

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VYUŽITÍ COMET ASSAY V KLINICKÉ PRAXI

TEREZA VOJTĚCHOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. MONIKA KUCHAROVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi pomohly při zpracování této práce a za její vstřícný přístup při konzultacích. Celé své rodině a přátelům děkuji za podporu během celého studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 11. 5. 2020

Tereza Vojtěchová

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. KOMETOVÁ ANALÝZA.....	6
2.1 Historie.....	7
2.2 Modifikace kometové analýzy	7
2.2.1 Alkalická jednobuněčná gelová elektroforéza.....	7
2.2.2 Neutrální jednobuněčná gelová elektroforéza.....	8
2.2.3 Použití enzymů specifických pro lézi.....	8
2.2.4 Méně obvyklé varianty.....	8
2.3 Metodika kometové analýzy	9
2.4 Hodnocení kometové analýzy	10
2.5 Oxidační stres	11
2.5.1 Volné radikály a jiné reaktivní částice	11
2.5.2 Oxidační poškození DNA.....	12
3. VYUŽITÍ COMET ASSAY V KLINICKÉ PRAXI	13
3.1 Kometová analýza a oxidační poškození u neurodegenerativních onemocnění...13	
3.2 Kometová analýza a oxidační poškození u kardiovaskulárních onemocnění	17
3.3 Kometová analýza a oxidační poškození u pacientů s diabetes mellitus	20
3.4 Kometová analýza a oxidační poškození u těžce nemocných pacientů	27
3.5 Kometová analýza a oxidační poškození u pacientů s nádorovým onemocněním 31	
4. ZÁVĚR.....	37
5. SEZNAM ZKRATEK	38
6. SEZNAM OBRÁZKŮ	40
7. SEZNAM TABULEK.....	41
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	42

1. ÚVOD

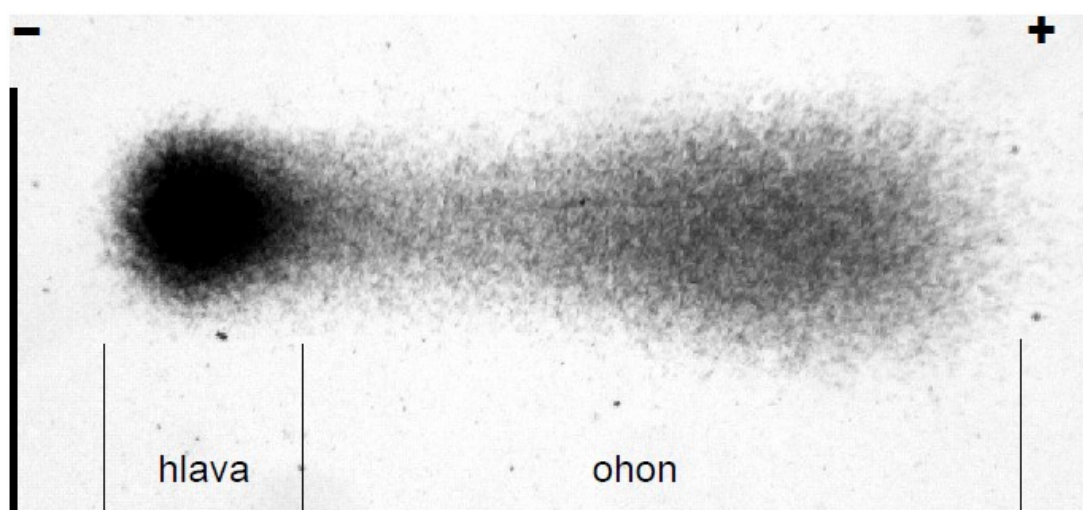
Kometová analýza neboli jednobuněčná gelová elektroforéza je citlivá, rychlá, relativně jednoduchá a levná metoda, která byla poprvé představena v roce 1978 Rydbergem a Johansonem. Metoda slouží pro zkoumání poškození a opravy DNA v jednotlivých buňkách. Principem metody je separace zlomených DNA řetězců pod vlivem elektrického pole, které následně vytvoří „kometu“ s hlavou, která zahrnuje nepoškozenou DNA, a ocasem, který se skládá z poškozených kusů DNA.

Citlivost a specifčnost analýzy jsou značně zlepšeny, pokud se DNA inkubuje pomocí enzymu, který rozpozná specifický druh poškození DNA. Toto poškození indukované oxidačním stresem hraje klíčovou roli u mnoha onemocnění a také u stárnutí.

Tato práce je přehledem možného použití kometového testu v některých patologických stavech v klinické praxi. Užitečná aplikace testu byla prokázána u pacientů s neurodegenerativním onemocněním, kardiovaskulárním onemocněním či diabetem mellitem. Jen několik studií bylo publikováno na využití kometového testu u těžce nemocných pacientů. Studie pacientů s nádorovým onemocněním se týká hodnocení reakce organismu na chemoterapii nebo radioterapii se statisticky významným prokázáním poškození DNA.

2. KOMETOVÁ ANALÝZA

Kometová analýza (comet assay) neboli jednobuněčná gelová elektroforéza (SCGE, single-cell gel electrophoresis) je široce rozšířená metoda, která slouží k hodnocení poškození DNA (Collins, 2004). Princip analýzy je založen na separaci zlomených DNA řetězců pod vlivem elektrického pole podle náboje a velikosti řetězců. Po oddělení neporušená DNA zůstává v hlavě komety, zatímco jedno- a dvouvláknové porušené DNA fragmenty migrují do ocasu komety (**obr.1**) (Simon et al., 2012).



Obrázek 1 Buňka inkubovaná s alkaloidem chelerytrinem a obarvená stříbřením. Na obrázku je vyznačena pozice a polarita elektrod při elektroforéze (převzato z Dvořák et al., 2008).

Kometová analýza má mnoho výhod a předností. Jedná se o levnou a jednu z nejcitlivějších technik. Analýzu lze použít u všech typů buněk včetně spermií. Stačí malé množství vzorku, provedení je snadné a nevyžaduje speciální vybavení. Tato metoda je použitelná jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu. Navzdory tomu má i některé nevýhody. Jendou z nich je například to, že analýza není schopná detekovat malé DNA fragmenty (menší než 50 kb), protože jsou většinou vymyty během lýzy a elektroforézy. Tento test také nedokáže detekovat poškození spojené s mitochondriální DNA, které je také příliš malé. Další nevýhodou testu je, že postrádá standardizované protokoly, což ztěžuje vzájemné porovnávání výsledků různých výzkumných skupin, a způsobuje nesnadnou interpretaci výsledků, protože neexistuje jednoduchý vztah mezi úrovní poškození a jeho biologickým dopadem (Shukla, 2018).

Kometový test se nejčastěji aplikuje na zvířecí buňky. Nicméně byly také vyvinuty metody pro zkoumání poškození DNA rostlinných buněk.(Collins, 2004)

2.1 Historie

V roce 1976 vydal Peter Cook článek, ve kterém se zaměřil na výzkum struktury nukleové kyseliny uvolněné z buňky na základě lýzy neoionickým detergentem. Tento postup slouží k odstranění membrán, cytoplazmy a nukleoplazmy a narušuje nukleozomy a téměř všechny histony, které se rozpouštějí v prostředí s vysokou koncentrací soli. Zbývá struktura je nukleoid složený z jaderné matrice složené z ribonukleové kyseliny (RNA) a proteinů a DNA. Cook navrhl model DNA, která se pravidelně připojuje k matici, takže je uspořádaná spíše jako série smyček než lineární molekula. Když bylo vinutí uvolněno přidáním interkalačního činidla (např. ethidium-bromidu), smyčky nukleoidu se uvolnily a vytvořily „halo (svatozář)“. Podobné účinky byly viděny, když se k uvolnění smyček použilo ionizující záření (Cook et al., 1976).

V roce 1978 byl proveden Rydbergem a Johansonem první pokus o kvantifikaci zlomů řetězce DNA, a to s buňkami, které byly zapuštěny do agarózy na sklíčkách a lyzovány za mírných alkalických podmínek (Piperakis, 2009).

V roce 1984 Ostling a Johanson vyvinuli test komety neboli SCGE. Jednalo se o analýzu, při které byla prováděna elektroforéza za neutrálních podmínek. Zbarvení DNA se provedlo akridinovou oranží. Získaný snímek vypadal jako „kometa“ s výraznou hlavou, která zahrnovala neporušenou DNA, a ocasem, který se skládal z poškozených nebo polámaných kusů DNA. Podle tohoto vznikl název „comet assay“. Výhodou této metody je žádné radioaktivní značení a potřeba malého množství buněk. (Piperakis, 2009)

2.2 Modifikace kometové analýzy

V současné době se používají tyto základní modifikace kometové analýzy:

2.2.1 Alkalická jednobuněčná gelová elektroforéza

Alkalická SCGE je prováděna při vysokém pH (>13). Tato modifikace je jednoduchou a citlivou metodou pro měření oxidativního poškození DNA a je optimální verzí pro hodnocení účinku látek s genotoxickou aktivitou. Analýza je schopna detekovat jednovláknové zlomy (SSB, single - strand breaks), dvouvláknové zlomy (DSB, double - strand breaks) a alkalicky labilní místa v DNA (Pu et al., 2015).

2.2.2 Neutrální jednobuněčná gelová elektroforéza

Tato varianta je v podstatě stejná jako výše zmiňovaná alkalická, ale buňky jsou lyzovány při nižším pH a elektroforéza probíhá buď v Tris-borát-EDTA pufru, nebo Tris acetát pufru při pH 8-9 (Hartley et al., 2011).

2.2.3 Použití enzymů specifických pro lézi

Při vzniku zlomů v řetězcích DNA se vyskytují tzv. AP místa (apurinové nebo apyrimidinové místo), která neobsahují žádné báze, jsou alkalicky labilní a při vysokém pH jsou přeměněna na zlomy v řetězcích (Dvořák et al. 2008). Aby byla tato analýza více specifická a také i citlivá, byl do postupu zaveden krok inkubace nukleoidů se specifickým enzymem, který rozpozná konkrétní druh poškození a vytvoří zlom. Endonukleáza III (Endo III) se používá k detekci oxidovaných pyrimidinů, formamidopyrimidin DNA glykosyláza (FPG) k detekci hlavního produktu oxidace purinů 8-oxoguaninu (8-oxoG) a dalších pozměněných purinů, T4 endonukleáza V k rozpoznání UV světlem indukovaných cyklobutanových pyrimidinových dimerů (Collins, 2004, Dvořák et al., 2008).

2.2.4 Méně obvyklé varianty

2.2.4.1 Detekce replikační DNA pomocí značení bromodeoxyuridem

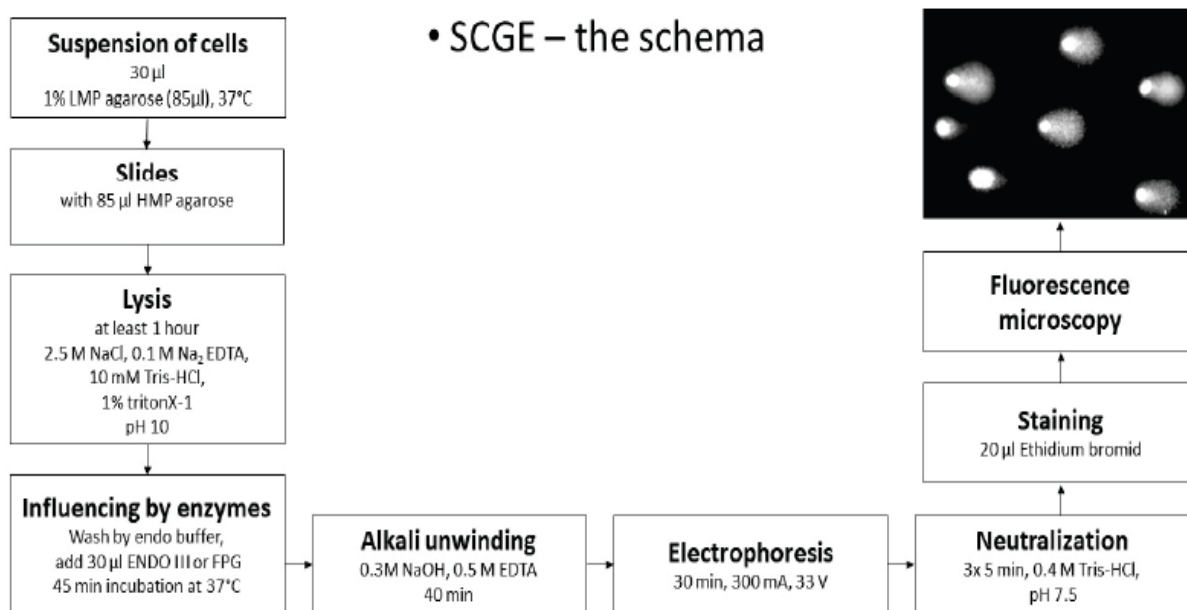
Dalo by se očekávat, že poruchy DNA spojené s replikací DNA dávají vzniknout ocasům komet. Většinou však není možné tímto způsobem odlišit S – fáze od non – S – fázových buněk. Důvodem může být velmi malé množství DNA podílející se na replikaci v jednom okamžiku. Pokud jsou buňky označené během replikace pomocí BUdR (bromodeoxyuridin), který je poté vizualizován pomocí anti-BUdR protilátek, označené kometové ocasy jsou viditelné (Collins, 2004).

2.2.4.2 FISH v kombinaci s kometovou analýzou

Pomocí samotné kometové analýzy je možné sledovat pouze celkové poškození DNA. Kombinací FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a kometového testu je možné analyzovat poškození a opravy různých genů, chromozomů nebo částí chromozomů (centromera, telomery, raménka). FISH v kombinaci s MN (mikronukleárním) testem je schopen charakterizovat výskyt různých chromozomů v mikrojádru (MN) a identifikovat

potenciální chromozomální cíle mutagenních látek. Ať už kombinace FISH s kometovou analýzou nebo MN testem, obojí se ukázalo jako slibná technika pro hodnocení rozložení poškození DNA a chromozomů v celém genomu jednotlivých buněk. Technika FISH také umožňuje studii tvorby komet a MN, což je nezbytné pro správné použití těchto metod (Hovhannisyan, 2010).

2.3 Metodika kometové analýzy



Obrázek 2 Schéma kometové analýzy (převzato z Kuchařová et al., 2019).

Nejprve se připraví pufrы – ELFO (elektroforetický) pufr, lyzační pufr a PBS (phosphate buffered saline = fosfátem pufrovaný solný roztok). Následuje příprava agaróz – 1 % HMP v PBS (high melting point = agaróza s vysokým bodem tání), 1 % LMP v PBS (low melting point = agaróza s nízkým bodem tání). V testu se používá ještě NMP (normal melting point = agaróza s normální bodem tání), kterou se potahují podložní skla. Dalším bodem postupu je příprava gelů na mikroskopické sklíčko, kdy je třeba si agarózy plně rozvařit. LMP se přemístí do vodní lázně (37 °C) a nechá se zchladnout. Mezitím se připraví HMP agaróza na sklíčko potažené NMP.

Následuje izolace lymfocytů z plné krve, kdy se na LSM (lymphocyte separation medium) navrství krev, provede se stočení, odebere se vytvořený lymfocytární prsteneček, k němu se přidá PBS a provede se další stočení. Následuje slití, rozsuspendování peletu

v 10ml PBS, odebrání vzorku k počítání buněk v Bürkerově komůrce a znovu stočení. Po dotočení následuje znovu slítí a přidá se PBS, aby se dosáhlo koncentrace 1mol/1ml, která se používá pro další analýzu (Fikrová et al., 2011).

V dalším kroku dochází k lýze buněk pomocí lyzačního roztoku s detergentem, který obsahuje vysokou koncentraci soli, což umožňuje odstranění buněčné membrány, proteinů, cytoplazmy a nukleoplazmy (Shukla, 2018).

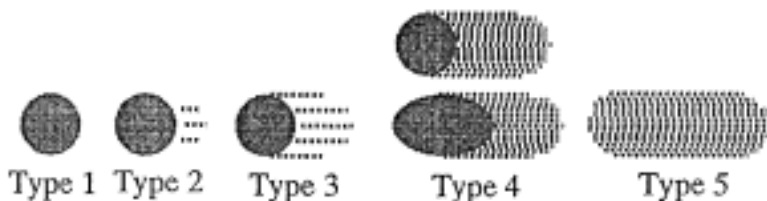
Následuje uvolnění DNA, poté elektroforéza, kdy se k tanku připojí elektrický zdroj. Zde je poškozená DNA přitáhnutá směrem k anodě, čímž vznikne ocas komety (Bajpayee et al., 2005).

Po elektroforéze se provede neutralizace propláchnutím neutralizačním pufrům s následným propláchnutím redestilovanou vodou. K barvení sklíček se využívá jakékoliv jedno z DNA barviv (Ethidium Bromid, Propidium Iodide, DAPI nebo YOYO) s tím, že při kometové analýze se nejčastěji využívá Ethidium Bromid. Jedná se o interkalační barvivo, které se váže efektivněji na dvouvláknovou DNA než na jednovláknovou DNA (**obr. 2**) (Kumaravel et al., 2009).

2.4 Hodnocení kometové analýzy

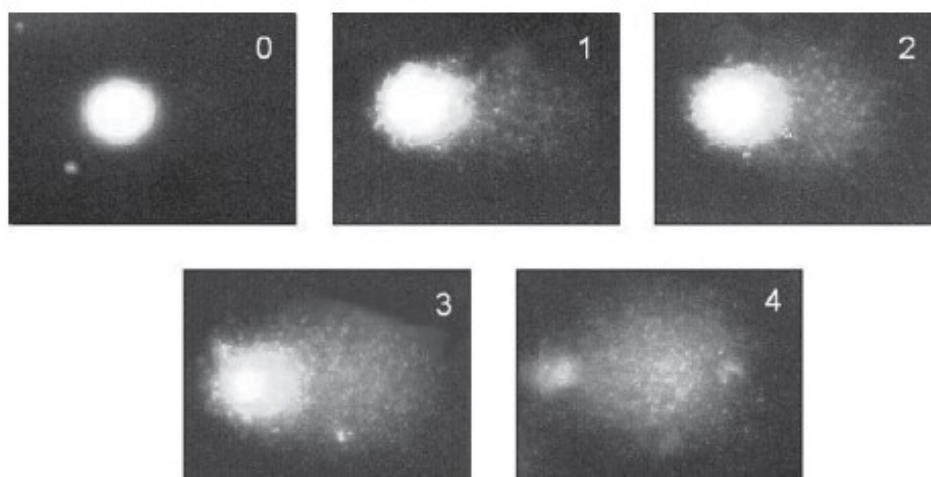
Vyhodnocování komet můžeme provádět buď vizuálně (tzv. „visual scoring“), nebo speciálním počítačovým softwarem pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Jednou metodou je kategorizace komet dle Kobayashiho. Ta rozděluje komety do kategorií 1-5 (**obr. 3**) (Kumaravel et al., 2009).



Obrázek 3 Kategorizace komet dle Kobayashiho (převzato z Collins, 2004).

Další metodu vizuálního hodnocení publikoval v roce 1995 Collins se spolupracovníky. Jejich systém klasifikuje komety do kategorií 0-4 podle míry poškození (**obr. 4**). Vyšší číslo znamená větší poškození (Collins, 2004).



Obrázek 4 Kategorizace komet dle Collinse (převzato z Collins, 2004).

Co se týče počítačových softwarů, na výběr je jich celá řada, ať už komerčních či freeware programů, které lze zdarma stáhnout z internetu. Počítačová analýza může být buď poloautomatizovaná, kdy je gel naskenován a komety jsou pro analýzu vybrány operátorem, nebo automatizovaná, bez zapojení operátora ve výběru komet. Výhodou počítačového hodnocení oproti vizuálnímu hodnocení je, že počítač dokáže změřit hned několik parametrů. Nevýhodou může být přítomnost překrývajících se komet, které nejsou počítačem rozpoznány jako různé, ale lze je hodnotit manuálně (Azqueta et al., 2011). Při hodnocení komet se používá mnoho parametrů. Těmi nejpoužívanějšími jsou délka ocasu (tail length), procentuální zastoupení DNA v ocasu (% tail DNA) a tail moment (Shukla, 2018). Zde je nutné nezaměnit tail moment a OTM (Olive tail moment). Tail moment je definován jako % tail DNA x tail length, tedy procenta DNA v ocasu násobená délkou ocasu. OTM je definován jako % tail DNA x (tail mean X – head mean X), tedy procenta DNA v ocasu násobená vzdáleností mezi těžišti DNA v ocasu a hlavě (Mozaffarieh et al., 2008).

2.5 Oxidační stres

2.5.1 Volné radikály a jiné reaktivní částice

Oxidační stres je spojen s mnoha lidskými nemocemi. V živé buňce je obvykle rovnováha mezi produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a antioxidanty. Tato dynamická rovnováha poskytuje určitý ustálený stav ROS. V určitých situacích může být tato rovnováha však narušena (Lushchak, 2015). Narušení této

rovnováhy je definováno jako oxidační stres. Endogenním zdrojem reaktivních forem kyslíku přispívajících ke specifickému oxidačnímu poškození DNA je normální buněčný metabolismus a jsou detekovány v tkáních za fyziologických podmínek. Nicméně, mohou však být také produktem patologických procesů (Kuchařová et al., 2019).

ROS jsou malé molekuly odvozené z molekul kyslíku. Mezi ROS patří jak volné radikály, tak neradikálové částice. Volný radikál můžeme definovat jako jakoukoliv chemickou látku, která obsahuje alespoň jeden nepárový elektron. Tyto radikály se tvoří ve velkém množství jako vedlejší produkt mnoha biochemických procesů a v některých případech záměrně (Betteridge, 2000). Mezi volné radikály můžeme řadit například superoxid (O_2^-), nejčastější ROS, dále hydroxylový radikál (OH^\cdot), nejreaktivnější a nejnebezpečnější radikál, který může být tvořen ze superoxidového aniontu a H_2O_2 anebo pak peroxy (ROO^\cdot). Neradikálové částice jsou například ozon (O_3), singletový kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2) či kyselina chlorná ($HClO$). Hladiny ROS se mohou dramaticky zvýšit například po vystavení teplu, UV záření či ionizujícímu záření. Při vysokých koncentracích ROS snadno reagují s lipidy, proteiny, sacharidy a nukleovými kyselinami (Ozcan et al., 2015). Nadměrné množství ROS je kontrolováno a odstraňováno z buněk superoxidovou mutací, katalázou (CAT), glutathion peroxidázou (G-Px) a antioxidanty o nízké molekulové hmotnosti, jako jsou vitamin C, E, glutathion a kyselina močová. Nejdůležitější místo původu ROS v buňkách se nachází v mitochondriích, kde vznikají v důsledku aerobního metabolismu. Dále mohou být ROS generovány určitými enzymovými aktivitami, jsou uvolňovány z fagocytárních buněk, určených k ničení buněk infikovaných viry nebo bakteriemi. Místem jejich původu mohou být i metabolické procesy jako β -oxidace mastných kyselin v peroxizomech. Co se týče exogenních zdrojů, těmi mohou být radiace, znečištěné ovzduší, tabákový kouř nebo široká škála chemických látek (Loft et al., 2008).

Podobně důležité jako ROS jsou také reaktivní formy dusíků (RNS, reactive nitrogen species), které zahrnují třeba oxid dusnatý (NO), oxid dusičitý (NO_2) či peroxyinitrit ($ONOO^-$) (Martínez et al., 2009).

2.5.2 Oxidační poškození DNA

Oxidační poškození DNA vzniká při tvorbě ROS v buňkách normálním aerobním metabolismem nebo exogenními zdroji, jako je ionizující záření nebo karcinogenní sloučeniny, a tento typ poškození v buňkách se implikuje na mutagenезi, karcinogenезi

a stárnutí (Dizdaroglu, 1999). Oxidační poškození DNA významně přispívá k vývoji rakoviny související s věkem. Látky, které snižují oxidační poškození, by tak měly snižovat riziko vzniku rakoviny. Jedná se tedy o „biomarker“ pro identifikaci osob s rizikem vývoje rakoviny (Halliwell, 2000).

Při oxidačním stresu je napadán přednostně guanin, protože má nejnižší oxidační potenciál v porovnání s ostatními čtyřmi bázemi. Guanin obsahuje elektronově bohatou purinovou strukturu, která mu umožňuje snadno reagovat s radikály. Oxidace guaninu má za následek tvorbu 8-oxoguaninu, respektive odpovídajícího nukleotidu 8 - hydroxy - 2 - deoxyguanosinu (8 - OHdG) (Kim et al., 2004). 8 - OHdG, respektive 8 - oxoG je vhodným markerem oxidačního stresu a používá se k měření míry endogenního oxidačního poškození DNA. Tato léze je hlavním mutagenním poškozením DNA, ale reparačními mechanismy je kontinuálně opravována. Závažnější jsou však sekundární DNA léze, které vznikají reakcí 8-oxoG s peroxynitritem (Henderson et al., 2005).

Oxidační poškození DNA v buňkách a tkáních lze měřit plynovou chromatografií (GC) a hmotnostní spektrometrií (MS), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s elektrochemickou detekcí nebo MS/MS (tandem MS) detekcí nebo imunoanalýzou. Mezi základní metodiky používané pro detekci DNA poškození patří také kometová analýza (Kuchařová et al., 2019).

Oprava poškozených úseků DNA je zaručeně důležitým prvkem obrany před mutagenezí. Ve většině případů jsou oxidačně poškozené DNA chráněny větším množstvím násobných a překrývajících se procesů opravy. Poškozené báze se nejčastěji odstraňují dvěma mechanismy – BER (base excision repair) – zahrnuje vystřížení jednotlivých poškozených bází glykosylázou a NER (nucleotide excision repair) – složitější komplex, zahrnující vystřížení oligonukleotidu s poškozenou bází (Cooke et al., 2003).

3. VYUŽITÍ COMET ASSAY V KLINICKÉ PRAXI

3.1 Kometová analýza a oxidační poškození u neurodegenerativních onemocnění

Termín neurodegenerativní onemocnění popisuje řadu dědičných a sporadických stavů, které jsou charakterizovány progresivní dysfunkcí nervového systému vyplývající z degenerace vybraných neuronů v lidském mozku nebo míše. Mezi první příznaky patří

třeba problémy s koordinací nebo zapamatováním jmen. Příznaky se však postupně zhoršují a mnohé z těchto nemocí mohou být fatální. Mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění patří Alzheimerova choroba (AD), Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba (PD) či amyotrofická laterální skleróza, známá též jako Lou Gehrigova choroba či onemocnění motoneuronu (Coppedè et al. 2014). V patofyziologiích všech těchto nemocí najdeme oxidační stres, který se zde především projevuje peroxidací lipidů, což může podporovat tvorbu dalších ROS a zvyšovat oxidační poškození proteinů a DNA (Kuchařová et al., 2019).

Kadioglu et al. (2004) studovali patofyziologickou roli ROS u pacientů s AD. Sledovali hladiny oxidačního poškození v lymfocytech periferní krve (PBL, peripheral blood lymphocytes) u 24 pacientů s AD pomocí kometového za použití specifických enzymů (Endo III pro detekci oxidovaných pyrimidinů, FPG pro oxidované puriny). Vzorky krve pacientů porovnávali s kontrolními vzorky věkově srovnatelné skupiny 21 lidí. V žádné buňce v této studii nebyla migrace kompletní a každá ze 100 buněk hodnocených ze vzorku krve každého pacienta byla přiřazena do jedné ze třech kategorií. V první kategorii byly buňky bez migrace, ve druhé byly s nízkou migrací a ve třetí byly s vysokou migrací v závislosti na části DNA vtažené do ocasu komety pod vlivem elektrického pole. Celkové skóre komety (TCS) bylo vypočteno následujícím způsobem.

$$TCS = 0 \times \text{počet komet v první kategorii} + 1 \times \text{počet ve druhé kategorii} \\ + 2 \times \text{počet komet ve třetí kategorii}$$

Bylo prokázáno, že AD je spojena se zvýšenou hladinou bazálních hladin SSB a alkalicky labilních míst v PBL (TCS - $16,7 \pm 4,55$) v porovnání s kontrolními vzorky (TCS - $13,0 \pm 2,7$). Tím, že v kometové analýze bylo zahrnuto i použití Endo III a FPG, došlo k odhalení dalších míst poškození u pacientů i kontrolních vzorků. V případě Endo III bylo zjištěno výrazné zvýšení v průměrném celkovém skóre komet u pacientů s AD ($36,1 \pm 6,9$) v porovnání s kontrolními vzorky ($14,6 \pm 2,6$). V případě FPG zde bylo také evidováno významné zvýšení v průměrném celkovém skóre komet u pacientů s AD ($31,33 \pm 7,27$) v porovnání s kontrolními vzorky ($14,43 \pm 2,5$) (Kadioglu et al., 2004). Nunomura et al. (2001) zaznamenali významné zvýšení hladin 8OHG (8 - hydroxyguanosin) a oxidované aminokyseliny (nitrotyrosin) v neuronech pacientů s AD a bylo konstatováno, že zvýšené oxidační poškození je časnou příhodou AD, které klesá s progresí onemocnění (Nunomura et al., 2001). Lyras et al. (1997) rovněž prokázali zvýšené oxidační poškození proteinů a DNA v mozku pacientů s AD měřením produktů

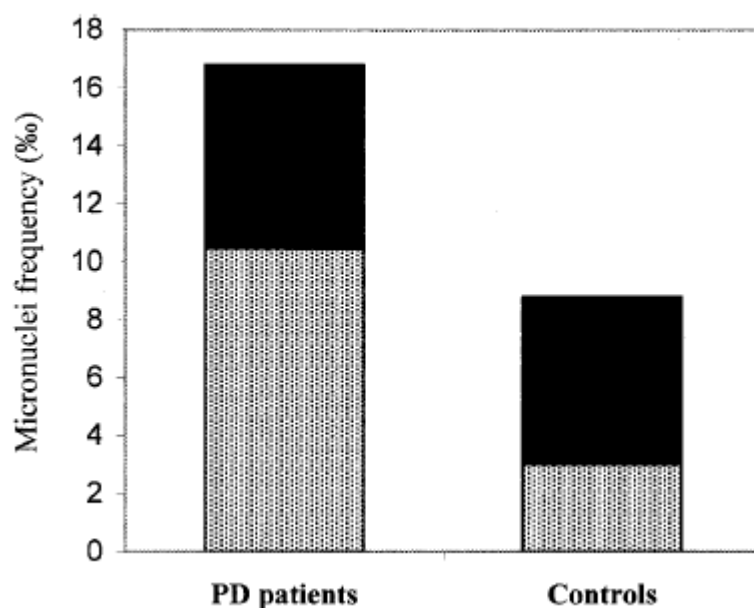
poškození čtyř DNA bází plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Lyras et al., 1997).

Petrozzi et al. (2002) zkoumali přítomnost cytogenetických změn v lymfocytech periferní krve u pacientů s AD a PD. Cytogenetické vyšetření bylo provedeno u 22 pacientů s AD, 18 pacientů s PD a 20 kontrolních vzorků. Pro zjištění přítomnosti poškozených chromozomů byl použit MN test spolu s FISH technikou. MN jsou chromatinové struktury snadno viditelné v cytoplazmě mezifázových binukleárních buněk. FISH technika zde umožnila rozlišení mezi MN vznikajícími z chromozomálních fragmentů (C – MN, centromerově negativní MN) a MN, které jsou odvozeny z opožděujících chromozomů (C + MN, centromerově pozitivní MN) během anafáze (ztráta chromozomů). U pacientů s AD i PD byly pozorovány v lymfocytech vyšší hladiny MN ve srovnání s kontrolními vzorky (**tab. 1**). Výsledky zde tedy ukazují přítomnost cytogenetických změn na periferní úrovni u těchto obou neurodegenerativních onemocnění (Petrozzi et al., 2002).

Parameter	AD (n=24)	PD (n=20)	Controls (n=22)
MN (%)	1.82 (0.48)**	1.75 (0.37)**	0.85 (0.42)
C+MN (%)	75.4 (5.3)*	34.8 (4.4)	49.3 (3.7)
C-MN (%)	24.6 (5.3)	65.2 (4.4)*	50.7 (3.7)

Tabulka 1 Výsledky cytogenetických analýz lymfocytů u pacientů s AD a PD (převzato z Petrozzi et al., 2002).

Migliore et al. (2002) zkoumali přítomnost chromozomu a primární nebo oxidační poškození DNA v leukocytech periferní krve pacientů s neléčenou PD. Cytogenetická analýza byla provedena u 20 pacientů s *de novo* PD a 16 kontrolních vzorků, odpovídajícího věku, pohlaví a s podobnými kuřáckými návyky, pomocí MN testu spolu s technikou FISH a kometovou analýzou. FISH technika byla provedena u 16 z 20 pacientů s PD a u 12 z 16 kontrolních vzorků. Kometový test byl proveden u 15 pacientů a u 14 kontrolních vzorků. Jedenáct pacientů s PD a 10 kontrolních vzorků bylo podrobena jak FISH technice, tak kometovému testu. Výsledky MN testu a FISH techniky ukázaly, že četnost MN byla vyšší u pacientů s PD v porovnání s kontrolními vzorky (16,8 % ± 4,8 % vs. 8,8 % ± 2,9 %). FISH technika ukázala statisticky významně vyšší procento C – MN u pacientů s PD v porovnání se skupinou kontrol (**obr. 5**).



Obrázek 5 Distribuce C+MN (tmavá plocha) a C-MN (světlá plocha) v lymfocytech pacientů s PD a kontrolních jedinců. Data jsou vyjádřena jako průměrné procento celkové frekvence mikrojadér (převzato z Migliore et al., 2002).

Délka kometového ocasu poskytla informace o hladinách SSB. Zjištěno bylo trojnásobné zvýšení hladin SSB u pacientů s PD v porovnání s kontrolními vzorky ($9,6 \mu\text{m} \pm 4,3 \mu\text{m}$ vs. $3,3 \mu\text{m} \pm 2,3 \mu\text{m}$; $p < 0,001$). Pozitivní korelace mezi procentem C – MN a hladinou SSB ($r=0,86$) byla pozorována u pacientů, vzorky jejichž krve byly FISH analýzou i kometovou analýzou. Měření oxidačního poškození DNA bylo provedeno pomocí modifikované verze kometového testu. K detekci oxidovaných pyrimidinů byla použita Endo III a u purinů byla použita FPG. Hladiny SSB, způsobené oxidovanými puriny, byly vyšší u pacientů s PD v porovnání s kontrolními vzorky ($22,4 \mu\text{m} \pm 3,8 \mu\text{m}$ vs. $17,3 \mu\text{m} \pm 6,2 \mu\text{m}$; $p < 0,052$). U obou skupin nebyly pozorovány žádné významné rozdíly u oxidovaných pyrimidinů (Migliore et al., 2002).

Mírná kognitivní porucha (MCI) je klinický stav mezi normálním stárnutím a AD, charakterizovaný nedostatečnou pamětí bez ztráty obecných kognitivních a funkčních schopností. Migliore et al. 2005 provedli studii pomocí kometové analýzy s cílem vyhodnotit míru primárního a oxidačního poškození DNA, za použití enzymů Endo III a FPG, ve dvou skupinách pacientů s MCI a AD ve srovnání se zdravými kontrolními skupinami. Údaje prokázaly statisticky významné zvýšení hladin primárního poškození DNA v leukocytech pacientů s AD a také MCI v porovnání s kontrolními vzorky

(průměrné délky ocasu komet: $2,09 \mu\text{m} \pm 0,79 \mu\text{m}$ a $2,47 \mu\text{m} \pm 1,01 \mu\text{m}$ u AD a MCI oproti $1,04 \mu\text{m} \pm 0,31 \mu\text{m}$ u kontrolních jedinců). Množství oxidovaných DNA bází (jak purinů, tak pyrimidinů) bylo navíc statisticky významně vyšší u obou skupin ve srovnání s kontrolními vzorky. Jejich výsledky naznačují, že oxidační stres, alespoň na úrovni DNA, je časným projevem v patogenezi AD (Migliore et al., 2005).

3.2 Kometová analýza a oxidační poškození u kardiovaskulárních onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění (CVD, cardiovascular disease) jsou hlavní příčinou úmrtnosti v Západním světě. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, které zahrnuje komplexní interakci mezi životním stylem (dieta, kouření, cvičení, konzumace alkoholu) a příčinnými faktory (genotyp, věk, pohlaví). Toto onemocnění může být obecně klasifikováno jako ischemická choroba srdeční (CAD, coronary artery disease), cerebrovaskulární onemocnění a onemocnění periferních cév. Počátečním krokem je poškození endotelu. Toto poškození vede k tvorbě aterosklerotických lézí, které mohou uzavřít malé cévy a narušit průtok krve. To vede k akutním projevům jako je infarkt myokardu a cévní mozková příhoda, při nichž je vážně ohroženo zásobení tkání kyslíkem a živinami (Fearon & Faux, 2009). Důkazy potvrzující spojení poškození DNA s kardiovaskulárním onemocněním byly získány z *in vitro* modelů buněčných struktur a z analýzy krevních vzorků. Souvislost mezi diabetem a kardiovaskulárními komplikacemi vyústila v důkladné zkoumání účinků vysokých hladin glukózy v kardiovaskulárních buňkách. Tento účinek byl studován v mikrovaskulárních endoteliálních buňkách a lidských endoteliálních buňkách pupeční žíly (Malik et al., 2012).

Botto et al. (2002) ve své studii použili kometový test pro měření oxidačního poškození DNA v lymfocytech periferní krve 13 pacientů s angiograficky dokumentovanou CAD a 11 kontrolních vzorků, odpovídajícího věku a pohlaví. Výsledky ukázaly, že průměrné hodnoty vláknových zlomů, měřených jako procento DNA v ocasu, byly významně vyšší u pacientů s CAD v porovnání s kontrolními vzorky ($11,9 \% \pm 1,4 \%$ vs. $3,3 \% \pm 0,2 \%$). Stejně tak oxidované pyrimidiny a změněné puriny byly vyšší u pacientů s CAD. S počtem vaskulárních lézí podíl oxidovaných purinů rostl a pozitivně koreloval s rozsahem CAD. Také bylo zjištěno, že pacienti s diabetem měli

vyšší hodnoty oxidovaných pyrimidinů, zatímco pacienti s dyslipidemií měli zvýšené hodnoty změněných purinů v porovnání se zdravými pacienty (Botto et al., 2002).

Kliemann se se spolupracovníky (2011) ve své studii zaměřil na vyhodnocení souvislosti mezi rizikovými faktory CVD a mírou DNA poškození u dětí a dospívajících. Antropometrie a výživa byly měřeny standardními postupy. DNA poškození bylo zjišťováno kometovou analýzou a cytokinezií blokováním MN testem v leukocytech. Celkem 34 dětí a dospívajících bylo rozděleno do 3 skupin podle míry rizika kardiovaskulárních onemocnění (1.skupina – s žádným rizikovým faktorem CVD, 2.skupina – s 1 nebo 2 faktory, 3.skupina – s 3 a více faktory). Testování se středním a vysokým rizikem kardiovaskulárního onemocnění vykazovali výrazně vyšší tělesný tuk než ti s nízkým rizikem. Jedinci s vysokým rizikem také vykazovali významné zvýšení DNA poškození podle kometové analýzy. Míra DNA poškození korelovala pozitivně s různými rizikovými parametry CVD (BMI, tělesný tuk, celkový cholesterol a triglyceridy). Pokud jde o stravu, příjem vitamínu C negativně koreloval s mírou DNA poškození podle kometového testu (**tab. 2**) (Kliemann et al., 2012).

Parameters	Cardiovascular risk#		
	Low (n=11)	Moderate (n=11)	High (n=12)
Anthropometry			
Age (years)	11.36 ± 3.23	10.55 ± 3.14	12.75 ± 2.22
Females (n)	5	9	6
BMI (kg/m ²)	19.24 ± 3.49	22.83 ± 7.41	28.6 ± 5.08 ^{a b}
Body fat (%)	17.34 ± 6.37	26.54 ± 10.61 ^a	38.46 ± 8.09 ^{a b}
Hypertension (n)	1	3	6*
Serum markers			
Fasting glucose (mg/dL)	77.91 ± 5.91	85.91 ± 9.68 ^a	85.5 ± 5.60 ^a
Total cholesterol (mg/dL)	151.45 ± 10.32	170.18 ± 18.59 ^a	189.83 ± 21.83 ^{a b}
HDL (mg/dL)	46.18 ± 4.56	48.55 ± 9.75	51.92 ± 9.13
LDL (mg/dL)	92.36 ± 16.88	110.36 ± 11.94 ^a	119.58 ± 11.07 ^a
Triglycerides (mg/dL)	66.73 ± 13.74	66.64 ± 12.53	110.00 ± 37.96 ^{a b}
DNA damage			
Damage index (mean±s.d.)	7.64 ± 3.96	15.09 ± 5.66	31.83 ± 8.97 ^{a b}
Damage frequency (%)	5.55 ± 2.84	11.27 ± 4.52	23.08 ± 6.79 ^{a b}
Micronuclei (‰)	6.79 ± 4.48	7.65 ± 3.08	5.52 ± 2.66
Nucleoplasmic bridges (‰)	2.58 ± 2.83	2.57 ± 1.20	1.88 ± 2.32
Nuclear buds (‰)	7.29 ± 5.54	7.52 ± 1.76	10.32 ± 6.27
Family history of CVD (n)	3	9*	9*
Low physical activity (n)	4	6	8
Diet			
Lipids (% total calories)	28.62 ± 4.94	32.68 ± 6.99	31.62 ± 6.31
Cholesterol (mg/day)	249.86 ± 87.24	234.45 ± 96.51	235.67 ± 152.08
Fibers (g/day)	13.87 ± 4.80	11.91 ± 5.28	12.84 ± 5.09
Vitamin A (µg/day)	586.22 ± 424.68	558.88 ± 355.53	420.35 ± 330.39
Vitamin C (mg/day)	60.84 ± 41.11	67.38 ± 47.25	40.93 ± 28.95
Vitamin E (mg/day)	11.19 ± 8.23	13.91 ± 4.94	9.93 ± 5.69
Folate (µg/day)	151.98 ± 94.78	151.69 ± 81.83	149.58 ± 76.71

Tabulka 2 Parametry vzorků dětí a dospívajících s různými kardiovaskulárními riziky (převzato z Kliemann et al., 2012).

Vztahem mezi DNA poškozením a CAD spolu s celkovou kapacitou antioxidantů (TAC, total antioxidant capacity) se zabývali také Demirbag et al. (2005). Také oni použili kometovou analýzu na měření DNA poškození, kdy testovali 53 pacientů s angiograficky dokumentovanou CAD a 42 pacientů s normální koronárním oběhem. Průměrné hodnoty DNA poškození zde vyšly výrazně vyšší u pacientů s CAD než u kontrolních pacientů (**tab. 3**). Také byly zjištěny pozitivní korelace mezi DNA poškozením a cukrovkou, kouřením, obezitou a hyperlipidémií, zatímco mezi DNA poškozením a TAC byla zjištěna negativní korelace. Z výsledků tedy vychází, že DNA poškození je zvýšeno a TAC je sníženo u pacientů s CAD (Demirbag et al., 2005).

Variables	Patients with CAD (Group I, n = 53)	Normal coronary (Group II, n = 42)
Age (years)	57 ± 9	56 ± 11
Male/female (%)	74/26	43/57
Obesity (%)	52	37
Family history (%)	34	21
Hypertension (%)	23	21
Diabetes Mellitus (%)	13	9
Smoking (%)	34	26
Hyperlipidemia	29	23
DNA damage score (AU)	139 ± 40	101 ± 42
TAC (mmol Trolox equivalent/l)	1.14 ± 0.13	1.38 ± 0.20

Tabulka 3 Studijní výsledky pacientů s CAD a pacientů s normálním koronárním oběhem (převzato z Demirbag et al., 2005).

Vidya et al. (2014) provedli kontrolní studii s cílem posoudit míru poškození DNA u dětí s vrozenou srdeční vadou a porovnat ji se skupinou zdravých dětí stejného věku a pohlaví. Pro studii použili alkalickou modifikaci kometové analýzy a vyhodnotili parametry délku ocasu komety, celkovou délku komety a % DNA v hlavě. Parametry kometového testu byly porovnány mezi vyšetřovanými vzorky a kontrolními vzorky pomocí nepárového T-testu. Co se týče poškození DNA, tak celková délka komety byla významně vyšší ($p < 0,001$) u vyšetřovaných vzorků než u kontrolních vzorků ($68,13 \mu\text{m} \pm 14,7 \mu\text{m}$ vs. $30,3 \mu\text{m} \pm 5,2 \mu\text{m}$). Také délka ocasu komety byla delší u vyšetřovaných vzorků ($9,90 \mu\text{m} \pm 11,29 \mu\text{m}$ vs. $0,89 \mu\text{m} \pm 1,55 \mu\text{m}$). Hodnoty procent DNA v hlavě byly $88,01 \% \pm 10,47 \%$ vs. $89,02 \% \pm 7,61 \%$ (Vidya et al., 2014).

Gandhi et al. (2011) ve své studii zjišťovali poškození DNA u obézních pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a porovnávali ho mezi ženami a muži. Obezita a kardiovaskulární onemocnění spolu se zvyšujícím se stresem a zánětem mohou způsobit DNA poškození. V této studii se prováděla alkalická kometová analýza v leukocytech

periferní krve 28 obézních pacientů s CVD (14 žen, 14 mužů) a 13 kontrolních vzorků (6 žen, 7 mužů). Pro porovnání průměrné délky migrace DNA a procenta buněk s ocase u pacientů a kontrolních vzorků byl proveden T-test. Co se týče výsledků, tak u obézních pacientů s kardiovaskulárním onemocněním bylo poškození vyšší (v porovnání mezi pohlavími bylo poškození vyšší u žen než u mužů), frekvence poškození (60,14 % u žen vs. 59,21 % u mužů), průměrná délka migrace DNA ($19,16 \mu\text{m} \pm 2,60 \mu\text{m}$ u žen vs. $37,53 \mu\text{m} \pm 4,74 \mu\text{m}$ u mužů), v porovnání se zdravými kontrolními jedinci, kde hodnoty byly naopak vyšší u mužů než u žen. Studie tedy ukázala, že výrazně zvýšené poškození DNA obézních pacientů s CVD může být způsobeno samotným CVD, délkou léčby a kombinací léků, které pacienti berou a nabývá na významu, protože s sebou nese vyšší riziko onemocnění souvisejících s věkem a rakovinou (Gandhi et al., 2011).

3.3 Kometová analýza a oxidační poškození u pacientů s diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) je považován za metabolické a zánětlivé onemocnění, které postihuje více než 170 milionů lidí po celém světě. Pacienti s cukrovkou často vykazují zvýšenou produkci ROS spolu s vaskulárními komplikacemi. Přítomnost ROS může vést ke zvýšenému poškození DNA v lymfocytech periferní krve, které může být odhaleno kometovým testem. Obecně existují dva typy diabetu – DM typu 1 (IDDM, inzulin dependentní diabetes mellitus) a DM typu 2 (NIDDM, non-inzulin dependentní diabetes mellitus). Oba typy se vyznačují systémovou poruchou metabolismu závislého na inzulinu, ale liší se v mechanismech patogeneze (Sardas et al., 2001).

Dandona et al. (1996) se zabývali oxidačním poškozením DNA u pacientů s DM. Zvýšená produkce ROS a peroxidace lipidů může přispívat k cévním komplikacím u diabetiků. V rámci testování oxidačního poškození DNA u diabetes, měřili hladinu 8 - OHdG jako indikátoru oxidačního poškození v mononukleárních buňkách. Pro tuto laboratorní studii byly použity vzorky 12 pacientů s IDDM, 15 pacientů s NIDDM a 10 kontrolních vzorků zdravých dobrovolníků. 8 - OHdG byl testován pomocí HPLC a hladina ROS byla testována chemiluminiscencí. Pacienti s IDDM a NIDDM měli významně vyšší střední koncentrace 8 - OHdG ve svých mononukleárních buňkách než kontrolní vzorky. Také ROS vyšly vyšší u diabetiků v porovnání s kontrolními vzorky. Diabetičtí pacienti vykazovali větší oxidační poškození DNA, se zvýšenou tvorbou ROS, než kontrolní vzorky (Dandona et al., 1996).

Sardas et al. (2001) ve své studii hodnotili zlomy řetězce DNA u pacientů s diabetem pomocí kometového testu. K otestování byly odebrány vzorky periferní krve od 63 pacientů s diabetem (15 IDDM, 48 NIDDM), které se porovnávaly se 30 kontrolními vzorky. Byly zde zjištěny významné rozdíly mezi DM pacienty a kontrolními vzorky z hlediska četnosti výskytu poškozených buněk. Rozsah DNA migrace byl větší u pacientů s NIDDM v porovnání s pacienty s IDDM, což by mohlo naznačovat, že pacienti s IDDM se méně potýkají s oxidačním poškozením. Mezi pacienty s diabetem bylo 26 kuřáků a ve skupině kontrolních jedinců bylo 11 kuřáků. U kuřáků se projevila vyšší četnost buněk s migrací než u nekuřáků v obou skupinách. Dále pak po dobu 12 týdnů dostávalo 32 pacientů s diabetem vitamin E. Následně u nich bylo zjištěno významné snížení v DNA migraci ($19,6 \% \pm 29,0 \%$) v porovnání s migrací jejich buněk před léčbou ($32,5 \% \pm 20,0 \%$), oproti zbylému počtu pacientů, kterým bylo podáno pouze placebo. Závěrem lze říct, že tato studie poskytla důkazy o oxidačním poškození u pacientů s DM pomocí kometové analýzy. Rozdíly byly zjištěny u pacientů s IDDM a NIDDM z hlediska rozsahu migrace DNA (Sardas et al., 2001).

V další studii se Collins et al. (1998) zabývali poškozením DNA u pacientů s diabetem typu 1. Studovaly se vzorky 10 pacientů (mužů) s IDDM a vzorky 10 zdravých mužů. Mezi diabetiky mělo 8 pacientů chronické komplikace, zatímco zbývající 2 pacienti byli bez diabetických komplikací. K vyhodnocení poškození DNA byl použit kometový test. Testem byly měřeny zlomy vláknů DNA, místa citlivá na FPG a Endo III v DNA lymfocytů. Průměrné hodnoty jednovláknových zlomů a oxidovaných pyrimidinů byly statisticky významně vyšší u diabetiků. Byla zde také pozorována silná korelace mezi místy citlivými na FPG a koncentrací glukózy v séru. Když byli tři pacienti s normální hladinou glukózy vyřazeni ze statistických analýz, byla průměrná hodnota poškození míst citlivých na FPG významně zvýšena ve srovnání s normální. Poškození DNA u lymfocytů je tedy užitečným markerem oxidačního stresu a zejména místa citlivá na FPG představují změny specificky související s hyperglykemií (Collins et al., 1998).

Co se týče dětí, u nich převládá diabetes mellitus typu 1 a ten je charakterizován autoimunitním charakterem s postupnou destrukcí β buněk a nedostatkem inzulínu u geneticky predisponovaných pacientů. Studie, pod vedením Varvařovské (2004), se zaměřila na diabetické děti a jejich příbuzné a potvrdila zvýšený oxidační stres u diabetických dětí a také podobný sklon u jejich sourozenců. Jako markery oxidačního stresu byly určovány hladiny superoxid dismutázy (SOD) v erytrocytech, glutathion peroxidázy v plné krvi a kapacita antioxidantů v plazmě. K jejich detekci byly použity

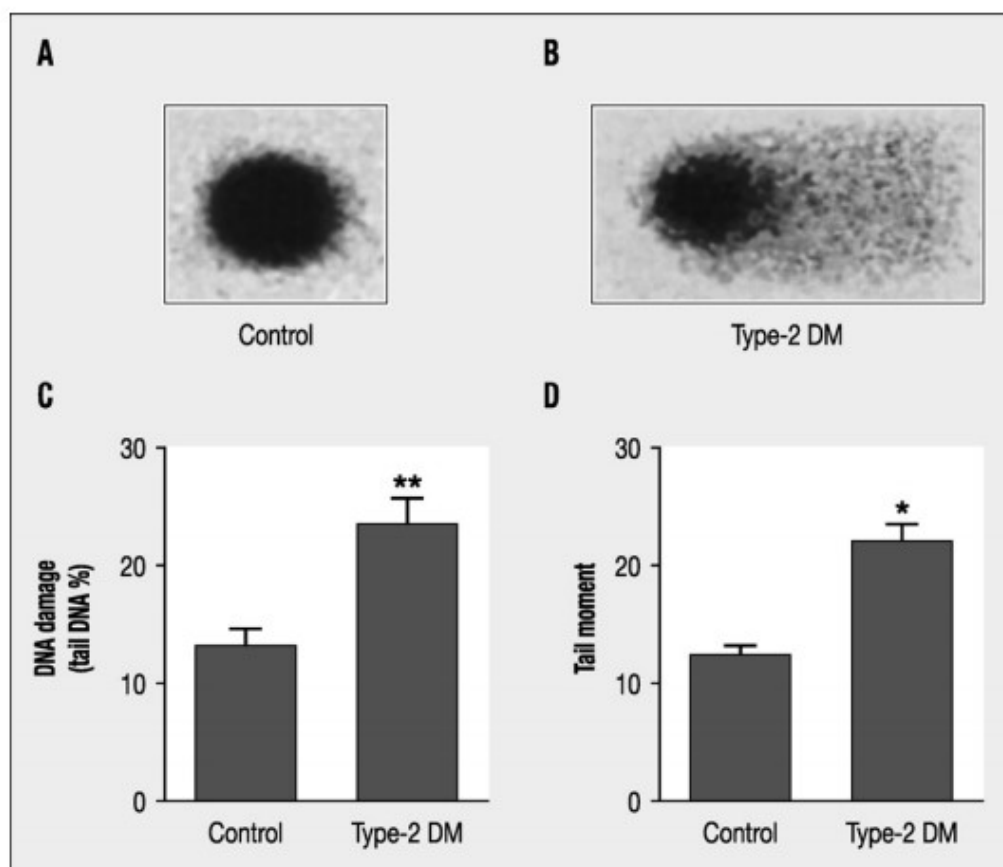
sady od Randox (Crumlin, Velká Británie). Koncentrace glutathionu (GSH) v erythrocytech byla zjištěna pomocí sad od Oxis Int. (Bonnenie, Marue, Francie), zatímco malondialdehyd (MDA), jako produkt lipidové peroxidázy, byl stanoven fotometricky. V návaznosti na to byla provedena roční studie zahrnující diabetické děti užívající vitaminy E a C, které dostávaly v určitých dávkách po celý rok. Design studie byl nastavený v cyklech 3 měsíce léčba, 3 měsíce pauza. Vitaminová suplementace zlepšila kontrolu diabetu a snížila markery oxidačního stresu ve srovnání s diabetickými dětmi bez doplňků. Dále se také pokusili prozkoumat úroveň zlomů DNA a procesy opravy DNA pomocí kometového testu. I když děti s diabetem typu 1 vykazovaly zvýšený oxidační stres oproti zdravým dětem, jejich oxidační poškození DNA se zásadně nezměnilo. Na druhou stranu jejich kapacita opravy DNA se významně zvýšila. To demonstruje stimulovaný proces opravy DNA, který je zcela jistě odpovědí na trvale zvýšený stav oxidačního stresu (Varvařovská et al., 2004).

Dincer et al. (2003) ve své studii určili vztah mezi poškozením DNA, hladinou oxidu dusnatého (NO) a antioxidační obranou u leukocytů pacientů s DM typu 1. Této studie se účastnilo 45 pacientů s DM typu 1 a 40 zdravých dobrovolníků. Poškození DNA bylo hodnoceno jako místa zlomu DNA vlákna a místa poškozených purinů, která jsou citlivá na FPG kometovou analýzou v DNA z leukocytů. Hladina dusitanů, jako produkt NO, aktivita SOD a G-Px leukocytů byly měřeny spektrofotometrickými sadami. Hladina glukózy v séru a glykosylovaný hemoglobin (HbA_{1c}) byly u pacientů podle očekávání vyšší. Rozdíly v měřených parametrech mezi kontrolními vzorky a pacienty byly vyhodnoceny samostatně u mužů a žen. Pokud jde o hladinu dusitanů, tak mezi kontrolními vzorky a pacienty nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, rozdíl nebyl významný ani mezi muži, ani mezi ženami. Zjištěno bylo, že místa zlomení vlákna a místa citlivá na FPG byla u pacientů zvýšená, zatímco aktivity SOD a G-Px leukocytů byly sníženy jak u mužů, tak u žen, v porovnání s příslušnými kontrolními vzorky (**tab. 4**) (Dinçer et al., 2003).

	Controls		Patients	
	Men (n = 17)	Women (n = 23)	Men (n = 21)	Women (n = 24)
Strand breakage	68 ± 12	65 ± 15	102 ± 26	77 ± 15
Fpg-sensitive sites	112 ± 23	107 ± 36	199 ± 44	175 ± 42
Nitrite (nmol/mg protein)	51 ± 11	47 ± 10	46 ± 9	50 ± 10
SOD (U/mg protein)	4.08 ± 0.77	4.31 ± 0.83	3.00 ± 0.56	3.01 ± 0.62
G-Px (mU/mg protein)	69 ± 14	81 ± 14	55 ± 12	60 ± 13

Tabulka 4 Měřené parametry v DNA a leukocytech kontrolních vzorků a pacientů s DM typu 1 (převzato z Dinçer et al., 2003).

Arif et al. (2009) se zabývali poškozením DNA a antioxidanty v plazmě u pacientů s diabetem typu 2 v Bangladéši. Cílem této studie bylo změřit antioxidační stav séra u pacientů s DM typu 2 a posoudit jeho stav vzhledem k oxidačnímu poškození DNA. Ve studii se pracovalo celkem s 57 vzorky, s tím, že 32 vzorků bylo od diabetiků typu 2 a 25 bylo od nediabetiků. K testování míry poškození DNA v lymfocytech byl použit kometový test a ke stanovení sérových hladin MDA a proteinového karbonylu, a sérové aktivity SOD a skupiny proteinových thiolů (P-SH) byly použity spektrofotometrické metody. Kometové snímky krevních buněk pacientů s DM vykazovaly abnormální vzhled, který se neprojevil u kontrolních vzorků. Rozsah poškození DNA zde byl vyjádřen měřením procent DNA přítomných v ocasu komety, kdy u pacientů s DM typu 2 DNA dosáhl 64 %, zatímco u kontrolních vzorků pouze 28 %. Dalším často měřeným parametrem je tail moment, který zde statisticky významně prokázal poškození DNA v buňkách diabetiků v porovnání s kontrolními vzorky (**obr. 6**). Diabetičtí pacienti dále měli významně vyšší hladiny MDA a proteinového karbonylu souběžně s významným poklesem hladin SOD a P-SH v porovnání s kontrolními vzorky. Sérové SOD také nepřímo korelovalo s nárůstem % DNA v ocasu komet. Studie naznačuje, že nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty může být jedním z mechanismů vedoucích k poškození DNA zjištěnému v lymfocytech pacientů s DM typu 2 (Arif et al., 2010).

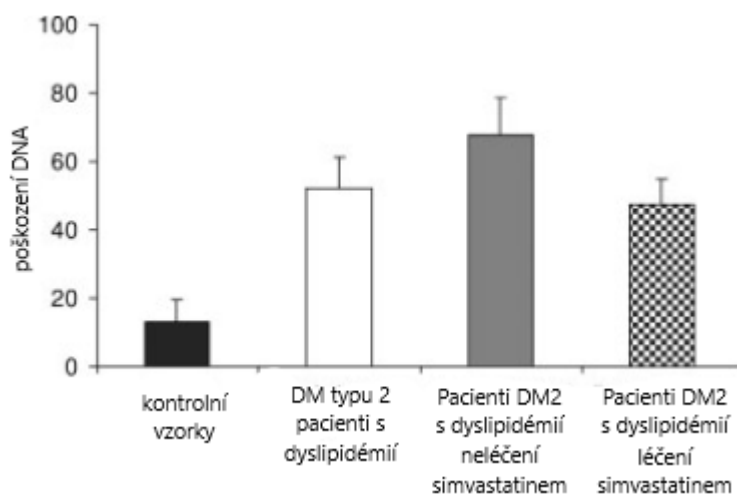


Obrázek 6 Kometové snímky krevních buněk pacientů s diabetem: rozsah poškození DNA u kontrolních vzorků (A) a pacientů s DM typu 2 (B), % DNA v ocasu komety (C), tail moment (D) (převzato z Arif et al., 2010).

Poškození DNA může být spojeno s DM typu 2 a jeho komplikacemi hlavně díky oxidačnímu stresu. O poruchách opravy DNA, které by mohly přispět k celkovému rozsahu poškození DNA a které mohou být spojeny s genomickou nestabilitou vedoucí k rakovině, je známo jen málo. Blasiak et al. (2004) se ve své práci snažili vyhodnotit rozsah poškození DNA, účinnost opravy DNA a citlivost na exogenní mutageny u DM typu 2. V této studii měřili míru endogenního bazálního poškození DNA pomocí kometového testu, a stejně tak i endogenní oxidační a alkylační poškození DNA, a pak také citlivost na látky poškozující DNA peroxid vodíku a doxorubicin a účinnost odstraňování poškození DNA vyvolané těmito látkami v lymfocytech periferní krve pacientů s DM typu 2 a zdravých jedinců. K testování byly použity vzorky 52 diabetiků a 55 zdravých jedinců. Míra poškození DNA a kinetika opravy DNA byly hodnoceny kometovým testem. Oxidační a alkylační poškození DNA bylo testováno s použitím enzymů pro opravu DNA Endo III a FPG rozpoznávající oxidované DNA báze a

3 - metyladenin-DNA glykosyláza II rozpoznávající alkylované báze. Hladiny bazálního endogenního a oxidačního poškození DNA byly u diabetiků vyšší v porovnání s kontrolními vzorky. Dále také pacienti s cukrovkou vykazovali vyšší citlivost na peroxid vodíku a doxorubicin a sníženou účinnost opravy poškození DNA vyvolaného těmito látkami, než zdraví jedinci. Výsledky studie naznačují, že cukrovka druhého typu může být spojena nejen se zvýšenou mírou oxidačního poškození DNA, ale také se zvýšenou citlivostí na mutageny a sníženou účinností opravy DNA (Blasiak et al., 2004).

Další studie, kterou provedli Manfredini et al. (2010), zkoumala oxidační poškození DNA pomocí alkalického kometového testu ve vzorcích leukocytů periferní krve od 15 dyslipidemických pacientů s DM typu 2 léčených simvastatinem (20mg/den), 15 dyslipidemických diabetických pacientů neléčených simvastatinem, 20 pacientů bez dyslipidemie a 20 zdravých pacientů (kontrolní vzorky). Výsledky ukázaly větší migraci DNA, reflektující poškození DNA, u pacientů s dyslipidemií a DM typu 2 neléčených statinem v porovnání s léčenými pacienty, pacienty bez dyslipidemie a kontrolními vzorky (**obr. 7**). Výsledky tedy ukazují, že léčba simvastatinem hraje ochrannou roli při oxidačním poškození DNA u diabetických pacientů typu 2 s dyslipidemií, pravděpodobně odrážející celkový pokles oxidačního stresu u těchto pacientů (Manfredini et al., 2010).



Obrázek 7 Index poškození DNA leukocytů periferní plné krve pacientů a kontrolních vzorků (převzato z Manfredini et al., 2010).

V další studii se Ibarra – Costilla et al. (2009) taktéž zabývali poškozením DNA, tentokrát u mexických pacientů s DM typu 2. Cílem studie bylo posoudit, zda celková

míra poškození DNA hodnocená kometovým testem se u těchto pacientů liší. V Mexiku je diabetes mellitus třetí nejčastější příčinou smrti. Vzorky byly odebrány 71 Mexičanům s DM typu 2, u kterých se cukrovka vyvinula nejdéle před pěti lety, a byli léčeni perorálními hypoglykemickými léky, a byli bez mikrovaskulárních či makrovaskulárních komplikací. Tito pacienti byli rozděleni do tří skupin podle věku – I. 40 - 50let, II. 51 - 60let, III. 61 - 70let. Kontrolní skupinu tvořilo 14 jedinců (40 - 50let) bez DM typu 2. Výsledky ukázaly, že došlo k mírnému, ne však statisticky významnému nárůstu poškození DNA u skupin pacientů s DM typu 2 ve věku 40 - 60let v porovnání se skupinou pacientů ve věku 61 - 70let a kontrolní skupinou. Vzhledem k tomu, že celkové poškození DNA bylo ve třech skupinách diabetických pacientů a kontrolní skupině podobné, je možné, že tyto buňky vykazovaly podobné oxidační poškození (Ibarra-Costilla et al., 2010).

Diabetes mellitus typu 2 je spojen se zvýšenou mírou oxidačního stresu, který je jedním z nejdůležitějších faktorů, které mohou za vznik chronických komplikací onemocnění. Navíc bylo prokázáno, že pacienti s diabetem měli zvýšenou hladinu oxidačního poškození DNA a sníženou účinnost opravy DNA. Tyto změny mohou být spojeny se zvýšeným rizikem rakoviny u pacientů s DM typu 2, jelikož poškození DNA a oprava DNA hrají klíčovou roli v maligní transformaci. Bylo zjištěno, že gliklazid, perorální antidiabetikum s antioxidačními vlastnostmi, snižuje poškození DNA způsobené volnými radikály. Proto cílem studie, kterou provedli Sliwiska et al. (2008), bylo zhodnotit *in vitro* vliv gliklazidu na endogenní bazální a oxidační poškození DNA, na poškození DNA způsobené peroxidem vodíku a na účinnost opravy takového poškození DNA. V této studii se testovalo 30 vzorků periferní krve pacientů s DM typu 2 a 30 vzorků od nediabetických jedinců pomocí kometové analýzy, jejichž lymfocyty z odebrané krve byly inkubovány s gliklazidem. Rozsah poškození DNA byl hodnocen pomocí enzymů Endo III. a FPG. Endogenní bazální a oxidační poškození DNA bylo vyšší u pacientů s diabetem ve srovnání nediabetiky a gliklazid významně snížil míru těchto poškození. Lék dále významně snížil míru poškození DNA vyvolaného peroxidem vodíku u obou skupin. Co se týče opravy DNA, tak gliklazid zvýšil její účinnost u pacientů s DM (93,4 % s gliklazidem vs 79,9 % bez gliklazidu) a u kontrolních vzorků (95,1 % s gliklazidem vs 90,5 % bez gliklazidu). Tyto výsledky naznačují, že gliklazid může ochránit před oxidačním stresem snížením míry poškození DNA vyvolaného ROS (Sliwiska et al., 2008).

3.4 Kometová analýza a oxidační poškození u těžce nemocných pacientů

Těžká onemocnění, jako sepse, polytrauma nebo akutní postižení plic (ALI, acute lung injury) /syndrom akutní dechové tísně (ARDS, acute respiratory distress syndrome), mohou drasticky zvyšovat produkci ROS/RNS a vést k oxidačnímu stresu. Oxidační stres během závažného onemocnění může souviset s aktivací fagocytů (neutrofilů, monocytů, makrofágy, eozinofily), produkcí NO, uvolněním železnatých a měděných iontů a metaloproteinů a vaskulárním poškozením. Těžce nemocní pacienti mají sníženou hladinu plazmatických a nitrobuňkových antioxidantů a sníženou aktivitu enzymatického systému zapojeného při detoxikaci ROS. Dále vykazují zvýšení koncentrace lipidových peroxidů, MDA a aktivity xanthinoxidázy. Naopak vykazují snížené hladiny α - tokoferolu (vitamin E), selenu, β - karotenu (provitamin A), lykopenu a kyseliny askorbové (vitamin C) (Kuchařová et al., 2019, Crimi et al., 2006).

Abilés et al. (2006) hodnotili vztah mezi oxidačním stresem u pacientů s těžkým onemocněním a příjmem antioxidantních vitaminů a závažností onemocnění. K měření celkové antioxidantní kapacity použili spektrometrii a také určovali množství lipidových peroxidů, karbonylových skupin (ty reprezentují poškození lipidů a proteinů), bilirubinu a kyseliny močové v plazmě ve dvou různých časových bodech – při přijetí na jednotce intenzivní péče (ICU, intensive unit care) a v den sedmý. Vedly se denní záznamy přijaté stravy a byla hodnocena shoda s doporučenou denní dávkou (RDA, recommended dietary allowance) antioxidantních vitaminů (A, C a E). Mezi přijetím a sedmým dnem na ICU byly zjištěny významně zvýšené hodnoty lipidových peroxidů a karbonylových skupin. Tento nárůst byl spojen se sníženou kapacitou antioxidantů a větším zhoršením SOFA skóre (the Sequential Organ Failure Assessment) (jedná se o skóre hodnotící orgánovou dysfunkci). Dále bylo zjištěno výraznější zhoršení parametrů oxidačního stresu u pacientů, kteří dostali antioxidantní vitaminy o dávce menší než 66% dávky RDA než u těch, kteří dostali antioxidantní vitaminy o dávce 66 % - 100 % dávky RDA. Podání antioxidantů o dávce menší než 66 % dávka RDA snížilo riziko zhoršení oxidačního stresu o 94 % bez ohledu na jakékoliv změny závažnosti onemocnění (Abilés et al., 2006).

Goode et al. (1995) také zjistili, že koncentrace antioxidantních vitaminů byly významně nižší u pacientů se septickým šokem a sekundárním selháním orgánu než rozsah hodnot získaný od srovnatelné skupiny kontrolních vzorků zdravých jedinců.

Všichni pacienti měli výrazně snížené koncentrace tokoferolu, retinolu (vitamin A) a karotenoidů betakarotenu a lykopenu (Goode et al., 1995).

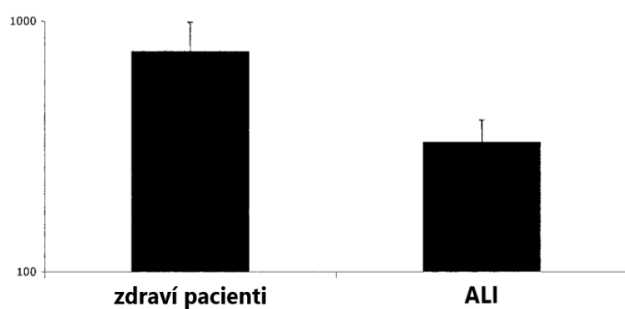
Při septickém šoku je snížený splachnický průtok krve. Bylo zjištěno, že N-acetylcystein (NAC) zvyšuje průtok krve hepatosplachnikem. Rank et al. (2000) zkoumali vliv NAC na průtok krve játry, přenos kyslíku splachnikem a funkci jater během časného septického šoku. Testováno bylo 60 pacientů se septickým šokem do 24 hodin po nástupu sepsy. Intravenózní infuze NAC zvýšila průtok krve hepatosplachnikem, což bylo vyšetřeno za použití indokyaninové zeleně, také zlepšila funkci jater, která byla hodnocena pomocí MEGX testu (monoethylglycinexylid) (Rank et al., 2000).

Syndrom akutní dechové tísně u dospělých s sebou nese vysokou úmrtnost. U pacientů s ARDS dochází k silnému oxidačnímu stresu díky aktivaci neutrofilů a léčbě vysokými koncentracemi vdechovaného kyslíku. Pacienti, kteří nepřežijí ARDS, mají mnohem vyšší hladiny oxidačního poškození, což naznačuje, že nejsou moc schopni se chránit proti zvýšenému oxidačnímu stresu. Quinlan et al. (1997) měřili plazmatické hladiny prooxidačních substrátů pro xanthinoxidázu, konkrétně hypoxantin a xantin, a korelovali je se ztrátou plazmatických proteinových thiolových skupin. Všichni pacienti s ARDS měli vyšší hladiny hypoxantinu ($37,48 \mu\text{M} \pm 3,1 \mu\text{M}$ u nepřeživších, $15,24 \mu\text{M} \pm 2,09 \mu\text{M}$ u přeživších) v porovnání s pacienty podstupujícími plicní resekci ($9,22 \mu\text{M} \pm 1,89 \mu\text{M}$), s pacienty na jednotce intenzivní péče se sepsí, ale bez poranění plic ($1,12 \mu\text{M} \pm 0,69 \mu\text{M}$) a se zdravými kontrolními pacienty ($1,43 \mu\text{M} \pm 0,38 \mu\text{M}$). Rozdíl v plazmatických hladinách hypoxantinu mezi přeživšími a nepřeživšími ARDS byl statisticky významný a vykazoval negativní korelaci se ztrátou proteionových thiolových skupin. Hladiny xantinu byly také vyšší u pacientů s ARDS, ale nelišily se moc od pacientů přeživších a nepřeživších ARDS (Quinlan et al., 1997).

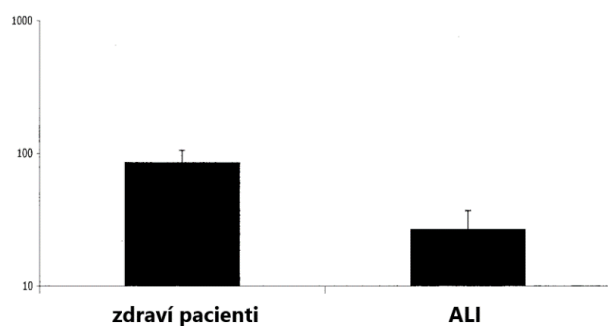
Akumulace neutrofilů hraje významnou roli při vývoji akutního poškození plic. Fyziologické role neutrofilů v hostitelské obraně je dosaženo nejen produkcí a uvolněním ROS, ale také uvolněním proteáz ve prospěch translokace patogenů. Účinná neutralizace neutrofilních proteáz a volných radikálů plicními antioxidanty (glutathion) a antiproteáz ($\alpha 1$ - antitrypsin, $\alpha 2$ - makroglobulin) je prevencí rozvoje akutní formy plicního postižení (Crimi et al., 2006). U ALI aktivované lymfocyty stimulují tumor nekrotizující faktor a další cytokiny. Tyto lymfokiny rozšiřují tvorbu volných radikálů pomocí polymorfonukleárních leukocytů, makrofágů a dalších buněk, které mohou nakonec vyvolat ARDS. Toto je podpořeno výsledky Kumara et al. (2000), které ukazují, že u

pacientů s prokázanou ARDS jsou významně zvýšené hladiny produktů lipidových peroxidací. Množství lipidových peroxidáz bylo výrazně vyšší u skupinky pacientů s ARDS v porovnání s rizikovými pacienty ARDS. Koncentrace oxidu dusnatého byly významně sníženy u pacientů s ARDS v porovnání s kontrolními vzorky a rizikovými pacienty ARDS. Dále byla provedena analýza mastných kyselin v plazmatické fosfolipidové frakci, která odhalila významný pokles kyseliny linolové, kyseliny gama-linolenové, dihomogama-linolenové, arachidonové, alfa-linolenové, eikosapentaenové, a dihomohexaenové. Pacienti, kteří byli ohroženi ARDS, měli snížené hladiny kyseliny gama-linolenové, alfa-linolenové a eikosapentaenové. Výsledky ukazují, že lipidové peroxidy a změny v metabolismu esenciálních mastných kyselin mohou hrát roli v patogenezi ARDS (Kumar et al., 2000).

Bowler et al. (2003) se zabývali hypotézou, zda jsou nízké koncentrace ve vodě rozpustných antioxidantů přítomny v rozšířených dýchacích cestách distálně od terminálních bronchiolů u pacientů s ALI. Testováno bylo 29 pacientů s ALI, kteří byli intubováni na ICU a 23 zdravých dobrovolníků. Pacientům s ALI byla ihned po intubaci odsáta tekutina z plicního edému. V porovnání s bronchoalveolární laváží u zdravých pacientů, kdy tekutina byla zředěná pomocí močoviny, měla nezředěná tekutina pacientů s ALI výrazně nižší koncentraci antioxidantů – urát ($757 \mu\text{M} \pm 232 \mu\text{M}$ vs. $328 \mu\text{M} \pm 75 \mu\text{M}$) (**obr. 8**), glutathion ($138 \mu\text{M} \pm 25 \mu\text{M}$ vs. $7 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$) a askorbát ($85 \mu\text{M} \pm 21 \mu\text{M}$ vs. $27 \mu\text{M} \pm 10 \mu\text{M}$) (**obr. 9**). Jednotlivé koncentrace byly měřeny HPLC s elektrochemickou detekcí.



Obrázek 8 Koncentrace urátu u zdravých pacientů v porovnání s pacienty s ALI (převzato z Bowler et al., 2003).



Obrázek 9 Koncentrace askorbátu u zdravých pacientů v porovnání s pacienty s ALI (převzato z Bowler et al., 2003).

ALI je tedy spojeno se sníženou koncentrací ve vodě rozpustných antioxidantů v rozšířených dýchacích cestách distálně od terminálních bronchiolů. Antioxidanty urát, askorbát a glutathion mohou hrát roli při zmírňování poškození plic (Bowler et al., 2003).

V další studii Winterbourn et al. (2000) určili, zda lze dokázat oxidační poškození u pacientů se septickým šokem nebo těžkým traumatem pomocí měření koncentrace bílkovin a produktů lipidových oxidací. Testováno bylo 22 pacientů se závažnou sepsí a 18 pacientů s traumatem. Během prvních 10 dnů po traumatu nebo nástupu sepse byla shromažďována plazma a tekutina bronchoalveolární laváže pacientů. U obou tekutin byly testovány koncentrace proteinového karbonylu pomocí testu ELISA, reaktivní látky kyseliny thiobarbiturové (TBARS, thiobarbituric acid reactive substances), které vznikají jako vedlejší produkt lipidové peroxidace, které mohou být detekovány testem TBARS za použití kyseliny thiobarbiturové jako činidla, pomocí HPLC s fluorescenční detekcí a koncentrace myeloperoxidázy, která byla stanovena měřením oxidace tetramethylbenzidinu. Koncentrace proteinového karbonylu v plazmě byla zpočátku velmi zvýšená v porovnání se zdravými kontrolními jedinci. V prvních několika dnech však koncentrace proteinového karbonylu výrazně klesaly, ale i tak zůstaly nad hodnotami kontrolních vzorků. Co se týče tekutiny bronchoalveolární laváže, tam byly koncentrace proteinového karbonylu také ze začátku vysoké, ale časem klesaly. Reaktivní látky kyseliny thiobarbiturové v plazmě nebyly zvýšené a u lavážové tekutiny hodnoty kolísaly. Myeloperoxidáza dosáhla mikromolárních hodnot v tekutině bronchoalveolární laváže a byla výrazně vyšší v plazmě pacientů se sepsí, kteří následně zemřeli. Výsledky této studie poskytly důkazy oxidačního poškození vyskytujícího se časně u pacientů se závažnou sepsí a těžkým traumatem. Vysoké koncentrace proteinového karbonylu jak v plazmě, tak lavážové tekutině značí, že oxidační poškození není omezeno pouze na plíce (Winterbourn et al., 2000).

Existuje jen velmi málo literárních odkazů, které popisují použití kometové analýzy pro stanovení oxidačního poškození DNA u těžce nemocných pacientů, ačkoli tato technika by byla velmi vhodná. Technika byla použita například ve studii pod vedením Zhanataeva (2010), ve které studovali poškození DNA a buněčnou smrt u 22 pacientů s těžkým mnohočetným zraněním. Měření se prováděla po přijetí pacientů (nultý den) a poté třetí, pátý, sedmý a patnáctý den během jejich pobytu na jednotce intenzivní péče. Průměrná hodnota procentuálního podílu DNA v ocasu v krvinkách od zdravých kontrolních jedinců byla $6,1 \% \pm 2,2 \%$. Bylo zjištěno, že pacienti s traumatem

měli při přijetí vysoké poškození DNA ($10,6 \% \pm 5,9 \%$ DNA v ocasu, $p < 0,01$), které se dále zvýšilo pátý den na maximální hodnotu ($14,2 \% \pm 4,2 \%$ DNA v ocasu, $p < 0,01$). V den patnáctý bylo poškození DNA výrazně vysoké a bylo vyšší v porovnání s kontrolními vzorky ($6,1 \% \pm 2,2 \%$ vs. $10,3 \% \pm 2,4 \%$ DNA v ocasu, $p < 0,01$) (Zhanataev et al., 2010).

V další studii se tým Natálie Carvalho (2010) snažil určit, zda poškození DNA zjištěné pomocí kometového testu pomáhá v diagnóze novorozenecké sepse. Ta byla diagnostikována na základě klinických nálezů, laboratorních nálezů a pozitivních kultivačních výsledků u 24 novorozenců, kteří se účastnili studie. Kontrolní vzorky byly od 24 novorozeňat, u kterých nebyla prokázána seps. Podle jejich výsledků zde nebyly významné rozdíly mezi oběma skupinami ve vztahu k demografickým údajům, které ukazují, že obě skupiny byly podobné a jediným rozdílem mezi nimi byla nemoc (Carvalho et al., 2010).

3.5 Kometová analýza a oxidační poškození u pacientů s nádorovým onemocněním

Poškození DNA a oprava DNA jsou základními molekulárními procesy, které řídí iniciaci a progresi rakoviny. Proto není překvapením, že mnoho studií použilo kometový test k vyšetření poškození a opravy DNA. Bylo potvrzeno, že je vhodným nástrojem pro předpověď citlivosti jednotlivých tumorů na radiaci a na různá chemoterapeutika, stejně tak je užitečný i pro hodnocení oxidačního stresu v nádorech. Obecně můžeme onkologické pacienty dělit do dvou skupin – ti, kteří podstupují radioterapii, a ti, kteří podstupují chemoterapii (Mckenna et al., 2008).

Gamulin et al. (2007) se ve své studii zabývali poškozením DNA u pacientů s nádorovým onemocněním léčených radioterapií. Studie se účastnilo 10 pacientů, kterým byly diagnostikovány různé pevné nádory. Hladiny poškození DNA byly vyhodnoceny z leukocytů periferní krve pomocí alkalického kometového testu. Celkem byly odebrány čtyři vzorky krve od každého pacienta – před (vzorek č.1) a po (vzorek č.2) první dávce radioterapie, uprostřed radioterapeutického cyklu (vzorek č.3) a po podání poslední dávky radioterapie (vzorek č.4). Monitorovány byly dva parametry – migrace DNA (délka ocasu; μm) a tail moment. Výsledky odhalily interindividuální rozdíly v poškození DNA před léčbou u pacientů s rakovinou. Individuální průměrná migrace DNA byla v rozsahu od $15,73 \mu\text{m} \pm 0,19 \mu\text{m}$ do $37,85 \mu\text{m} \pm 3,12 \mu\text{m}$. Hodnoty tail momentu byly v rozsahu

od $13,11 \pm 0,19$ do $34,11 \pm 2,97$. Příčinu rozdílů v hladinách poškození DNA před léčbou lze vysvětlit různými faktory životního stylu, stejně tak jako různou citlivostí na diagnostickou léčbu před operací a radioterapií. Stanovení obou parametrů ve vzorcích č.2 potvrdilo silně pozitivní odpověď na léčbu ($p < 0,05$). Mezi pacienty byly pozorovány značné interindividuální rozdíly. Tyto rozdíly odrážely dopad aplikovaných dávek radiace, a také ukazovaly různou citlivost genomu. U vzorků č. 2 byl rozsah délek ocasu od $18,56 \mu\text{m} \pm 0,58 \mu\text{m}$ do $60,30 \mu\text{m} \pm 2,17 \mu\text{m}$. Odpovídající hodnoty tail momentu byly od $15,69 \pm 0,56$ do $54,82 \pm 2,12$. Specifické hodnoty poškození DNA byly zaznamenány ve vzorcích krve analyzovaných uprostřed radioterapeutického cyklu (vzorky č.3). Ve většině případů bylo pozorováno snížení poškození DNA v porovnání se vzorky č.2. Rozpětí délek ocasů bylo od $16,36 \mu\text{m} \pm 0,24 \mu\text{m}$ do $43,95 \mu\text{m} \pm 1,67 \mu\text{m}$ a u tail momentu to bylo od $13,87 \pm 0,23$ do $39,99 \pm 1,64$. Výsledky vzorků po podání poslední dávky radioterapie ukázaly možnost adaptivní reakce. Příliš se nelišily a byly dokonce nižší než hodnoty před léčbou. Hodnoty migrace DNA byly v rozsahu od $17,48 \mu\text{m} \pm 0,25 \mu\text{m}$ do $31,17 \mu\text{m} \pm 1,98 \mu\text{m}$ a odpovídající hodnoty tail momentu byly od $14,94 \pm 0,25$ do $27,18 \pm 1,80$. Vzorky s různorodým poškozením DNA na konci radioterapie ukázaly, že pacienti s různými typy pevných nádorů se značně liší podle citlivosti genomu (Gamulin et al., 2007) .

Další studie stejného týmu se zabývala poškozením DNA u pacientů s orofaryngeálním karcinomem před, během a po radioterapii. Poškození DNA bylo hodnoceno v PBL 10 pacientů s použitím kometového testu, mikrojaderného testu a analýzy strukturních chromozomových aberací. Vzorky krve byly odebrány 2 h před a 2 h po první radioterapeutické dávce, uprostřed cyklu, 2 h po posledním podání a nakonec 6 až 12 měsíců po radioterapii. Pacienti s karcinomem měli relativně vysoké hladiny primárního poškození DNA v PBL již před terapií. U většiny pacientů byly nejvyšší hodnoty primárního poškození DNA ve vzorcích krve odebraných po podání první dávky ozáření (průměrná délka ocasu $25,04 \mu\text{m} \pm 6,23 \mu\text{m}$). Četnost výskytu strukturální chromozomové aberace v lymfocytech postupně narůstala během radiačního cyklu ($26,50 \pm 27,72$ na 100 metafází na konci léčby), stejně jako četnost výskytu mikrojader (průměrný celkový počet mikrojader $167,20 \pm 35,69$ na 1000 binukleárních buněk). Jelikož četnost chromozomových aberací rok po radioterapii zůstala zvýšená v porovnání s výchozími hodnotami, představuje již prodělaná radioterapie důležitý rizikový faktor související s recidivou rakoviny (Gamulin et al., 2008).

Rakovina plic je hlavní příčinou úmrtnosti na rakovinu ve světě. Chemoterapie je základem léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic a bylo prokázáno, že deriváty na bázi platiny zlepšují celkové přežití. Tým Fikrové (2014) provedl studii zahrnující 20 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic ve 4. stádiu a 10 kontrolních vzorků věkově srovnatelné skupiny zdravých jedinců. Vzorky krve pacientů, kteří podstoupili chemoterapii poprvé, byly shromážděny před zahájením prvního cyklu chemoterapie, před zahájením třetího cyklu chemoterapie a 3 týdny po čtvrtém závěrečném cyklu. V kombinované terapii dostávali deriváty na bázi platiny. Poškození DNA bylo stanoveno kometovým testem a bylo vyjádřeno jako procento DNA v ocasu. U kontrolních vzorků, bylo procento DNA $6,7 \% \pm 1,2 \%$. U pacientů s karcinomem to bylo $11,8 \% \pm 3,9 \%$. Výsledky ukazují, že v průběhu chemoterapie dochází ke změnám v množství SSB a křížových vazeb DNA. Průměrná hodnota procenta DNA v ocasu u pacientů rostla po celou dobu chemoterapie. K určení křížových vazeb DNA, které mohou být způsobeny cisplatinou, byla použita modifikace kometového testu. Ihned nebo jeden den po chemoterapii byl zjištěn nejvyšší výskyt křížových vazeb DNA. Cisplatinu může reagovat s DNA v několika ohledech, nejčastější je reakce s guaninem vedoucí k tvorbě křížových vazeb se stejnými vlákny. Sedm dní po chemoterapii hladina křížových vazeb DNA klesala a vrátila se na hodnoty před chemoterapií (Fikrova et al., 2014).

Buchynska et al. (2014) ve své práci vyhodnocovali výchozí poškození DNA a bleomycinem způsobené poškození DNA a schopnost opravy DNA v PBL u pacientek s karcinomem endometria s ohledem na rodinnou anamnézu karcinomu. Poškození DNA bylo analyzováno ve vzorcích buněk inkubovaných s protinádorovým antibiotikem bleomycinem 45 pacientek s rakovinou v porovnání s kontrolní skupinou 10 zdravých žen pomocí kometového testu. Úroveň poškození DNA byla stanovena jako procento DNA v ocasu komety. Hodnoty výchozího poškození DNA byly výrazně vyšší u pacientek s rakovinou ($9,31 \% \pm 15,32 \%$) ve srovnání s kontrolními vzorky zdravých jedinců ($3,41 \% \pm 4,71 \%$). Poškození DNA způsobené bleomycinem bylo vyhodnoceno odečtením % DNA v ocasu komety při výchozím poškození od % DNA v ocasu komety získaného po inkubaci PBL s bleomycinem. Bylo pozorováno, že toto poškození se výrazně nelišilo u pacientek s rakovinou od zdravých jedinců. Nicméně zde byly zjištěny rozdíly, poté co byl bleomycin odstraněn a byla studována oprava poškozené DNA. Míra poškození DNA klesla během prvních 15 minut po odstranění bleomycinu a to jak u zdravých jedinců, tak u pacientek s rakovinou. Dále bylo pozorováno, že úroveň

poškození DNA, po odstranění bleomycinu, v PBL pacientek s rakovinou byla výrazně nižší než u PBL kontrolní skupiny. A co je nejdůležitější, bylo zaznamenáno 80–100 % oprava poškození DNA vyvolané bleomycinem u 70 % zdravých osob a jen u 12 % pacientek s karcinomem. Ukázalo se také, že oprava DNA je méně účinná u PBL pacientů s karcinomem endometria s rodinnou anamnézou rakoviny než u pacientů s ojedinělým výskytem rakoviny (Buchynska et al., 2014).

Sánchez et al. (2004) zkoumali poškození DNA u neléčených pacientek s rakovinou prsu. Sledováno bylo 40 pacientek v klinickém stádiu III bez nádorové rodinné anamnézy v porovnání s kontrolními vzorky věkově srovnatelné skupiny 60 lidí. PBL byly analyzovány alkalickou a neutrální kometovou analýzou. Cílem studie bylo prozkoumat, zda PBL neléčených pacientek s karcinomem prsu vykazují zvýšený počet zlomů řetězce DNA. Výsledky ukázaly, že PBL pacientů s nádorovým onemocněním měly vyšší počet zlomů řetězce DNA oproti kontrolním vzorkům. U kontrolních vzorků byly zjištěny zlomy DNA pomocí alkalické metody (zobrazující SSB i DSB), u 18 % ± 4,67 % PBL. U pacientek s nádorovým onemocněním byla tato hodnota vyšší 24,08 % ± 4,96 % (**tab. 5**). Dále u kontrolních vzorků hodnota tail momentu byla 6,23 ± 1,44, zatímco u pacientek s karcinomem to bylo 11,73 ± 2,40 (**tab. 6**) (Sánchez et al., 2004).

DNAstrand breaks	Controls	Breast cancer patients
ssb	18.00 ± 4.67	24.08 ± 4.96
dsb	7.99 ± 3.67	13.11 ± 3.20

Tabulka 5 Procenta zlomů v PBL pacientek a kontrolních jedinců (převzato z Sánchez et al., 2004)

DNAstrand breaks	Controls	Breast cancer patients
ssb	6.23 ± 1.44	11.73 ± 2.40
dsb	2.31 ± 1.09	6.33 ± 1.75

Tabulka 6 Tail moment v PBL pacientek a kontrolních jedinců (převzato z Sánchez et al., 2004).

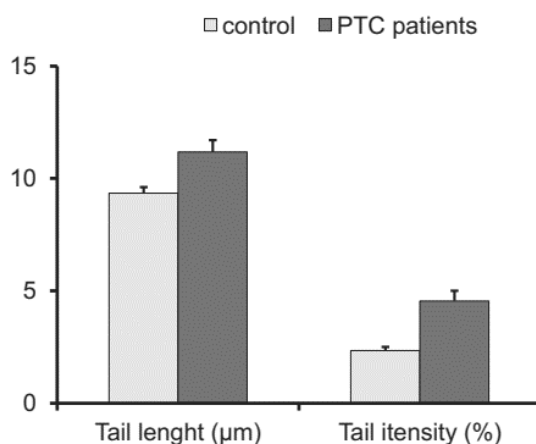
Alapetite et al. (1999) se ve své studii zabývali otázkou, zda hypersenzitivita normálních tkání, kterou posuzovali z pohledu závažnosti reakce na radiační terapii, hraje

roli v opravě DNA. Porovnávali lymfocyty ozařované *in vitro* při 5 Gy (jednotka absorbované dávky záření) od 17 pacientů s rakovinou prsu a 9 pacientů s Hodgkinovým lymfomem, u kterých se rozvinula závažná reakce na radioterapii, 22 pacientů s “průměrnou“ reakcí a 24 zdravých jedinců. Pomocí alkalického kometového testu, analyzovali odezvy v poškození DNA v závislosti na čase. Rozdíl byl pozorován 30 a 60 min po ozáření u všech skupin. Bazální úroveň poškození DNA u neozařených PBL se významně nelišila mezi skupinami. U lymfocytů, ve kterých bylo poškození DNA zjištěno okamžitě po *in vitro* ozáření 5 Gy, nebyl pozorován žádný významný rozdíl. Měření poškození DNA po ozáření 2 Gy vedlo ke stejnému závěru. Jejich výsledky naznačují, že snížená efektivita opravy DNA může být spojená s individuálním rizikem velké toxicity od ozařování. Proto se stanovení alkalickým kometovým testem zdá být užitečné pro dokumentování opravy DNA u pacientů s nádorovým onemocněním (Alapetite et al., 1999).

V další studii Kosti et al. (2011) hodnotili souvislost kinetiky opravy DNA pomocí kometového testu s rizikem rakoviny prostaty. Studie zahrnovala tři skupiny. První skupinu tvořilo 55 pacientů s rakovinou prostaty, druhou skupinu 53 zdravých jedinců a třetí skupinu tvořilo 71 mužů po rakovině prostaty, kterým bylo potvrzeno biopsií, že jsou bez nádorového onemocnění. Souvislost byla zkoumána v první fázi v časovém rozmezí 0–15 min a ve druhé fázi v rozmezí 15–45 min po gama ozáření. I když bylo poškození 45 minut po ozařování u všech skupin stejné (65 % DNA v ocasu bylo opraveno), byly zde rozdíly dle časových intervalů. V první fázi po ozáření měli pacienti s rakovinou prostaty opraveno 38 % poškození DNA oproti 42 % u zdravých jedinců a 40 % u pacientů po rakovině. Ve druhé fázi po ozáření bylo u pacientů s rakovinou 27 % poškozené DNA opraveno oproti 22 % u zdravých jedinců a 23 % u pacientů po rakovině. Když byli pacienti s rakovinou rozděleni do skupinek podle účinnosti opravy poškození DNA, vyšší efektivita opravy během prvních 15 min po ozáření nebyla spojena s rizikem karcinomu prostaty, zatímco vyšší efektivita v období 15–45 min po ozáření byla spojena se zvýšeným rizikem. Výsledky studie naznačují, že kinetika opravy DNA se nepatrně liší mezi pacienty s rakovinou oproti pacientům bez rakoviny (Kosti et al., 2011).

Rakovina štítné žlázy představuje sice pouze 2,1 % všech rakovin, ale je to jedna z nejrychleji rostoucích typů rakoviny na světě. Tým Marka (2015) zkoumal pomocí kometového testu cytogenetický stav 23 neléčených pacientů s papilárním karcinomem štítné žlázy v porovnání s 23 zdravými jedinci. Pacienti s rakovinou vykazovali vyšší

poškození DNA v PBL. Hodnoty délky ocasu a intenzity ocasu komety byly u pacientů s rakovinou 1,20krát a 1,94krát větší než u kontrolních vzorků (**obr.10**) (Marko et al., 2015).



Obrázek 10 Průměrné hodnoty délky ocasu a intenzity ocasu zdravých jedinců a pacientů s papilární rakovinou štítné žlázy (převzato z Marko et al., 2015).

Rakovina hlavy a krku jsou šestou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu po celém světě. Toto onemocnění zahrnuje zhoubné léze vznikající v ústní dutině, hrtanu a hltanu, slinných žlázách a ve vedlejších nosních dutinách. Pacienty s těmito typy rakoviny se ve své studii zabývali Milonski et al. (2015), kteří vyšetřovali aktivitu antioxidantních enzymů – koncentrace SOD, katalázy, G-Px a MDA – v krvi 24 pacientů s rakovinou hlavy a krku v porovnání s kontrolní skupinou. K vyhodnocení poškození DNA byl použit kometový test. Výsledky ukázaly statisticky nevýznamné zvýšení koncentrace MDA a pokles SOD, CAT a G-Px ($p > 0,05$) u pacientů s karcinomem ve srovnání se zdravými kontrolními jedinci. Míra oxidačního poškození DNA u pacientů s rakovinou byla statisticky výrazně vyšší než u kontrolní skupiny ($p \leq 0,001$). Jejich pozorování naznačují, že pacienti s rakovinou hlavy a krku mohou mít poškozený antioxidantní obranný systém, což má za následek poškození DNA a nestabilitu genomu. Významný je i fakt, že nerovnováha mezi oxidačními a antioxidantními činidly může být spojena se složitým mechanismem, který vede k poškození DNA, které lze indikovat v krvi pacientů s nádorovým onemocněním hlavy a krku (Milonski et al., 2015).

4. ZÁVĚR

Kometový test je osvědčená, velmi užitečná metoda pro měření poškození DNA u mnoha různých patologických a fyziologických jevů. Co se týče měření zlomů vláken DNA, kometový test patří mezi nejcitlivější dostupné metody a k jeho dalším výhodám patří rychlost a jednoduchost. Jedinečným aspektem této metody je její schopnost detekovat poškození na úrovni individuální buňky.

Jak je popsáno v mé práci, tato metoda může být použita ve studiu neurodegenerativních a kardiovaskulárních onemocnění, diabetus mellitus, těžkých onemocnění nebo rakoviny.

Mnoho článků se shoduje, že oxidační poškození DNA je jednou z prvních detekovatelných událostí v raných fázích neurodegenerativního procesu a může přispívat k mitochondriální dysfunkci tím, že udržuje oxidační stres v neuronech, což vede k neurodegeneraci.

Řada článků také poukazuje na statisticky významně zvýšené poškození DNA v patogenezi pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a také s diabetem.

Použití této metody pro sledování hojivých procesů u pacientů s polytraumatem a sepsí není ještě bohužel zcela jasné kvůli nedostatku informací.

U nádorových onemocnění je tato metoda užitečná pro měření poškození DNA před, v průběhu a po léčbě (buď radioterapií, nebo chemoterapií). V mnoha publikovaných článcích zabývajících se různými typy rakoviny kometový test prokázal, že nejen vlastní nádorové onemocnění, ale i léčba rakoviny může způsobit poškození DNA.

5. SEZNAM ZKRATEK

8OHdG	8 – hydroxy – 2 – deoxyguanosin
8 – oxoG	8 – oxoguanin
AD	Alzheimerova choroba
ALI	acute lung injury, akutní poranění plic
AP místa	apurinové/apyrimidinové místo, místo bez dusíkaté báze
ARDS	acute respiratory distress syndrome, syndrom akutní dechové tísně
BER	base excision repar
BUdR	bromodeoxyuridin
C – MN	centromerově negativní MN
C + MN	centromerově pozitivní MN
CAD	coronary artery disease, ischemická choroba srdeční
CAT	kataláza
CVD	cardiovascular disease, kardiovaskulární onemocnění
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	double-strand break(s), dvouřetězcové(ý) zlom(y)
Endo III	endonukleáza III
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FPG	formamidopyrimidin DNA glykosyláza
G-Px	glutathion peroxidáza
GC	plynová chromatografie
GSH	glutathion
HBA _{1c}	glykosylovaný hemoglobin
HMP	high melting point, agaróza s vysokým bodem tání
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICU	intensive unit care, jednotka intenzivní péče

IDDM	inzulin dependentní diabetes mellitus
LMP	low melting point, agaróza s nízkým bodem tání
MCI	mild cognitive impairment, mírná kognitivní porucha
MDA	malondialdehyd
MN	mikronukleární, mikrojádru
MS	hmotnostní spektrometrie
NAC	N-acetylcystein
NER	nucleotide excision reapi
NIDDM	non-inzulin dependentní diabetes mellitus
NMP	normal melting point, agaróza s normálním bodem tání
NO	oxid dusnatý
PBL	peripheral blood lymphocytes, lymfocyty periferní krve
PBS	phosphate buffered saline, fosfátem pufovaný solný roztok
PD	Parkinsonova choroba
P-SH	proteinové thioly
RDA	recommended dietary allowance, doporučená denní dávka
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reactive nitrogen species, reaktivní formy dusíku
SCGE	single-cell gel electrophoresis, jednobuněčná gelová elektroforéza
SOD	superoxid dismutáza
SSB	single-strand break(s), jednořetězcové(ý) zlom(y)
TAC	total antioxidant capacity, celková kapacita antioxidantů
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, reaktivní látky kyseliny thiobarbiturové
TCS	total comet score, celkové skóre komet

6. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Buňka inkubovaná s alkaloidem chelerytrinem a obarvená stříbřením	6
Obrázek 2 Schéma kometové analýzy	9
Obrázek 3 Kategorizace komet dle Kobayashiko.....	10
Obrázek 4 Kategorizace komet dle Collinse.	11
Obrázek 5 Distribuce C+MN (tmavá plocha) a C-MN (světlá plocha) v lymfocytech pacientů s PD a kontrolních jedinců.	16
Obrázek 6 Kometové snímky krevních buněk pacientů s diabetem.....	24
Obrázek 7 Index poškození DNA leukocytů periferní plné krve pacientů a kontrolních vzorků.....	25
Obrázek 8 Koncentrace urátu u zdravých pacientů v porovnání s pacienty s ALI.....	29
Obrázek 9 Koncentrace askorbátu u zdravých pacientů v porovnání s pacienty s ALI.	29
Obrázek 10 Průměrné hodnoty délky ocasu a intenzity ocasu zdravých jedinců a pacientů s papilární rakovinou štítné žlázy.....	36

7. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výsledky cytogenetických analýz lymfocytů u pacientů s AD a PD	15
Tabulka 2 Parametry vzorků dětí a dospívajících s různými kardiovaskulárními riziky	18
Tabulka 3 Studijní výsledky pacientů s CAD a pacientů s normálním koronárním oběhem.....	19
Tabulka 4 Měřené parametry v DNA a leukocytech kontrolních vzorků a pacientů s DM typu 1	22
Tabulka 5 Procenta zlomů v PBL pacientek a kontrolních jedinců	34
Tabulka 6 Tail moment v PBL pacientek a kontrolních jedinců	34

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Abilés, J., Pérez, A., Cruz, D., Castaño, J., Rodríguez-elvira, M., Aguayo, E., ... Planells, E. M. (2006). Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study. *Critical Care*, 10(5), 1–9. <https://doi.org/10.1186/cc5068>
- Alapetite, C., Thirion, P., Rochefordiere, A., Cosset, J.-M., & Moustacchi, E. (1999). Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients. *International Journal of Cancer*, 83(1), 83–90. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990924\)83:1<83::aid-ijc16>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990924)83:1<83::aid-ijc16>3.0.co;2-8)
- Arif, M., Islam, M. R., Waise, T. M. Z., Hassan, F., Mondal, S. I., & Kabir, Y. (2010). DNA damage and plasma antioxidant indices in Bangladeshi type 2 diabetic patients. *Diabetes and Metabolism*, 36(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2009.05.007>
- Azqueta, A., Meier, S., Priestley, C., Gutzkow, K. B., Brunborg, G., & Collins, A. (2011). The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. *Mutagenesis*, 26(3), 393–399. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq105>
- Bajpayee, M., Pandey, A. K., Parmar, D., Mathur, N., Seth, P. K., & Dhawan, A. (2005). Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: A study in healthy Indian females. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 565(2), 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.10.008>
- Betteridge, D. J. (2000). What Is Oxidative Stress? *Metabolism*, 49(2), 3–8. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., ... Drzewoski, J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 554(1–2), 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.05.011>
- Botto, N., Masetti, S., Petrozzi, L., Vassalle, C., Manfredi, S., Biagini, A., & Andreassi, M. G. (2002). Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, 13(5), 269–274. <https://doi.org/10.1097/00019501-200208000-00004>
- Bowler, R. P., Velsor, L. W., Duda, B., Chan, E. D., Abraham, E., Ware, L. B., ... Day, B. J. (2003). Pulmonary edema fluid antioxidants are depressed in acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 31(9), 2309–2315. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000085090.06078.8C>
- Buchynska, L., Brieieva, O., Glushchenko, N., Vorobyova, L., & Bilyk, O. (2014). DNA repair deficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients with a family history of cancer. *BMC Cancer*, 14, 2–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-765>
- Carvalho, N. C., De Souza, R. L., Dal-Pizzol, F., & Andrade, V. M. (2010). Comet assay in neonatal sepsis. *Indian Journal of Pediatrics*, 77(8), 875–877. <https://doi.org/10.1007/s12098-010-0127-9>

- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 26(3), 249–261. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>
- Cook, P. R., Brazell, I. A., & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*, 22(2), 303–324.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage : mechanisms , mutation , and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Crimi, E., Sica, V., Williams-ignarro, S., Zhang, H., Slutsky, A. S., Ignarro, L. J., & Napoli, C. (2006). The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.054>
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., & Nicotera, T. (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 347(8999), 444–445. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)90013-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)90013-6)
- Demirbag, R., Yilmaz, R., & Kocyigit, A. (2005). Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 570(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.003>
- Dinçer, Y., Akçay, T., İlkova, H., Alademir, Z., & Özbay, G. (2003). DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 527(1–2), 49–55. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(03\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(03)00073-3)
- Dizdaroglu, M. (1999). Mechanisms of oxidative dna damage; lesions and their measurement. *Advances in DNA Damage and Repair*, 67–87. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Dvořák, M., & Matejovičová, M. (2008). Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chemické Listy*, 977–983.
- Fearon, I. M., & Faux, S. P. (2009). Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(3), 372–381. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.05.013>
- Fikrova, P., Stetina, R., Hrnčiarik, M., Hrnčiarikova, D., Hronek, M., & Zadák, Z. (2014). DNA crosslinks , DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes of non-small cell lung cancer patients treated with platinum derivatives. *Oncology Reports*, 31(1), 391–396. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2805>
- Fikrová, P., Štětina, R., Hronek, M., Hyšpler, R., Tichá, A., & Zadák, Z. (2011). Application of the comet assay method in clinical studies. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 123(23–24), 693–699. <https://doi.org/10.1007/s00508-011-0066-0>
- Gamulin, M., Garaj-vrhovac, V., & Kopjar, N. (2007). Evaluation of DNA Damage in Radiotherapy-Treated Cancer Patients Using the Alkaline Comet Assay. *Collegium Antropologicum*, 31(3), 837–845.
- Gamulin, M., Kopjar, N., Grgić, M., Ramić, S., & Bišof, V. (2008). Genome Damage in Oropharyngeal Cancer Patients Treated by Radiotherapy. *Croatian Medical Journal*, 49(4), 515–527. <https://doi.org/10.3325/cmj.2008.4.515>

- Gandhi, G., Kaur, J., & Mahajan, N. (2011). Detection of Dna Damage in Obese Cardiovascular Disease Patients and Comparison Between Genders: a Case-Control Study. *International Journal of Genetics*, 3(2), 66–71. <https://doi.org/10.9735/0975-2862.3.2.66-71>
- Goode, H. F., Cowley, H. C., Walker, B. E., Howdle, P. D., & Webster, N. R. (1995). Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Critical Care Medicine*, 23(4), 646–651. Retrieved from <https://ovidsp.dc1.ovid.com/sp-4.05.0b/ovidweb.cgi?ID=shib:dc1:0xfa2934b08b254dad82dc75579227b4ce&PASSWORD=ignore&CSC=Y&T=JS&D=ovft&NEWS=n&PAGE=fulltext&AN=00003246-199504000-00011#toc>
- Halliwel, B. (2000). Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies ? How far have we come ? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(5), 1082–1087. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1082>
- Hartley, J. M., Spanswick, V. J., & Hartley, J. A. (2011). Measurement of DNA damage in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay. *Methods in Molecular Biology*, 731, 309–320. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5>
- Henderson, P. T., Neeley, W. L., Delaney, J. C., Gu, F., Niles, J. C., Hah, S. S., ... Essigmann, J. M. (2005). Urea Lesion Formation in DNA as a Consequence of Provides a Potent Source of Point Mutations. *Chemical Research in Toxicology*, 18(1), 12–18. <https://doi.org/10.1021/tx049757k>
- Hovhannisyan, G. G. (2010). Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. *Molecular Cytogenetics*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1755-8166-3-17>
- Kadioglu, E. L. A., Sardas, S., & Aslan, S. (2004). Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer ' s disease. *Biomarkers*, 2(2), 203–209. <https://doi.org/10.1080/13547500410001728390>
- Kim, J., Choi, S., Yoo, J., & Ñ, M. C. (2004). 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Letters*, 556(1–3), 104–110. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01385-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01385-1)
- Kliemann, M., Prá, D., Müller, L. L., Hermes, L., Horta, J. A., Reckziegel, M. B., ... da Silva, J. (2012). DNA damage in children and adolescents with cardiovascular disease risk factors. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 84(3), 833–840. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000039>
- Kosti, O., Goldman, L., Saha, D. T., Orden, R. A., Pollock, A. J., Madej, H. L., ... Goldman, R. (2011). DNA damage phenotype and prostate cancer risk. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 719(1–2), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.11.005>
- Kuchařová, M., Hronek, M., Rybáková, K., Zadák, Z., Štětina, R., Osková, V. J., & Patková, A. (2019). Comet Assay and Its Use for Evaluating Oxidative DNA Damage in Some Pathological States Oxidative stress Oxidative stress is associated with many human. *Physiological Research*, 68(1), 1–15. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933901>

- Kumar, K. V., Rao, S. M., Gayani, R., & Mohan, I. K. (2000). Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS. *Clinica Chimica Acta*, 298(1–2), 111–120. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(00\)00264-3](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(00)00264-3)
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>
- Loft, S., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L., & Møller, P. (2008). Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions*, 36(5), 1071–1076. <https://doi.org/10.1042/BST0361071>
- Lushchak, V. I. (2015). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. *Ukrainian Biochemical Journal*, 87(6), 11–18. <https://doi.org/10.15407/ubj87.06.011>
- Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An Assessment of Oxidative Damage to Proteins, Lipids, and DNA in Brain from Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2061–2069. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68052061.x>
- Malik, Q., & Herbert, K. E. (2012). Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Free Radical Research*, 46(4), 554–564. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.663913>
- Manfredini, V., Biancini, G. B., Vanzin, C. S., Maria, A., Dal, R., Deon, M., ... Treme, R. (2010). Simvastatin treatment prevents oxidative damage to DNA in whole blood leukocytes of dyslipidemic type 2 diabetic patients. *Cell Biochemistry and Function*, 28(5), 360–366. <https://doi.org/10.1002/cbf.1654>
- Marko, G., Janušić, R., Šarčević, B., & Garaj-Vrhovac, P. (2015). A case-control study of genotoxicity endpoints in patients with papillary thyroid cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.05.006>
- Martínez, M. C., & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive Nitrogen Species : Molecular Mechanisms and Potential Significance in Health and Disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(3), 66–702. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1993>
- Mckenna, D. J., Mckeown, S. R., & Mckelvey-martin, V. J. (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*, 23(3), 183–190. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem054>
- Migliore, L., Fontana, I., Trippi, F., Colognato, R., Coppedè, F., Tognoni, G., ... Siciliano, G. (2005). Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiology of Aging*, 26(5), 567–573. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.016>
- Migliore, L., Petrozzi, L., Lucetti, C., Gambaccini, G., Bernardini, S., Scarpato, R., ... Bonuccelli, U. (2002). Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology*, 58(12), 1809–1815. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1809>
- Milonski, J., Zielinska-Blizniewska, H., Olszewski, J., Majsterek, I., & Mrowicka, M. (2015). DNA damage and oxidant-antioxidant status in blood of patients with head and neck cancer. *DNA and Cell Biology*, 34(3), 213–219. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2706>

- Mozaffarieh, M., Schoetzau, A., Sauter, M., Grieshaber, M., Orgül, S., Golubnitschaja, O., & Flammer, J. (2008). Comet assay analysis of single – stranded DNA breaks in circulating leukocytes of glaucoma patients. *Molecular Vision*, 1584–1588.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., ... Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759–767. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>
- Ozcan, A., & Ogun, M. (2015). Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, 37–58. <https://doi.org/10.5772/61193>
- Petrozzi, L., Lucetti, C., Scarpato, R., Gambaccini, G., Trippi, F., Bernardini, S., ... Bonuccelli, U. (2002). Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease patients. *Neurological Sciences*, 23(2), 97–98. <https://doi.org/10.1007/s100720200087>
- Piperakis, S. M. (2009). Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 1–3. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9081-y>
- Pu, X., Wang, Z., & Klaunig, J. E. (2015). Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. *Current Protocols in Toxicology*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>
- Quinlan, G. J., Lamb, N. J., Tilley, R., Evans, T. W., & Gutteridge, J. M. C. (1997). Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 155(2), 479–484. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.155.2.9032182>
- Rank, N., Michel, C., Haertel, C., Med, C., Lenhart, A., Welte, M., ... Spies, C. (2000). N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: Results of a prospective, randomized, double-blind study. *Critical Care Medicine*, 28(12), 3799–3807. <https://doi.org/10.1097/00003246-200012000-00006>
- Sánchez, P., Penarroja, R., Gallegos, F., Bravo, J. L., Rojas, E., & Benítez-Bribiesca, L. (2004). DNA Damage in Peripheral Lymphocytes of Untreated Breast Cancer Patients. *Archives of Medical Research*, 35(6), 480–483. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2004.11.008>
- Sardas, S., Yilmaz, M., Oztok, U., Cakir, N., & Karakaya, A. E. (2001). Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 490(2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(00\)00157-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(00)00157-1)
- Shukla, R. K. (2018). An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41935-017-0035-5>
- Simon, L., & Carell, D. T. (2012). Sperm DNA Damage Measured by Comet Assay. *Spermatogenesis*, 137–146. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0>
- Sliwinska, A., Blasiak, J., Kasznicki, J., & Drzewoski, J. (2008). In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chemico-Biological Interactions*, 173(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.03.017>

- Varvařovská, J., Racek, J., Štětina, R., Sýkora, J., Pomahačová, R., Rušavý, Z., ... Stožický, F. (2004). Aspects of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58(10), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2004.09.011>
- Vidya, G., Suma, H. Y., Bhat, V. B., Chand, P., Rao, R. K., & Harichandrakumar, K. T. (2014). Estimation of DNA damage through Comet assay in children with Congenital Heart Disease - Case-control study. *Current Pediatric Research*, 18(1), 1–4.
- Winterbourn, C. C., Buss, I. H., Chan, T. P., Plank, L. D., Clark, M. A., & Windsor, J. A. (2000). Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 28(1), 143–149. <https://doi.org/10.1097/00003246-200001000-00024>
- Zhanataev, A. K., Moroz, V. V., Durnev, A. D., Muravyeva, M. Y., & Reshetnyak, V. I. (2010). DNA damage and cell death assessment in patients with severe multiple trauma using comet assay. *Health*, 2(5), 412–417. <https://doi.org/10.4236/health.2010.25062>