

SOUHRN

Hlavním úkolem této práce bylo prostudovat indukci a následně mechanismus reparace poškození DNA sirtým yperitem u specifických buněčných linií v dávkové závislosti a jejich vliv na cytotoxicitu yperitu. Yperit je zpuchýřující otravná látka, která může být zneužita v lokálních válečných konfliktech, při teroristických útocích nebo může dojít k náhodné expozici při likvidaci jeho zásob.

Yperit vyvolává v interakci s buňkou závažné alkylační poškození DNA, které zahrnuje přímé zlomy vláken DNA, monoaddukty s adeninem a guaninem a vznik křížových vazeb interakcí s guaniny v obou komplementárních vláknech DNA. V této práci jsme se zaměřili na křížové vazby a k jejich detekci použili metodu buněčné gelové elektroforézy (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE). Tato metoda slouží k detekci zlomů DNA a její pomocí lze hodnotit poškození DNA jednotlivých buněk. V námi použité modifikaci metody jsme u analyzovaných buněk nejdříve indukovali standardní množství zlomů DNA styrenoxidem, neboť přítomné křížové vazby brání rozplétání DNA. Ke studiu mechanismů reparace specifického poškození DNA jsme s výhodou použili buněčné linie s jasně definovanými deficity v určitých fázích opravy DNA.

Pro experimenty jsme použili linie ovariálních buněk křečička čínského AA8 a jejich mutanty UV-5 deficitní v helicázové aktivitě a mutanty UV-20 deficitní v endonukleázové aktivitě. Reparace může probíhat několika mechanismy. Je to například nukleotidová excizní reparace jako odezva buněk na působení mnoha mutagenů. Dalšími mechanismy jsou básová excizní reparace odstraňující z DNA pouze defektní bázi a komplexnější reparace zahrnující rekombinační opravu. V experimentální části této práce jsme použili několik látek ovlivňujících různé fáze reparačních procesů. Byly to inhibitory reparace DNA v polymerační fázi NER: cytosinarabinosid (AraC) + hydroxyurea (HU) a specifický inhibitor poly(ADP-ribóza)polymerázy 3-aminobenzamid. Sledovali jsme jejich vliv na opravu DNA.

Navzdory všem předpokladům jsme však zjistili, že pro reparaci buněčného poškození vyvolaného yperitem není významná helicázová ani endonukleázová reparační aktivita buněk, ale že nezbytnou součástí reparačních procesů je polymerace. Proto jsme usoudili, že oprava poškození DNA indukovaného yperitem probíhá komplexním mechanismem rekombinace DNA. Neprokázáli jsme inhibiční působení 3-aminobenzamidu na reparaci křížových vazeb v DNA. Výsledky naznačují, že křížové vazby patrně nehrají klíčovou roli v cytotoxicitě yperitu. Zdá se, že hlavní cytotoxickou lézí jsou pravděpodobně monoaddukty yperitu s DNA, což je nutné ověřit v dalších studiích.