

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



Studium cytostatických účinků siriého yperitu

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Jošt, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Martina Krejčová

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 14. 5. 2024

.....

Martina Krejčová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla především poděkovat Mgr. Petru Joštovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, konzultace a trpělivost při práci v laboratoři a při tvorbě této práce.

Mé poděkování patří také paní doc. PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za ochotu a pomoc s formální stránkou práce.

V neposlední řadě děkuji svému příteli a rodině za nekonečnou podporu a motivaci při psaní diplomové práce.

Děkuji.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Martina Krejčová

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Jošt, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium cytostatických účinků sirného yperitu

Sirný yperit (HD) patří mezi zpuchýřující bojové chemické látky. Jedná se o bifunkční alkylační činidlo, které kovalentně modifikuje DNA. Cytostatický účinek HD je charakteristický zástavou buněčného dělení, aniž by došlo ke smrti buňky. Čas, po který je buňka schopna v tomto stavu setrvat, je závislý na míře poškození DNA, které může být následně konvertováno v cytotoxický účinek a smrt buňky.

Cílem práce bylo nalézt koncentrační rozmezí HD, které má cytostatické účinky a dále zjistit senzitivitu buněk kožních keratinocytů HaCaT, synchronizovaných ve fázi buněčného cyklu G1, S a G2/M, k indukci alkylačního poškození, provedeném po uvolnění blokace buněčného cyklu.

Cytostatický účinek se projevil pouze ve velmi nízkých koncentracích, v řádu jednotek $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V našich experimentech to byla koncentrace $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD, která zabránila proliferaci buněk po dobu 2 dnů. Nižší, submikromolární koncentrace, měly stimulační efekt na proliferaci buněk, vyšší koncentrace HD naopak působily již cytotoxicky.

Pokud bylo poškození indukováno v G1 fázi, došlo k poklesu viability buněk až po 48 hodinách za současného poklesu % buněk v G1 fázi. Ve fázi S jsme překvapivě nenašli žádný signifikantní vliv alkylačního poškození na synchronizované buňky, jak na úrovni viability, tak i buněčného cyklu. Nejvýraznější vliv na viabilitu buněk ovlivněných HD byl ve fázi G2/M, přestože na úrovni buněčného cyklu nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl. Reakce synchronizovaných buněk na alkylační poškození pak nebyla v našich experimentech z pohledu odpovědi na úrovni buněčného cyklu a syntézy DNA detekována jako statisticky významná.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Martina Krejčová

Supervisor: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Petr Jošt. Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of the cytostatic effects of sulfur mustard

Sulfur mustard (HD) belongs to blistering agents used in chemical warfare. It is a bifunctional alkylating agent that covalently modifies DNA. The cytostatic effect of HD is characterized by halting cell division without cell death. The duration for which a cell can remain in this state depends on the extent of DNA damage, which can subsequently be converted into a cytotoxic effect leading to cell death.

The aim of the study was to determine the concentration range of HD gas that exhibits cytostatic effects and to investigate the sensitivity of HaCaT skin keratinocyte cells synchronized in the G1, S, and G2/M phases of the cell cycle to alkylating damage induction following release from cell cycle blockage.

The cytostatic effect was observed only at very low concentrations, in the range of units of $\mu\text{mol.l}^{-1}$. In our experiments, a concentration of $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ of HD prevented cell proliferation for 2 days. Lower, submicromolar concentrations, had a stimulatory effect on cell proliferation, while higher concentrations of HD acted cytotoxically.

When damage was induced in the G1 phase, there was a decrease in cell viability after 48 hours, accompanied by a decrease in the percentage of cells in the G1 phase. Surprisingly, we found no significant effect of alkylating damage on synchronized cells in the S phase, neither in terms of viability nor cell cycle. The most pronounced impact on the viability of HD-affected cells was observed in the G2/M phase, although there was no significant difference at the level of the cell cycle. The response of synchronized cells to alkylating damage was not statistically significant in terms of cell cycle and DNA synthesis in our experiments.

Obsah

1	Seznam zkratk	8
2	Úvod	12
3	Teoretická část	13
3.1	Sirný yperit	13
3.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti sirného yperitu	14
3.2	Účinky sirného yperitu na lidský organismus	15
3.2.1	Oči a dýchací cesty	15
3.2.2	Kůže	16
3.2.3	Systémové účinky sirného yperitu a hematopoéza	16
3.3	Mechanismus účinku sirného yperitu	17
3.3.1	Interakce sirného yperitu s DNA a jeho cytostatický efekt	17
3.3.2	Rozpoznání alkylačního poškození DNA	19
3.3.3	Cytotoxické účinky sirného yperitu	21
3.3.4	Reparace DNA poškozené sirným yperitem	23
3.4	Buněčný cyklus	25
3.4.1	Regulace buněčného cyklu a cyklin dependentní kinasy	28
3.4.2	Metody měření buněčného cyklu	32
3.5	Metody synchronizace buněčného cyklu	34
4	Cíle práce	37
5	Experimentální část	38
5.1	Použité chemikálie a roztoky	38
5.2	Použité přístroje a pomůcky	39
5.3	Buněčná linie HaCaT a podmínky její kultivace	39
5.4	Měření buněčné proliferace elektroimpedanční metodou	40
5.5	Měření fází buněčného cyklu	40
5.6	Měření syntézy DNA inkorporací BrdU	41
5.7	Synchronizace buněčného cyklu	41
5.8	Statistická analýza dat	42
6	Výsledky	43
6.1	Cytostatický účinek sirného yperitu	43
6.2	Vliv sirného yperitu na buněčný cyklus	44
6.3	Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk v G1 fázi	44
6.3.1	Vliv sirného yperitu na buňky synchronizované v G1 fázi	45
6.4	Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk v S fázi	48

6.4.1	Vliv sirného yperitu na buňky synchronizované v S fázi.....	49
6.5	Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk ve fázi G2/M	52
6.5.1	Vliv sirného yperitu na buňky synchronizované ve fázi G2/M	53
7	Diskuse.....	57
8	Závěr	63
9	Literatura	64
10	Seznam obrázků	70
11	Seznam tabulek	71

1 Seznam zkratek

5'-dRP - 5' deoxyribózový fosfát

53BP1 - *p53 - binding protein 1*

APE1 - apurinová/apyrimidinová endonukleasa 1

ATM - *ataxia telangiectasia mutated*

ATR - *ataxia telangiectasia and Rad – related*

ATRIP - protein interagující s *ataxia telangiectasia mutated and Rad3 – related*

BER - reparace excizí báze

Bis-G - bis(2-(guaninethyl)sulfid)

BrdU - 5-bromo-2'-deoxyuridin

CDK - cyklin dependentní kinasa

CDT - karbohydrát deficientní transferin

Cip/Kip - CDK interagující protein/protein inhibující kinasu

CKI - inhibitor cyklin dependentních kinas

CldU - 5-chloro-2-deoxyuridin

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol

DDR - reakce na poškození DNA (*DNA damage response*)

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - dimethyl sulfoxid

DNA - PKcs - *DNA – dependent protein kinase, catalytic subunit*

DSB - dvouřetězcové zlomy (*double strand break*)

EdU - 5-ethynyl-2'-deoxyuridin

ERCC1 - excizní reparační protein komplementační skupiny 1 (excision repair cross complementing group 1)

FACS - fluorescencí aktivované třídění buněk

FasL - Fas ligand

FBS - fetální bovinní sérum

FEN1 - endonukleasa 1

FUCCI - fluorescenční indikátor buněčného cyklu založený na ubikvitinaci (*Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*)

GSH - glutathion

H2AX - *histone family member X*

HD - sirný yperit

HDAC - histondeacetylase

HN2 - dusíkatý analog yperitu

HR - homologní rekombinace

CHK1 - *checkpoint kinasa 1*

CHK2 - *checkpoint kinasa 2*

IdU - 5-iodo-2-deoxyuridin

IL-13 - interleukin 13

IL-15 - interleukin 15

IL-6 - interleukin 6

IL8 - interleukin 8

IL- β - interleukin- β

IL- α - interleukin- α

INF- γ - interferon gamma

iNOS - syntasa oxidu dusnatého

IP3 - inositoltrifosfát

LD₅₀ - střední smrtelná dávka

MDC1 - *mediator of DNA damage checkpoint 1*

Mdm2 - Mouse double minute 2 homolog

MRN - komplex MRE11, RAD50 a NBN1

Myt1 - Myelin Transcription Factor 1

N3-HETEA - N3(2-((2-hydroxyethyl)thio)-ethyl)adenin

N7-HETEG - N7-(2-((2-hydroxyethyl)thio)-ethyl)guanin

NAD⁺ - nikotinamidadenindinukleotid

NADP⁺ - nikotinamidadenindinukleotid fosfát

NER - reparace excizí nukleotidů

NF-κB - nukleární faktor κB

NHEJ - nehomologní spojování konců

NPAT - jaderný protein mapovaný na lokus ATM

O6-HETEG - O6-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]guanin

p21 - protein 21

p27 - protein 27

p53 - protein 53

p57 - protein 57

PAR - poly(ADP-ribóza)

PARP - poly(ADP-ribózo)polymerasa

PBS - fyziologický roztok pufovaný fosfáty

PBS-Tw20 - 0,05 % Tween-20 v PBS

PCNA - proliferační antigen buněčného jádra

pH3 - fosforylovaný histon H3

PI - propidium jodid

PIKK - fosfatidylinositol – 3 kinasa

PK - proteinkinasa

PLC - fosfolipasa C

Pol β - DNA polymerasa β

Pol δ - DNA polymerasa δ

Pol ϵ - DNA polymerasa ϵ

Pol κ - DNA polymerasa κ

pRB - retinoblastomový protein

R - restrikční bod

ROS - reaktivní formy kyslíku

SDS - dodecylsírán sodný

SEM - střední chyba průměru

SLBP - *stem-loop binding protein*

SSB - jednořetězcové zlomy (single strand break)

TFIIH - transkripční faktor IIH

TNF α - tumor nekrotizující faktor α

TopBP1 - *topoisomerase – binding protein 1*

Tw20 - Tween-20

XPA - protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny A

XPB - protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny B

XPC - protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny C

XPD - protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny D

XPG - protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny G

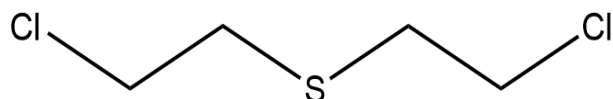
2 Úvod

Sírný yperit (bis(2-chlorethyl)sulfid) je bifunkční alkylační činidlo, které způsobuje nejen alkylaci jednotlivých bází DNA, ale rovněž i tvorbu kovalentních meziřetězcových spojení uvnitř molekuly DNA. Tyto patologické vazby jsou jednou z příčin cytostatického a cytotoxického účinku této látky. Na buněčné úrovni probíhá interakce sírného yperitu nejen se strukturami DNA, ale rovněž dochází i k poškození RNA, proteinů, lipoproteinů a dalších molekul, které jsou významné pro normální funkci buňky. Toto poškození aktivuje hned několik intracelulárních mechanismů, které v závislosti na míře alkylace směřují svoji činnost k opravě poškození a následnému umožnění replikace DNA, anebo k zániku buňky.

3 Teoretická část

3.1 Sirný yperit

Sirný yperit (HD), chemicky bis(2-chlorethyl)sulfid, patří do skupiny vysoce toxických organických sloučenin, označovaných jako zpuchýřující bojové chemické látky (Obr. 1). Jeho první použití pro bojové účely bylo zaznamenáno v roce 1917, kdy byl použit poblíž města Ypres v dnešní Belgii (Humans 2012). Podle místa prvního nasazení dostala tato látka i své české označení yperit. V angličtině se pro sirný yperit používá název „*sulfur mustard*“, který reflektuje typický „hořčičný“ zápach této látky (Ghabili et al. 2011). Pro vojenské označení sirného yperitu se používá zkratka HD, která je zároveň i kódem NATO (Borak a Sidell 1992; Kehe et al. 2008; Wattana a Bey 2009). Zkratka HD bude proto používána i v této práci.



Obr. 1 Strukturní vzorec sirného yperitu (zdroj: Steinritz a Thiermann 2016).

HD byl poprvé syntetizován na počátku 19. století francouzsko-belgickým chemikem C. Despretzem. V roce 1880 pak nezávisle na sobě provedli zdařilou syntézu HD i vědci F. Guthrie a A. Niemann. Dalším německým chemikem, který se zabýval syntézou halogenovaných thioetherů, byl V. Meyer, který v roce 1886 navrhl postup syntézy čistého HD. Takto připravený HD byl následně použit německou armádou proti vojskům Trojdohody (Shakarjian et al. 2010; Sezigen et al. 2019; Steinritz a Thiermann 2016).

Během první světové války (1914 až 1918) bylo použito mnoho toxických chemických látek k potenciálnímu zničení nepřítele, ale HD byl cíleně vyvinut za tímto účelem. Po jeho prvním úspěšném použití byl odstartován další intenzivní vývoj otravných látek využitelných pro bojové účely. Jednalo se především o vysoce toxické organofosforové sloučeniny (Ganesan et al. 2010).

V roce 1997 vešla v platnost mezinárodní úmluva „Úmluva o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení“. Tento významný dokument zavazuje členské státy k eliminaci veškerých chemických zbraní (Křížková a Vitvarová 2017). Přestože je nadále vyvíjena intenzivní snaha o celosvětovou eliminaci chemických zbraní, nebyla tato „Úmluva“ ratifikována všemi státy a tedy stále existuje potenciální riziko zneužití těchto látek. Například HD byl použit během občanské války v Sýrii v roce 2013 nebo během

Irácko-iránské války v letech 1980-1988 a v několika dalších konfliktech (Křížková a Vitvarová 2017).

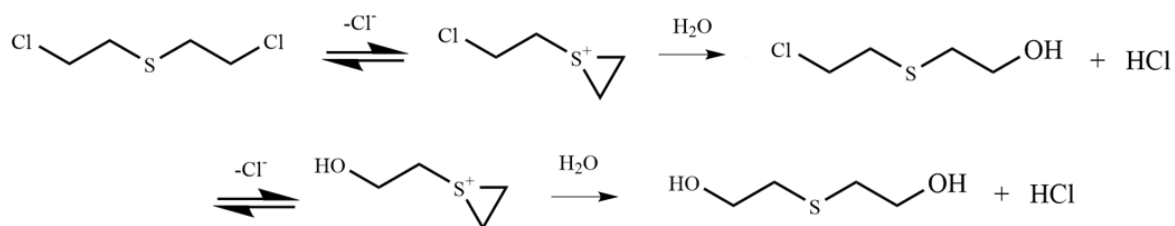
3.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti sirného yperitu

Chemicky čistá látka je stabilní bezbarvá viskózní kapalina s velmi slabým zápachem po hořčici nebo česneku. Teplota tání HD se pohybuje kolem 13 až 14,5 °C. Teplota varu je v rozmezí 217,5 až 218 °C (Steinritz a Thiermann 2016; Timperley et al. 2021). HD je špatně rozpustný ve vodě (0,92 mg.ml⁻¹ při 25 °C), slabě rozpustný v parafínu nebo vazelině a neomezeně rozpustný v živočišných a rostlinných tucích, olejích, alkoholu, benzenu, chloroformu, éteru, benzínu nebo petroleji. Fyzikálně-chemické vlastnosti jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti sirného yperitu (zdroj: Steinritz a Thiermann 2016).

Skupenství (25 °C)	olejovitá kapalina
Sumární vzorec	C ₄ H ₈ Cl ₂ S
Molekulová hmotnost	159,08 g.mol ⁻¹
Tlak nasycených par	0,00427 kPa při 10 °C
	0,0016 kPa při 20 °C
	0,0461 kPa při 40 °C
Teplota varu	217,5 – 218 °C
Teplota tání	13 – 14,5 °C
Hustota	1,27 g.ml ⁻¹ při 20 °C
Těkavost	610 mg.m ⁻³ při 25 °C
Rozpustnost ve vodě	0,92 mg.ml ⁻¹ při 25 °C

Ve vodném prostředí HD podléhá hydrolytické reakci za vzniku thiodiglykolu (Obr. 2). Nejprve dochází k odštěpení chloridového aniontu z jednoho z postranních alkylových řetězců molekuly HD za vzniku (2-chlorethyl)thiiranium chloridu. U tohoto vysoce nestabilního meziprojektu dochází dále k otevření heterocyklu a na konci alkylového řetězce vzniká karbokationt. Ten je silným elektrofilem a rychle reaguje s přítomnými OH⁻ skupinami vody za vzniku 2-hydroxyethyl-2-chlorethylsulfidu. Identická reakce se pak opakuje i na druhém chloralkylovém řetězci a výsledkem hydrolýzy je bis(2-hydroxyethyl)sulfid neboli thiodiglykol. Tato látka již nemá toxické vlastnosti ani zpuchýřující účinky na lidskou kůži (Timperley et al. 2021).



Obr. 2 Hydrolýza sirného yperitu (zdroj: Ashmore a Nathanail 2008).

3.2 Účinky sirného yperitu na lidský organismus

Vstupní branou HD v plynném nebo kapalném skupenství jsou oči, dýchací cesty a kůže. Méně častá je expozice prostřednictvím gastrointestinálního traktu, například při požití kontaminované potravy nebo vody (Steinritz a Thiermann 2016; Humans 2012).

Toxický účinek na zasaženou tkáň je okamžitý, ovšem jeho klinická manifestace se projevuje až se zpožděním. Toto asymptomatické období je charakteristickým znakem pro expozici HD. Jeho délka závisí na absorbované dávce, způsobu expozice HD a citlivosti zasaženého orgánu. Se vzrůstající koncentrací se zkracuje latentní perioda manifestace klinických příznaků (Timperley et al. 2021; Humans 2012; Steinritz a Thiermann 2016).

3.2.1 Oči a dýchací cesty

Oči jsou nejvíce senzitivním orgánem k účinkům HD a první příznaky se objevují už do 60 minut. Expozice je charakteristická otokem očních víček a zarudnutím bělma, což může vyústit v poškození rohovky, blefarospasmus a dočasnou slepotu. Subjektivně pak postižený cítí podráždění očí, má pocit cizího tělesa v oku a je velmi citlivý na světlo (Shakarjian et al. 2010). V mírném podnebí vyvolává inhalace par o koncentraci $70 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ HD mírnou nebo žádnou reakci, 70 až $100 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ způsobuje nebezpečné poškození dýchacích cest a více než $100 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-3}$ může vést ke ztrátám na životech (Timperley et al. 2021).

Při inhalační expozici je primárně zasažena *nasální, laryngální a tracheobronchiální* sliznice dýchacích cest. První příznaky se objevují po 4 až 6 hodinách. Podráždění dýchacího systému vede k rozvoji laryngitidy, poškození dýchacího epitelu, otoku plic a tvorbě pablán,

kteřé mohou způsobit obstrukci dolních cest dýchacích (Timperley et al. 2021). Při mírném podráždění jsou popsány pocity suchosti v ústech a pálení v krku. Objevuje se také chrapt, suchý kašel a krvácení z nosu. K narušení dýchací bariéry a poruchy funkce výměny plynů v dolních cestách dýchacích dochází při expozici vysokým dávkám HD. Rekonvalescence je dlouhodobá a pacient je ohrožen sekundární infekcí dýchacích cest (Shakarjian et al. 2010).

3.2.2 Kůže

Při perkutánní expozici je střední smrtelná dávka (LD₅₀) HD pro člověka odhadována na 100 mg.kg⁻¹ hmotnosti těla (Timperley et al. 2021). První kontakt s kůží není obvykle spojen s nepříjemnými pocity. HD nejnáze poškozujee kožní regiony těla, které jsou bohatě zásobeny potními žlázami (podpaží a třísla) a kde je tenčí vrstva kůže (krk, obličej). V těchto místech HD snadno penetruje skřz kůži, váže se zde na přítomné makromolekuly, část se rozpouští a deponuje v podkožním tuku a část se dostává do systémového oběhu, kde dále poškozujee organismus (Nair et al. 2021).

Prvním příznakem expozice je erytém, který se objevuje po 2 až 24 hodinách od kontaktu HD s kůží. Často bývá spojen s velmi intenzivním svěděním. O několik hodin později se objevují malé puchýřky, které jsou naplněné světle žlutou tekutinou. Tyto malé puchýřky se mohou spojit a vytvořit až 6 cm velké puchýře. To je dáno v souvislosti s rozvojem toxické dermo-epidermální nekrolýzy a následné separace *dermis* od *epidermis* vlivem hromadění transudátu. Mechanicky namáhané puchýře mohou prasknout, na povrchu postižené kůže se vytvoří vrstva nekrotické tkáně a strup. Léze se obvykle zacelí v průběhu 10 až 50 dnů veformě jizvy. Zasažená místa jsou charakteristická dlouhodobou změnou v pigmentaci. Může se jednat o hyperpigmentaci, ale také i o její vymizení, neboli hypopigmentaci (Shakarjian et al. 2010).

3.2.3 Systémové účinky sirného yperitu a hematopoéza

Systémové účinky při otravě HD jsou velmi podobné těm, které způsobuje radio – nebo chemoterapie. Po expozici nízkým dávkám HD mohou nastat bolesti hlavy, nevolnost, zvracení a ztráta chuti k jídlu. Expozice vysokým dávkám HD může vážně poškodit gastrointestinální trakt a buňky kostní dřene. Toxické účinky HD na hematopoézu jsou závislé na dávce a způsobují aplastickou anémii. Třetí až čtvrtý den po expozici dochází k výrazné

redukci počtu bílých krvinek. Nejnižších hodnot dosahují počty leukocytů přibližně 9 dnů po expozici. Tato leukopenie je následována poklesem počtu megakaryocytů a erythropoetických buněk. To má za následek imunosupresi a zvýšenou náchylnost k infekcím, které mohou být smrtelné (Balali-Mood a Hefazi 2006; Steinritz a Thiermann 2016).

3.3 Mechanismus účinku sirného yperitu

HD je bifunkční alkylační činidlo, které způsobuje kovalentní modifikace biomolekul. Ve vodném prostředí podléhá postranní chlorethylový řetězec intramolekulární cyklizaci, při níž se odštěpuje chloridový aniont a vzniká kladně nabitý, ale velmi nestabilní meziproduct (2-chlorethyl)thiiranium chlorid. Následuje otevření cyklu a na místě původního atomu chlóru vzniká mimořádně reaktivní karbokationt (Obr. 3). Karbokationt, jakožto silný elektrofil, atakuje nukleofilními molekuly v okolí.



Obr. 3 Mechanismus účinku sirného yperitu, vznik karbokationtu (zdroj: Yang et al. 2002).

Tento mechanismus je shodný s již popsaným procesem hydrolyzy, ovšem nedochází zde k substituční reakci s -OH skupinou na obou alkylchloridových řetězcích, ale s nukleofilem, který je součástí biologicky významných molekul. V živých systémech jsou to především proteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy a lipoproteiny. Molekula DNA lokalizovaná v buněčném jádře poskytuje prostřednictvím svých bází velké množství volných elektronových párů, které jsou atakovány vzniklým karbokationtem (Beigi Harchegani et al. 2018).

Druhý chlorethylový postranní řetězec je rovněž schopen intramolekulární cyklizace a vzniku karbokationtu. Ten pak může obdobně reagovat s jakýmkoliv nukleofilem v okolí, včetně molekuly vody. Výsledkem této alkylační reakce jsou nejen monofunkční adukty, ale také i bifunkční adukty, které mají charakter kovalentních vazeb mezi bázemi DNA, proteiny anebo jejich vzájemnou kombinací. Alkylační poškození buněčných struktur má pak za následek rozvoj procesů, které se snaží přítomné poškození odstranit anebo, v případě DNA, opravit (Beigi Harchegani et al. 2018; Shakarjian et al. 2010).

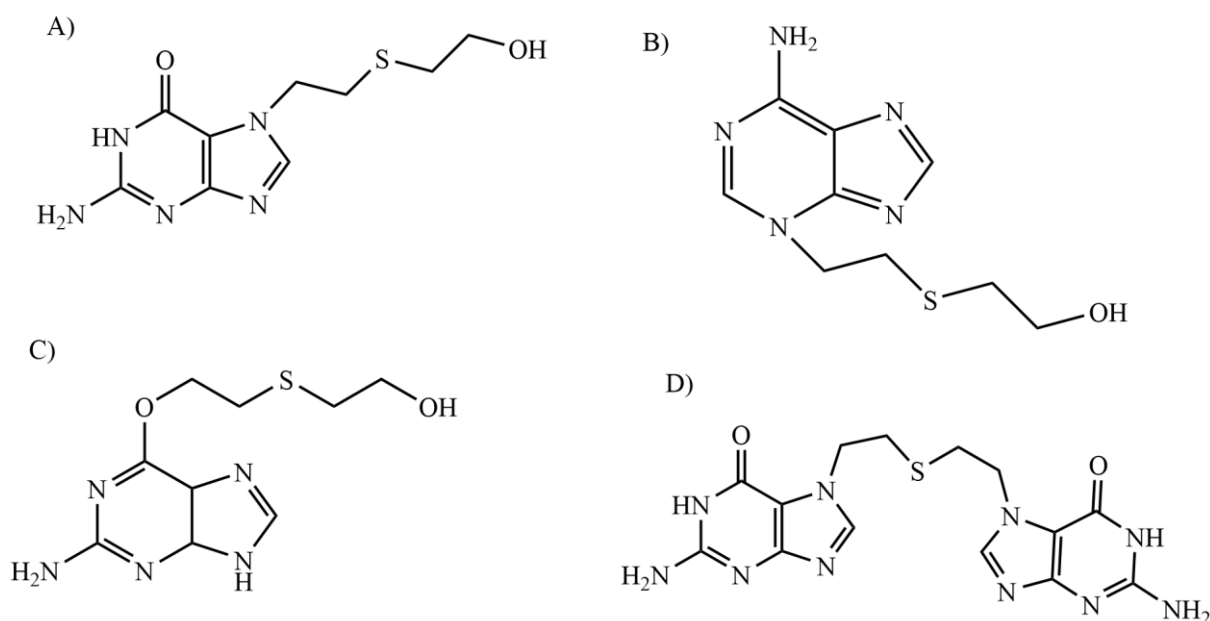
3.3.1 Interakce sirného yperitu s DNA a jeho cytostatický efekt

Alkylační modifikace DNA je považována za nejkritičtější poškození buňky způsobené HD. Přítomné změny ve struktuře DNA jsou pak primárním iniciátorem komplexu několika

kaskádových reakcí, které mají za následek typické klinické příznaky. Genotoxický stres indukovaný strukturálními modifikacemi DNA umožňuje vznik řetězcových zlomů DNA, apurinových míst nebo mutacím v DNA. Tyto léze mohou vést k chybám během procesu replikace a transkripce. Protože kontrolní mechanismy buňky nedovolí replikaci DNA s chybami, dochází k zástavě buněčného cyklu. To je také podstatou cytostatického účinku HD na proliferující buňky. Pokud je poškození nadměrné a buňka by ho nezvládla včas opravit, je iniciována buněčná smrt cestou apoptózy (Beigi Harchegani et al. 2018; Borak a Sidell 1992; Panahi et al. 2018).

Kovalentní alkylace nukleových kyselin jsou velmi dobře zdokumentované, zejména instrumentálními analytickými metodami založených na hmotnostní spektrometrii. Jednoduché adukty jsou obecně reprezentovány bází DNA s připojeným 2-hydroxyethyl(thio)ethylovým zbytkem. Dvojnásobné adukty jsou tvořeny dvěma bázemi vzájemně spojenými ethylthioetherovým můstkem. Tyto adukty se tvoří nejčastěji v poloze N7 báze guaninu (Obr. 4, A), což vede ke vzniku N7-(2-((2-hydroxyethyl)thio)-ethyl)guaninu (N7-HETEG). Tato modifikace se vyskytuje nejčastěji a tvoří 64 až 81 % všech alkylačních aduktů HD. Další adukty vznikají v poloze N3 molekuly adeninu (Obr. 4, B), jejichž výsledkem je N3(2-((2-hydroxyethyl)thio)-ethyl)adenin (N3-HETEA) a to v zastoupení 1,3 až 4,6 %. Nejméně zastoupený, ale biologicky vysoce významný je adukt guaninu v poloze O6 (Obr. 4, C). O6-[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]guanin (O6-HETEG), tvoří pouze 0,04 až 0,62 % všech aduktů, ale je považován za mutagenní z důvodu jeho tolerance a nerozpoznání reparačními mechanismy, na kterých se podílejí i enzymy ze skupiny DNA alkyltransferáz (Ghabili et al. 2011; Steinritz a Thiermann 2016).

Bifunkční adukty jsou v poměru 18 až 42 % všech alkylací zastoupeny bis(2-(guaninethyl)sulfidem) (Bis-G) (Obr. 4, D). Při tomto typu poškození DNA vznikají inter- či intrařetězcové kovalentní vazby. Bifunkční adukty představují v rámci struktury dvoušroubovice DNA nejen funkční, ale i sterickou překážku. Konformační změny dvoušroubovice DNA, které vyvolává vnitřní pnutí řetězce, mohou vést během reparačních procesů ke vzniku dvouřetězcových zlomů DNA (DSB). V důsledku poškození komplementárnosti bází a ztráty vhodného templátu pro opravu DNA, je toto poškození pro další osud buňky fatální. Tolerováno je jen velmi malé množství DSB, které je buňka schopna opravit (Beigi Harchegani et al. 2018; Ghabili et al. 2011; Panahi et al. 2018; Steinritz a Thiermann 2016).



Obř. 4 Báže DNA modifikované alkyací sirným yperitem; A) N7-HETEG, B) N3-HETEA, C) O6-HETEG, D) Bis-G (zdroj: Yue et al. 2014).

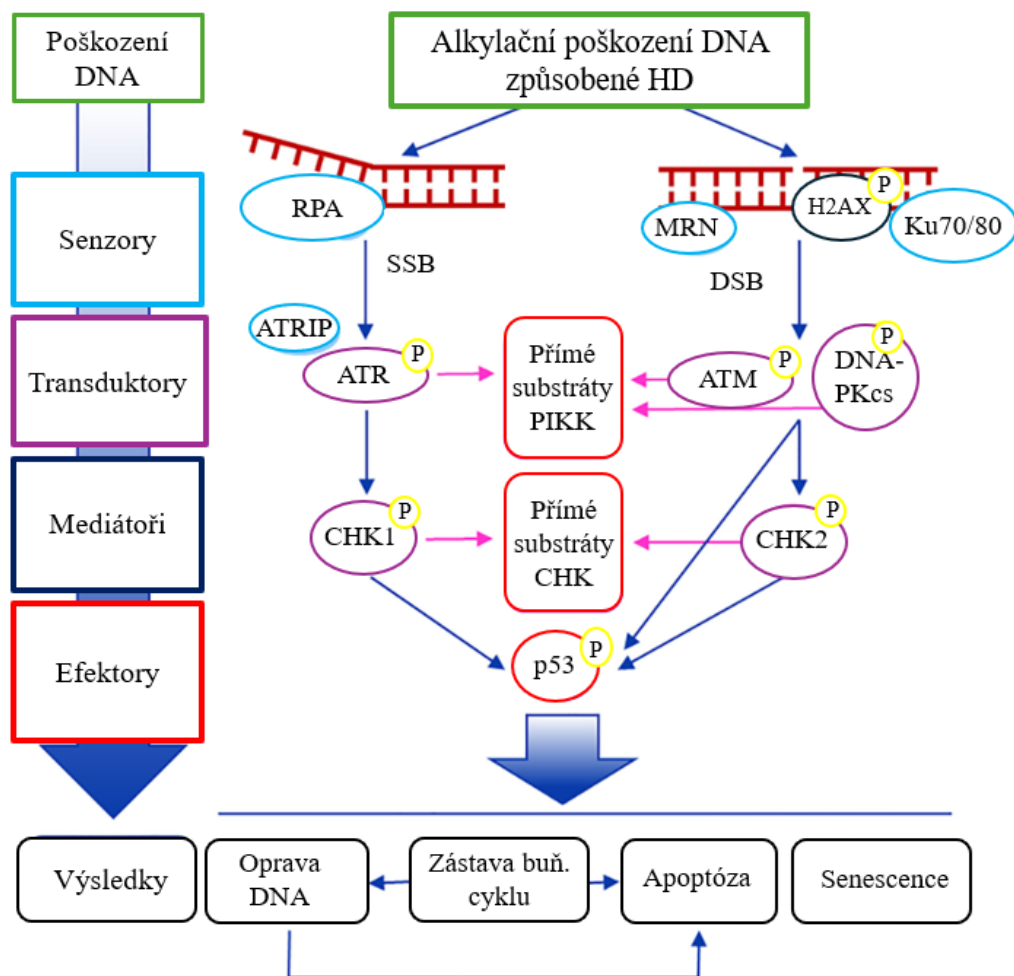
3.3.2 Rozpoznání alkylačního poškození DNA

Adukty HD nezpůsobují řetězcové zlomy přímo. Za chyby, které jsou vnášeny do DNA, jsou zodpovědné endonukleasy, které se podílejí na replikaci a reparaci poškozené DNA. Tyto chyby mohou způsobit zlomy jednoho řetězce (SSB) nebo DSB DNA. SSB i DSB byly zjištěny v izolovaných buňkách i tkáních, které byly vystaveny účinkům HD. Nepřesná oprava zlomů DNA, zejména DSB, je spojena se zástavou buněčného cyklu, genomovou nestabilitou a poškozením chromozomů (Jan et al. 2020).

Signalizace poškození DNA je nutná pro zachování její integrity a správného fungování. Přesné mechanismy, kterými jsou signalizační kaskády poškození DNA indukovány v cílových buňkách po expozici HD, nejsou detailně objasněny.

V reakci na poškození DNA, spouštějí buňky komplexní signální odpověď, která se nazývá „DNA damage response“ (DDR). Tento proces je důležitý pro opravu DNA a prevenci genotoxicity. Proces zahrnuje signalizaci poškození DNA, aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu, opravu DNA, remodelaci chromatinu a modulaci genové exprese. Všechny tyto prvky jsou důležité pro udržení stability genomu. Protein interagující s *ataxia telangiectasia mutated and Rad3 – related* (ATRIP), komplex MRE11, RAD50 a NBN1 (MRN) a komplex Ku70/Ku80 patří mezi senzorké proteiny, které detekují poškození DNA. Tyto senzory rychle aktivují řadu kináz v místě poškození DNA a zahajují DDR.

Klíčovou roli v iniciaci signalizačních kaskád v reakci na poškození DNA mají fosfatidylinositol – 3 kinasy (PIKK), zejména *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ataxia telangiectasia and Rad – related* (ATR) a *DNA – dependent protein kinase, catalytic subunit* (DNA – PKcs). Tyto PIKK se vážou na DSB a na řadu dalších lézí přítomných v DNA. Dále se podílí na transdukcii signálů prostřednictvím fosforylace široké škály adaptorových nebo mediátorových proteinů, jako jsou *p53 – binding protein 1* (53BP1), *mediator of DNA damage checkpoint 1* (MDC1) pro ATM, *topoisomerase – binding protein 1* (TopBP1) a *Claspin* pro ATR. Následně jsou aktivovány efekторы apikálních kináz, jako jsou *checkpoint kinasa 1* (CHK1), *checkpoint kinasa 2* (CHK2), p53 a *H2A histone family member X* (H2AX), které se snaží udržet buňky v kontrolních bodech buněčného cyklu a indukovat opravu poškození DNA (Obr. 5). Aktivací kontrolních bodů p53, CHK1 a CHK2 účinkem HD, dochází ke zpomalení nebo zastavení progresu buněčného cyklu, což může iniciovat smrt buňky cestou apoptózy (Jan et al. 2019; 2020).

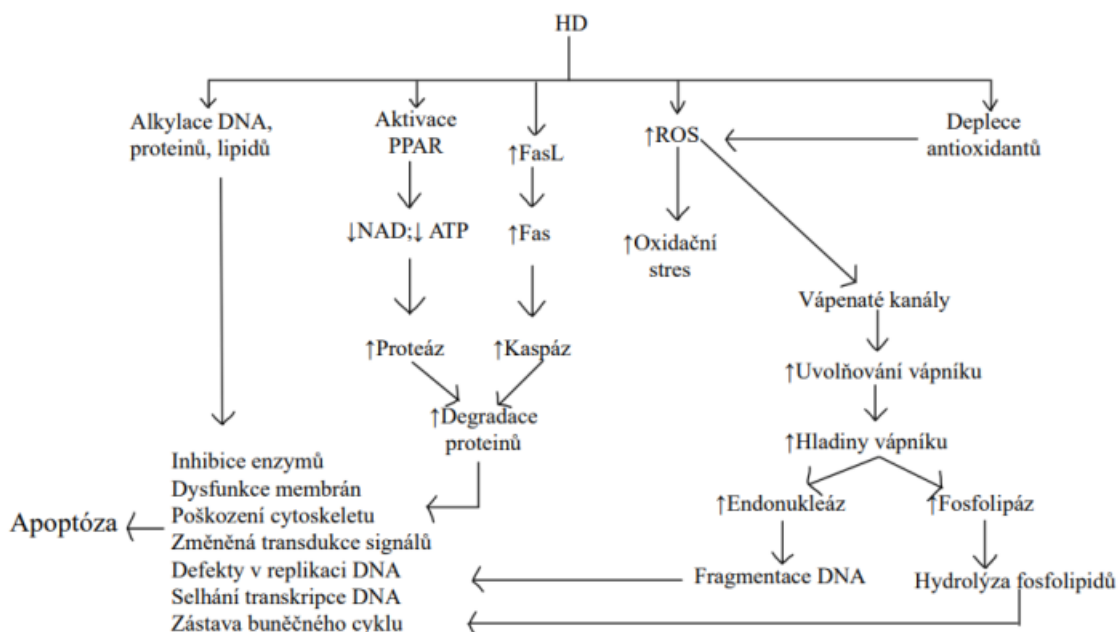


Obr. 5 Schéma rozpoznávání poškození DNA způsobené sirtinovým yperitemem (Jan et al. 2020). Význam použitých zkratk je uveden v textu, popřípadě v seznamu zkratk.

3.3.3 Cytotoxické účinky sirného yperitu

Toxicita HD je zprostředkována hned několika mechanismy. Mezi ty hlavní patří alkylační poškození biologicky významných makromolekul, vyčerpání buněčné zásoby nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+), zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, zvýšení hladiny proapoptických mediátorů, oxidativní stres, rozvoj zánětu a vyčerpání zásoby intracelulárních antioxidantů (Beigi Harchegani et al. 2018; Ramos et al. 2023).

Vyčerpání intracelulárních zásob NAD^+ je považováno za jeden ze zásadních mechanismů, který vede k buněčné smrti. Po poškození DNA vyvolaném HD se aktivují opravné mechanismy, včetně reparačního enzymu poly(ADP-ribóza)polymerasa (PARP), opravy excizí bází a opravy excizí nukleotidů (Obr. 6). Bylo prokázáno, že zlomy DNA vyvolávají aktivaci PARP, která vede k vyčerpání NAD^+ , ATP a ke stimulaci nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADP^+) závislého hexosa-monofosfátového zkratu. Tyto mechanismy mají za následek zvýšenou syntézu a uvolňování proteáz, což je spojeno se smrtí buněk a poškozením tkání. Činností PARP je také produkována poly(ADP-ribóza) (PAR), která indukuje signály pro apoptózu (Ramos et al. 2023; Beigi Harchegani et al. 2018).



Obr. 6 Buněčné a molekulární mechanismy působení sirného yperitu (zdroj: Beigi Harchegani et al. 2018).

Po expozici HD také dochází ke zvyšování hladiny intracelulárního vápníku a kalmodulinu. Obě látky mají důležitou roli v apoptóze a buněčné smrti. Zvýšená aktivita

proteinkináz (PK) aktivuje fosfolipasu C (PLC) a tvorbu inositoltrifosfátu (IP3), který působí na vápníkové iontové kanály a uvolňuje vápník z intracelulárních zásob v endoplazmatickém retikulu (Beigi Harchegani et al. 2018).

Další mechanismus, který vede ke zvýšení vápníku v cytosolu vyplývá z masivní produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) způsobené HD. ROS mohou reagovat s vápníkovými kanály uvnitř endoplazmatického retikula, mitochondrií a buněčné membrány. Tyto interakce poškozují transportní iontové kanály, což vede ke zvýšené mobilizaci vápníku do cytosolu buňky. Zvýšený obsah cytosolického vápníku vyvolává proteázovou aktivitu (např. kaspáz), ale také aktivitu fosfolipáz a endonukleáz, které následně degradují buněčné proteiny, lipidy i DNA (Ramos et al. 2023; Beigi Harchegani et al. 2018).

HD indukuje nadměrnou expresi Fas ligandu (FasL) a jeho receptoru Fas na povrchu buněčné membrány. Vazba FasL na Fas indukuje aktivaci kaspáz, což má za následek degradaci proteinů a spuštění procesu apoptózy vnější cestou. Další signální molekuly jako například nukleární faktor κ B (NF- κ B) nebo proteiny p38 a p53, rovněž reagují na alkylační poškození buňky HD. V cytopatologických reakcích mají funkci mediátorů, které spouští četné reakce v buňce. Může se jednat o zánět, apoptózu, proliferaci nebo diferenciaci (Beigi Harchegani et al. 2018).

Oxidační stres je výsledkem nerovnováhy mezi ROS a antioxidačními systémy. ROS jsou vysoce reaktivní volné radikály, které vznikají přirozeně v živých organismech. Ve vysokých koncentracích mohou interagovat s lipidy, proteiny nebo DNA a tím nepříznivě ovlivňovat metabolické buněčné procesy. Ty pak mají vliv na modifikaci fyziologických reakcí v buňce (Beigi Harchegani et al. 2018).

HD zvyšuje množství ROS na tkáňové úrovni prostřednictvím několika mechanismů. Patří sem akumulace leukocytů a rozvoj zánětu, snížení antioxidační aktivity, zvýšení exprese enzymů, které souvisejí s produkcí ROS, mitochondriální dysfunkce, deplece glutathionu (GSH), deplece syntézy GSH dependentních antioxidačních enzymů a změny v aktivitě indukovatelné syntasy oxidu dusnatého (iNOS) (Beigi Harchegani et al. 2018).

HD může také v poškozených tkáních indukovat sekreci prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů, jako jsou tumor nekrotizující faktor α (TNF α), interleukin- α (IL- α), interleukin- β (IL- β), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), interleukin 13 (IL-13), interleukin 15 (IL-15) a interferon gamma (INF- γ). HD může aktivovat buňky imunitního systému, které signalizují zánět. Jsou to makrofágy a neutrofilní granulocyty. Ty produkují zánětlivé mediátory,

prostřednictvím kterých mohou svolat a aktivovat další složky zánětlivé imunitní reakce. Aktivované leukocyty udržují během zánětlivé odpovědi hladiny ROS na tak vysoké úrovni, že přirozená antioxidační ochrana začne být nedostatečná. Nadprodukce ROS leukocyty aktivovanými HD způsobuje oxidační poškození DNA i proteinů (Beigi Harchegani et al. 2018).

HD snižuje koncentraci antioxidantů a to tak, že zvyšuje tvorbu ROS. GSH je jedním z primárních cílů HD. Adukty HD-GSH snižují hladinu buněčného GSH ve prospěch převahy intracelulárních ROS, stejně jako další markery oxidačního stresu, včetně oxidačního poškození DNA, lipidů a proteinů. Je prokázáno, že podáním exogenního GSH nebo N-acetylcysteinu, lze snížit oxidační stres a toxický účinek HD. HD může také snižovat aktivitu dalších antioxidantů jako je thioredoxinreduktasa, katalasa, superoxiddismutasa, glutathionreduktasa, glutathionperoxidasa a glutathion-S-transferasa, které jsou významné při kontrole rovnováhy buněčných antioxidantů a obnovení funkce GSH (Beigi Harchegani et al. 2018; Ramos et al. 2023).

Nejdůležitějším metabolickým účinkem HD z pohledu akutní toxicity, je inhibice buněčné glykolýzy. V případě HD je inhibice glykolýzy nepřímým důsledkem poškození a opravy nukleových kyselin. Poté, co HD alkyluje purinové báze DNA, dochází k aktivaci endonukleáz, které vedou k depurinaci alkylovaných bází, což má za následek výskyt apurinových míst, kde snadno dochází ke zlomům DNA. Potřeba DNA opravit aktivuje PARP, který zase rychle vyčerpává buněčný NAD^+ (Borak a Sidell 1992).

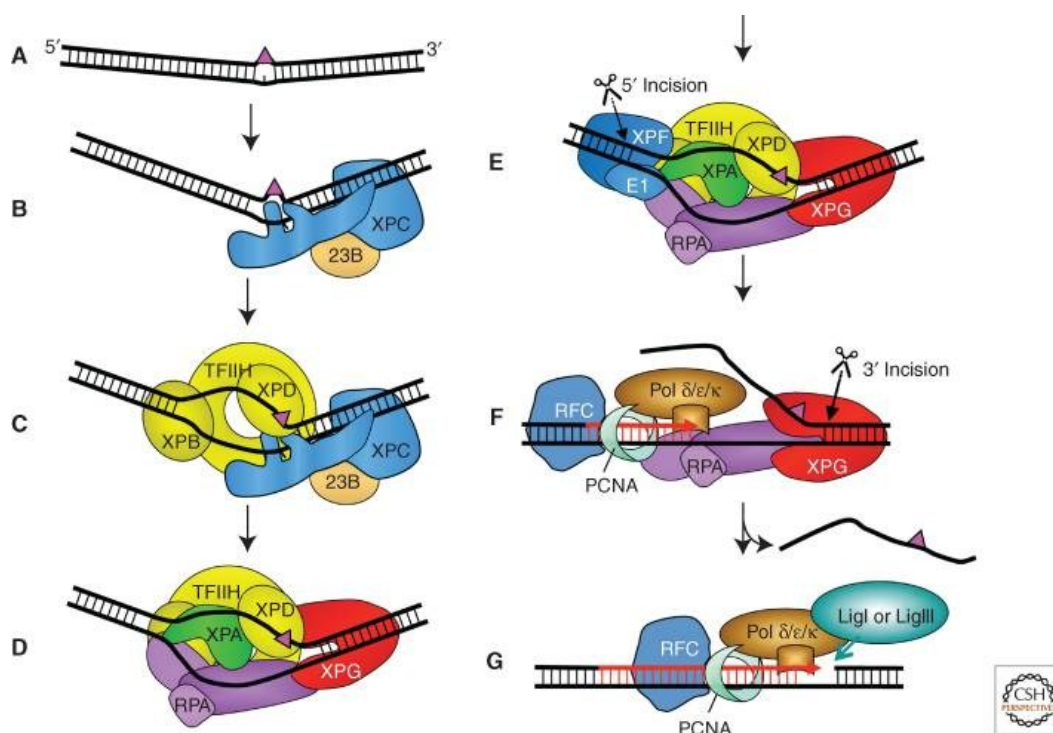
3.3.4 Reparace DNA poškozené sirným yperitem

Mezi hlavní reparační mechanismy DNA patří reparační excizí bází (BER), reparační excizí nukleotidů (NER), homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců (NHEJ). Alkylové adukty vzniklé působením HD, využívají při reparaci především dráhy BER a NER (Panahi et al. 2018; Krokan a Bjørås 2013).

Dráha BER je iniciována nejméně jednou z 11 různých DNA glykosyláz, z nichž každá preferuje specifický typ léze. DNA glykosylasa rozpozná a odstraní poškozenou bázi. Tak vzniká abázické místo. Toto místo je na svém 5' konci rozštěpeno apurinovou/apyrimidinovou endonukleázou 1 (APE1) a vzniká jednovláknový zlom. DNA polymerasa β (Pol β) vyplní zlom komplementárním nukleotidem a odstraní 5'-deoxyribózový fosfát (5'-dRP). K uzavření zlomu dochází pomocí DNA ligasy III α -XRCC1. Takto vzniká tzv. krátká

záplata. Dlouhá záplata je v lidských buňkách považována za minoritní cestu opravy DNA. Probíhá, pokud je 5' cukr modifikován nebo pokud je lyázová aktivita Pol β defektní. V tomto případě DNA polymerasa δ (Pol δ) a DNA polymerasa ϵ (Pol ϵ) přidávají 2 až 12 nukleotidů na abázické místo, což vede k vytvoření přesahu 5' konce DNA. Tento přesah je odstraněn endonukleázou 1 (FEN1) a DNA ligasa 1 nebo XRCC1/LigIII α uzavře zlom (Krokan a Bjørås 2013; Panahi et al. 2018; Marsden et al. 2017).

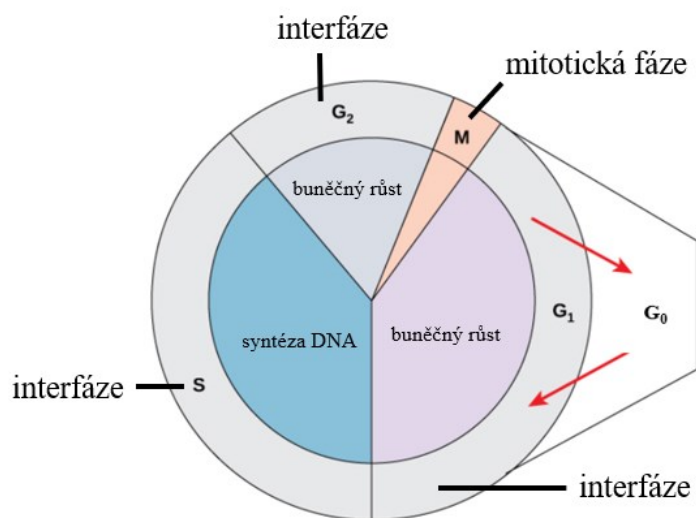
Primární funkcí reparační dráhy NER je odstraňování objemných lézí DNA, které ji destabilizují. Objemné léze DNA, jsou následky působení řady fyzikálních a chemických faktorů, včetně alkylační modifikace HD. Dráha NER je složitější, než BER a využívá řadu různých proteinů a enzymů. Silně deformující léze jsou rozpoznávány komplexem protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny C (XPC) RAD23B, který se váže na nepoškozené vlákno DNA naproti lézi (Obr. 7). Transkripční faktor IIIH (TFIIH) interaguje s XPC-RAD23B a pomocí své podjednotky proteinu *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny B (XPB) rozvolní DNA, což umožní protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny D (XPD) kontrolu DNA. XPD prověřuje správnost DNA a zastaví se až v místě jejího poškození, kde ověřuje chemickou modifikaci léze. Po ověření poškození dané léze dochází k vytvoření komplexu za pomoci protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny A (XPA), RPA a protein *xeroderma pigmentosum* komplementační skupiny G (XPG). Poté přichází na řadu (*excision repair cross complementing group 1*) (ERCC1)-XPF, který interaguje s vytvořeným komplexem za pomoci XPA a vede k incizi 5' konce ve směru od léze. Dalším krokem je zahájení opravné syntézy pomocí Pol δ , DNA polymerasa κ (Pol κ) nebo Pol ϵ a přidružených faktorů, po kterém následuje incize 3' konce pomocí XPG. Dokončení opravné syntézy a uzavření vzniklého řezu dokončuje DNA ligasa III α /XRCC1 nebo DNA ligasa1 (Schärer 2013; Krasikova et al. 2021).



Obr. 7 Reparace DNA mechanismem excize nukleotidů (zdroj: Schärer 2013).

3.4 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je uspořádaný proces intracelulárních pochodů, který vede k buněčnému dělení. Buňka postupně prochází sekvenčními molekulárními událostmi, aby dokončila proces rozdělení buňky. Buněčné složky včetně genetické informace se musí duplikovat, duplikované sady se musí separovat a poté musí být rozděleny do dvou dceřiných buněk. Dceřiné buňky mají identické vlastnosti. Buněčný cyklus (Obr. 8) se u eukaryotických buněk dělí na interfázi a mitózu (Lew 2013; Yang a Sheridan 2014).



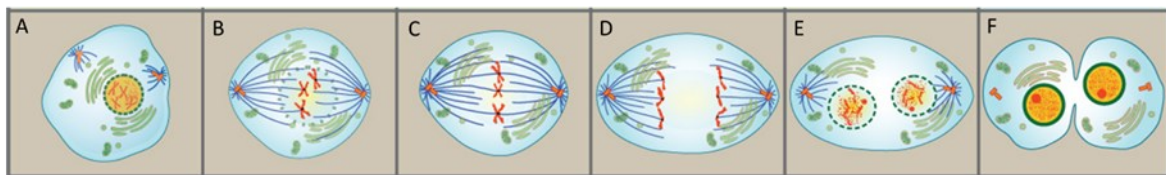
Obr. 8 Buněčný cyklus (zdroj: Fowler et al. 2013)

Interfázi dále dělíme na G1 (*gap 1*), S (*synthesis*) a G2 (*gap 2*) fázi. První fáze interfáze se nazývá fáze G1. V G1 fázi je buňka aktivní na biochemické úrovni. Syntetizují se stavební složky chromozomální DNA a přidružené proteiny. Zároveň se vytváří dostatek energetických zásob k dokončení replikace chromozomů v jádře. Nejintenzivněji zkoumaným procesem probíhající v interfázi je replikace DNA. Replikace DNA probíhá během S fáze interfáze. S fáze obvykle trvá 8 hodin, ale může být dokončena i během deseti minut. Výsledkem S fáze jsou dvě identické kopie každého chromozomu, sesterské chromatidy, které jsou pevně spojené v oblasti centromery. Většina buněk obsahuje jeden centrozom, který musí být během buněčného cyklu přesně duplikován. Centrozom iniciuje polymeraci mikrotubulů a jejich prostorové rozložení v buňce. Duplikace ostatních složek buňky nemusí být tak přesná, jako je tomu u DNA či centrozomů. Duplikace ostatních složek probíhá do jisté míry automaticky a nevyžaduje přílišnou koordinaci. V G2 fázi buňka doplňuje své energetické zásoby, syntetizuje proteiny a může docházet k dalšímu růstu buňky. U některých buněčných struktur dochází ke zdvojení a vytváří se místo pro mitotické vřetenko. Probíhají závěrečné přípravy, které jsou nezbytné pro vstup do první fáze mitózy (Lew 2013; Fowler et al. 2013).

Aby mohly vzniknout dvě dceřiné buňky, musí se rozdělit obsah jádra a cytoplazmy. Během mitotické fáze se zdvojené chromozomy vyrovnají do ekvatoriální roviny, oddělí a přesunou se na opačné póly buňky. Buňka se poté rozdělí na dvě nové identické dceřiné buňky. První část mitotické fáze, mitóza, se skládá z pěti fází, ve kterých dochází k jadernému

dělení. Druhá část mitotické fáze, cytokineze, je fyzické oddělení cytoplazmatických složek na dvě dceřiné buňky (Fowler et al. 2013).

Mitóza je rozdělena do série několika po sobě jdoucích fází. Jedná se o profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi. Výsledkem tohoto procesu je rozdělení buněčného jádra. Během profáze (Obr. 9, A) se rozpadá jaderný obal, přilehlé endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát na malé fragmenty a rozptýlí se na periferii buňky. Dochází k zániku jádra. Centrozomy se začnou přesouvat k opačným pólům buňky. Mikrotubuly, základ mitotického vřeténka, se rozprostírají mezi centrozomy, které se od sebe vzdalují a zároveň se prodlužují do délky. Sesterské chromatidy kondenzují v kompaktní chromozomy.



Obr. 9 Fáze mitózy a cytokineze. A) profáze, B) prometafáze, C) metafáze, D) anafáze, E) telofáze, F) cytokineze (zdroj Fowler et al. 2013).

Během prometafáze (Obr. 9, B) pokračuje mnoho procesů, které byly zahájeny v předchozí fázi. Dochází k vytvoření spojení mezi chromozomy a cytoskeletem. Zbytky jaderného obalu mizí, mitotické vřeténko se stále vyvíjí a chromozomy dále kondenzují. Každá sesterská chromatida se připojuje k mikrotubulům vřeténka, které vychází z centromery. K tomu dochází prostřednictvím bílkovinného komplexu zvaného kinetochor. Metafáze (Obr. 9, C) je typická tím, že všechny chromozomy, které jsou v tuto chvíli maximálně kondenzované, se zarovnávají uprostřed buňky v ekvatoriální rovině. Sesterské chromatidy jsou spojeny pouze v místě centromery. V anafázi se sesterské chromatidy seřazené v ekvatoriální rovině rozdělí (Obr. 9, D). Každá chromatida, nyní již nazývaná chromozom, je rovnoměrně tažena k pólu buňky. Kromě oddalování chromozomů se od sebe vzdalují také póly buňky a buňka se prodlužuje. Během telofáze se chromozomy dostanou na opačné póly a začnou dekonenzovat (Obr. 9, E). Rozpadají se mitotická vřeténka, ze kterých se sestavují složky cytoskeletu. Kolem chromozomů se vytváří jaderné obaly (Fowler et al. 2013).

Cytokineze je druhou částí mitotické fáze, během níž je dělení buněk ukončeno fyzickým rozdělením buňky na dvě buňky dceřiné (Obr. 9, F). Příprava cytoskeletu na cytokinezi začíná současně již na začátku anafáze. Po obvodu buňky se začne vytvářet prstenec z aktinových a myozinových mikrofilament, který se postupně kontrahuje a vzniká dělicí rýha. Dělicí rýha

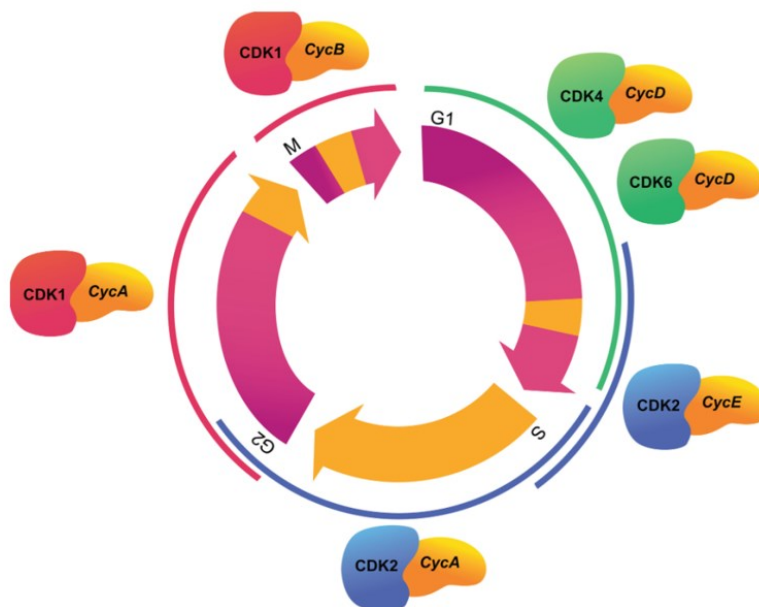
se stále prohlubuje, až dojde k přerušení spojení a vzniku dvou samostatných dceřiných buněk (Lew 2013; Yang a Sheridan 2014; Fowler et al. 2013).

Ne všechny buňky dodržují klasické schéma buněčného cyklu, kdy nově vzniklá dceřiná buňka okamžitě vstupuje do interfáze a následně do fáze mitotické. U buňky může nastat i fáze G₀, kdy se buňka nepřipravuje na dělení, ale nachází se pouze v klidové fázi. Některé buňky vstupují do G₀ fáze dočasně, dokud vnější signál nevyvolá nástup fáze G₁. Buňky, které se nikdy nedělí nebo se dělí jen zřídka, jako jsou buňky srdečního svalu či nervové buňky, zůstávají v G₀ fázi trvale (Fowler et al. 2013).

3.4.1 Regulace buněčného cyklu a cyklin dependentní kinasy

Přesná regulace buněčného cyklu je nezbytná k zachování integrity DNA v průběhu několika generací buněk. Regulace buněčného cyklu také zajišťuje, že k proliferaci buněk dochází pouze za definovaných podmínek (Yang a Sheridan 2014). Buněčný cyklus je primárně katalyzován komplexem obsahujícím cyklin dependentní kinasy (CDK) a cykliny. CDK jsou serinové/threoninové proteinové kinasy, které jsou aktivovány ve specifických bodech buněčného cyklu. CDK jsou nezbytné pro průběh buněčného cyklu, protože jejich inaktivace brání buňce vstoupit do mitotické fáze. Velká část regulace buněčného cyklu je závislá na stavu fosforylace. CDK jsou regulovány několika metodami. Jednou z nich je fosforylace na threoninovým a tyrosinových zbytcích (Yang a Sheridan 2014; Lew 2013; Murray 1994).

Přechod z jedné do další fáze buněčného cyklu probíhá uspořádaně a je regulován různými buněčnými proteiny. Klíčovými regulačními proteiny jsou CDK, rodina serinových/threoninových proteinových kináz, které se aktivují v určitých bodech buněčného cyklu (Obr. 10).



Obr. 10 Regulace buněčného cyklu komplexy CDK-cyklin (zdroj: Pluta et al. 2024)

Doposud bylo identifikováno devět CDK a pět z nich je aktivních během buněčného cyklu (Tab. 2). Po aktivaci CDK indukují navazující procesy prostřednictvím fosforylace vybraných proteinů. Hladiny proteinů CDK zůstávají během buněčného cyklu stabilní, na rozdíl od jejich aktivačních proteinů, kterými jsou cykliny. Hladiny cyklinových proteinů během buněčného cyklu stoupají a klesají a tím pravidelně aktivují příslušné CDK. V různých fázích buněčného cyklu jsou zapotřebí různé cykliny (Vermeulen et al. 2003).

Tab. 2 Regulace buněčného cyklu pomocí cyklinů a cyklin dependentních kinas (zdroj: Vermeulen et al. 2003).

Aktivita v buněčném cyklu	Cykliny	CDK
G1 fáze	Cyklin D1, D2, D3	CDK4
G1 fáze	Cyklin D1, D2, D3	CDK6
Přechod fáze G1/S	Cyklin E	CDK2
S fáze	Cyklin A	CDK2
Přechod fáze G2/M	Cyklin A	CDK1
Mitóza	Cyklin B	CDK1
Všechny fáze buněčného cyklu	Cyklin H	CDK7

Tři cykliny typu D (cyklin D1, D2 a D3) se váží na CDK4 a CDK6. Komplexy CDK cyklin D jsou nezbytné pro vstup do G1 fáze. Na rozdíl od ostatních cyklinů není cyklin D exprimován periodicky, ale je syntetizován tak dlouho, dokud trvá stimulace růstovými faktory. Dalším cyklinem regulující G1 fázi cyklu je cyklin E, který se spojuje s CDK2 a reguluje přechod z G1 do S fáze. Cyklin A se váže s CDK2 a tento vzniklý komplex je nezbytný během S fáze. V pozdní G2 a časně M fázi se cyklin A spojuje s CDK1 a zajišťuje vstup do M fáze. Na regulaci mitózy se dále podílí cyklin B v komplexu s CDK1 (Lew 2013; Vermeulen et al. 2003).

Kromě vazby cyklinu je aktivita CDK regulována také fosforylací na threoninových a tyrozinových zbytcích aminokyselin. Plná aktivace CDK1 vyžaduje fosforylací threoninu 161, threoninu 172 u CDK4 a threoninu 160 u CDK2, kterou přináší komplex CDK7-cyklin H, nazývaný také CAK. Tyto fosforylace vyvolávají konformační změny a zároveň posilují vazbu cyklinů. Rovněž existují kinasy, které mohou způsobit inaktivaci buněčného cyklu. Jsou to například kinasy Wee1 a *Myelin Transcription Factor 1* (Myt1), které fosforylují CDK1 na tyrozinu 15 nebo threoninu 14. Defosforylace na těchto místech pomocí enzymu Cdc25 je nezbytná pro aktivaci CDK1 a další postup buňky buněčným cyklem (Vermeulen et al. 2003).

Aktivita CDK může být narušena inhibičními proteiny buněčného cyklu, tzv. inhibitory cyklin-dependentních kináz (CKI). Tyto inhibitory se vážou na samostatnou CDK nebo na komplex CDK-cyklin a regulují aktivitu CDK. Byly objeveny dvě odlišné rodiny inhibitorů CDK, rodina INK4 a rodina CDK interagující protein/protein inhibující kinasu (Cip/Kip). Tyto CKI vytvářejí stabilní komplexy s CDK před vazbou cyklinu. Druhá rodina inhibitorů zahrnuje protein 21 (p21), protein 27 (p27) a protein (p57). Tyto inhibitory inaktivují komplex CDK-cyklin. Inhibují G1 CDK-cyklin komplexy. Protein p21 také inhibuje syntézu DNA. CKI jsou regulovány jak vnitřními, tak vnějšími signály. Ke správnému průběhu buněčného cyklu přispívá také intracelulární lokalizace různých proteinů regulujících buněčný cyklus. Cyklin B obsahuje jaderný vylučovací signál a je aktivně exportován z jadra, až do začátku profáze. Kinasy Wee1 a Myt1 se nacházejí v jádře a v Golgiho komplexu, kde chrání buňku před předčasnou mitózou (Murray 1994; Vermeulen et al. 2003; Yang a Sheridan 2014; Barnum a O'Connell 2014).

Když je CDK aktivní, cílové proteiny jsou fosforylovány na konsenzuálních místech CDK, což vede k fyziologicky významným změnám průběhu buněčného cyklu. Mezi nejčastěji studovaný cíl patří substrát CDK4/6-cyklin D, který je produktem retinoblastomového tumor supresorového genu (pRb). Během časně G1 fáze dochází k fosforylaci pRb, což vede

k narušení komplexu s proteinem histondeacetylásou (HDAC) a uvolnění transkripčních faktorů E2F-1 a DP-1. Tyto faktory pozitivně regulují transkripci genů, jejichž produkty jsou nezbytné pro progresi S fáze, včetně cyklinu A, cyklinu E a Cdc25. pRb zůstává hyperfosforylovaný po zbytek buněčného cyklu a CDK2-cyklin E se podílí na udržování toho hyperfosforylovaného stavu. Během G1/S fáze komplex CDK2-cyklin E také fosforyluje svůj inhibitor p27, čímž indukuje jeho degradaci. Jaderný protein mapovaný na lokus ATM (NPAT) se spojuje s CKD2-cyklinem E a je jím také fosforylován. Hladina proteinu NPAT dosahuje vrcholu na hranici G1/S fáze a předpokládá se, že hraje roli při vstupu do S fáze. CDK2-cyklin E fosforyluje histon H1 a tato aktivita může být důležitá pro kondenzaci chromozomů, která je potřebná při replikaci DNA. Histon H1 je také substrátem pro CDK1-cyklin B. Cyklin A dependentní kinasy regulují iniciaci replikace DNA tím, že fosforylují DNA polymerasu alfa primasu. Mezi další substráty CDK patří vlastní regulátory CDK Wee1, Cdc25 a cytoskeletální proteiny, jako jsou jaderné lamináty, mikrotubuly a vimentin. Tyto proteiny jsou nepostradatelné pro správný průběh mitózy (Murray 1994; Vermeulen et al. 2003).

Restrikční bod (R) je bod v G1 fázi, po jehož překonání je buňka zavázána ke vstupu do buněčného cyklu. Další kontroly nebo kontrolní body nacházející se v buněčném cyklu, zajišťují uspořádaný sled jednotlivých fází. V reakci na poškození DNA zastavují kontrolní body buněčný cyklus, aby poskytly čas na opravu DNA. Kontrolní body poškození DNA se nachází před vstupem buňky do fáze S (kontrolní bod G1/S) nebo po replikaci DNA (kontrolní bod G2/M) a zdá se, že kontrolní body existují i během S a M fáze. V kontrolním bodě G1/S je zástava buněčného cyklu vyvolána poškozením DNA závislá na p53. Obvykle je hladina p53 nízká, ale při poškození DNA může dojít ke zvýšené aktivitě p53. p53 stimuluje transkripci různých genů, jako jsou například p21, *Mouse double minute 2 homolog* (Mdm2) a Bax. Indukce p21, CKI, má za následek inhibice CDK a zastavení buněčného cyklu, což funguje jako prevence replikace poškozené DNA (Vermeulen et al. 2003; Barnum a O'Connell 2014).

V případě nadměrně poškozených buněk p53 vyvolává buněčnou smrt aktivací genů, které se podílejí na proapoptické signální dráze. Mezi tyto geny patří například Bax, Fas a geny zapojené v dráze oxidačního stresu. Další blokáce v kontrolním bodě G1/S je způsobována kinasami ATM či ATR. Tyto kinasy při poškození DNA fosforylují p53, což vede k zablokování buněčného cyklu. Mechanismy kontroly v kontrolním bodu ve fázi S při poškození DNA jsou dosud málo objasněny (Vermeulen et al. 2003; Barnum a O'Connell 2014).

Pokud dojde k poškození DNA během fáze G2, buňky jsou schopné zahájit zástavu buněčného cyklu nezávisle na aktivaci p53. Vstupu do mitózy je zabráněno udržováním CDK1 v inhibované formě. Této inhibici brání inhibitory fosforylace či sekvestrace komponent komplexu CDK1-cyklin B mimo jádro. Této situace je dosaženo pomocí CHK1 a CHK2, které se aktivují při poškození DNA. Protein p53 může hrát také roli v regulaci kontrolního bodu G2/M. Poškození DNA, které vede ke zvýšení hladiny p53, stejně jako je tomu v kontrolním bodu G1/S, vede i ke zvýšené transkripci p21 (Vermeulen et al. 2003; Yang a Sheridan 2014; Lew 2013).

3.4.2 Metody měření buněčného cyklu

Mezi nejčastější metody používané k analýze buněčného cyklu patří fluorescenční sondy nebo značky. Danou fázi cyklu lze určit pomocí barviv, které interagují s DNA na základně ploidy. Fluorescenční analýza populace buněk, které byly fluorescenčně obarveny, vytváří histogram DNA diploidní buňky (2N) v G0/G1 fázi. V této fázi mají buňky poloviční množství DNA než buňky v G2 fázi. Během S fáze buňky zdvojnásobují svůj genomický obsah, která svou velikostí leží mezi G1 a G2. Fluorescenční barviva 4',6-diamidino-2-fenyindol (DAPI) a propidium jodid (PI) se běžně používají k barvení fixovaných buněk, zatímco jiná barviva určená pro DNA jako jsou Hoechst 33258 a DRAQ mohou být použita i pro analýzu živých buněk (Eastman a Guo 2020).

Buňky aktivně zapojené do replikace DNA lze identifikovat pomocí analogů thymidinu, které jsou v průběhu značení začleněné do vznikající DNA. Halogenované thymidinové nukleosidy, mezi které patří 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), 5-chloro-2'-deoxyuridin (CldU) a 5-iodo-2'-deoxyuridin (IdU), se detekují značením protilátkami po fixaci buňky, permeabilizaci membrán a denaturaci DNA. Alkylovaný nukleosid thymidinu, 5-ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU), může být detekován pomocí mědi katalyzované „*click chemistry*“. Výhodnou je vyšší citlivost značení a vynechání kroku denaturace DNA. Fosforylovaný histon H3 (pH3), který se vyskytuje od pozdní G2 fáze až po telofázi, lze rozpoznat pomocí specifických protilátek a bývá použit jako marker M fáze cyklu. Přesná analýza buněčného cyklu vyžaduje vyloučení mrtvých a časně apoptických buněk z analýzy, protože ty neodpovídají rozdílům v metabolismu nukleotidů a konfiguraci chromozomů v rámci buněčného cyklu. Tohoto lze dosáhnout pomocí barviv, které procházejí poškozenými membránami těchto buněk a nespecificky váží proteiny (Eastman a Guo 2020).

Vitální fluorescenční proteinové značení se vyhýbá nutnosti fixace buněk a umožňuje sledovat klíčové okamžiky buněčného cyklu na základě morfologie, subcelulární lokalizace či intenzity fluorescence. Mezi příklady morfologické sondy patří histony značené fluorescenčním proteinem GFP, které informují o mitotickém vývoji založeném na progresi charakteristické kondenzace a zarovnání chromatinu. Fluorescenčně značený proliferační antigen buněčného jádra (PCNA) se spojuje do replikačních ohnisek během S fáze. Značení proteinů, které podléhají jaderné translokaci regulované buněčným cyklem, jako je lidská DNA helikasa B a cyklin B1, vede k jaderné lokalizaci fluorescence ve specifických buněčných oblastech.

Rodina reportérů FUCCI (*Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator*) využívá proteolytickou povahu mechanismů buněčného cyklu. Exprese fluorescenční sondy je tak omezena pouze na specifickou fázi buněčného cyklu. Jednoznačným benefitem při rozlišování fází buněčného cyklu podle typu a intenzity fluorescence je umožnění separace buněk pomocí průtokové cytometrie ve spojení s fluorescencí aktivované třídění buněk (FACS). Původně je FUCCI dvoubarevný systém s odlišnými fluorescenčními proteiny, který jsou fúzované s karbohydrát-deficientním transferinem (CDT) a MINININ, které označují G0/G1 a S/G2 fázi cyklu. Novější verze je rozšířena ještě o *stem-loop binding protein* (SLBP) pro rozlišení S fáze od G2 fáze a o čtvrtý reportér fúzovaný s histonem H1.0 pro identifikaci buněk v časně M fázi cyklu. Vzhledem k tomu, že původní CDT1 přetrvává i po vstupu do S fáze, byl vyvinut alternativní reportér PIP-FUCCI, aby zvýšil časovou přesnost cyklu. Tento systém využívá s replikací spřažený degron (sekvence aminokyselin, která reguluje rychlost degradace proteinů), který je citlivý na přítomnost PCNA navázané na DNA k omezení exprese fluorescenčního proteinu během S fáze. Některé reportéry buněčného cyklu, CDT1 a PCNA, vykazují akumulaci signálu v průběhu času v rámci hlášené fáze. To usnadňuje rozdělení fáze buněčného cyklu na časnou a pozdní na základě intenzity signálu. Kontrolován je buď počet kopií transgenů nebo genomická integrace. Dokud je k dispozici dostatek vizuálně identifikovatelných znaků, které ohraničují vývoj fází buněčného cyklu, lze reportéry použít jednotlivě nebo kombinovaně v časosběrné mikroskopii, abychom kvantifikovali trvání určité fáze buněčného cyklu na úrovni jedné buňky (Eastman a Guo 2020).

Abychom snížili počet fluorescenčních sond a mohli studovat buňky v jejich přirozené podobě, bez značení, byly vyvinuty techniky, které odvozují fáze buněčného cyklu z asynchronních populací. Pokroky ve vysokorychlostním optickém snímání a digitalizační technologii v kombinaci s postakviziční rekonstrukcí snímků umožňují vysoce výkonné měření

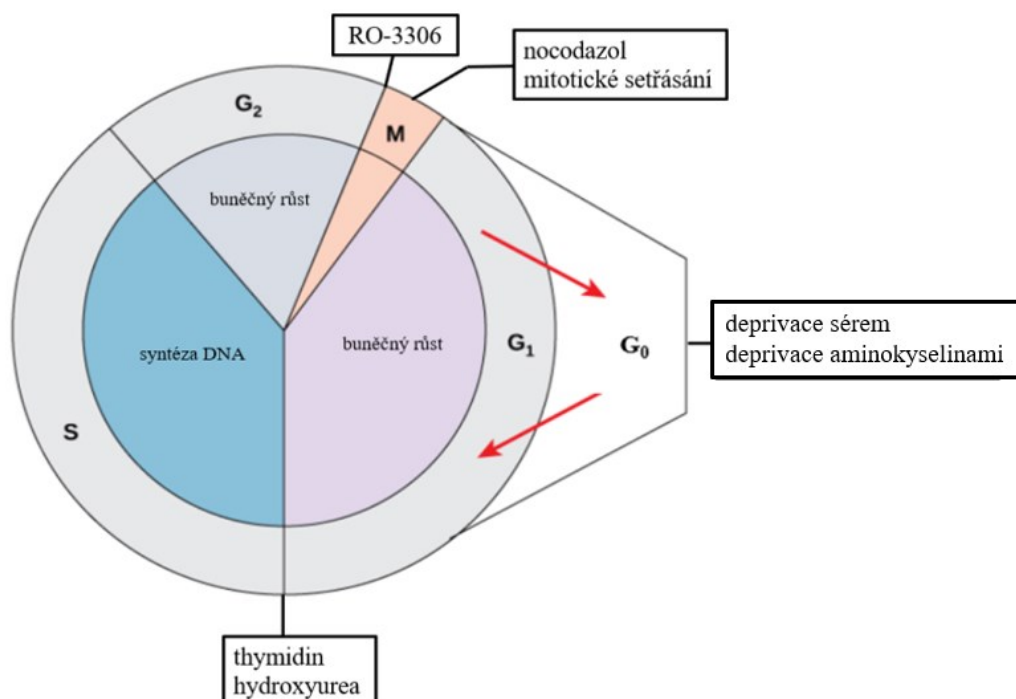
mnoha buněčných funkcí, včetně těch, které souvisejí s buněčným cyklem jako je mikroskopie a zobrazovací průtoková cytometrie (Eastman a Guo 2020).

3.5 Metody synchronizace buněčného cyklu

U většiny savčích buněk dochází k dělení buněk asynchronně. Při studiu buněk v určité fázi cyklu je výhodné provést jejich synchronizaci. Obecně lze metody rozdělit na chemické zásahy do progresu buněčného cyklu a na mechanickou separaci buněk (Eastman a Guo 2020).

Do první skupiny patří metody založené na zastavení buněk v určitém bodě buněčného cyklu. V G₁ fázi se využívá deprivace fetálního bovinního séra nebo aminokyselinami. Mezi metody založené na zástavě cyklu v S fázi patří blokáda pomocí thymidinu nebo hydroxyurey. Pro synchronizaci buněk v M fázi lze použít nocodazol. Na hranici G₂/M pak například reverzibilní inhibitor RO-3306 (Eastman a Guo 2020).

Druhá skupina zahrnuje izolaci mitotických buněk mechanickou cestou např. periodickým setřásáním, metodou elutriace (odplavením) nebo izolace buněk pomocí průtokové cytometrie (Eastman a Guo 2020; Jackman a O'Connor 1998). Přehled uvedených metod shrnuje Obr. 11.



Obr. 11 Metody a sloučeniny využívané při synchronizaci buněčného cyklu (zdroj: Ligasová a Koberna 2021).

Deprivace sérem způsobuje zastavení buněk v G0/G1 fázi, protože vstup do buněčného cyklu vyžaduje dostatek dostupných živin a prostoru pro růst buňky. Stejně jako zástava cyklu vyvolaná chemickými agens není tato synchronizace stoprocentně účinná a může vyvolávat buněčný stres. Navíc může být neúčinná u mnoha nádorových buněčných linií, které jsou méně citlivé na metabolickou a kontaktní inhibici růstu (Ligasová a Koberna 2021; Eastman a Guo 2020).

Velký počet synchronních buněk v G0 fázi lze získat kultivací ve speciálním médiu bez obsahu některých aminokyselin, důležitých pro růst buňky. Jedná se například o methionin nebo isoleucin, které patří mezi esenciální aminokyseliny. Tato metoda využívá vnitřních regulačních mechanismů buněčného cyklu, které souvisejí s bodem restrikce. Ovšem některé buněčné linie mohou být rezistentní a pokračovat v buněčném cyklu nepravidelně. U jiných buněčných typů deprivace živin vede ke smrti buňky nebo částečné diferenciaci (Eastman a Guo 2020; Ligasová a Koberna 2021).

Chemická synchronizace buněk dvojitým thymidinovým blokem byla první spolehlivou metodou synchronizace, která byla široce používána. Metoda zahrnuje dvě po sobě jdoucí expozice thymidinu o koncentraci přibližně 4 až 8 mmol.l⁻¹. Každá expozice je oddělena časovým intervalem, který je určený na základě znalosti normálního rozložení buněčného cyklu exponenciálně rostoucích buněk a době zotavení z blokády thymidinem. Metoda je cílena na synchronizaci buněk v G1/S (Ligasová a Koberna 2021; Eastman a Guo 2020).

Nocodazol je inhibitor buněčného cyklu, který chemicky narušuje organizaci mikrotubulů v buňkách. Ta je klíčová pro vstup mitózy a proto nocodazol působí zástavu cyklu v G2/M fázi. Některé linie jsou však defektní v detekci narušení mikrotubulární sítě, pokračují v cyklu a následně prochází abnormální mitózou (Jackman a O'Connor 1998; Eastman a Guo 2020).

Účinnost chemické synchronizace závisí na typu a mechanismu účinku molekuly, koncentraci či době trvání chemické inhibice. Z tohoto důvodu je nezbytná optimalizace experimentálních podmínek pro každý typ buněk. Zvýšením koncentrace inhibitoru nebo doby trvání blokády cyklu se může zlepšit výtěžnost metody. Snížení počtu buněk, které uniknou z bloku, je však doprovázeno poklesem jejich životaschopnosti. Dočasné zastavení buněčného cyklu může vést ke změně buněčného chování nebo projevu cytotoxicity inhibitoru doprovázené zvýšením populace apoptických buněk (Jackman a O'Connor 1998; Ligasová a Koberna 2021; Eastman a Guo 2020).

Mitotické setřásání je jednou z nejstarších metod získávání mitoticky obohacené populace buněk při současném zachování jejich životaschopnosti. Tento postup je použitelný pro většinu adherentních buněk rostoucích v jedné vrstvě. Adherentní buňky během mitózy a cytokineze dočasně ztrácí kontakt se substrátem a lze je mechanickým mícháním kultivačního média uvolnit a separovat v podobě suspenze. Pro zvýšení efektivity procesu se tato metoda může kombinovat s inhibitory mitózy (Eastman a Guo 2020; Jackman a O'Connor 1998; Ligasová a Koberna 2021).

Moderním přístupem k synchronizaci buněk je metoda *in silico*. Synchronizaci *in silico* lze použít u multiparametrických testů, mezi které patří například průtoková cytometrie a mikroskopie. Fáze buněčného cyklu je určena a seřazena postupně na základě typických znaků charakteristických pro jeho jednotlivé fáze. Další experimentálně měřené vlastnosti jsou analyzovány jako funkce dané fáze buněčného cyklu (Eastman a Guo 2020; Jackman a O'Connor 1998; Ligasová a Koberna 2021).

4 Cíle práce

1. Nalézt koncentrační rozmezí HD, kde se projevují cytostatické účinky a zjistit, jak HD zasahuje do průběhu buněčného cyklu.
2. Optimalizovat protokol synchronizace buněk ve fázi G1, S a G2/M za použití specifických inhibitorů buněčného cyklu.
3. Zjistit senzitivitu synchronizovaných buněk kožních keratinocytů HaCaT, k indukci alkylačního poškození, provedeném po odstranění inhibitoru.

5 Experimentální část

Poznámka k praktické části diplomové práce.

Při experimentální práci byl použit zásobní roztok sirného yperitu v dimethyl sulfoxidu (DMSO) o koncentraci 20 mmol.l⁻¹. Tento roztok byl uchovávaný při teplotě -20 °C. Před použitím byl roztok temperovaný na laboratorní teplotu. Jedná se o látku uvedenou v Seznamu 1 přílohy „Úmluvy o zákazu vývoji, výrobě, hromadění a použití chemických zbraní a o jejich zničení“.

Praktická část byla prováděna na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Vojenské lékařské fakulty Univerzity obrany. Zmíněné pracoviště je držitelem platné licence k zacházení s látkami uvedenými v Seznamu 1, kterou vydal Státní ústav pro jadernou bezpečnost.

Autorka diplomové práce byla po celou dobu, kdy pracovala na experimentální části diplomové práce, zařazená do III. kategorie práce v riziku (vysoce toxické látky) a pravidelně podstupovala periodické zdravotní prohlídky na Oddělení nemocí z povolání v Ústřední vojenské nemocnici v Praze. Práce se sirným yperitem probíhala vždy pod dohledem konzultanta této diplomové práce, za použití předepsaných ochranných pomůcek a stanovených postupů pro dekontaminaci použitého materiálu.

5.1 Použité chemikálie a roztoky

2-[3-(2,3-dichlorofenoxy)propylamino]etanol (2,3-DCPE) (Merck, Německo)

4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) (Merck, Německo)

5-(6-chinolinylmetylen)-2-[(2-thienylmethyl)amino]-4(5H)-thiazolon (RO-3306)

(Merck, Německo)

Abemaciclib (LY2835219) (Merck, Německo)

bis(2-chlorethyl)sulfid, HD, (VOP 072 Zemianske Kostofany, Slovensko; čistota ≥ 98 %, analyzováno GC-MS)

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit (Roche Diagnostic GmbH, Německo)

Dimethyl sulfoxid (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsírán sodný (Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, (DMEM) (Biosera, Francie)

Fetální bovinní sérum (Biosera, Francie)

Formaldehyd 4 %, pH 7 (Carl-Roth, Německo)

Fyziologický roztok pufovaný fosfáty (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, USA)

Glutamin (Biosera, Francie)

Penicillin-Streptomycin (Biosera, Francie)

Trypsin EDTA (Biosera, Francie)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)

5.2 Použité přístroje a pomůcky

Analyzátor životaschopnosti buněk v reálném čase xcelligence (Roche, Německo)

Centrifuga (Hettich, Německo)

CO₂ inkubátor (Binder, Německo)

Laminární box (EuroClone, Itálie)

Mikropipety (Eppendorf, Německo)

Multidetekční reader Cytation 5 (BioTek, USA)

Sterilní plastové pomůcky pro kultivaci buněk (Corning, USA; Costar, USA; TPP Švýcarsko)

Vodní lázeň (Polyscience, USA)

5.3 Buněčná linie HaCaT a podmínky její kultivace

Immortalizované lidské kožní keratinocyty HaCaT byly kultivovány v médiu DMEM suplementovaném 10 % fetálním bovinním sérem (FBS), 4 mmol.l⁻¹ glutaminu a 1 % roztoku penicilin /streptomycin. Kultivace probíhala v CO₂ inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂ v atmosféře

a 95 – 98 % vzdušné vlhkosti. Buňky byly pravidelně pasážovány za použití trypsinu/EDTA. Vzniklá suspenze buněk pak byla použita pro experimentální práce. Po naředění na požadovanou koncentraci buněčné suspenze byl pipetován příslušný objem do 96 jamkových mikrotitračních destiček určených pro měření absorbance fluorescence, anebo impedance.

5.4 Měření buněčné proliferace elektroimpedanční metodou

Buňky byly nasazeny do speciální 96 jamkové destičky (e-plate) v koncentraci 4 tis. buněk na jamku, v objemu 190 μ l kompletního média DMEM. Destička byla poté připojena k jednotce přístroje xCELLigence umístěné v CO₂ inkubátoru, která zajišťuje snímání hodnot elektrické impedance v 60minutových intervalech.

Druhý den byly buňky ovlivněny koncentrační řadou HD v rozmezí 0,5 až 6 μ mol.l⁻¹, přičemž koncentrace DMSO nepřesáhla 0,25 %. Čas ovlivnění buněk je ve výsledném grafu označen jako čas 0. Dále probíhalo automatické monitorování buněk po dobu 5 dní v intervalu 60 minut. Měření bylo provedeno v replikátu n = 4 a výsledná hodnota je uvedena jako průměrná hodnota buněčného indexu \pm střední chyba průměru (SEM).

5.5 Měření fází buněčného cyklu

Suspenze o koncentraci 6 000 buněk/jamku/200 μ l byla pipetována do černé 96 jamkové destičky s plochým transparentním dnem, vhodné pro měření fluorescence. Druhý den bylo provedeno ovlivnění buněk podle protokolu (synchronizace/HD). Ve stanovené časové intervaly bylo kultivační médium odsáto, buňky opláchnuty fyziologickým roztokem pufrovaným fosfáty (PBS) a do jamky bylo pipetováno 100 μ l 4 % roztoku formaldehydu (pH 7). Po 10 minutách byl obsah jamky odsát, fixované buňky byly uchovávány v PBS až do konečné fixace buněk ve všech sledovaných intervalech.

Následně byla provedena permeabilizace buněk přidáním 100 μ l PBS-Tw20 (0,05 % Tween-20 v PBS) po dobu 10 minut. Po oplachu 100 μ l PBS bylo do jamek pipetováno 70 μ l roztoku DAPI v PBS o koncentraci 10 μ g.ml⁻¹. Analýza fluorescence byla provedena po 30 minutách inkubace buněk s DAPI při laboratorní teplotě bez přístupu světla.

Buněčný cyklus byl analyzován přístrojem Biotek Cytation C5 při použití fluorescenčního kanálu pro DAPI (ex. 377 nm/em. 447 nm). Z každé jamky bylo vyfoceno

36 zorných polí a následně složeno do jednoho obrazu. Analytický software pak sestavil histogram závislosti % počtu buněk z celku na integrální intenzitě fluorescence buněčného jádra. V tomto histogramu byly vymezeny populace buněk nacházející se ve fázi G1, S a G2/M. Výsledky udávají % buněk v dané fázi cyklu. Měření bylo provedeno v replikátu $n=2$ až 4 v závislosti na typu experimentu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM z nejméně tří nezávislých experimentů.

5.6 Měření syntézy DNA inkorporací BrdU

Měření bylo provedeno dle návodu přiloženého k sadě testovacích chemikálií (*Cell Proliferation ELISA*), *BrdU (colorimetric) kit* a proto nelze jednoznačně určit některé komponenty ani jejich případnou koncentraci.

K buňkám HaCaT nasazených v 96 jamkové destičce o koncentraci 6 000 buněk/jamku a ovlivněné dle požadovaného protokolu bylo přidáno 20 μ l roztoku BrdU v kultivačním mediu, ředěného 1:100, 120 minut před uplynutím testovaného časového intervalu. Výsledná koncentrace BrdU v jamce byla 100 μ mol.l⁻¹. Po inkubaci bylo veškeré médium odsáto a buňky fixovány 200 μ l *FixDenat* pufrem po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Fixační činidlo bylo odstraněno a do jamek bylo pipetováno 100 μ l roztoku myší monoklonální protilátky anti-BrdU konjugované s peroxidázou, naředěné 1:100 ředícím pufrem. Následovala inkubace 90 minut při laboratorní teplotě. Přebytná protilátka byla odstraněna přidáním 3x 200 μ l promývacího pufrem. Do jamek bylo poté pipetováno 100 μ l roztoku substrátu a po 30 minutách byla změřena absorbance modrého produktu při vlnové délce 370 nm. Měření bylo provedeno v duplikátu a třech nezávislých experimentech.

5.7 Synchronizace buněčného cyklu

Synchronizace buněčného cyklu v G1 fázi byla provedena inkubací buněk s LY2835219. Rozpuštěním 10 mg LY2835219 v 830 μ l DMSO byl připraven roztok o koncentraci 20 mmol.l⁻¹. Pro zjištění optimální koncentrace LY2835219 a času potřebného k synchronizaci buněk v G1 fázi, byla připravena koncentrační řada v mediu DMEM o výsledné koncentraci 0,63 až 20 μ mol.l⁻¹. Do jamky s buňkami inkubovaných ve 100 μ l média DMEM, bylo pipetováno 100 μ l připravené koncentrační řady LY2835219 o dvojnásobné koncentraci. Takto ovlivněné buňky byly inkubovány 24 a 48 hodin. Následovala fixace buněk a měření buněčného

cyklu na přístroji Biotek Cytation 5. Zjištěná optimální koncentrace LY2835219 a čas působení byla použita pro další experimenty.

Synchronizace buněčného cyklu v S fázi byla provedena inkubací buněk s 2,3-DCPE. Rozpuštěním 10 mg 2,3-DCPE v 1,664 ml DMSO byl připraven roztok o koncentraci 20 mmol.l⁻¹. I v tomto případě byla provedena optimalizace experimentálních podmínek pro zjištění času a koncentrace 2,3-DCPE, kdy dojde k efektivní kumulaci buněk v S fázi cyklu. Testovaný koncentrační rozsah byl 5 až 160 μmol.l⁻¹ a časové intervaly 18, 24 a 48 hodin. Zjištěná koncentrace a čas působení 2,3-DCPE na synchronizaci buněčného cyklu ve S fázi byly použity v dalších experimentech.

Synchronizace buněčného cyklu v G2/M fázi byla provedena inkubací buněk s RO-3306. Rozpuštěním 10 mg RO-3306 v 1,424 ml DMSO byl připraven roztok o koncentraci 20 mmol.l⁻¹. V rámci optimalizačních experimentů byly testovány koncentrace 1,25 až 40 μmol.l⁻¹ a intervaly inkubace 24 a 48 hodin. Zvolená doba inkubace a koncentrace RO-3306, která signifikantně blokuje buňky v G2/M fázi cyklu byla použita pro další experimenty.

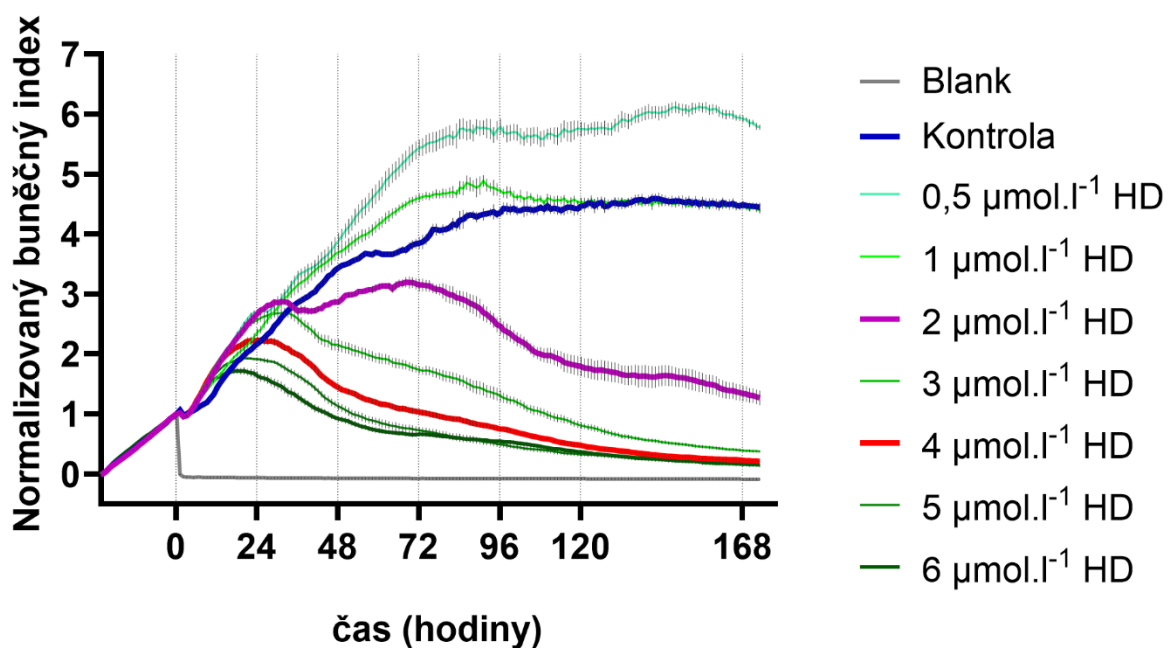
5.8 Statistická analýza dat

Data byla získána z nejméně tří nezávislých experimentů provedených v replikátu $n = 2$ až 4, v závislosti na uspořádání experimentu. Každý experimentální bod pak vyjadřuje průměr \pm SEM. Signifikantní rozdíly mezi kontrolou a dalšími hodnotami byly analyzovány na základě dvoucestné analýzy rozptylu (2way ANOVA) a Dunettovým post hoc testem. Statistická významnost rozdílu byla hodnocena na hladinách významnosti *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; *** a $p < 0,001$. Analýza dat byla provedena v programu GraphPadPrism, verze 10.2.2 (GraphPad Software, MA, USA).

6 Výsledky

6.1 Cytostatický účinek sirného yperitu

Elektroimpedanční metodou bylo provedeno dlouhodobé kontinuální monitorování proliferace buněk HaCaT po dobu 168 hodin. Buňky byly ovlivněny vzrůstající koncentrační řadou HD od 0,5 do 6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 12). Neovlivněné buňky jsou v obrázku znázorněny modrou křivkou. Je patrné, že po dobu 48 hodin od zvoleného času 0 (čas kdy bylo provedeno ovlivnění buněk HD), jsou neovlivněné buňky v exponenciální fázi růstu. Mezi intervaly 48 až 96 hodin dochází ke zpomalení růstu a po 96. hodině se již buňky dále nemnoží. Pro další experimentální práce byly vybrány 2 koncentrace: 2 a 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD, které výrazně mění trend křivek v porovnání s kontrolou. Koncentrace 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD omezuje růst buněk po 34 hodinách od ovlivnění. U koncentrace 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD se začíná projevovat odchylka od exponenciální fáze růstu už po 20 hodinách od ovlivnění HD. Následuje zhruba 10hodinový interval, kdy nedochází ke změně buněčného indexu. Následující část křivky pak už ukazuje pozvolný pokles hodnot buněčného indexu limitně blížícího se k nulové hodnotě buněčného indexu blanku, kde jsou buňky lyzovány účinkem dodecylsírnanu sodného (SDS).



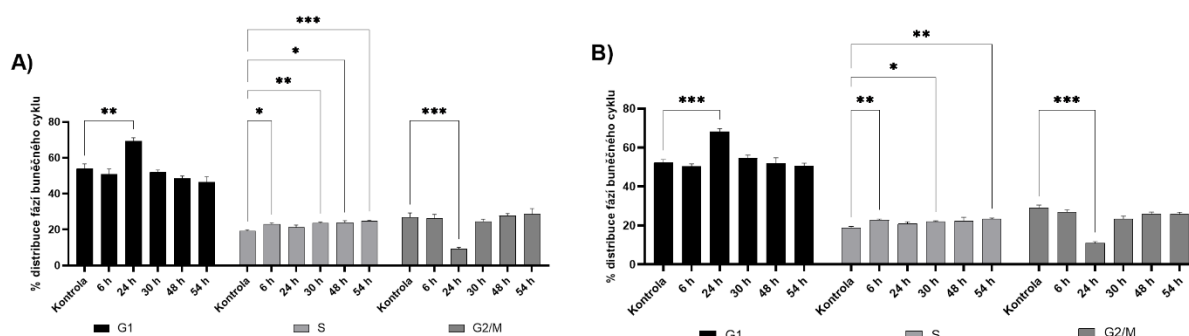
Obr. 12 Proliferační křivka buněk HaCaT ovlivněných sirným yperitem. Buňky byly ovlivněny koncentrační řadou sirného yperitu a buněčná proliferace byla automaticky monitorována každých 60 minut na základě měření hodnoty elektrické impedance vyjádřených v bezrozměrné jednotce „cell index“. Hodnoty jsou znázorněny jako průměr replikátu $n = 4 \pm \text{SEM}$.

6.2 Vliv sirmého yperitu na buněčný cyklus

U zvolených koncentrací (2 a 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) HD, byl studován jejich vliv na buněčný cyklus buněk HaCaT v časových intervalech 6, 24, 30, 48 a 54 hodin po ovlivnění HD.

Koncentrace 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD vedla k přechodnému statisticky významnému zvýšení populace buněk v G1 fázi po 24 hodinách inkubace, kde došlo k zvýšení o 15,5 % oproti kontrole (Obr. 13, A). Toto navýšení se projevilo souvisejícím signifikantním poklesem buněk ve fázi G2/M a to o 17,7 %. Další signifikantní změny byly zaznamenány ve fázi S, kde došlo k zvětšení populace buněk v intervalu 6 hodin po ovlivnění HD o 3,9 %, po 30 hodinách o 4,4 %, po 48 hodinách o 4,7 % a po 54 hodinách o 5,7 %.

Koncentrace 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD vedla ke statisticky významnému zvětšení populace buněk ve fázi G1 v intervalu 24 hodin (Obr. 13, B). Rozdíl činil 16 % v porovnání s kontrolou. V tomto intervalu došlo zároveň i k poklesu populace buněk o 18,1 % ve fázi G2/M. V S fázi buněčného cyklu došlo k signifikantnímu zvětšení populace buněk o 2,2 % v intervalu 6 hodin, o 5,6 % v intervalu 30 hodin a o 3,1 % v intervalu 54 hodin.



Obr. 13 Časový průběh buněčného cyklu buněk HaCaT po ovlivnění sirmým yperitem v koncentraci A) 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a B) 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Buněčný cyklus byl měřen metodou obrazové analýzy fluorescence jader fixovaných buněk obarvených DAPI v uvedených časových intervalech. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky signifikantní rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$ je označen *, $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

Další experimentální práce byly provedeny s koncentrací 2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD.

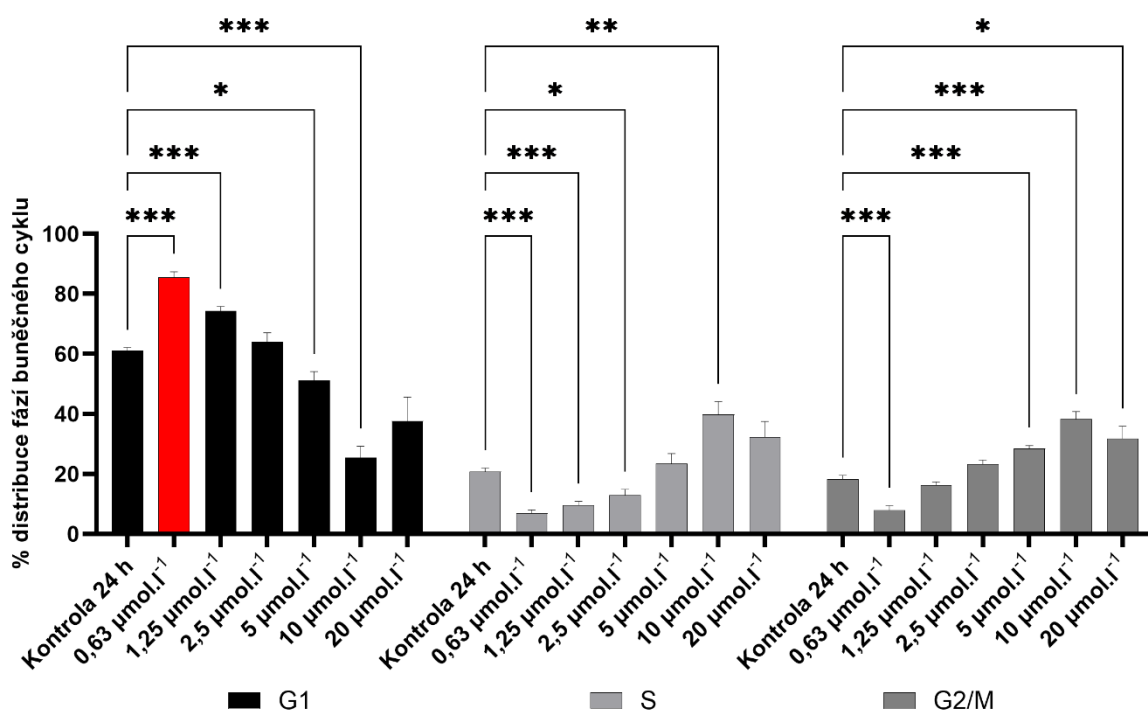
6.3 Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk v G1 fázi

Buňky byly ovlivněny koncentrační řadou látky LY2835219 v rozsahu 0,6 až 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Následně byly buňky fixovány v čase 24 a 48 hodin po ovlivnění a byla provedena analýza buněčného cyklu. Cílem synchronizace je nalézt koncentraci LY2835219 a čas inkubace, kdy dojde k maximální kumulaci buněk ve fázi G1. Po 24 hodinách inkubace buněk

s LY2835219 bylo zjištěno nejvyšší a zároveň statisticky významné zvětšení populace buněk v G1 fázi u koncentrace 0,63 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ LY2835219 (Obr. 14, A). Nárůst hodnot byl o 24,3 % ($p < 0,0001$) vyšší oproti kontrole. Se zvyšující se koncentrací docházelo ke koncentračně závislému poklesu hodnot.

V intervalu 48 hodin bylo rovněž zjištěno, že při koncentraci 0,63 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ LY2835219 došlo k signifikantnímu nárůstu % buněk v G1 fázi a to o 20,2 % ($p < 0,0001$) v porovnání s kontrolou (Obr. 14, B). Se zvyšující se koncentrací LY2835219 se i zde projevil trend koncentračně závislého poklesu množství buněk v G1 fázi.

Koncentrace LY2835219 0,63 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a doba inkubace 24 hodin byly zvoleny jako optimální parametry pro synchronizaci buněk HaCaT v G1 fázi buněčného cyklu.



Obr. 14 Optimalizace podmínek synchronizace buněčného cyklu v G1 fázi. Buňky HaCaT byly ovlivněny koncentrační řadou LY2835219 v rozsahu 0,63 až 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a fixovány v čase 24 (A) a 48 hodin (B) po ovlivnění. Po obarvení buněčných jader DAPI byla provedena analýza buněčného cyklu. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole je na hladině významnosti $p < 0,05$ označen *, $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

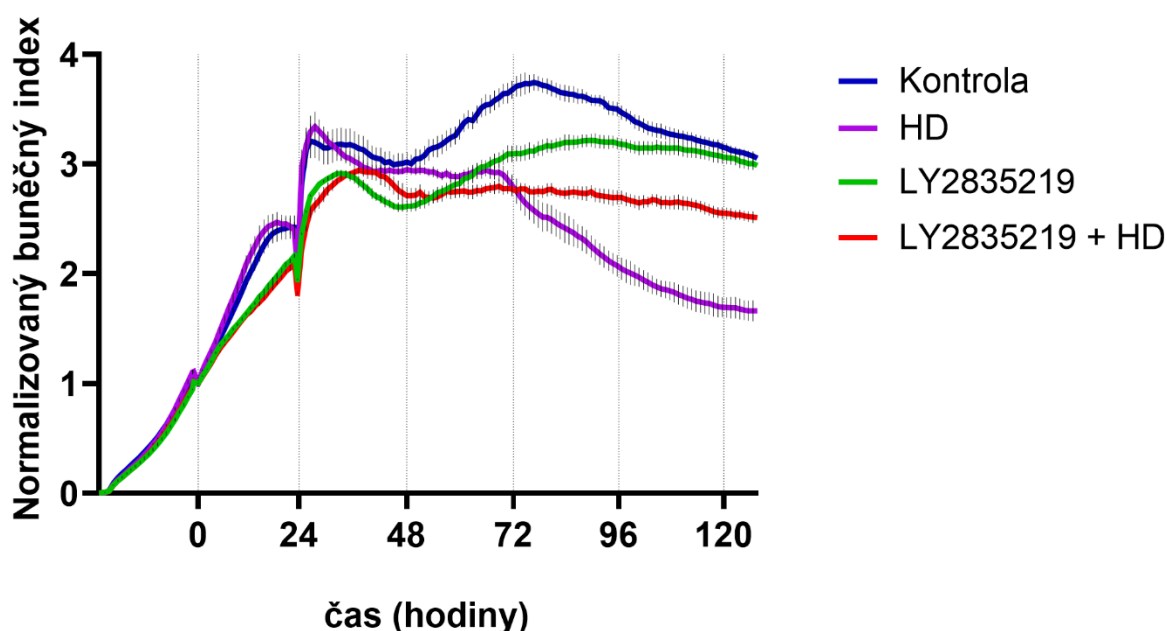
6.3.1 Vliv sirného yperitu na buňky synchronizované v G1 fázi

Buňky HaCaT byly ovlivněny LY2835219 v koncentraci 0,63 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 24 hodin, což vedlo k jejich synchronizaci v G1 fázi. U takto synchronizovaných buněk byla

v rámci tří paralelních experimentů studována životaschopnost buněk (I.), změny ve fázi G1 buněčného cyklu (II.) a aktivita syntézy DNA *de novo* metodou inkorporace BrdU (III.).

I. Životaschopnost buněk HaCaT

Buňky HaCaT byly synchronizovány působením LY2835219 o koncentraci $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 24 hodin (Obr. 15, zelená červená křivka). Po uplynutí 24 hodin byla provedena kompletní výměna média a synchronizované (Obr. 15, zelená křivka) i nesynchronizované buňky (Obr. 15, fialová křivka) byly ovlivněny $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD. Poté byly buňky kontinuálně monitorovány 4 dny. Trend křivek ukazuje, že nedochází k prudkému poklesu viability ani v průběhu synchronizace buněk, ani při následném ovlivnění HD po dobu přibližně 72 hodin od započetí synchronizace buněk. K výraznému poklesu životaschopnosti buněk došlo až po 72 hodinách od započetí experimentu u buněk, které byly ovlivněny pouze HD.

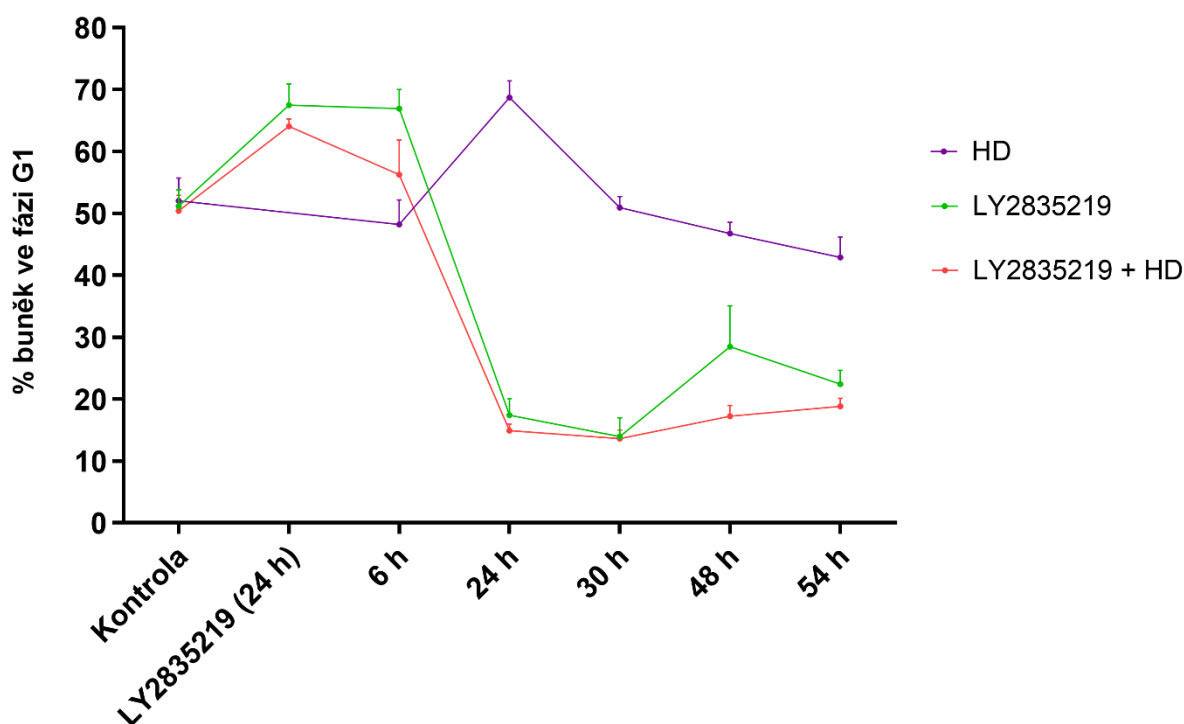


Obr. 15 Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase. Buňky HaCaT byly nasazeny do mikrotitrační destičky e-plate a v čase 0 byl přidán inhibitor LY2835219 o koncentraci $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Po inkubaci následovala výměna média a buňky byly ovlivněny sirtým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (čas 24 hodin). Následovalo monitorování buněčné viability po dobu 4 dnů. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 replikátů.

II. Změny v G1 fázi cyklu u synchronizovaných buněk

Buňky synchronizované v G1 fázi účinkem LY2835219 byly ovlivněny HD o výsledné koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Cílem statistické analýzy bylo porovnat buňky synchronizované v G1 fázi (Obr. 16, zelená křivka) a synchronizované buňky, které byly následně ovlivněny

HD (Obr. 16, červená křivka). Analýza ovšem neukázala žádné signifikantní rozdíly hodnot v žádném ze sledovaných časových intervalů v rámci těchto dvou experimentů.



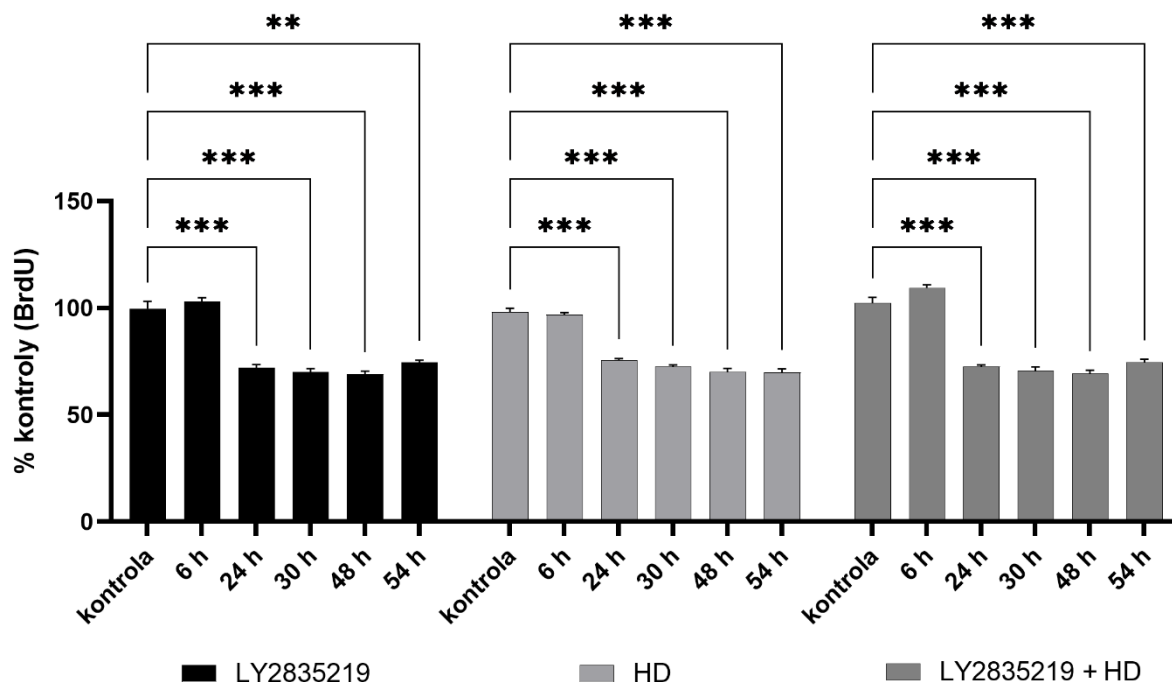
Obr. 16 Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v G1 fázi cyklu se sirným yperitem. Buňky HaCaT byly synchronizovány po dobu 24 hodin inkubací s LY2835219 o koncentraci $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Následovala výměna média a ovlivnění buněk sirným yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky postupně fixovány v uvedených časech. Následovalo barvení buněčných jader DAPI a analýza fluorescence. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu.

III. Inkorporace BrdU

Měření syntézy DNA *de novo* u proliferujících buněk bylo měřeno inkorporací BrdU do nově replikované DNA. U buněk synchronizovaných LY2835219 o koncentraci $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl po uvolnění z bloku zjištěn signifikantní pokles inkorporace BrdU v intervalech 24 až 54 h, v porovnání s kontrolou (Obr. 17, černé sloupce). Po 24 hodinách došlo k poklesu o 27,7 %, po 30 h o 29,7 %, po 48 h o 30,6 % a po 54 h o 25,2 %.

Buňky ovlivněné HD vykazovaly podobné chování. I zde došlo ke statisticky významnému poklesu inkorporace BrdU v intervalech 24 až 54 hodin oproti neovlivněné kontrole (Obr. 17, světle šedé sloupce). Po 24 hodinách byl zjištěn pokles o 22,6 %, po 30 h o 25,6 %, po 48 h o 28,0 % a po 54 h o 28,3 %.

V posledním experimentu kde byly synchronizované buňky HaCaT následně ovlivněny $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD klesla inkorporace BrdU po 24 hodinách o 29,9 %, po 30 h o 31,9 %, po 48 h o 33,2 % a po 54 h o 28,3 %, oproti kontrole (Obr. 17, tmavě šedé sloupce).



Obr. 17 Inkorporace BrdU u buněk HaCaT. Buňky byly synchronizované v G1 fázi cyklu inkubací s LY2835219 o koncentraci $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (černé sloupce). Paralelně byly nesynchronizované buňky ovlivněny sirtinovým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (světle šedé sloupce). Ve třetím paralelním experimentu pak byly synchronizované buňky ovlivněny sirtinovým yperitem (tmavě šedé sloupce). Dvě hodiny před uplynutím sledovaného intervalu byl k buňkám přidán roztok BrdU v médiu. V uvedených časech byly buňky fixovány a poté následovala imunochemická detekce inkorporovaného BrdU. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole je na hladině významnosti $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

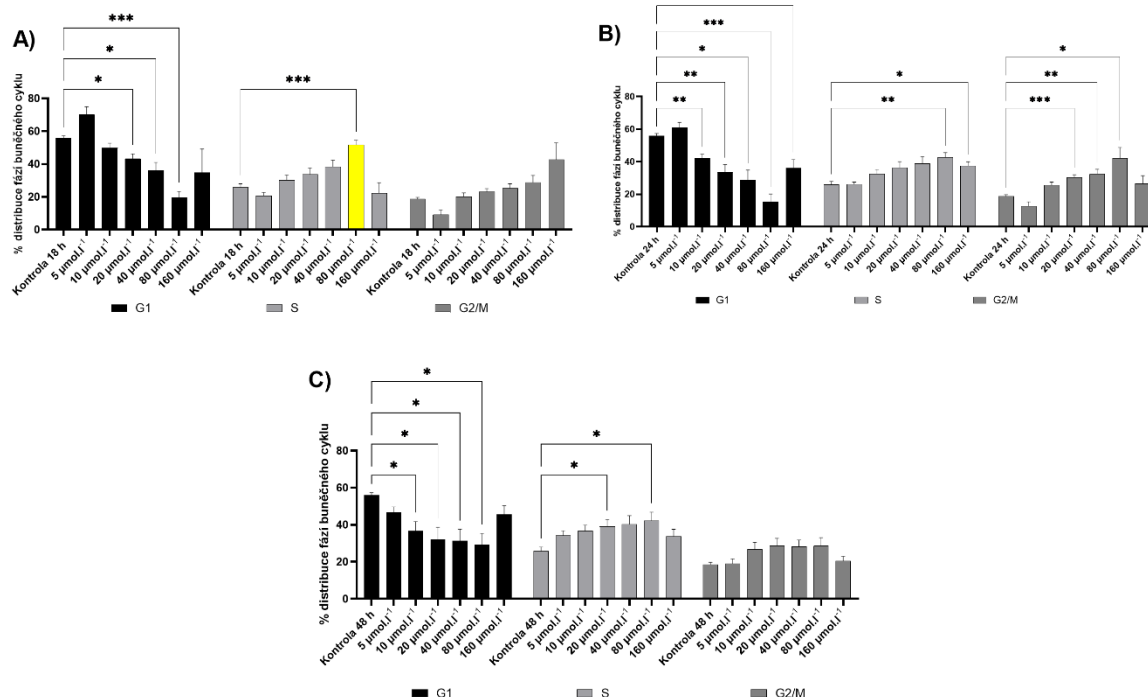
6.4 Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk v S fázi

Pro získání populace buněk HaCaT ve fázi S byl použit inhibitor 2,3-DCPE v koncentračním rozsahu 5 až $160 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Synchronizace buněk byla testována v inkubačních intervalech 18, 24 a 48 hodin. U buněk analyzovaných po 18 hodinové inkubaci s 2,3-DCPE byla nalezena nejvyšší a zároveň statisticky významná populace buněk v S fázi v koncentraci $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 18, A). Rozdíl oproti kontrole činil 36,2 %. Ostatní změny v S fázi nebyly v tomto intervalu statisticky významné.

Nižší výtěžnosti synchronizace (při stávající koncentraci 2,3-DCPE $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$) pak bylo dosaženo v delších inkubačních intervalech, kdy po 24 hodinách byla populace buněk

v S fázi o 16,7 % větší oproti kontrole (Obr. 18, B). Po 48 hodinách tvořil rozdíl populace buněk v S fázi 16,4 % v porovnání s kontrolou (Obr. 18, C).

Pro další experimentální práce byly zvoleny podmínky 80 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,3-DCPE a čas inkubace 18 hodin.



Obr. 18 Optimalizace podmínek synchronizace buněčného cyklu v S fázi. Buňky HaCaT byly ovlivněny koncentrační řadou 2,3-DCPE a fixovány v čase 18 hodin (A), 24 hodin (B) a 48 hodin (C) po ovlivnění. Následně byla jádra buněk obarvena DAPI a provedena analýza buněčného cyklu. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky významné rozdíly hodnot v porovnání s kontrolou jsou hladině významnosti $p < 0,05$ označeny *, $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

6.4.1 Vliv sirného peritru na buňky synchronizované v S fázi

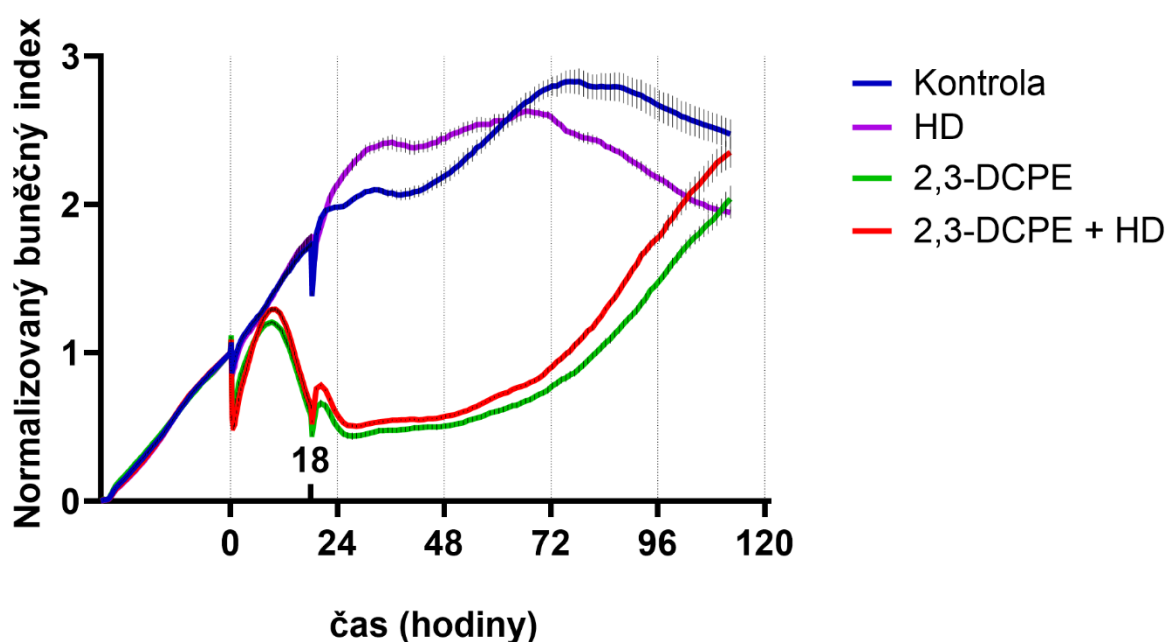
Na základě předchozích výsledků byly buňky HaCaT synchronizovány účinkem 2,3-DCPE v koncentraci 0,63 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 18 hodin. Ve třech paralelních experimentech byla zkoumána životaschopnost buněk (I.), změny ve fázi S buněčného cyklu (II.) a aktivita syntézy DNA *de novo* metodou inkorporace BrdU (III.).

I. Životaschopnost buněk HaCaT

Buňky HaCaT byly ovlivněny 2,3-DCPE o koncentraci 80 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 18 hodin. Došlo tak k synchronizaci buněk ve fázi S. Zelená křivka na obrázku č. 19 pak ukazuje vliv 2,3-DCPE

na buněčnou viabilitu během přítomnosti této látky. Po odstranění inhibice buněčného cyklu a ustálení podmínek následovala asi 24 hodin trvající fáze zástavy proliferace. Po této periodě je patrný postupný vzestup křivky naznačující obnovu množení buněk.

Pokud byly takto synchronizované buňky ovlivněny HD o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ byl pozorován téměř identický trend jako u buněk uvolněných z bloku v S fázi (Obr. 19, červená křivka).

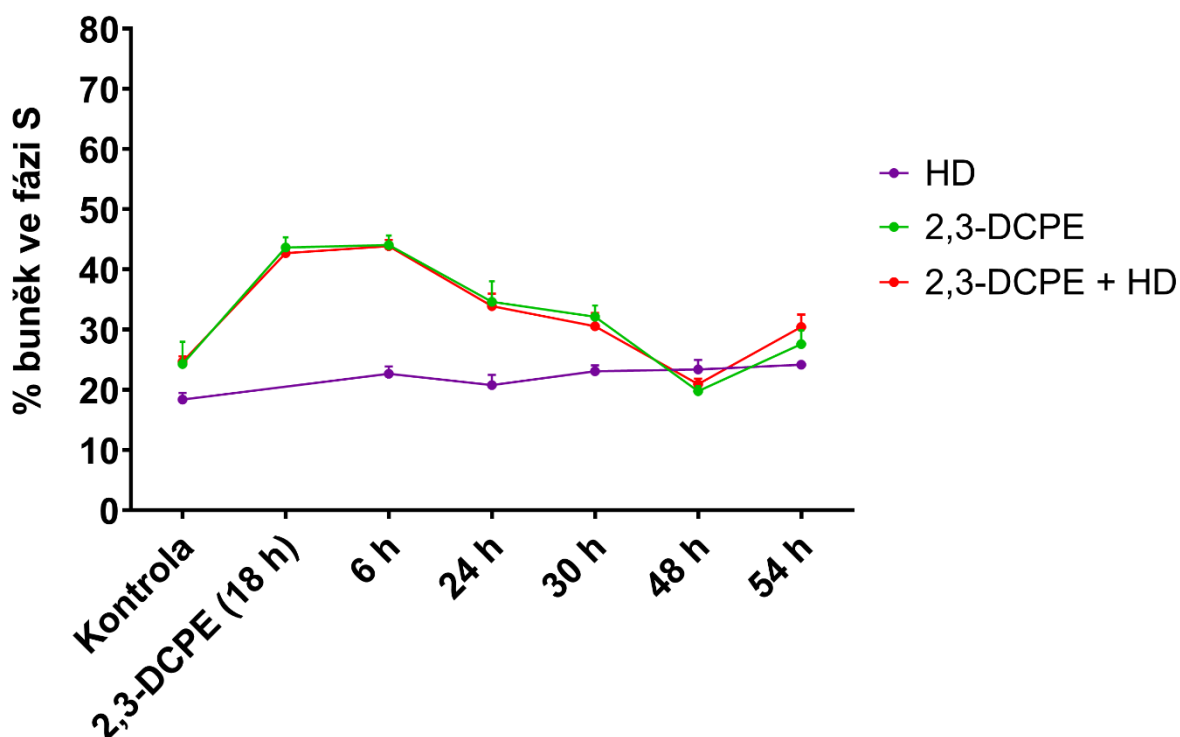


Obr. 19 Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase. Buňky HaCaT byly nasazeny do mikrotitrační destičky e-plate a v čase 0 byl přidán inhibitor 2,3-DCPE o koncentraci $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 18 hodin. Po inkubaci následovala výměna média a buňky byly ovlivněny sirtým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (čas 18 hodin). Následovalo monitorování buněčné viability po dobu 4 dnů. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 replikátů.

II. Změny v S fázi cyklu u synchronizovaných buněk

Populace buněk HaCaT synchronizovaných v S fázi cyklu byla uvolněna z bloku výměnou média (Obr. 20, zelená křivka). V intervalech 6, 24, 30 a 48 hodin pak následoval pokles a v čase 54 hodin mírné zvýšení hodnot oproti synchronizované kontrole v čase 0 (Obr. 20, bod zelené křivky „2,3-DCPE (18 h)“). Předmětem statistické analýzy však bylo zjistit signifikantní rozdíl mezi buňkami HaCaT, které byly po synchronizaci uvolněny z bloku v S fázi cyklu (Obr. 20, zelená křivka) a buňkami, které byly navíc ještě

ovlivněny HD (Obr. 20, červená křivka). Statisticky významné rozdíly však nebyly zaznamenány v žádném ze sledovaných časových intervalů.



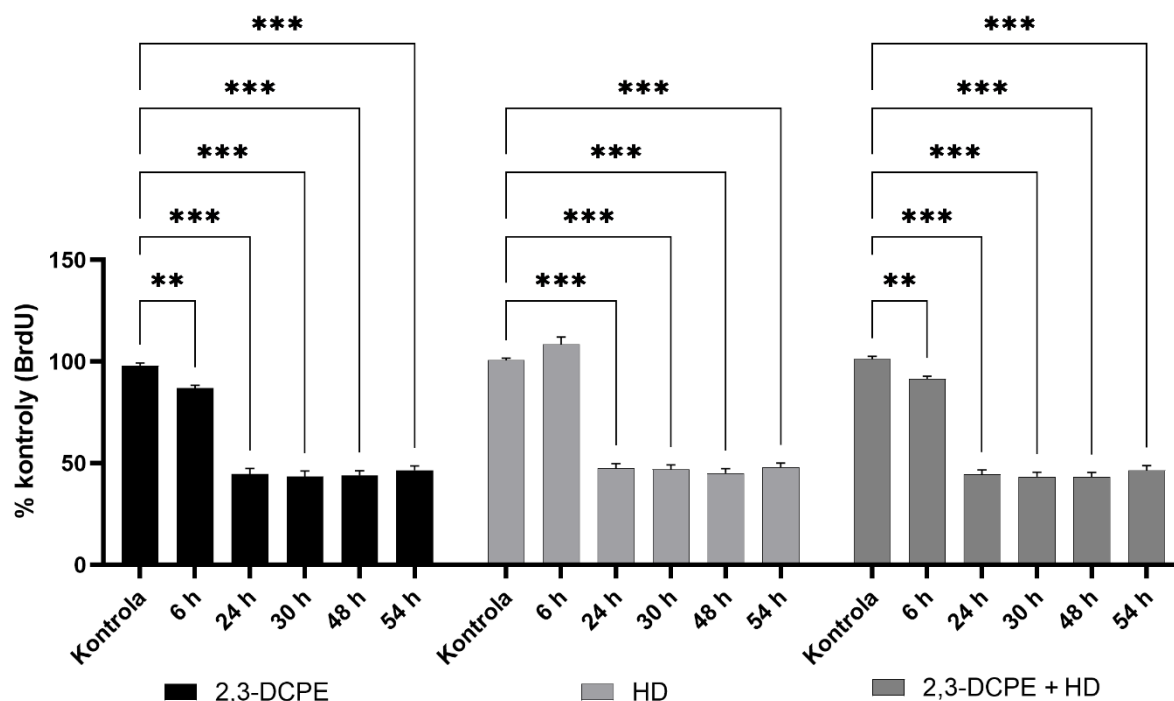
Obr. 20 Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v S fázi cyklu se sirným yperitem. Buňky HaCaT byly synchronizovány po dobu 18 hodin inkubací s 2,3-DCPE o koncentraci $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Následovala výměna média a ovlivnění buněk sirným yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky postupně fixovány v uvedených časech. Následovalo barvení buněčných jader DAPI a analýza fluorescence. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu.

III. Inkorporace BrdU

U buněk uvolněných z bloku v S fázi (Obr. 21, černé sloupce) byl nalezen statisticky významný pokles míry inkorporace BrdU v porovnání s kontrolou. Po 6 hodinách došlo k signifikantnímu snížení hodnot o 11 %, po 24 h o 53,2 %, po 30 h o 54,5 %, po 48 h o 53,9 % a po 54 h o 51,3 %.

Buňky HaCaT ovlivněné pouze HD zpomalily inkorporaci BrdU, což vedlo k signifikantnímu poklesu hodnot v porovnání s kontrolou (Obr. 21, světle šedé slupce). Po 24 hodinách byl zjištěn pokles o 53,4 %, po 30 h o 53,8 %, po 48h o 55,7 % a po 54 h o 52,8 %.

U synchronizovaných buněk, které byly následně ovlivněny HD, došlo ke statisticky významnému poklesu v čase 6 h o 9,9 %, po 24 h o 56,9 %, po 30 h o 58 %, po 48 h o 58,1 % a po 54 h o 52,8 % vzhledem ke kontrole.

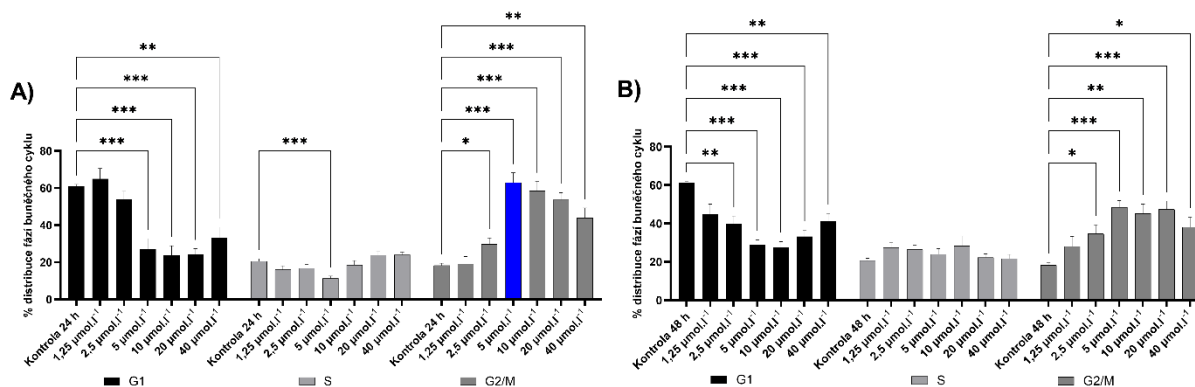


Obr. 21 Inkorporace BrdU u buněk HaCaT. Buňky byly synchronizované v S fázi cyklu inkubací s 2,3-DCPE o koncentraci $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (černé sloupce). Paralelně byly nesynchronizované buňky ovlivněny sirtiným yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (světle šedé sloupce). Ve třetím paralelním experimentu byly synchronizované buňky ovlivněny sirtiným yperitem (tmavě šedé sloupce). Dvě hodiny před uplynutím sledovaného intervalu byl k buňkám přidán roztok BrdU v médiu. V uvedených časech byly buňky fixovány a poté následovala imunochemická detekce inkorporovaného BrdU. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole je na hladině významnosti $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

6.5 Optimalizace podmínek pro synchronizaci buněk ve fázi G2/M

Buňky HaCaT byly ovlivněny koncentrační řadou inhibitoru RO-3306 v rozmezí $1,25$ až $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Fixace buněk a analýza buněčného cyklu byla provedena v intervalech 24 hodin a 48 hodin po ovlivnění. Cílem synchronizace bylo získat co největší populaci buněk, která se v daný čas a pod vlivem dané koncentrace RO-3306 nachází ve fázi G2/M. Po 24 hodinách bylo zjištěno největší množství buněk ve fázi G2/M u koncentrace $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 22, A). V porovnání s kontrolou se jedná o 44% navýšení. Ostatní statisticky významné rozdíly byly vždy nižší než tato hodnota.

Prodloužení inkubace na celkem 48 hodin nepřineslo už další zvětšení populace buněk v G2/M fázi a nejvyšší signifikantní rozdíl oproti kontrole činil při koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ 30,2 % (Obr. 22, B).

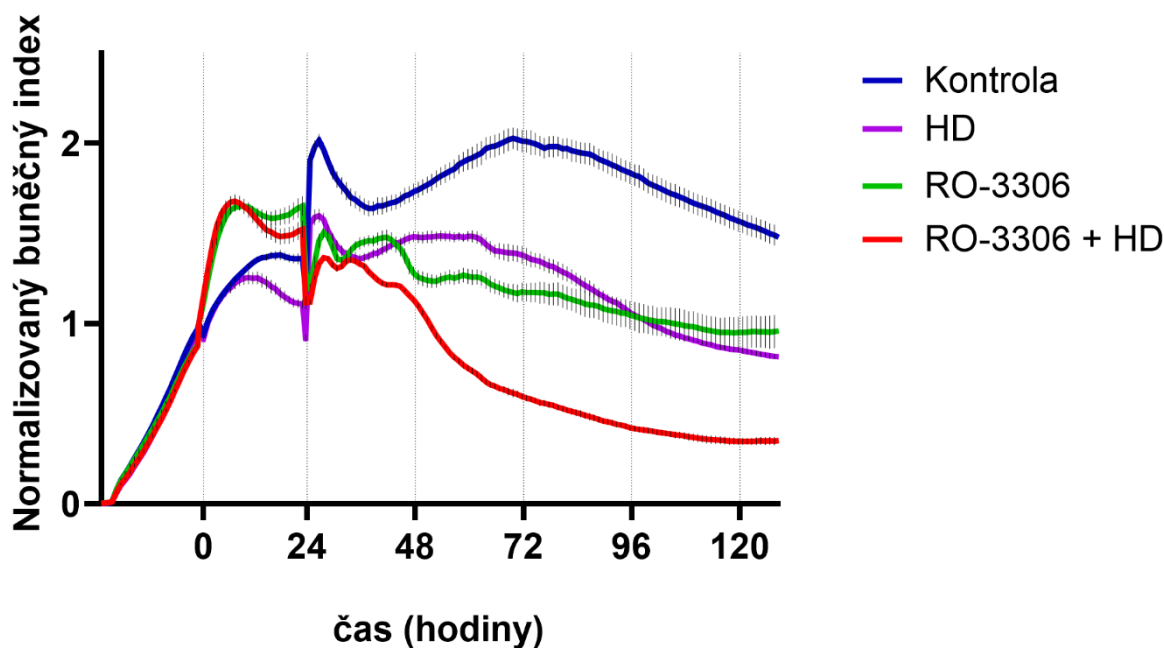


Obr. 22 Optimalizace synchronizace buněk HaCaT ve fázi G2/M. Buňky byly ovlivněny koncentrační řadou inhibitoru RO-3306 v rozmezí 1,25 až 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Buňky byly fixovány po 24 hodinách (A) a po 48 hodinách (B) od ovlivnění RO-3306. Po obarvení buněčných jader DAPI byl analyzován buněčný cyklus. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky významné rozdíly hodnot v porovnání s kontrolou jsou na hladině významnosti $p < 0,05$ označeny *, $p < 0,01$, ** a $p < 0,001$, ***.

6.5.1 Vliv sirného yperitu na buňky synchronizované ve fázi G2/M

I. Životaschopnost buněk HaCaT

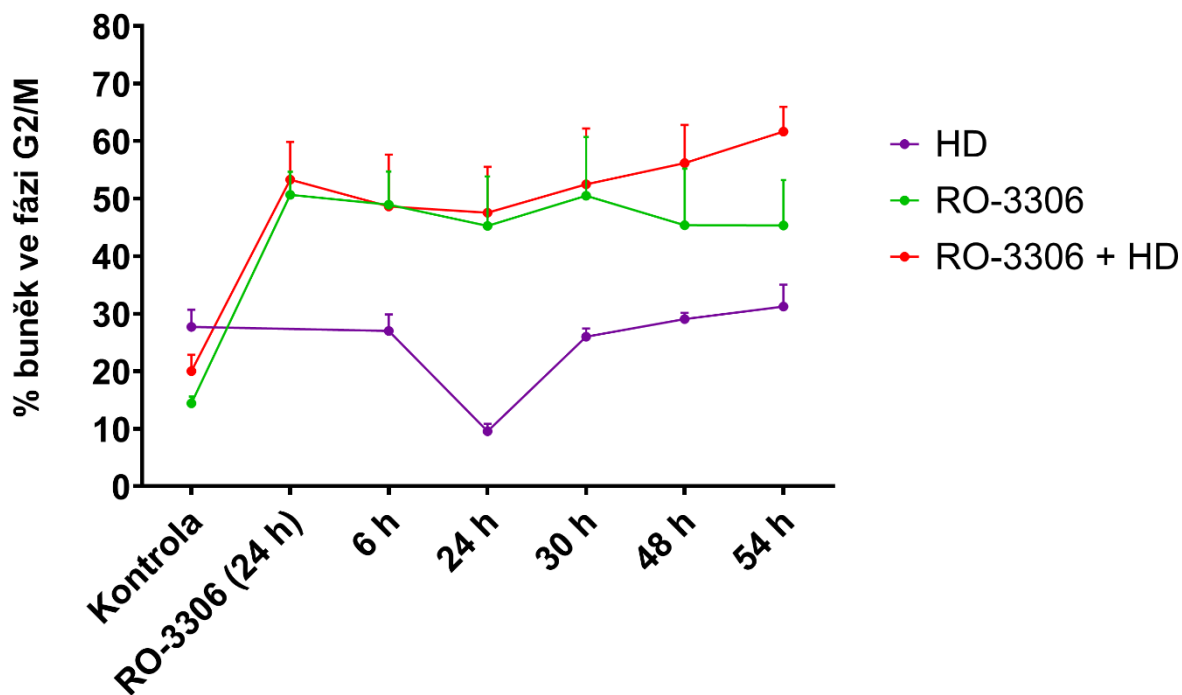
Viabilita buněk HaCaT synchronizovaných ve fázi G2/M působením RO-3306 o koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a době inkubace 24 hodin byla měřena elektroimpedanční metodou (Obr. 23, zelená křivka). Během 24hodinové inkubace je patrný rychlý vzestup křivky, který po dosažení maxima setrvává v konstantní fázi až do uvolnění bloku výměnou kultivačního média. Po odstranění RO-3306 a ustálení signálu je patrný pokles po dobu 96 hodin od uvolnění bloku, kdy byl experiment ukončen. Pokud byly takto synchronizované buňky následně ovlivněny HD, došlo k výraznému poklesu životaschopnosti buněk po 24 hodinách od ovlivnění (Obr. 23, červená křivka).



Obr. 23 Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase. Buňky HaCaT byly nasazeny do mikrotitrační destičky e-plate a v čase 0 byl přidán inhibitor RO-3306 o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ po dobu 24 hodin. Po inkubaci následovala výměna média a buňky byly ovlivněny sirtým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (čas 24 hodin). Následovalo monitorování buněčné viability po dobu 4 dnů. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 4 replikátů.

II. Změny v G2/M fázi cyklu u synchronizovaných buněk

Populace buněk HaCaT synchronizovaných ve fázi G2/M (Obr. 24, zelená křivka) nevykazovala po odstranění inhibitoru výrazné změny. Podobně tomu bylo i u synchronizovaných buněk, které byly následně ovlivněny HD (Obr. 24, červená křivka). Ani v tomto případě neodhalila statistická analýza signifikantní rozdíl mezi populací buněk uvolněných z bloku v G2/M fázi cyklu a buněk, které byly za těchto podmínek následně ovlivněny HD.



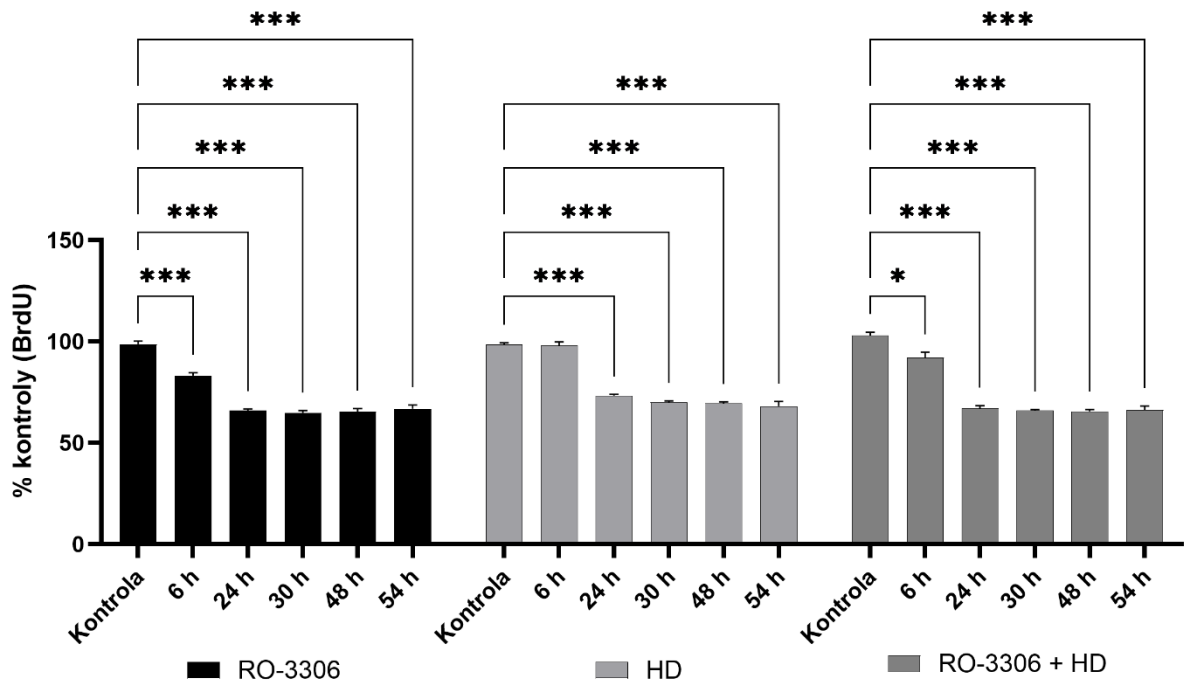
Obr. 24 Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v G2/M fázi cyklu s HD. Buňky HaCaT byly synchronizovány po dobu 24 hodin inkubací s RO-3306 o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Následovala výměna média a ovlivnění buněk sirtým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky postupně fixovány v uvedených časech. Následovalo barvení buněčných jader DAPI a analýza fluorescence. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu.

III. Inkorporace BrdU

Uvolnění buněk HaCaT z bloku v G2/M fázi (Obr. 25, černé sloupce) vedlo ke statisticky významnému poklesu inkorporace BrdU v porovnání s kontrolou. V čase 6 h byl pokles hodnot o 15,5 %, po 24 h o 32,7 %, po 30 h o 33,7 %, po 48 h o 33,2 % a po 54 h o 31,9 %.

Ovlivnění buněk HD vedlo k poklesu inkorporace BrdU po 24 h o 25,2 %, po 30 h o 28,5 %, po 48 h o 29, % a po 54 h o 30,4 % v porovnání s kontrolou (Obr. 25, světle šedé sloupce).

Buňky uvolněné z bloku v G2/M fázi a následně ovlivněné HD také zpomalily míru inkorporace BrdU. Vzhledem ke kontrole došlo v intervalu 6 hodin k poklesu o 10,9 %, po 24 h o 36 %, po 30 h o 37 %, po 48 h o 37,4 % a po 54 h o 36,8 % (Obr. 25, tmavě šedé sloupce).



Obr. 25 Inkorporace BrdU u buněk HaCaT. Buňky byly synchronizované v G2/M fázi cyklu inkubací s RO-3306 o koncentraci $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (černé sloupce). Paralelně byly nesynchronizované buňky ovlivněny sirtým yperitem o koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (světle šedé sloupce). Ve třetím paralelním experimentu pak byly synchronizované buňky ovlivněny sirtým yperitem (tmavě šedé sloupce). Dvě hodiny před uplynutím sledovaného intervalu byl k buňkám přidán roztok BrdU v médiu. V uvedených časech byly buňky fixovány a poté následovala imunochemická detekce inkorporovaného BrdU. Výsledky vyjadřují průměr \pm SEM vypočítaný ze 3 nezávislých experimentů provedených v duplikátu. Statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrole je na hladině významnosti $p < 0,5$, * a $p < 0,001$, ***.

7 Diskuse

Kompletní průběh buněčného cyklu, kterým končí a zároveň začíná buněčné dělení, je závislý na bezchybném templátu DNA, který má být replikován a předán do dceřiných buněk. Zároveň musí být funkční veškeré regulační a kontrolních mechanismy, které umožňují hladký průchod cyklu přes jednotlivé fáze.

Toxický účinek HD působí na buňku hned několika mechanismy. Zásah do metabolismu nukleových a ribonukleových kyselin má ale na další osud buňky rozhodující dopad. Alkylace DNA narušuje její přirozenou vlastnost denaturace a renaturace, kterou umožňuje komplementarita bází. Může se jednat o DNA adukty nebo příčné meziřetězcové či vnitřetězcové kovalentní vazby. To vše brání plynulému průběhu replikace DNA během interfáze a následnému rozdělení genetického materiálu do vznikajících dceřiných buněk při mitóze. HD tak zásadním způsobem zasahuje do buněčného cyklu a tím i do rychlosti proliferace buněk.

Experimentální cíle této práce jsou proto zaměřeny na sledování cytostatického účinku HD, jeho dopadu na buněčný cyklus a životaschopnost buněk. Dále byla studována senzitivita buněk synchronizovaných ve fázi buněčného cyklu G1, S a G2/M ve vztahu k současně indukovanému alkylačnímu poškození DNA HD.

Kůže tvoří souvislý, pevný a zároveň pružný povrch lidského těla a je složena z několika vrstev. Keratinocyty jsou majoritními buňkami *epidermis*, tedy nejsvrchnější vrstvy kůže, která přichází do kontaktu se zevním prostředím. V případě expozice HD jsou tak tyto buňky poškozeny jako první. Buňky HaCaT jsou lidské keratinocyty, které byly spontánně immortalizovány a nejedná se tedy o buňky nádorového původu (Boukamp et al. 1988). Lze je tedy neomezeně kultivovat *in vitro* a jsou často používaným modelem pro studie spojené toxickým účinkem látek na kůži (Macário et al. 2019; Choudhary et al. 2021; McLean et al. 2024).

Výsledky monitorování viability buněk HaCaT ovlivněných HD ukazují, že mezi cytotoxickým a cytostatickým účinkem existuje velmi úzká hranice. Abychom našli koncentraci HD, která působí cytostaticky, byly testovány koncentrace v řádu jednotek $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD (Obr. 12). Zcela odlišné elektroimpedanční křivky viability buněk, která byla monitorována na principu měření míry buněčné adheze k měřícím elektrodám, poskytují koncentrace HD 0,5; 2 a 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Dle tvaru křivky lze u koncentrace 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ HD

usuzovat, že přítomnost minoritního poškození buňky má spíše stimulační efekt na buněčný růst. Podle zvyšující se hodnoty buněčného indexu může být tento efekt spojený jednak s intenzivnější proliferací, ale zároveň i s vyšší adhezí buněk k podkladu. Další možností je i změna tvaru buňky, což má za následek větší zakrytí detekční plochy elektrod a zvýšení impedance při průchodu měřicího proudu. Podobný účinek byl například zaznamenán při působení těžkých kovů na buněčné linie. Ionty olova v koncentracích nižších než $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ stimulují proliferaci buněk HepG2 a LS-174T (Kopp et al. 2018).

Koncentrace $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD způsobila takovou míru poškození DNA, která již nebyla slučitelná s další možností proliferace buněk. Z tvaru křivky je zřejmé, že přibližně po 34 hodinách muselo dojít ke kumulaci poškození, které mělo za následek zástavu cyklu. Tuto přechodnou fázi kumulace dokládá i zvětšení populace buněk v G1 fázi v intervalu 24 hodin od ovlivnění HD (Obr. 13, A). To může být způsobeno reakcí sensorického proteinu ATM na poškození DNA, následnou fosforylací proteinu p53, který prostřednictvím p21Cip1/Waf1 inhibuje vznik komplexu cyklin-CDK2 a tím je indukována zástava cyklu v kontrolním bodu G1/S (Laiho a Latonen 2003). V dalších časových intervalech naše výsledky ukazují konstantní stav, kdy u ovlivněných buněk nedošlo k žádné signifikantní změně v distribuci jednotlivých fází buněčného cyklu. Podobný průběh buněčného cyklu je popsán i u buněk A549 ovlivněným dusíkatým analogem yperitu (HN2) (Jan et al. 2019). Při koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HN2 došlo k navýšení populace buněk v G1 fázi v čase 24 hodin, ale po 30 hodinách následoval pokles hodnot.

Cytotoxické účinky HD se pak projeví s dalším zvýšením jeho koncentrace. Už při pouhém zvýšení koncentrace o $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD, tedy na $3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD, se zcela změnil charakter křivky viability a po 34. hodině následoval pokles hodnot buněčného indexu, který reflektuje ztrátu životaschopnosti buněk. Dle pozvolného poklesu lze soudit, že byly aktivovány apoptotické mechanismy buněčné smrti, které nezpůsobí okamžitou destrukci buňky. Ta by se na křivce projevila okamžitým poklesem hodnoty buněčného indexu, jako je tomu vidět na příkladu použitého blanku, kde byly buňky lyzovány účinkem detergentu SDS (Obr. 12, šedá křivka).

Koncentrace $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD pak už opisuje podobný trend poklesu jako předchozí koncentrace, ale s prohloubením toxického účinku. Na druhou stranu výsledky buněčného cyklu ukazují velmi podobný profil jako u koncentrace $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD, což opět může naznačovat jeho kompletní inhibici vlivem nadměrného poškození DNA, které iniciuje zánik buňky. Pro další

experimentální práci byla tedy zvolena koncentrace $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ jako koncentrace s převažujícím cytostatickým účinkem na buňky HaCaT nad účinkem cytotoxickým.

HD ve vodném prostředí podléhá hydrolytickému rozkladu a s tím i související ztrátě cytotoxického účinku. Například koncentrace HD $40 \mu\text{mol.l}^{-1}$ je schopna indukovat poškození DNA po dobu přibližně 20 minut (Jost et al. 2015). HD tedy není přítomen v kultivačním médiu po celou dobu inkubace v aktivní formě a v našem případě se tedy jedná o počáteční iniciační koncentraci HD, který s postupem času podléhá hydrolytickému rozkladu.

Pro jednotlivé fáze buněčného cyklu jsou charakteristické procesy, kterými se buňka připravuje na další dělení. V následující části experimentální práce bylo cílem synchronizovat buněčný cyklus tak, abychom získali co nejvíce buněk v konkrétní fázi buněčného cyklu a otestovat senzitivitu synchronizovaných buněk vůči cytostatické koncentraci HD.

K synchronizaci buněk HaCaT ve fázi G1 byla použita látka s označením LY2835219. Jedná se o inhibitor kináz CDK4 a CDK6, které pak nemohou vytvořit aktivní komplex s cyklinem D1, který umožňuje následnou fosforylaci pRb proteinu. Tím je indukována zástava cyklu v G1 fázi (Gelbert et al. 2014). Při optimalizaci experimentálních podmínek synchronizace bylo zjištěno, že v obou testovaných intervalech 24 a 48 hodin, došlo ke zmenšování populace buněk ve fázi G1 v závislosti na zvyšující se koncentraci LY2835219. Při nejvyšší koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ LY2835219 pak bylo zaznamenáno snížení počtu hodnocených buněk v důsledku cytotoxické koncentrace inhibitoru. Proto byla zvolena koncentrace $0,63 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a inkubační doba 24 hodin. Za těchto podmínek se nacházelo v G1 fázi cyklu 85,4 % buněk. Podobného výsledku synchronizace cyklu bylo dosaženo i na buňkách MV4-11 (akutní myeloidní leukemie), kde submikromolární koncentrace LY2835219 vedly po 24 hodinách ke kumulaci buněk v G1 fázi s účinností až 94 % (Gelbert et al. 2014). Pomalejší proliferace buněk HaCaT a s tím i související delší průběh buněčného cyklu mohou být příčinou nižší výtěžnosti synchronizace než je tomu u MV4-11. Na druhou stranu bylo třeba zohlednit udržení dostatečné životaschopnosti buněk pro navazující experiment.

Buňky synchronizované ve fázi G1 byly z tohoto bloku uvolněny odstraněním inhibitoru (výměnou kultivačního média) a následně ovlivněny $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ HD. Experiment byl pak sledován v 5 časových intervalech po dobu 56 hodin. Viabilita buněk HaCaT uvolněných z bloku v G1 fázi kopírovala trend negativní kontroly (Obr. 15). Ovšem u buněk, které byly následně ovlivněny HD, byl pozorován konstantní a téměř rovnoběžný průběh křivky buněčného indexu s osou x v intervalu 48 až 120 hodin. Začátek tohoto časového úseku

odpovídá intervalu 24 hodin od uvolnění bloku G1/ovlivnění HD. Na grafu (Obr. 16) je pak zřejmé, že zastavení cyklu je provázeno poklesem velikosti populace buněk v G1 fázi. Tento stav pak reflektuje i pokles syntézy DNA od 24. hodiny dále (Obr. 17). Porovnáním experimentů s buňkami uvolněných z G1 bloku, ovlivněných HD a po kombinaci obou zásahů není možné určit, zda má na pokles syntézy DNA jednoznačný vliv ovlivnění buněk LY2835219 a nebo HD, protože nedochází k sumaci ani potenciaci efektu HD na synchronizovaných buňkách.

Inhibitorem 2,3-DCPE bylo u buněk HaCaT dosaženo synchronizace buněčného cyklu v S fázi. Tato molekula působí aktivaci dráhy ATM/ATR-CHK1-Cdc25A, která je odpovědí na poškození buněčné DNA a vede tedy k zástave buněčného cyklu v S fázi. To poskytuje buňce jisté časové období pro zajištění reparace poškození (Bai et al. 2020; Sørensen et al. 2003).

Při optimalizaci synchronizace buněk HaCaT bylo zjištěno, že látka 2,3-DCPE působí zvětšení populace buněk v S fázi se zvyšující se koncentrací 2,3-DCPE. Výrazný efekt však měla i doba inkubace, která musela být zkrácena, z původně studovaných intervalů 24 a 48 hodin, na 18 hodin. V tomto čase pak byla získána synchronizovaná populace, která tvořila 51,6 % analyzovaných buněk. Tyto buňky byly ovlivněny koncentrací $80 \mu\text{mol.l}^{-1}$ 2,3-DCPE. Pro porovnání, na nádorových buňkách střeva DLD-1 bylo dosaženo kumulace buněk v S fázi 76,6 % při stejném časovém intervalu, tedy 18 hodin, ale při koncentraci $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Bai et al. 2020). Rozdílnost výsledku může opět souviset s rozdílným typem buněk nejen dle tkáňového původu, ale dle charakteru - nádorové buňky DLD-1 a imortalizované buňky HaCaT.

Synchronizace buněk ukazuje při elektroimpedanční analýze přechodnou změnu, kdy během 18 hodin od přidání 2,3-DCPE došlo k rychlému nárůstu hodnot s maximem, po 9 hodinách inkubace, a následnému poklesu na počáteční hodnotu buněčného indexu. Oproti kontrole je zde patrné značné potlačení růstu buněk. Po 18 hodinách následovalo ovlivnění synchronizovaných buněk HD. Statisticky významné rozdíly mezi synchronizovanými buňkami a buňkami dodatečně ovlivněnými HD nebyly zjištěny. Stejný trend vykazují i výsledky buněčného cyklu, kde nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi oběma populacemi buněk v S fázi. Na druhou stranu byl ale pozorován vzestup hodnot buněčného indexu, který poukazuje na obnovu buněčné proliferace. Děje se tak zhruba po 48 hodinách po přidání HD, což dokumentuje i pokles populace buněk v S fázi v tomto čase, což značí návrat k hodnotám srovnatelných se stavem před synchronizací. Zvýšení buněčné proliferace v pozdějších

časových intervalech je spojeno s intenzivnější syntézou DNA. V našich měřeních se nám však nepodařilo tento jev zachytit.

Synchronizace buněk ve fázi G2/M byla provedena inkubací buněk HaCaT s látkou RO-3306. RO-3306 je inhibitor komplexu CDK1/cyklin B1 s více než desetinásobnou selektivitou k CDK1 oproti CDK2. Aktivita CDK1 je esenciální pro vstup buněk do mitózy a tak tento inhibitor zastavuje buněčný cyklus na rozhraní G2 a M fáze. Výhodou je reverzibilní způsob inhibice, který po odstranění inhibitoru umožňuje vstup buněk do fáze mitózy během 30 až 60 minut (Vassilev 2006; Sunada et al. 2021). Jako optimální byla nalezena koncentrace $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ RO-3306 a inkubační doba 24 hodin. Za těchto podmínek byla získána populace o velikosti 62,9 % buněk ve fázi G2/M. Velmi podobného výsledky bylo za identických podmínek jako v našem experimentu, dosaženo i na jaterních nádorových buňkách HepG2 (Aleem et al. 2015).

RO-3306 inhibuje reparační mechanismy, které jsou za běžných podmínek aktivní v G2 fázi, aby se předešlo chybné distribuci replikovaných sad chromozomů do dceřiných buněk (Sunada et al. 2021). Když byly takto synchronizované buňky vystaveny alkylačnímu poškození HD, došlo přibližně po 24 hodinách k poklesu viability, oproti buňkám, které byly uvolněny z G2/M bloku. Protože po odstranění inhibice CDK1 pokračují buňky do mitózy je tato fáze náchylná k poškození DNA, zejména typu DSB a SSB (Sunada et al. 2021; Liao et al. 2017). Tyto změny se ovšem statisticky významně neprojeví v distribuci buněk ve fázi G2/M, které byly uvolněny z bloku a buněk které byly následně ovlivněny HD. Rovněž nebyla pozorována změna v syntéze DNA, která je ale ovšem více specifickým dějem pro S fázi cyklu (Buck et al. 2008).

Reakce synchronizovaných buněk na alkylační poškození byla v našich experimentech z pohledu distribuce fází buněčného cyklu a syntézy DNA statisticky nevýznamná. Možnou příčinou může být příliš nízká koncentrace HD, která sice působila cytostaticky, ale k vyvolání signifikantní odpovědi na poškození nemusela být dostatečná. Nízké koncentrace alkylačních látek, jako je například i dusíkatý analog HD HN2 vyvolávají v nízkých koncentracích změny na úrovni buněčné signalizace, ale nepůsobí dostatečnou modifikaci DNA (Jan et al. 2019). Rovněž zde může mít i vliv působení inhibitorů použitých při synchronizaci, které svým mechanismem účinku zasahují do buněčného cyklu (Villedieu et al. 2007). V našich experimentech bylo alkylační poškození indukováno ihned po odstranění inhibitoru. Pokud bychom po odstranění inhibitoru zařadili do protokolu například hodinový interval, sloužící

k regeneraci a obnově všech signálních drah potřebných k průchodu buňky do další fáze cyklu, mohlo by to ovlivnit naše výsledky.

Poznání cytostatických účinků HD v závislosti na poškození buněk v určité fázi buněčného cyklu je zásadní pro porozumění vývoje dynamiky poškození DNA a jeho dopadů na další přežití buňky. Tyto poznatky pak mohou přispět ke zlepšení strategie léčebných postupů při expozici zpuchýřujícími bojovými chemickými látkami.

8 Závěr

HD je vysoce toxickou látkou a jeho cytostatický účinek se projevuje pouze ve velmi nízkých koncentracích, v řádu jednotek $\mu\text{mol.l}^{-1}$. V našich experimentech jsme cytostatický účinek HD našli při koncentraci $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$, který přetrvává až 3 dny po ovlivnění buněk. Nižší, submikromolární koncentrace měly stimulační efekt na proliferaci buněk, vyšší koncentrace HD naopak působily již cytotoxicky.

Dále jsme se v práci zaměřili na indukci alkylačního poškození u buněk synchronizovaných ve fázi buněčného cyklu G1, S a nebo G2/M. Pokud bylo poškození indukováno v G1 fázi, došlo k poklesu viability buněk až po 48 hodinách za současného poklesu % buněk v G1 fázi. Ve fázi S jsme překvapivě nenašli žádný signifikantní vliv alkylačního poškození na synchronizované buňky, jak na úrovni viability, tak i buněčného cyklu. Nejvýraznější vliv na viabilitu buněk ovlivněných HD byl ve fázi G2/M, přestože na úrovni buněčného cyklu nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl.

Senzitivita synchronizovaných buněk k alkylačnímu poškození byla na základě změny viability nalezena ve fázi G2/M. Reakce synchronizovaných buněk na alkylační poškození nebyla v našich experimentech z pohledu reakce buněčného cyklu a syntézy DNA statisticky významná. Možnou příčinou může být příliš nízká koncentrace HD, která sice působila cytostaticky, ale k vyvolání signifikantní odpovědi na poškození DNA, která by se projevila v našich testech, nemusela být dostatečná.

9 Literatura

ALEEM, Eiman, Margherita BADIN, Ahmed WARAKY a Olle LARSSON, 2015. The cdk1 inhibitor ro-3306 modulates the expression of cell cycle inhibitory and apoptotic genes. *The egyptian journal of experimental biology (Zoology)*. **7**(2), 271–271. ISSN 2090-0511.

ASHMORE, Matthew Howard a C. Paul NATHANAIL, 2008. A critical evaluation of the implications for risk based land management of the environmental chemistry of Sulphur Mustard. *Environment International* [online]. **34**(8), 1192–1203. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2008.03.012

BAI, Bingjun, Lina SHAN, Jianhong WANG, Jinhui HU, Wenqian ZHENG, Yiming LV, Kangke CHEN, Dengyong XU a Hongbo ZHU, 2020. Small molecule 2,3-DCPE induces S phase arrest by activating the ATM/ATR-Chk1-Cdc25A signaling pathway in DLD-1 colon cancer cells. *Oncology Letters* [online]. **20**(6), 294. ISSN 1792-1074. Dostupné z: doi:10.3892/ol.2020.12157

BALALI-MOOD, Mahdi a Mehrdad HEFAZI, 2006. Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. **99**(4), 273–282. ISSN 1742-7843. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_429.x

BARNUM, Kevin J. a Matthew J. O'CONNELL, 2014. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1170**, 29–40. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2

BEIGI HARCHEGANI, Asghar, Mahdiyeh MIRNAM NIHA, Milad SOHRABIYAN, Mahdi GHATREHSAMANI, Eisa TAHMASBPOUR a Alireza SHAHRIARY, 2018. Cellular and molecular mechanisms of sulfur mustard toxicity on spermatozoa and male fertility. *Toxicology Research* [online]. **7**(6), 1029–1035. ISSN 2045-452X. Dostupné z: doi:10.1039/c8tx00062j

BORAK, Jonathan a Frederick R SIDELL, 1992. Agents of chemical warfare: Sulfur mustard. *Annals of Emergency Medicine* [online]. **21**(3), 303–308. ISSN 0196-0644. Dostupné z: doi:10.1016/S0196-0644(05)80892-3

BOUKAMP, P., R. T. PETRUSSEVSKA, D. BREITKREUTZ, J. HORNUNG, A. MARKHAM a N. E. FUSENIG, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* [online]. **106**(3), 761–771. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.106.3.761

BUCK, Suzanne B., Jolene BRADFORD, Kyle R. GEE, Brian J. AGNEW, Scott T. CLARKE a Adrian SALIC, 2008. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *BioTechniques* [online]. **44**(7), 927–929. ISSN 0736-6205. Dostupné z: doi:10.2144/000112812

EASTMAN, Anna E. a Shangqin GUO, 2020. The palette of techniques for cell cycle analysis. *FEBS Letters* [online]. **594**(13), 2084–2098. ISSN 1873-3468. Dostupné z: doi:10.1002/1873-3468.13842

FOWLER, Samantha, Rebecca ROUSH a James WISE, 2013. *6.2 The Cell Cycle - Concepts of Biology | OpenStax* [online]. B.m.: OpenStax [vid. 2024-02-01]. Dostupné z: <https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/6-2-the-cell-cycle>

GANESAN, K., S. K. RAZA a R. VIJAYARAGHAVAN, 2010. Chemical warfare agents. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. **2**(3), 166–178. ISSN 0976-4879. Dostupné z: doi:10.4103/0975-7406.68498

GELBERT, Lawrence M., Shufen CAI, Xi LIN, Concepcion SANCHEZ-MARTINEZ, Miriam DEL PRADO, Maria Jose LALLENA, Raquel TORRES, Rose T. AJAMIE, Graham N. WISHART, Robert Steven FLACK, Blake Lee NEUBAUER, Jamie YOUNG, Edward M. CHAN, Philip IVERSEN, Damien CRONIER, Emiko KREKLAU a Alfonso DE DIOS, 2014. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Investigational New Drugs* [online]. **32**(5), 825–837. ISSN 1573-0646. Dostupné z: doi:10.1007/s10637-014-0120-7

GHABILI, Kamyar, Paul S. AGUTTER, Mostafa GHANEI, Khalil ANSARIN, Yunes PANAHI a Mohammadali M. SHOJA, 2011. Sulfur mustard toxicity: History, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. **41**(5), 384–403. ISSN 1040-8444, 1547-6898. Dostupné z: doi:10.3109/10408444.2010.541224

HUMANS, IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to, 2012. SULFUR MUSTARD. In: *Chemical Agents and Related Occupations* [online]. B.m.: International Agency for Research on Cancer [vid. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304425/>

CHOUDHARY, Indu, Duhyeon HWANG, Jinho CHAE, Wonduk YOON, Changkeun KANG a Euikyung KIM, 2021. Proteomic Changes during the Dermal Toxicity Induced by Nemopilema nomurai Jellyfish Venom in HaCaT Human Keratinocyte. *Toxins* [online]. **13**(5), 311. ISSN 2072-6651. Dostupné z: doi:10.3390/toxins13050311

JACKMAN, Joany a Patrick M. O'CONNOR, 1998. Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. **00**(1) [vid. 2023-10-29]. ISSN 1934-2500, 1934-2616. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb0803s00

JAN, Yi-Hua, Diane E. HECK, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2019. Sulfur Mustard Analog Mechlorethamine (Bis(2-chloroethyl)methylamine) Modulates Cell Cycle Progression via the DNA Damage Response in Human Lung Epithelial A549 Cells. *Chemical Research in Toxicology* [online]. **32**(6), 1123–1133. ISSN 0893-228X, 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00417

JAN, Yi-Hua, Diane E. HECK, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2020. DNA damage signaling in the cellular responses to mustard vesicants. *Toxicology Letters* [online]. **326**, 78–82. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2020.03.008

JOST, Petr, Hana SVOBODOVA a Rudolf STETINA, 2015. Induction and repair of DNA cross-links induced by sulfur mustard in the A-549 cell line followed by a comet assay. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **237**, 31–37. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2015.05.009

KEHE, Kai, Frank BALSZUWEIT, Judith EMLER, Helmut KREPPEL, Marianne JOCHUM a Horst THIERMANN, 2008. Sulfur Mustard Research—Strategies for the Development of Improved Medical Therapy. *Eplasty*. **8**, e32. ISSN 1937-5719.

KOPP, B., D. ZALKO a M. AUDEBERT, 2018. Genotoxicity of 11 heavy metals detected as food contaminants in two human cell lines. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. **59**(3), 202–210. ISSN 1098-2280. Dostupné z: doi:10.1002/em.22157

KRASIKOVA, Yuliya, Nadejda RECHKUNOVA a Olga LAVRIK, 2021. Nucleotide Excision Repair: From Molecular Defects to Neurological Abnormalities. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(12), 6220. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22126220

KROKAN, Hans E. a Magnar BJØRÅS, 2013. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **5**(4), a012583. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012583

KŘÍŽKOVÁ, J. a T. VITVAROVÁ, 2017. 20 let úmluvy o zákazu chemických zbraní. *Chemické listy*. **111**(4), 285–289. ISSN 1213-7103.

LAIHO, Marikki a Leena LATONEN, 2003. Cell cycle control, DNA damage checkpoints and cancer. *Annals of Medicine* [online]. **35**(6), 391–397. ISSN 0785-3890. Dostupné z: doi:10.1080/07853890310014605

LEW, D.J., 2013. Cell Cycle. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 456–464 [vid. 2024-01-13]. ISBN 978-0-08-096156-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00206-0

LIAO, Hongwei, Fang JI, Xinwei GENG, Meichun XING, Wen LI, Zhihua CHEN, Huahao SHEN a Songmin YING, 2017. CDK1 promotes nascent DNA synthesis and induces resistance of cancer cells to DNA-damaging therapeutic agents. *Oncotarget* [online]. **8**(53), 90662–90673. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.21730

LIGASOVÁ, Anna a Karel KOBERNA, 2021. Strengths and Weaknesses of Cell Synchronization Protocols Based on Inhibition of DNA Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(19), 10759. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms221910759

MACÁRIO, I. P. E., H. OLIVEIRA, A. C. MENEZES, S. P. M. VENTURA, J. L. PEREIRA, A. M. M. GONÇALVES, J. a. P. COUTINHO a F. J. M. GONÇALVES, 2019. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Scientific Reports* [online]. **9**(1), 3932. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-019-39910-y

MARSDEN, Carolyn G., Julie A. DRAGON, Susan S. WALLACE a Joann B. SWEASY, 2017. Chapter Six - Base Excision Repair Variants in Cancer. In: Brandt F. EICHMAN, ed. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, DNA Repair Enzymes: Cell, Molecular, and Chemical Biology, s. 119–157 [vid. 2024-01-07]. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mie.2017.03.003

MCLEAN, Polly, Jessica MARSHALL, Amaia GARCÍA-BILBAO, David BEAL, Alberto KATSUMITI, Marie CARRIÈRE a Matthew S. P. BOYLES, 2024. A comparison of dermal toxicity models; assessing suitability for safe(r)-by-design decision-making and for screening

nanomaterial hazards. *Toxicology in Vitro* [online]. **97**, 105792. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2024.105792

MURRAY, Andrew, 1994. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **6**(6), 872–876. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/0955-0674(94)90059-0

NAIR, Ashrit, Pooja YADAV, Amanpreet BEHL, Rakesh Kumar SHARMA, Shweta KULSHRESTHA, Bhupendra Singh BUTOLA a Navneet SHARMA, 2021. Toxic blister agents: Chemistry, mode of their action and effective treatment strategies. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **350**, 109654. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2021.109654

PANAHI, Yunes, Amir FATTAHI, Hamid Reza NEJABATI, Sina ABROON, Zeinab LATIFI, Abolfazl AKBARZADEH a Tohid GHASEMNEJAD, 2018. DNA repair mechanisms in response to genotoxicity of warfare agent sulfur mustard. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **58**, 230–236. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2018.01.012

PLUTA, Aleksandra J., Cécilia STUDNIAREK, Shona MURPHY a Chris J. NORBURY, 2024. Cyclin-dependent kinases: Masters of the eukaryotic universe. *WIREs RNA* [online]. **15**(1), e1816. ISSN 1757-7012. Dostupné z: doi:10.1002/wrna.1816

RAMOS, Eva, Emilio GIL-MARTÍN, Cristóbal DE LOS RÍOS, Javier EGEA, Francisco LÓPEZ-MUÑOZ, René PITA, Antonio JUBERÍAS, Juan J. TORRADO, Dolores R. SERRANO, Russel J. REITER a Alejandro ROMERO, 2023. Melatonin as Modulator for Sulfur and Nitrogen Mustard-Induced Inflammation, Oxidative Stress and DNA Damage: Molecular Therapeutics. *Antioxidants* [online]. **12**(2), 397. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox12020397

SEZIGEN, Sermet, Ruşen EYISON a Levent KENAR, 2019. Bioanalytical verification of sulfur mustard exposure in a Syrian family [online]. **61**, 64. Dostupné z: doi:10.26657/gulhane.00056

SHAKARJIAN, Michael P., Diane E. HECK, Joshua P. GRAY, Patrick J. SINKO, Marion K. GORDON, Robert P. CASILLAS, Ned D. HEINDEL, Donald R. GERECKE, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2010. Mechanisms Mediating the Vesicant Actions of Sulfur Mustard after Cutaneous Exposure. *Toxicological Sciences* [online]. **114**(1), 5–19. ISSN 1096-6080, 1096-0929. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfp253

SCHÄRER, Orlando D., 2013. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **5**(10), a012609. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012609

SØRENSEN, Claus Storgaard, Randi G. SYLJUÅSEN, Jacob FALCK, Tine SCHROEDER, Lars RÖNNSTRAND, Kum Kum KHANNA, Bin-Bing ZHOU, Jiri BARTEK a Jiri LUKAS, 2003. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* [online]. **3**(3), 247–258. ISSN 1535-6108. Dostupné z: doi:10.1016/s1535-6108(03)00048-5

STEINRITZ, Dirk a Horst THIERMANN, 2016. Sulfur Mustard. In: Jeffrey BRENT, Keith BURKHART, Paul DARGAN, Benjamin HATTEN, Bruno MEGARBANE a Robert

PALMER, ed. *Critical Care Toxicology* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 1–30 [vid. 2023-09-28]. ISBN 978-3-319-20790-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-20790-2_149-1

SUNADA, Shigeaki, Hiroko SAITO, Doudou ZHANG, Zeyu XU a Yoshio MIKI, 2021. CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **550**, 56–61. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2021.02.117

TIMPERLEY, Christopher M., Jonathan E. FORMAN, Mohammad ABDOLLAHI, Abdullah Saeed AL-AMRI, Augustin BAULIG, Djafer BENACHOUR, Veronica BORRETT, Florida A. CARIÑO, Christophe CURTY, Michael GEIST, David GONZALEZ, William KANE, Zrinka KOVARIK, Roberto MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, Nicia Maria Fusaro MOURÃO, Slawomir NEFFE, Syed K. RAZA, Valentin RUBAYLO, Alejandra Graciela SUÁREZ, Koji TAKEUCHI, Cheng TANG, Ferruccio TRIFIRÒ, Francois Mauritz VAN STRATEN, Paula S. VANNINEN, Slavica VUČINIĆ, Volodymyr ZAITSEV, Muhammad ZAFAR-UZ-ZAMAN, Mongia Saïd ZINA, Stian HOLEN, Wesam S. ALWAN, Vivek SURI, Peter J. HOTCHKISS a Mostafa GHANEI, 2021. Advice on assistance and protection provided by the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons: Part 3. On medical care and treatment of injuries from sulfur mustard. *Toxicology* [online]. **463**, 152967. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2021.152967

VASSILEV, Lyubomir T., 2006. Cell cycle synchronization at the G2/M phase border by reversible inhibition of CDK1. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* [online]. **5**(22), 2555–2556. ISSN 1551-4005. Dostupné z: doi:10.4161/cc.5.22.3463

VERMEULEN, Katrien, Dirk R. VAN BOCKSTAELE a Zwi N. BERNEMAN, 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* [online]. **36**(3), 131–149. ISSN 0960-7722. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x

VILLEDIEU, M., M. BRIAND, M. DUVAL, J. F. HÉRON, P. GAUDUCHON a L. POULAIN, 2007. Anticancer and chemosensitizing effects of 2,3-DCPE in ovarian carcinoma cell lines: Link with ERK activation and modulation of p21WAF1/CIP1, Bcl-2 and Bcl-xL expression. *Gynecologic Oncology* [online]. **105**(2), 373–384. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2006.12.019

WATTANA, Monica a Tareg BEY, 2009. Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine* [online]. **24**(1), 19–29. ISSN 1049-023X, 1945-1938. Dostupné z: doi:10.1017/S1049023X0000649X

YANG, N. a A.M. SHERIDAN, 2014. Cell Cycle. In: *Encyclopedia of Toxicology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 753–758 [vid. 2024-01-13]. ISBN 978-0-12-386455-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00273-6

YANG, Yu Chu, Linda L. SZAFRANIEC, William T. BEAUDRY a J. Richard WARD, 2002. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of 2-chloroethyl sulfides. *ACS Publications* [online]. B.m.: American Chemical Society [vid. 2023-10-18]. Dostupné z: doi:10.1021/jo00249a029

YUE, Lijun, Yuxia WEI, Jia CHEN, Huiqin SHI, Qin LIU, Yajiao ZHANG, Jun HE, Lei GUO, Tingfen ZHANG, Jianwei XIE a Shuangqing PENG, 2014. Abundance of Four Sulfur Mustard-

DNA Adducts *ex Vivo* and *in Vivo* Revealed by Simultaneous Quantification in Stable Isotope Dilution–Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* [online]. **27**(4), 490–500. ISSN 0893-228X, 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/tx4003403

10 Seznam obrázků

Obr. 1	Strukturní vzorec siriého yperitu	13
Obr. 2	Hydrolyza siriého yperitu	15
Obr. 3	Mechanismus účinku siriého yperitu, vznik karbokationtu.....	17
Obr. 4	Báze DNA modifikované siriým yperitem	19
Obr. 5	Schéma rozpoznávání poškození DNA způsobené siriým yperitem	20
Obr. 6	Buněčné a molekulární mechanismy působení siriého yperitu	21
Obr. 7	Reparace DNA mechanismem excize nukleotidů	25
Obr. 8	Buněčný cyklus	26
Obr. 9	Fáze mitózy a cytokineze	27
Obr. 10	Regulace buněčného cyklu komplexu CDK-cyklin	29
Obr. 11	Metody a sloučeniny využívané při synchronizaci buněčného cyklu	34
Obr. 12	Proliferační křivka buněk HaCaT ovlivněných siriým yperitem.....	43
Obr. 13	Časový průběh buněčného cyklu buněk HaCaT po ovlivnění siriým yperitem	44
Obr. 14	Optimalizace podmínek synchronizace buněčného cyklu v G1 fázi.....	45
Obr. 15	Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase v G1 ..	46
Obr. 16	Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v G1 fázi cyklu se siriým yperitem.....	47
Obr. 17	Inkorporace BrdU u buněk HaCaT v G1 fázi.....	48
Obr. 18	Optimalizace podmínek synchronizace buněčného cyklu v S fázi	49
Obr. 19	Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase v S.....	50
Obr. 20	Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v S fázi cyklu se siriým yperitem	51
Obr. 21	Inkorporace BrdU u buněk HaCaT v S fázi	52
Obr. 22	Optimalizace synchronizace buněk HaCaT ve fázi G2/M	53
Obr. 23	Stanovení viability buněk HaCaT elektroimpedanční metodou v reálném čase v G2/M	54
Obr. 24	Interakce buněk HaCaT synchronizovaných v G2/M fázi cyklu s HD	55
Obr. 25	Inkorporace BrdU u buněk HaCaT v G2/M	56

11 Seznam tabulek

Tab. 1 Fyzikálně-chemické vlastnosti sirného yperitu 14

Tab. 2 Regulace buněčného cyklu pomocí cyklinů a cyklin dependentních kinas 29