analyse

Statistisk analyse ble utført ved bruk av SPSS versjon 14.00 (SPSS, Chicago, IL). Ikke-parametriske tester ble benyttet. Parrede data ble analysert med Wilcoxon matched pairs test, mens uparrede data ble analysert med Mann-Whitney U.

Gjennomsnittet for fekalvannbehandlede celler er basert på gjennomsnitt av to uavhengige eksperiment pr. person. For PBS-behandlede celler behandles hvert eksperiment som ett uavhengig eksperiment og gjennomsnittet tas av alle enkelteksperiment.

4. Resultater

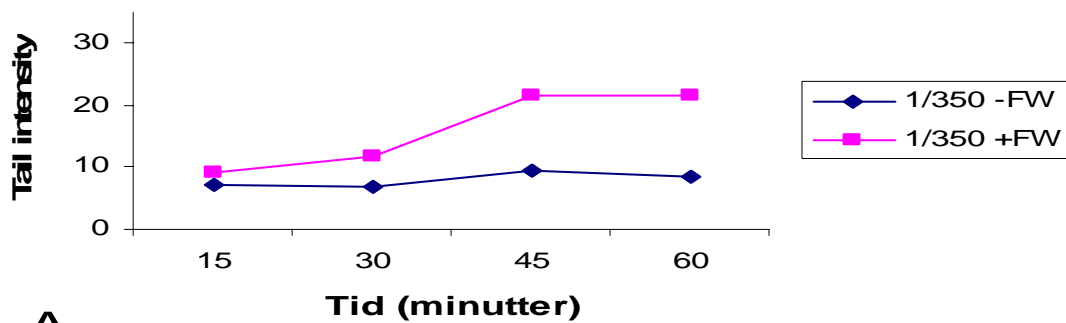
4.1 Undersøkelser før start

4.1.1 Optimal enzymkonsentrasjon av Alk A

For å finne riktig brukskonsentrasjon av enzymet Alk A ble dette testet ut. Enzymet ble testet i disse tre konsentrasjonene: 1/1000, 1/350 og 1/100.

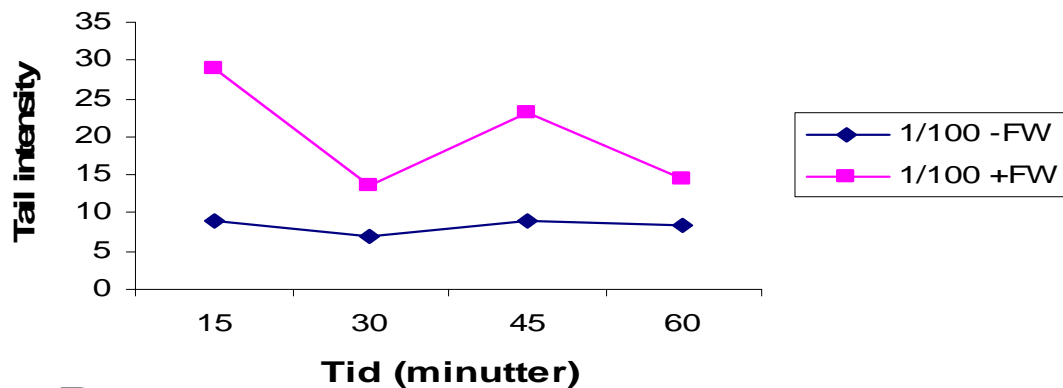
Cellene lå i varmeskap i 37,0°C; 15, 30, 45 eller 60 min.

DNA-trådbrudd og alkylerte skader i CaCo-2 celler behandlet med (+FW)/uten (-FW), inkubert med 1/350 Alk A



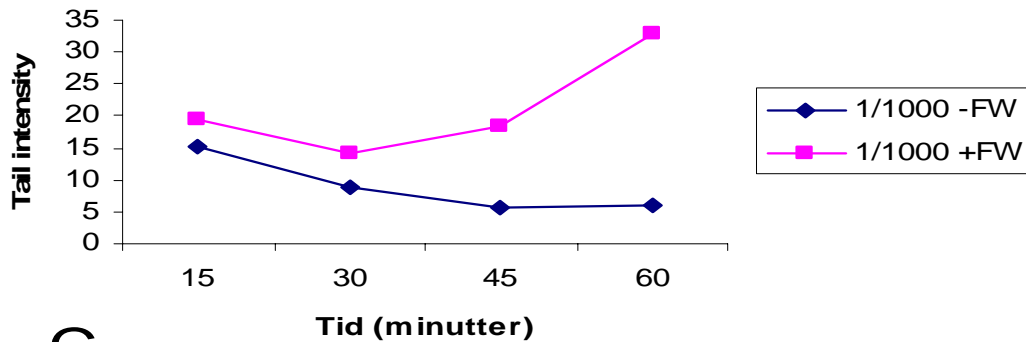
A

DNA-trådbrudd og alkylerte skader i CaCo-2 celler behandlet med (+FW)/uten (-FW) fekalvann, inkubert med 1/100 Alk A



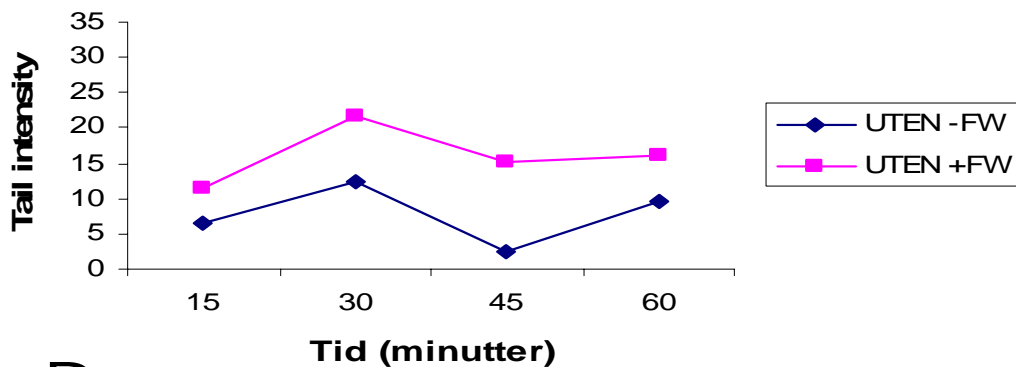
B

DNA-trådbrudd og alkylerte skader i CaCo-2 celler behandlet med (+FW)/uten (-FW) fekalvann, inkubert med 1/1000 Alk A



C

DNA-trådbrudd og alkylerte skader i CaCo2-celler behandlet med (+FW)/uten(-FW) fekalvann, inkubert uten enzym, kun med enzymbuffer



D

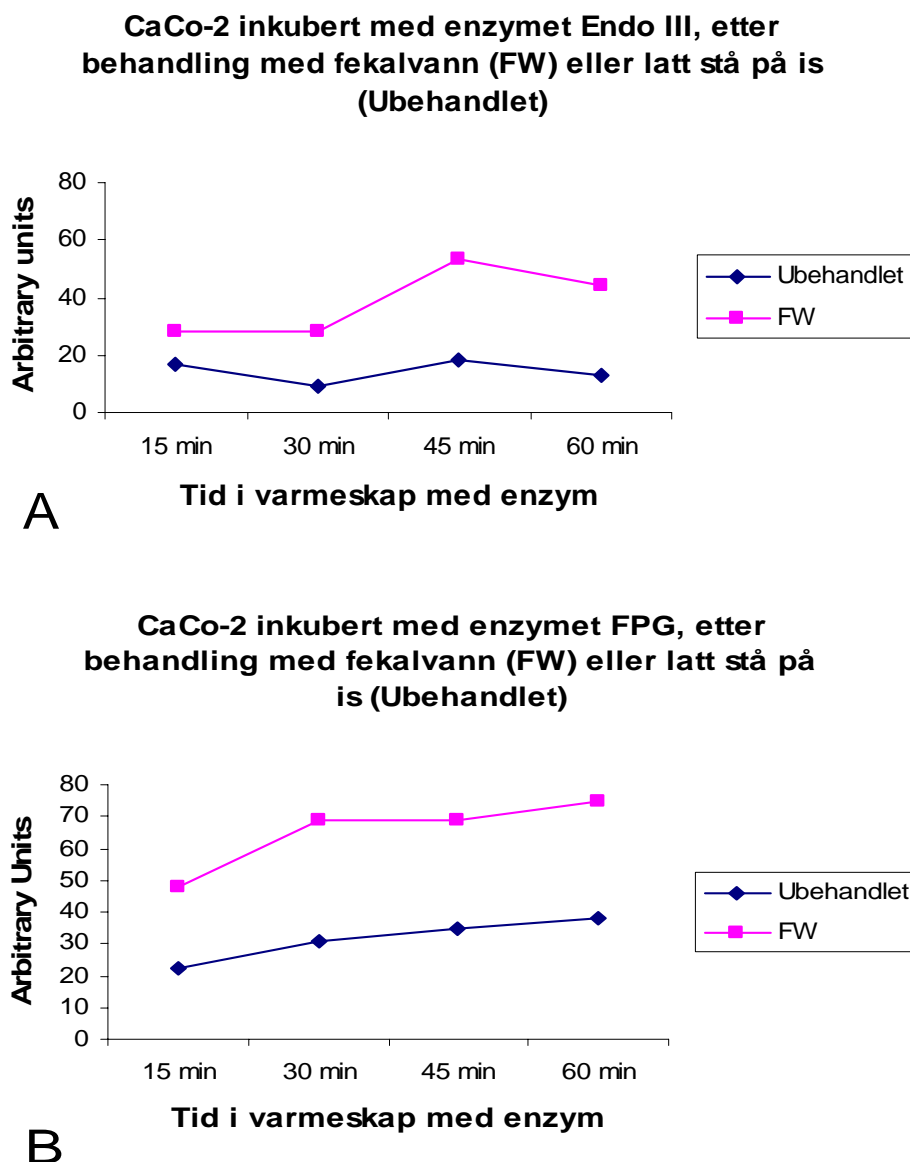
Figur 3.

DNA-trådbrudd og alkylert skade i CaCo-2 celler behandlet med og uten fekalvann samt inkubert med ulike mengde enzym; (A) Enzymkonsentrasjon 1/350 (den valgte konsentrasjon å jobbe videre med), (B) Enzymkonsentrasjon 1/100 Inkubering, (C) Enzymkonsentrasjon 1/1000, (D) Inkubering kun med enzymbuffer. (Verdiene er tatt fra ett eksperiment).

Alk A ble undersøkt to ganger med tre ulike konsentrasjoner. Første gang ga Alk A ingen effekt på detekterte skader (resultater ikke vist). Med den nye batchen Alk A viste det seg at å bruke 1/350 fikk jeg en stigning opp til 45 minutter (figur 3A). Dette gjaldt celler som ikke ble inkubert med fekal vann og celler som ble inkubert med fekalvann. På bakgrunn av resultatene ble konsentrasjonen 1/350 valgt.

4.1.2 Optimal virketid for enzymene FPG og Endo III

Effekten av enzymene FPG og Endo III ved ulike inkubasjonstider ble også testet. Enzymene FPG og Endo III ble tilsatt celler inkubert med fekalvann samt celler ikke inkubert med fekalvann. Totalt 8 gel med CaCo-2 inkubert med fekalvann og 8 gel med ubehandlet CaCo-2. Cellene lå i varmeskap i 37,0°C i 15, 30, 45 eller 60 minutter.



Figur 4.

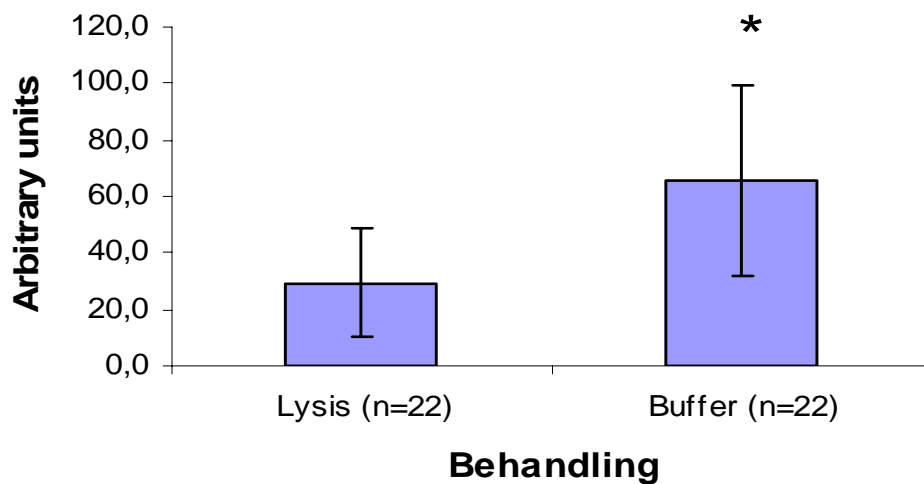
CaCo-2 celler behandlet med fekalvann (FW) i 30 min. 37,0°C, eller latt stå på is (Ubehandlet) og deretter inkubert med enzymene (A) Endo III, (B) FPG, i varmeskap ved 37,0°C i 15, 30, 45 eller 60 minutter. (Data er resultater fra ett eksperiment).

Når det gjelder enzymet FPG økte ikke antall detekterte oksiderte puriner fra 30-45 minutter. For Endo III økte detekterte oksiderte pyrimidiner opp til 45 minutter (figur 4). Alkylerte baser detektert med konsentrasjonen 1/350 Alk A steg jevnt til 45 minutter for deretter å stige litt til 60 minutter (figur 3A). Av praktiske årsaker ble derfor alle enzymene gitt virketid 45 minutter.

4.2 Resultater fra eksperimentene

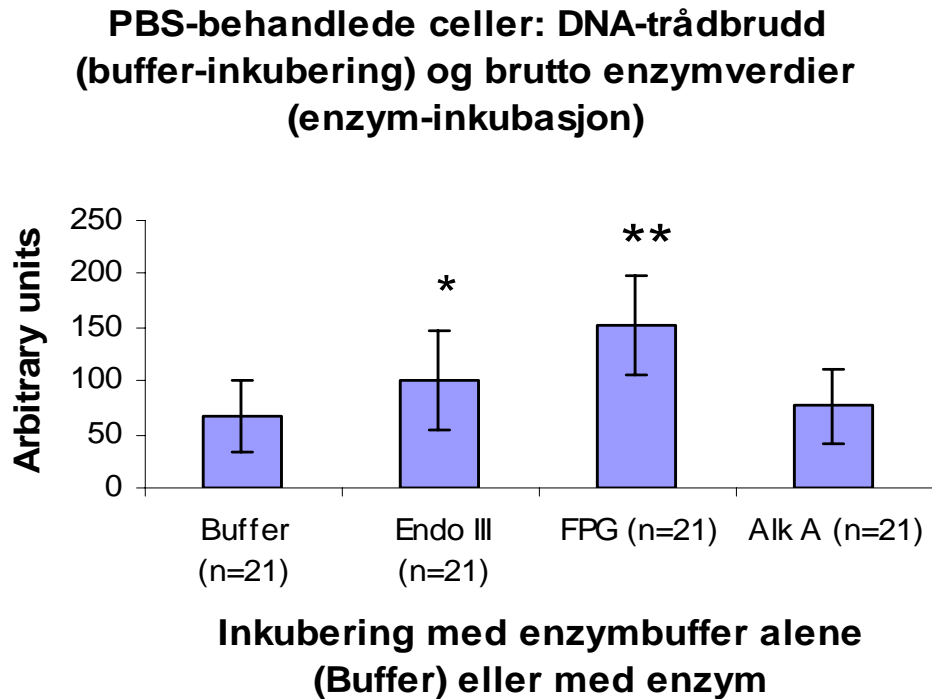
4.2.1 PBS-behandlede celler

DNA-trådbrudd: Ubehandlede celler (Lysis) og celler behandlet med PBS og inkubert med enzymbuffer (Buffer)



Figur 5.

DNA-trådbrudd i CaCo-2 celler behandlet med PBS 37,0°C, 30 min. og inkubert med enzymbuffer i 37,5°C, 45 min. (Buffer) sammenlignet med ubehandlede celler (Lysis). Data er gjennomsnitt ± standardavvik for uavhengige eksperimenter. * Signifikant økt mengde DNA-trådbrudd ved behandling med PBS og enzymbuffer. * $P < 0,0005$ (Wilcoxon matched pairs test).



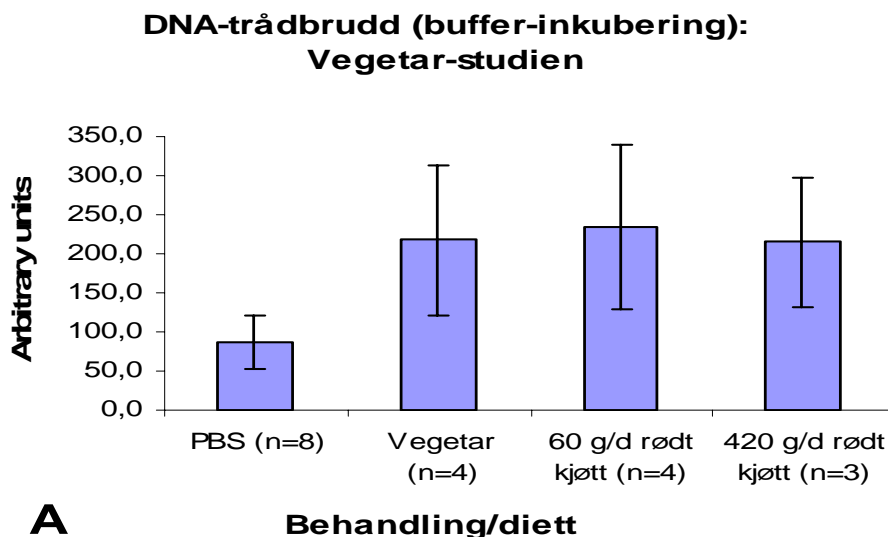
Figur6.

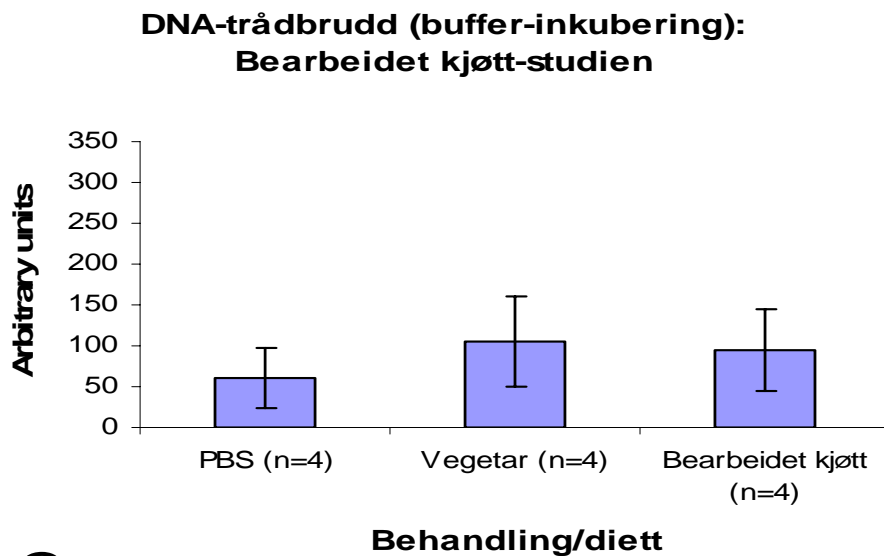
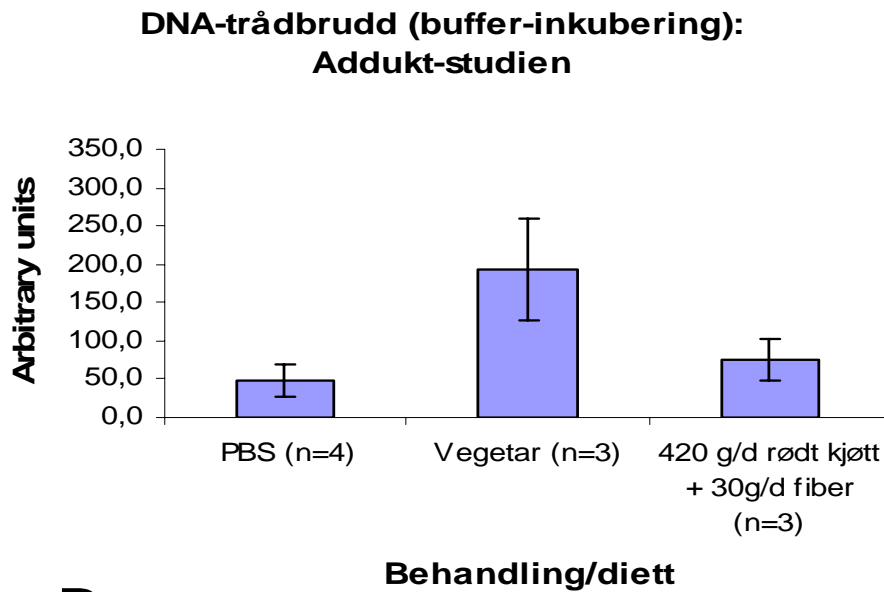
Mengde DNA-trådbrudd (Buffer), oksiderte pyrimidiner og DNA-trådbrudd (Endo III), endrede puriner og DNA-trådbrudd (FPG) samt 3-methyladenine og trådbrudd (Alk A) i CaCo-2 celler inkubert med PBS 37,5° C, 30 min. og enzym/bufferbehandling i 37,5° C, 45 min. Data er gjennomsnitt ± standardavvik av 21 uavhengige eksperimenter. * signifikant forskjellig fra Buffer * P= 0,002; ** P<0,0005 (Wilcoxon matched pairs test).

Som man kan se av figur 5 øker mengden DNA-trådbrudd for CaCo-2 celler som gjennomgår en enkel behandling med inkubering med PBS for deretter å behandles med enzymbuffer i 45 minutter. Det er signifikant økt skadenivå når man benytter enzymer, bortsett fra enzymet Alk A (figur 6). CaCo-2 cellene har dermed endogen skade vist ved oksiderte pyrimidiner og -puriner. Verdiene er fra alle PBS-behandlede celler i alle utførte eksperimenter. Standardavviket er ganske stort som reflekterer en stor variasjon mellom eksperimentene.

4.2.2 Trådbrudd induisert av fekalvann i de ulike studiene

DNA-trådbrudd vist ved bufferverdier (figur 7) viser at kun vegetardietten fra addukt-studien skiller seg ut. Begge diettene i bearbeidet kjøtt-studien og de tre diettene i vegetar-studien har like mange trådbrudd som de andre diettene i studien de er en del av. En forskjell mellom bearbeidet kjøtt-studien og vegetar-studien er at fekalvann fra alle diettene i vegetarstudien gir nesten dobbelt så mye trådbrudd. Hvis man sammenligner vegetardietten i addukt-studien med vegetar-dietten i vegetar-studien kan man ikke si det er noe spesielt med den. Men vegetardietten fra addukt-studien er den eneste dietten som skiller seg ut med klart høyere mengde trådbrudd i studien den er en del av.

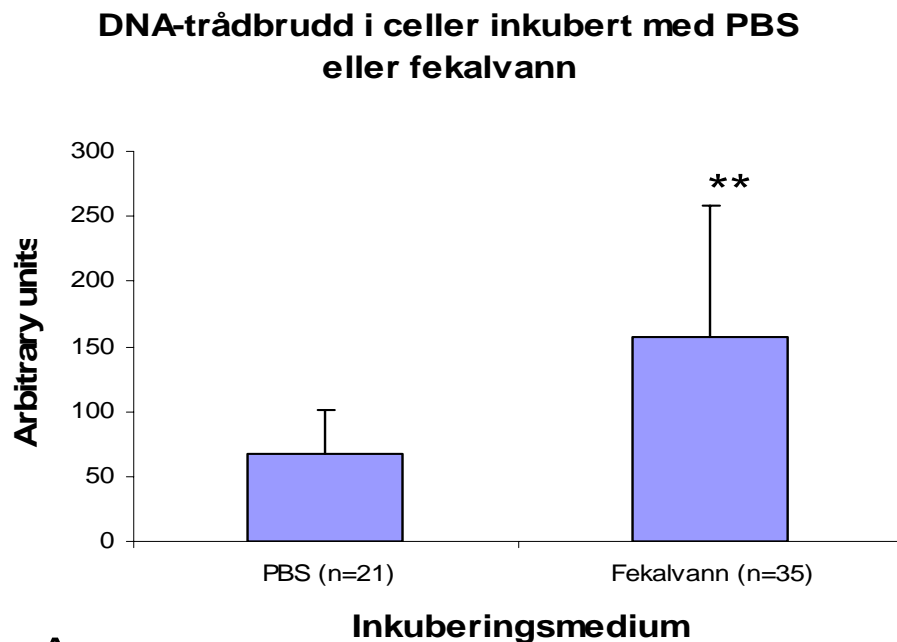




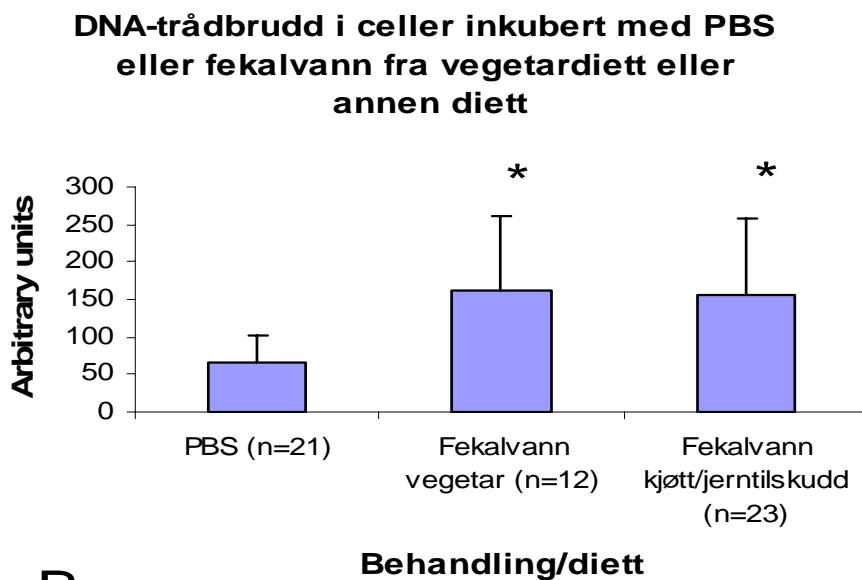
Figur 7.

DNA-trådbrudd i CaCo-2 celler behandlet med PBS eller fekalvann fra (A) Vegetar-studien, (B) Addukt-studien og (C) Bearbeidet kjøtt-studien og inkubert med enzymbuffer. Verdiene er gjennomsnitt av "Arbitrary units". Gjennomsnittet for fekalvannbehandlede celler er basert på gjennomsnitt av to uavhengige eksperiment pr. person. Standardavvik er vist ved vertikale barer.

4.2.3 DNA-trådbrudd i PBS-behandlede celler sammenlignet med DNA-trådbrudd for alle fekalvannbehandlede celler



A



B

Figur 8.

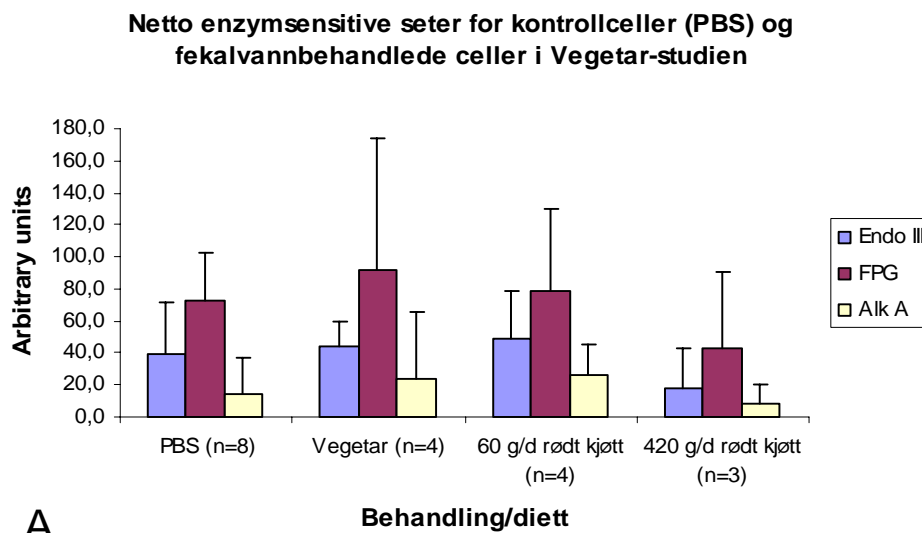
Nivå av DNA-trådbrudd vist ved bufferverdier for CaCo-2 celler inkubert med fekalvann og PBS (kontroll) fra (A) Alle fekalvannene uavhengig av studie og diett; (B) Fekalvannene delt inn i vegetardielt eller rødt kjøtt/bearbeidet kjøtt/ferntilskudd. Data er gjennomsnitt \pm standard avvik. Gjennomsnittet for fekalvannbehandlede celler er basert på gjennomsnitt av to uavhengige eksperiment pr. person. * signifikant forskjellig fra Buffer ** $P=0,001$; * $P<0,005$ (Mann-Whitney U).

Figur 8 viser at når verdiene fra alle fekalvannene samles finner man en statistisk signifikant økning i induerte DNA-trådbrudd. Det er generelt ingen forskjell mellom vegetardiett og de andre diettintervensjonene til å induere trådbrudd i DNA.

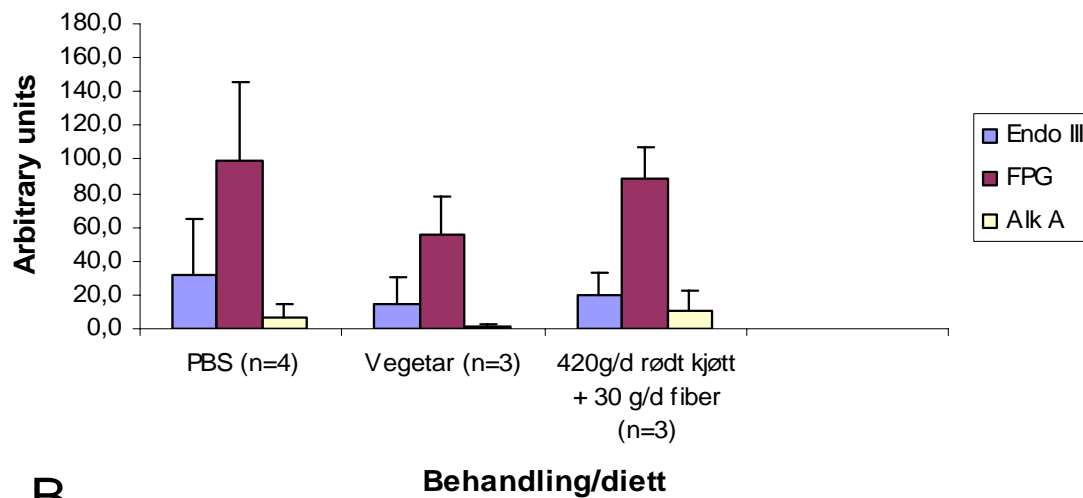
Hvis man gjør samme sammenligningen som i figur 8A og B, men med de ulike enzymene vil det nesten ikke være forskjeller mellom PBS-behandlede celler og fekalvannbehandlede celler (data ikke vist).

4.2.4 Netto enzymsensitive seter for kontrollceller behandlet med PBS- og fekalvannbehandlede celler i de ulike studiene

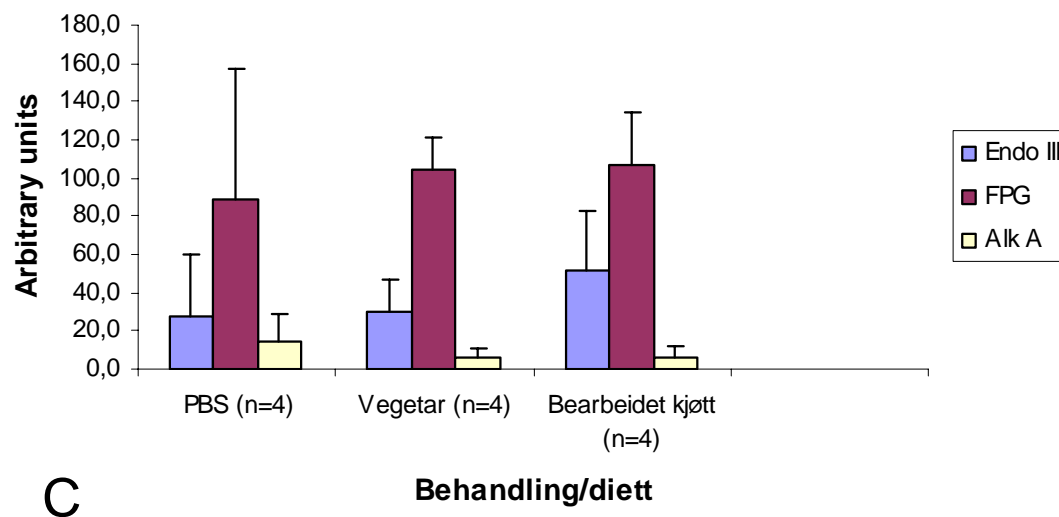
Netto enzymverdier i de ulike studiene viser ingen signifikante forskjeller. 420 g/dag rødt kjøtt induserer mindre oksiderte puriner enn PBS. Kjøttdiettene viser ikke større oksidativ skade enn PBS, unntatt eventuelt bearbeidet kjøtt som viser ca. doblet mengde oksiderte pyrimidiner (figur 9C).



Netto enzymsensitive seter for kontrollceller (PBS) og fekalvannbehandlede celler i adduct-studien



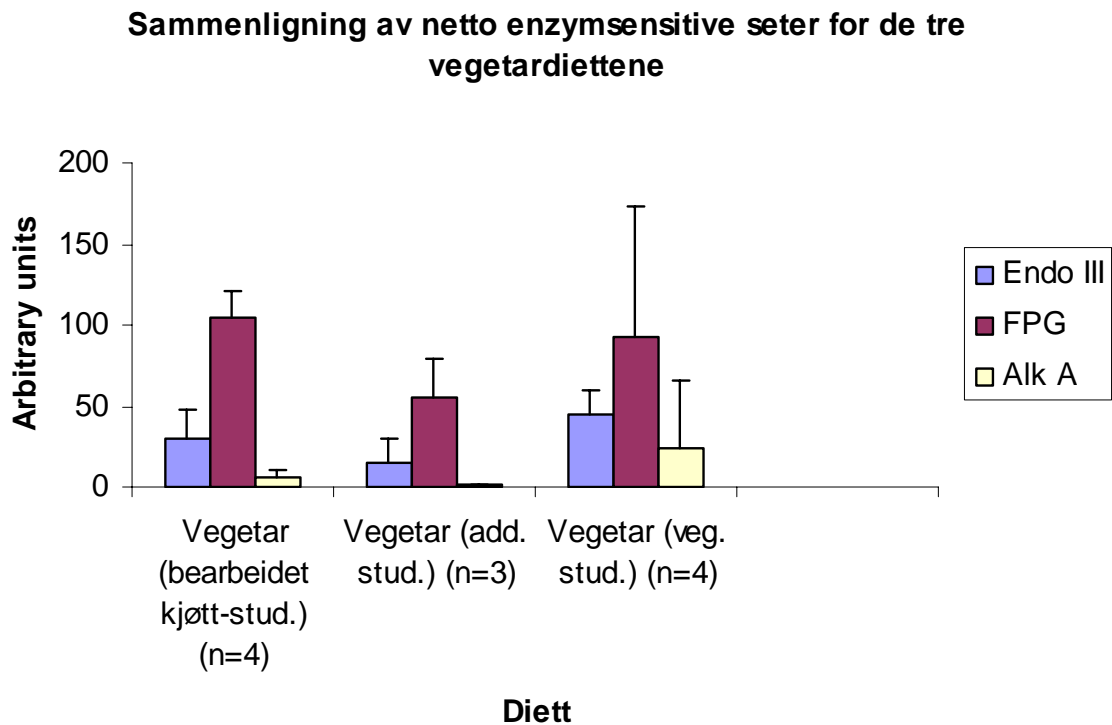
Netto enzymsensitive seter for kontrollceller (PBS) og fekalvannbehandlede celler i bearbeidet kjøtt-studien



Figur 9.

Netto oksiderte pyrimidiner (Endo III), oksiderte puriner (FPG) og 3-methyladenine (Alk A) i PBS- (kontroll) og fekalvannbehandlede CaCo-2 celler i (A) Vegetar-studien; (B) Addukt-studien; og (C) Bearbeidet kjøtt-studien. Data er gjennomsnitt \pm standard avvik. Gjennomsnittet for fekalvannbehandlede celler er basert på gjennomsnitt av to uavhengige eksperiment pr. person

4.2.5 Sammenligning av netto enzymverdi i de tre vegetardiettene



Figur 10.

Sammenligning av netto enzymsensitive seter i de tre vegetar diettene fra de tre studiene

Figur 10 viser ingen signifikante forskjeller mellom de tre vegetardiettene mht. enzymsensitive seter.

5. Diskusjon

5.1 Metode

Design

Hvordan studiene er lagt opp med tanke på forsøkspersoner og dietter har ikke vært opp til meg å bestemme. Ferdige fekalvannprøver ble sendt fra England. Utgangspunktet var at kun to studier med henholdsvis 12 og 6 personer skulle analyseres. Dette er studiene kalt 1: Vegetar-studien og 2: Jerntilskudd-studien. De samme fekalvannene fra studien til Cross et al.³⁴ som tidligere kun var undersøkt for trådbrudd skulle nå studeres med enzymene Endo III, FPG og Alk A. Slik gikk det ikke. Etter at de første prøvene var analysert ble ikke resten av prøvene sendt. Derimot kom prøver fra to andre studier. En av prøvene fra studie 2 var ikke mulig å bruke i analyser. Dermed satt jeg igjen med to personer i den studien og ingen statistikk er utført. Dette er årsaken til at resultater fra tre studier er presentert.

Statistisk styrke

Den statistiske styrken er svært lav, derfor er det ikke mulig å finne signifikante forskjeller mellom diettene selv der det er synlig store forskjeller. For PBS-behandlede celler er antallet analyserte prøver såpass høyt at man kan finne signifikante forskjeller mellom celler inkubert med enzymbuffer (Buffer) og celler som kun har stått på is, inkorporert i agarose og deretter lysert (Lysis). Ved å sammenligne PBS-behandlede celler med alle fekalvannene samlet (uavhengig av studie/diett) blir det mulig å finne signifikante forskjeller.

Det opprinnelige utgangspunktet med 12 og 6 personer i hver studie ville hatt tilstrekkelig statistisk styrke til å kunne oppdage forskjeller mellom diettene dersom det var forskjeller. En studie av syv forsøkspersoner som spiste sin vanlige diett, tillegg til 200 g brød med 40 g linfrø, i fire uker fant en signifikant reduksjon i antall DNA-trådbrudd på ca. 31 %⁵¹. Yeh et al. hadde åtte mus i hver gruppe når de undersøkte fekalvannsgenotoksiteten via CaCo-2 celler ved inntak av ulike fibertyper og fant signifikante forskjeller. Igjen, med det første tenkte antallet forsøkspersoner ville det vært mulig å finne signifikante forskjeller dersom det var noen. Også studie 4, bearbeidet kjøtt-studien, ville muligens kunne gitt statistisk

signifikant forskjell mellom vegetar og bearbeidet kjøtt for induerte oksiderte pyrimidiner, dersom flere prøver var tilgjengelige.

CaCo-2 celler som eksperimentell modell

CaCo-2 påvirkes av plantestoffer ved endret uttrykking av apoptoseindikator, proliferasjon og DNA-skade⁵⁹ samt akkumulering i G₂/M fasen i cellesyklus⁶⁰. CaCo-2 innehar flere funksjoner som ligner de i normalt kolonepitel: Funksjonelle mikrovilli og "tight junctions"⁴⁴ samt at de har enzymaktivitet som metaboliserer xenobiotika⁴³.

CaCo-2 celler har som sagt blitt brukt av andre til genotoksisitetstester sammen med kometmetoden og vist seg å være en celletype som kan fremvise at de påvirkes ulikt av ulike fekalvann^{58, 50}.

Dette viser at CaCo-2 celler som eksperimentell modell er fungerende og man kan vente å se ulikt skadenivå dersom det man inkuberer med har ulik evne til å indusere skader i DNA.

5.2 Resultater; DNA-trådbrudd (bufferverdier), PBS-behandlede celler og Alk A

Generelt

Bufferverdiene viser DNA-trådbrudd og abasiske seter. Det finnes enkelttrådbrudd og dobbeltrådbrudd. Det er her ikke gjort forsøk på å undersøke mengde enkelt- og dobbeltrådbrudd da det ikke er mulig via kometmetoden. David M Wilson III forteller at DNA-trådbrudd er en av de mest vanligst forekommende genskadene ⁶¹. Enkelttrådbrudd forekommer daglig fra angrep fra reaktive oksygen radikaler og andre elektrofile molekyler i titusentall i alle celler ⁶². De repareres raskt slik at ved hvert tidspunkt vil kun en andel av denne skaden ses ⁴⁵.

Spørsmålet er jo om fekalvannbehandlede celler viser andre netto enzymverdier sammenlignet med celler behandlet med PBS fordi bufferverdier gir begrenset informasjon ³⁸. Dersom disse verdiene er signifikant annerledes kan man si noe om fekalvannet er mer genotoksisk med hensyn til evnen å oksidere og alkylere DNA og dermed at dietten inneholder stoffer som kan skade tarmepitelet.

PBS-behandlede celler

Cellene som kun har blitt behandlet med PBS og enzymbuffer hadde signifikant mer trådbrudd enn celler som kun har stått på is før inkorporering i agarose og lysert (figur 5). De PBS-behandlede cellene har gjennomgått flere steg med vortexing, sentrifugering og pipettering som utsetter cellene for stress. Uansett er det vanlig at bufferinkubering øker mengde DNA-trådbrudd ⁶³.

Dersom man ser på oksidativ DNA-skade ved bruk av enzymene FPG og EndoIII på PBS-behandlede celler viser de signifikant høyere skadenivå enn buffer alene (figur 6).

Alt dette betyr at CaCo-2 cellene endogen har en viss mengde DNA-trådbrudd, oksiderte DNA-pyrimidiner og oksiderte DNA-puriner, også kalt bakgrunnskade.

Alle celler som inkuberes med fekalvann går gjennom de samme stegene som de PBS-behandlede cellene. Det som er interessant er om inkubering med fekalvann fra ulike dietter gir større mengda DNA-trådbrudd, oksiderte DNA-baser eller alkylerte DNA-baser.

DNA-trådbrudd (bufferverdier): hver studie for seg

Trådbrudd er et vanlig endepunkt i genotoksisitetsstudier ved kometmetoden ^{34, 51, 53}. Alle fekalvannbehandlede celler viste høyere nivå av DNA-trådbrudd enn celler behandlet med kun PBS. Forskjellene er ikke signifikante selv om fekalvann fra f.eks. vegetardietten i addukt-studien ga 4 x større skade (figur 7B) og fekalvann fra alle diettene i vegetarstudien ga over dobbelt så mye skade på cellene (figur 6A) sammenlignet med kontroll. Andre har vist at fekalvann er genotoksisk sammenlignet med kontrollceller. Yeh et al. viste at fekalvann fra dietter med ulike mengder fiber gitt til mus økte DNA-trådbrudd i CaCo-2 cellene med unntak av dietten tilsatt fibertypen inulin som ikke var signifikant annerledes enn kontroll ⁵⁸. Oberreuther-Moschner et al. viste at fekalvann fra personer som spiste sin vanlige diett tilsatt enten vanlig yoghurt eller probiotisk yoghurt ga henholdsvis ca. 6x og 2,5x mer trådbrudd i HT29clone19A celler sammenlignet med kontrollceller inkubert med isoton saltvannsløsning ⁵³. Ozwald et al. viste også at fekalvann er genotoksisk sammenlignet med kontroll ⁵¹. Dette er da ikke nytt, men kjent fra før.

Selv om ingen av bufferverdiene fra fekalvannbehandlede celler var statistisk signifikant høyere enn kontrollceller var det pga. det lave antall personer i de ulike studiene. Bufferverdiene til fekalvannbehandlede celler i bearbeidet kjøtt-studien og vegetar-studien var ca. 1,7 og 2,5 x høyere enn kontrollcellene. Diettene i disse to studiene ligger på samme nivå av DNA-trådbrudd innen sin egen studie. Det som skiller seg ut er vegetardietten i adduct-studien som viser nesten 4x mer skade enn kontrollcellene mens celler inkubert med fekalvann fra en diett med mye rødt kjøtt tilsatt fiber kun har 1,6x mer skade enn kontrollcellene.

Med tanke på at det er så få personer i hver studie og at individuelle variasjoner kan være store er det vanskelig å uttale seg om disse resultatene.

DNA-trådbrudd (bufferverdier): alle studier og dietter samlet

Figur 7A viser at fekalvann er signifikant mer genotoksisk enn PBS. Som nevnt over er dette kjent fra før. Det er ingen forskjell mellom vegetardiettene og kjøtt/bearbeidet kjøtt/jerntilskudd diettene (figur 8B).

Sammenligning av DNA-trådbrudd i de ulike vegetardiettene

Vegetardietten i addukt-studien er på nivå med vegetardietten i vegetar-studien, mens vegetardietten i bearbeidet kjøtt-studien gir ca. halvparten av skaden av disse andre. De forskjellene kan komme av ulike ting. For det første er det store forskjeller mellom individer^{51, 50} som ikke blir borte og heller ikke mindre av at individene spiser samme diett⁵¹. Dette gjør det vanskelig å sammenligne de tre vegetardiettene som jo er inntatt av ulike personer i de tre studiene. Forskjellene kan rett og slett komme pga. forskjellige personers ulike genotoksiske profil av deres fekalvann. Disse forskjellene gjør det veldig viktig at studier av fekalvanngenotoksisitet bruker forsøkspersoner som sin egen kontroll. De humane fekalvannsstudier av Glinghammar og Ozwald fant på tross av store individuelle forskjeller signifikante forskjeller mellom intervensjoner. Signifikant mindre trådbrudd ble funnet i fekalvann ved inntak av 200 g brød med 40 g linfrø i 28 dager sammenlignet med før intervensjonen⁵¹.

For det andre er det en mulighet for at forskjellene mellom vegetardiettene er reelle. Informasjonen om de ulike vegetardiettene på nåværende tidspunkt er ikke nok til å kunne vurdere om matvarereinntaket burde kunne gi forskjellig nivå av skade. I dette tilfellet hvor det er så få personer i hver gruppe blir det vanskelig å sammenligne de tre vegetardiettene spist av ulike personer.

Det er undersøkt tidligere om man kan se forskjell i DNA skade i lymfocytter ved ulike vegetardietter. Kazimirova et al. viste i en gruppe med 24 vegetarianere at laktovegetarianere hadde signifikant mindre netto Endo III sensitive seter i lymfocytene, enn lakto-ovo-vegetarianere. Faktisk nesten 40 % lavere. Netto FPG var også lavere, mens DNA-trådbrudd lå høyere hos laktovegetarianerne. De klarte også å finne en signifikant forskjell mellom vegetarianere og ikke-vegetarianere for brutto FPG som viser DNA-trådbrudd, abasiske seter og oksiderte puriner⁶⁴.

Dersom vi ser på figur 7 som sammenligner netto enzymverdier i de tre vegetardiettene kan man se at den dietten som har flest trådbrudd har minst oksiderte DNA- pyrimidiner og – puriner. Dette er lik funnet i studien av lymfocytter nevnt ovenfor.

Vegetardietten i addukt-studien har mindre netto FPG. Sesink et al. fant, i studien fekalvannprøvene kommer fra, en signifikant forskjell mellom vegetardiett og en diett med

mye rødt kjøtt på mengde O6-carboxymethyl guanine, et NOC-spesifikt DNA-addukt, i eksfolierte kolonceller²⁹. Mye rødt kjøtt med mye fiber ga færre addukter, men fortsatt mer enn vegetardietten. Hvis vi ser på figur 9B, ser vi at netto enzymverdier faktisk er høyere i rødt kjøtt + fiber dietten enn vegetardietten for alle tre enzymer, men også lavere enn PBS-behandlede celler..

Alk A verdier

Enzymet Alk A ga gjennomgående svært lave verdier. Forundersøkelsen av enzymet viste at inkubering med fekalvann i 30 minutter doblet detektert skadenivå i CaCo-2 celler sammenlignet med celler som var latt stå på is (figur 3A). I forsøkene var det ikke noen effekt av enzymet. En studie av mukosaceller fra magesekk sammenlignet DNA-skade i *Helicobacter pylori*-infiserte og ikke-infiserte celler. Infiserte celler hadde signifikant mer oksidativ skade detektert med FPG, mens Alk A ikke viste noen forskjell. Prosentvis DNA i komethalen viste et høyere skadenivå funnet med Alk A enn FPG⁶⁵. Arabski skriver at de høye Alk A verdiene muligens kan komme av høyt nivå av nitroso-relaterte forbindelser. Ifølge Cross et al. vil økte mengder kjøtt gi en dose-avhengig økning i NOC stoffer (ATNC = apparent total N-nitroso compounds) i feces. I dette forsøket var det ikke mulig å se noen effekt av disse N-nitrosoforbindelsene på alkylert skade på CaCo-2 celler.

Muligens var Alk A av en eller annen årsak blitt inaktivt, eller fekalvann har kun små mengder stoffer som gir alkylende skade. Sistnevnte er trolig da verdiene for ulike personer og eksperimenter viser stor variasjon i verdier for Alk A, men ingen netto Alk A. Ofte er verdien for netto Alk A 0 hvilket betyr disse cellene inkubert med fekalvann ikke har noe alkylende skade å snakke om.

5.3 Rødt kjøtt

Rødt kjøtt har vært undersøkt på mange måter. Prospektive studier^{20, 66, 17} kohortestudier^{35, 67}, case-control^{18, 68} og review-studier^{22, 69, 70}. De tre review-artiklene konkluderer med at rødt kjøtt sannsynligvis øker risikoen for kolorektalkreft.

Prospektive-/kohorte studier

En engelsk prospektiv studie av 10998 vegetarianere og ikke-vegetarianere viste en lavere relativ risiko blant vegetarianere, men den var ikke statistisk signifikant. Et problem med denne studien er at ikke-vegetarianere ble definert som både de som spiste hvitt og rødt kjøtt samt fisk slik at informasjonen dermed blir borte¹⁷. Informasjon blir borte dersom man setter hvitt og rødt kjøtt samt fisk i samme kategori fordi inntak av hvitt kjøtt og fisk er sett å gi lavere risiko for kolorektalkreft^{20, 35}.

En annen mindre prospektiv studie av amerikanske adventister viste en positiv assosiasjon mellom kolonkreft og totalt kjøttinntak. Relativ risiko for kolonkreft og inntak av rødt kjøtt \geq 1x/uke hos personer som spiste hvitt kjøtt $<$ 1x/uke var 1,90, 95 % KI (1,16-3,11). For de med samme kyllinginntak, men enda lavere inntak av rødt kjøtt $>$ 0 $<$ 1x/uke var relativ risiko 1,40⁶⁶.

Den store europeiske prospektive studien EPIC mener at inntak av rødt kjøtt og kolorektalkreft klart har en sammenheng. Kalibrert HR (hazard ratio) for rødt kjøtt inntak viste en HR på 1,49 pr. 100 g/dag økning i inntak²⁰.

Chao et al. analyserte en kohorte på 148610 personer i alderen 50-74 år. De fant en sammenheng mellom høyere inntak av rødt kjøtt og kolorektalkreft. Resultatet for kvinner og menn sammen viste at fra andre til femte kvintil hadde de en høyere risiko. Spesielt de i femte kvintil hadde høy risiko (RR 1,7; 95 % KI 1.15-2.52 P= 0,007 for trend) sammenlignet med første kvintil. Inntaket i høyeste kvintil var $>$ 800 g/uke for menn og $>$ 560 g/uke for kvinner. Denne høyere risiko gjaldt hovedsakelig kreft i recto-sigmoid junction RR 2,40; 95 % KI 1.30-4.43 med signifikant økning i risiko ved økt inntak av rødt kjøtt (P= 0,002 for trend). Også for kreft i proksimale kolon var det en assosiasjon mellom inntak av rødt kjøtt og kreft (RR; 1,27; 95 % KI, 0,91-1,76) sett mellom høyeste og laveste kvintil (p=0.05 for trend)³⁵. Som denne studien viser øker ikke kreftrisiko likt i hele tykktarmen. Larsson et al. fant det samme i en stor svensk studie som fulgte 61443 kvinner i alderen 40-75 år fri fra

kreft ved begynnelsen av studien. De svarte på et selvadministrert spørreskjema og ble gjennomsnittlig fulgt i 13,9 år. De fant en signifikant positiv assosiasjon mellom inntak av rødt kjøtt og risiko for kreft i distale deler av tykktarmen (p for trend = 0,001). For kvinner som spiste ≥ 94 g/dag sammenlignet med de som spiste ≤ 50 g/dag var den multivariate rate ratio 2.20 (95 % KI 1.34-3.68). Kvinnene i høyeste kvartil spiste mer blodpudding og bearbeidet kjøtt og fikk i seg mindre kalsium. Kalsium er sett å ha beskyttende effekt på utvikling av aberrante kryptfokuser i tykktarm hos rotter gitt en diett tilsatt haemin²².

Ved å kombinere krefttilfeller i distale deler og rektum fant Larsson et al. at det viste seg å gi en 26 % høyere risiko ved å spise 2 porsjoner blodpudding pr. mnd (RR 1.26, 95 % KI 1.02-1.55) sammenlignet med å sjelden eller aldri spise det⁶⁷.

Cross et al. så en økning i endogen NOC-produksjon når forsøkspersoner spiste store mengder rødt kjøtt³³. De foretok en studie av fekalvannet for å undersøke om forskjeller i endogen produksjon av NOC kan påvirke fekalvannsgenotoksisitet vist ved hjelp av kometmetoden³⁴. De fant ingen sammenheng mellom totalkonsentrasjonen av NOC i fekal homogenat og fekalvannsgenotoksisitet. Det ble ikke benyttet reparasjonsenzymmer. Et utvalg av disse fekalvannprøvene er prøvene analysert i vegetar-studien i håp om å finne noe ved hjelp av enzymene. Dessverre var det ingen informasjon å trekke fra resultatet. Cellene inkubert med fekalvann viste ikke mer skade enn celler inkubert med PBS (figur 9A). Addukt-studien med vegetardiett og en diett med mye rødt kjøtt og fiber viser lite i forhold til økt skade.

Hos rotter gitt dietter med 15, 25 eller 35 % rødt kjøtt ble mucuslaget tynnere med økende mengde rødt kjøtt, hvitt kjøtt induserte ikke samme nedgang i mucustykkelse ved økende inntak⁷¹.

Det må være noe felles med rødt kjøtt og blodpudding (blodmat) som ikke finnes i hvitt kjøtt som øker risikoen. Hvitt kjøtt ble funnet i en studie⁶⁶ å gi høyere risiko for kolorektalkreft, men de fleste studier har ikke vist noen høyere risiko^{35, 19, 18, 67}. En stor forskjell på fjærkre og rødt kjøtt er innholdet av hem.

5.4 Hem

Rødt- og bearbeidet kjøtt er sett å ha sammenheng mellom kreft flere steder i kroppen samt andre sykdommer⁷². Når kokt og behandlet kjøtt spises vil hemichromer og hemochromer hydrolyseres slik at hemdelen frigjøres. Fritt og koordinert hem katalyserer fortrinnsvis oksidative reaksjoner. Oksidasjoner katalysert av hem kan skade bl.a. proteiner, DNA og lipider⁷². Sistnevnte skader på lipider i form av lipidperoksidasjon er undersøkt på både rotter og mennesker²⁸.

1,4-dihydroxynonane merkaptursyre (DHN-MA) og 8-iso-PGF_{2α} som er to sluttprodukter av lipidperoksidasjon ble målt i urinen til rotter og forsøkspersoner etter inntak av matvarer/dietter med ulikt heminnhold. DHN-MA utskillelse økte dramatisk hos rotter gitt en diett med mye hem. 73 X høyere utskillelse ved blodpølse dietten ($p < 0,0001$) og 4,6 X høyere utskillelse ved biffdietten ($p < 0,01$), mens ingen forskjell mellom kyllingdietten og kontroldietten. Det var blant forsøkspersonene også signifikant korrelasjon mellom heminntak og DHN-MA utskillelse ($r = 0,94$, $P < 0,05$, $n = 5$).

8-iso-PGF_{2α} utskillelse økte ikke hos forsøkspersonene for noen av diettene. Hos rotter gitt blodpølse, økte mengden av 8-iso-PGF_{2α}, men ikke på biffdietten. Rotter behandlet med karsinogen og gitt biff og blodpølsedietten hadde flere "Mucin-depleted foci" (MDF) enn rotter gitt karsinogen og kylling eller lav-hem diett. De to sistnevnte diettene økte ikke dannelsen av MDF. Antall MDF økte med DHN-MA verdier i urinen ($P < 9 \cdot 10^{-5}$)²⁸. MDF er områder med krypter hvor slimproduksjonen er defekt⁷³. Det var flere forskjeller mellom dietten til rotter og forsøkspersoner; 1: rottene fikk kun små mengder kalsium som blokkerer for hem, 2: kontroldietten for forsøkspersonene inneholdt biffkjøtt, 3: heminntaket var 60 x høyere pr. kg metabolsk vekt for rottene.

Biffkjøtt og blodpølse er sett også i en annen studie å signifikant fremme dannelsen av azoxymetan indusert MDF. Biff og blodpølse diettene ga henholdsvis $1,9 \pm 1,4$ ($P < 0,01$) og $3,0 \pm XX$ ($P < 0,001$) MDF/kolon sammenlignet med $0,55 \pm 0,68$ hos kontroller²⁷. Ifølge Femia et al. kan MDF være en nyttig biomarkør for tykktarms-karsinogenese da de fant at det korrelerte med karsinogenese hos rotter behandlet med azoxymethane og en promotor eller inhibitor av tykktarms-karsinogenese⁷⁴.

Aberrante kryptfokuser er også sett å øke hos rotter ved økt heminntak^{27, 75}. Aberrante kryptfokuser er unormale krypter i tarmslimhinnen mht. både genetikk og morfologi⁷⁶. I bl.a. adenomer, som regnes å være forstadiet til kreft i 60-90 % av tilfellene⁷⁷, finner man igjen flere av mutasjonene fra aberrante kryptfokuser⁷⁶.

Er det hemet selv som utgjør effekten? Ifølge Sesink et al. er det ikke hem selv, men en hemindusert cytotoxisk faktor. De undersøkte effekten av fire dietter på rotter hvorav tre dietter ble tilsatt metabolitter av hem mens én diett ble tilsatt hem. Det var flere signifikante forskjeller mellom hemdietten og de andre diettene samt kontroll. Hemdietten økte signifikant proliferasjonen i tykktarmsepitelet og cytotoxisiteten av fekalvann. De andre diettene forandret verken proliferasjonen eller cytotoxisiteten til fekalvannet. De testet dermed om det var hem som sto for den økte cytotoxisiteten av fekalvann i hemgruppen. De tilsatte en mengde hem som tilsvarte mengde organisk jern i fekalvannet til hemgruppen, til kontrollgruppens fekalvann. Cytotoxisiteten ble ikke endret og dermed er det ikke hemdelen i seg selv som er cytotoxisk²⁵.

Fra hemstudien utført av Cross et al. hadde jeg fekalvann fra tre forsøkspersoner. Fekalvannet fra den ene personen ga ikke resultater det var mulig å bruke i analyser. Prøver fra denne studien diskuteres derfor ikke.

5.5 Bearbeidet kjøtt

Med bearbeidet kjøtt menes kjøtt som konserveres ved røyking, salting, speking eller tilsetning av kjemiske konserveringsmiddel ⁶.

Med bearbeidet kjøtt menes ikke kjøtt som kun er kuttet opp eller kjøttdeig uten kjemiske tilsetningsstoffer ⁶.

Figur 8C viser at en diett med mye bearbeidet kjøtt gir større mengde oksiderte pyrimidiner funnet ved Endo III enn en vegetardiett. Denne forskjellen er ikke statistisk signifikant selv om bearbeidet kjøtt ga dobbel så høy verdi som vegetardietten. Det var kun fire personer i gruppen og dermed vanskelig å finne en signifikant forskjell. Inntaket av bearbeidet kjøtt hos forsøkspersonene var relativt høyt og lå på 420 g/d for menn og 366 g/d for kvinner.

Prospektive-/kohorte studier

Chao et al. så på langsiktig inntak av bearbeidet kjøtt. Kjøttinntaket til en gruppe på 148610 personer ble registrert med ca. 10 års mellomrom i 1982 og 92/93. I 2001 hadde 1667 kolorektale krefttilfeller blitt registrert. De som ved begge registreringene hadde høyt inntak hadde RR:1,50 i forhold til laveste tertil for risiko for utvikling av tykktarmskreft ³⁵.

En japansk studie fant ingen sammenheng mellom økende inntak av bearbeidet kjøtt og kolorektalkreft selv om antall krefttilfeller var høyt (782 tilfeller) ¹⁸. Intervallene mellom kvartilene var små: Medianinntak i øverste kvartil var lavere enn medianinntaket i laveste kvartil i en svensk studie av Larsson ⁶⁷.

Resultater fra EPIC-studien viste en kalibrert HR på 1,7 pr. 100 g/dag økning i inntak av bearbeidet kjøtt for kolorektalkreft ¹⁹. Gaard et al. fant at kvinner som spiste pølse til hovedmåltid 4-5 ganger i måneden hadde 3.5 ganger høyere relativ risiko for kolorektalkreft sammenlignet med kvinner som spiste pølser mindre enn én gang i måneden ⁷⁸.

Case-control studier

Hu et al. så på inntak av bearbeidet kjøtt og risiko for utvikling av kreft i ulike deler av tarmen. De fant signifikant positive assosiasjoner mellom risiko for distal tykktarmskreftrisiko hos kvinner og totalt inntak av bearbeidet kjøtt. Bacon var den matvaren hos kvinner som ga størst risiko for både proksimal- og distal kolonkreft. Hos menn var bearbeidet kjøtt relatert til økt risiko av proksimal kolonkreft. Hamburger var den enkeltmatvaren som var sterkest korrelert med risiko i proksimale kolon i tillegg til bacon ⁶⁸.

Humane studier

Studier har vist statistisk signifikant sammenheng mellom inntak av ulike typer bearbeidet kjøtt og risiko for utvikling av adenomer ^{79, 36}. Ward et al. viste dobbelt OR for de i høyeste kvartil sammenlignet med laveste kvartil ³⁶. Sinha et al. derimot fant at høyere inntak av bacon og pølse var assosiert med økt risiko for kolorektal adenomrisiko, men at totalinntaket av bearbeidet kjøtt ikke var assosiert med økt risiko for adenomer. Bacon og pølse var assosiert med økning av nonadvanced adenomer og single adenomer men ikke multiple ⁷⁹. Det antas at 60 - 90 % av kolorektalkreft tilfellene utvikler seg fra kolorektale adenomer ⁷⁷. WCRF gjorde en meta- analyse av fem studier som ga et estimat på økt risiko på 1.21 (95 % KI 1.04-1.42) pr. 50g/dag. De nye anbefalingene fra WRCF er å unngå bearbeidet kjøtt fullstendig ⁶.

Konserveringsmidler i bearbeidet kjøtt

Både Johnson og Ward tar opp problemstillingen om at bearbeidet kjøtt har relativt høyt nivå av nitritt og nitrat. Nitritt og nitrat er forløpere til NOC ^{36, 22}. Kjøtt som behandles med disse konserveringsmidlene er hovedkilde til predannede NOC ⁸⁰. Johnson argumenterer med at det meste av bearbeidet kjøtt inneholder ganske høye mengder av disse stoffene som i tillegg til protein og hem bidrar til produksjonen av mutagene nitrosaminer i tarmen ²². En undersøkelse av mus viste at å gi en diett innblandet enten 18 % pølse av biff og svin eller 18 % biffkjøtt ga en økning av NOC i feces på henholdsvis 3,7-5,0 og 2,0-2,9 i forhold til kontroll ⁸¹. Ward et al. som fant en dobbelt risiko mellom høyeste og laveste kvartil av bearbeidet kjøtt inntak estimerte også nitritt- og nitratinntak. En 30 % marginalt signifikant økt risiko for kolorektale adenomer pr. 0,5 mg inntak av disse konserveringsmidlene ble funnet ⁸².

Bearbeidet kjøtt ser ut til å være skadelig sett i forhold til risiko for adenomer og kreft i tykktarm. Konserveringsmidler og andre forhold ved matvarene står for denne økte risiko. Bearbeidet kjøtt ga mer oksiderte pyrimidiner selv om det ikke er signifikant på grunn av det lave antall forsøkspersoner, figur 9C.

Inntak av pølser er undersøkt i utvalgte europeiske land ¹⁴. Tyskerne spiser mest pølser etterfulgt av Norge (kvinner), Sverige, Danmark og Nederland. Disse landene ligger, for kvinner, på henholdsvis 3., 1., 15., 4., og 6. plass i forekomst av kolorektalkreft ^{14, 3}.

Maria Gaard fant i sitt doktorgradsarbeid at for kvinner som spiste pølser som hovedmåltid fem eller flere enn fem ganger i måneden sammenlignet med de som spiste færre enn én gang i måneden, hadde 3.5 ganger høyere relativ risiko for tykktarmskreft ⁷⁸. I diskusjonen tar hun opp at pølseinntak kan være en indikator for dårlig kosthold generelt og at det ikke kun er pølsene i seg selv som gir den økte risikoen.

Figur 9C viser at fekalvann fra bearbeidet kjøtt dietten induserte mer oksiderte pyrimidiner i CaCo-2 cellene enn fekalvann fra vegetardietten og PBS (kontroll).

Dette gir en liten indikasjon på at det er noe i bearbeidet kjøtt som skader tykktarmsceller. WRCF anbefaler i sin siste rapport å begrense inntaket av rødt kjøtt. Men når det kommer til bearbeidet kjøtt anbefaler de å unngå det helt eller spise så lite som mulig da de sier at det er ikke noen mengde bearbeidet kjøtt som ikke øker risiko for kolorektalkreft ⁶.

5.6 Fiber/Stivelse

Da jeg ikke har verdier for dietten med mye rødt kjøtt i addukt-studien er det nytteløst å prøve å si noe om effekten av dietten med mye rødt kjøtt tilsatt fiber sammenlignet med en tilsvarende diett uten fiber. Vegetar-studien har en diett med 420 g rødt kjøtt /d.

Sammenlignet med denne har 420 g/d + 30 g/d fiber dietten mye lavere nivå av DNA-trådbrudd. Sistnevnte gir dobbel mengde oksiderte puriner i CaCo-2 cellene, se figur 9A og B. Igjen er det et problem med få personer og stor interindividuell variasjon. Dersom fiberet skulle redusere DNA-trådbrudd burde ikke vegetardietten i addukt-studien ha så høyt nivå av trådbrudd da også den inneholdt 30g/d fiber. Det er vist i studie av mus at fiber senker fekalvanns evne til å indusere DNA-trådbrudd⁵⁸. Peters et al. fant i en studie hvor de sammenlignet fiberinntaket hos 33971 personer uten polypper med 3591 tilfeller med histologisk bekreftet adenom i distale deler av tykktarmen, at risiko for utvikling av distal tykktarmsadenom var assosiert med lavere inntak av fiber⁸³.

Burkitt fremsatte i 50-årene en hypotese om at lavere risiko for kolorektalkreft hos østafrikanere er pga. høyt inntak av fiber. Nyere studier av populasjoner omtalt av Burkitt tyder på at det ikke er fiber som er årsak til lavere risiko. To studier har sett på forskjellen mellom afrikanske amerikanere og innfødte afrikanere og forskjellen mellom hvite sørafrikanere og svarte sørafrikanere. Begge disse studiene tyder på at diettforskjeller og ulikheter i tarmflora bestemmer risiko for kolorektalkreft.

At fiber er hoveddeterminanten i ulik risiko tyder disse studiene imidlertid ikke på. Når dietten til afroamerikanere (AA) ble sammenlignet med innfødte afrikanere (IA) var nemlig fiberinntaket det samme. AA spiste derimot mer protein, fett, kjøtt, mettet fett og kolesterol. Det var forskjell på pustepøver ved at AA hadde signifikant høyere innhold av hydrogen og lavere innhold av metan de har en annen bakterieflora. Celleproliferasjonen var nesten syv ganger høyere hos AA enn hos IA. I tillegg hadde AA mer 7-a dehydroxylerende bakterier og mindre lactobaciller. Insidensen blant AA er > 60 x insidensen blant IA⁸⁴.

En sammenligning mellom høyrisiko hvite sørafrikanere og lavrisiko svarte sørafrikanere viste at lavrisikogruppen kun spiste 43 % av anbefalt inntak av fiber. De hadde også lavere inntak av andre diettkomponenter som er tenkt å gi lavere risiko for kolorektalkreft; kalsium, A-vitamin, C-vitamin og folsyre.

Den moderne afrikanske dietten er ikke rik på fiber slik den var. I dag lever de fleste afrikanere på raffinert mais mel som inneholder lite fiber, men som inneholder en stor del resistent stivelse ⁸⁵.

Resistent stivelse unnslipper tynntarmen for så å brytes ned bakterielt i tykktarmen og det er sett at langvarig inntak av resistent stivelse hos voksende griser reduserer kryptocelle proliferasjon, reduserer skade på kolonocytterne og bedrer integriteten til tarmslimhinnen ⁸⁵, ⁷¹.

En prospektiv studie av adventister fant at inntak av belgfrukter var negativt assosiert med kolorektalkreft. Det er funnet at belgfrukter inneholder store mengder stivelse med høy konsentrasjon av amylose ⁸⁶. Maisstivelse med høyt innhold av amylose beskyttet tarmslimhinnen hos rotter som spiste mye rødt kjøtt ved å motvirke at slimhinnen ble tynnere (slik den ble i gruppen som ikke fikk maisstivelsen) ⁷¹. En studie av fekalvannsgenotoksisitet hos mus gitt ulike typer fiber, viste at de fibertypene som best økte mengden av lactobaciller og bifidobakterier i feces var de som var minst genotoksiske ⁵⁸. Resistent stivelse er substrat for bakteriell fermentering som gir bl.a. kortkjedede fettsyrer, f.eks. butyrat, som beskytter tykktarmen mot unormal cellepopulasjon ⁸⁶. Butyrat hemmer proliferasjon og induserer apoptose i tykktarmkreft cellelinjer ⁴⁹.

5.7 Flavonoider

Flavonoidene quercetin og myricetin beskytter CaCo-2 celler mot oksiderende skade in vitro ⁶¹. Flavonoider er en gruppe fenolisk forbindelse. Siden fenoliske forbindelser ikke absorberes fullstendig i tynntarmen men går videre til tykktarmen kan de beskytte mot oksidativ skade i tykktarmen ⁵². Matvarer som inneholder mye fenoliske forbindelser er frukt, grønnsaker, frø, nøtter, krydder og korn ⁵².

6. Konklusjon

Det er store forskjeller mellom individer, men fekalvann er generelt genotoksisk og induserer DNA-skader i CaCo-2 celler.

På grunn av det lave antallet personer i hver gruppe er det vanskelig å finne sammenhenger. Stor variasjonen mellom enkeltindivider reduserer sjansen for å finne forskjeller på tvers av studier. Det kan se ut som bearbeidet kjøtt induserer mer oksiderte pyrimidiner i CaCo-2 celler. I lys av den nye rapporten fra WCRF (World Cancer Research Fund) er det sannsynlig. Rødt kjøtt ser ikke ut til å indusere mer DNA-skade enn vegetarmat.

Økning i kreftrisiko fra ulike matvaner formidles til befolkningen i Norge og befolkninger i andre land. Det kan fort se ut til å være en selvmotsigelse et sted når levealder øker samtidig med advarsler om økt krefthyppighet.

Behandlingen, både medisineren og kirurgiske inngrep, samt at man har større mulighet til å oppdage kreften ved et tidligere tidspunkt enn før, gjør at flere overlever kreft og mange lever lenger med kreft ⁶.

På tross av de sparsomme resultatene tyder de fortsatt på at det ville være interessant å gå videre med studier av bearbeidet kjøtt og fekalvannsgenotoksisitet. Da studier har funnet at visse bearbeidede kjøttprodukter har sterkere sammenheng med kolorektalkreft enn andre ville det være nyttig å studere om inntak av forskjellige bearbeidede kjøttprodukter påvirker fekalvannsgenotoksisitet ulikt. Bacon, hamburger og pølser er i studier sett å ha sammenheng med kolorektalkreft. Senere studier kunne også inkludere matvarer med høy konsentrasjon av fenoliske forbindelser for å undersøke om disse kan senke en eventuell økt fekalvannsgenotoksisitet fra de nevnte kjøttvarene ovenfor.

7. Referanser

1. Stensvold I, Grotmol T, Glattre E. Tykkktarm- og endetarmkreft - utvikling fra 1956-1995: status i Telemark og i bydelene i Oslo og ny masseundersøkelse 1999. *Norsk Epidemiologi* 1998;8:37-43.
2. Cancer registry of Norway, Institute of Population-based Cancer Research. *Cancer in Norway 2004. 1-4-2006.*
Ref Type: Report
3. Bray F, Wibe A, Dorum LM, Moller B. [Epidemiology of colorectal cancer in Norway.]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2007;127:2682-2687.
4. Boyle P, Autier P, Bartelink H, Baselga J, Boffetta P, Burn J, Burns HJ, Christensen L, Denis L, Dicato M, Diehl V, Doll R, Franceschi S, Gillis CR, Gray N, Griciute L, Hackshaw A, Kasler M, Kogevinas M, Kvinnsland S, La VC, Levi F, McVie JG, Maisonneuve P, Martin-Moreno JM, Bishop JN, Oleari F, Perrin P, Quinn M, Richards M, Ringborg U, Scully C, Siracka E, Storm H, Tubiana M, Tursz T, Veronesi U, Wald N, Weber W, Zaridze DG, Zatonski W, zur HH. European Code Against Cancer and scientific justification: third version (2003). *Ann Oncol* 2003;14:973-1005.
5. Parkin DM. International variation. *Oncogene* 2004;23:6329-6340.
6. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. *Food, Nutrition, Physical Activity and the Prevention of Cancer: a Global Perspective.* 2007. Washington, AICR.
Ref Type: Report
7. Cassidy A, Bingham SA, Cummings JH. Starch intake and colorectal cancer risk: an international comparison. *Br J Cancer* 1994;69:937-942.
8. Norsk Gastrointestinal Cancer Gruppe. Forekomst, overlevelse og prevalens av kolorektalcancer. http://www.kreftsaken.no/dt_printarticle.asp?amid=751330

. 2007. 10-5-2006.

Ref Type: Electronic Citation

9. Blesch KS, Davis F, Kamath SK. A comparison of breast and colon cancer incidence rates among native Asian Indians, US immigrant Asian Indians, and whites. *J Am Diet Assoc* 1999;99:1275-1277.
10. Mohandas KM and Desai DC. Epidemiology of digestive tract cancers in India. V. Large and small bowel. *Indian journal of gastroenterology* 18[3], 118-121. 2007.
Ref Type: Abstract
11. Goh KL. Changing trends in gastrointestinal disease in the Asia-Pacific region. *J Dig Dis* 2007;8:179-185.
12. Sosial og helsedirektoratet. Utviklingen i norsk kosthold 2006. 2006. 15-11-2007.
Ref Type: Report
13. Meat Consumption: Per Capita. Earthtrends The Environmental Information Portal . 2007. World Resources Institute.
Ref Type: Electronic Citation
14. Linseisen J, Kesse E, Slimani N, Bueno-de-Mesquita HB, Ocke MC, Skeie G, Kumle M, Dorransoro IM, Morote GP, Janzon L, Stattin P, Welch AA, Spencer EA, Overvad K, Tjonneland A, Clavel-Chapelon F, Miller AB, Klipstein-Grobusch K, Lagiou P, Kalapothaki V, Masala G, Giurdanella MC, Norat T, Riboli E. Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: results from 24-hour dietary recalls. *Public Health Nutr* 2002;5:1243-1258.
15. Hogg N. Red meat and colon cancer: heme proteins and nitrite in the gut. A commentary on "diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract". *Free Radic Biol Med* 2007;43:1037-1039.
16. Oates PS, West AR. Heme in intestinal epithelial cell turnover, differentiation, detoxification, inflammation, carcinogenesis, absorption and motility. *World J Gastroenterol* 2006;12:4281-4295.

17. Sanjoaquin MA, Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJ. Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom. *Br J Cancer* 2004;90:118-121.
18. Kimura Y, Kono S, Toyomura K, Nagano J, Mizoue T, Moore MA, Mibu R, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, Ikejiri K, Futami K, Yasunami Y, Maekawa T, Takenaka K, Ichimiya H, Imaizumi N. Meat, fish and fat intake in relation to subsite-specific risk of colorectal cancer: The Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci* 2007;98:590-597.
19. Gonzalez CA. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr* 2006;9:124-126.
20. Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: where we are, where we are going. *Nutr Cancer* 2006;56:225-231.
21. Wakai K, Hirose K, Matsuo K, Ito H, Kuriki K, Suzuki T, Kato T, Hirai T, Kanemitsu Y, Tajima K. Dietary risk factors for colon and rectal cancers: a comparative case-control study. *J Epidemiol* 2006;16:125-135.
22. Johnson IT, Lund EK. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:161-181.
23. McCullough ML, Robertson AS, Chao A, Jacobs EJ, Stampfer MJ, Jacobs DR, Diver WR, Calle EE, Thun MJ. A prospective study of whole grains, fruits, vegetables and colon cancer risk. *Cancer Causes Control* 2003;14:959-970.
24. International Agency for Research on Cancer. Eat less meat, more fish! 15-6-2005.
25. Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der MR. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Res* 1999;59:5704-5709.

26. Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der MR. Red meat and colon cancer: dietary haem, but not fat, has cytotoxic and hyperproliferative effects on rat colonic epithelium. *Carcinogenesis* 2000;21:1909-1915.
27. Pierre F, Freeman A, Tache S, Van der MR, Corpet DE. Beef meat and blood sausage promote the formation of azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colons. *J Nutr* 2004;134:2711-2716.
28. Pierre F, Peiro G, Tache S, Cross AJ, Bingham SA, Gasc N, Gottardi G, Corpet DE, Gueraud F. New marker of colon cancer risk associated with heme intake: 1,4-dihydroxynonane mercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2274-2279.
29. Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006;66:1859-1865.
30. Bingham SA, Hughes R, Cross AJ. Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response. *J Nutr* 2002;132:3522S-3525S.
31. Kuhnle GG, Story GW, Reda T, Mani AR, Moore KP, Lunn JC, Bingham SA. Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1040-1047.
32. Jakszyn P, Bingham S, Pera G, Agudo A, Luben R, Welch A, Boeing H, Del GG, Palli D, Saieva C, Krogh V, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Berglund G, Siman H, Hallmans G, Sanchez MJ, Larranaga N, Barricarte A, Chirlaque MD, Quiros JR, Key TJ, Allen N, Lund E, Carneiro F, Linseisen J, Nagel G, Overvad K, Tjonneland A, Olsen A, Bueno-de-Mesquita HB, Ocke MO, Peeters PH, Numans ME, Clavel-Chapelon F, Trichopoulou A, Fenger C, Stenling R, Ferrari P, Jenab M, Norat T, Riboli E, Gonzalez CA. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* 2006;27:1497-1501.

-
33. Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res* 2003;63:2358-2360.
 34. Cross AJ, Greetham HL, Pollock JR, Rowland IR, Bingham SA. Variability in fecal water genotoxicity, determined using the Comet assay, is independent of endogenous N-nitroso compound formation attributed to red meat consumption. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:179-184.
 35. Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005;293:172-182.
 36. Ward MH, Cross AJ, Divan H, Kulldorff M, Nowell-Kadlubar S, Kadlubar FF, Sinha R. Processed meat intake, CYP2A6 activity and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 2007;28:1210-1216.
 37. Binderup ML, Knudsen LE. Genotoksikologi. In Midtgård U, Simonsen L, Knudsen LE, editors. *Toksikologi i arbejdsmiljøet, bind 2 (basisbog)*. København: Arbejdsmiljøinstituttet, 1999:9-62.
 38. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249-261.
 39. Møller P. Måling av DNA-skader med comet-metoden. *Dansk kemi* 2005;86:14-16.
 40. Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen* 1997;30:139-146.
 41. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 1996;104 Suppl 3:465-469.
 42. Collins AR, Dusinska M, Horska A. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 2001;48:611-614.

43. Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 1996;24:634-642.
44. Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 1997;390:141-151.
45. Collins. 2007.
Ref Type: Personal Communication
46. Bony S, Carcelen M, Olivier L, Devaux A. Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the Comet assay. *Toxicol Lett* 2006;166:67-76.
47. Aherne SA, Kerry JP, O'Brien NM. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *Br J Nutr* 2007;97:321-328.
48. Azqueta A, Arbillaga L, Pachon G, Cascante M, Creppy EE, Lopez de CA. A quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative induces DNA oxidative damage not attenuated by vitamin C and E treatment. *Chem Biol Interact* 2007;168:95-105.
49. Fassler C, Gill CI, Arrigoni E, Rowland I, Amado R. Fermentation of resistant starches: influence of in vitro models on colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2007;58:85-92.
50. Venturi M, Hambly RJ, Glinghammar B, Rafter JJ, Rowland IR. Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay. *Carcinogenesis* 1997;18:2353-2359.
51. Osswald K, Becker TW, Grimm M, Jahreis G, Pool-Zobel BL. Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res* 2000;472:59-70.

-
52. Jenner AM, Rafter J, Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 2005;38:763-772.
 53. Oberreuther-Moschner DL, Jahreis G, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr* 2004;91:925-932.
 54. Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C. A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis* 1999;20:2311-2316.
 55. Klinder A, Forster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer* 2004;49:144-155.
 56. Lee YK, Hao W, Ho PS, Nordling MM, Low CS, de Kok TM, Rafter J. Human fecal water modifies adhesion of intestinal bacteria to Caco-2 cells. *Nutr Cancer* 2005;52:35-42.
 57. Hughes R, Pollock JR, Bingham S. Effect of vegetables, tea, and soy on endogenous N-nitrosation, fecal ammonia, and fecal water genotoxicity during a high red meat diet in humans. *Nutr Cancer* 2002;42:70-77.
 58. Yeh SL, Lin MS, Chen HL. Inhibitory Effects of a Soluble Dietary Fiber from *Amorphophallus konjac* on Cytotoxicity and DNA Damage Induced by Fecal Water in Caco-2 Cells. *Planta Med* 2007.
 59. Young JF, Duthie SJ, Milne L, Christensen LP, Duthie GG, Bestwick CS. Biphasic effect of faltarinol on caco-2 cell proliferation, DNA damage, and apoptosis. *J Agric Food Chem* 2007;55:618-623.
 60. Visanji JM, Duthie SJ, Pirie L, Thompson DG, Padfield PJ. Dietary isothiocyanates inhibit Caco-2 cell proliferation and induce G2/M phase cell cycle arrest, DNA damage, and G2/M checkpoint activation. *J Nutr* 2004;134:3121-3126.

61. Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999;38:28-34.
62. McKinnon PJ, Caldecott KW. DNA Strand Break Repair and Human Genetic Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2007;8:37-55.
63. Azqueta Oscoz Amaia. 2007.
Ref Type: Personal Communication
64. Kazimirova A, Barancokova M, Volkovova K, Staruchova M, Krajcovicova-Kudlackova M, Wsolova L, Collins AR, Dusinska M. Does a vegetarian diet influence genomic stability? *Eur J Nutr* 2004;43:32-38.
65. Arabski M, Klupinska G, Chojnacki J, Kazmierczak P, Wisniewska-Jarosinska M, Drzewoski J, Blasiak J. DNA damage and repair in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa cells. *Mutat Res* 2005;570:129-135.
66. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 1998;148:761-774.
67. Larsson SC, Rafter J, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: the Swedish Mammography Cohort. *Int J Cancer* 2005;113:829-834.
68. Hu J, Morrison H, Mery L, DesMeules M, Macleod M. Diet and vitamin or mineral supplementation and risk of colon cancer by subsite in Canada. *Eur J Cancer Prev* 2007;16:275-291.
69. Doyle VC. Nutrition and colorectal cancer risk: a literature review. *Gastroenterol Nurs* 2007;30:178-182.
70. Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:439-446.
71. Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA. High red meat diets induce greater numbers of colonic DNA double-strand breaks than white meat in rats:

attenuation by high-amylose maize starch. *Carcinogenesis* 2007;28:2355-2362.

72. Tappel A. Heme of consumed red meat can act as a catalyst of oxidative damage and could initiate colon, breast and prostate cancers, heart disease and other diseases. *Med Hypotheses* 2007;68:562-564.
73. Femia AP, Caderni G, Bottini C, Salvadori M, Dolara P, Tessitore L. Mucin-depleted foci are modulated by dietary treatments and show deregulation of proliferative activity in carcinogen-treated rodents. *Int J Cancer* 2007;120:2301-2305.
74. Femia AP, Caderni G, Bottini C, Salvadori M, Dolara P, Tessitore L. Mucin-depleted foci are modulated by dietary treatments and show deregulation of proliferative activity in carcinogen-treated rodents. *Int J Cancer* 2007;120:2301-2305.
75. Pierre F, Tache S, Petit CR, Van der MR, Corpet DE. Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats. *Carcinogenesis* 2003;24:1683-1690.
76. Soreide K. [Genetics and molecular classification of colorectal cancer.]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2007;127:2818-2823.
77. Thiis-Evensen. Forebygging av kolorektal cancer. *Tidsskr.Nor Laegeforen*. 121[9], 1112. 2001.
78. Gaard Maria, Tretli Steinar, and Løken Elin B. Dietary factors and risk of colon cancer: a prospective study of 50,535 young norwegian men and women. 1996.
Ref Type: Thesis/Dissertation
79. Sinha R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB. Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* 2005;65:8034-8041.

80. Tricker AR. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *Eur J Cancer Prev* 1997;6:226-268.
81. Mirvish SS, Haorah J, Zhou L, Clapper ML, Harrison KL, Povey AC. Total N-nitroso compounds and their precursors in hot dogs and in the gastrointestinal tract and feces of rats and mice: possible etiologic agents for colon cancer. *J Nutr* 2002;132:3526S-3529S.
82. Glei M, Klenow S, Sauer J, Wegewitz U, Richter K, Pool-Zobel BL. Hemoglobin and hemin induce DNA damage in human colon tumor cells HT29 clone 19A and in primary human colonocytes. *Mutat Res* 2006;594:162-171.
83. Peters U, Sinha R, Chatterjee N, Subar AF, Ziegler RG, Kulldorff M, Bresalier R, Weissfeld JL, Flood A, Schatzkin A, Hayes RB. Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 2003;361:1491-1495.
84. O'Keefe SJ, Chung D, Mahmoud N, Sepulveda AR, Manafe M, Arch J, Adada H, van der MT. Why do African Americans get more colon cancer than Native Africans? *J Nutr* 2007;137:175S-182S.
85. Nofrarias M, Martinez-Puig D, Pujols J, Majo N, Perez JF. Long-term intake of resistant starch improves colonic mucosal integrity and reduces gut apoptosis and blood immune cells. *Nutrition* 2007;23:861-870.
86. Rochfort S, Panozzo J. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J Agric Food Chem* 2007;55:7981-7994.