

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

# DIPLOMOVÁ PRÁCE

Oxidativní poškození DNA a jeho vztah  
k cytotoxickému účinku



Hradec Králové 2008

Hana Blahová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Mudr. Jiřímu Hochmannovi, Csc. a školiteli RNDr. Rudolfu Štětinovi, Csc. za vždy vstřícný přístup, odborné vedení a nemalé množství rad, které přispěly k vypracování této práce. Dále děkuji za všestrannou pomoc laborantce p. Věře Škrancové za ochotu a pomoc při řešení experimentálních problémů.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za podporu během celé doby studia.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsem uvedla v seznamu použité literatury a v práci řádně citovala.

V Hradci Králové 15.5 2008

---

Hana Blahová

# ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na studium oxidačního poškození DNA vyvolaného účinkem hydrogenperoxidu a na vztah tohoto poškození k cytotoxickému účinku. Opravu oxidačního poškození DNA a schopnosti přežít buněk jsme sledovali jednak u linie normálních ovariálních buněk křečička čínského AA8, a jednak u mutantní linie těchto UV-20. Pro stanovení poškození DNA jsme použili metodu modifikované jednobuněčné gelové elektroforézy – kometový test. Cytotoxický účinek jsme hodnotili pomocí testu inhibice tvorby kolonií.

Normální buňky AA8 i mutantní buňky UV-20 opravují oxidační poškození DNA přibližně stejně rychle a také jsou stejně vnímavé k cytotoxickému účinku peroxidu vodíku. Tyto výsledky naznačují, že defekt v mechanismu nukleotidové excizní reparace u buněk UV-20 nehraje v odezvě těchto buněk na oxidativní poškození DNA žádnou podstatnou roli, a že se tedy tento mechanismus na odstranění oxidačního poškození DNA nepodílí. To svědčí pro to, že hlavním mechanismem opravy oxidačního poškození DNA je mechanismus báze excizní opravy.

Klíčová slova: Oxidativní poškození DNA, hydrogenperoxid, kometový test, excizní reparace.

# ABSTRACT

This work has been focused on the study of oxidative DNA damage induced with hydrogen peroxide and on the relationship of this damage to cytotoxic effect. The repair of the oxidative DNA damage and the cell survival was followed both in normal Chinese hamster cells and their mutant derivative UV-20. The modified single cell gel electrophoresis (the comet assay,) was used to estimate the DNA damage. The cytotoxicity was measured using the inhibition of colony forming capacity of cells.

Both normal AA8 and mutant UV-20 cells repair the oxidative DNA damage with approximately the same velocity, and they show also the same sensitivity towards the hydrogen peroxide. These results indicate, that the defect in the nucleotide excision DNA repair in UV-20 cells does not play any important role in the response of these cells to the oxidative DNA damage, and therefore this mechanism is not involved in the removal of this damage. This may indicate, that the main mechanism of the repair of oxidative DNA damage is the base excision repair.

Keywords: Oxidative DNA damage, hydrogen peroxide, comet assay, excision repair.

# OBSAH

<b>1</b>	<b><u>ÚVOD</u></b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b><u>TEORETICKÁ ČÁST</u></b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>VÝSKYT RAKOVINY VE SVĚTĚ A V ČR</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>VOLNÉ RADIKÁLY A ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>12</b>
2.2.1	VOLNÉ RADIKÁLY .....	12
2.2.2	ANTIOXIDANTY .....	13
<b>2.3</b>	<b>OXIDAČNÍ STRES</b> .....	<b>14</b>
2.3.1	ZÁKLADNÍ TYPY REAKCÍ REAKTIVNÍCH SLOUČENIN .....	14
2.3.2	REAKCE HYDROGENPEROXIDU A DALŠÍCH HYDROPEROXIDŮ .....	17
2.3.2.1	Mechanismus Fentonovy reakce .....	18
2.3.2.2	Další volné radikály vznikající rozkladnými reakcemi H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	19
2.3.3	REAKCE HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU .....	20
2.3.4	REAKCE ·OH S BÁZEMI DNA .....	20
2.3.4.1	Uvolňování peroxylového radikálu při aerobní Fentonově reakci .....	22
2.3.5	DŮSLEDEK OXIDAČNÍHO STRESU .....	23
<b>2.4</b>	<b>ANTIOXIDANTY – OBRANNÝ SYSTÉM ORGANISMU</b> .....	<b>25</b>
2.4.1	POLYFENOLY – FLAVONOIDY JAKO ANTIOXIDANTY .....	25
2.4.2	HLAVNÍ LÁTKY PATŘÍCÍ MEZI FLAVONOIDY .....	26
<b>2.5</b>	<b>MĚŘENÍ OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>REPARACE DNA</b> .....	<b>32</b>
2.6.1	BÁZOVÁ EXCIZNÍ REPARACE .....	33
2.6.2	NUKLEOTIDOVÁ EXCIZNÍ REPARACE .....	36
2.6.3	MISMATCH REPARACE .....	38

<b>3 PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1 MATERIÁL.....</b>	<b>41</b>
3.1.1 BUNĚČNÉ LINIE.....	41
3.1.2 POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	41
3.1.3 CHEMIKÁLIE .....	41
<b>3.2 METODY.....</b>	<b>44</b>
3.2.1 TEST INHIBICE TVORBY KOLONÍ.....	44
3.2.2 KOMETOVÝ TEST .....	44
<b>3.3 VÝSLEDKY.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 ZHODNOCENÍ A DISKUSE.....</b>	<b>55</b>
<b>3.5 ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
<u>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</u>	<u>59</u>
<u>SEZNAM TABULEK .....</u>	<u>60</u>
<u>SEZNAM GRAFŮ .....</u>	<u>60</u>
<u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</u>	<u>61</u>
<b><u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</u></b>	<b><u>63</u></b>

# 1 ÚVOD

Výskyt rakoviny ve světě i u nás stále roste. Není to žádná nová šokující informace, jen smutný fakt. Příčin je mnoho, od vlivů dědičných po vlivy vnějšího prostředí. Často si za vznik rakoviny můžeme sami. Naštěstí spolu s naší bezohledností vůči svému zdravotnímu stavu dochází k neustálému vývoji nových diagnostických metod a výzkumu nových léků.

Jedna z mnoha příčin, která se může podílet na vzniku nemocí, je vliv volných radikálů. Těmito agresivními látkami je náš organismus neustále napadán a musí se s nimi den co den vypořádávat. Pokud to přestane zvládat, volné radikály vyvolají oxidační reakce vedoucí k oxidačnímu poškození buněk, DNA a jiných struktur, což může vést ke vzniku nádorového bujení a řadě jiných onemocnění.

Jednou z metod, jak měřit míru oxidačního poškození, je kometový test – jednobuněčná gelová elektroforéza. Poprvé byla popsána Östlingem a Johansonem [1] v roce 1984, kteří jako první popsali chování DNA jednobuněčné kultury v elektrickém poli a detekovali zlomy způsobené ionizačním zářením. Za uplynulých dvacet let prošla tato metoda mnoha změnami a modifikacemi. V současné době je to hojně využívaná, všestranná a citlivá metoda, pomocí které můžeme měřit poškození DNA a buněčnou odpověď k tomuto poškození.

V této práci jsem se zabývala oxidačním poškozením DNA vyvolaným účinkem hydrogenperoxidu a jeho vlivem na přežívání buněk. Pro sledování poškození DNA byla použita metoda modifikované jednobuněčné gelové elektroforézy spolu s využitím enzymů endonukleázy III a formamidopyridinglykosylázy. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí analýzy obrazu a statistického zhodnocení. Pokusy byly provedeny na ovariálních buňkách křečička čínského, a to na liniích normálních AA8 a liniích mutantních UV-20. Cytotoxický účinek byl zkoumán pomocí testu inhibice tvorby kolonií.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

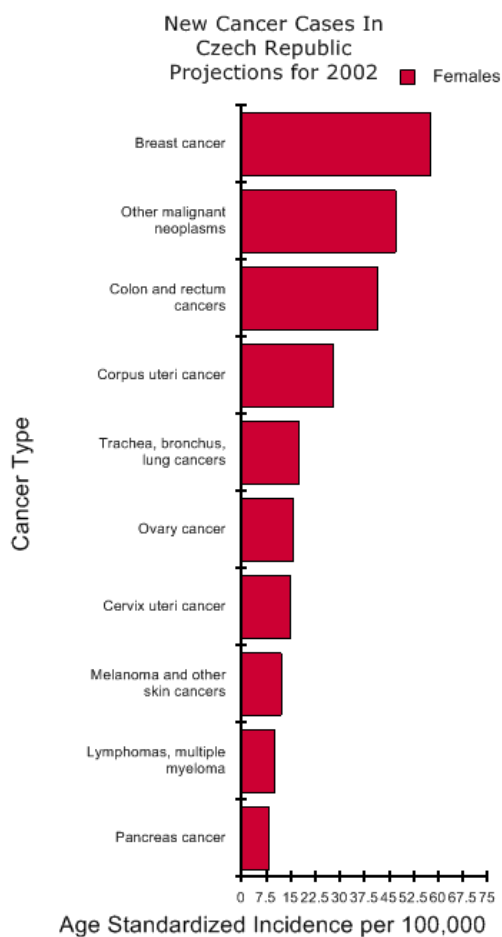
## 2.1 Výskyt rakoviny ve světě a v ČR

V posledních letech se vědcům podařilo pochopit základní příčiny vzniku rakoviny. K novým lékům je však ještě dlouhá cesta. Dosud se v léčbě používají klasická cytostatika, která však ničí nádorové i zdravé buňky. Nové léky se od běžné chemoterapie liší především minimálními nežádoucími účinky a lze je podávat i v tabletách. Nevýhodou je, že pro své působení vyžadují přítomnost určité struktury v nádorové buňce, která se obvykle vyskytuje jen u části nemocných. Stanovení takových struktur je obvykle laboratorně i finančně náročné, a proto je léčba těmito preparáty soustředěna jen do velkých center. První zástupci těchto léčiv jsou ověřovány i na vybraných pracovištích u nás [2].

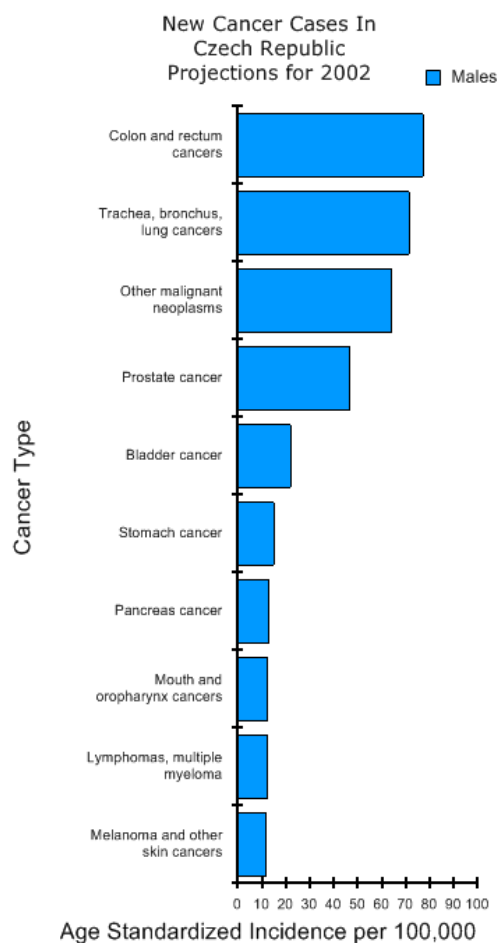
Ve vyspělých zemích je rakovina jedna z chorob, na kterou umírá nejvíce lidí. V současné době je pravděpodobné, že se rakovina vyvine u jednoho ze tří lidí, ale v 70% případů by se změnou způsobu života dalo vzniku rakoviny zabránit [3].

Ze statistik Světové zdravotnické organizace (WHO) vyplývá, že v Česku je druhý nejvyšší výskyt nových případů rakoviny v Evropě. V Česku je každý rok zaznamenáno téměř 700 nových případů rakoviny na 100 tisíc obyvatel. Počet nově objevených případů rakoviny v Česku se navíc zvyšuje. Horší situace je pouze v Maďarsku. V Česku je také vysoká úmrtnost a to především z důvodu pozdní diagnostiky.

Nejvíce se v Česku vyskytuje rakovina kůže, nádory tlustého střeva a rakovina plic. Nejčastějším typem rakoviny vyskytujícím se u žen je rakovina prsou a u mužů rakovina střev a konečníku (Obr.1,2). Právě výskyt rakoviny tlustého střeva je u nás vůbec nejvyšší na světě. Je to zejména způsobeno špatným životním stylem a nekvalitním stravováním - jíme ve spěchu, nepravidelně a nezdravě. Jedním z důvodů rostoucího počtu případů rakoviny ve světě je také paradoxně rostoucí průměrná délka života. V Česku je však i průměrná délka života nižší než v jiných evropských zemích [4].

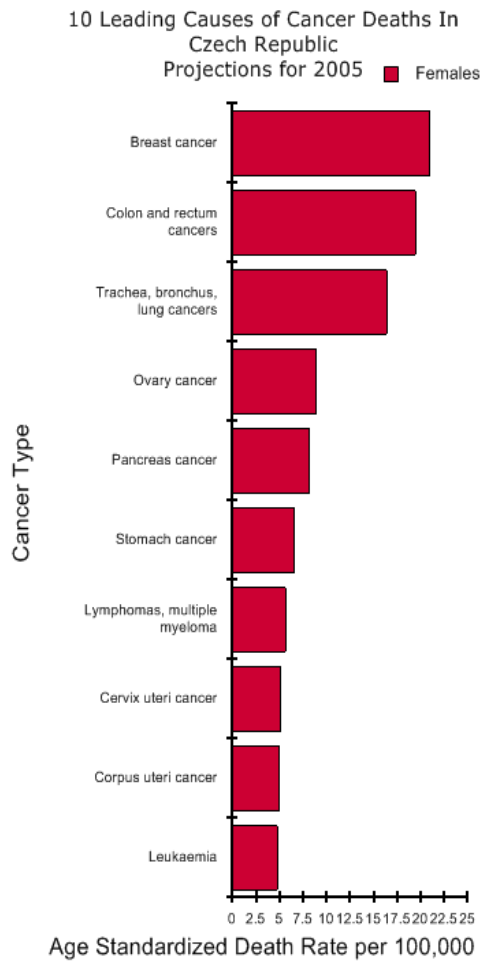


Obr. 1: Počet nově vzniklých případů rakoviny u žen [5]

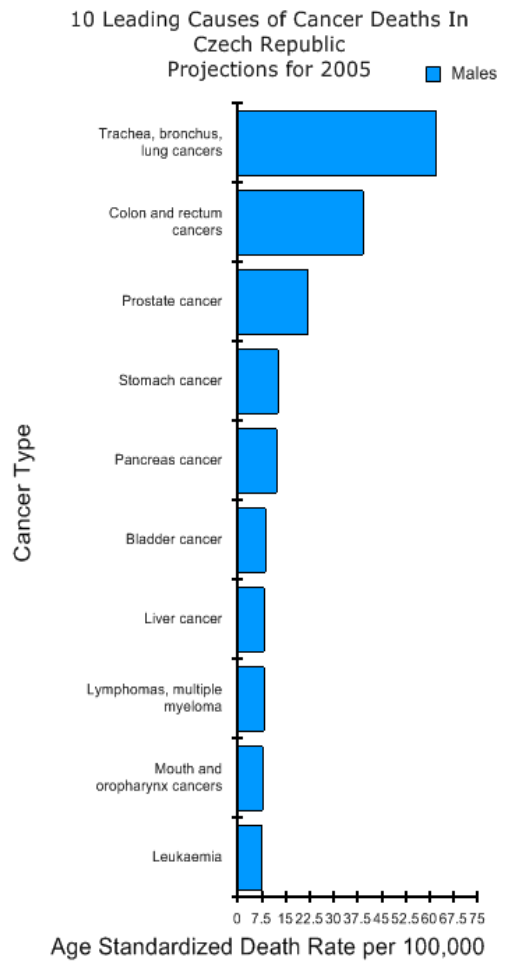


Obr. 2: Počet nově vzniklých případů rakoviny u mužů [5]

V Česku je také vysoká úmrtnost. V roce 2005 zemřelo na rakovinu přibližně 29 000 Čechů, z toho bylo 14 000 lidí mladší než 70 let. Nejčastější příčinou smrti na rakovinu je u žen rakovina plic a u mužů rakovina plic a dýchacích cest (Obr.3,4). Z dat Světové zdravotnické organizace vyplývá, že rakovinné onemocnění častěji přežijí ženy než muži. Pět let po diagnóze novotvaru se v Česku dožívá 29,3 procenta mužů a 43,4 procenta žen. Ve většině zemí Evropské unie je však úspěšnost léčby výrazně vyšší. Například v Rakousku nebo ve Francii se dožije pěti let od diagnózy rakoviny více než polovina pacientů. Je to dáno tím, jak už bylo zmíněno, že nádory se u nás odhalují pozdě, pacienti nechodí včas na kontroly a o své zdraví se nezajímají [4].



Obr. 3: Nejčastější příčiny smrti na rakovinu u žen [5]



Obr. 4: Nejčastější příčiny smrti na rakovinu u mužů [5]

## 2.2 Volné radikály a antioxidanty

Dosud není zcela jasné proč a jakým způsobem se mění zdravé buňky na rakovinné. Je však známo, že molekuly volných radikálů mohou poškodit genetický materiál v buňkách a tím i dělení buněk a vyvolat zhoubný proces. Volné radikály se mohou tvořit samovolně při normálním metabolismu a jsou organismem dobře kontrolovány. Jejich tvorba vzrůstá při působení škodlivin jako je kouření, nesprávná výživa, nadměrné pití alkoholu, přílišné slunění. Normální dělení buněk může být také porušeno určitými viry, stresem a dědičnými faktory [3].

Antioxidanty patří k látkám, které hrají velkou ochrannou úlohu při vzniku některých nemocí jako jsou poruchy srdce, cévního zásobení, mozkové mrtvice a hlavně rakoviny. Předpokládá se, že mechanismus vedoucí ke vzniku těchto chorob může být podpořený vlivem volných radikálů a antioxidanty mohou vlivu těchto molekul zabránit. K dobře známým účinkům antioxidantů jako jsou vitamin C a vitamin E, se postupně přidávají i potenciálně příznivé účinky rostlinných antioxidantů, polyfenolů vyskytujících se v ovoci, zelenině, oříšcích a nápojích jako jsou čaj a víno [6].

Měli bychom také zdůraznit, že volné radikály a další reaktivní sloučeniny také plní v organismu užitečné funkce. Například oxid dusný (NO) je důležitý v regulaci krevního tlaku a jako posel v nervové soustavě a kyselina chlorná (HOCl) bojuje proti mikrobiálním infekcím. Za normálních okolností se volné radikály nacházejí v buňce. Ve zdravé buňce je rovnováha mezi reaktivními sloučeninami a antioxidanty. Oxidační stres můžeme definovat jako nerovnováhu mezi oxidačními činidly a antioxidanty ve prospěch oxidačních činidel. Vyšší hladiny antioxidantů mohou mít rovněž záporné účinky na buňku [7].

### 2.2.1 Volné radikály

Mezi volné radikály patří sloučeniny kyslíku, které vznikají přímo v našem těle jako vedlejší produkt buněčného metabolismu [8]. Přesněji řečeno, volné radikály jsou částice elektronově nestabilní, a proto velmi reaktivní. Buď mají o jeden elektron více, nebo méně, a proto reagují s ostatními atomy – odebírají jim elektrony, nebo jim je naopak předávají – a tím pádem se stabilizují. Elektrony jsou záporně nabitě částice, a pokud jsou v páru, nepředstavují žádné riziko, protože vytvářejí pevnou vazbu. Pokud

však elektron není spárováný, je nebezpečný a útočí na buňku jako raketa, než prorazí její stěnu [3]. Tyto agresivní molekuly mohou poškozovat buňky, enzymy a genetický materiál [8]. Někteří vědci se domnívají, že působení tohoto typu volných radikálů podmiňuje vznik některých chronických nemocí a nemocí jako jsou rakovina, Alzheimerova choroba, revmatická artritida, šedý zákal, nemoci srdce a mozková mrtvice a mohou i přispívat ke vzniku infekčních a degenerativních onemocnění [3].

### **2.2.2 Antioxidanty**

Antioxidanty jsou látky, které zamezují vzniku oxidačních reakcí vyvolaných volnými radikály a tím působí preventivně proti poškozování buněk. Jejich mechanismus obsahuje: vyplavování reakčního kyslíku a dusíku z různých druhů volných radikálů, redukování koncentrace kyslíku snížením oxidačního potenciálu molekulárního kyslíku, metabolizují peroxidový tuk na neradikály, váže do komplexů ionty kovů a tím působí preventivně proti tvorbě volných radikálů [6].

## 2.3 Oxidační stres

Mezi základní částice vyvolávající oxidační stres zahrnujeme reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku. Volné radikály můžeme považovat za podskupinu reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku. Souhrnně jsou také nazývány oxidanty.

Volné radikály jsou nestabilní molekuly obsahující nepárový elektron [7]. Stabilizovat se pokoušejí spojováním se s jinými molekulami, což může vést k uvolnění dalších radikálů, a to může být počátek řetězové reakce [8]. Volné radikály jsou malé molekuly nebo ionty s malou reaktivní aktivační energií a krátkým poločasem rozpadu. Malá velikost jim umožňuje prostoupit buněčné membrány [7].

Volné radikály vyvolávají v buňkách oxidační stres, který působí na buňky třemi faktory: zvyšováním tvorby oxidantů, snížením účinnosti antioxidační ochrany a neschopností opravit oxidační poškození.

Hlavním zdrojem reaktivních sloučenin kyslíku je aerobní metabolismus. Vznikají též při peroxisomové  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, biotransformaci xenobiotik v mikrosomech za účasti oxidoredukčního systému s cytochromem P450, při stimulaci fagocytózy patogeny nebo liposacharidem, při metabolismu argininu a v tkáních účinkem specifických enzymů. Za normálních okolností jsou nadbytečné reaktivní kyslíkové sloučeniny kontrolovány a odstraňovány v buňce působením superoxid-dismutázy (SOD), katalázy nebo glutathionperoxidázy (GSH).

Nejvíce jsou v buňce účinkem reaktivních sloučenin kyslíku pozměněny makromolekuly jako jsou polynenasycené mastné kyseliny v membránových lipidech, esenciální proteiny a nukleové kyseliny [9].

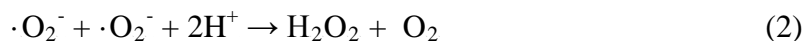
### 2.3.1 Základní typy reakcí reaktivních sloučenin

Kyslík ( $O_2$ ) se v mitochondriích normálně kompletně redukuje na vodu ( $H_2O$ ) tím, že přijímá 4 elektrony. Při nekompletní redukci mohou vzniknout velmi toxické deriváty: hydroxylový ion, superoxidový radikál a hydrogenperoxid. Dochází k tomu při řadě enzymových reakcí v různých buněčných složkách (mitochondrie, lyzozomy, peroxizomy, plazmatická membrána) [9].

Superoxidový radikál  $\cdot\text{O}_2^-$  vzniká ve vnitřní membráně mitochondrie [7] nebo při reakcích katalyzovaných xanthinoxidázou, cytochromem P-450 popř. jinými oxidázami (Rov. 1).

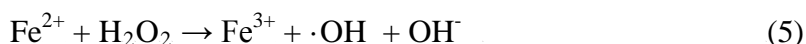
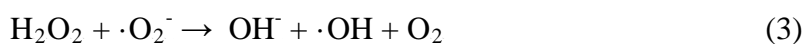


Vzniklý superoxid může být inaktivován spontánně nebo mnohem rychleji účinkem superoxidodismutázy za vzniku hydrogenperoxidu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rov. 2) [9].



Hlavním zdrojem  $\text{H}_2\text{O}_2$ , kromě uvedené reakce, je oxidativní deaminace biogenních aminů, která je katalyzována monoaminoxidázou v mitochondriální vnitřní membráně. Hydrogenperoxid patří mezi oxidanty, ačkoli to není radikál. Je to látka s relativně dlouhým poločasem rozpadu a může se rozšířit do velkých vzdáleností předtím, než vstoupí do reakce [7].

Hydroxylové radikály vznikají při: Haberově a Weissově reakci (Rov. 3), nebo hydrolyzou vody při ionizační radiaci (Rov. 4), nebo při interakci přechodných kovů (kupř. Fe, Cu) s hydrogenperoxidem při Fentonově reakci (Rov. 5).



Železo je zvláště důležité při toxickém kyslíkovém poškození. Většina volného Fe je v trojmocné formě a musí být redukována na dvojmocnou, aby mohla být účinná ve Fentonově reakci. Redukce může být podpořena superoxidem (Rov. 6).



A tedy zdroje Fe a superoxidu jsou nutné pro maximální oxidační poškození buňky [9].

Hydrogenperoxid je zdrojem dalších reaktivních kyslíkových sloučenin jako je kyselina chlorná  $\text{HOCl}$ , a to enzymatickou oxidací chloridových aniontů (Rov. 7).



HOCl může vést k jinému silnému oxidantu singletovému kyslíku  $^1\text{O}_2$  (Rov. 8), nebo k hydroxylovému radikálu (Rov. 9).



Hydrogenperoxid může také oxidovat množství hydrogenuhličitanových iontů na peroxohydrogenuhličitanové (Rov. 10) [7].



Také reaktivní dusíkové sloučeniny jako oxid dusnatý (NO) je důležitým chemickým mediátorem jako volný radikál ( $\text{NO}\cdot$ ) [9]. Je tvořen v biologických tkáních, např. v cévních endoteliálních buňkách nitricoxide syntázou [7]. Jako takový může být přeměněn na velmi reaktivní oxynitritový radikál [9] nebo v přítomnosti protonů podporuje vznik  $\cdot\text{OH}$  za současné tvorby radikálu  $\cdot\text{NO}_2$  [10].

V souvislosti s oxidativním stresem je nejvíce významnou reakcí radikálu  $\text{NO}\cdot$  reakce s radikálem superoxidem  $\cdot\text{O}_2^-$  (Rov. 11). Produktem je peroxynitritový aniont.



Reakce je velmi rychlá s rychlostní konstantou  $k = 7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [7]. Tato reakce je 3,5x rychlejší než odstraňování superoxidu účinkem superoxididismutázy (SOD). Peroxynitrit oxiduje thioly, lipidy, působí mutaci DNA, nitruje bílkoviny a další molekuly, čímž je poškozuje, a inaktivuje některé enzymy [10].

Peroxynitritový aniont  $\text{ONOO}^-$  je v kontrastu s radikály  $\text{NO}\cdot$  a  $\cdot\text{O}_2^-$  silným oxidantem. Peroxynitrit může reagovat s množstvím  $\text{CO}_2$  za vzniku nitrosoperoxycarbonátu (Rov 12).



Aniont  $\text{ONOOCO}_2^-$  je radikál s krátkým poločasem rozpadu a má disociační schopnost vedoucí ke dvěma radikálům (Rov. 13).



Odpovídající kyselinou k peroxynitritu je kyselina peroxydusitá  $\text{ONOOH}$  ( $\text{pK}_a=6,8$ ), která se samovolně rozkládá během několika sekund ve vodném roztoku. Mechanismus rozkladu kyseliny byl sice předmětem jistého rozporu, nicméně nedávné experimentální i výpočetní důkazy ukazují, že peroxydusitá kyselina podléhá homolýze

na hydroxylový  $\cdot\text{OH}$  radikál a radikál oxidu dusičitého  $\cdot\text{NO}_2$ , které se následně rekombinují na kyselinu dusičnou (Rov. 14) [7].



Všechny výše uvedené reakce se výraznou měrou uplatňují na mechanismech poškození buňky, zvláště pak při peroxidaci lipidů v membránách (oxidace dvojných vazeb polynenasycených mastných kyselin), při oxidační modifikaci proteinů (oxidace SH-skupin), při poškození DNA (ataka thyminu  $\rightarrow$  vznik jednořetězcových přerušeni dvoušroubovice DNA) [9].

### 2.3.2 Reakce hydrogenperoxidu a dalších hydroperoxidů

Je známo, že hydroperoxy (ROOH) hrají důležitou roli při tvorbě radikálového poškození. Hydrogenperoxid ( $\text{R}=\text{H}$ ) je produkován endogenními metabolickými a katabolickými procesy v buňce, zatímco alkyhydroperoxy ( $\text{R}=\text{lipid}$ , protein, DNA) jsou produkovány v řetězových reakcích volných radikálů za účasti molekulárního kyslíku (autooxidace). Role kovových iontů při vzniku poškození DNA způsobené hydroperoxy byla dlouho rozpoznávána a bylo identifikováno několik zřetelných biologicky relevantních mechanismů. Identifikace mechanismu reakcí je důležitá, protože tak může značně rozlišit typy vznikajících volných radikálů, které mohou značnou měrou určit spektrum poškození DNA. Některé aspekty mechanismu reakcí iontů nízko valenčních přechodných kovů s ROOH a jejich role v mutagenезi je posuzována s ohledem na jejich možnou roli při biologickém vzniku poškození DNA.

Mutace vyvolané hydroperoxy (ROOH) jsou přímým následkem radikálů uvolněných po jejich rozkladu. Pochopení původu endogenních oxidativních mutací, požaduje znalost potenciálních pochodů zahrnující vznik reaktivních volných radikálů jako prostředníků a jejich potenciál pro reakci s DNA. Hydroperoxy uvolňují volné radikály reakcí s komplexy iontů přechodných kovů. Podstata nízko valenčních iontů přechodných kovů může, spolu s ligandovou strukturou, značně ovlivnit distribuci volných radikálů vznikajících při rozkladu hydroperoxidů. Tyto reakce jsou všeobecně klasifikovány jako reakce Fentonova typu. Nejdostupnější kovový iont jako katalyzátor reakce v organismu je železo a měď, ačkoli další ionty kovů, i když obsažených ve stopových množstvích nebo jako výsledek toxické expozice, mohou také zvyšovat množství volných radikálů v buňce [11].

### 2.3.2.1 Mechanismus Fentonovy reakce

Kvůli všudypřítomné produkci hydrogenperoxidu v buňkách, bylo soustředěno mnoho pozornosti na jeho roli jako činidlo poškozující DNA. Od doby, co Haber a Weiss poprvé navrhli zahrnutí hydroxylových radikálů do Fentonovy reakce, bylo nasměrováno velké množství snahy ke zkoumání mechanismu zahrnutých aktivních oxidantů. Ačkoli je zde hojnost důkazů, že klasická Fentonova reakce ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}_2^+$ ) (Rov. 5) produkuje hydroxylové radikály ( $\cdot\text{OH}$ ), jsou zde ještě nějaké spory nad přesnou povahou oxidujících sloučenin. Některé publikace navrhovaly, že Fentonova reakce oxiduje substrát skrz mechanismus zahrnující železo-kyslíkaté sloučeniny bez zahrnutí volných radikálů. Jestliže reakce probíhá skrz hydroxyl radikálového prostředníka, pak Fentonova reakce může být považována za radiomimetickou (napodobující účinek radioaktivního záření) ve smyslu, že spektrum poškození DNA a mutace by se mělo podobat poškození DNA pozorovaného při působení ionizujícího záření. Fentonova reakce může být zevšeobecněna (Rov. 19).



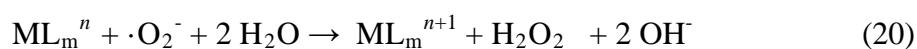
Ionty nízkovalečních přechodných kovů jsou označeny jako M, zatímco L odpovídá ligandům, které tvoří s kovy komplexy, a  $n$  označuje náboj iontu. Rozsáhlý výzkum nyní zkoumá šíři iontů přechodných kovů, které by mohli mít daný mechanismus reakce, a vliv různých ligandů na redoxní chemii. Uvedená reakce pouze ukazuje formálně přechod elektronů. Pro většinu kovových iontů, snad pouze s výjimkou některých více vzácných iontů kovů jako Ru (II) a V (II), se přímý elektronový transfer na hydrogenperoxid do vnější elektronové vrstvy většinou nevyskytuje. Aktuální redukce pravděpodobně probíhá mezi komplexem tvořeným hydrogenperoxidem a kovem navázaným na ligand, obvykle označován :  $\text{L}_m\text{M} - \text{H}_2\text{O}_2^{n+}$ . Tento komplex se může rozkládat několika způsoby, přičemž ne vždy musí docházet ke vzniku hydroxylového radikálu. Příkladem může být reakce  $\text{H}_2\text{O}_2$  s Cu (I) a oxidace jednoduchého řetězce alkoholů, zatímco při analogické reakci s Cr (II) se objevuje vznik hydroxylového radikálu.

Fentonova reakce zahrnující komplex Fe(II)EDTA je pravděpodobně nejvíce zkoumaný příklad této třídy reakcí. Mnoho studií potvrdilo, že reakce tohoto komplexu s hydrogenperoxidem produkuje radikál  $\cdot\text{OH}$ . Většina těchto studií použila nekatalytické podmínky, např. železo ve velkém přebytku nad substrátem. Přesná povaha ligandu L v  $\text{ML}_m^n$  může ovlivnit distribuci produktu, patrně změnou výnosů

oxidujících radikálů vznikajících ve Fentonově reakci. Takže, když Fe(II)NTA (nitrilotrioctová kyselina (chelaton 1)) je použita místo Fe(II)EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina - chelaton 2, disodná sůl - chelaton 3), hydroxylový radikál  $\cdot\text{OH}$  již není hlavním produkovaným reaktivním meziproduktem. V případě že L je porfyrinová molekula, hydroxylový radikál nemusí být produkován vůbec. Například enzymy P-450 monooxygenazové rodiny používají železo k připojení OH-ekvivalentů k nasyceným aromatickým substrátům mechanismem, který nezahrnuje produkci volně rozptylujících se hydroxylových radikálů. Tyto reakce postupují pravděpodobně přes výše valenční železo-kyslíkaté  $[\text{Fe(IV)=O}]$  meziprodukty.

Navzdory velkému množství důkazů které naznačují, že Fentonova reakce s Fe(II) produkuje  $\cdot\text{OH}$  jako aktivní oxidant, některé naopak tvrdí, že tato reakce také probíhá přes železo-kyslíkatý meziprodukt bez uvolnění volných radikálů.

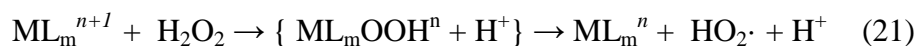
Superoxid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), produkt jednoelektronové redukce molekulárního kyslíku, přispěl k produkci hydrogenperoxidu díky dismutační reakci uskutečněné enzymy superoxidodismutázové rodiny (SOD) a stejně jako vedlejší redukce superoxidu kovovými ionty (Rov. 20).



Takže dismutační reakce přispívající k produkci hydrogen peroxidu, tímto zvyšuje potenciál pro Fentonovu oxidaci [11].

### 2.3.2.2 Další volné radikály vznikající rozkladnými reakcemi $\text{H}_2\text{O}_2$

Ačkoli redukce hydrogenperoxidu skrze Fentonovu reakci je považována za nejběžnější cestu jeho rozkladu, oxidace  $\text{H}_2\text{O}_2$  komplexy přechodných kovů jako je Mn(III) a Co(II) dává protonovaný superoxid ( $\text{HO}_2\cdot$ ) (Rov. 21).



Tahle protonovaná forma superoxidu (perhydroxylový radikál) má pK 4,8 , a proto se neočekává, že by mohl být přítomný ve fyziologickém pH ve větším množství. Nicméně perhydroxylový radikál je silnější oxidant než jeho původní aniont a je zapletený do vzniku zlomů řetězců DNA. Hydrogenperoxid může podstoupit rozklad produkující hydroxylový radikál působením UV záření (Rov. 22).



Není jasné zda tento proces přispívá k uvolňování hydroxylového radikálu z endogenního hydrogenperoxidu in vivo. Alkylhydroperoxydy podstupují analogickou reakci za vzniku alkoxylového radikálu [11].

### 2.3.3 Reakce hydroxylového radikálu

Nejreaktivnější mezi reaktivními sloučeninami je hydroxylový radikál. Jeho poločas v organismu je kolem  $10^{-9}$  s, což ukazuje, že se bude účastnit reakcí v krátké vzdálenosti od místa vzniku. Ve skutečnosti se odhaduje, že více než polovinu poškození způsobených volnými radikály má na svědomí hydroxylový radikál  $\cdot\text{OH}$ . Ten může iniciovat lipidovou peroxidaci odtrhnutím vodíku od nenasycené mastné kyseliny XH (Rov. 15)



Fragment  $\cdot\text{X}$  se může podílet na radikálové řetězové reakci (Rov. 16 a 17).



Reakce může být ukončena reakcí dvou radikálů za vzniku stabilního produktu (Rov. 18).



Dalšími typy reakcí zahrnující hydroxylový radikál jsou hydroxylace, oxidace a štěpení proteinů a nukleových kyselin. Reaktivní sloučeniny dusíku mohou indukovat nitraci, nitritaci a deaminaci bází. Oxidanty – jiné než hydroxylový radikál – většinou vykazují určitou selektivitu v typu biomolekuly, se kterou reagují. Pokud takové reakce mají možnost pokračovat nekontrolovaně, pak je výsledkem strukturální změna bílkovin, inhibice enzymatické aktivity a interference v regulačních funkcích a možné buněčné smrti [7].

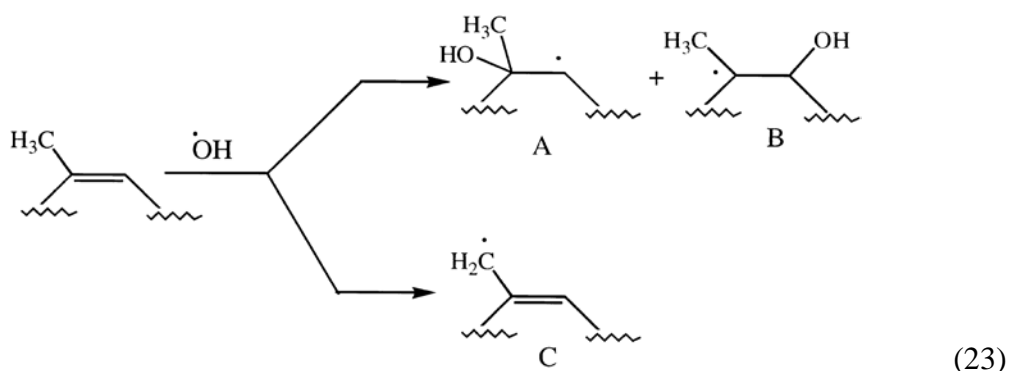
### 2.3.4 Reakce $\cdot\text{OH}$ s bázemi DNA

Reakce DNA bází s volnými radikály ze začátku dává nestabilní radikálové meziprodukty s centrem na DNA. Tyto radikálové meziprodukty jsou bezprostředními prekurzory poškození DNA. Takže informace vzhledem k jejich formaci a chemickému

osudu je důležitá pro pochopení mechanismu vzniku mutací. Většina našich znalostí reakcí DNA s hydroxylovými radikály pochází z biologie záření, odkud může být radikál  $\cdot\text{OH}$  uvolňován úplně a v dobré dávce pro pulzní radiolýzu [11].

Reakční produkty reakce hydroxylového radikálu s purinovými a pyrimidinovými bázemi byly zkoumány do velkých podrobností pulsní radiolýzou, ESR, EPR, a metodami chemického záchytu [11]. Metoda EPR (electron paramagnetic resonance), též (ESR - electron spin resonance) je založena na absorpci mikrovlnné energie volnými radikály v silných magnetických polích. Na rozdíl od nukleární magnetické rezonance, kde se sledují neutrony, u EPR se sledují elektrony. Přímé stanovení zatím provádíme pro superoxid, nitroxidový radikál, hydroxylový radikál, singletový kyslík a six lines spectra (volné radikály organických látek) [10].

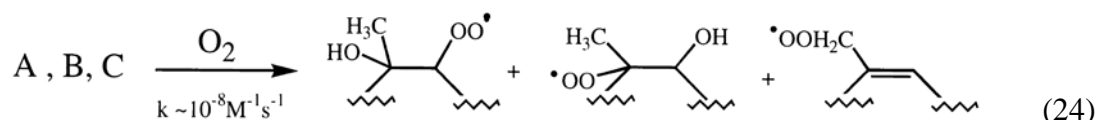
V reakcích s organickými sloučeninami působí hydroxylový radikál primárně jako nukleofil. Adice na dvojnou vazbu je hlavní cestou (produkty A a B), ale může se také vyskytnout odtrhnutí atomu vodíku z metylové skupiny (produkt C) (Rov. 23).



V případě reakce s thymidinem 65 % produktu bylo adováno v pozici C5, což nám dává odpovídající 6-yl radikál (A), zatímco 5-yl radikálového produktu (B) vzniká 25 %. A tvoří se pouze 10 % allylového radikálu (C). V případě guaninu  $\cdot\text{OH}$  adice probíhá na C8 a vzniká 8-hydroxyguanin [11]. Při biosyntéze DNA a RNA se místo na cytosin váže na adenin. Tím vzniká mutace a ta může vést třeba k nádorovému bujení [10]. Podobné hydroxyradikálové adukty byly pozorovány u adeninu. A také adeninové a guaninové adukty odpovídající adici purinové C4 pozice [11].

### 2.3.4.1 Uvolňování peroxylového radikálu při aerobní Fentonově reakci

Radikály A, B, a C z rovnice (23) jsou uhlíkové radikály. V přítomnosti kyslíku můžou reagovat za vzniku peroxylového radikálu ( $\cdot\text{OOR}$ ) (Rov. 24).



Z toho vyplývá, že pokud jsou hydroxylové radikály uvolňovány za aerobních podmínek, budou vznikat z oxidovaných substrátů peroxylové radikály. Peroxylové radikály můžou oxidovat další substráty odštěpením atomu vodíku, produkováním alkylhydroperoxidů a oxidováním radikálových meziproductů. Tyto alkylhydroperoxydy (ROOH) procházejí mnoha stejnými reakcemi s ionty kovů jako hydrogenperoxydy. Ve speciálním případě lipidových hydroperoxydů další strukturální důvody upravují distribuci vznikajících reaktivních radikálových meziproductů, které mají pravděpodobně vliv na mutagenezi.

Chemizmus peroxylového radikálu byl většinou zkoumán bez kontextu k oxidaci polynenasycených lipidů. Vzhledem k vysokému příjmu polynenasycených tuků v potravě a preděpodobném vlivu na zvýšení rozvoje některých typů rakoviny je autooxidace polynenasycených lipidů velkým zájmem výzkumu. Tohle je spojeno s dvěma genotoxickými procesy lipidové peroxidace. Prvním je tvorba mutagenních sloučenin odvozených od reakce s elektrofilními aldehydovými produkty a druhým je oxidace bází DNA a indukce zlomů řetězců peroxy/alkoxylovými volnými radikály, které jsou uvolňovány jako meziproducty během peroxidace. Aldehydové sloučeniny jsou tvořeny jako výsledek řetězových reakcí volných radikálů během lipidové peroxidace. Množství malondialdehydu (MDA), nejhojnějšího z těchto vedlejších produktů, se běžně používá jako marker lipidové peroxidace. Schopnost MDA a dalších mutagenních aldehydů k modifikaci DNA a indukování mutací byla dobře studována, ale potencionálnímu oxidativnímu poškození DNA peroxylovými a alkoxylovými radikály, které vznikaly během lipidové oxidace, bylo věnováno méně pozornosti. Ve skutečnosti důležitost těchto reaktivních meziproductů může zasahovat i mimo lipidovou peroxidaci. Bylo také popsáno poškození proteinů volnými radikály

(peroxyl). Uvolnění peroxylového radikálu je hlavní znak aerobního poškození volnými radikály [11].

Unikátní znak peroxylového radikálu je jeho neobyčejný poločas rozpadu (Tab.1). Narozdíl od ostatních radikálů, jejichž poločas je velmi malý, peroxyloý radikál může reagovat se substráty daleko od místa jeho vzniku.

Radikál	Poločas rozpadu
$\cdot\text{OH}$	$10^{-9}$ s
$\cdot\text{OR}$	$10^{-6}$ s
$\cdot\text{OOR}$	0,5-0,7 s
$\cdot\text{R}$	$10^{-8}$ s
$^1\text{O}_2$	$10^{-6}$ s

*Tab.1: Poločas rozpadu některých reaktivních meziproductů*

Tato neobyčejná stabilita naznačuje zvýšenou chemickou selektivitu peroxylového radikálu vzhledem k jiným kyslíkatým radikálům. Tato domněnka pramení ze studie oxidace thymidinu peroxylovými radikály. Byly nalezeny výhradně produkty vzniklé odtržením atomu vodíku z 5-Me skupiny (produkt C, Rov. 23). Nebyly zjištěny žádné produkty peroxylové adice na 5,6 dvojnou vazbu (produkty A,B), narozdíl od pokusů reakcí thymidinu s hydroxylovým radikálem. Tato selektivita v reakcích s odtržením atomu vodíku peroxylovými radikály je dobře známa z chemizmu lipidové autooxidace [11]

### **2.3.5 Důsledek oxidačního stresu**

Existuje značné množství důkazů, že oxidační stres je spojený s mnoha vážnými nemocemi. Oxidativní poškození DNA, indukované exogenně zářením nebo chemickými činidly, nebo endogenně volnými radikály uvolněnými během normální respirace, je všeobecně považováno za jednu z významných příčin rakoviny. Důkaz pro tohle vyjádření vyvstává z několika úseků výzkumu.

První z úseku epidemiologie. Je mnoho zpráv o souvislostech mezi vysokou spotřebou ovoce a zeleniny, nebo specifických antioxidantů (vitamin C, karotenoidy, vitamin E) a relativně nízkým výskytem některých typů rakoviny. Antioxidanty ve stravě mohou chránit proti rakovině odstraňováním reaktivních kyslíkatých sloučenin předtím, než mají šanci způsobit poškození biologických molekul.

A druhý na molekulární úrovni. Spektrum oxidačních produktů tvořených v DNA zahrnuje zlomy řetězců, cukry bez báze nebo AP místa (apurinová/apyrimidinová) a oxidované báze. V poslední skupině jsme zaměřili pozornost na 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-OHgua) jako na hlavní produkt s jasným mutagenním potenciálem. Párová specifita 8-OHgua není přesně stejná jako u guaninu. Při in vitro replikaci s bakteriální a eukaryotickou DNA polymerázou docházelo k inkorporaci adeninu naproti guaninu do dceřiného řetězce.

Vzhledem k jeho potenciální důležitosti a relativní snadnosti s jakou může být měřen, je 8-OHgua nebo nukleosid 7,8-dihydro-8-oxo-deoxyguanosine (8-OHdG) všeobecně považován za dobrý marker oxidačního poškození [12].

Zvláště citlivá k oxidačnímu stresu je také centrální nervová soustava. Je zde pro to několik důvodů: mozek má vysokou spotřebu kyslíku a má nízkou hladinu endogenních antioxidantů; má relativně vysokou koncentraci polynenasycených mastných kyselin a v některých oblastech je relativně bohatý na volné ionty  $Fe^{2+}$ , které mohou vést k řetězové reakci (Fentonova reakce). Oxidační poškození je horší kvůli skutečnosti, že neurony se normálně neobnovují.

Také proces stárnutí je spojen s oxidačním stresem. Teorie, při níž je stárnutí spojeno s volnými radikály, je založena na hypotéze, že dokud endogenní antioxidanty nepotlačují oxidační činidla (volné radikály) kompletně, pak souhrnným působením oxidačního poškození dochází ke snížení životnosti. To vede k mutaci mitochondriální DNA a má za následek redukovanou funkčnost buňky a její možnou smrt. Hypotéza je podporována pozorováním zvýšeného množství markerů oxidačního poškození ve stárnoucích buňkách. Nynější názor, zdá se, vyjadřuje, že stárnutí je multifaktoriální proces, kde oxidační stres je důležitým ale ne jediným mechanismem [7].

## 2.4 Antioxidanty – obranný systém organismu

Naštěstí, zde jsou obranné systémy, endogenní antioxidanty, které potlačují škodlivé reakce. Antioxidanty mohou být enzymatické, jako superoxiddismutáza (SOD) nebo neenzymatické. Chemický princip ochrany efektivními antioxidanty je, že antioxidanty reagují s oxidanty dříve než oxidanty mohou reagovat s důležitými biomolekulami. Reakce SOD s radikálem  $O_2^-$  produkující  $H_2O_2$  (Rov.2) je rychlá a jedinou reakcí, která s ní může soutěžit v rychlosti, je reakce radikálu NO s radikálem  $O_2^-$  za vzniku anionu peroxyinitritu (Rov.11). Neenzymatické antioxidanty jednájí hlavně jako pohlcovači radikálů v oxidačních řetězových reakcích. Můžeme je rozdělit na antioxidanty porušující řetězec v lipidové fázi jako tokoferol nebo ve vodní fázi jako askorbát. A také další funkce neenzymatických antioxidantů je blokování tranzitních kovů, a tím snižování výskytu reakcí Fentonova typu [7].

V organismu je produkce i účinek reaktivních forem kyslíku a dusíku udržována v takových mezích, kdy není narušena činnost normálních (zdravých) buněk. Tento mechanismus se nazývá *integrováný antioxidantní systém*. Zahrnuje:

**Preventivní antioxidanty**, které brání vzniku nových reaktivních forem.

*ceruloplasmin* (váže Cu), *metalothionein* (váže Cu), *albumin* (váže Cu), *transferrin* (váže Fe), *ferritin* (váže Fe), *myoglobin* (váže Fe)

**Odstraňující antioxidanty**, které zneškodňují už vytvořené ROS a tím blokují řetězovou reakci navozenou volnými radikály.

(a) *antioxidanční enzymy* superoxiddismutáza (SOD), glutathionperoxidáza (GPx), glutathionreduktáza (GR), kataláza a metaloenzymy:.,

(b) *redukující sloučeniny* jako je vitamin C a E, karotenoidy, glutathion, močová kyselina, bilirubin, flavonoidy.

**Opravující enzymy**, které opravují kupř. poškození DNA nebo enzym methioninsulfoxid-reduktáza [9].

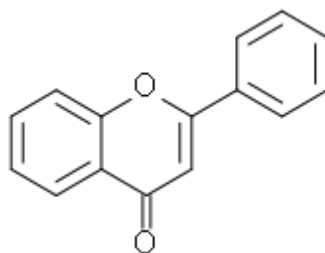
### 2.4.1 Polyfenoly – flavonoidy jako antioxidanty

Jednou z velkých skupin antioxidantů, která je v současné době hodně zkoumána, jsou polyfenoly. Chemicky to jsou látky, které obsahují ve své struktuře

benzenové jádro a několik hydroxylových skupin. Tyto fenolické sloučeniny můžeme nalézt v řadě rostlin. Patří k nim sója, citrusové plody, cibule a především zelený čaj [13].

Antioxidační sloučeniny nacházející se v zeleném čaji můžeme také nazývat katechiny. O zeleném čaji se domníváme, že může zvyšovat antioxidační obranný systém těla proti radikálovému poškození. Oxidativní změny mohou porušit průběh transkripce, translace a replikace DNA a tak vést ke vzniku mutací, stárnutí buněk nebo k buněčné smrti [14].

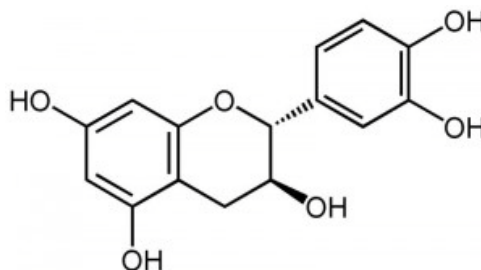
Mezi polyfenoly můžeme zahrnout skupinu zvanou flavonoidy. Je to velmi rozsáhlá skupina látek, která obsahuje několik podskupin s různým stupněm oxidace základního flavonového skeletu (Obr.5). Mezi podskupiny můžeme zařadit flavony, flavonoly, flavany, flavan-3-oly, isoflavony, katechiny, anthokyanidiny a další [13].



Obr.5: Flavon [13]

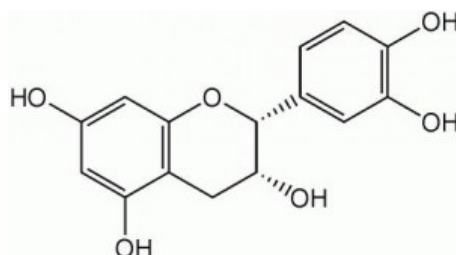
#### 2.4.2 Hlavní látky patřící mezi flavonoidy

**Katechin** – patří do skupiny flavan-3-olů. Katechin (Obr.6) byl poprvé izolován z rostliny Catechu a odtud pochází jeho název. Katechin a epikatechin jsou nejběžnější optické izomery nacházející se v přírodě.



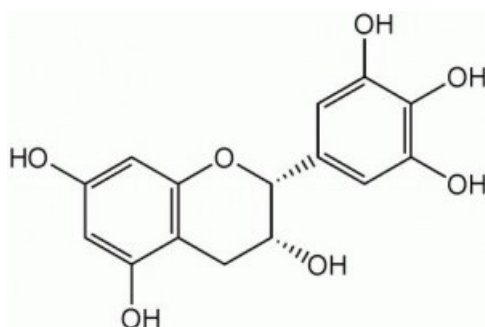
Obr.6: Katechin [13]

**Epikatechin** - má příznivé účinky na srdce, zlepšuje tok krve. Velké množství epikatechinu (Obr.7) je obsaženo v kakau. Má dobré antioxidační účinky, ale bylo zjištěno, že je rychle eliminován z těla ven.

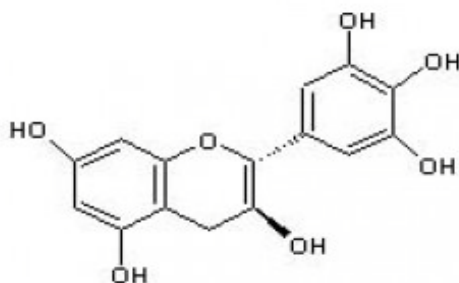


Obr.7: Epikatechin [13]

**Epigallokatechin a gallokatechin** - obsahují, ve srovnání s epikatechinem a katechinem, jednu fenolickou hydroxylovou skupinu navíc (Obr.8, 9).

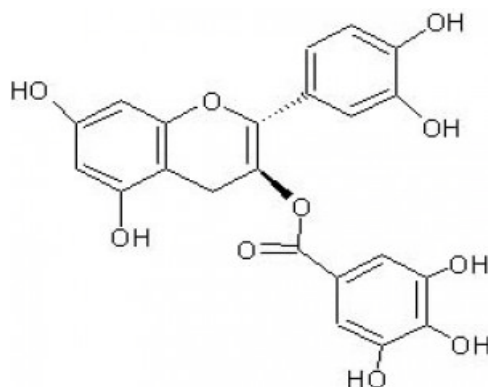


Obr.8: Epigallokatechin [13]



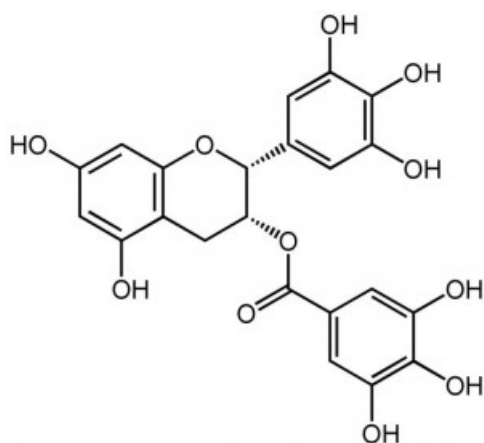
Obr.9: Gallokatechin [13]

**Katechin-3-gallát** – je to ester kyseliny gallové a katechinu (Obr.10) [13].



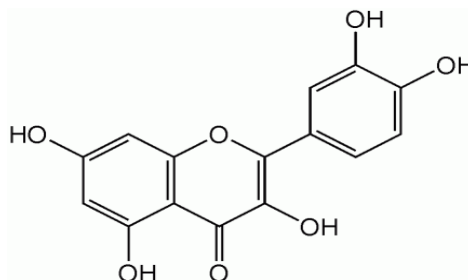
*Obr.10: Katechin-3-gallát [13]*

**Epigallokatechin-3-gallát** – je základní fenolický antioxidant a nachází se v různých rostlinách, je to katechin vyskytující se v čaji v největším množství. Epigallokatechin-3-gallát (EGCG) (Obr.11) inhibuje buněčnou oxidaci LDL cholesterolu (low density lipoproteins). EGCG inhibuje peroxynitritem indukovanou tvorbu markerů oxidativního poškození – 8-hydroxy-2-deoxyguanosin a 3-nitrotyrosin [15].



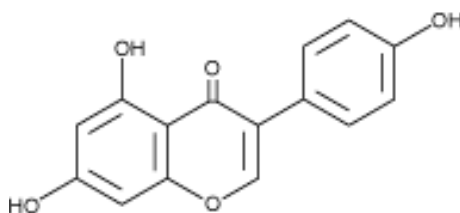
*Obr.11: Epigallokatechin-3-gallát [13]*

**Quercetin** – patří do skupiny flavonolů (Obr.12) Kromě antioxidačních účinků také působí protizánětlivě. Inhibuje produkci a uvolňování histaminu a dalších zánětlivých mediátorů [15].



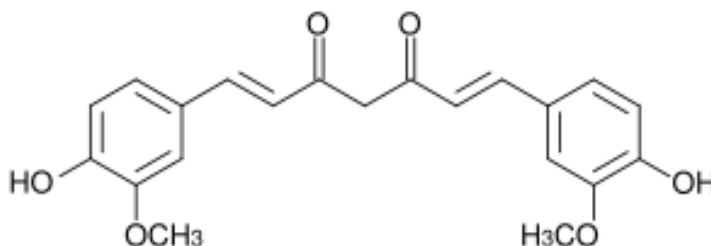
Obr.12: Quercetin [13]

**Genistein** - je isoflavonoidní fytoestrogenní sloučenina (Obr.13), která se nachází v sojových bobech, v hrachu a ostatních luštěninách



Obr.13: Genistein [13]

**Kurkumin** – patří mezi polyfenoly, ale není to flavonoid (Obr.14). Je obsažený v koření zvané Kurkuma, a odpovídá za její žluté zbarvení. Kurkumin je přírodní produkt s antioxidačními, protizánětlivými a protinádorovými vlastnostmi [13].



Obr.14: Kurkumin [13]

## 2.5 Měření oxidačního poškození DNA

Oxidační poškození DNA se může měřit několika způsoby. Jako biomarker oxidačního poškození se může použít jeden nejčastěji se vyskytující oxidační produkt 7,8-dihydro-8-oxo-guanine (8-OHgua). Dříve se měřily oxidované báze v DNA přímo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V současné době je nejpoužívanější metodou kometový test – jednobuněčná gelová elektroforéza.

Tento kometový test nám dává hodnotu endogenního oxidativního poškození bází tak, že je více než 10-ti násobně nižší než nejvyšší odhady z HPLC. Je možné, že odhady založené na HPLC jsou uměle zvýšeny, protože oxidace guaninu se vyskytuje během izolace, skladování nebo hydrolyzy DNA. Používání kontrolované metody izolace DNA přispívá ke snížení in vitro oxidace. Byly získány hodnoty koncentrace 8-OHgua v lidských lymfocytech, které jsou blízké výsledkům získaným při kometovém testu [12].

Kometový test (jednobuněčná gelová elektroforéza) je rychlá, jednoduchá, citlivá, spolehlivá a finančně nenáročná metoda měření poškození DNA. Také je použitelná ve velké šíři aplikací. Používá se jako test pro genotoxicitu, je to neocenitelný nástroj pro zkoumání základních aspektů poškození DNA a buněčné odpovědi k tomuto poškození.

Při klasické elektroforéze migrují fragmenty látek a vzdálenost, kterou urazí, je nepřímo úměrná velikosti fragmentu. Pro migrující fragmenty DNA toto neplatí. Alkalický kometový test štěpí DNA na zlomy ve frekvencích až do několika tisíc na buňku, takže vzdálenost mezi zlomy jsou řádově kolem  $10^9$  Da. Je to rozhodně za rozsahem velikosti fragmentů, pro které je klasická elektroforéza vhodná. Délka takového fragmentu je asi 1 mm a velikost ocasu komety je několik setin. Je to dáno tím, že DNA je uspořádaná do smyček, které si ponechá superšroubovice, která byla předtím obsažena v nukleozomech. Ocas komety je tedy tvořen uvolněnými smyčkami superšroubovice a počet smyček v ocasu odpovídá počtu zlomů DNA. S rostoucím množstvím poškození se více zvyšuje intenzita ocasu než jeho délka. Délka ocasu je pravděpodobně dána délkou smyček.

Alkalický kometový test detekuje jednořetězcové zlomy DNA. Jednořetězcové zlomy (single-strand breaks – SSBs) jsou rychle opravovány a nenahlíží se na ně jako na významné letální nebo mutagenní změny. Mnoho genotoxických činitelů neindukuje

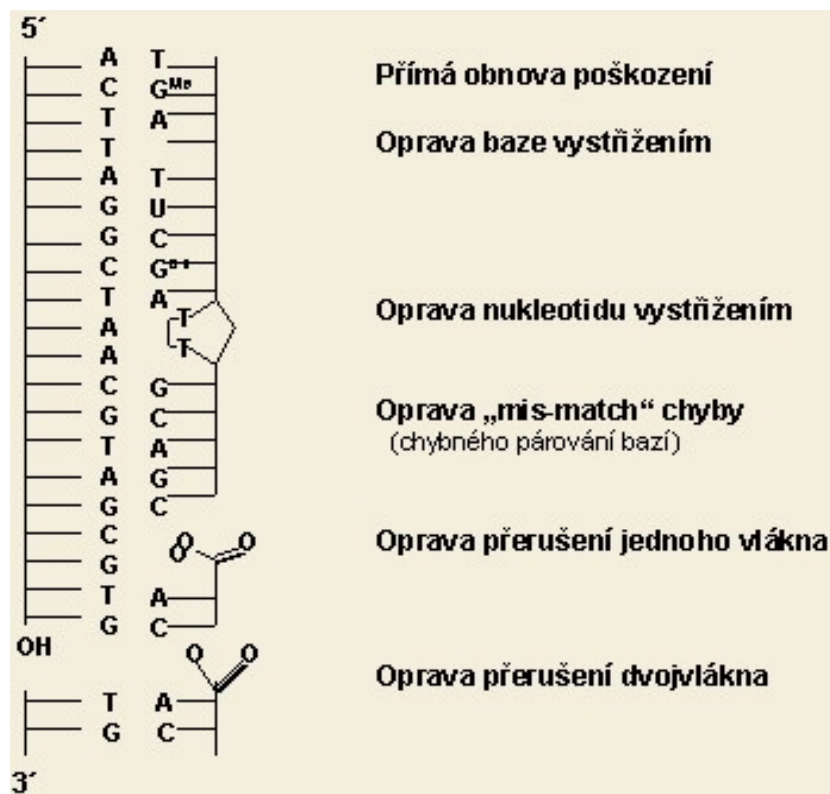
zlomy řetězců přímo. Vytvářejí AP (apurinová/apyrimidinová) místa, která jsou alkali-labilní a přeměňují se pravděpodobně na zlomy během elektroforézy při vysokém pH. Navíc zlomy budou dočasně přítomné, když buňky opraví poškození bázovou nebo nukleotidovou excizí. A tak velké množství zlomů v kometovém testu může indikovat buď velké poškození nebo účinnou opravu. Ve skutečnosti můžeme získat mnoho užitečných informací využitím buněčné reparace k produkci zlomů DNA, a tak odhalit nebo znásobit efekty genotoxinů [16].

Alternativní přístup k měření oxidovaných bází využívá opravných endonukleáz s patřičnou specifitou – endonukleáza III (endo III), pro oxidované pyrimidiny, a formamidopyridinglykosylázu (FPG), pro 8-OHgua a jiné oxidované puriny. Tyto enzymy vytvářejí zlomy na místech poškozené DNA [12]. V podstatě každé poškození, pro které existuje specifická endonukleáza, může být takto detekováno. Schopnost detekovat specifická poškození otevírá novou oblast zkoumání – buněčnou opravu DNA [16].

## 2.6 Reparace DNA

Lidský genom je neustále napadán endogenními reaktivními metabolity, terapeutickými látkami a mutageny z vnějšího prostředí tak, že je narušena jeho integrita. Proto je pro zachování stability genomu nutná neustálá kontrola. Ta je dosažena mechanismy opravy DNA, které odstraňují nebo tolerují pre-cytotoxické, pre-mutagenní a pre-klastogenní poškození. Defekty v opravě DNA zvyšují hypersenzitivitu k činidlům poškozujícím DNA, dochází k akumulaci mutací a nakonec k rozvoji rakoviny, různých dědičných onemocnění a jiných metabolických poruch.

Bylo rozpoznáno asi 130 opravných genů, ale ne u všech byla charakterizována jejich funkce. Opravné geny mohou být rozděleny na dvě podskupiny na geny se signalizační a regulační funkcí a na geny s rozdílnými mechanismy opravy (Obr.15) Můžeme je dělit na geny báze excizní reparace (BER), nukleotidové excizní reparace (NER), mismatch reparace (MMR-mismatch repair), přímá oprava poškození, oprava jednořetězcových zlomů (SSB – single strand breaks) a oprava dvouřetězcových zlomů (DSB- double strand breaks) [17].



Obr.15: Různé mechanismy oprav chyb při replikaci DNA [9]

## 2.6.1 Bázová excizní reparace

Bázová excizní reparace (BER) je hlavní mechanismus opravy poškozených bází, které vznikají jako produkty endogenní deaminace, oxidace a alkylace [18]. BER je zodpovědná za odstraňování poškozených DNA bází, které jsou rozpoznávány specifickými enzymy – DNA glykosylázami. Hlavními změnami určenými k BER jsou oxidované DNA báze, vznikající spontánně v buňce během zánětlivé reakce nebo při expozici exogenním činidlům, včetně ionizujícího záření a dlouhovlnného UV záření. Další hlavní zdroj poškození opravovaný BER je DNA alkylace indukovaná endogenními alkylačními sloučeninami a exogenními karcinogeny. Poškození odstraněná z DNA zahrnují inkorporovaný uracil, fragmentovaný pyrimidin, N-alkylované puriny (7-methylguanin, 3-metyladenin, 3-metylguanin), 7,8-dihydro-8-oxoguanin (8-OHgua) a další.

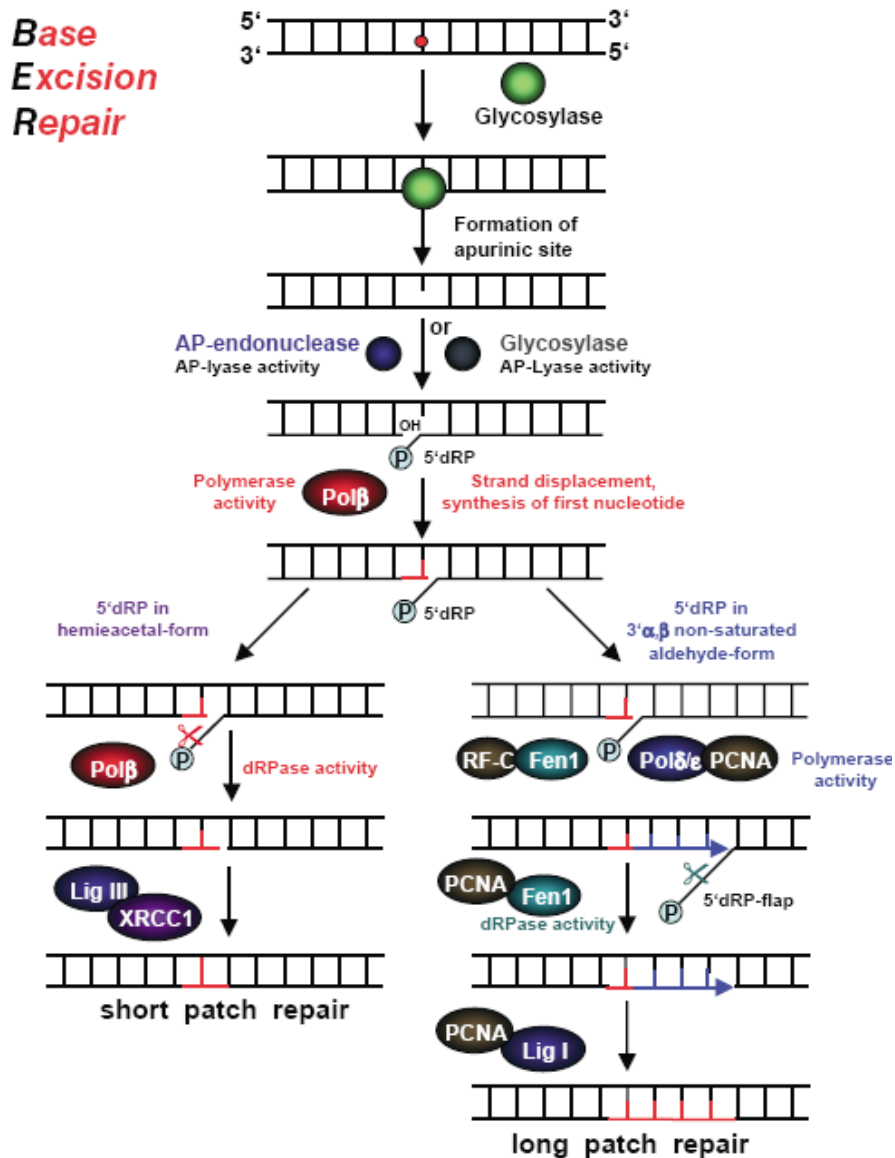
Hlavní oxidovaný purin, 8-OHgua, je vysoce mutagenní kvůli špatnému párování s adeninem. N-alkylpuriny jsou náchylné ke spontánní hydrolyze N-glykosylovaných vazeb. Vznikají při tom apurinova/apyrimidinová (AP) místa, která jsou jednou z nejčastějších letálních změn [17].

BER je vícekrokový proces složený ze sekvencí reakcí, které probíhají velice koordinovaně. BER zahrnuje následující kroky (Obr.16):

1. *rozpoznání a odstranění báze* - první krok je uskutečněn specifickými DNA glykosylázami, které rozpoznávají a odstraňují poškozené nebo nesprávné báze (uracil), hydrolyzou N-glykosidické vazby. Tyto glykosylázy rozdělujeme do dvou skupin na typ I a II. Glykosylázy typu I odstraňují modifikované báze a zanechávají AP místa, zatímco glykosylázy typu II odstraňují modifikované báze a zároveň štěpí AP místa vnitřní lyazovou aktivitou za vzniku jednovláknových zlomů. Vzniklé AP místo je substrátem pro endonukleázu, která hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu a tvoří 5'-deoxyribosofosfát (5'-dRP).
2. *vložení nukleotidu* – vložení prvního nukleotidu nezávisí na chemické struktuře AP místa. BER může dále pokračovat krátkou cestou, během které je 5'-dRP odstraněn DNA polymerázouβ (Polβ), a která vkládá jednoduchý nukleotid, nebo dlouhou cestou, která taky zahrnuje Polβ a vkládá první nukleotid na AP místo. Kritickým krokem při rozhodování mezi krátkou a dlouhou cestou je odstranění 5'-dRP po vložení prvního nukleotidu. Na rozdíl od opravy krátkou

cestou ve které je po vložení nukleotidu kostra DNA přímo uzavřena, při opravě dlouhou cestou se objevuje několik kroků navíc. Po disociaci  $\beta$  nahrazení řetězce a další DNA syntéza je dokončena  $\delta$   $\beta$   $\alpha$   $\epsilon$  spo lu v komplexu s PNCA (proliferating cell nuclear antigen) za účinku „flap“ endonukleasy -1 (FEN-1). Při opravě další cestou je nahrazeno až 10 nukleotidů.

3. *ligace*- tento krok je představován DNA ligázou I a III. DNA ligáza I se uplatňuje především při opravě dlouhou cestou, zatímco DNA ligáza III se účastní krátké opravy [17,18,19].



Obr.16: BER – bázová excizní reparace, abnormální báze v DNA je rozpoznána DNA-glykosylasou, která katalyzuje hydrolytické štěpení N-glykosylové vazby spojující cukr s bází. Excize poškozené báze dá vzniknout místu v sekvenci bez purinu anebo pyrimidinu (AP místo). V tomto místě začne následně působit endonukleasa (APE), která rozštěpí fosfodiesterový skelet. Oprava baze (vytvoření a vložení správné baze) je pak realizována komplexem složeným z XRCC1, polb a DNA-ligasy III (short patch repair) nebo působením Polδ a Polε spolu v komplexu s PNCA (proliferating cell nuclear antigen) za účinku „flap“ endonukleasy –1 (FEN-1)(long patch repair) [17].

## 2.6.2 Nukleotidová excizní reparace

NER je typ reparace, který se nachází u všech organismů, které eliminují poškození DNA vystřížením celých poškozených úseků (oligonukleotidů) a následným nahrazením novou DNA. Tento systém je zpravidla aktivován v místě, kde dochází k porušení struktury helixu v důsledku přítomnosti nesprávných či modifikovaných nukleotidů (bází). Tento systém rozpoznává především úseky s thyminovými dimery způsobujícími distorze ve struktuře dvoušroubovice a jednořetězcové zlomy (opravované UvrABC endonukleázami).

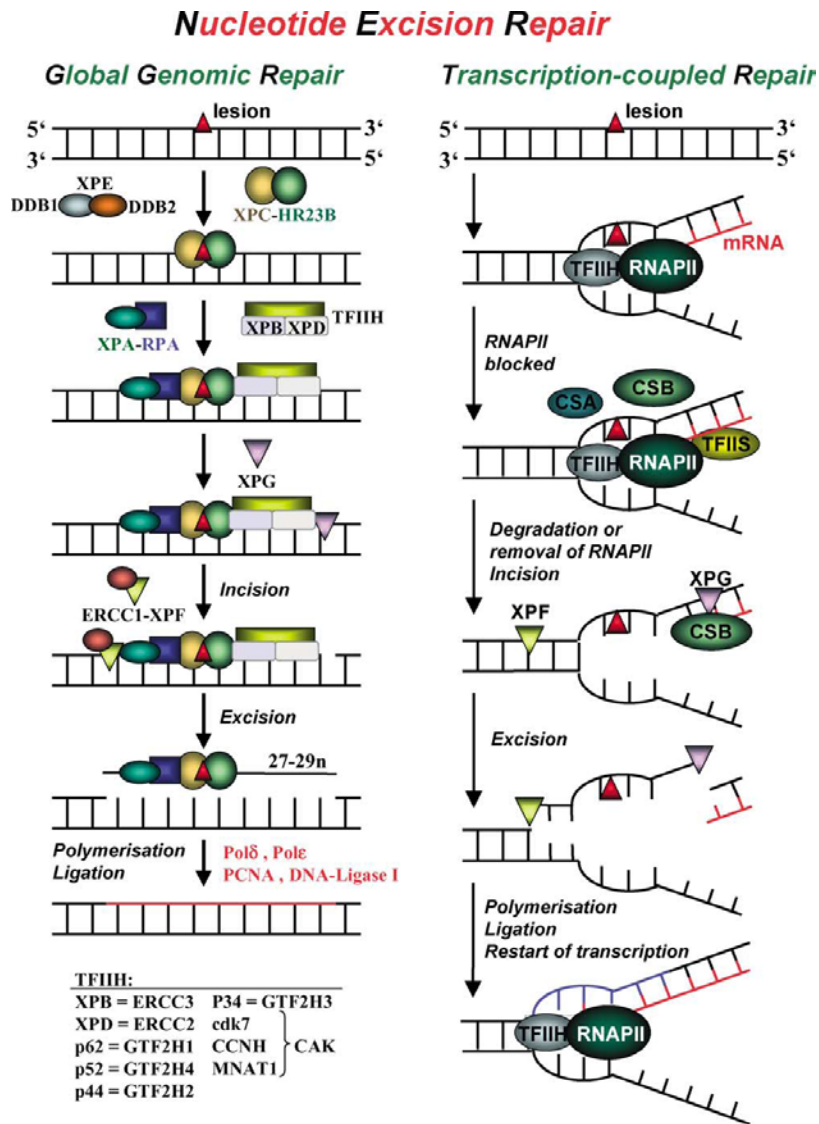
Geneticky kódovaná porucha NER reparačního systému u člověka způsobuje velmi závažné onemocnění, nazývané xeroderma pigmentosum, charakterizované extrémní citlivostí na světelné záření a brzkým vývoje rozsáhlé rakoviny pokožky. Obdobné onemocnění, které však nezpůsobuje rakovinové bujení je tzv. Cockayneuv syndrom [17].

Klasický typ NER označován jako GGR (global genomic repair) je nezávislý na transkripci. Existuje speciální druh NER známý jako TCR oprava (transcription-coupled repair), který zodpovídá za opravu poškození v genech aktivně přepisovaných. Průběh opravy GGR je následující (Obr.17):

1. Rozpoznání místa poškození jedním nebo více proteiny (XPC–HR23B, RPA–XPA or DDB1–DDB2)
2. Uvolnění DNA za současné tvorby „bubliny“ pomocí transkripčních faktorů TF IIIH (ten také funguje v procesu normální transkripce)
3. Vyštěpení poškozené částí tak, že ke štěpení dochází na 3'- a 5'- koncích poškozeného úseku (XPG a XPF–ERCC1)
4. DNA syntéza probíhající podle předlohy opačného (nepoškozeného) řetězce v místě odstraněného poškozeného úseku DNA. Tím jsou doplněny správné nukleotidy a enzymy zodpovědné za tuto činnost se nazývají DNA polymeráza delta a epsilon (Pol $\delta$  a Pol $\epsilon$ ).
5. Nově syntetizovaný úsek je pak ligázou kovalentně spojen s páteří DNA

Porucha TCR je přímo spjata s Cockaynovým syndromem. TCR odstraňuje poruchy spojené s blokováním RNA polymerázy z transkribovaných řetězců aktivních genů.

Mezi nezbytné proteiny podílející se na TCR patří CSA a CSB, XPB, XPD (jako část TFIIH) a XPG. Dojde k navázání proteinů na DNA, odstranění RNA poly II komplexu, vystřížení části řetězce (25-30 bází) s poškozeným místem. Odstraněná část je dosyntetizovaná polymerázou a spojena ligázou. Následuje pokračování transkripce [17,20].



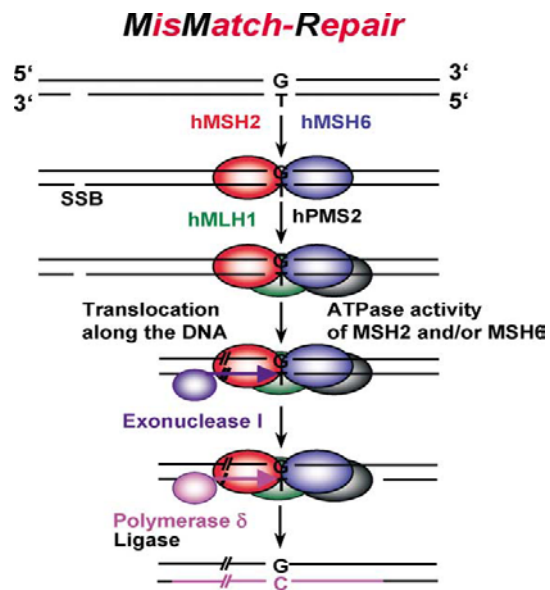
Obr.17: NER – nukleotidová excizní reparace, GGR (global genomic repair) je nezávislá na transkripci, k rozpoznání a vyštěpení poškozeného úseku se účastní řada proteinů, řetězec DNA je dosyntetizován polymerázou  $\delta$  a  $\epsilon$ . TCR (transcription-coupled repair) probíhá u právě transkribovaných genů, dojde k odstranění RNA poly II, vystřížení poškozeného řetězce, polymerace a ligace nového řetězce a pokračování transkripce [17].

### 2.6.3 Mismatch reparace

Jakákoliv chyba párování, která není opravena v průběhu replikace může být opravena pomocí mechanismu tzv. mismatch reparace (MMR – mismatch repair). Navíc, MMR systém umí opravit úseky, které mohou vznikat tzv. sklouznutím DNA polymerázy (slippage mechanismus), tj. nespárované úseky až 4 nukleotidu. Aby MMR systém mohl rozlišit, které z vláken DNA je správné, musí existovat systém, který určí správné, tedy templátové vlákno. Např. u *E.coli* je tento systém tvořen tzv. DAM methylázou, která methyloje sekvenci GATC u nově vzniklých vláken avšak s určitou časovou prodlevou. Vlákno, které je dceřiné zůstává tedy po určitou dobu nemethylováno. Tato doba je dostatečná k tomu, aby byly odhaleny nespárované úseky a opraveny MMR systémem. Jiný způsob rozpoznání dceřiného vlákna je, že na dceřiném vlákně se objevují zlomy (SSB) a ty jsou specificky rozpoznány.

MMR probíhá v následujících krocích (Obr.18):

1. *rozpoznání chyb párování* – je uskutečněno proteinem MutS, který se váže ve formě homodimeru na nespárovanou bázi. MutS komplex se skládá ze dvou homologních proteinů MSH2 a MSH6.
2. *vystřihnutí a opravná syntéza* - MutS-DNA komplex váže homodimer MutL, který je tvořen proteiny MLH1 a PMS2. MutS-MutL komplex vytváří na DNA smyčku za spotřeby ATP. Za pomoci MutH je rozpoznáno nemetylované vlákno DNA a rozstříženo endonukleázou na 5'-konci nemetylované sekvence GATC, popř. místo SSB. Tato sekvence může být až 1000 bazí vzdálená od místa nespárovaných bazí. Po vzniku nicku (nastřížení) odstraní exonukleáza ve spojení s proteinem UvrD (helikáza) nastřížené vlákno až po 3'-konec nespárované sekvence. Odstraněné vlákno je znovu syntetizováno dle templátové metylované DNA Pol $\delta$  a spojeno pomocí DNA ligázy [17,20].



Obr.18: MMR – mismatch reparační, oprava nesprávného párování bází, pomocí komplexu proteinů dojde k rozpoznání a odstranění nesprávného řetězce, polymerázou  $\delta$  se odstraněná část nahradí [17].

## **3 PRAKTICKÁ ČÁST**

## 3.1 Materiál

### 3.1.1 Buněčné linie

Pokus jsme prováděli za použití buněčných linií AA8 a UV-20. Jsou to linie ovariálních buněk křečička čínského, které byly popsány a izolovány Thompsonem (1980). Buňky jsme získali od prof. Collinse (Univ. Oslo, Norsko). Kultivovány byly v médiu MEM alfa doplněném o směs antibiotik a o 10% bovinního sérového albuminu. Buňky jsme pasážovali trypsinizací 2 x týdně v poměru 1:5. Linie UV-20 se vyznačuje zvýšenou citlivostí k UV záření v důsledku specifických defektů v excisní reparaci DNA.

### 3.1.2 Pomůcky a přístroje

Fluorescenční mikroskop Eclipse E400, zvětšení 20x / 0.50 (NIKON, Japonsko); Světelný mikroskop (Telaval); UV-lampa (Philips); UV-light metter (Thaiwan); Centrifuga Z 400 K (Hermle, Německo); CO<sub>2</sub> inkubátor (Shellab, USA); Parní sterilizátor (Tuttaufer); Laminární box AURA 2000 (Itálie); Lázeň 37°C MTA, Kutesz 609/a (Mad'arsko); Magnetická míchačka s ohřevem MSH basic (Yellow line, Německo); Mikrovlnná trouba (Goldstar, Korea); Automatické pipety (HTL, Polsko); Dewarovy nádoby 34XT (Taylor-Wharton, USA); Výrobek ledové tříště (Angelantoni Industrie, Itálie); Ice Maker CB 184 (Brema); Lednice (Calex, Iberna, Bosch); Mrazák (Bosch); Analytické váhy (Boeco, Německo); Předvážky EMB 220-1 (Kern, Německo); Počítač HP – Windows XP, Programy Lucia comet assay: Laboratory imaging, Praha, Statistický program: Sigma-stat; Laboratorní sklo a další běžné vybavení laboratoře.

### 3.1.3 Chemikálie

Agaróza normální (na potahování sklíček) – Serva-Boehringer Bioproducts Partnership, Německo; agaróza HMP (high melting point) a nízkotuhnoucí LMP (low melting point) – Sigma St. Luis, USA; bovine serum albumin (BSA) – Sigma St. Luis, USA; ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – Lachema ČR; epigalokatechingallát (EGCG) – Sigma Aldrich, Německo; enzymy endonukleáza III (endo III) a

formamidopyridinglykosyláza (FPG) – Ústav experimentální botaniky AVČR; ethidiumbromid (EB) – Sigma Aldrich, Německo; Giemsa Romanovski – Sigma-Aldrich, Německo; hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – Peroxides s.r.o, ČR.; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES) – Sigma Aldrich, Německo; KCl – Lachema, ČR; kyselina octová – Lachema, ČR; medium MEM – Alfa Modification with L-Glutamine, with Nucleosides – Biotech, ČR; Methanol – Kulich HK, ČR; NaCl – Lachema, ČR; NaOH – Lachema, ČR; phosphate-buffered saline (PBS) – Sigma St. Luis, USA; hydroxymethylaminomethan (Tris) – Penta, ČR; Triton X-100 – Sigma Aldrich, Německo; trypsin – Biotech, ČR;

Během pokusu jsme používali čerstvě připravené roztoky z tridestilované vody (pokud není uvedeno jinak):

<i>Roztok agarózy 1%</i>	Na potažení sklíček	1g	do 100ml vody
	Standardní (HMP)	100mg	do 10ml PBS
	Nízkotuhnoucí (LMP)	100mg	do 10ml PBS
<i>Lyzační roztok (1000ml)</i>	2,5M NaCl	146,1g	
	100mM EDTA	29,22g	
	10mM Tris	1,2114g	
Upraveno na pH 10	koncentrovaný NaOH	(asi 12g do 1000ml)	
Před použitím přidán	1% triton X - 100	1ml do 100ml roztoku	
<i>Roztok pro elektroforézu (1500ml)</i>	300mM NaOH	18g	
	0,5mM EDTA	3ml	
<i>Neutralizační roztok (1000ml)</i>	0,4M Tris	48,456g	
Upraveno na pH 7,5	koncentrovaná HCl	(asi 25ml do 1000ml)	

<i>Pufr endo III (1000ml)</i>	KCl	7,45g
	HEPES	9,53g
	EDTA	1,46g
	BSA	0,2g
Upraveno na pH 8	přidání KOH	(asi 1g do 1000ml)
<i>Roztok ethidiumbromidu</i>	EB	20µg do 1ml

## 3.2 Metody

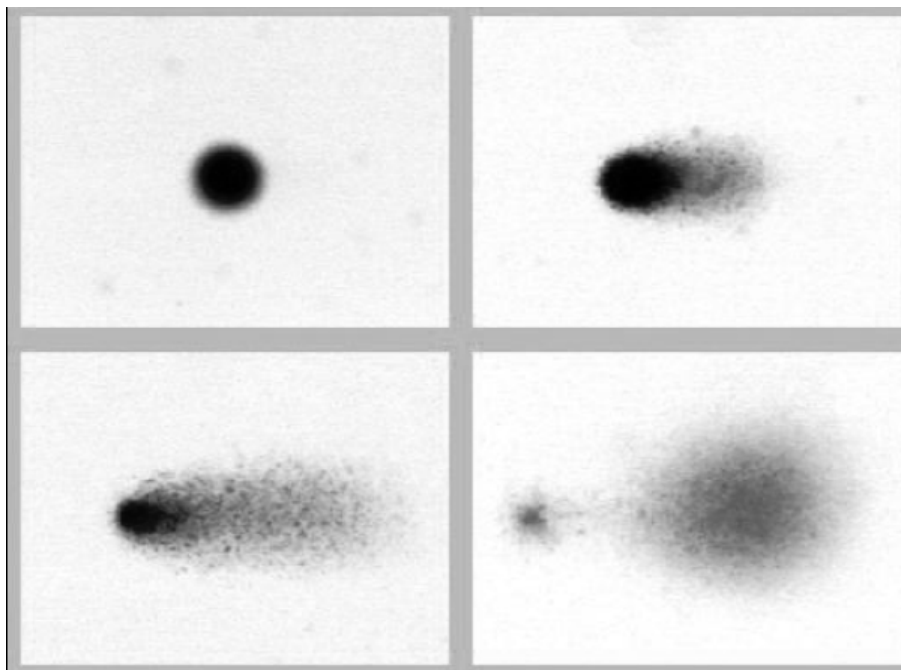
### 3.2.1 Test inhibice tvorby kolonií

Na každou petriho misku ( průměr 40 mm) bylo vyseto 200 buněk v 1,5 ml média. Druhý den byl na buňky dán  $H_2O_2$ , v koncentraci 0mM, 0,06mM, 0,12mM, 0,25mM a 1mM, na dobu 5min, potom byly misky opláchnuty PBS a přidáno čerstvé médium. Vyrostlé kolonie byly 7 dní po vysetí buněk fixovány směsí metanol-kys.octová (3:1), obarveny Giemsou a spočítány. Cytotoxický efekt je vyjádřen snížením počtu vyrostlých kolonií vzhledem ke kontrolám bez hydrogenperoxidu.

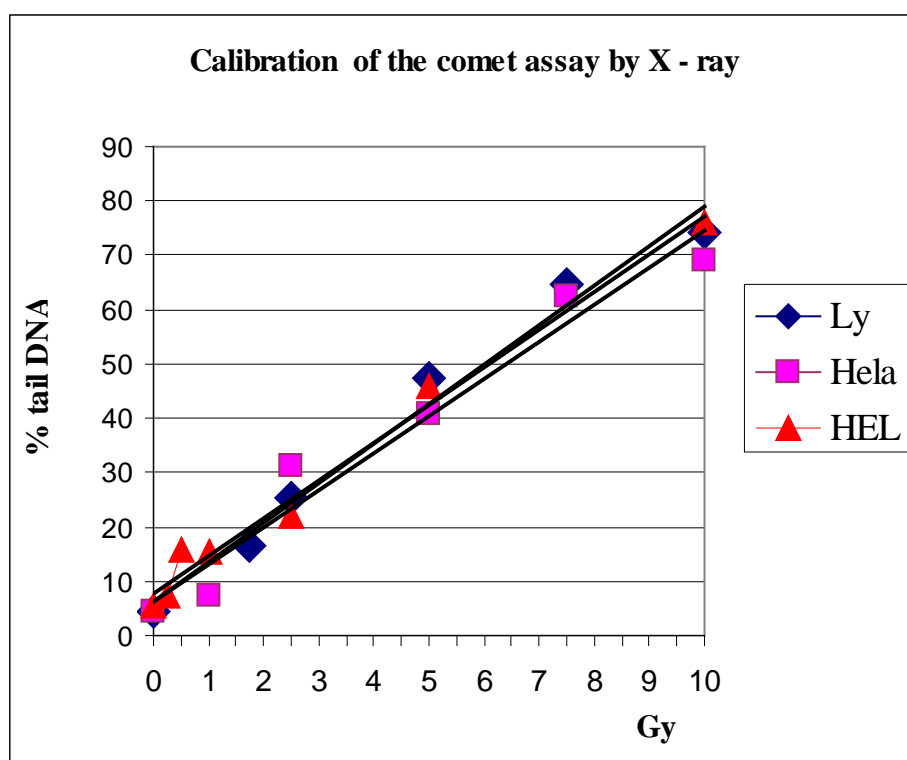
### 3.2.2 Kometový test

#### Popis metody:

Při kometovém testu, přesněji metodě jednobuněčné gelové elektroforézy, je sledováno chování jaderné DNA buňky během elektroforézy. Působením mutagenů dochází k narušení struktury DNA a k uvolňování jejích fragmentů. Čím větší poškození DNA (počet zlomů), tím větší migrace během elektroforézy. Buňky jsou zality do 1% agarózy na podložním sklíčku a ponořeny do lyzačního roztoku, kde dochází k rozpadu buněčných membrán. Pak jsou sklíčka vložena do elektroforetického tanku do alkalického roztoku. Působením alkalického prostředí dochází k rozpadu alkalilabilních míst a vzniku zlomů DNA. Je provedena elektroforéza. Pokud je DNA porušena, putuje ven z jádra směrem k anodě. Buňky jsou obarveny fluorescenční barvou (ethidiumbromidem) a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu. Pokud DNA není poškozena, během elektroforézy nemigrovala a my můžeme vidět jasně svítící kulatá jádra. U poškozených jader pozorujeme struktury připomínající kometu, kde část DNA uvolněná z jádra tvoří ohon komety a zbylá jaderná DNA je jádrem komety (Obr.:19). Fluorescence ohonu komety je hodnocena vzhledem k fluorescenci v jádře komety. Čím větší je fluorescence ohonu komety, tím došlo k většímu počtu zlomů a poškození DNA. Fluorescence je vyhodnocována pomocí obrazové počítačové analýzy Lucia. Procento DNA v ohonu komety je přímo úměrné počtu indukovaných zlomů [12]. Pro přepočet parametru % tail DNA na zlomy DNA (SSB) jsme použili kalibrace této metody rentgenovým zářením (Obr.:20). Počet SSB můžeme vypočítat podle vzorce  $SSB = \text{faktor } 0,042 \times \% \text{ Tail DNA}$  [21].



Obr.19: Zobrazení jader v kometovém testu. A – kontrolní jádro;  
B, C, D – jádra s různým stupněm poškození [22].



Obr.20: Kalibrace kometového testu rentgenovým zářením [21].

U části pokusů byla pro kometový test použita modifikace. Po provedení lýzy buněk jsme na sklíčka s buňkami působili specifickými enzymy endo III a FPG. Enzym endo III působí štěpení DNA v místě oxidovaných pyrimidinů a FPG v místě oxidovaných purinů (8-OHgua). Dále jsme postupovali stejně.

### **Popis pracovního postupu:**

Před započítáním pokusu jsme si připravili podložní sklíčka. Můžeme je mít připravené i delší dobu do zásoby. Podložní sklíčka jsme ponořili do 1 % roztoku agarózy pro potažení sklíček. Za horní okraj jsme sklíčko drželi pinzetou (slouží později pro umístění popisku). Po vytažení z agarózy jsme spodní stranu otřeli, položili na plechový podnos a nechali ztuhnout. Postupovat musíme rychle, aby se na sklíčkách vytvořila rovnoměrná vrstva. Po vychladnutí jsme sklíčka dali do sušárny a sušili při 60° C. Uložili jsme je tak, abychom věděli, na které straně je agaróza.

Připravili jsme si spodní vrstvu agarózy na sklíčku. Na sklíčko potažené agarózou jsme dali 85 µl HMP agarózy a ihned přikryli krycím sklíčkem. Sklíčka jsme dali na plechový táč umístěný na ledě. Agaróza je tuhá asi za 15 minut. Krycí sklíčka jsme stáhli plynulým pohybem až těsně předtím, než jsme dali druhou vrstvu s buňkami.

Hlavní a nejdůležitější částí pokusu je ovlivnění buněk. Ovlivnění jsme prováděli roztoky H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daných koncentrací - 0 mM, 0,25mM, 0,5 mM a 1 mM, po dobu 5 min. Všechny roztoky jsme měli připravené čerstvé, uchovávané v ledu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jsme odsáli a ihned pokračovali v pokusu (reparace 0min) nebo jsme na buňky dali medium a vložili do termostatu na 30min nebo 60min (čas reparace 30min, 60min).

U buněk, které jsme ovlivnili na miskách, jsme odsáli medium, jednou opláchli PBS a dali na ně na jednu minutu asi 1 až 2 ml trypsinu. Trypsin jsme odsáli, a misky dali na 1 až 2 minuty do termostatu. Potom jsme na misky napipetovali medium a to 0,1ml až 0,3ml na 30mm misku, 0,3ml až 0,6 ml na 60mm misku. Množství media jsme odhadli podle množství buněk, které na miskách narostly. Buňky jsme v mediu špičkou resuspendovali.

Pro horní vrstvu agarózy s buňkami jsme použili 1% LMP agarózu. Rozvařili jsme ji předtím než jsme připravili buňky. Po rozvaření jsme ji umístili do kádinky s vodou a postavili do lázně 37° C. Než jsme smíchali LMP agarózu s buňkami, musela mít 37°C. Do eppendorfky jsme pipetovali 20 µl buňk resuspendovaných v mediu.

K buňkám jsme přidali 85  $\mu$ l LMP agarózy, promíchali špičkou a 85  $\mu$ l agarózy s buňkami pipetovali na podložní sklíčko s vrstvou HMP agarózy. Ihned jsme přikryli krycím sklíčkem a dali ztuhnout na ták s ledem.

Lýza – z podložních sklíček s agarózou s buňkami jsme stáhli krycí sklíčka a dali do kyvety a zalili lyzačním roztokem. Kyvetu jsme dali na jednu hodinu do lednice.

Dále může následovat ovlivnění enzymy – endo III, FPG – podle toho jaký pokus provádíme. Po lýze jsme sklíčka promyli v kyvetě 3x5 minut pufrém endo III (pro FPG jsme použili stejný pufr) při 40°C. Potom sklíčka zakapali 50  $\mu$ l roztoku enzymu (100x se zředí zásobní roztok enzymu). Přikryli se krycím sklíčkem a inkubovali se při 37°C 45 minut (v krabici s vlhkým filtračním papírem).

Alkalické rozplétání DNA – do tanku v lednici jsme nalili 1,5 l vychlazeného roztoku pro elektroforézu. Roztok jsme měli připravený čerstvý a vychlazený alespoň na -8°C. Sklíčka jsme vkládali do tanku číslem vpravo tak, aby byla úplně ponořená, prázdná místa jsme doplnili volnými sklíčky. Zkontrolovali jsme připojení drátu a nechali v lednici 40 min.

Elektroforéza – po uplynutí 40 minut jsme zapli elektrický zdroj, nastavený na 25 V a asi 300 mA. Proud jsme upřesnili přidáním nebo odebráním roztoku. Elektroforéza probíhala 30 minut.

Sklíčka jsme vytáhli z elektroforetického tanku, vložili do kyvety a propláchli neutralizačním roztokem 3 x 5 minut.

Barvení – probíhalo až když jsme chtěli sklíčka hodnotit. Mohly být obarvena ihned po provedení pokusu nebo i později (v tom případě jsme je před barvením zvlhčili v kyvetě ponořené do destilované vody). Barvili jsme roztokem ethidiumbromidu. Na sklíčka jsme napipetovali 20  $\mu$ l a přikryli krycím sklíčkem.

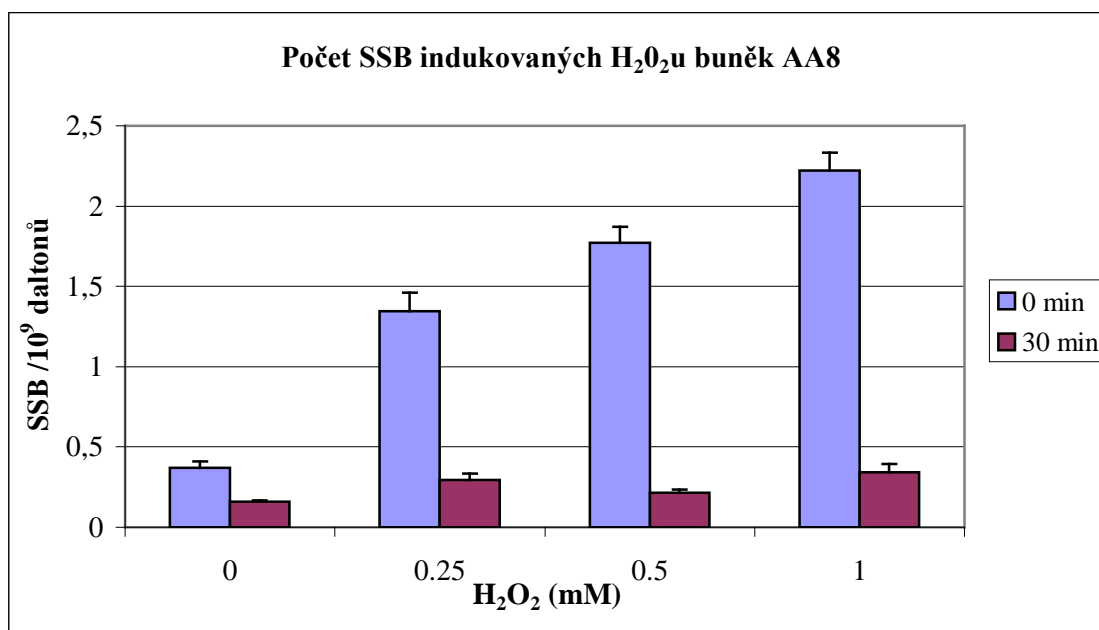
Hodnocení poškození DNA jsme prováděli ve fluorescenčním mikroskopu počítačovou obrazovou analýzou LUCIA. Pomocí Mann-Whitneyova testu jsem sledovali statistickou významnost rozdílu počtu zlomů mezi dvěma skupinami.

### 3.3 Výsledky

**A)** Byla sledována míra oxidativního poškození u buněk AA8 za použití kometového testu. Zjišťovali jsme počet jednoduchých zlomů (SSB) – bez působení enzymů – v porovnání s počty zlomů za působení enzymů endo III a FPG na buňkách ovlivněných 0 mM, 0,25mM, 0,5mM a 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při různé době reparače.

1.) Buňky AA8 jsme ovlivnili H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v koncentraci 0 mM, 0,25mM, 0,5mM a 1mM. U jedné části kultur jsme ihned stanovili počet SSB kometovým testem, paralelní kultury byly dále inkubovány 30 min. v termostatu při 37°C pro umožnění reparače DNA. Výsledky stanovení počtu zlomů (SSB) v závislosti koncentraci hydrogenperoxidu a reparači ukazuje Graf 1.

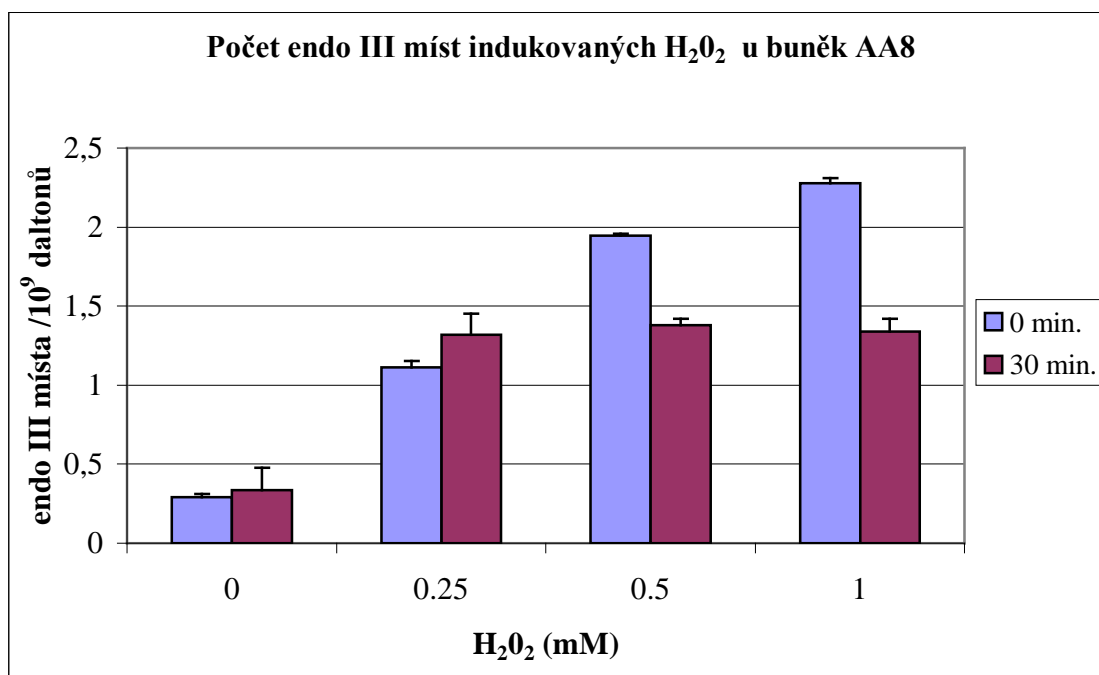
Počet SSB roste se zvyšující se koncentrací. Při koncentraci 0mM je počet SSB asi 0,4/10<sup>9</sup>daltonu, při 0,25mM asi 1,4/10<sup>9</sup>daltonu, při 0,5mM 1,8/10<sup>9</sup>daltonu a při 1mM je počet SSB 2,2/10<sup>9</sup>daltonu. Zjistili jsme, že po 30min reparače došlo k viditelnému snížení počtu SSB. Počet SSB se snížil u všech koncentrací pod 0,5/10<sup>9</sup>daltonu.



Graf 1.: Počet SSB indukovaných H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u buněk AA8 v čase 0 a po 30min reparače

2.) V dalším pokusu jsme postupovali obdobně. Buňky byly ovlivněny hydrogenperoxidem v různých koncentracích. Po ovlivnění a nebo po následné 30 min. reparaci byly buňky během kometového testu ( po vynětí z lyzačního roztoku ) ovlivněny endo III. Byl sledován rozdíl počtu míst štěpení DNA v místě oxidovaných pyrimidinů (místo, kde působí endo III) v závislosti na čase reparace (0min a 30min) a koncentraci  $H_2O_2$  (Graf 2.).

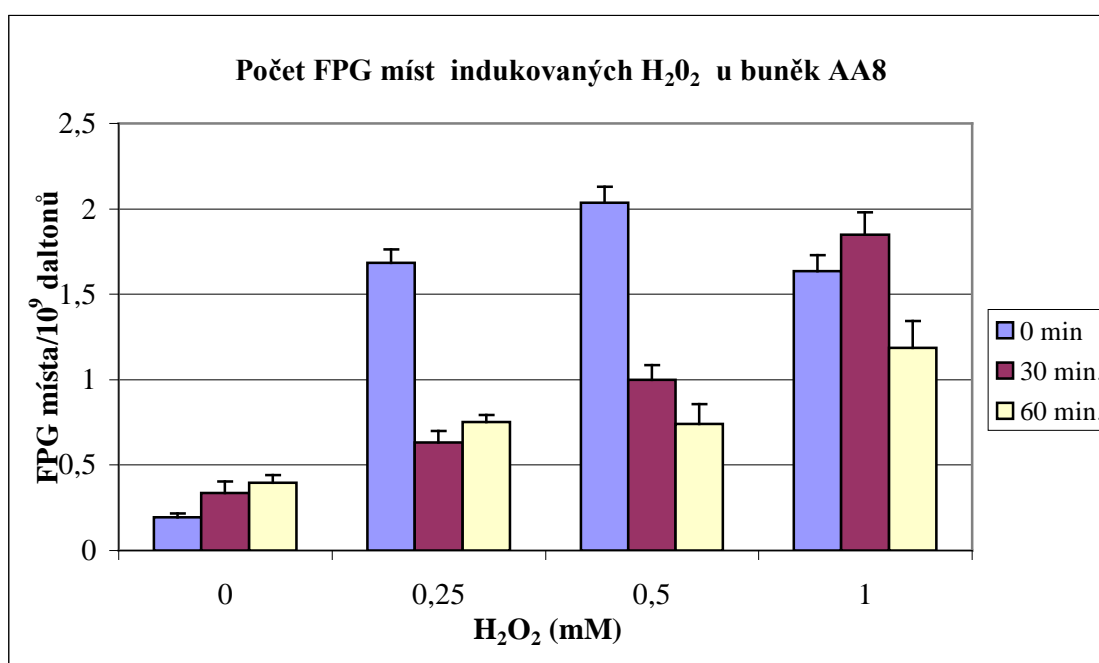
Zjistili jsme, že u vyšších koncentrací došlo ke snížení počtu štěpených endo III míst. Jen při koncentraci 0,25mM došlo k mírnému nárůstu asi o  $0,2/10^9$  daltonu. Při koncentracích 0,5mM a 1mM se počet endo III míst snížil asi o jednu třetinu.



Graf 2.: Počet **endo III** míst indukovaných  $H_2O_2$  u buněk AA8 v čase 0 a po 30min reparace

3.) V případě dalšího pokusu jsme na buňky působili FPG. Sledovali jsme počet štěpení v místě oxidovaných purinů (8-OHgua) (na místech působení tohoto enzymu) po dobu 0min, 30min a 60min reparační a různé koncentraci  $H_2O_2$  (Graf 3.).

Opět došlo ke snížení počtu FPG míst vzhledem k nulovému času reparační. Jen při vyšší koncentraci  $H_2O_2$  ke snížení počtu FPG míst došlo až po 60min reparační. Při koncentraci 0,25mM a 0,5mM se počet FPG míst snížil po 30min asi o polovinu. Při koncentraci 1mM se po 30min reparační počet mírně zvýšil, ale po 60 min došlo ke snížení asi o třetinu.

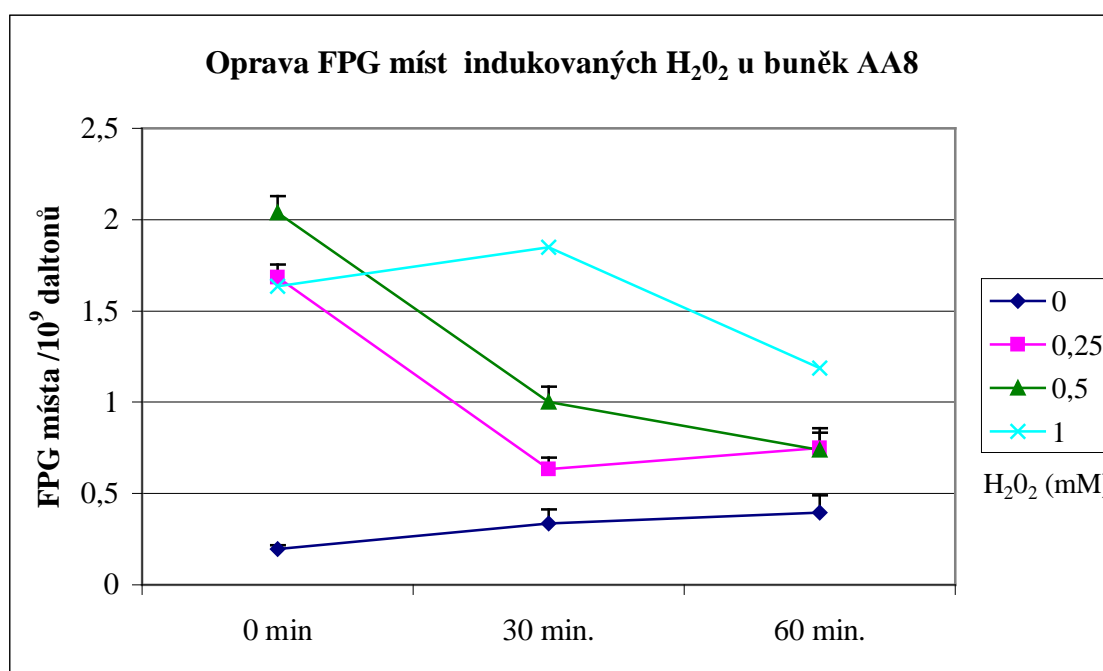


Graf 3.: Počet **FPG míst** indukovaných  $H_2O_2$  u buněk AA8 v čase 0, po 30min a 60min reparační

**B)** Byl sledován rozdíl schopnosti buněk AA8 a UV-20 opravit poškození vyvolané různými koncentracemi  $H_2O_2$  a účinkem FPG za použití kometového testu.

1.) Na buňky AA8 jsme působili  $H_2O_2$  (v koncentraci 0 mM, 0,25mM, 0,5mM a 1mM) a FPG. Sledovali jsme počet vzniklých FPG míst po 30min a 60min reparace (Graf 4.).

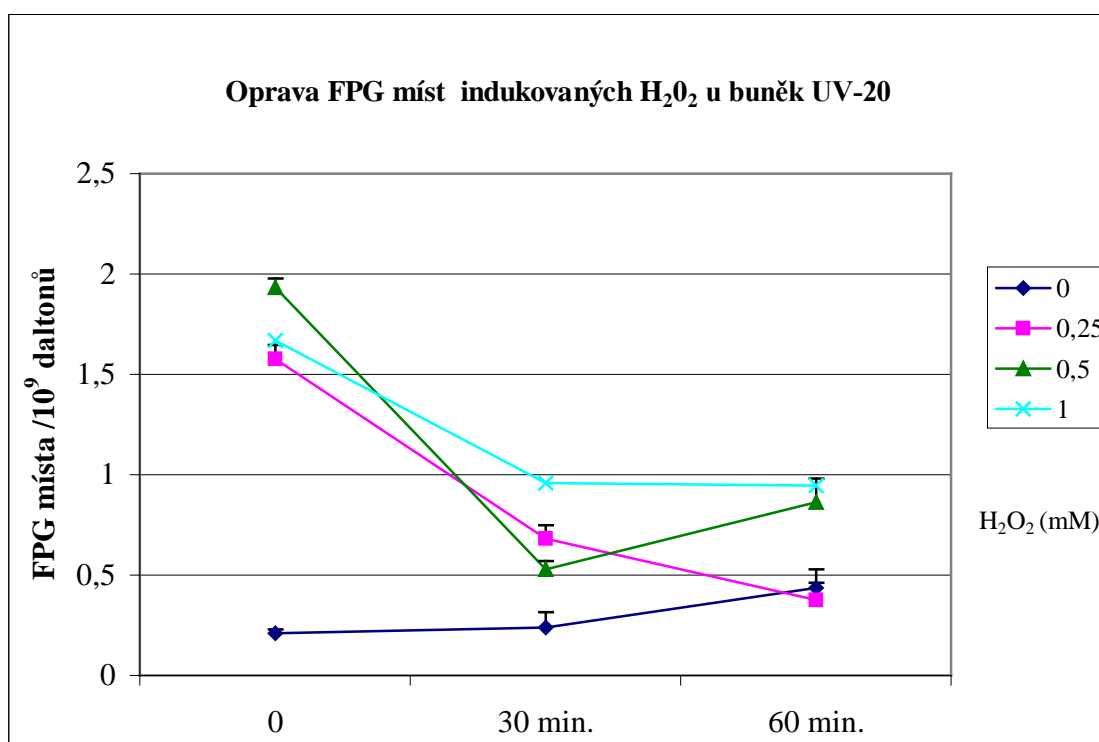
U buněk AA8 došlo v koncentracích 0,25 a 0,5 mM  $H_2O_2$  k poklesu počtu FPG míst po 30min reparace asi o polovinu a po 60min došlo už jen k mírné změně. Při použití koncentrace 1mM po 30min reparace došlo k mírnému nárůstu. Počet se snížil až po 60min reparace a to asi o jednu třetinu.



Graf 4.: Oprava FPG míst indukovaných  $H_2O_2$  u buněk AA8

2.) Stejně jako v předchozím případě jsme působili na buňky UV-20  $H_2O_2$  a při zpracování kometovým testem také FPG. Sledovali jsme počet opravených FPG míst po 30min a 60min reparace (Graf 5.).

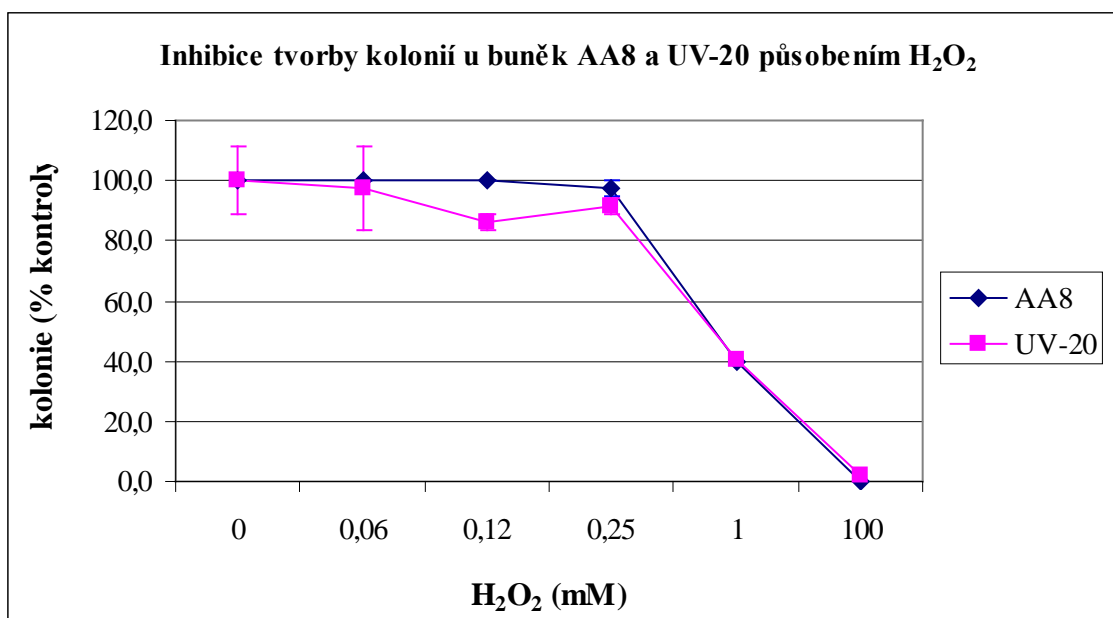
U buněk UV-20 došlo k poklesu počtu FPG míst u všech koncentrací již po 30min reparace. Při koncentraci 0,25mM se počet FPG míst snížil po 30min reparace asi o polovinu a po 60min na čtvrtinu původního počtu. U koncentrace 0,5mM po 30 min se počet snížil téměř na čtvrtinu původních hodnot a po 60min reparace se mírně zvýšil. Při koncentraci 1mM se počet FPG míst snížil téměř o polovinu po 30min reparace a po 60 min k výrazné změně nedošlo.



Graf 5.: Oprava FPG míst indukovaných  $H_2O_2$  u buněk UV-20

C) Dále byl zjišťován cytotoxický efekt  $H_2O_2$ , v koncentraci 0mM, 0,06mM, 0,12mM, 0,25mM a 1mM, a to metodou testu inhibice tvorby kolonií. Sledovali jsme rozdíl ve schopnostech buněk AA8 a UV-20 přežít oxidativní poškození (Graf 6.).

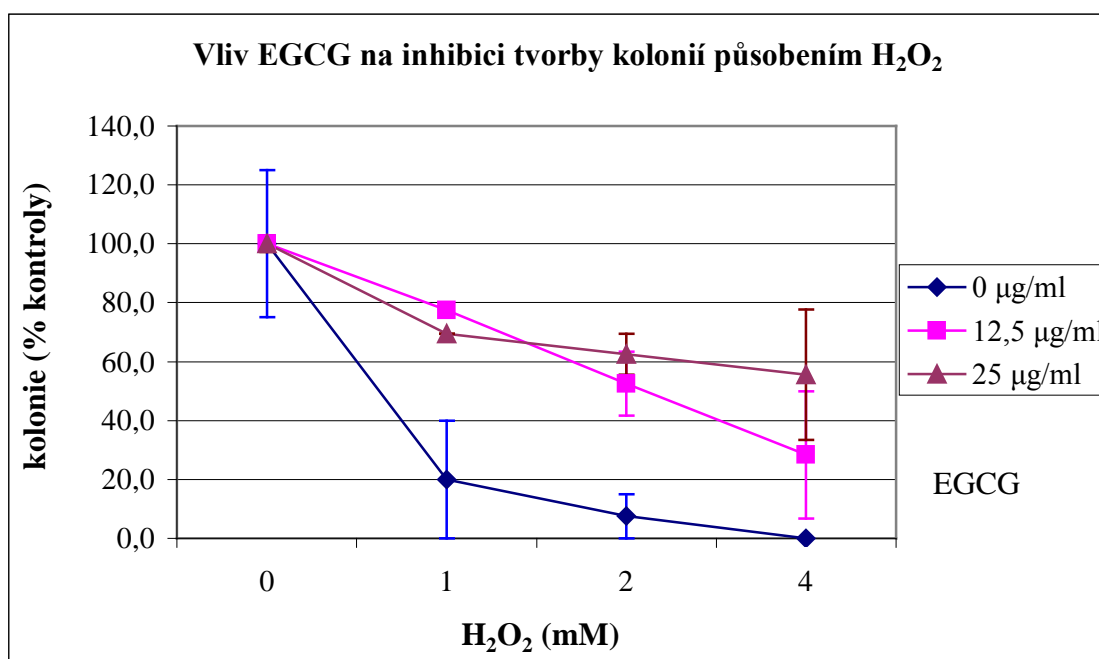
U obou linií buněk jsme zjistili, že počet narostlých kolonií po předchozím působení  $H_2O_2$  je přibližně stejný. Pokles počtu kolonií při koncentraci do 0,25mM je minimální. K většímu snížení dochází při koncentraci 1mM, a to asi na 40% původního počtu. Při použití koncentrace 100mM nepřežily téměř žádné kolonie obou typů buněk.



Graf 6.: Inhibice tvorby kolonií u buněk AA8 a UV-20 působením  $H_2O_2$

**D)** Dále jsme sledovali vliv EGCG v koncentraci 0mM, 12,5mM a 25mM na cytotoxický efekt  $H_2O_2$  u buněk AA8, při koncentraci 1mM, 2mM a 4mM (Graf 7.).

Při působení na buňky bez EGCG při koncentraci 1mM  $H_2O_2$  přežívá jen 20% kolonií, s rostoucí koncentrací  $H_2O_2$  se počet kolonií snižuje až na nulu. Při koncentraci 12,5mM a 25mM EGCG je počet přežívajících kolonií vyšší. Při koncentraci 1mM  $H_2O_2$  to je asi 75%, při koncentraci 2mM asi 60%. Při použití koncentrace 4mM  $H_2O_2$  je již vidět značný rozdíl v počtu přeživších kolonií. U 25mM EGCG je procento nejvyšší a to asi 55%, u 12,5mM přežívá 30% kolonií a bez použití EGCG nepřežila žádná buňka.



Graf 7.: Vliv EGCG na inhibici tvorby kolonií působením  $H_2O_2$

### 3.4 Zhodnocení a diskuse

V této práci jsme se pokusili ověřit mechanismus cytotoxického účinku oxidativního poškození DNA. Toto poškození jsme indukovali peroxidem vodíku. Naším cílem bylo ověřit, zda se bude lišit účinek peroxidu vodíku u buněk deficientních v nukleotidové excizní reparaci a buněk normálních. Ačkoli oxidativní poškození DNA je z DNA odstraňováno především mechanismem báze excizní reparace, určitý podíl nukleotidové excizní reparace někteří autoři nevyklučují [17]. Proto jsme v našich pokusech sledovali, jak se liší rychlost opravy poškození DNA u normálních buněk čínského křečka AA8 a jejich mutanty UV-20 deficientní v nukleotidové excizní reparaci. Tyto buňky byly původně izolovány Thompsonem [23], a vzhledem k svojí neschopnosti iniciovat incisi DNA poškozené UV zářením jsou k tomuto záření vysoce citlivé.

V našich pokusech jsme nejdříve ověřovali, zda mutantní buňky UV-20 opravují poškození vyvolané peroxidem vodíku stejně účinně jako normální reparačně kompetentní buňky AA8. Nejdříve jsme sledovali opravu přímých zlomů DNA, tj. alkalilabilních míst stanovených kometovým testem. Zjistili jsme, že SSB jsou u normálních buněk AA8 opravovány velmi rychle. Během 30 minut byly prakticky všechny zlomy DNA odstraněny. Alkalilabilní místa indukovaná působením enzymu Endo III (štěpí oxidované puriny) však byla z DNA odstraňována pomaleji, takže za 30 minut zůstávala přibližně třetina těchto míst neopravena. Podobně tomu bylo v případě míst štěpených enzymem FPG (štěpí 8-oxoguaniny). Zde zůstávalo neopraveno přibližně polovina (po dávkách  $H_2O_2$  0,25 a 0,5mM) nebo třetina (po dávce 1 mM) indukovaných FPG-míst i po šedesáti minutách

Zlomy vyvolané působením enzymů endo III a FPG se opravují pomaleji a méně úspěšně než SSB. Z toho můžeme vyvodit, že oxidační poškození vyvolané  $H_2O_2$  za působení enzymů tj. vznik oxidovaných bází bude mít větší vliv na přežívání buněk.

V další části pokusů jsme zjišťovali rozdíl mezi buňkami AA8 a UV-20 ve schopnosti opravit poškození vyvolané různými koncentracemi  $H_2O_2$  a účinkem FPG a schopnost přežít oxidační poškození.

Linie buněk UV-20 se vyznačuje specifickými defekty v excizní reparaci. Tyto buňky nejsou schopny opravovat poškození DNA pomocí mechanismů nukleotidové excizní reparace (NER) a není jisté, zda umí opravit poškození pomocí báze excizní reparace (BER). Předpokládá se, že právě BER je rozhodující částí účastníci se opravy oxidačního poškození způsobené  $H_2O_2$  [24].

V dalších pokusech jsme porovnávali opravu oxidativního poškození DNA u buněk AA8 a UV-20. U obojího typu buněk došlo k opravě oxidačního poškození přibližně stejnou měrou. Počet zlomů na FPG místech se jak u buněk AA8, tak i u buněk UV-20 snížil po 30min (resp. po 60min) reparace v průměru asi o 50%.

Tyto výsledky ukázaly, že není výrazný rozdíl v opravě oxidačního poškození vyvolané  $H_2O_2$  a účinkem FPG mezi buňkami AA8 a UV-20. Můžeme tak usoudit, že i když buňky UV-20 nejsou schopny opravy pomocí mechanismu NER, opravují oxidační poškození mechanismy BER, které jsou rozhodující součástí opravy oxidačního poškození.

Na cytotoxický účinek má především vliv vznik oxidovaných bazí, pyrimidinu a purinu, které vznikají účinkem  $H_2O_2$ , a spolu s působením enzymů endo III a FPG dochází na těchto místech ke vzniku zlomů.

Provedli jsme test inhibice tvorby kolonií buněk AA8 a UV-20, abychom zjistili jestli existuje rozdíl ve schopnosti přežít oxidační poškození u těchto dvou linií buněk. Zjistili jsme, že zde není rozdíl v přežívání těchto dvou typů buněk. Ještě při koncentraci 0,25mM  $H_2O_2$  přežívá téměř většina buněk, při koncentraci 1mM je to již asi jen 40% buněk a při koncentraci 100mM nepřežila již žádná.

Toto zjištění odpovídá i předchozímu pokusu, kdy jsme sledovali počet zlomů a schopnost reparace buněk AA8 a UV-20. Oba typy buněk vykazují stejnou schopnost reparovat oxidační poškození i schopnost přežít oxidační působení. Cytotoxický účinek  $H_2O_2$  je u obou typů buněk stejný.

Dále jsme chtěli ověřit, zda se změní cytotoxicita v případě, kdy snížíme indukci oxidativního poškození působením antioxidantní látky. K těmto pokusům jsme vybrali EGCG. U EGCG se předpokládá, že má ochranný vliv na buňku, má antimutagení účinek na několik karcinogenů. EGCG též účinně inhiboval indukci SSB [25].

V našich pokusech jsme zjistili, že pokud na buňky působíme EGCG, přežívá po jejich ovlivnění peroxidem vodíku větší množství kolonií než bez použití EGCG.

V předchozích pokusech jsme zjistili, že vliv na cytotoxicitu mají zlomy vznikající v místech oxidovaných bazí. Také oprava endo III a FPG míst je urychlena působením EGCG, jak vyplývá z diplomové práce kolegyně Havlínové [26], a to odpovídá snížení cytotoxicity.

### 3.5 Závěr

Úkolem této práce bylo zjistit jakou míru poškození vyvolává  $\text{H}_2\text{O}_2$ , spolu s využitím enzymů endonukleázy III (endo III) a formamidopyridinglykosylázy (FPG), a jaký vliv má oxidativní poškození vyvolané  $\text{H}_2\text{O}_2$  na cytotoxicitu u buněk AA8 a UV-20.

Zjistili jsme, že působením  $\text{H}_2\text{O}_2$  na buňky AA8 dochází ke vzniku jednoduchých zlomů DNA (SSB). Pokud na buňky spolupůsobíme enzymy endo III a FPG dochází ke štěpení na místech oxidovaných bazí. SSB se po 30min reparace opravují rychleji a s větší účinností než oxidované báze detekovatelné působením enzymů endo III a FPG. Tyto oxidované báze patrně hrají podstatnou roli v cytotoxickém účinku peroxidu vodíku

Buňky UV-20 vykazují stejnou schopnost opravit oxidační poškození jako buňky AA8 a oba typy buněk také vykazují stejnou schopnost přežít působení oxidačního činidla  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cytotoxický účinek  $\text{H}_2\text{O}_2$  na kolonie obou linií buněk je stejný.

Působením EGCG na buňky dochází ke snížení cytotoxického účinku  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## Seznam obrázků

Obr. 1: Počet nově vzniklých případů rakoviny u žen [5] .....	10
Obr. 2: Počet nově vzniklých případů rakoviny u mužů [5].....	10
Obr. 3: Nejčastější příčiny smrti na rakovinu u žen [5].....	11
Obr. 4: Nejčastější příčiny smrti na rakovinu u mužů [5] .....	11
Obr.5: Flavon [13] .....	26
Obr.6: Katechin [13] .....	26
Obr.7: Epikatechin [13] .....	27
Obr.8: Epigallokatechin [13] .....	27
Obr.9: Gallokatechin [13] .....	27
Obr.10:Katechin-3-gallát [13] .....	28
Obr.11: Epigallokatechin-3-galát [13].....	28
Obr.12: Quercetin [13].....	29
Obr.13: Genistein [13].....	29
Obr.14: Kurkumin [13].....	29
Obr.15: Různé mechanismy oprav chyb při replikaci DNA [9].....	32
Obr.16: BER – bázová excizní reparace [17]. .....	35
Obr.17: NER – nukleotidová excizní reparace [17]. .....	37
Obr.18: MMR – mismatch reparace [17].....	39
Obr.19: Zobrazení jader v kometovém testu. A – kontrolní jádro, B, C, D – jádra s různým stupněm poškození [22]. .....	45
Obr.20: Kalibrace kometového testu rentgenovým zářením [21].....	45

## Seznam tabulek

Tab.1: Poločas rozpadu některých reaktivních meziproductů.....	23
----------------------------------------------------------------	----

## Seznam grafů

Graf 1.: Počet SSB indukovaných $H_2O_2$ u buněk AA8 v čase 0 a po 30min reparace ..	48
Graf 2.: Počet endo III míst indukovaných $H_2O_2$ u buněk AA8 v čase 0 a po 30min reparace .....	49
Graf 3.: Počet FPG míst indukovaných $H_2O_2$ u buněk AA8 v čase 0, po 30min a 60min reparace.....	50
Graf 4.: Oprava FPG míst indukovaných $H_2O_2$ u buněk AA8 .....	51
Graf 5.: Oprava FPG míst indukovaných $H_2O_2$ u buněk UV-20 .....	52
Graf 6.: Inhibice tvorby kolonií u buněk AA8 a UV-20 působením $H_2O_2$ .....	53
Graf 7.: Vliv EGCG na inhibici tvorby kolonií působením $H_2O_2$ .....	54

## Seznam použitých zkratek

5'-dRP	5'-deoxyribosofosfát
8-OHgua	7,8-dihydro-8-oxo-guanine
AP	Apurinová/apyrimidinová místa
BER	Bázová excizní reparace
BSA	Bovine serum albumin
DSB	Double strand breaks (dvouřetězcové zlomy)
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGCG	Epigallokatechin-3-gallát
Endo III	Endonukleáza III
FEN-1	„Flap“ endonukleasa-1
FPG	Formamidopyridinglykosyláza
GGR	Global genomic repair
GSH	Glutathionperoxidáza
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HMP	High melting point (vysokotuhnoucí agaróza)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Low density lipoproteins
LMP	Low melting point (nízkotuhnoucí agaróza)
MDA	Malondialdehyd
MMR	Mismatch reparace
NER	Nukleotidová excizní reparace
PBS	Phosphate-buffered saline
PNCA	proliferating cell nuclear antigen

Pol $\beta$ , Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$	Polymeráza $\beta$ , $\delta$ , $\epsilon$
RNA poly II	RNA polymeráza II
SOD	Superoxid-dismutáza
SSB	Single-strand breaks (jednořetězcové zlomy)
TCR	transcription-coupled repair
Tris	Hydroxymethylaminomethan
WHO	Světová zdravotnická organizace

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] Östling, O. and Johanson, K.J.

Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.

*Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 291-298, 1984

[2] MUDr. Jan Novotný, PhD, Perspektivy protinádorové léčby, Liga proti rakovině, on-line: [http://www.lpr.cz/index.php?page=perspektivy\\_lecby&index=onkologie](http://www.lpr.cz/index.php?page=perspektivy_lecby&index=onkologie)

[3] <http://nemoci.abecedazdravi.cz/rakovina>

[4] <http://zdravi.centrum.cz/zpravy/2007/2/8/clanky/cesko-je-velmoc-ve-vyskytu-rakoviny/>

[5] Světová zdravotnická organizace WHO on-line:

<http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=119&iso=CZE&generateReport=Generate+Report>

[6] <http://www.primar.sk/Page.aspx?ID=808>

[7] Svend J. Knak Jensen

Oxidative stress and free radicals

*Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, Volumes 666-667, December 2003, Pages 387-392

[8] <http://www.doktor-zdravi.cz/lekarna/volne-radikaly-se-vzaly-a-nebezpecne-id4423.html>

[9] J. Masopust, PATOBIOCHEMIE BUŇKY,

on-line: [https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141\\_1387.html](https://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_1387.html)

- [10] MUDr. Václav Holeček CSc.,  
Volné radikály, způsoby stanovení jejich účinků a antioxidanty  
Časopis FINCLUB Zpravodaj LG - Farma 2002, on-line:  
<http://www.finclub.cz/web/index.php?src=ref&id=227>
- [11] John Termini  
Hydroperoxide-induced DNA damage and mutations  
*Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 450, Issues 1-2, 30 May 2000, Pages 107-124*
- [12] Collins, A.R., Dušinská, M., Gedik, C.M., Štětina, R.  
Oxidative damage to DNA; do we have a reliable biomarker?  
*Environ. Hlth. Perspect., 104, Suppl. 3., 465-469, (1996)*
- [13] Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Catechin>
- [14] Patrizia Riso, Daniela Erba, Franca Criscuoli and Giulio Testolin  
Effect of green tea extract on DNA repair and oxidative damage due to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Jurkat T cells  
*Nutrition Research, Volume 22, Issue 10, October 2002, Pages 1143-1150*
- [15] Melissa K. Johnson and George Loo  
Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA  
*Mutation Research/DNA Repair, Volume 459, Issue 3, 28 April 2000, Pages 211-218*
- [16] Andrew R. Collins, Victoria L. Dobson, Mária Dušinská, Gayle Kennedy, Rudolf Štětina  
The comet assay: what can it really tell us?  
*Mutation Research 375\_1997.183–193, (1997)*
- [17] Markus Christmann, Maja T. Tomicic, Wynand P. Roos, Bernd Kaina  
Mechanisms of human DNA repair: an update  
*Toxicology 193 (2003) 3–34*

- [18] Sarah L. Allinson, Kate M. Sleeth, Gemma E. Matthewman, Grigiry L. Dianov  
Orchestration of base excision repair by controlling the rates of enzymatic activities  
*DNA repair 3 (2004) 23 – 31*
- [19] Tadahide Izumi, Lee R. Wiederhold, Gargi Roy, Rabindra Roy, Arun Jaiswal,  
Kishor K. Bhakat, Sankar Mitra, Tapas K. Hazra  
Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role of oxidative  
DNA damage  
*Toxicology 193 (2003) 43 – 65*
- [20] Jan Malý  
Molekulární a buněčná biologie, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, přírodovědecká  
fakulta, katedra biologie, Ústí nad Labem 2006, on-line:  
[http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni\\_a\\_bunecna\\_biologie.pdf](http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni_a_bunecna_biologie.pdf)
- [21] Andrew R. Collins, Amaia Azqueta Oscoz, Gunnar Brunborg, Isabel Gaivão,  
Marcin Kruszewski, Catherine Smith, Rudolf Štětina  
The comet assay: topical issues  
*Mutagenesis, in press*
- [22] Menke M., Angelis K.J., Schubert I.  
Detection of specific DNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants.  
*Environ. Molec. Mutag. 35(2): 132-138, 2000.*
- [23] Thompson, L.H., J.S. Rubin, J.E. Cleaver, G.F. Whitmore and K. Brookman,  
A screening method for isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells. *Somat.*  
*Cell*  
*Genet.. 6, 391-405 (1980)*
- [24] Bunsyo Shiotani, Masahiko Watanabe, Yukari Totsuka, Takashi Sugimura, Keiji  
Wakabayashi  
Involvement of nucleotide excision repair (NER) system in repair of mono ADP-  
ribosylated dG adducts produced by pierisin-1, a cytotoxic protein from cabbage  
butterfly

*Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 572, Issues 1-2, 2 May 2005, Pages 150-155*

[25] Hayatsu H., Inada N., Kakutani T., Arimoto S., Negishi T., Mori K., Okuda T., Sakata I.

Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate

*Prev Med. 21:370-6 (1992)*

[26] Alena Havlínová

Reparace oxidativního poškození DNA a jeho vztah k cytotoxickému účinku

Diplomová práce 2008