

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

**OPRAVA POŠKOZENÍ DNA VYVOLANÉHO SIRNÝM
YPERITEM A JEHO VZTAH K CYTOTOXICITĚ**

(Diplomová práce)

ve spolupráci s
UNIVERZITOU OBRANY V BRNĚ
FAKULTOU VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedrou toxikologie

Školitelé: Doc. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.
PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové 2008

Martina Jílková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Autorka

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat lidem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Jsou to hlavně moji školitelé: Doc. RNDr. Rudolf Štětina, CSc., který mi poskytl nejen mnoho cenných rad při přípravě diplomové práce, potřebných materiálů a poznatků k použité metodě, ale také mi zásadním způsobem pomohl proniknout do řešené problematiky a způsobu vyhodnocování a interpretace výsledků.

Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Marii Vopršalové, CSc., která mi poskytla praktické rady zejména při vypracovávání této diplomové práce.

Mnohé díky patří také paní Věře Škrancové za trpělivé a pečlivé zacvičení do všech praktických činností souvisejících s použitou metodou od pasážování buněk přes průběh pokusů až po vyhodnocení výsledků.

Děkuji také všem, kteří zde nejsou uvedeni jmenovitě, ale podělili se se mnou o svoje cenné zkušenosti a jakýmkoliv, byť sebemenším, přičiněním se podíleli na vzniku této práce.

Autorka

OBSAH

<u>ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU</u>	6
<u>1 ÚVOD A CÍL PRÁCE</u>	7
<u>2 ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</u>	
2.1 Historie používání chemických zbraní	8
2.1.1 Zbraně hromadného ničení	
2.1.2 Chemické zbraně v minulosti	
2.1.3 Chemické zbraně v současnosti	
2.2 Bojové chemické látky	10
2.2.1 Rozdělení bojových chemických látek	
2.3 Zpuchýřující otravné látky	11
2.3.1 Hlavní zástupci zpuchýřujících OL	
2.3.2 Mechanismus účinku zpuchýřujících OL	
2.3.3 Toxicita zpuchýřujících OL	
2.3.4 Klinický obraz akutní intoxikace zpuchýřujícími OL	
2.3.5 Terapie akutních otrav zpuchýřujícími OL	
2.4 Sirný yperit	15
2.4.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti yperitů	
2.4.2 Mechanismus působení yperitů na DNA	
2.4.3 Použití yperitů v chemoterapii	
2.4.4 Možnosti reparace poškození DNA vyvolaného yperity	
2.4.5 Inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy	
2.4.6 Klinické účinky inhibitorů PARP	
2.4.7 Účinky dalších látek použitých v experimentální části	
2.5 Metoda	22
2.5.1 Úvod k použité metodě	
2.5.2 Historie kometového testu	
2.5.3 Princip kometového testu	
2.5.4 Modifikace kometového testu	
2.5.5 Využití kometového testu	
2.5.6 Vyhodnocení kometového testu	
<u>3 MATERIÁL A METODA</u>	
3.1 Buňky	30
3.1.1 Specifikace použitých buněčných linií	
3.1.2 Kultivace a pasážování buněk	
3.1.3 Počítání buněk	
3.1.4 Vysévání buněk	
3.1.5 Fixace buněčných kolonií	
3.2 Chemikálie a přístroje	33
3.2.1 Použité chemikálie	
3.2.2 Přístroje	
3.3 Kometový test	34
3.3.1 Roztoky pro kometový test	
3.3.2 Příprava sklíček	

3.3.3 Buněčná lýza	
3.3.4 Alkalické rozplétání DNA	
3.3.5 Elektroforéza	
3.3.6 Neutralizace	
3.3.7 Barvení	
3.3.8 Hodnocení poškození DNA	
4 <u>VÝSLEDKY</u>	
4.1 Test inhibice tvorby kolonií buněk působením HD	40
4.2 Indukce křížových vazeb	41
4.3 Reparace křížových vazeb	42
4.4 Vliv inhibitorů na reparaci CL u buněčné linie AA8	44
4.5 Vliv inhibitorů na reparaci CL u buněčných linií AA8 a UV-20	45
4.6 Vliv 3-aminobenzamidu na reparaci CL u linie AA8	46
5 <u>DISKUSE</u>	48
6 <u>ZÁVĚR</u>	53
7 <u>SOUHRN</u>	56
<u>SUMMARY</u>	58
8 <u>SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ</u>	60

ZKRATKY POUŽITÉ V TEXTU

3-AB	3-aminobenzamid
AČR	Armáda České republiky
AraC	cytosinarabinosid
BER	bázová excizní reparace
BCHL	bojové chemické látky
BUdR	bromodeoxyuridin
CL	cross-link; křížová vazba
EB	ethidium bromid
HD	sirný yperit
HMP	high melting point; vysokotuhnoucí - standardní (agaróza)
HU	hydroxyurea; hydroxymočovina
CHZ	chemické zbraně
ICL	interstrand cross-link; meziřetězcová křížová vazba
LC _{t50}	střední smrtná dávka (po inhalačním podání)
LD ₅₀	střední smrtná dávka (po p.o. a perkutánní aplikaci)
LMP	low melting point; nízkotuhnoucí (agaróza)
NER	nukleotidová excizní reparace
OCHL	otravné chemické látky
OL	otravné látky
PARP	poly(ADP-ribóza)polymeráza
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr
SCGA	single cell gel assay
SCGE	single cell gel electrophoresis
SO	styrenoxid
T-DNA	tail DNA; DNA v ohonu komety
ZHN	zbraně hromadného ničení

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Sírný yperit byl poprvé použit německou armádou již v průběhu první světové války u belgického města Ypres, podle kterého dostal také svůj název, jako bojová chemická látka se zpuchýřujícím účinkem. Přestože dnes platí Úmluva o zákazu chemických zbraní, dosud nebyly všechny zásoby této (ale i jiných) nebezpečné látky zlikvidovány. Proto představuje i dnes riziko použití při teroristických útocích nebo náhodné expozice osob při likvidaci jeho zásob.

Hlavním klinickým projevem expozice yperitu jsou závažné kožní léze, které se zdlouhavě a jen obtížně hojí, často s trvalými následky. Dosud však není přesně znám mechanismus cytotoxického působení yperitu.

Při interakci s buňkou může yperit reagovat hned s několika molekulami, ale za nejpodstatnější se považuje jeho interakce a tvorba kovalentních vazeb s DNA. Yperit působí jako alkylační činidlo, které vytváří s DNA monofunkční, či bifunkční (křížové vazby) addukty, což je pravděpodobně hlavní příčinou cytotoxicity yperitu.

Cílem této práce je prostudovat indukci křížových vazeb v DNA yperitem, následně mechanismy reparace tohoto buněčného poškození, vliv specifických inhibitorů reparace na rychlost a průběh opravy křížových vazeb a jejich vztah k cytotoxicitě.

K pokusům použijeme specifické buněčné linie s jasně definovanými vlastnostmi. Jedná se o ovariální buňky křečička čínského, které jsou deficitní v určitých fázích reparace.

2 ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Historie použití chemických zbraní

2.1.1 Zbraně hromadného ničení

Mezi zbraně hromadného ničení (ZHN), tj. zbraně působící hromadné ztráty živé síly, patří jaderné, biologické a chemické zbraně (CHZ). Jako zbraně hromadného ničení byly biologické zbraně a CHZ definovány Komisí OSN pro konvenční zbrojení v r. 1948. CHZ patří bezesporu k historicky nejstarším. Své prvopočáteční krůčky udělaly – i když se tak ještě nenazývaly – v hlubokém dávnověku. Domorodci, který obrátil otrávený šíp nebo pochodeň ne proti zvířeti, ale proti jinému člověku, patří asi primát názvu chemický válečník (BAJGAR, 1996).

2.1.2 Chemické zbraně v minulosti

Z historických pramenů víme o tom, že se již asi 2000 let př. n. l. používaly toxické dýmy obsahující i vyluhované extrakty z rostlin, které vyvolávaly hromadný spánek. Tyto dýmy jsou popisovány v čínských pramenech z doby dynastie Sun. Další zmínky o jejich použití pochází z dob starověkého Řecka a Říma (BAJGAR, 1996).

První použití otravných látek (OL) na evropské půdě bylo produktem české vynalézavosti (PROKEŠ, 2005). Při obléhání Karlštejna v r. 1422 do něj pražané (husité), vedeni Zikmundem Korybutovičem, vrhli 1822 soudků s obsahem pražských žump. Zápach v hradu byl prý nesnesitelný a sirovodík uvolněný z fekálií zřejmě způsobil intoxikace – obráncům začaly vypadávat vlasy, dostavily se žaludeční a střevní potíže (BAJGAR, 1996).

Poprvé byly moderní CHZ v masovém měřítku použity během 1. světové války. Za počátek éry CHZ je považován útok německých vojsk s použitím chlóru dne 22. 4. 1915 u belgického města Ypres v západních Flandrech proti Francouzům. Výsledkem plynového útoku bylo 15 000 zasažených osob, z nichž do 2 dnů zemřela jedna třetina (BAJGAR, 1996).

Dne 12. 7. 1916 použila německá armáda neočekávaně na stejném místě (Ypres) novou OL se zpuchýřujícím účinkem. Po použití u Ypres vešla do historie pod názvem yperit (BAJGAR, 1996). Ačkoliv byl yperit zařazen do chemické výzbroje válčících mocností teprve v závěru 1. světové války, převyšovaly zdravotnické ztráty jím způsobené osmkrát ztráty vyvolané všemi ostatními OL za celý průběh války (KASSA, 1993). Proto byl také někdy nazýván „králem plynů“ (PRYMULA, 2002).

Celkově bylo na bojištích 1. světové války použito kolem 45 druhů otravných chemických látek (OCHL), z nichž 18 bylo smrtících a 27 v různé míře dráždivých. Nejnebezpečnějšími byli především chlór, fosgen, difosgen, kyanovodík a yperit. Množství použitých OL dosáhlo 110 000 - 120 000 tun. Zasaženo a intoxikováno bylo 1 300 000 osob, z nichž skoro 100 000 zemřelo. Efektivnost chemických zbraní ve srovnání s klasickou municí byla zřejmá na první pohled: 1 tuna otravných látek způsobila zhruba dvojnásobek ztrát připadajících na tradiční výbušniny. Přičemž zdravotnické ztráty připadající na samotné látky zpuchýřující byly až sedminásobně vyšší (BAJGAR, 1996).

V roce 1986 probíhalo jednání „Konference o odzbrojení“ v Ženevě. Spojené státy a Sovětský svaz uskutečnily ukázkou svých CHZ a metod k jejich likvidaci. V roce 1989 proběhla konference v Paříži, která sehrála

významnou úlohu v úsilí o dosažení zákazu a likvidace CHZ. V roce 1993 byla podepsána Úmluva o zákazu chemických zbraní (PRYMULA, 2002).

2.1.3 Chemické zbraně v současnosti

Problematika OL a CHZ je i dnes velmi aktuální. Velmoci stále vlastní obrovská množství chemické munice. Jedná se o staré zásoby, které nejsou určeny k použití a mají být likvidovány. I přes sepsání a podepsání celosvětové Úmluvy o zákazu chemických zbraní, hrozí jejich zneužití kdekoli na světě a to nejen na poli válečném. Vzhledem k jejich velmi snadné syntéze a použití mohou být tyto látky zneužity i různými teroristickými skupinami.

Je známo, že sovětská armáda zneužívala chemické zbraně v Afganistanu. Události na Blízkém východě v letech 1980 - 1988 (irácko-íránská válka) i 1990 - 1991 (válka v zálivu – Gulf War) potvrdily, že se nejedná pouze o velmoci (PROKEŠ, 2005).

S ohledem na současnou politickou světovou situaci a s přihlédnutím k historickým zkušenostem je kladen velký důraz na výzkum a vývoj preventivních, antidotních a léčebných prostředků proti účinkům OL.

2.2 Bojové chemické látky

2.2.1 Rozdělení bojových chemických látek

Toxické látky se mohou dělit z několika různých hledisek. Podle chemického složení, zdroje, podle účinku na orgány, buňky nebo lidský organismus (nespecifický, specifický, systémový, alergizující, karcinogenní, případně jejich kombinace) (PATOČKA, 2004).

Podle převažujících účinků na systémové úrovni je možné toxické látky (z vojenského pohledu – bojové chemické látky (BCHL)) dělit na:

- a) nervově paralytické, které zasahují centrální a periferní nervový systém; tabun, sarin, soman, VX látka;
- b) zpuchýřující, které vyvolávají tvorbu puchýřů a toxicky působí na imunitní systém a ribonukleové kyseliny; yperity (HD, HN), lewisit;
- c) dušivé, které působí toxický otok plic zásahem na membrány plicních sklípků; fosgen, difosgen, chlorpikrin;
- d) všeobecně jedovaté, které blokuji přenos kyslíku z krve do tkání; kyselina kyanovodíková, kyanidy, chlorkyan;
- e) kromě nich ještě látky zneschopňující (působící dočasné fyzické, nebo psychické, většinou však ne smrtelné, zneschopnění organismu; BZ látka, LSD, fencyklidin) a dráždivé (působící potíže pouze po dobu kontaktu organismu s nimi v horních cestách dýchacích, na kůži, slzotvorně; CS látka, CR látka, adamsit) (PATOČKA, 2004).

Látky uvedené pod body a) – d) se také nazývají látkami letálními, neboť mohou způsobit smrt organismu (PRYMULA, 2002).

2.3 Zpuchýřující otravné látky

2.3.1 Hlavní zástupci zpuchýřujících OL

$\text{Cl-CH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl}$ Sirný yperit, HD	$\text{O-(CH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl)}_2$ Oxolový yperit
$(\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl})_2$ Seskviyperit	Cl-CH=CH-As-Cl_2 Lewisit

Dusíkaté yperity	$\text{CH}_3\text{-N-(CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl)}_2$ HN-1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-N-(CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl)}_2$ HN-2	$\text{Cl-CH}_2\text{CH}_2\text{-N-(CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl)}_2$ HN-3

(PATOČKA, 2004)

2.3.2 Mechanismus účinku zpuchýřujících OL

Mechanismus účinku těchto OL není dosud uspokojivě vysvětlen. Je však známo, že existuje úzká souvislost mezi účinkem zpuchýřujících OL, cytostatik a ionizujícího záření (KASSA, 1993), což v minulosti vedlo k použití některých těchto látek při chemoterapii zhoubných nádorů.

Největší pozornost je věnována zásahu zpuchýřujících OL do metabolismu nukleoproteinů buněčných jader, především do metabolismu kyseliny deoxyribonukleové (DNA). Zpuchýřující OL zde působí jako alkylační činidla (KASSA, 1993). Alkylací purinových bází mění strukturu DNA, což může vést až k jejímu rozštěpení. Degradace struktury DNA potom vede k výraznému poklesu proteosyntézy (PATOČKA, 2004).

Zpuchýřující OL se vyznačují dobrým průnikem biologickými membránami a velmi dobrou smáčenlivostí, dále interagují s enzymy a enzymovými systémy a inhibují jejich aktivitu (např. pyruvát oxidáza, hexokináza, některé peptidázy, enzymové systémy katalyzující anaerobní glykolýzu), interagují s některými aminokyselinami a bílkovinami, což může vést ke změně imunobiologických vlastností, tvorbě protilátek proti vlastním bílkovinám a následné senzibilizaci zasaženého organismu (PATOČKA, 2004).

Pro zasažení živé síly je typická dlouhá doba latence s vleklým průběhem intoxikace i hojení. Přitom výše uvedené mechanismy účinku zpuchýřujících OL probíhají již v latentním období, takže v okamžiku začátku klinických příznaků intoxikace je již ireverzibilní poškození důležitých funkcí organismu dokončeno. Tento zákeřný charakter účinku zvyšuje ve značné míře jejich bojový význam (PATOČKA, 2004).

2.3.3 Toxicita zpuchýřujících OL

I když tyto látky nedosahují toxicity nejvýznamnější skupiny OL, nervově paralytických látek (NPL), přesto není zanedbatelná. U sirného yperitu se LD₅₀ při perkutánní intoxikaci pohybuje mezi 40 – 60 mg.kg⁻¹ hmotnosti, zatímco zpuchýřujícího efektu bývá dosaženo již v dávce 0,03 – 1,0 mg.kg⁻¹. V případě perorální otravy se pohybuje hodnota LD₅₀ kolem 10 mg.kg⁻¹. Při inhalační otravě dosahuje LC_{t50} hodnoty 1,5 g.min⁻¹.m⁻³. Podobnou inhalační toxicitou se vyznačuje i lewisit, jehož hodnota LC_{t50} se pohybuje mezi 1,2 - 1,5 g.min⁻¹.m⁻³ (PATOČKA, 2004).

2.3.4 Klinický obraz akutní intoxikace zpuchýřujícími OL

LOKÁLNÍ PŘÍZNAKY – *při zasažení očí*: pálení s pocitem cizího tělesa v oku, fotofobie, slzení, chemóza spojivek, keratitida s vředy, iritida s dlouhou latencí (2-8 hodin); *při zasažení kůže*: pálení a svědění (po 4 - 6 hodinách), zarudnutí a otok (po cca 24 hodinách), vznik slévajících se puchýřů s čirým exudátem – povrchní nebo hluboká dermatitida (4-6 dní); *při zasažení dýchacího systému*: bolest za sternem, dyspnoe, kýchání a kašel, postupně se rozvíjí bronchopneumonie; *při zasažení gastrointestinálního systému* (GIT) (latence pouze několik minut): nauzea,

bolesti v epigastriu, tenesmy, slinění, úporné zvracení a průjmy s příměsí krve, rozvíjející se hypovolemický šok, hrozí nebezpečí perforace (PATOČKA, 2004).

CELKOVÉ PŘÍZNAKY – emoční labilita (deprese, melancholie), motorický neklid, ataxie, snížená odolnost vůči sekundární infekci, útlum krvetvorby z důvodu poškození kostní dřeně a poruchy metabolismu (BAJGAR, 1991).

NÁSLEDNÉ STAVY – *oči*: jizevnaté retrakce víček, zákal rohovky; *kůže*: fibrózní jizvy s hyperpigmentovým lemem, atrofická kůže bez adnex (hojení probíhá 1 – 4 měsíce); *dýchací systém*: astmoidní chronická bronchitida, fibróza plic; *GIT systém*: stenózy trávicí trubice, chronický dyspeptický syndrom; poruchy psychiky a vegetativní regulace (PATOČKA, 2004).

LEWISIT – zvláštnosti klinického obrazu intoxikace: kapilarotoxický efekt (hemoragický charakter tkáňového poškození), intoxikace uvolněným arsenem (poškození jater a ledvin), kratší latence, dramatický nástup příznaků a kratší průběh intoxikace (PATOČKA, 2004).

2.3.5 Terapie akutních otrav zpuchýřujícími OL

U těchto látek neexistuje specifické profylaktické opatření zvyšující odolnost organismu vůči jejich účinkům. V rámci první pomoci při zasažení nechráněného organismu je nutné co nejdříve odmořit zasažená místa na kůži a sliznicích (PATOČKA, 2004).

Antidotum proti účinkům yperitů (**40% natrium thiosulfát**) je schopno zabránit vlastnímu účinku yperitů – alkylaci DNA, ale pouze v případě, je – li podáno před vznikem ireverzibilních vazeb yperitu na DNA, tedy

do 30 minut po zasažení, což při několikahodinové latenci je prakticky nemožné (PATOČKA, 2004).

Rozdílná situace je při zasažení lewisitem, neboť antidotum proti lewisitu – **dimerkaptopropanol** (BAL, Sulfaktin) či jeho analog dimerkaptopropansulfát (DMPS), eliminující toxický efekt arsenu obsaženého v molekule lewisitu, je účinný po dobu 24 hodin od zasažení (PATOČKA, 2004).

2.4 Sírný yperit

= H, HD, Mustard gas, Sulphur mustard

= bis-(2-chlorethyl)sulfid; β,β -dichlordiethylsulfid

= $\text{Cl-CH}_2\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-Cl}$

2.4.1 Fyzikálně - chemické vlastnosti yperitu

V čistém stavu je yperit bezbarvá olejovitá kapalina (v technickém stavu nažloutlá až hnědočerná), charakteristického zápachu (po hořčici, křenu, cibuli či spálené gumě – v anglosaské literatuře je proto také nazýván „hořčičným plynem“). Ve vodě je nepatrně rozpustný (přesto je schopen vytvořit ve vodě zdraví nebezpečnou koncentraci), zato je dobře rozpustný v organických rozpouštědlech. Je relativně perzistentní, v zimních měsících je schopen zamořovat terén několik týdnů, v letních měsících 3 - 7 dní. Yperit je schopen pronikat neporušenou kůží a běžnými oděvy během několika minut (KASSA, 1993).

Hlavním cílem účinku sírného yperitu je molekula DNA, kterou alkyluje a vytváří křížové vazby na purinových bázích (FOX, 1980), čímž interferuje s DNA syntézou a buněčným dělením (ROSS, 1962).

2.4.2 Mechanismus působení yperitů na DNA

Yperity obecně působí jako bifunkční alkylační činidla, která mohou s cílovými molekulami – DNA, RNA, proteiny – tvořit monofunkční nebo bifunkční addukty (POVIRK, 1994).

Hopkins a kol. (1991) popsal mechanismus interakce bifunkčních alkylačních činidel s DNA. Prvotním meziproduktem je tvorba nekovalentního komplexu, který následně přechází na kovalentně vázaný monoaddukt, který může dále reagovat třemi různými způsoby:

- 1) reakce s externím nukleofilem (rozpouštědlo, protein)
- 2) reakce s bází na stejném řetězci DNA – intrařetězcová křížová vazba
- 3) reakce s bází z protilehlého řetězce DNA – interřetězcový CL (interstrand cross-link, ICL), přičemž tyto CL většinou tvoří menší část poškození DNA než monoaddukty (POVIRK, 1994).

Pro vznik yperitových adduktů je důležitá tvorba vysoce reaktivních elektrofilních N-alkylaziridiniových iontů (HEMMINKI, 1994), které pak mohou reagovat s aminoskupinami, karboxylovými, SH, OH a fosfátovými funkčními skupinami (ROSS, 1962).

Yperit se váže na nukleofilní místa DNA v poloze N⁷ guaninu, kde vzniká 7-(2-hydroxyethylthioethyl)guanin (HETEG), a v poloze N³ adeninu, kde vzniká 3-(2-hydroxyethylthioethyl)adenin (HETEA). Případně se současně váže k těmto bázím v obou komplementárních řetězcích a pak dochází k tvorbě křížových vazeb (CL), vzniká di-(guanin-7-yl-ethyl)-sulfid. Tvorba jednoduchých a dvojitých adduktů je považována za hlavní příčinu cytotoxicity HD (PAPIERMEISTER, 1991). V důsledku vzniku CL v molekulách DNA dojde k inhibici replikace, neboť CL blokují pohyb replikační vidlice.

Hlavním klinickým znakem zasažení yperitem je vznik závažných kožních lézí. Toto poškození má cytostatický účinek na buňky podkoží (především fibrocyty), které se normálně účastní hojení ran. Tyto buňky se nemohou dělit a hojení je tak ztíženo a probíhá velmi dlouho. Z toho vyplývá důležitost poznání mechanismů účinku HD a reparace jím vyvolaného poškození DNA.

2.4.3 Použití yperitů v chemoterapii

Cytotoxická chemoterapie rozličných rakovinných onemocnění se rozšířila v 50. letech 20. století a zahrnula použití mnoha alkylačních látek včetně dusíkatých yperitů – mechlorethamin (HN-2), melfalan, cyklofosamid, chlorambucil. Tyto byly prvotně používány v monoterapii, ale postupně se začlenily do efektivních kombinací (FARMER, 1994). Ze všech používaných alkylačních chemoterapeutik s cytotoxickým účinkem jsou yperity nejpotentnější (KALDOR, 1988), ale vykazují nejvyšší riziko sekundárních malignit (KALDOR, 1990).

Povirkova – Shukerova (1994) studie mutageneze dusíkatých yperitů používaných v rakovinné terapii prokázala, že mutagenní účinek těchto látek je spojen s monoaddukty i CL. To naznačuje, že pravděpodobně není možné od sebe oddělit požadovaný cytotoxický a nežádoucí mutagenní účinek dusíkatých yperitů.

2.4.4 Možnosti reparace poškození DNA vyvolaného yperity

Prvotní reparační studie prokázaly, že jak jednoduché, tak dvojité (ICL) addukty způsobené yperity jsou opravovány v bakteriálních i savčích buňkách. V savčích buňkách se poločas reparace adduktů běžně pohybuje

v řádu několika hodin (FOX, 1980), přičemž kinetika oprav CL závisí na látce, která je vyvolala (POVIRK, 1994).

Meziřetězcové CL jsou jedny z nejtoxičtějších poškození DNA, neboť jediný ICL je schopen usmrtit v reparaci deficitní bakteriální či kvasinkovou buňku a 40 ICL usmrtí stejně deficitní buňku savčí (MAGANA-SCHWENCKE, 1982; LAWLEY, 1996). ICL indukují mutace a chromozomální aberace, které mohou ústít v nekontrolované buněčné dělení a následný vznik malignit (SCOTT, 1976).

Dronkert – Kanaarova studie (2001) se zabývá způsoby oprav ICL v bakteriálních, kvasinkových a savčích buňkách a prokázala, že reparace ICL probíhá hned několika cestami – nukleotidovou excizní reparací (NER), homologní rekombinací a post-replikační/translační opravou, případně jejich kombinacemi.

Důležitým předstupněm reparace ICL je jejich rozpoznání buňkami jako prostorové deformace DNA šroubovice, nebo jako blok transkripce, či replikace. Po rozpoznání ICL je pozastaven buněčný cyklus, a pokud selže reparace, vede ICL ke smrti buněk (DRONKERT, 2001).

ICL reparace u Escherichia coli:

Tato bakterie provádí opravu ICL pomocí kombinace NER a homologní rekombinace (VAN HOUTEN, 1990; COLE, 1973).

ICL reparace u Saccharomyces cerevisiae:

Kvasinka využívá k opravě ICL hned 3 různé mechanismy: NER, homologní rekombinací a post-replikační/translační opravu (BRENDDEL, 1984).

ICL reparace u savčích buněk:

Informace o reparačních procesech u savčích buněk vychází ze dvou hlavních zdrojů. Prvním z nich jsou poznatky o reparaci ICL u kvasinkových buněk. Cesty reparace DNA zůstaly u eukaryot zachovány od *S. cerevisiae* až po člověka. Do reparace ICL - NER, homologní rekombinace, post-replikační/translační reparace - jsou u savčích buněk zapojeny podobné geny. Dalším informačním zdrojem jsou analýzy mutantních buněčných linií citlivých k látkám vyvolávajícím ICL. Většina těchto savčích buněk je odvozena od křeččích buněčných linií (COLLINS, 1993a).

Obecně však platí, že cesty reparace ICL u savčích buněk jsou mnohem komplexnější než u buněk kvasinkových či bakteriálních, přestože mají některé společné rysy (DRONKERT, 2001).

2.4.5 Inhibitory poly(ADP-ribóza)polymerázy

Berger a kol. (1979) navrhl obecnou hypotézu mechanismu buněčné smrti způsobené alkylačními látkami:

- 1) zlomy DNA se objevují jako přímý následek působení těchto látek;
- 2) zlomy DNA aktivují poly(ADP-ribóza)polymerázu (PARP), která syntetizuje velká množství homopolymerů ADP-ribóza a tím dojde k depleci buněčného NAD;
- 3) pokles hladiny NAD inhibuje glykolýzu a způsobuje ztrátu ATP nezbytného k udržení základního buněčného metabolismu.

Ztrátám NAD lze zabránit selektivními inhibitory PARP (MEIER, 1987) a současně tak buňky ochránit před poklesem hladiny ATP (MEIER, 1996).

Meierova - Millardova studie (1998) se zabývá alteracemi DNA lidských lymfocytů způsobenými sirtinovým yperitem a případným vlivem PARP

inhibitorů na tyto alterace. Studie dokazuje, že u buněk dochází po vystavení vlivu HD (sirného yperitu) k časově závislému přesmyku mezi způsoby štěpení DNA. Primárně je DNA štěpena na oligonukleosomální fragmenty charakteristické pro apoptotické buňky a následně se změni na štěpení DNA charakteristické pro buňky nekrotické. K tomuto přesmyku dochází 6 – 16 hodin po expozici HD v závislosti na jeho koncentraci (MEIER, 1998).

Vystavení buněk selektivním PARP inhibitorům vede k zablokování tohoto přesmyku a štěpení DNA zůstává ve fázi apoptózy. To v praxi znamená, že PARP inhibitory sice nemohou předcházet štěpení DNA, ale měni mechanismus buněčné smrti. Bylo by tak možno změnit nekrotickou buněčnou smrt - vyvolávající lýzu, dezintegraci buňky, aktivaci prozánětlivých působků, ve smrt apoptotickou – pomalejší, programovanou, neproliferativní, zahrnující absorpci umírající buňky a poškození tkání by pak bylo méně invazivní (MEIER, 1998).

Tento efekt je časově závislý. Nejefektivnější je aplikace PARP inhibitorů 1 hodinu před, nebo nejpozději 2 hodiny po ovlivnění HD. Pokud jsou podány později, projeví se jejich účinek „pouze“ ochranou některých metabolických pochodů (MEIER, 1998).

Mechanismus, kterým selektivní PARP inhibitory brání přesmyku fragmentace DNA z apoptotické na nekrotickou, není znám (MEIER, 1998).

2.4.6 Klinické účinky inhibitorů PARP

Mezi inhibitory PARP patří 3-aminobenzamid (3-AB). Jeho klinické účinky byly studovány na myších, u nichž byla vyvolána akutní pankreatitida intraperitoneální injekcí ceruleinu. Vážná akutní

pankreatitida se projevila edémem, infiltrací neutrofilů a prozánětlivými cytokiny, zvýšenými sérovými hladinami amylázy a lipázy, zvýšenou expresí mezibuněčných adhezivních molekul (ICAM-1), P-selektinu a expresí TGF- β (transformující růstový faktor) a VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) (MAZZON, 2006).

Tato studie prokázala, že hladiny všech výše zmíněných projevů, působků a faktorů byly významně sníženy po aplikaci 3-AB (MAZZON, 2006).

2.4.7 Účinky dalších látek použitých v experimentální části

Styrenoxid

Styrenoxid (SO) tvoří v molekule DNA vláknové zlomy (strand breaks, SB). Styrenoxid v koncentraci 400 μ M po 30 minutách působení indukuje v nepoškozených buňkách takové množství SB, které vede ke kometám s hodnotou T-DNA nad 90 %.

Pokud ale necháme SO působit na DNA ovlivněnou HD, tj. s CL, sníží se procento DNA v ohonu komety (% T-DNA), protože CL brání rozplétání DNA i přes četné SB vytvořené SO.

Cytosinarabinosid a hydroxyurea

Cytosinarabinosid (1- β -D-furanosylcytosin, AraC) a hydroxyurea (HU) působí jako inhibitory buněčné reparační. Tyto dvě látky specificky inhibují DNA polymerázu δ , která se podílí na polymerační fázi nukleotidové excizní reparační (NER).

2.5 Metoda

2.5.1 Úvod k použité metodě

Ke zpracování experimentu byla použita metoda nazývaná Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE), nebo také Single Cell Gel Assay (SCGA), či zjednodušeně comet assay (kometový test), což je metoda hodnocení jednotlivých buněk ukotvených v agarózovém gelu na podložním skličku.

V průběhu posledních 15 let se SCGE stala standardní metodou pro stanovení poškození DNA s využitím v genotoxických studiích, humánním biomonitoringu a molekulární epidemiologii, ekogenotoxikologii a v základním výzkumu poškození a reparace DNA. Tato metoda láká svojí jednoduchostí, citlivostí, variabilitou, rychlostí a ekonomičností, je schopná nám osvětlit nejen míru poškození DNA, ale také jeho typ. Zařazení specifických enzymů (k danému poškození DNA) do průběhu pokusu nám umožní detekovat například oxidované báze, UV zářením indukované pyrimidinové dimery a alkylační poškození DNA (COLLINS, 2004).

2.5.2 Historický vývoj kometového testu

V 70. letech minulého století objevil Peter Cook a kol. (COOK, 1976) přístup ke zkoumání jaderných struktur, založený na lýze buněk roztokem detergentu a koncentrované soli (NaCl). Tento roztok z buněk odstraňuje membrány, cytoplasmu a narušuje strukturu nukleosomů. Zůstává pouze nukleoid skládající se z jaderné matrix: ribonukleové kyseliny (RNA), proteinů a DNA. DNA si zachovává superhelikální (superspiralizovanou) strukturu včetně klíček, které tvořila okolo histonů. Cook a kol. tak navrhl model DNA vázané v intervalech na jadernou matrix, jako efektivně

uspořádaný soubor kliček. Tuto strukturu lze rozrušit použitím ionizujícího záření způsobujícího zlomy DNA, přičemž stačí vždy jeden zlom k rozvolnění každé jedné kličky (COLLINS, 2004).

První ukázkou „komet“, ačkoliv je tak ještě nenazývali, provedli Östling a Johanson (ÖSTLING, 1984), kteří popsali ohon komety jako DNA s rozvolněnými kličkami, která byla vytažena k anodě elektroforetickým polem, a odvolávali se na Cookův a kol. model nukleoidu. Ačkoliv nejpoužívanější variantou v současnosti je alkalická SCGE, není vysoké pH nezbytné k detekci zlomů DNA (COLLINS, 2004).

SCGE je nejčastěji využívána u živočišných buněk, nicméně byla vyvinuta modifikace k použití i u buněk rostlinných (KOPPEN, 1998).

Procento T-DNA vykazuje lineární závislost na frekvenci zlomů DNA, ale pouze do určité meze. Jakmile se míra poškození blíží stavu, kdy je všechna DNA v ohonu komety, dostaví se saturační efekt projevující se odklonem od linearitu (COLLINS, 2004).

2.5.3 Princip kometového testu

Principem kometového testu je stanovení míry poškození DNA na základě zlomů jejích vláken. Buňky jsou ukotveny v agarózovém gelu a vystaveny lyzačnímu roztoku, který z nich odstraní cytoplasmu, buněčné a jaderné membrány. Po lýze jsou buňky reprezentovány již pouze jadernou DNA, nukleoidy. DNA si zachovává stočenou strukturu.

Takto izolovanou (neporušenou) DNA bychom v mikroskopu pozorovali jako kruhový svítící bod. Můžeme ji však ovlivnit libovolnou látkou, u níž chceme stanovit, zda a v jaké míře DNA poškozuje. Poškození může mít podobu buď přímo zlomů vláken DNA, nebo alterace bází (oxidace, alkylace),

kteřá vytváří alkalilabilní místa (apurinová, apyrimidinová místa neboli abázické cukry). Tato místa jsou potom v alkalickém prostředí při rozplétání DNA přeměněna na zlomy, které rozvolňují její strukturu. Pokud vystavíme takto narušená a rozpletená vlákna DNA elektroforetickému poli, jsou vytažena z jádra a tvoří ohon komety, kterou pozorujeme po obarvení ve fluorescenčním mikroskopu.

Čím více zlomů vláken DNA je přítomno, nebo indukováno zásaditým prostředím v alkalilabilních místech, tím více DNA je vytaženo do ohonu komety a tím intenzivnější je fluorescence ohonu.

Kometový test můžeme modifikovat dle druhu pozorovaného poškození DNA a potom se může lišit i interpretace výsledků.

2.5.4 Modifikace kometového testu

Alkalická SCGE:

V 80. letech vyvinuly dvě výzkumné skupiny, Singh a kol. (SINGH, 1988) a Olive a kol. (OLIVE, 1990), nezávisle na sobě postup zahrnující vystavení buněk vysokému pH - ohony komet jsou výraznější, rozsah detekovatelného poškození je větší, ale bez vlivu na citlivost (COLLINS, 1997).

Neutrální SCGE:

Po vzoru Östlinga a Johanssona provedla Collinsova pracovní skupina důkaz toho, že neutrální pH umožňuje detekovat nízký stupeň DNA zlomů (COLLINS, 1997a). Buňky umístili nejprve do zásaditého prostředí a poté v neutrálním podrobili elektroforéze (ANGELIS, 1999). Tato modifikace snížila citlivost, ale rozšířila rozsah detekovatelného poškození (COLLINS, 2004).

Využití specifických enzymů:

Ke zpřesnění a zvýšení citlivosti kometového testu byl do jeho průběhu vložen zvláštní krok zahrnující inkubaci nukleoidů v agaróze se specifickými enzymy, které rozpoznají jednotlivé typy poškození DNA, přemění je ve zlomy a zvyšují tak intenzitu ohonu komety (DUŠINSKÁ, 1996; COLLINS, 1997b; COLLINS, 2001).

Detekce replikované DNA:

Předpokládá se, že zlomy DNA vzniklé v souvislosti s replikací zvyšují intenzitu ohonu komety. Proto byla vypracována metoda značení buněk v průběhu replikace bromodeoxyuridinem (BUdR) a následná vizualizace těchto míst specifickými anti-BUdR protilátkami. Takto značená replikovaná DNA se objevuje v ohonu, avšak po dozrání dojde k jejímu stažení do hlavy komety (McGLYNN, 1999).

Detekce intermediátů při reparaci DNA:

Zlomy, které se objevují jako meziprodukty NER UV zářením indukovaného poškození, mají většinou krátkou životnost. Proto se inkubují UV ozářené buňky s inhibitory DNA syntézy (hydroxyurea, cytosinarabinosid). V důsledku toho se hromadí zlomy DNA, což poskytuje citlivý způsob kvantifikace škodlivého působení na DNA (GEDIK, 1992).

FISH komety:

Obzvláště poučná by byla možnost lokalizovat určité chromozomy, části chromozomů (telomerickou nebo centromerickou DNA) nebo specifické geny v kometách. K tomu nám slouží fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) využívající sondy cDNA nebo oligonukleotidy rozeznávající zájmové sekvence (SANTOS, 1997; RAPP 1999).

2.5.5 Využití kometového testu

Testování genotoxicity:

SCGE se zařadila mezi standardní testy používané ke stanovení bezpečnosti nových léčiv či jiných sloučenin (HARTMANN, 2003).

Na druhé straně mince stojí chemoprotekce, k jejímuž stanovení je kometový test také vhodný. Lze například zjistit, zda některé látky rostlinného původu mohou chránit buňky před genotoxickým poškozením (DUTHIE, 1999).

Ekologický monitoring:

Některé organismy, v kombinaci s kometovým testem, mohou posloužit jako biosenzory kontaminace životního prostředí genotoxiny. Používají se například mušle ke stanovení kontaminace mořského prostředí (DIXON, 2002) a půdní červi ke zjištění přítomnosti genotoxických sloučenin v půdě (VERSCHA EVE, 1995).

Humánní biomonitoring:

S využitím kometového testu lze zjišťovat pracovní expozici genotoxickým sloučeninám nebo škodlivému záření (SOMOROVSKÁ, 1999), oxidativní poškození DNA v souvislosti s některými chorobami (např. diabetes) (COLLINS, 1998) a poškození DNA ve vztahu ke kouření (BETTI, 1994). V tomto pozorování se uplatňují značné interindividuální a intraindividuální rozdíly (COLLINS, 2004).

Výživové studie:

Bylo prokázáno, že potrava bohatá na antioxidanty a suplementace těmito látkami mimo potravu vykazuje ochranný efekt vůči DNA – pokles endogenní oxidace bází a snížení citlivosti k poškození vyvolanému H₂O₂ (POOL ZOBEL, 1997; DUTHIE, 1996).

Detekce reparace DNA:

Pomocí kometového testu můžeme také stanovit reparační kapacitu buněk. Například vystavíme lymfocyty ionizujícímu záření nebo působení H₂O₂ a následně inkubujeme, abychom umožnili reparaci. V určitých časových intervalech pak můžeme pozorovat zbývající míru poškození DNA. Stanovení reparační kapacity buněk může být využito pro pozorování inter- a intra- individuálních rozdílů v populaci (COLLINS, 2004).

2.5.6 Vyhodnocení kometového testu

Vizualizace komet:

DNA je vizualizovaná fluorescenčním mikroskopem. K barvení se nejčastěji používá ethidium bromid (EB). EB je interkalační barvivo, které se efektivněji váže k dvouvláknové DNA než k jednovláknové. Jelikož je působením zásaditého prostředí DNA rozplétána na jednotlivé řetězce, měla by být fluorescence v ohonu méně výrazná. To znamená, že čím vyšší podíl DNA je v ohonu (jednovláknová), tím slabší by měla být celková fluorescence komety. Avšak Collins a kol. zjistil, že pokles fluorescence je minimální (COLLINS, 2004).

Kvantitativní analýza komet:

Používanými parametry kvantifikace kometového testu jsou: délka ohonu, intenzita fluorescence hlavy a ohonu komety (vyjádřená jako procento DNA v ohonu; T-DNA) a „tail moment“. Délka ohonu není příliš vhodným parametrem, neboť roste pouze v malém rozmezí poškození DNA. Se vzrůstající mírou poškození DNA roste spíše intenzita fluorescence ohonu než jeho délka. Procento T-DNA je mnohem vhodnější jednotkou, neboť vykazuje lineární závislost s frekvencí zlomů DNA a umožňuje rozlišit

větší rozmezí poškození (teoreticky 0-100 % T-DNA). Částečně vypovídá i o skutečném vzhledu komety. Naproti tomu třetí parametr „tail moment“ (podíl délky ohonu a jeho intenzity) nevykazuje lineární závislost s mírou poškození DNA, ani nevypovídá nic o vzhledu komety (COLLINS, 2004).

Vizuální hodnocení komet:

Vyhodnocování komet může probíhat pomocí speciálního programu obrazové analýzy, ale i bez něj, a to pouhým lidským okem, které lze snadno vycvičit k rozlišení stupňů poškození DNA podle vzhledu komety. Pro tento způsob bodování se používá 5 tříd, od 0 (kometa bez ocasu) do 4 (téměř všechna DNA v ocasu) bodů. Pokud tedy hodnotíme 100 komet na skličku, pak je mu přiděleno 0 - 400 bodů (COLLINS, 2004).

Výběr komet:

Pro oba způsoby hodnocení platí, že komety musí být vybírány tak, aby reprezentovaly celou agarózovou plochu. To znamená, že hodnotitel musí prohlížet skličko systematicky. Musí se vyhnout okrajům gelu a vzduchových bublin. Taktéž není možné hodnotit překrývající se komety, proto je doporučené množství buněk na jedno skličko okolo 2×10^4 (COLLINS, 2004).

Kalibrace kometového testu:

Standardní metodou kalibrace kometového testu je expozice buněk γ -nebo rentgenovému záření, které vyvolá známý počet zlomů DNA. Tyto zlomy jsou rychle reparovány, proto se buňky ozařují na ledové lázni a jsou ukotveny v agarózovém gelu na skličku. To umožní minimální manipulaci a reparaci po ozáření (COLLINS, 2004).

Komety vykazují lineární závislost procenta T-DNA na obdržené dávce záření v rozmezí 0 – 8 Gy (COLLINS, 1996).

Postup detekce křížových vazeb:

Při detekci křížových vazeb (CL) v DNA pomocí kometového testu se postupuje opačně než při detekci zlomů (SB). Při detekci SB zjistíme míru poškození DNA z procentuálních hodnot DNA v ohonu komety (% T-DNA), zatímco při detekci CL komety samy o sobě nevznikají, neboť přítomnost CL brání rozplétání DNA. Proto musíme před kometovým testem buňky vystavit látce, která vyvolá standardní množství zlomů DNA, nejlépe aby se hodnota T-DNA u nepoškozených buněk pohybovala okolo 90 %. K takovéto indukci zlomů jsme použili styrenoxid (SO) po dobu 30 minut v koncentraci 400 μM , o které víme, že indukuje požadované množství SB (VODIČKA, 1996).

3 MATERIÁL A METODA

3.1 Buňky

3.1.1 Specifikace použitých buněčných linií

K pokusům jsme použili buněčné linie A88, UV-5 a UV-20. Jedná se o ovariální buňky křečička čínského izolované a popsané Thompsonem (1981). O těchto buňkách je známo, že jsou asi 100x citlivější k účinkům látek indukujících CL. Tyto buňky jsme ke studii vybrali na základě dříve publikovaných údajů (MOLLER, 2000) a předběžných studií provedených na řešitelském pracovišti.

AA8 jsou linií normálních ovariálních buněk křečička čínského (sublinie CHO).

UV-5 a **UV-20** jsou mutantní linie, deficitní v reparaci, odvozené od AA8. Buňky UV-5 a UV-20 vykazují značně zvýšenou citlivost k UV-záření v důsledku specifických defektů v excizní reparaci DNA. Linie UV-5 je deficitní v helicázové aktivitě, zatímco linie UV-20 je deficitní v endonukleázové aktivitě (THOMPSON, 1981). Mutanta UV-5 je deficitní konkrétně v proteinu ERCC2-XPD, který má 5' – 3' helicázovou aktivitu (KIRCHNER, 1994), zatímco mutanta UV-20 v proteinu ERCC1-XPF. Ten má endonukleázovou aktivitu a provádí incizi na 5' konci poškozeného místa v průběhu nukleotidové excizní reparace (NER) (PARK, 1995).

Na těchto buněčných liniích jsme zjišťovali, zda a do jaké míry je cytotoxický účinek HD závislý na rozsahu a druhu vyvolaného poškození DNA, či na účinnosti a typu reparačních mechanismů.

Buňky byly získány od Prof. Collinse (Univerzita Oslo, Norsko). Kultivovány byly v médiu MEM alfa doplněném o 10 % fetálního telecího séra a směs antibiotik.

Buňky byly pasážovány trypsinizací 2 – 3 krát týdně v poměru 1:5.

3.1.2 Kultivace a pasážování buněk

Buňky uchováváme v kultivačních lahvičkách o objemu 25 ml v termostatu při teplotě 37 °C a 5% CO₂ ve vhodném kultivačním médiu. Když buňky dorostou (změna barvy média), vytvoří na dně souvislou vrstvu a musí být každé 2 – 4 dny pasážovány.

Z kultivační lahvičky odsajeme pomocí pasteurovy pipety médium a buňky řádně omyjeme roztokem PBS. Do lahvičky napipetujeme několik mililitrů roztoku trypsinu tak, aby zcela pokrýval celé dno nádoby. Po několika minutách (liší se dle typu pasážovaných buněk) trypsin odsajeme a v nádobce ponecháme pouze nezbytně nutné množství k pokrytí celé plochy dna. Lahvičku uzavřeme a vložíme na 3 minuty do termostatu. Poté zkontrolujeme, zda jsou všechny buňky uvolněné ode dna kultivační lahvičky. Trypsinem uvolněné buňky resuspendujeme v kultivačním médiu, řádně zhomogenizujeme a nasajeme do pasteurovy pipety. V nádobce necháme pouze určitý podíl suspenze – dle dalších potřeb kultivace – asi 1 třetinu až 1 desetinu. Zbytek odpustíme do odpadní nádoby, nebo použijeme k přípravě suspenze v médiu pro vysévání buněk k pokusu. Kultivační lahvičku doplníme médiem a uložíme zpět do termostatu.

3.1.3 Počítání buněk

Buňky počítáme pro potřeby vysévání na kultivační misky k pokusu kometovým testem nebo k pozorování nárůstu kolonií na miskách po ovlivnění určitou látkou.

Buňky počítáme v Bürkerově komůrce. Buněčnou suspenzi nanese na Bürkerovu komůrku a spočítáme buňky v každém z devíti čtverců ohraničených trojitou linií. Zjistíme průměrný počet buněk v jednom čtverci, ten vynásobíme 10^4 a získáme počet buněk v 1 ml koncentrované suspenze.

3.1.4 Vysévání buněk

Buňky vyséváme do kultivačních misek o průměru 40 mm tak, aby konečný počet buněk na jedné misce byl 100 – 200 000, podle druhu pokusu a typu buněk.

Příklad výpočtu:

K pokusu potřebujeme 12 kultivačních misek. Na jednu misku pipetujeme 1,5 ml buněčné suspenze (konečné, naředěné), to znamená, že potřebujeme $1,5 \times 12 = 18$ ml konečné suspenze.

Na jedné misce potřebujeme mít 150 000 buněk, takže musíme získat suspenzi o koncentraci $150\,000 \times 12 = 1\,800\,000$ buněk / 18 ml.

Počítáním v Bürkerově komůrce jsme zjistili, že průměrný počet buněk v 1 ml koncentrované suspenze je $204,8 \times 10^4 = 2\,048\,000$.

Nyní vypočítáme, kolik ml koncentrované suspenze obsahuje potřebný počet buněk (1 800 000), tj. kolik ml budeme potřebovat k přípravě konečné ředěné buněčné suspenze: $1\,800\,000 \div 2\,048\,000 = 0,9$ ml.

Z toho plyne, že z koncentrované suspenze odsajeme 0,9 ml a rozředíme na konečných 18 ml. Buněčnou suspenzi řádně promícháme, rozpipetujeme po 1,5 ml na kultivační misky a ty umístíme do termostatu.

3.1.5 Fixace buněčných kolonií

Fixace buněk na kultivačních miskách se provádí pro potřeby pozorování nárůstu (či inhibice) buněčných kolonií po ovlivnění testovanou látkou.

Médium z misek vylijeme a buňky 2krát opláchneme roztokem PBS. Poté dno misek zakapeme fixační směsí (metanol + kyselina octová v poměru 3:1) a necháme 5 minut působit. Kyselinu slijeme, misky necháme na vzduchu řádně vyschnout a barvíme dle Giemsky. Barvu necháme 10 minut působit, odsajeme a necháme misky opět řádně vyschnout.

Tento pokus se hodnotí mikroskopem proti kontrolním (neovlivněným) miskám.

3.2 Chemikálie a přístroje

3.2.1 Použité chemikálie

- Agaróza (HMP) Low EEO (Sigma, St. Louis, USA)
- Agaróza (LMP) Low Gelling Temperature (typ VII) (Sigma, St. Louis, USA)
- Agaróza - Standard EEO (Serva - Boehringer Bioproducts Partnership, Ingelheim, Německo)
- Ethidium bromid 95% (Sigma Aldrich, Německo)
- Fosfátový pufr (PBS - tablety) (Sigma, St. Louis, USA)

- HCl p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Chelaton II p.a. (Penta, Chrudim, ČR)
- NaCl p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- NaOH p.a. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Plasty pro buněčné kultury (PAA laboratories GmbH – the cell laboratories company)
- TRIS (hydroxymethyl-aminomethan p.a.) (Penta, Chrudim, ČR)
- Triton X-100 (Laboratories, Anglie)

3.2.2 Přístroje

- Automatické pipety (HTL, Polsko)
- CO₂ inkubátor (Shellab, USA)
- Fluorescenční mikroskop Eclapse E400, zvětšení 20x/0.50 (NIKON, Japonsko)
- Laminární box AURA 2000 (Itálie)
- Lázeň 37 °C MTA, Kutesz 609/a (Maďarsko)
- Lednice 175 R (Calex), (Iberna), (Bosch)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH basic (Yelow line, Německo)
- Programové vybavení - Lucia commet assay (program obrazové analýzy); Laboratory imaging, Praha (kometový modul); Windows XP; statistický program: Sigma-stat
- Stolní počítač HP
- Světelný mikroskop (Telaval)

3.3 Kometový test

3.3.1 Roztoky pro kometový test

Lyzační roztok:

2,5 M NaCl	146,10 g	do 1000 ml
100 mM EDTA	29,225 g	do 1000 ml nebo
Na ₂ EDTA	37,224 g	do 1000 ml
10 mM Tris	1,2114 g	do 1000 ml

Na pH 10,0 upravíme koncentrovaným roztokem NaOH (nebo 12 g NaOH/1000 ml).

Před použitím přidáme 1% Triton X-100 (1 ml/100 ml roztoku).

Neutralizační roztok:

0,4 M Tris	48,456 g	do 1000 ml
------------	----------	------------

Na pH 7,5 upravíme koncentrovanou HCl (asi 30 ml na 1000 ml).

Roztok EDTA:

0,5 M EDTA	14,612 g	do 1000 ml
------------	----------	------------

Roztok pro elektroforézu:

300 mM NaOH	18 g	do 1500 ml
1 mM EDTA	3 ml 0,5 mM EDTA	do 1500 ml

Roztok ethidiumbromidu (EB):

20 µg	do 1 ml vody
-------	--------------

Všechny roztoky připravujeme čerstvé a uchováváme v lednici.

3.3.2 Příprava sklíček

a) Potažení sklíček agarózou

Připravený 1% roztok agarózy – Serva – pro elektroforézu v destilované vodě důkladně rozvaříme, aby byl roztok zcela homogenní. Rozehřátou agarózu přelijeme do 50 ml kádinky, která musí stát ve vroucí vodě, aby agaróza neztuhla a zachovala si homogennost. Do horké agarózy svisle ponoříme podložní sklíčko, které držíme za jeden okraj pinzetou. Tento čistý okraj následně poslouží pro číselný popis podložního sklíčka tužkou nebo diamantem.

Po vytažení sklíčka z agarózy jednu stranu otřeme a touto stranou položíme na plechový podnos. Musíme postupovat co nejrychleji tak, aby agaróza netuhla a vytvořila na povrchu tenký film. Sklíčka necháme na podnosu vychladnout. Když agaróza ztuhne, vložíme podnos se sklíčky do sušárny a půl hodiny vysoušíme při 60 °C.

Takto připravená sklíčka ukládáme do histologických krabic – nejlépe potaženou stranou sklíčka k sobě a čistým okrajem doprava.

b) Nanesení spodní vrstvy agarózy na sklíčko

Připravený 1% roztok standardní agarózy (HMP) v PBS řádně rozehejeme. Do středu sklíčka potaženého agarózou napipetujeme 85 µl HMP agarózy a ihned přiklopíme krycím sklíčkem. Vhodné je tento krok provádět na plechovém podnosu umístěném na ledové lázni, případně můžeme celý podnos se sklíčky přenést do lednice.

Agaróza ztuhne asi za 15 minut, ale je vhodné takto sklíčka připravit 1 hodinu předem. Teprve až před nanášením druhé vrstvy agarózy krycí sklíčka stáhneme plynulým pohybem palce.

c) Nanesení horní vrstvy agarózy na sklíčko

Rozvaříme připravený 1% roztok nízkotuhnoucí (LMP) agarózy. Po dostatečném rozehrátí umístíme nádobu s agarózou do kádinky s vodou a tu postavíme do lázně o teplotě 37 °C. Toto provedeme alespoň 20 minut předem, než máme připravené buňky. Než smícháme LMP agarózu s buňkami, nesmí mít teplotu vyšší než 37 °C. Buňky máme připravené v „ependorfce“ (pelet resuspendovaný ve 37 μ l PBS).

Pipetou k buňkám přidáme 85 μ l LMP agarózy, opatrně promícháme špičkou, nanese na podložní sklíčko do místa, kde je spodní vrstva HMP agarózy a ihned přikryjeme krycím sklíčkem. Opět necháme ztuhnout na plechovém podnosu v lednici nebo na ledové lázni.

3.3.3 Buněčná lýza

Buňky v LMP agaróze na sklíčkách by neměly být zbytečně dlouho, to znamená, že jakmile agaróza ztuhne (cca 15 minut), stáhneme plynule palcem krycí sklíčka. Podložní sklíčka vložíme opatrně, abychom nepoškodili vrstvu s buňkami, do skleněné kyvety a zalijeme dostatečným množstvím vychlazeného lyzačního roztoku.

Kyvetu se sklíčky přemístíme do lednice a 1 hodinu necháme působit lyzační roztok. Podle zkušeností mohou být sklíčka v roztoku 6 hodin i déle bez vlivu na výsledek, což je výhodné zejména pokud děláme více pokusů najednou.

3.3.4 Alkalické rozplétání DNA

Alkalický pufr pro rozplétání DNA nesmí mít před použitím teplotu vyšší než 8 °C. Již v průběhu buněčné lýzy umístíme do lednice

elektroforetický tank vhodné velikosti podle toho, kolik máme připravených sklíček s buňkami. Do elektroforetického tanku nalijeme cca 1,5 litru pufru.

Sklička umístíme do tanku vždy číslem doprava a případná prázdná místa vyplníme čistými podložními skličky bez agarózy (všechna sklička musí být převrstvena pufrem). Elektroforetický tank připojíme ke zdroji nastavenému na 25 V, ale ponecháme jej vypnutý.

Alkalické rozplétání probíhá v lednici po dobu 40 minut. Tento čas je narozdíl od buněčné lýzy potřeba dodržet vždy stejný.

3.3.5 Elektroforéza

Po 40 minutách alkalického rozplétání zapneme připojený zdroj a velikost proudu upravíme odebráním nebo přidáním alkalického pufru na hodnotu 300 mA. Všechna sklička musí být ponořena v pufre.

Elektroforéza probíhá 30 minut. I tento čas je třeba přesně dodržet.

3.3.6 Neutralizace

Ihned po skončení elektroforézy vypneme zdroj, pinzetou vyjmeme sklička z elektroforetického tanku a přemístíme do skleněné kyvety. Následně provedeme tři neutralizační cykly po 5 minutách vždy čerstvým a vychlazeným neutralizačním pufrem. Kyveta se skličky je při neutralizaci umístěna v lednici.

Po skončení neutralizace promyjeme sklička ještě destilovanou vodou (5 minut). V tomto okamžiku můžeme sklička buď ihned barvit a hodnotit, nebo je z kyvety vyjmeme a necháme agarózu vyschnout, sklička uložíme a buňky hodnotíme později (potom je potřeba sklička před barvením namočit do destilované vody v kyvetě, aby agaróza nabobtnala).

3.3.7 Barvení

K barvení použijeme roztok ethidiumbromidu (EB) - 20 µg v 1 ml destilované vody. Na sklíčko nanese 20 µl roztoku EB a přikryjeme čistým krycím sklíčkem.

3.3.8 Hodnocení poškození DNA

Poškození DNA hodnotíme pomocí počítačové obrazové analýzy za vizualizace kamerou připojenou k fluorescenčnímu mikroskopu. Buňky pozorujeme přímo v mikroskopu (vyhledávání komet) a také na obrazovce počítače, kde můžeme obraz komety dále upravovat (zaostřovat, přizpůsobovat intenzitu, upřesnit polohu konce hlavy a ocasu komety).

Na každém podložním sklíčku hodnotíme 50 komet. Údaje získané hodnocením ukládáme do souboru a dále z nich zpracováváme statistiku a grafy závislosti % T-DNA na koncentraci nebo době působení testované látky v programu Excel. Statistickou významnost výsledků hodnotíme Kruskal – Wallis a Mann – Whitney testem.

K hodnocení míry poškození buněk lze použít parametry % T-DNA a frekvence zlomů DNA/10⁹ daltonů. Tyto dva mezi sebou můžeme libovolně přepočítávat pomocí experimentálně získaného koeficientu (0,042):
zlomy/10⁹ daltonů = % T-DNA x 0,042.

Nepoškozenou DNA v mikroskopu pozorujeme jako kruhový svítící bod, zatímco s narůstajícím poškozením se tvoří komety s prodlužujícím se ohonem a vzrůstající intenzitou fluorescence.

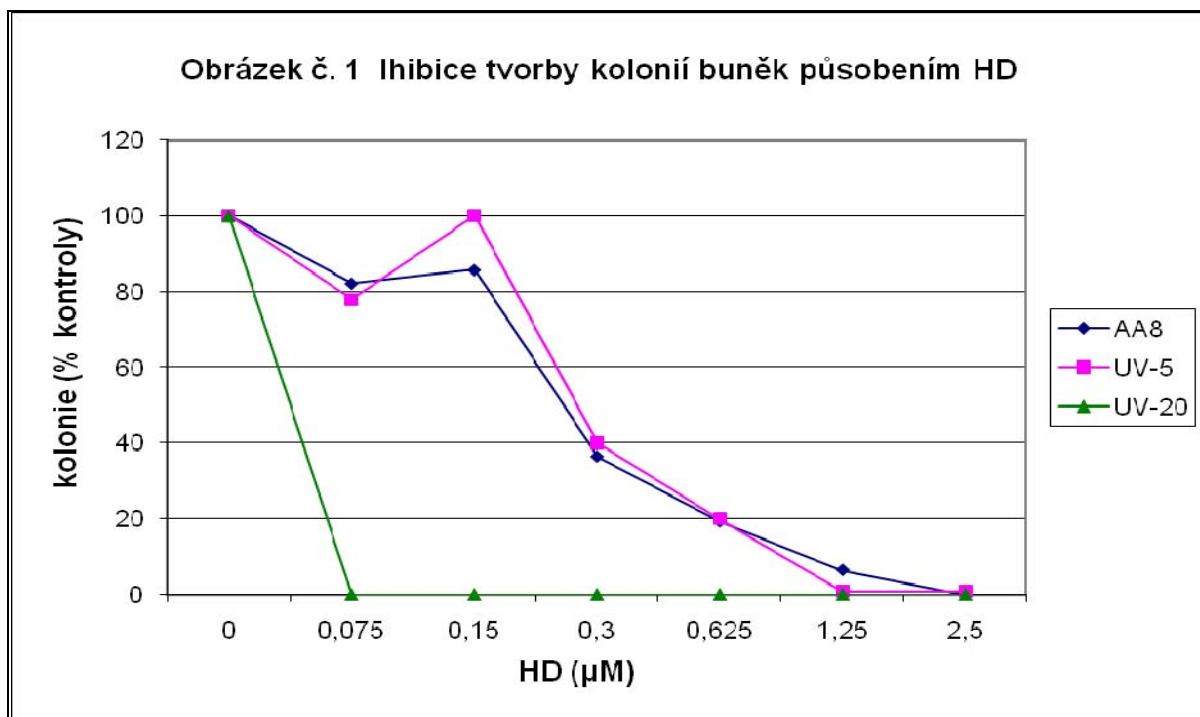
Každý pokus je validován vyhodnocením kontrolních vzorků, které byly zpracovány stejným postupem, ale bez ovlivnění testovanými látkami.

4 VÝSLEDKY

4.1 Test inhibice tvorby kolonií buněk působením HD

Porovnávali jsme cytotoxický účinek sirného yperitu (HD) na jednotlivé buněčné linie, tj. AA8, UV-5 a UV-20. Cytotoxický účinek jsme měřili testem inhibice tvorby kolonií. Buňky jsme vyseli na kultivační misky a druhý den je ovlivnili různými koncentracemi HD po dobu jedné hodiny. Po sedmi dnech jsme buňky fixovali a pozorovali počet narostlých kolonií vzhledem ke kontrolním miskám neovlivněným HD. Cytotoxický efekt je zde vyjádřen poklesem počtu narostlých kolonií buněk v porovnání s kontrolami bez působení HD.

Jak dokládá obrázek č. 1, u linií AA8 a UV-20 se cytotoxický účinek projevil již při koncentraci 0,3 μM HD částečnou inhibicí nárůstu kolonií, kdy jejich počet poklesl na 40 % vzhledem ke kontrole. Pro linii UV-20 je již koncentrace 0,075 μM HD letální. Linie AA8 a UV-5 jsou vůči HD téměř stejně citlivé, zatímco mutanta UV-20 oproti nim vykazuje mnohonásobně zvýšenou citlivost. Koncentrace 2,5 μM HD je letální pro všechny použité buněčné linie.



Obrázek č. 1 Inhibice tvorby kolonií buněk působením HD

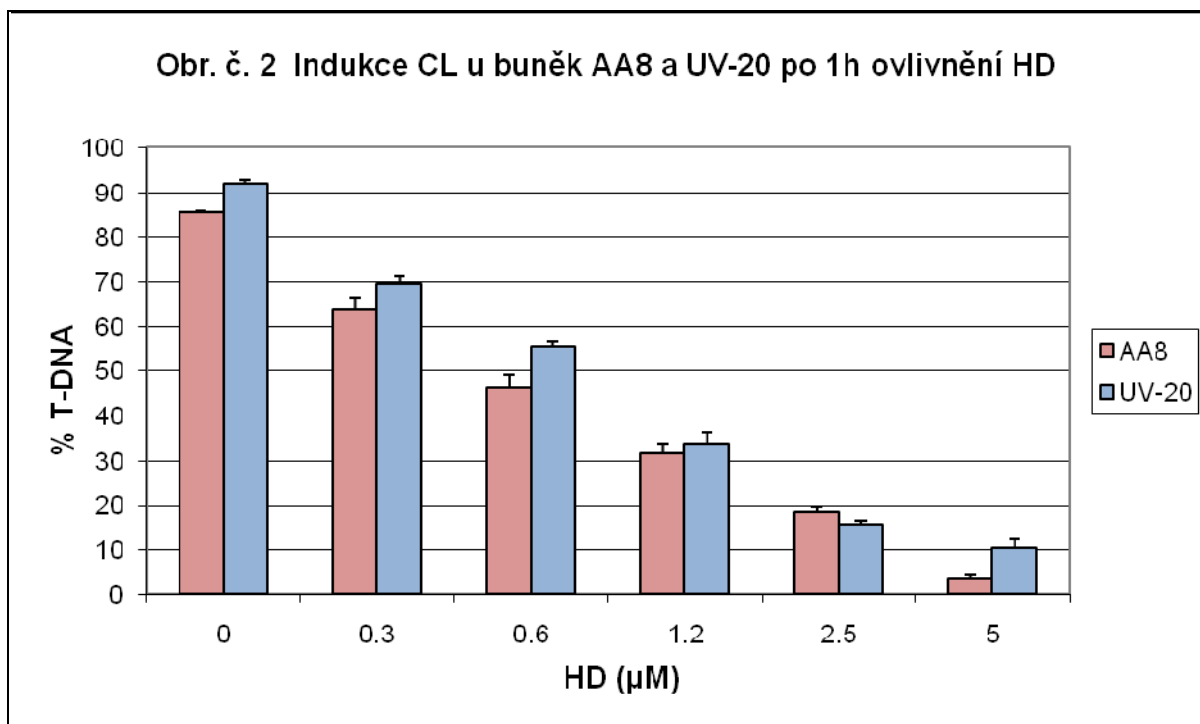
Na každou kultivační misku jsme vyseli 200 buněk (AA8, UV-5, UV-20) v 1,5 ml média a inkubovali do druhého dne. Poté jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hodiny, misky jsme opláchli PBS, přidali čerstvé médium a dále inkubovali za běžných podmínek. Za 7 dní jsme buňky fixovali směsí metanol + kyselina octová v poměru 3:1, obarvili Giemsovým barvivem a narostlé kolonie spočítali.

4.2 Indukce křížových vazeb

Sledovali jsme indukci CL u buněčných linií AA8 a UV-20. U buněk neovlivněných HD jsme působením 400 μM styrenoxidu (SO) po dobu 30 minut vyvolali v DNA vznik zlomů tak, že hodnota T-DNA je u linie AA8 85 % a u linie UV-20 92 %.

Již při ovlivnění buněk koncentrací 0,3 μM HD poklesly hodnoty T-DNA na 65 % u buněk AA8 a na 70 % u buněk UV-20 v důsledku inhibice alkalického rozplétání DNA, zapříčiněné přítomností CL. Hodnoty T-DNA nadále klesají přímo úměrně se zvyšující se použitou koncentrací HD. Ovlivnění buněk 5 μM HD indukuje v DNA takové množství CL, které zcela

brání rozplétání DNA a vytvoření komet. Obrázek č. 2 vypovídá o tom, že množství indukovaných CL je u obou buněčných linií srovnatelné.



Obrázek č. 2 Indukce CL u buněk AA8 a UV-20 po 1h ovlivnění HD

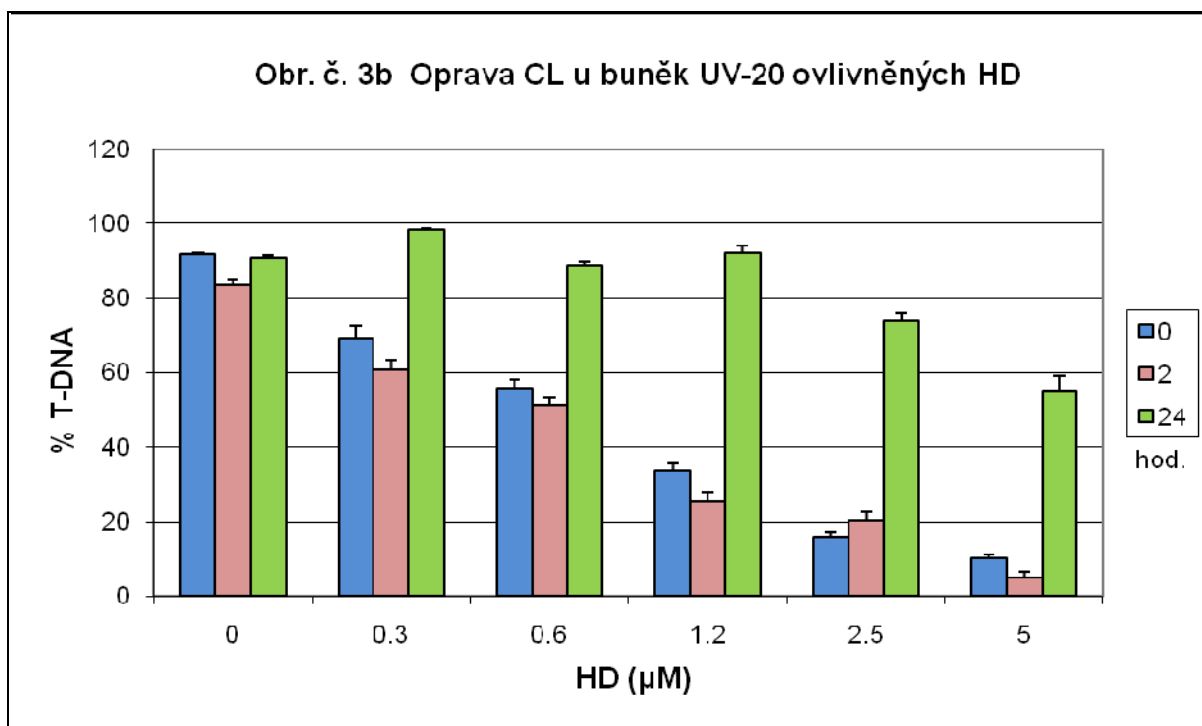
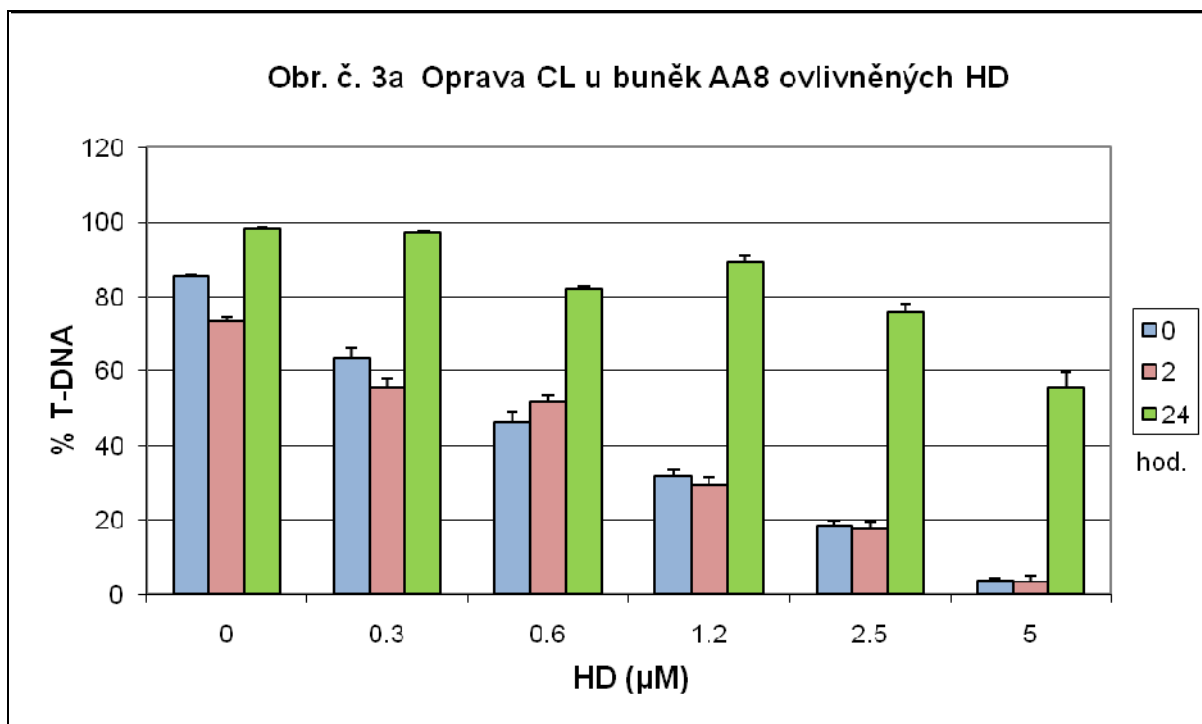
Na každou kultivační misku jsme vyseli 2×10^5 buněk v 1,5 ml média a následující den jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hodiny. Následně jsme buňky vystavili na 30 minut $400 \mu\text{M}$ SO a provedli stanovení CL kometovým testem.

4.3 Reparace křížových vazeb

Sledovali jsme míru reparace CL v časových intervalech 0, 2 a 24 hodin po ovlivnění HD a její rozdíly mezi liniemi AA8 a UV-20.

Obrázky č. 3a a 3b ukazují, že doba 2 hodiny je pro reparaci nevýznamná, neboť nedošlo k reparaci téměř žádných CL. Zatímco po 24hodinové inkubaci buňky opravily značnou část indukovaného buněčného poškození. U kultur ovlivněných HD do koncentrace $1,25 \mu\text{M}$ podíl reparovaných CL za 24 hodin dosáhl dokonce úrovně kontrol neovlivněných HD, % T-DNA je cca 90 %. Buňky tak opravily veškeré indukované poškození DNA. Při použití koncentrace $5 \mu\text{M}$ HD,

kteřá indukuję velké množství CL, nereparovaly buňky toto poškození úplně, takže hodnota T-DNA zůstala snižena na 55 %, a to jak u AA8, tak u UV-20.



Obrázek č. 3a, b Oprava CL u buněk AA8 a UV-20 ovlivněných HD

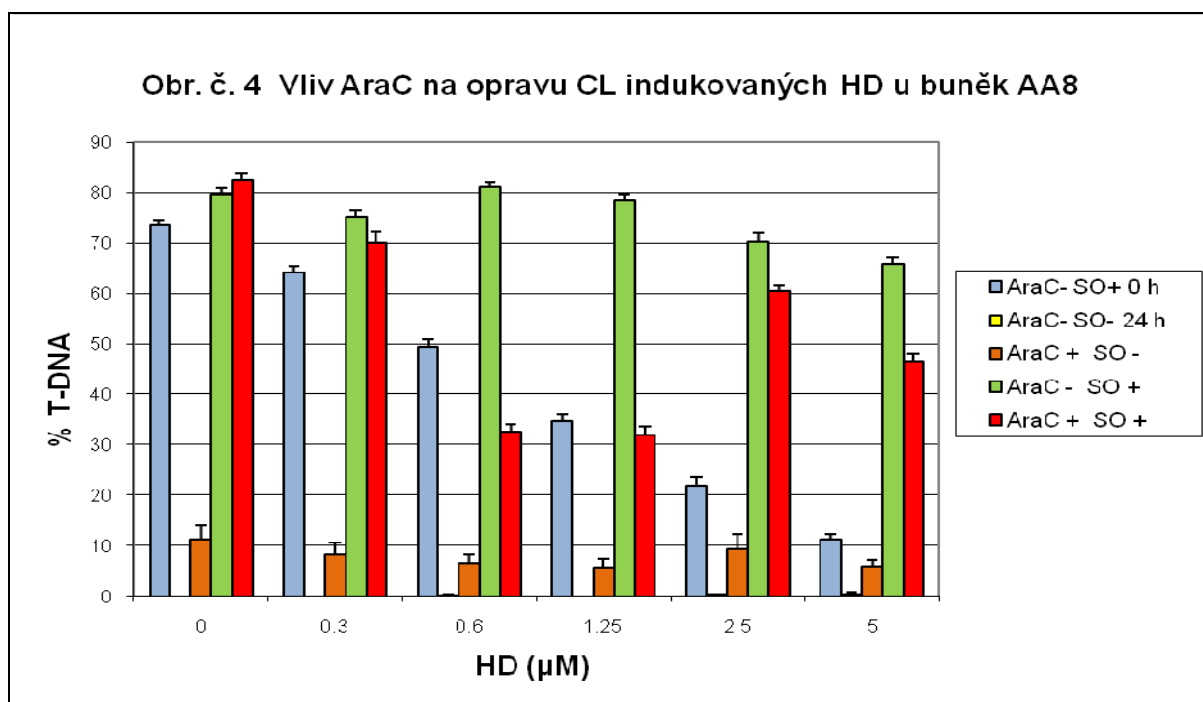
Na každou kultivační misku jsme vyseli 2×10^5 buněk a následující den jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hodiny. Poté jsme buňky inkubovali v čistém médiu a v časových intervalech 0, 2 a 24 hodin jsme buňky vystavili na 30 minut 400 μM SO a provedli stanovení CL kometovým testem.

4.4 Vliv inhibitorů na reparaci CL u buněčné linie AA8

Sledovali jsme vliv inhibitorů reparační cytosinarabinosidu (AraC) a hydroxyurey (HU), na schopnost buněk AA8 reparovat CL indukované HD.

Na obrázku č. 4 můžeme vidět údaje o buněčném poškození linie AA8 v čase 0 po ovlivnění HD a SO, které slouží jako počáteční údaj o množství indukovaných CL v DNA. V průběhu 24hodinové reparační byla podstatná část těchto CL odstraněna, takže po vystavení SO jsme detekovali kometovým testem maximální komety s hodnotou T-DNA okolo 80 %, resp. 70 % u koncentrací 2,5 a 5 μM HD.

Pokud jsme však buňky AA8 inkubovali 24 hodin s inhibitory reparační, množství opravených CL bylo sníženo v průměru o 26 %. Vliv inhibitorů na reparaci byl výraznější u buněk s větším poškozením DNA.



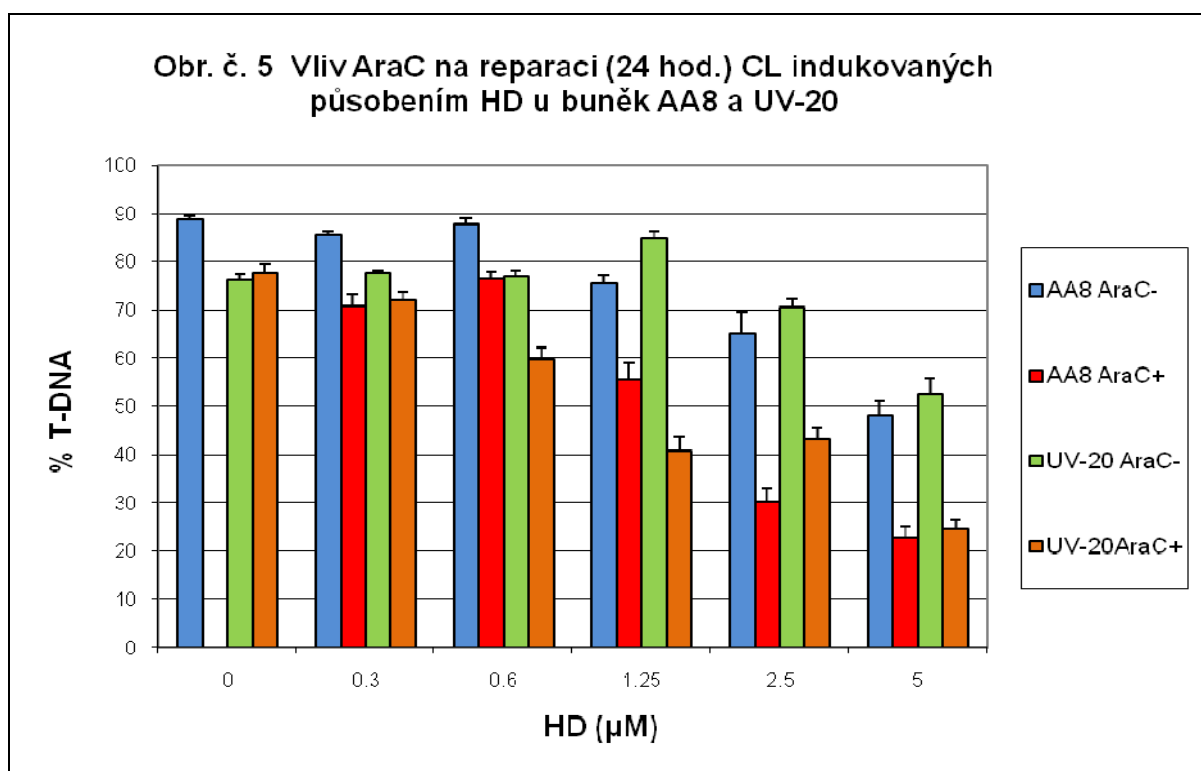
Obrázek č. 4 Vliv AraC na opravu CL indukovaných HD u buněk AA8

Na každou kultivační misku jsme vyseli 2×10^5 buněk a následující den jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hod. Poté jsme buňky inkubovali 24 hodin v médiu s nebo bez (viz legenda obrázku) 10^{-4} M AraC + 10^{-2} M HU. Před stanovením CL kometovým testem jsme buňky na některých miskách (viz legenda obrázku) na 30 minut ovlivnili $400 \mu\text{M}$ SO.

4.5 Vliv inhibitorů na reparaci u buněčných linií AA8 a UV-20

V tomto pokusu jsme sledovali rozdíly vlivu inhibitorů reparace (AraC + HD) na buněčné linie AA8 a UV-20.

Jak můžeme vidět na obrázku č. 5, je vliv AraC + HU u obou těchto buněčných linií stejný. U buněk vystavených nižším koncentracím HD byl vliv inhibitorů méně výrazný, než u buněk s rozsáhlejším poškozením DNA. U buněk ovlivněných koncentracemi do 0,6 μM HD, včetně, se účinek inhibitorů reparace projevil poklesem hodnot T-DNA v průměru o 10 %. Pokud jsme buňky ovlivnili koncentrací 2,5 a 5 μM HD, byla reparace CL inhibována výrazněji, takže hodnota T-DNA byla snížena o cca 25 %.



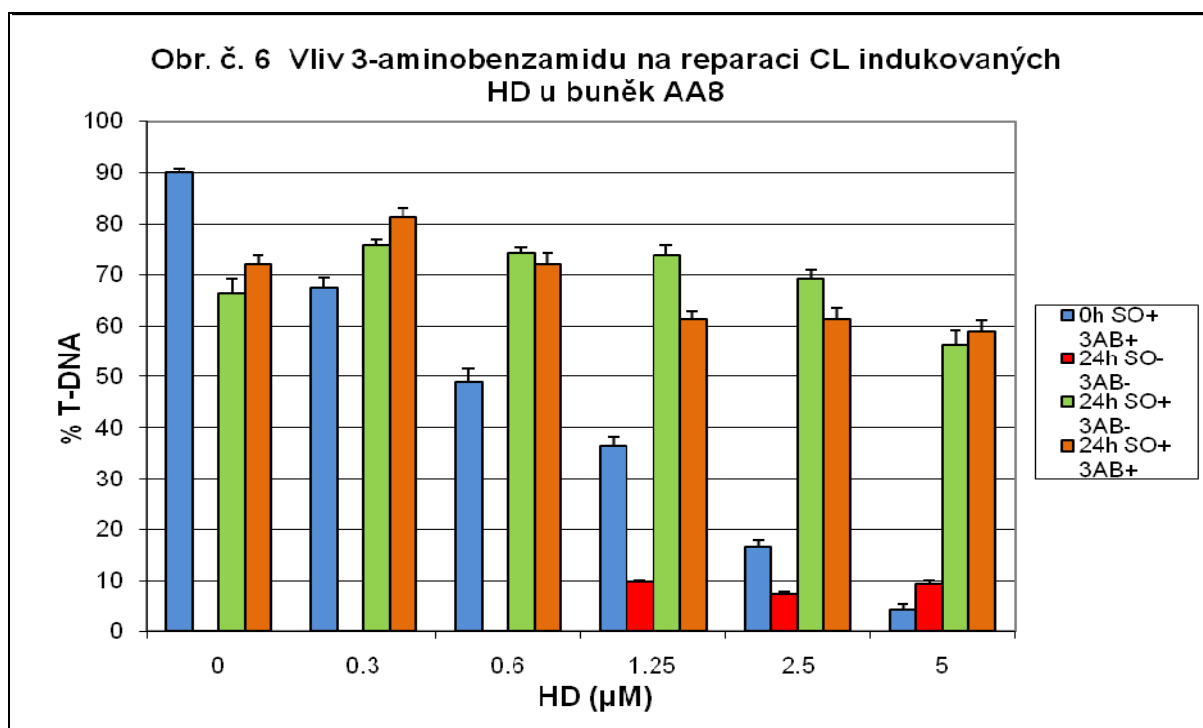
Obrázek č. 5 Vliv AraC na reparaci (24 hod.) CL indukovaných působením HD u buněk AA8 a UV-20

Na každou kultivační misku jsme vyseli 2×10^5 buněk a následující den jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hodiny. Poté jsme buňky inkubovali 24 hodin v médiu s nebo bez (viz legenda obrázku) 10^{-4} M AraC + 10^{-2} M HU. Před stanovením CL kometovým testem jsme buňky na 30 minut ovlivnili 400 μM SO.

4.6 Vliv 3-aminobenzamidů na reparaci CL u linie AA8

Sledovali jsme vliv 3-aminobenzamidů (3-AB) na reparaci CL indukovaných HD u buněčné linie AA8.

Pokud jsme buňky inkubovali 24 hodin bez 3-AB, reparaovali většinu buněčného poškození a tedy % T-DNA dosahovalo hodnot cca 70 %, resp. 60 % u buněk ovlivněných 5 μM HD. Pokud byl v průběhu reparace přítomen 3-AB, neprojevil se žádným významným vlivem na reparaci CL, tj. % T-DNA nebylo sníženo vůbec, nebo jen velmi nepatrně, což můžeme vidět na obrázku č. 6.



Obrázek č. 6 Vliv 3-aminobenzamidů (3-AB) na reparaci CL indukovaných HD u buněk AA8

Na každou kultivační misku jsme vyseli 2×10^5 buněk a následující den jsme buňky ovlivnili příslušnou koncentrací HD po dobu 1 hodiny. Poté jsme buňky inkubovali 24 hodin v médiu s nebo bez (viz legenda obrázku) 2 mM 3-AB. Před stanovením CL kometovým testem jsme buňky na některých miskách (viz legenda obrázku) na 30 minut ovlivnili 400 μM SO.

5 DISKUSE

V experimentální části jsme kromě specificky deficitních buněčných linií, na základě dříve publikovaných údajů (MOLLER, 2000), použili také specifické inhibitory polymerační fáze NER AraC + HU a PARP inhibitor 3-AB, který blokuje BER a ovlivňuje průběh buněčné smrti při vysokém poškození DNA.

Podobná studie již byla na těchto buňkách provedena i s HD, avšak její autoři (MOLLER, 2000) stanovovali zlomy DNA (SB), nikoliv CL. SB při působení HD vznikají také, ale jejich detekce je metodami využívajícími alkalické rozplétání DNA (tedy i kometovým testem) nemožná, neboť je maskována přítomnými CL, které brání rozplétání DNA.

Sledovali jsme cytotoxický účinek HD, který se projeví inhibicí tvorby kolonií, a porovnávali jej u jednotlivých použitých buněčných linií. Předpokládali jsme, že reparačně deficitní buňky UV-5 a UV-20 budou v důsledku neschopnosti opravovat CL indukované UV zářením ke křížovým vazbám indukovaným HD citlivější, než normální linie AA8.

Toto se však potvrdilo pouze z části, neboť linie UV-5 vykazovala velmi podobnou citlivost jako buňky AA8. Cytotoxický efekt u AA8 a UV-5 se projevil při koncentraci 0,3 μM HD. Mnohem citlivější pak byla mutanta UV-20, pro niž byla již koncentrace 0,075 μM HD letální. Koncentrace 5 μM HD vedla k indukci takového množství CL, které již nedovolilo rozplétání DNA ani při velkém počtu zlomů. Tyto naše poznatky jsou v souladu s údaji studie, ve které byly podobným způsobem ovlivněny lidské lymfocyty a keratinocyty (SMITH, 2000).

Na základě těchto výsledků můžeme usuzovat, že vysoká citlivost buněk linie UV-20 k působení HD souvisí s jejich deficitem v endonukleázové aktivitě a tudíž neschopnosti vystříhovat z DNA CL. Naopak linie UV-5 vykazuje citlivost podobnou buňkám normálním (AA8), z čehož můžeme vyvodit závěr, že helikáza, v níž je linie UV-5 deficitní, se na reparaci CL nijak významně nepodílí. Významnou úlohu v reparaci tak můžeme přisuzovat spíše endonukleázové aktivitě.

Dále jsme sledovali míru indukce CL yperitem v DNA a porovnávali ji u buněčných linií AA8 a UV-20. V tomto pokusu jsme zjistili, že indukce CL je u obou buněčných linií srovnatelná, tj. že není u žádné z nich výrazně vyšší. Z toho plyne, že rozdílná citlivost buněk AA8 a UV-20 k cytotoxickému působení HD není zapříčiněna rozdílnou mírou indukce poškození DNA.

Po ovlivnění nepoškozené DNA se hodnota T-DNA pohybovala okolo 90 % a byla přímo úměrná množství indukovaných zlomů, neboť rozplétání DNA v alkalickém prostředí nic nebrání, což ve své studii prokázal již Collins a kol. (1996, 1997a). Hodnota T-DNA poklesla při koncentraci 0,3 μM HD na cca 70 % a při působení 5 μM HD došlo ke kompletní inhibici rozplétání DNA, tj. bylo přítomno takové množství CL, které již nedovolí vytvoření komety, a to ani při velkém počtu SB.

Dále jsme sledovali rozsah opravy CL u buněk AA8 a UV-20 po 2 a 24 hodinách reparace a její rozdíly mezi těmito liniemi. Přitom jsme podle výsledků testu inhibice růstu kolonií očekávali, že schopnost (resp. rychlost) reparace u buněk typu UV-20 bude oproti normálním buňkám AA8 značně snížena v důsledku deficitní reparační aktivity. Toto se však nepotvrdilo.

Deficitní buněčná linie UV-20 překvapivě vykazuje stejný rozsah a rychlost reparace CL jako buňky AA8. Z toho plyne, že ani endonukleázová aktivita nehraje zásadní roli při reparaci CL a tedy, že CL nejsou opravovány mechanismem NER (nukleotidová excizní reparace), což však není v souladu s poznatky na bakteriích, kvasinkách a savčích buňkách (MATIJASEVIC, 2001). To ukazuje na mnohem složitější a komplexnější reparaci CL.

Po dvouhodinové reparaci buňky neopravily téměř žádné poškození DNA. To znamená, že je tato doba příliš krátká a pro hodnocení reparace nevýznamná. Pokud jsme však buňky ponechali opravovat DNA po dobu 24 hodin, zjistili jsme, že došlo k reparaci značné části CL. U buněk vystavených koncentracím do 1,25 μM HD se hodnota T-DNA dostala dokonce na úroveň kontrol neovlivněných HD, což značí opravu veškerého poškození DNA. Pouze u velmi rozsáhlého poškození buněk, tj. při ovlivnění 5 μM HD, není reparace tak rozsáhlá.

Nyní ještě zbývá vysvětlit, proč jsou buňky UV-20 mnohem citlivější k cytotoxickým účinkům HD, než linie AA8, když množství indukovaných CL i rychlost jejich opravy je stejná u obou těchto linií. Možným vysvětlením je, že významnou roli v toxickém působení HD hrají kromě CL, také monoaddukty yperitu s adeninem a guaninem a také to, jakým mechanismem jsou tyto léze reparovány. Je možné, že právě monoaddukty jsou hlavní příčinou cytotoxicity HD.

V dalších pokusech jsme sledovali vliv směsi AraC + HU na rozsah reparace poškozené DNA nejprve u buněk AA8 a poté i u buněk UV-20. AraC a HU působí jako inhibitory reparace (NER) ve fázi polymerace. Pokud při reparaci mechanismem NER zablokujeme polymerační fázi působením AraC, dojde k akumulaci neopravených reparačních děr,

kteře detekujeme jako zlomy DNA (ERIXON, 1979), což se projeví zvýšením % T-DNA v ohonu komety. Proto můžeme předpokládat, že reparace bude těmito inhibitory ovlivněna ve smyslu zpomalení a omezení její aktivity.

Tento předpoklad se podle výsledků naplnil, neboť jsme v našich pokusech zaznamenali naopak pokles hodnot T-DNA. Když jsme buňky inkubovali 24 hodin v přítomnosti inhibitorů reparace, bylo množství opravených CL za tuto dobu nižší, než u kontrol inkubovaných bez inhibitorů. Vliv inhibitorů reparace byl výraznější při ovlivnění buněk vyššími koncentracemi HD, počínaje 1,25 μ M HD.

Z těchto výsledků usuzujeme, že inhibitory reparace AraC a HU jsou u obou buněčných linií účinné, tj. snižují množství reparovaných lézí DNA, a to u AA8 i UV-20 ve stejné míře.

Posledním pokusem jsme sledovali vliv 3-AB na reparaci DNA. 3-aminobenzamid je specifický inhibitor reparačního enzymu poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP), u něhož se předpokládá pozitivní vliv na mechanismus reparace CL indukovaných HD a tím na průběh hojení kožních lézí způsobených CL v DNA buněk.

3-AB má schopnost měnit průběh buněčné smrti zasažených buněk v podkoží. Brání přesmyku vývoje buněčné smrti ze šetrnější apoptotické na značně invazivní nekrotickou. Tento přesmyk je charakteristický pro rozsáhlé poškození DNA a jeho inhibice, resp. blokáda ve stádiu apoptózy, může mít výrazný kladný vliv na hojení ran (MAZZON, 2006). Další studie (MEIER, 1998) dokazuje pozitivní vliv PARP inhibitorů na vývoj dějů probíhajících v buňkách s poškozením DNA ve smyslu ochrany buněčných zásob NAD, ATP a tím zachování bazálního metabolismu buněk. Tohoto by bylo možné využít v terapii kožních lézí vyvolaných expozicí HD.

V našem posledním pokusu jsme však nezaznamenali nijak významný vliv 3-AB na reparaci DNA poškozené křížovými vazbami ve smyslu inhibice. Jelikož mechanismus působení inhibitorů PARP není přesně znám, je možné, že jejich vliv se projeví výraznou inhibicí reparace DNA při použití vyšších koncentrací HD.

6 ZÁVĚR

V této práci jsme hodnotili indukci poškození DNA sirtým yperitem, který je řazen mezi zpuchýřující otravné látky s alkylačním působením na DNA, a jeho následnou reparaci na normálních – AA8 a reparačně deficitních – UV-5 a UV-20 buněčných liniích ovariálních buněk křečička čínského. Tyto buněčné linie jsou deficitní v aktivitě specifických reparačních enzymů: helikázy (UV-5) a endonukleázy (UV-20), čehož jsme využili při sledování mechanismů reparace buněčného poškození yperitem.

Ke sledování reparačních mechanismů podílejících se na opravě DNA poškozené yperitem jsme dále využili látky působící jako specifické inhibitory některých fází reparačních procesů. Jako inhibitory reparace jsme použili cytosinarabinosid, hydroxyureu a 3-aminobenzamid.

Z přesně definovaných vlastností mutantních buněčných linií jsme předpokládali, že budou zvýšeně citlivé k působení yperitu. To jsme ověřovali testem inhibice tvorby kolonií a zjistili, že mnohonásobně citlivé jsou pouze buňky UV-20. Naproti tomu vykazovaly buňky UV-5 stejnou citlivost jako normální buněčná linie AA8.

Proto jsme vyloučili možnost, že na reparaci křížových vazeb se podílí enzym helikáza, v jejíž aktivitě je linie UV-5 deficitní. Naopak bylo pravděpodobné, že v reparaci poškození DNA yperitem hraje významnou roli endonukleázová aktivita, ve které jsou deficitní buňky UV-20 vykazující mnohonásobně vyšší citlivost k yperitu.

Dále jsme sledovali rozdíly mezi buněčnými liniemi AA8 a UV-20 v indukci křížových vazeb yperitem, ve schopnosti a rychlosti jejich reparace

a následně vliv inhibitorů reparace na jejich schopnost opravovat buněčné poškození.

Zjistili jsme, že u obou buněčných linií jsou tyto procesy srovnatelné, tj. množství křížových vazeb indukovaných yperitem bylo u těchto buněk stejné. Křížové vazby DNA jsou efektivně opravovány po 24 hodinách reparace jak normálními buňkami, tak liniemi UV-20 deficitními v incizní fázi nukleotidové excizní reparace.

Z toho vyplynulo, že ani endonukleáza není klíčovým enzymem v reparaci křížových vazeb DNA. Pravděpodobným mechanismem opravy tohoto buněčného poškození tak zůstává komplexní proces zahrnující homologní rekombinaci DNA.

Vliv inhibitorů polymerační fáze reparace (cytosinarabinosidu a hydroxyurey) se prokázal jako pozitivní ve smyslu inhibice reparačních procesů v buňkách. Míra inhibice byla opět u obou buněčných linií stejná.

Tento poznatek nás vedl k závěru, že polymerace je nezbytnou součástí reparačních mechanismů probíhajících v buňkách při opravě poškození indukovaného yperitem. Z toho opět vyplývá, že na reparaci DNA se klíčovým způsobem podílí rekombinační oprava.

Při testování vlivu 3-aminobenzamidu na reparaci DNA, jsme neprokázali žádné inhibiční působení této látky na opravu buněčného poškození, což je ovšem v rozporu s dříve publikovanými pracemi, ale narozdíl od jiných autorů jsme pracovali s nižšími dávkami HD, kde se ještě účinek 3-aminobenzamidu nemusel nutně projevit.

Tyto závěry jsou však pouze předběžné. Je potřeba je ověřit na lidských buňkách, neboť reparační mechanismy, stejně jako jiné nejen buněčné procesy, probíhají v lidských buňkách velmi komplexně.

Z výsledků této práce vyvstává otázka, zda a do jaké míry jsou právě křížové vazby hlavní příčinou cytotoxicity yperitu. Je pravděpodobné, že zejména monoaddukty yperitu s adeninem a guaninem jsou hlavní cytotoxickou lézí DNA indukovanou yperitem.

7 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 báze 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: cytosinarabidosid (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 helikázová 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.

Neprokázali 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.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the induction and repair mechanisms of DNA damage caused by sulphur mustard in specific cell lines and their relationship to cytotoxicity of sulphur mustard.

Sulphur mustard is a chemical warfare agent of the blistering agent category, which can be misused in local conflicts, terrorist attacks and during liquidation of its storage.

Sulphur mustard is an alkylating agent, which interacts with a wide range of cellular macromolecules including DNA, RNA and proteins. Sulphur mustard forms single – strand breaks, monofunctional guanine and adenine adducts, as well as interstrand cross-links involving the two guanines in interaction with DNA.

This study is aimed at cross-links. We used the Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE, comet assay) for their detection. It is a method of evaluation of single cells embedded in agarose. It is used for detection of DNA single strand breaks in a single cell.

In our modification of the method we determined cross-links, which make the alkaline DNA unwinding impossible. That is why we had to induce a standard number of single strand breaks in DNA by styreneoxide (at a certain concentration and exposure time) before the comet assay.

We studied DNA repair mechanisms of specific DNA lesions using specific cell lines with clearly determined deficits in certain phases of DNA reparation.

We used Chinese hamster ovary cells, line AA8, and their mutants UV-5 deficient in helicase activity and UV-20 deficient in endonuclease activity of DNA repair for our experiments.

There are several repair mechanisms possible for DNA damage: e.g. nucleotide excision repair (NER) as a response to action of many mutagens, base excision repair (BER) which removes only one defective base and more complex recombinant repair.

In the experimental part of this study we also used several agents affecting particular stages of reparation processes. These were inhibitors of polymerisation phase of NER cytosinarabioside (AraC) + hydroxyurea (HU) and specific inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 3-aminobenzamide (3-AB). We observed their affect on reparation processes.

In contrast with our hypothesis we found out that neither helicase repair activity, nor endonuclease repair activity of deficient cell lines play significant role in DNA reparation processes, but that necessary part of these processes is polymerisation of DNA. This is the reason why we came to a conclusin that DNA damage caused by sulphur mustard is repaired by recombination.

But we did not prove the inhibition affect of 3-aminobenzamide on DNA reparation processes.

Results suggest that interstrand cross-links do not play an important role in the cytotoxicity of yperite. It seems that the main cytotoxic lesions are more likely monofunctional adducts of sulphur mustard with DNA adenines and guanines. This must be verified in subsequent studies.

8 SEZNAM POUŽITÝCH LITERÁRNÍCH ZDROJŮ

ANGELIS, K. J. – DUŠINSKÁ, M. – COLLINS, A. R. *Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity.* Electrophoresis, 1999, vol. 20, p. 1923 – 1933.

BAJGAR, J. *Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu.* Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), sv. 302, 1996, p. 4 – -22.

BAJGAR, J. – FUSEK, J. – HRDINA, V. *Vojenská toxikologie.* Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. KVĚTINA, J.), sv. 206, 1991, p. 14 – 42.

BERGER, N. A. et al., J. Clin. Invest., 1979, vol. 63, p. 1164 – 1171.

BESSHO, T. – SANCAR, A. *Investigation of DNA interstrand cross-links repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incision in 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28- nukleotide- long damage free strand.* Mol. Cell. Biol., 1995, vol. 17, p. 6822 – 6830.

BETTI, C. et al. *Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects.* Mutat. Res., 1994, vol. 307, p. 323 – 333.

BRENDEL, M. – RUHLAND, A. *Relationships between functionality and genetic toxicology of selected DNA-damaging agents.* Mutat. Res., 1984, vol. 133, p. 51 – 85.

COLE, R. S. *Repair of DNA containing interstrand cross-links in Escherichia coli: sequential excision and recombination.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, vol. 70, p. 1064 – 1068.

COLLINS, A. R. *Mutant rodent cell lines sensitive to ultraviolet light, ionizing radiation and cross-linking agents: a comprehensive survey of genetic and biochemical characteristics.* Mutat. Res., 1993a, vol. 293, p. 99 – 118.

COLLINS, A. R. – DUTHIE, S. J. – DOBSON, V. L. *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA.* Carcinogenesis, 1993b, vol. 14, p. 1733 – 1735.

COLLINS, A. R. et al. *Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?* Environ. Health Perspect., 1996, vol. 104, suppl. 3, p. 465 – 469.

COLLINS, A. R. et al. *The comet assay: what can it really tell us?* Mutat. Res., 1997a, vol. 375, p. 183 – 193.

COLLINS, A. R. et al. *UV sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts.* Environ. Mol. Mutagen., 1997b, vol. 29, p. 152 – 160.

COLLINS, A. R. et al. *DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker.* Free Radic. Biol. Med., 1998, vol. 25, p. 373 – 377.

COLLINS, A. R. – DUŠINSKÁ, M. – HORSKÁ, A. *Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay.* Acta Biochim. Pol., 2001, vol. 48, p. 611 – 614.

COLLINS, A. R. et al. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations.* Mol. Biotechnol., 2004, vol. 26, p. 249 – 261.

COOK, P. R. – BRAZELL, I. A. – JOST, E. *Characterisation of nuclear structures containing superhelical DNA.* J. Cell Sci., 1976, vol. 22, p. 303 – 324.

DIXON, D. R. et al. *Marine invertebrate eco – genotoxicology: a methodical overview.* Mutagenesis, 2002, vol. 17, p. 495 – 507.

DRONKERT, M. L. G. – KANAAR, R. *Repair of DNA interstrand cross-links.* Mutat. Res., 2001, vol. 486, p. 217 – 247.

DUŠINSKÁ, M. – COLLINS, A. R. *Detection of oxidised purines and UV induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion specific enzymes in the comet assay.* Altern. Lab. Anim., 1996, vol. 24, p. 405 – 411.

DUTHIE, S. J. et al. *Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes*. *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, p. 1291 – 1295.

DUTHIE, S. J. – DOBSON, V. L. *Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro*. *Eur. J. Nutr.*, 1999, vol. 38, p. 28 – 34.

ERIXON, K. – AHNSTRÖM, G. *Single – strand breaks in DNA during repair of UV – induced damage in normal human and Xeroderma pigmentosum cells as determined by alkaline DNA unwinding and hydroxyapatite chromatography. Effects of hydroxyurea, 5-fluorodeoxyuridine and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine on the kinetics of repair*. *Mutat. Res.*, 1979, vol. 59, p. 257 – 271.

FARMER, P. B. *Metabolism and reactions of alkylating agents*. Oxford: Pergamon Press, *Anticancer Drugs Reactive Metabolism and Drug Interactions*, (ed. POWIS, E. P.), 1994.

FOX, M. – SCOTT, D. *The genetic toxicology of nitrogen and sulfur mustard*. *Mutat. Res.*, 1980, vol. 75, p. 131 – 168.

GEDIK, C. M. – EWEN, S. W. B. – COLLINS, A. R. *Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells*. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1992, vol. 62, p. 313 – 320.

HARTMANN, A. et al. *Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay*. *Mutagenesis*, 2003, vol. 18, p. 45 – 51.

HEMMINKI, K. et al. *Nitrogen mustards and ethylene imines*. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, *DNA Adducts Identification and Biological Significance* (IARC Scientific Publication No. 125).

HOPKINS, P. B. *Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents. Importance of minimal DNA structural organization in the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatin and mitomycin C*. *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, p. 2475 – 2489.

KALDOR, J. M. – DAY, N. E. – HEMMINKI, K. *Quantifying the carcinogenicity of antineoplastic drugs*. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1988, vol. 24, p. 703 – 711.

KALDOR, J. M. et al. *Leukemia following Hodgkin's disease*. N. Engl. J. Med., 1990, vol. 322, p. 7 – 13.

KASSA, J. – KRS, O. – CABAL, J. *Základy vojenské toxikologie a ochrany proti BChL: pro posluchače VLA JEP farmaceutického směru*. Hradec Králové: Učební texty VLA JEP, (ed. PAČES, J.), 1993, sv. 273, p. 37 – 50.

KIRCHNER, J. M. et al. *Cloning and molecular characterization of the Chinese hamster nucleotide excision repair gene homologous to the XDP human gene*. Genomics, 1994, vol. 23, p. 592 – 599.

KOPPEN, G. – ANGELIS, K. J. *Repair of X ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of Vicia faba*. Env. Mol. Mutagenesis, 1998, vol. 32, p. 281 – 285.

LAWLEY, P. D. – PHILLIPS, D. H. *DNA adducts from chemotherapeutic agents*. Mutat. Res., 1996, vol. 355, p. 13 – 40.

MAGANA – SCHWENCKE, N. et al. *The fate of 8-methoxypsoralen photo-induced cross-links in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 1722 – 1726.

MATIJASEVIC, Z. et al. *Repair of sulphur mustard-induced DNA damage in mammalian cells measured by a host cell reactivation assay*. Carcinogenesis, 2001, vol. 22, suppl. 4, p. 661 – 664.

MAZZON, E. et al. *Effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly(ADP-ribose)polymerase, in a mouse model of pancreatitis induced by cerulein*. Eur. J. Pharmacol., 2006, vol. 549, p. 149 – 156.

McGLYNN, A. P. et al. *The bromodeoxyuridine comet assay: detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells*. Cancer Res., 1999, vol. 59, p. 5912 – 5916.

MEIER, H. L. – GROSS, C. L. – PAPIRMEISTER, B., *Toxicol. Lett.*, 1979, vol. 39, p. 109 – 122.

MEIER, H. L. et al., *Toxicology*, 1996, vol. 9, p. 135 – 139.

MEIER, H. L. – MILLARD, C. B. *Alterations in human lymphocyte DNA caused by sulphur mustard can be mitigated by selective inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1404, p. 367 – 376.

MOLLER, P. et al. *Sensitivity to nitrogen mustard relates to the ability of processing DNA damage in Chinese hamster ovary cells*. *Pharmacol. Toxicol.*, 2000, vol. 86, p. 169 – 177.

OLIVE, P. L. – BANÁTH, J. P. – DURAND, R. E. *Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the „comet“ assay*. *Radiat. Res.*, 1990, vol. 122, p. 86 – 94.

ÖSTLING, O. – JOHANSON, K. J. *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 123, p. 291 – 298.

PAPIERMEISTER, B. et al. *Medical defence against mustard gas: Toxic mechanisms and pharmacological implications*. CRC Press, Boca Raton, 1991.

PARK, C. H. et al. *Purification and characterization of the XPF-ERCC1 complex of human DNA repair excision endonuclease*. *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 22657 – 22660.

PATOČKA, J. et al. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2004, p. 22 – 29, 45 – 54.

POOL ZOBEL, B. L. et al. *Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid rich foods*. *Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, p. 1847 – 1850.

POVIRK, L. F. – SHUKER, D. E. *DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards*. *Mutat. Res.*, 1994, vol. 318, p. 205 – 226.

PROKEŠ, J. et al. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. Praha: Galén a Karolinum, 2005, p. 169 – 173.

PRYMULA, R. et al. *Biologický a chemický terorismus: Informace pro každého*. Praha: Grada Publishing, 2002, p. 94 – 111.

RAPP, A. et al. *Comet-fish used to detect UV-A sensitive regions in the whole human genome and on chromosome 8*. *Neoplasma*, 1999, vol. 46, p. 99 – 101.

ROSS, W. C. J. *Biological alkylating agents*. Stoneham, Massachusetts, Butterworths, 1962, p. 142 – 145.

SANTOS, S. J. – SINGH, N. P. – NATARAJAN, A. T. *Fluorescence in situ hybridisation with comets*. *Exp. Cell Res.*, 1997, vol. 232, p. 407 – 411.

SCOTT, B. R. – PATHAK, M. A. – MOHN, G. R. *Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions*. *Mutat. Res.*, 1976, vol. 39, p. 29 – 74.

SINHG, N. P. et al. *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. *Exp. Cell Res.*, 1988, vol. 175, p. 184 – 191.

SMITH, W. J. et al. *Effects of low dose sulphur mustard on growth and DNA damage in human cell in culture*. Meeting of NATO TG-004, Rijswijk, The Netherlands, 2-5 October 2000.

SOMOROVSKÁ, M. et al. *Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the comet assay with cytogenetic methods and immunology*. *Mutat. Res.*, 1999, vol. 445, p. 181 – 192.

THOMPSON, L. H. et al. *Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 3734 – 3737.

VAN HOUTEN, B. *Nucleotide excision repair in Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 1990, vol. 54, p. 18 - 51.

VERSCHAEVE, L. – GILLES, J. *Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soil.* Bull. Env. Contam. Toxicol., 1995, vol. 54, p. 112 – 119.

VODIČKA, P. *7-alkylguanine adducts of styrene oxide determined by ³²P-postlabelling in DNA of human embryonal lung fibroblasts (HEL).* Carcinogenesis, 1996, vol. 17, p. 801 – 808.