

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd**

Antimutagenní účinek epigalokatechin galátu

(bakalářská práce)

Školitel specialista: Doc. RNDr. Rudolf Štětina, Csc.

Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Hradec Králové, 2009

Jana Voříšková

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové dne 5. května 2009

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Rudolfu Štětinovi, CSc. za odborné vedení při zpracování této bakalářské práce a paní laborantce Věře Škrancové za cenné rady při realizaci praktické části.

OBSAH

1	ABSTRAKT	6
2	ÚVOD	8
3	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	VOLNÉ RADIKÁLY	9
3.1.1	Vznik volných radikálů	11
3.1.2	Funkce volných radikálů ve zdravém organismu	11
3.1.3	Ochrana organismu před volnými radikály	12
3.1.4	Poškození biomolekul volnými radikály	16
3.2	POŠKOZENÍ DNA	16
3.2.1	Spontánní mutace	16
3.2.2	Indukované mutace.....	17
3.3	OPRAVA POŠKOZENÉ DNA.....	18
3.3.1	Úplná oprava	19
3.3.2	Excizní oprava.....	19
3.3.3	Tolerantní oprava.....	20
3.4	COMMET ASSAY	20
3.4.1	Princip metody	20
3.4.2	Varianty kometového testu.....	21
3.4.3	Modifikace kometového testu	21
3.4.4	Hodnocení komet.....	22
3.4.5	Kalibrace	22
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1	Materiál	23
4.1.1	Buněčné kultury.....	23
4.1.2	Pomůcky a přístroje.....	23
4.1.3	Chemikálie.....	24

4.2	Pracovní postup	25
4.2.1	Příprava roztoků	25
4.2.2	Příprava buněk.....	26
4.2.3	Pracovní postup	27
5	VÝSLEDKY	29
5.1	Vliv EGCG na indukci oxidativního poškození DNA u buněk AA8.....	29
5.2	Vliv EGCG na opravu Endo III míst indukovaných H ₂ O ₂ u buněk AA8.....	30
5.3	Oprava SSB, Endo III míst a FPG míst indukovaných H ₂ O ₂	32
5.4	Vliv EGCG na reparaci oxidativního poškození DNA indukovaného H ₂ O ₂ u buněk AA8 ..	33
6	DISKUZE	36
7	ZÁVĚR.....	40
8	ZDROJE	41

1 ABSTRAKT

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin, kterým je přisuzována antioxidační aktivita. My jsme si k testování antimutagenního účinku vybrali látku epigalokatechin galát (EGCG) ze skupiny flavanolů, u které byla již v předchozích experimentech prokázána schopnost chránit DNA proti poškození způsobenému volnými radikály.

Ke zjišťování genotoxicity peroxidu vodíku a ke sledování antioxidačního účinku EGCG jsme používali alkalickou verzi kometového testu. Hodnotili jsme 3 typy poškození DNA: jednořetězcové zlomy, místa oxidovaných pyrimidinů (tzv. Endo III místa) a místa oxidovaných purinů (tzv. FPG místa). Poškození buněk jsme hodnotili jako počet jednořetězcových zlomů vztažených na 10^9 Daltonů.

Pokusy jsme prováděli na buňkách AA8 křečička čínského. Ovlivňovali jsme je různými koncentracemi peroxidu vodíku. Z něj vzniká Fentonovou reakcí hydroxylový radikál, který navozuje oxidativní poškození DNA. Sledovali jsme účinnost reparace těchto změn způsobených volnými radikály. Dále nás zajímalo, zda EGCG nějakým způsobem přispívá ke zlepšení účinnosti reparace oxidativního poškození.

Předěšlé studie hovoří o dvojí funkci EGCG: prooxidační a antioxidační aktivitě. My jsme v této otázce potvrdili dosavadní poznatky, že v nízkých koncentracích má EGCG protektivní účinek, zatímco vyšší koncentrace mohou indukovat oxidační poškození DNA.

V našich experimentech jsme potvrdili genotoxicitu peroxidu vodíku, který vyvolal u buněk AA8 tvorbu jednořetězcových zlomů, vznik Endo III míst a FPG míst. Nejúčinnější reparace bylo dosaženo u jednořetězcových zlomů, zde jsme nepozorovali žádný vliv EGCG. Endo III místa se také opravovala rychle, reparace byla navíc podpořena v přítomnosti EGCG. Nejpomalejší reparaci jsme zaznamenali u FPG míst. V přítomnosti EGCG byla reparace oproti kontrole naopak mírně zpomalena.

ABSTRACT

Flavonoids are a class of plant secondary metabolites which are commonly known for their antioxidant activity. For our experiments we choosed epigallocatechin galat (EGCG) from the group of flavanols. Several studies have already proven its ability in the defence against DNA damage caused by free radicals.

We used the method of alkaline comet assay for testing genotoxicity of hydrogen peroxide and for the measurement of the antioxidant activity of EGCG. We assessed 3 types of DNA damage: single strand breaks, sites of oxidised pyrimidines (Endo III sites) and sites of oxidised purines (FPG sites). The results were represented as the number of single strand breaks in 10^9 Daltons.

We provided the experiments with the cell line of Chinese hamster AA8. We treated the cells with various concentrations of hydrogen peroxid which generates hydroxyl radical by Fenton reaction. This reaction caused oxidative damage of DNA. We investigated the reparation ability of the cells after their exposure to free radicals. Then we searched if EGCG improves these reparative processes.

There were experiments which has proven dual function of EGCG: prooxidant and antioxidant activity. We confirmed in this question present knowledge that low concentration of EGCG has protective effect while higher concentrations can induce oxidative damage of DNA.

In our experiments we confirmed the genotoxicity od hydrogen peroxid which generated single strand breaks, Endo III sites and FPG sites in AA8 cells. The most effective reparation was achieved in the reparation of single strand breaks, where we couldn't observe any effect of EGCG. The reparation of Endo III sites proceeded quickly too, in the presence of EGCG was furthermore accelerated. The lowest reparation ability was observed in the case of reparation of FPG sites. In the presence of EGCG the reparation process was compared to control cells slightly moderated.

2 ÚVOD

V lidském těle vznikají volné radikály, které mají na jedné straně pozitivní účinky, na druhé straně se ale mohou vázat na biomolekuly a způsobovat jejich poškození. Zatímco proteiny a lipidy jsou neustále obměňovány, poškození DNA musí být opraveno. Pokud je tato oprava nějakým způsobem narušena, může oxidativní stres přispívat k mutagenезi či karcinogenезi. Jelikož patří zhoubná onemocnění ke druhé nejčastější příčině úmrtí v České republice, je této problematice věnován velký zájem.

Buňky jsou vybaveny mechanismy, které eliminují poškození způsobená volnými radikály. V lidském těle se na antioxidační aktivitě podílí řada enzymů a jiných neenzymatických systémů. My jsme se v naší práci zaměřili na sledování antimutagenního účinku látky ze skupiny flavonoidů, epigalokatechin galátu (EGCG). Tato látka je obsažena v zeleném čaji a je jí přisuzován pozitivní účinek v prevenci nádorových onemocnění.

Pro testování genotoxicity jsme zvolili kometový test (comet assay). Ten nám umožňuje sledovat vliv mutagenního účinku různých látek na buňky a posoudit případné pozitivní vlivy látek s antimutagenními účinky.

Cílem naší práce bylo zjistit, jak EGCG ovlivňuje opravu DNA po oxidačním poškození vyvolaném působením peroxidu vodíku. Zjišťovali jsme také, zda EGCG jako polyfenolická látka indukuje oxidativní změny v DNA. Dále jsme se snažili objasnit mechanismy, kterými EGCG působí při ochraně proti volným radikálům.

3 TEORETICKÁ ČÁST

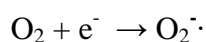
3.1 VOLNÉ RADIKÁLY

Volné radikály jsou látky obsahující nepárový elektron ve svém elektronovém obalu. Stabilní konfigurace však vyžaduje párové seskupení elektronů, proto se snaží volné radikály chybějící elektron doplnit, z čehož vyplývá jejich vysoká reaktivita. (*Racek, 2003*) V lidském organismu za normálních podmínek vznikají reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS-reactive oxygen and nitrogen species). (*Štípek, 2000*)

ROS (reactive oxygen species)

V organismu se nejčastěji setkáváme s reaktivními formami kyslíku. Nezbytnou reakcí pro aerobní způsob života je redukce atmosférického kyslíku na 2 molekuly vody. Probíhá jako čtyřelektronová redukce:

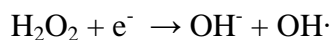
Přijetím jednoho elektronu se molekula kyslíku (biradikál) redukuje na superoxid:



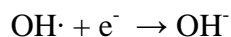
Druhý elektron redukuje superoxid na peroxid vodíku:



Další elektron způsobí rozklad peroxid vodíku na vodu (v rovnici je uvedena disociovaná forma OH⁻) a hydroxylový radikál (má o jeden elektron méně než hydroxidový aniont):



Poslední elektron redukuje hydroxylový radikál na další molekulu vody:



Reakce probíhá v dýchacím řetězci mitochondrií v aktivním centru enzymu cytochromoxidázy. Ani neaktivnější forma kyslíku, kterým je hydroxylový radikál OH[·], není ve vazbě s enzymem škodlivá. Jako volná částice se však ve tkáni okamžitě slučuje s téměř jakoukoliv sousední molekulou.

Superoxid

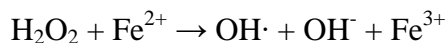
Superoxid podléhá dismutaci, při které je zároveň oxidován i redukován a vzniká kyslík a peroxid vodíku:



Ve vodném prostředí probíhá tato reakce vysokou rychlostí, v organismu je navíc urychlována enzymem superoxiddismutázou.

Peroxid vodíku

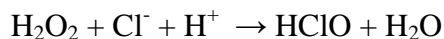
Peroxid vodíku není sám o sobě radikálem, ale patří do skupiny ROS, protože se účastní vzniku radikálů. S biomolekulami reaguje poměrně pomalu, avšak v přítomnosti tranzitních kovů (Fe^{2+} , Cu^+) je rychle redukován:



Tato reakce je označována jako Haber- Weissova nebo častěji Fentonova reakce. Je katalyzována železem a vzniká při ní hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$, což je velmi silné oxidační činidlo. Trojmocné železo je regenerováno dalším superoxidem zpět na dvojmocné, takže může být znovu použito pro katalýzu.

Kyselina chlorná

Její syntéza probíhá v neutrofilních granulocytech za účasti enzymu myeloperoxidázy:



Polymorfonukleáry využívají kyselinu chlornou jako baktericidní prostředek. (Štípek, 2000)

RNS

Mezi nejdůležitější reaktivní formy dusíku patří oxid dusnatý $\text{NO}\cdot$ a peroxynitrit $\text{ONOO}\cdot$. (Racek, 2003)

3.1.1 Vznik volných radikálů

Volné radikály vznikají z normální částice buď přijetím elektronu- redukcí nebo ztrátou elektronu- oxidací. Další možností je homolytické štěpení na dvě částice, z nichž každá má jeden elektron. Tato reakce však vyžaduje mnoho energie, proto se s ní v biologických systémech prakticky nesetkáme.

Volné radikály se dostávají do organismu zvenčí nebo vznikají v průběhu metabolismu. Exogenní příčiny mohou být např. ionizující záření, UV světlo, znečištěné ovzduší, kouření, intoxikace nebo potrava. K endogenním příčinám patří vznik kyseliny močové, rozpad fagocytů a makrofágů, vznik methemoglobinu, syntéza prostaglandinů, autooxidace thiolů, hyperglykémie nebo reperfuze po předchozí ischemii. (*Racek, 2003*)

Vznik radikálu většinou iniciuje řetězec dalších reakcí. Vyplývá to z jejich vysoké reaktivity. Téměř okamžitě se slučují s okolními molekulami a dochází k propagaci do okolí. Radikálová reakce je ukončena, když se spojí dva radikály a vznikne stabilní molekula. (*Štípek, 2000*)

3.1.2 Funkce volných radikálů ve zdravém organismu

Volné radikály mají v organismu i příznivé účinky. Škodí jen v případě, že se vymknou kontrolním mechanismům.

ROS a zejména kyselina chlorná je využívána jako účinná zbraň fagocytů proti bakteriím a cizím strukturám. Neutrofilní leukocyty a makrofágy jsou vybaveny enzymovým komplexem NADPH- oxidázou katalyzujícím vznik superoxidového radikálu, který je dále přeměňován na kyselinu chlornou působením myeloperoxidázy.

Volné radikály mohou také sloužit jako nástroj oxidáz a oxygenáz. Cytochromoxidáza, enzym dýchacího řetězce obsažený ve vnitřní mitochondriální membráně, přijímá elektrony pocházející ze živin a předává je na molekulární kyslík. Redukuje ho čtyřmi elektrony za vzniku dvou molekul vody a uvolnění energie ve formě ATP. Toxické meziprodukty, tj. peroxid vodíku a superoxid, zůstávají navázány na enzym a nepoškozují okolní struktury.

Monooxygenázy redukují podobně dioxygen na hydroxylový radikál, který je využíván při hydroxylaci endogenních a exogenních látek. (*Štípek, 2000*)

Peroxid vodíku je také nezbytný pro oxidaci jodidu na elementární jód, který využívá štítná žláza k jodaci tyroninu.

Superoxid a peroxid vodíku jsou dále nezbytné při úspěšném oplodnění. Superoxid narušuje membránu vajíčka. Peroxid vodíku je tvořen vajíčkem po oplodnění a zajišťuje tvorbu křížových vazeb v membráně, což zamezuje pronikání dalších spermií.

Oxid dusnatý má v organismu mnoho funkcí: působí vazodilataci cév, reguluje imunitní pochody, má význam při erekci a uplatňuje se také jako neurotransmitter.

Volné radikály mohou působit také jako signální molekuly, zasahovat do regulace imunitní odpovědi nebo ovlivňovat produkci transkripčních faktorů. (*Racek, 2003*)

3.1.3 Ochrana organismu před volnými radikály

Aerobní metabolismus je energeticky výhodnější než anaerobní, ale vznikají při něm již zmíněné volné radikály. Proto se u aerobních organismů vyvinuly tyto ochranné mechanismy:

1. Mechanismy zabrňující tvorbě VR:

- Vazba iontů přechodných kovů (transportní a zásobní bílkoviny, haptoglobin a hemopexin, ceruloplasmin, chelatační činidla)
- Inhibice enzymů, které katalyzují tvorbu VR
- Odstranění peroxidu vodíku katalázou či peroxidázami (zablokování jeho možné další reakci za vzniku hydroxylového radikálu)

2. Mechanismy odstraňující již vzniklé VR

- Superoxiddismutáza (katalýza přeměny superoxidu na peroxid vodíku)
- Redukující látky, které předají radikálu elektron a samy se změny na stabilnější radikál (vitamin C, E, ubichinol, GSH)

3. Reparační systémy odstraňující molekuly poškozené volnými radikály

- U poškozených fosfolipidů se uplatňují fosfolipázy, které odštěpují oxidované vyšší mastné kyseliny
- Proteiny jsou degradovány a eliminovány z organismu
- DNA je reparována za pomoci endonukleáz (*Racek, 2003*)

Antioxidační ochranný systém je velmi různorodý. Mezi jeho nejvýznamnější složky patří antioxidační enzymy (superoxiddismutáza, glutathionperoxiáza, kataláza), glutathion, vitamin E, vitamin C, β - karoten a jiné karotenoidy, ubichinol (koenzym Q10), kyselina močová, melatonin, polyfenolické antioxidanty a látky vážící přechodné kovy.

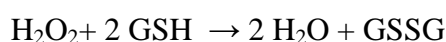
3.1.3.1 Antioxidační enzymy

Superoxiddismutáza (EC 1.5.1.1, **SOD**) urychluje dismutaci peroxidu. Je obsažena v každé buňce. Rozeznáváme dva druhy SOD lišící se kofaktorem:

1. Mn^{2+} SOD a Fe^{2+} SOD je obsažena v prokaryotických buňkách.
2. Cu^{2+}/Zn^{2+} SOD se nachází v eukaryotických buňkách- v cytosolu a v intermembránovém prostoru mitochondrií. Má dimerní strukturu. Každá podjednotka obsahuje jeden atom přechodného kovu- měď je zodpovědná za přenos elektronů, zinek plní strukturní úlohu.

U člověka najdeme 3 typy SOD lišící se kofaktorem a umístěním. SOD1 je dimer obsahující Cu a Zn a vyskytuje se v cytoplazmě. SOD2 je tetramer s kofaktorem Mn a najdeme jí v mitochondriích. SOD3 je tetramer vyskytující se extracelulárně, obsahuje Cu a Zn. (*Racek, 2003*)

Glutathionperoxidáza (EC 1.11.1.9, **GSHPx**) katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu a současnou oxidaci glutathionu obsahujícího cystein:

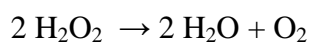


Glutathion musí být regenerován v redukované formě. To zajišťuje enzym glutathionreduktáza (EC 1.6.4.2, **GR**), který využívá NADPH jako kofaktor:



GSPHx se vyskytuje ve třech různých formách lišících se stavbou molekuly. První dvě formy se nacházejí v extracelulární tekutině (eGSPHx)- v cytoplazmě buněk a v krevní plazmě. Jsou to bílkoviny obsahující v aktivním centru selenocystein. Třetí typ je vázán v buněčné membráně a nazývá se fosfolipidová glutathionperoxidáza (pGSHPx).

Kataláza (EC 1.11.1.6, **CAT**) je enzym zajišťující štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík:

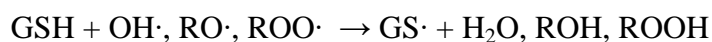


Narozdíl od peroxidáz působí kataláza na peroxid vodíku jen při jeho vyšších koncentracích. (Racek, 2003)

3.1.3.2 Neenzymatické antioxidanty

Glutathion se uplatňuje intracelulárně, v buňkách je obsažen ve vysoké koncentraci (1- 10 mmol/l). Vyskytuje se ve dvou formách: jako thiol (redukovaná forma- GSH) nebo jako disulfid (oxidovaná forma- GSSG). Pro organismus je důležitý stálý poměr GSH/GSSG s převahou redukované formy. (Racek, 2003)

Podílí se na odstraňování ROS:



K jeho dalším funkcím patří ochrana sulfhydrylových skupin proteinů, regenerace tokoferolu a askorbátu, je koenzymem glutathionperoxidázy.

Vitamin E (α -tokoferol) se uplatňuje především v membránách při peroxidaci lipidů, kde přeměňuje alkylperoxidové radikály $\text{LOO}\cdot$ na hydroperoxydy LOOH , které jsou dále štěpeny glutathionperoxidázou. Z tokoferolu se stane tokoferylový radikál, který je zpětně redukován pomocí askorbátu. Tímto cyklem se zabrání propagaci radikálových reakcí v lipidech membrán a lipoproteinů. (Štípek, 2000)

Vitamin C (kyselina askorbová) se uplatňuje jako kofaktor řady enzymů např. při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. Působí také jako redukční činidlo, redukuje Fe^{3+} na Fe^{2+} , Cu^{2+} na Cu^{+} . Jeho antioxidační účinek je založen na redukci radikálů a regeneraci tokoferylového radikálu. (Štípek, 2000) Při těchto reakcích se kyselina askorbová oxiduje do dvou stupňů: na semidehydroaskorbát (askorbylový radikál) a dehydroaskorbát. (Racek, 2003) Zpětná regenerace dehydroaskorbátu na askorbát je možná pomocí enzymu dehydroaskorbátreduktázy, který obsahuje GSH. Ten je ale umístěn intracelulárně, takže se mohou při oxidačním stresu askorbylové radikály hromadit v extracelulární tekutině. (Štípek, 2000)

Karotenoidy, β -karoten a vitamin A jsou schopny přeměňovat reaktivní singletový kyslík na běžný tripletový kyslík, likvidovat volné radikály, např. alkylperoxylové v lipidech.

Ubichinol (koezym Q10) slouží v mitochondriích jako přenašeč elektronů při buněčném dýchání. Najdeme ho i v membránách buněk, kde působí jako lipofilní antioxidant. Při těchto reakcích se ubichinol oxiduje na ubichinon. (Racek, 2003)

Kyselina močová je nejdůležitější antioxidant plazmy. (Štípek, 2000) Váže přímo volné radikály za vzniku urátového radikálu, který je regenerován kyselinou askorbovou. Váže také ionty železa, které nemohou vstupovat do Fentonovy reakce. (Racek, 2003)

Melatonin vychytává volné radikály a přeměňuje singletový kyslík. Po vazbě na buněčné jádro zabráňuje oxidačnímu poškození DNA.

Flavonoidy jsou polyfenolické látky rostlinného původu. Jejich antioxidační účinek je dán schopností vázat peroxylové, hydroxylové a superoxidové radikály a peroxid vodíku, schopností regenerace vitaminů E a C, vazbou přechodných kovů do pevných chelátů, inhibicí enzymů katalyzujících vznik volných radikálů. Jsou obsaženy v ovoci, zelenině, v zeleném čaji a v červeném víně. (Racek, 2003)

Látky vážící přechodné kovy

Přechodné kovy mají předposlední sféru neúplně zaplněnou elektrony, chovají se proto jako radikály. Organismus potřebuje železo a měď jako biogenní stopové prvky, musí však zabránit jejich vstupu do Fentonovy reakce a to buď vazbou do pevného chelátu (např. na transportní či skladovací protein) nebo oxidací přechodného kovu na vyšší valenci. Železo je vázáno v plazmě na transferin, v leukocytech na laktoferin, ve střevní sliznici a v kostní dřeni

na ferritin. (*Racek, 2003*) Oxidaci železa v krvi zajišťuje ceruloplazmin vážící měď. Na vzniku volných radikálů se může podílet i volný hemoglobin. Proto je za antioxidant považován haptoglobin vázající extracelulární hemoglobin a hemopexin vázající uvolněný hem. (*Štípek, 2000*)

3.1.4 Poškození biomolekul volnými radikály

Volné radikály napadají molekuly organismu a působí tak jejich oxidační poškození. K nejzávažnějším patří poškození fosfolipidů buněčných membrán, které způsobí poruchu životně důležitých membránových dějů, popř. zánik buňky. Poškození nukleových kyselin může vést k mutagenезi, karcinogenезi. Napadení bílkovin volnými radikály pak může způsobit inaktivaci enzymů. (*Racek, 2003*)

3.2 POŠKOZENÍ DNA

Při přenosu informací dochází díky náhodným vlivům k informačnímu šumu. Tak je tomu i u genetické informace uložené v DNA- mluvíme o mutacích. (*Nečas, 2000*) Mutace je definována jako dědičná změna genotypu způsobená nukleotidovou substitucí, inzercí nebo delecí. Může vzniknout spontánně nebo může být indukována působením mutagenních faktorů. (*Rosypal, 2000*)

3.2.1 Spontánní mutace

Během replikace mohou vznikat páry bází, které jsou odlišné od Watson- Crickových párů. K nejčastějším příčinám tvorby těchto chybných párů bází patří:

- Tautomerní změny bází

Báze se mohou vyskytovat ve dvou tautomerních formách (amino/imino forma, keto/enol forma), což ovlivňuje jejich párovací vlastnosti. Mohou vznikat nestabilní (přechodné) páry.

- Depurinace a depyrimidinace

Může k ní docházet při vysokých teplotách nebo v přítomnosti silných kyselin. Vede ke vzniku tzv. AP (apurinového/apyrimidinového) místa, které je během replikace zaplněno jakýmkoliv nukleotidem (nejčastěji bývá zařazen adenin).

- Oxidativní poškození DNA

H₂O₂ reaguje s DNA, která je v komplexu s železem přes hydroxylový radikál:



Radikálové reakce vedou k mnoha produktům. Pro vznik mutací je nejvýznamnější vznik 8-oxodeoxyguanozinu (8-OxodG), který se páruje přednostně s adeninem. Působením hydroxylového radikálu na thymin vzniká thyminglykol, který blokuje replikaci DNA. Reakce OH· s adeninem vede k tvorbě 4,6-diamino-5-formamidopyrimidinu, s guaninem vzniká 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin. (*Rosypal, 2000*)

3.2.2 Indukované mutace

Rozlišujeme mutagenní faktory fyzikální a chemické.

3.2.2.1 Chemické mutageny:

- Analogy bází

Jsou strukturálně podobné bázím. Mohou být zařazeny do DNA místo normální báze. Nejčastěji to bývá 5- bromuracil (analog thyminu).

- Deaminační činidla

Např. kyselina dusitá způsobuje oxidativní deaminaci cytosinu na uracil, adeninu na hypoxantin a guaninu na xantin a dochází k substitucím.

- Alkylační činidla

Alkylační látky mají vysokou afinitu k nukleofilním centrům molekul. Předávají DNA alkylové skupiny a tím mění nebo blokují párování bází.

3.2.2.2 Fyzikální mutageny:

- Ionizující záření (rentgenové paprsky, záření X, protony, neutrony a elektrony o vysokém obsahu energie) působí přímo na DNA nebo rozkládají vodu za vzniku hydroxylového radikálu. V DNA se tvoří křížové vazby mezi protilehlými nukleotidy nebo vznikají zlomy.
- UV záření má specifitější účinek než ionizující záření. DNA absorbuje UV záření s maximem v oblasti 260- 280 nm. Absorpcí UV záření dojde ke kovalentnímu spojení dvou sousedních thyminů na stejném polynukleotidovém řetězci. Vzniká tzv. thyminový dimer, který je chemicky stabilní a brání replikaci a transkripci. Dále může UV záření přispívat ke vzniku nestabilních tautomerních forem bází. (*Rosypal, 2000*)

3.3 **OPRAVA POŠKOZENÉ DNA**

DNA může být poškozena během procesu replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů. Rozeznáváme tyto typy poškození DNA:

1. chybné párování nukleotidů při replikaci
2. mezera v jednom z řetězců dvoušroubovice DNA- opravná syntéza probíhá podle nepoškozeného řetězce za účasti enzymů DNA- polymerázy a ligázy
3. zlomy- přerušení fosfodiesterové vazby mezi dvěma sousedními polynukleotidy. Mohou být jednořetězcové nebo dvouřetězcové (*Rosypal, 2000*)

Typy oprav DNA:

3.3.1 Úplná oprava

- Fotoreaktivace

Působením UV záření vznikají v DNA cyklobutanové pyrimidinové (převážně thyminové) dimery, které brání replikaci DNA a transkripci. K jejich odstranění slouží proces nazývaný enzymatická fotoreaktivace. Je to na světle závislý enzymatický proces katalyzovaný enzymem fotolyázou, která se váže na kovalentně spojené pyrimidinové dimery v DNA. Obsahuje FADH₂, který je aktivován absorpcí záření z oblasti 300- 500 nm a působí jako donor elektronů při monomerizaci pyrimidinových dimerů. (*Friedberg, 1995*)

- Oprava alkylovaného O⁶guaninu, O⁴thyminu a alkylfosfotriesterů

Monofunkční alkylační látky mohou reagovat s DNA za vzniku O nebo N-alkylovaných produktů, které pak způsobují chybné párování při replikaci. Enzym O⁶methylguaninmethyltransferáza odstraňuje tyto methylové skupiny z O⁶guaninu a O⁴thyminu vazbou na svůj cysteinový zbytek. (*Rosypal, 2000*)

- Reparace jednořetězcových zlomů působením ligázy

DNA může být přímo spojena, pokud jsou v těsné blízkosti volné 3` OH a 5` P konce a nechybí žádný nukleotid. (*Friedberg, 1995*)

3.3.2 Excizní oprava

- Bázová excizní reparace (BER)

Při BER dochází k vyštěpení chemicky modifikované báze. Excize je zahájena specifickým enzymem DNA- glykosylázou, která hydrolyticky rozštěpí N- glykosidickou vazbu a vznikne tzv. AP (apurinové/ apyrimidinové) místo. To je specificky rozpoznáno AP- endonukleázou, která vytvoří v dsDNA zlom s 5` deoxyribózafosfátovým zbytkem. DNA-

deoxyribosfosfodiesteráza (dRpáza) tento zbytek vyštěpí a výsledná jednonukleotidová mezera je zaplněna opravnou syntézou za účasti DNA- polymerázy a ligázy. (*Rosypal, 2000*)

- Nukleotidová excizní reparace (NER)

NER odstraňuje poškozené báze ve formě pyrimidinových dimerů a jiných fotoproduktů jako součást oligonukleotidů. Excize je zahájena endonukleázou, která vyštěpí oligonukleotid obsahující thyminový dimer. Vzniklá mezera se zaplní opravnou syntézou a řetězce jsou spojeny pomocí DNA- polymerázy a ligázy.

- Oprava chybného párování (mismatch repair)

Při replikaci může dojít k nesprávnému zařazení báze. DNA- polymeráza III rozezná chybný pár a nahradí nukleotid správným.

3.3.3 Tolerantní oprava

Původní poškození není odstraněno, ale funkce DNA je obnovena. (*Rosypal, 2000*)

3.4 COMMET ASSAY

Kometový test (SCGE- single- cell gel electrophoresis) je metoda používaná k měření poškození DNA v eukaryotických buňkách. K jejím výhodám patří rychlost, spolehlivost, přesnost, nenáročnost a možnost širokého využití. (*Collins et al, 1997*)

3.4.1 Princip metody

Buňky jsou imobilizovány v LMP agaróze při 37°C na mikroskopickém sklíčku, lyzovány a poté je provedena elektroforéza. Následuje neutralizace a oplach v destilované vodě. Buňky jsou vizualizovány pomocí fluorescenčních barviv a hodnoceny buď manuálně nebo za použití automatického softwaru. (*Collins, 2004*)

Změny DNA během SCGE:

Při lýze jsou narušeny nukleosomy DNA, odstraněny histony a DNA zůstane ve formě smyček. V místech, kde se vytvořily zlomy, ztrácí DNA superhelixovou strukturu a proto po zapnutí elektroforézy putuje k anodě. Při mikroskopickém pozorování vidíme komety, kde množství DNA v ohonu odpovídá úrovni jejího poškození. (*Collins, 2008*)

3.4.2 Varianty kometového testu

1. Alkalická SCGE: Po lýze jsou buňky vkládány do alkalického denaturačního roztoku (pH 12- 13), který zbaví DNA struktury superhelixu. Primárně se používá k detekci jednořetězcových zlomů (SSB- single strand breaks), protože v alkalickém prostředí dochází k oddělení obou vláken dvoušroubovice.
2. Neutrální SCGE: Při této modifikaci se používá pufr o pH 7-8. Využívá se k detekci dvouřetězcových zlomů (DSB- double strand breaks). (*Collins, 2004*)

Jednořetězcové zlomy (SSB) nejsou považovány za mutagenní, protože dochází k jejich rychlé opravě. Většina látek nepůsobí zlomy přímo, ale vytváří tzv. AP místa, která jsou alkali- labilní a při použití alkalické SCGE jsou převedeny na zlomy. Zlomy také vznikají během bazové nebo nukleotidové excizní reparace, takže výskyt zlomů může znamenat i účinnou opravu poškozené DNA. (*Collins et al, 1997*)

3.4.3 Modifikace kometového testu

Ke zvýšení specifity se používají enzymy, které rozeznají určitý typ poškození a vytvoří zlomy.

- Endonukleáza III (EndoIII) vytvoří zlomy v místě oxidovaných pyrimidinů.
- Formamidopyrimidin- DNA- glykosyláza (FPG) se používá k detekci míst oxidovaných purinů, kterým je nejčastěji 8- oxoguanin.
- uvrABC detekují rozsáhlejší poškození. (*Collins et al, 1997*)

3.4.4 Hodnocení komet

DNA je vizualizována pomocí fluorescenčních barviv, nejčastěji se používá ethidium bromid a DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol). Hodnotí se tyto parametry:

- procento DNA v ohonu (relativní intenzita fluorescence hlavy a ohonu) je považován za nejlepší ukazatel, jelikož je lineárně závislý na frekvenci zlomů.
- Délka ohonu není příliš používaný parametr, protože se zvyšujícím se poškozením DNA se ohon neprodlužuje (vzrůstá jen intenzita). (Collins, 2004) Délka ohonu pravděpodobně souvisí s velikostí relaxovaných smyček DNA. (Collins et al, 1997)

Komety se mohou vyhodnocovat manuálně: zařazením do 5 skupin (0- žádný ohon, 4- téměř všechna DNA v ohonu). Hodnocení je ale značně subjektivní a data jsou obtížně reprodukovatelná. Proto se častěji využívají softwarové programy. (Collins, 2004)

3.4.5 Kalibrace

Validní výsledky by se měly vždy uvádět jako počet zlomů na 10^9 Da nebo jako ekvivalent Gy. (Collins, 2008) Standardní metoda kalibrace spočívá v ozáření vzorku buněk pomocí γ nebo X- paprsků, které vyvolá určitý počet jednořetězcových zlomů. Ty mají tendenci rychle se opravovat, proto provádíme vše na ledu. Komety vykazují lineární nárůst procenta DNA v ohonu v rozmezí 0-8 Gy, což odpovídá 2,5 zlomů na 10^9 Da. (Collins, 2004)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Materiál*

4.1.1 **Buněčné kultury**

Používali jsme buňky AA8 z ovaríí křečička čínského (CHO- Chinese Hamster ovary, wild type). Buňky byly uchovávány v mediu MEM alpha obohaceném o 5% fetálního bovinního séra a směs antibiotik při 37°C v atmosféře 5% CO₂.

4.1.2 **Pomůcky a přístroje**

- Zkumavky
- Mikrozukmavky (Eppendorf)
- Petriho misky
- Kyvety
- Kádinky
- Pasteurovy pipety
- Automatické pipety, špičky na pipety
- Kultivační lahvičky (50 ml, 250 ml)
- Laminární box (AURA 2000)
- Světelný mikroskop (Telaval)
- Bürkerova komůrka
- Podložní a krycí sklíčka
- Předvážky EMB 220-1 (Kern)
- Analytické váhy (Boeco)
- Lednice 175 R (Calex)
- Elektroforetický tank
- Centrifuga Z 400 K (Hermle)
- Magnetická míchačka s ohřevem MSH basic (Yellow line)
- CO₂ inkubátor (Shellab)
- Vodní lázeň 609/a (Kutesz)
- Výrobník ledové tříště (Angelantoni Industrie)

- Počítač (Hewlet Packard)
- Fluorescenční mikroskop Eclipse E 400, zvětšení 20x/0,5 (Nikon)
- Kamera COHU
- UV lampa (Phillips UV-C), zářivka typu TUV 15W/G15T8
- Softwarové vybavení: operační systém Windows XP, program Lucia comet assay (Laboratory Imaging), statistický program Sigma- stat, Microsoft Office Excell

4.1.3 Chemikálie

- Agarózy (Sigma- Aldrich)
- Bovinní sérový albumin- BSA (Sigma- Aldrich)
- Dimethylsulfoxid- DMSO (Sigma- Aldrich)
- EDTA (Lachema)
- Endonukleáza III (Ústav experimentální botaniky AV ČR)
- Formamidopyrimidin- DNA- glykosyláza- FPG (Ústav experimentální botaniky AV ČR)
- Epigalokatechingalát- EGCG (Sigma- Aldrich)
- H₂O₂ (Peroxides s.r.o.)
- KCl p.a.(Lachema)
- KOH p.a. (Lachema)
- NaOH p.a. (Lachema)
- HCl p.a. (Lachema)
- NaCl (Lachema)
- N – (2 – hydroxyethyl) – piperazin – N' – 2 – ethansulfonová kyselina- HEPES p.a. (Sigma- Aldrich)
- Fosfátem pufovaný fyziologický roztok- PBS (Sigma- Aldrich)
- Trypsin (PAA)
- Triton X-100 (Sigma- Aldrich)
- Tris (hydroxymethyl)- aminomethan p.a. (Penta)
- Kultivační médium MEM alpha (PAA)
- Ethidium bromid 95% (Sigma- Aldrich)
- Tridestilovaná voda

4.2 *Pracovní postup*

4.2.1 Příprava roztoků

Roztoky jsme vždy připravovali čerstvé a uchovávali je v lednici.

4.2.1.1 Agaróza

Na potahování sklíček: 1 g agarózy na 100 ml destilované vody (1% roztok)

High melting point agaróza (HMP): 100 mg agarózy do 10 ml PBS (1% roztok)

Low melting point agaróza (LMP): 100 mg agarózy do 10 ml PBS (1% roztok)

4.2.1.2 Lyzační roztok

2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris; pH 10,0

Příprava: 146 g NaCl + 29,2 g EDTA + 1,2 g Tris do 1000 ml destilované vody

Přesnou hodnotu pH jsme upravili přidáním NaOH (cca 12 g do 1000ml). Před použitím jsme přidali 1% Triton X-100 (1ml do 100 ml roztoku), směs důkladně zamíchali, zchladili a uchovávali v lednici.

4.2.1.3 Neutralizační roztok

0,4M Tris; pH 7,5

Příprava: 48,456 g do 1000 ml destilované vody

Hodnotu pH jsme upravili přidáním koncentrované HCl (cca 25 ml do 1000 ml).

4.2.1.4 Roztok pro elektroforézu

300 mM NaOH, 1 mM EDTA

Příprava: 18 g NaOH + 3 ml 0,5 M EDTA do 1500 ml destilované vody

4.2.1.5 0,5M EDTA

Příprava: 14,612 g do 100 ml destilované vody

4.2.1.6 Endonukleáza III

Příprava: zásobní roztok enzymu jsme zředili v poměru 1:100 Endo pufrem

4.2.1.7 Endo pufr

40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA; pH 8,0

Příprava: 9,53 g HEPES + 7,45 g KCl + 1,46 g EDTA + 0,2 g BSA do 1000 ml destilované vody

Hodnotu pH jsme upravili přidáním KOH (cca 1 g na 1000 ml).

4.2.1.8 Roztok PBS

Příprava: 1 tableta do 200 ml tridestilované vody.

4.2.1.9 Roztok H₂O₂

Příprava: 50 µl koncentrovaného H₂O₂ (10 M) jsme přidali k 5 ml PBS (100 mM). Vše probíhalo v ledu. Dále jsme roztok ředili vychlazeným PBS na koncentrace používané při pokusu. Požadované koncentrace jsme připravovali vždy bezprostředně před pokusem.

4.2.1.10 Roztok EGCG

Příprava: EGCG jsme rozpustili v DMSO podle požadované koncentrace použité při pokusu.

4.2.1.11 Ethidium bromid

Příprava: 20 µg do 1 ml vody

4.2.2 **Příprava buněk**

Na misky jsme vyseli asi 150- 200 tisíc buněk. V pokusech, ve kterých byl sledován vliv EGCG na indukci poškození DNA peroxidem vodíku byl za 4 h po vysetí k médiu buněk v miskách přidán EGCG rozpuštěný v DMSO, výsledná koncentrace DMSO v médiu byla 0,5%. Druhý den po vysetí jsme buňky ovlivňovali různými koncentracemi H₂O₂ ředěným v PBS. Ovlivnění bylo prováděno po dobu 5 min. na ledu. Poté jsme vždy odsáli médium, opláchli buňky PBS a přidali na 2 minuty trypsin. Napipetovali jsme určitý přesný objem PBS (lišil se podle hustoty buněk na miskách). Buňky jsme pomocí pipety resuspendovali a 35 µl jsme přenesli do ependorfky chlazené v ledu.

Při sledování vlivu EGCG na opravu indukovaného oxidačního poškození byly buňky druhý den po vysetí na misky ovlivněny H₂O₂, na misky vráceno původní médium, ke kterému byl přidán EGCG. Dále byly buňky inkubovány 30 min. při 37°C, poté trypsinizovány, jak je popsáno výše.

4.2.3 Pracovní postup

4.2.3.1 Příprava sklíček

Nejdříve byla podložní sklíčka potažena 1% roztokem standardní agarózy. Na ty jsme napipetovali 85 µl HMP agarózy, přikryli krycím sklíčkem a dali zchladit na plotnu. Po ztuhnutí agarózy jsme krycí sklíčka plynulým pohybem stáhli.

4.2.3.2 Příprava vrchní vrstvy agarózy s buňkami

LMP agarózu jsme před použitím rozvařili a postavili do lázně s 37°C. K buňkám v endorfce jsme přidali 85 µl této 37°C LMP, špičkou promíchali a ihned napipetovali na podložní sklíčko s vrstvou HMP agarózy. Přiklopili jsme suspenzi krycím sklíčkem a dali zchladit na plotnu. Po ztuhnutí agarózy jsme opět krycí sklíčko plynule stáhli.

4.2.3.3 Lýza

Podložní sklíčka s buňkami jsme narovnali do kyvety s lyzačním roztokem a vložili na 1 hodinu do lednice (doba může být i delší).

4.2.3.4 Ovlivnění Endo III/ FPG

Tento krok jsme prováděli jen u pokusů, kde jsme chtěli zjistit přítomnost Endo III/ FPG míst. Sklíčka jsme v kyvetě promyli třikrát po pěti minutách Endo pufrem. Potom jsme napipetovali na sklíčko roztok enzymu a nechali inkubovat 45 minut při 37°C.

4.2.3.5 Alkalické rozlétání DNA

Do elektroforetického tanku umístěném v lednici jsme nalili vychlazený elektroforetický pufr. Sklíčka jsme narovnali číslem vpravo a měřili čas 40 minut (ten je nutný dodržet).

4.2.3.6 Elektroforéza

K elektroforetickému tanku jsme připojili kabely a po ukončení rozplétání jsme zapnuli elektrický zdroj, který je nastavený na 25 V a 300 mA. Proud lze doladit odebráním nebo přidáním pufu. Elektroforézu jsme nechali probíhat po dobu 30 minut.

4.2.3.7 Neutralizace

Sklička jsme přendali z tanku do kyvety a propláchli je celkem třikrát po pěti minutách v neutralizačním roztoku. Nakonec jsme sklička promyli 5 minut destilovanou vodou.

4.2.3.8 Barvení

Na skličko jsme napipetovali 20 µl roztoku ethidium bromidu a přikryli krycím skličkem.

4.2.3.9 Hodnocení poškození DNA

Buňky jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem. Obraz byl přenášen kamerou na obrazovku počítače, kde jsme s využitím programu Lucia komety hodnotili, popř. upravovali. Údaje jsme zaznamenávali v programu Microsoft Excell.

Na každém skličku jsme hodnotili 25 buněk. Poškození DNA jsme zaznamenávali jako poměr DNA, která zůstala v jádře komety a která se nacházela v ohonu. Nepoškozené buňky se proto v mikroskopu jevily jako kruhové body (nepoškozená DNA zůstala v jádře), zatímco buňky poškozené vytvořily komety (poškozená DNA vycestovala během elektroforézy a vytvořila tzv. „ohon“).

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv EGCG na indukci oxidativního poškození DNA u buněk AA8

Tímto testem jsme sledovali vliv EGCG na indukci Endo III míst způsobených H₂O₂. (viz graf č. 1)

Buňky AA8 jsme nechali inkubovat 24 hodin v médiu obsahujícím EGCG o vzrůstajících koncentracích (3,125; 6,25; 12,5; 25 a 50 µg/ml). Kontrolní buňky byly vystaveny roztoku DMSO (0 µg/ml EGCG). Poté jsme buňky ovlivnili na pět minut při 0°C roztokem H₂O₂ o koncentracích 0,25; 0,5 a 1 mM. Na kontrolní buňky byl použit čistý PBS (0 mM H₂O₂). Po lýze buněk jsme použili enzym endonukleázu III, který způsobil zlomy v místech oxidovaných pyrimidinů. Velikost poškození DNA jsme měřili pomocí kometového testu a výsledek vyjádřili jako počet jednořetězcových (SSB) zlomů vztažených na 10⁹ Daltonů.

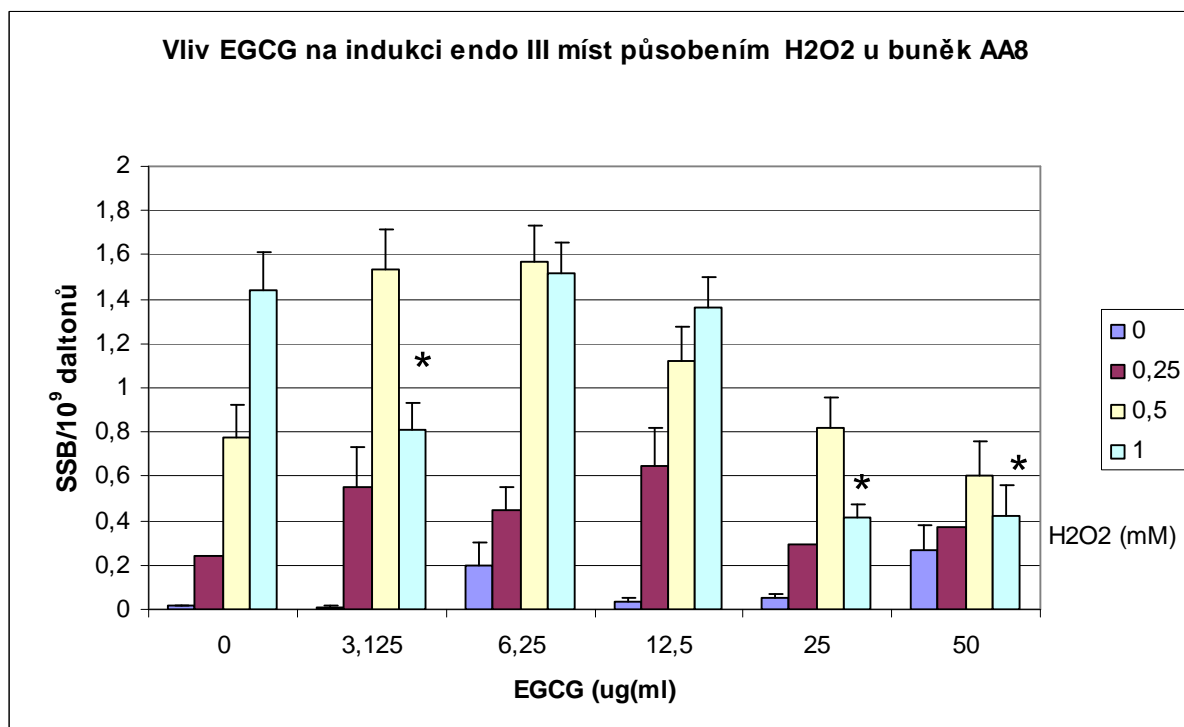
Se vzrůstající koncentrací roztoku H₂O₂ jsme pozorovali i zvýšení počtu Endo III míst. U kontrolních buněk vyvolala nejmenší koncentrace H₂O₂ (0,25 mM) 0,244 SSB; 0,5 mM H₂O₂ 0,772 SSB a 1 mM H₂O₂ pak 1,443 SSB/10⁹ Da.

Při použití 0,25 mM H₂O₂ jsme u kontrolních buněk zaznamenali hodnotu 0,244 SSB/10⁹Da. Po působení EGCG bylo patrné zvýšení počtu SSB a to na hodnoty 0,550 u 3,125 µg/ml EGCG; 0,446 u 6,25 µg/ml EGCG; 0,645 u 12,5 µg/ml EGCG; 0,294 u 25 µg/ml EGCG a 0,371 u 50 µg/ml EGCG.

Působení 0,5 mM H₂O₂ na kontrolní buňky vyvolalo poškození 0,772 SSB/10⁹Da. EGCG tyto hodnoty ve většině případů zvyšoval. Zaznamenali jsme nárůst při použití koncentrací EGCG 3,125 µg/ml na hodnotu 1,530; 6,25 µg/ml EGCG na 1,566; 12,5 µg/ml EGCG na 1,121 a 25 µg/ml EGCG na 0,820. Pouze u nejvyšší koncentrace EGCG (50 µg/ml) se hodnota oproti kontrole nepatrně snížila na 0,602.

Statisticky významné snížení počtu zlomů jsme zaznamenali u buněk ovlivněných 1 mM H₂O₂. U kontrolních buněk vyvolal 1 mM H₂O₂ 1,443 SSB/10⁹ Da. EGCG o koncentraci 3,125 µg/ml snížil tuto hodnotu na 0,809 SSB/10⁹ Da, 6,25 µg/ml EGCG hodnotu nepatrně zvýšil na 1,518; 12,5 µg/ml EGCG vyvolal mírný pokles na hodnotu 1,362; 25 µg/ml EGCG

způsobil značné snížení na 0,416 a 50 $\mu\text{g/ml}$ EGCG na 0,426 SSB/ 10^9 Da. EGCG snižuje indukce Endo III míst způsobených vysokými koncentracemi H_2O_2 (1 mM).



Graf č. 1. Vliv EGCG na indukci oxidativního poškození DNA u buněk AA8. Buňky byly inkubovány po dobu 24 h v přítomnosti uvedených koncentrací EGCG a potom ovlivněny H_2O_2 v koncentracích uvedených na grafu po dobu 5 min při 0° . Během zpracování byly buňky po vyjmutí z lyzačního roztoku (viz metody) ovlivněny endonukleázou III, která specificky štěpí oxidované pyrimidiny.

* statisticky významné snížení oproti buňkám ovlivněným pouze H_2O_2 ($p < 0,05$)

5.2 Vliv EGCG na opravu Endo III míst indukovaných H_2O_2 u buněk AA8

Buňky jsme ovlivnili roztokem H_2O_2 o koncentracích 0,25; 0,5 a 1 mM. (viz graf č. 2). Na kontrolní buňky jsme použili roztok PBS (0 mM H_2O_2). Některé buňky jsme zpracovávali ihned, na jiné jsme nechali působit různé koncentrace EGCG (6,25; 12,5; 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$) po dobu 30 minut a poté sledovali reparační účinnost EGCG. Jako kontrolu (0 $\mu\text{g/ml}$ EGCG) jsme použili roztok DMSO. Po lýze jsme buňky ovlivnili enzymem Endonukleázou III. Rozsah poškození DNA jsme zaznamenali jako počet zlomů na 10^9 Daltonů.

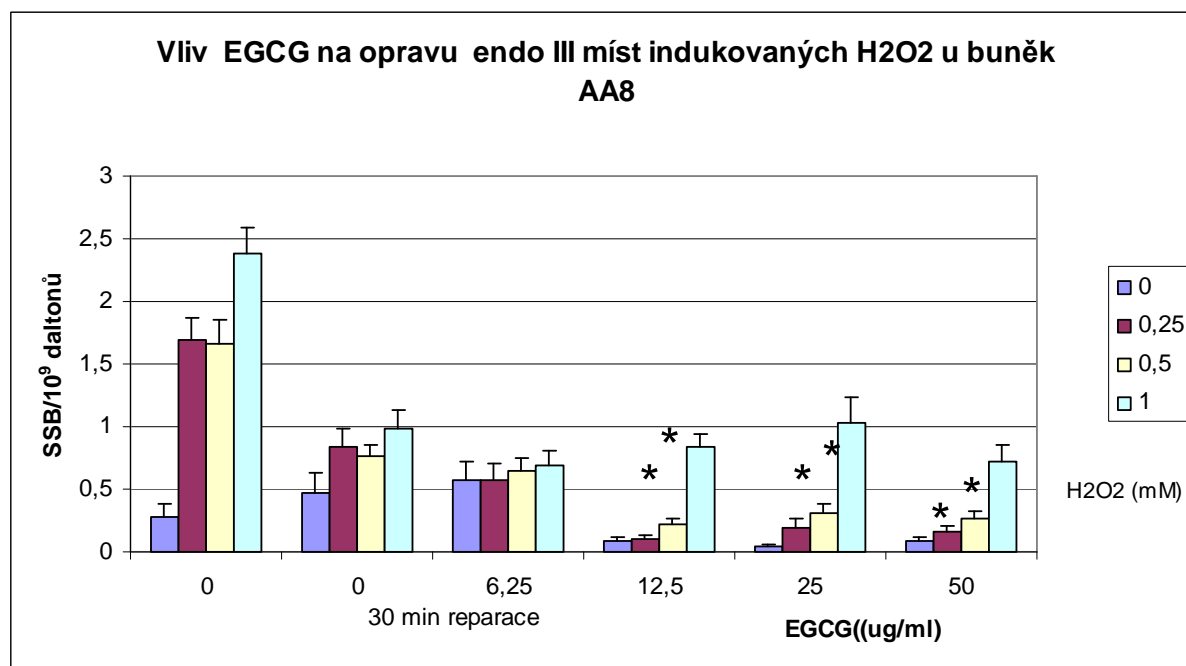
Se vzrůstající koncentrací H₂O₂ narůstalo poškození DNA jak u kontrolních buněk, tak i u buněk po 30- ti minutové reparaci. Reparace byla patrná i bez vlivu EGCG. Koncentrace H₂O₂ 0,25 mM vyvolala u kontrolních buněk poškození o rozsahu 1,689, po reparaci 0,833; 0,5 mM poškození 1,669, po reparaci sníženo na 0,763 a 1 mM poškození 2,388, po reparaci 0,982 SSB/10⁹ Da.

Výraznější snížení zlomů jsme pozorovali u reparace s EGCG. Při použití 0,25 mM H₂O₂ jsme zaznamenali snížení počtu zlomů z původní hodnoty kontrolních buněk 1,689 na hodnoty 0,576 u 6,25 µg/ml EGCG; 0,098 u 12,5 µg/ml EGCG; 0,190 u 25 µg/ml EGCG a 0,159 u 50 µg/ml EGCG.

Po ovlivnění buněk H₂O₂ o koncentraci 0,5 mM jsme z původní hodnoty kontrolních buněk 1,669 zaznamenali pokles při použití 6,25 µg/ml EGCG na hodnotu 0,647; 12,5 µg/ml EGCG vyvolal výraznější pokles na hodnotu 0,224; u 25 µg/ml EGCG poklesla hodnota na 0,316 a u 50 µg/ml EGCG na 0,268 SSB/10⁹Da.

Při použití 1 mM H₂O₂ jsme zaznamenali u kontroly hodnotu 2,388 SSB/10⁹Da. EGCG tuto hodnotu vždy snížil a to na hodnoty 0,697 (6,25 µg/ml EGCG); 0,844 (12,5 µg/ml EGCG); 1,030 (50 µg/ml EGCG) a 0,725 (50 µg/ml EGCG).

EGCG výrazně zlepšoval reparaci buněk AA8 po ovlivnění 0,25mM a 0,5 mM H₂O₂, zejména při koncentracích 12,5 µg/ml a vyšších.



Graf č. 2. Vliv EGCG na reparaci oxidativního poškození DNA indukovaného H₂O₂ u buněk AA8. Buňky byly ovlivněny H₂O₂ a během reparace po dobu 30 min byl přidán do média EGCG v uvedených koncentracích. U buněk byl kometovým testem stanoven současně počet SSB (horní graf) a počet míst citlivých k endonukléaze III (endo III místa)

* statisticky významné snížení oproti buňkám ovlivněným pouze H₂O₂ (p<0.05)

5.3 Oprava SSB, Endo III míst a FPG míst indukovaných H₂O₂

Za použití kometového testu jsme sledovali účinnost reparace jednořetězcových zlomů, míst oxidovaných pyrimidinů (Endo III míst) a oxidovaných purinů (FPG míst). (viz graf č. 3.)

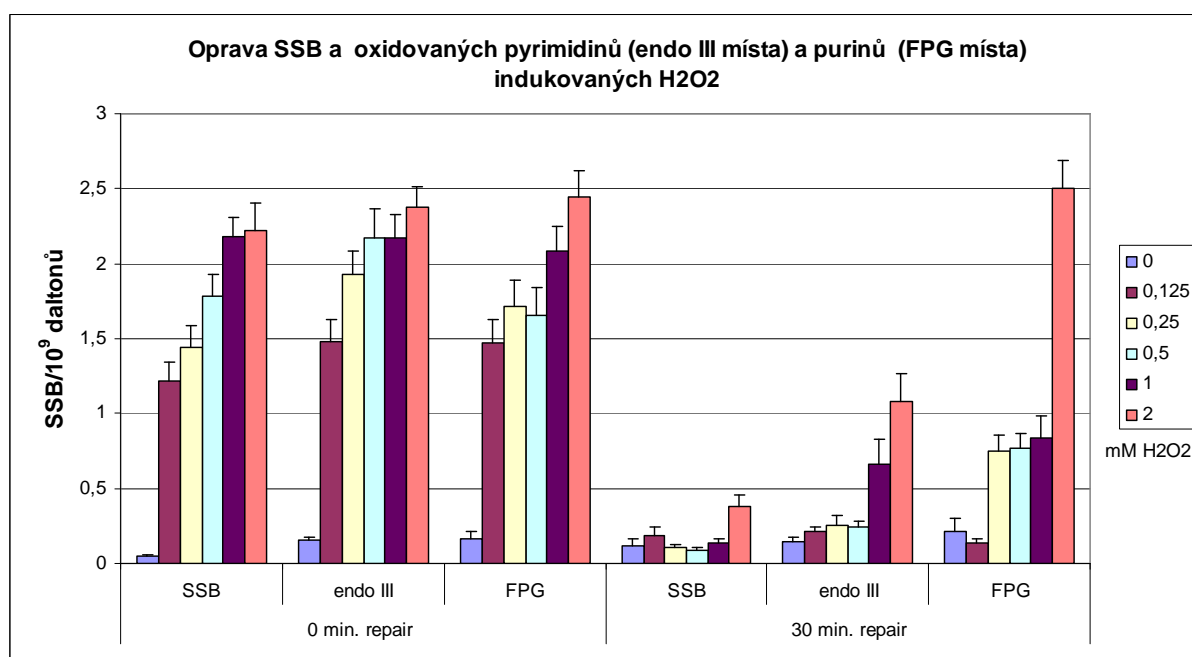
Na buňky jsme působili roztokem H₂O₂ o stoupajících koncentracích (0,125; 0,25; 0,5; 1 a 2 mM H₂O₂). Na kontrolní buňky jsme použili roztok PBS (odpovídá koncentraci H₂O₂ 0 mM). Část buněk jsme zpracovali ihned, druhou část jsme nechali 30 minut reparovat a sledovali rychlost opravy jednotlivých poškození. U detekce Endo III míst a FPG míst jsme po lýze buňky vystavili působení příslušných enzymů.

Se vzrůstající koncentrací H₂O₂ se zvyšují počty SSB, Endo III míst i FPG míst. Peroxid vodíku tedy způsobuje jednořetězcové zlomy, v DNA vznikají místa oxidovaných pyrimidinů a purinů, která příslušné enzymy převádí na jednořetězcové zlomy. V buňkách dochází k indukci reparačních mechanismů, které tato poškození odstraňují.

Nejúčinnější reparaci jsme zaznamenali u SSB, kde po 30- ti minutách byly téměř všechny zlomy opravené. Nejlepší reparační schopnosti bylo dosaženo při použití 1 mM H₂O₂, kde klesl počet SSB/10⁹ Da z hodnoty 2,184 po 30- ti minutové reparaci na hodnotu 0,139.

U detekce míst citlivých k endonukleáze III se také po 30- ti minutách většina poškození opravila, zejména při použití H₂O₂ do koncentrace 0,5 mM. Při použití 1 mM H₂O₂ klesl počet SSB z hodnoty 2,176 na hodnotu 0,661 po reparaci, u 2 mM H₂O₂ jsme zaznamenali pokles z původní hodnoty 2,380 na 1,077 SSB/10⁹Da.

Nejmenší reparační schopnost byla dosažena při detekci míst citlivých k enzymu formamidopyrimidin glykosyláze. Po ovlivnění buněk nejnižší koncentrací H_2O_2 (0,125 mM) nastala téměř úplná reparační schopnost, z hodnoty 1,471 na 0,137. Při použití vyšších koncentrací H_2O_2 jsme zaznamenali menší reparační schopnost. Při ovlivnění buněk 0,25 mM H_2O_2 došlo po 30- ti minutách ke snížení z 1,713 na hodnotu 0,749; u 0,5 mM H_2O_2 byla snížena hodnota z 1,658 na 0,770 a u 1 mM H_2O_2 došlo ke snížení z 2,089 na 0,837. U nejvyšší použité koncentrace H_2O_2 (2 mM) se hodnota 2,443 SSB/ 10^9 Da nepatrně zvýšila na hodnotu 2,503, zde k opravě míst oxidovaných purinů nedošlo.



Graf č. 3. Reparační schopnost oxidativního poškození DNA indukovaného H_2O_2 u buněk AA8. Buňky byly ovlivněny H_2O_2 po 30 min. byl u buněk kometovým testem stanoven současně počet SSB, počet míst citlivých k endonukleáze III (Endo III) a k formamidopyrimidin glykosyláze (FPG místa).

5.4 Vliv EGCG na reparaci oxidativního poškození DNA indukovaného H_2O_2 u buněk AA8

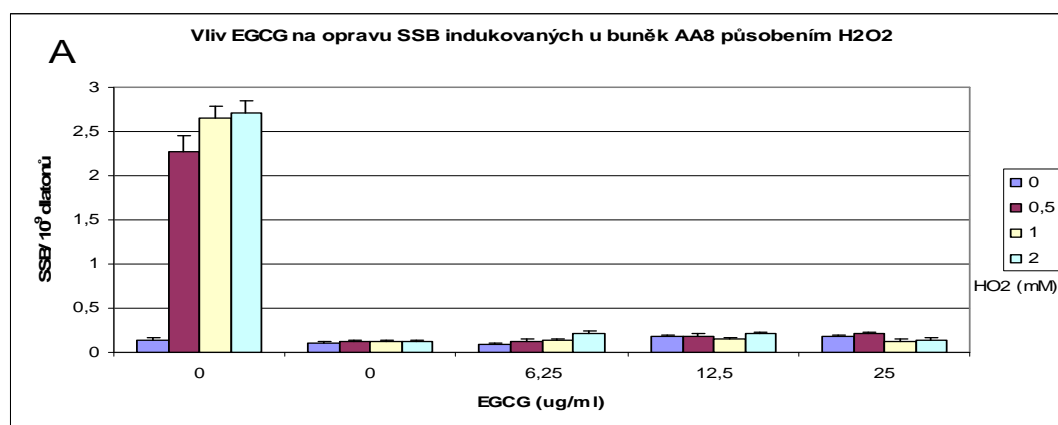
Tímto testem jsme prokazovali, zda má EGCG vliv na reparaci oxidativního poškození způsobené H_2O_2 . (viz graf č. 4)

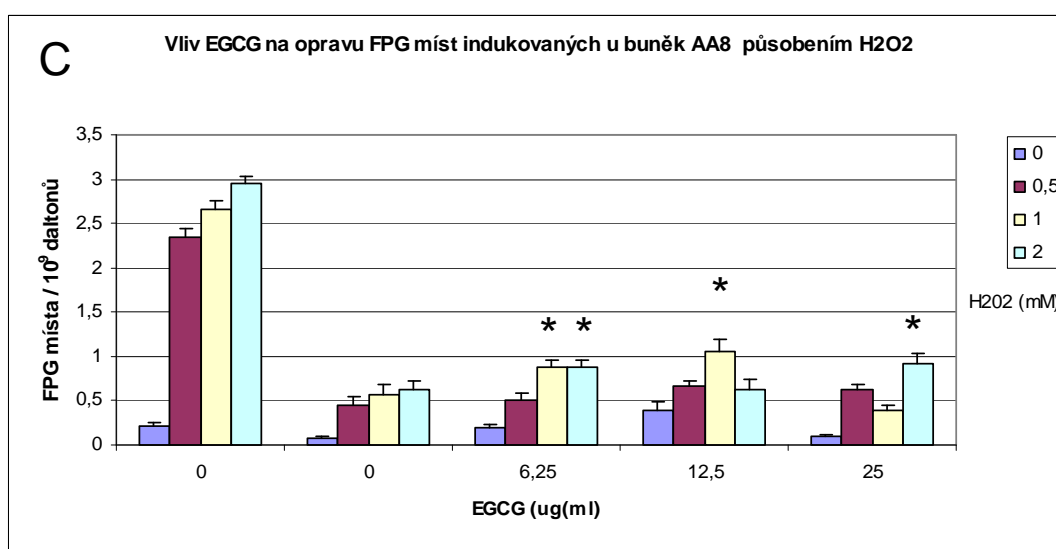
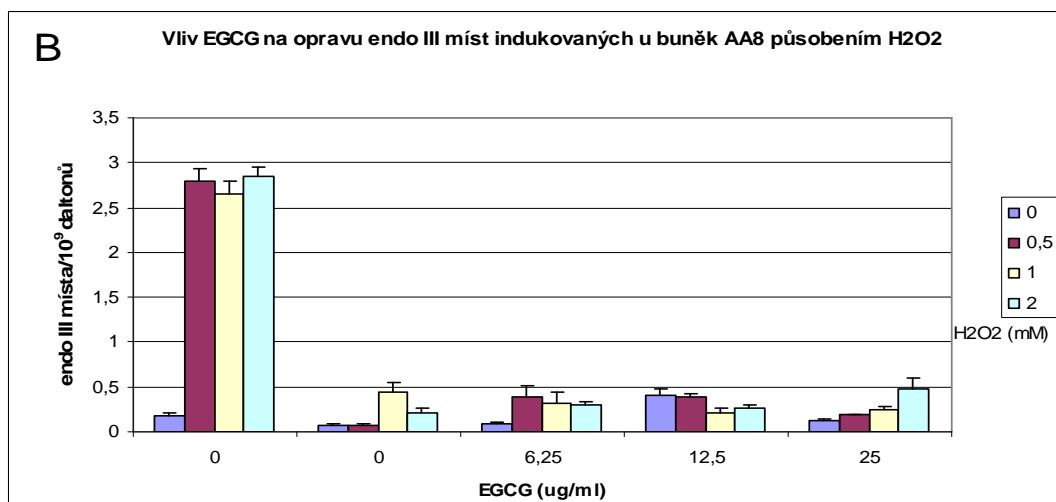
Buňky jsme ovlivnili H₂O₂ o koncentracích 0,5; 1 a 2 mM. Na kontrolní buňky jsme použili roztok PBS. Část buněk jsme zpracovávali ihned, část jsme ponechali 30 minut reparovat v médiu obsahujícím různé koncentrace EGCG (6,25; 12,5 a 25 µg/ml). Na kontrolní buňky jsme nechali působit roztok DMSO (0 µg/ml EGCG). Sledovali jsme účinnost reparace SSB, Endo III míst a FPG míst po 30- ti minutách. Výsledky jsme zaznamenávali jako počet SSB/10⁹Da.

Jednořetězcové zlomy se opravují velmi rychle, i při použití 2 mM H₂O₂ se po 30- ti minutách opravily téměř všechny jednořetězcové zlomy. Hodnoty po reparaci nepřesahují 0,3 SSB/10⁹ Da. Vliv EGCG zde tedy nemůžeme pozorovat.

Endo III místa se také reparují rychle, po 30- ti minutách byly získané hodnoty do 0,5 SSB/10⁹Da. Místa oxidovaných pyrimidinů byla opravena i při použití nulové koncentrace EGCG. EGCG opravu urychluje, ale tento efekt dokládá spíše graf č. 2.

Oprava FPG míst probíhá nejpomaleji. Za přítomnosti EGCG je reparace míst citlivých k FPG mírně zpomalena. Přesto jsme zaznamenali statisticky významné snížení SSB proti buňkám ovlivněným pouze H₂O₂ při použití 1 mM roztoku H₂O₂ z hodnoty 2,651 na hodnotu 0,873 u 6,25 µg/ml EGCG, resp. na hodnotu 1,057 u 12,5 µg/ml EGCG. Po ovlivnění buněk 2 mM H₂O₂ klesla hodnota 2,950 SSB/10⁹ Da na hodnoty 0,877 u 6,25 µg/ml EGCG a 0,921 u 25 µg/ml EGCG.





Graf č. 4. Vliv EGCG na reparaci oxidativního poškození DNA indukovaného H₂O₂ u buněk AA8. Buňky byly ovlivněny H₂O₂ a během reparace po dobu 30 min byl přidán do média EGCG v uvedených koncentracích. U buněk byl kometovým testem stanoven současně počet SSB (horní graf A), počet míst citlivých k endonukleáze III (Endo III místa, prostřední graf B) a k formamidopyrimidin glykosyláze (FPG místa, dolní graf C).

* statisticky významné snížení oproti buňkám ovlivněným pouze H₂O₂

6 DISKUZE

Jak již bylo uvedeno v teoretické části, samotný peroxid vodíku není pro buňku toxický. V přítomnosti Fe^{2+} však probíhá Fentonova reakce, která dává vzniknout nebezpečnému hydroxylovému radikálu.

Evans et al. (2004) popisuje mechanismus poškození DNA hydroxylovými radikály jako adici na dvojné vazby pyrimidinů a purinů. Hydroxylové radikály se přednostně váží na místa s vyšší elektronovou hustotou, vznikají tak různé adukty.

Volné radikály způsobují více modifikací DNA. Dochází k oxidaci bazí, cukerných zbytků, vznikají zlomy a tvoří se vazby mezi DNA a proteiny (tzv. cross links). K detekci oxidativního poškození je možno použít několik metod.

My jsme zvolili kometový test, který je velmi vhodnou metodou ke zjišťování genotoxicity a k testování účinků antioxidantů, v našem případě EGCG. K výhodám této metody patří jednoduchost provedení, rychlost, citlivost a při použití specifických enzymů také selektivita.

Jinou možností detekce je využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tuto detekci využil ve svých experimentech *Kasai (2002)*. Sledoval oxidované produkty DNA pomocí HPLC s UV detekcí využívající diodové pole.

Dizdaroglu et al. (2002) popisuje využití chromatografických metod spojených s hmotnostní spektrometrií (MS). Měření těmito metodami umožňuje identifikaci vzniklých aduktů a jejich kvantifikaci.

My jsme v této práci sledovali, zda má EGCG vliv na indukci oxidativního poškození DNA. Nechali jsme na buňky působit 24 hodin EGCG a poté je vystavili účinku peroxidu vodíku. Použili jsme enzym endonukleázu III k detekci míst oxidovaných pyrimidinů. Specifické enzymy nám umožňují odlišit oxidativní poškození od ostatních změn v molekule DNA. Během pokusu dochází k narušení integrity DNA, která se projeví vznikem malého množství zlomů i u buněk, které nebyly vystaveny účinkům peroxidu vodíku. Při použití specifických enzymů pak dojde k navýšení počtu zlomů pouze v místech výskytu oxidovaných bazí, a proto můžeme s největší pravděpodobností usuzovat na oxidativní změny vyvolané peroxidem vodíku.

Vliv EGCG zkoumal i *Kanadzu (2006)*. Ve svém pokusu sledoval prooxidační a antioxidační účinek EGCG, který byl již zmiňován v předchozích studiích. Pracoval s lidskými lymfocyty, poškození detekoval pomocí kometového testu. Dospěl k závěru, že EGCG v nižších koncentracích potlačuje tvorbu zlomů v DNA, zatímco vyšší koncentrace indukují zlomy v lymfocytech. Potvrdil tak jeho dvojí funkci- prooxidační a antioxidační.

Vlivem flavonoidů na oxidativní změny DNA se zabývali také *Johnson et al. (2000)*. Ve svých pokusech zkoumali vliv EGCG, quercetinu a dalších polyfenolů. EGCG vykazoval největší účinnost v ochraně před volnými radikály. Poškození sledovali na T- lymfocytech Jurkat, používali také kometový test. Potvrdili již dříve zmíněnou tezi, že nízké koncentrace EGCG (a quercetinu) snižují rozsah oxidativního poškození, zatímco vysoké koncentrace těchto látek se podílí na poškození DNA.

Sugisawa et al. (2002) ve své studii také prokazují jak prooxidační, tak antioxidační účinky EGCG. Zkoumali vliv EGCG na chromozomální poškození u buněk WIL2-NS. Dospěli k závěru, že EGCG o koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ vyvolává poškození chromozomů. Naproti tomu nižší koncentrace EGCG ($<10 \mu\text{mol/l}$) buňku před chromozomálním poškozením ochraňuje. Výsledkem jeho studie bylo, že EGCG ve fyziologických koncentracích ($<1 \mu\text{mol/l}$) není toxické, naopak, že chrání buňky před chromozomálními změnami vyvolanými reaktivními sloučeninami kyslíku.

My jsme v testu zkoumali různé koncentrace EGCG. Dospěli jsme k závěru, že EGCG potlačuje indukci zlomů DNA způsobených peroxidem vodíku a to zejména v nejvyšších použitých koncentracích- 25 a 50 $\mu\text{g/ml}$. Významného snížení zlomů však bylo dosaženo i při použití 3,125 $\mu\text{g/ml}$ EGCG. Tento výsledek potvrzuje antioxidační vliv EGCG. Po 24 hodinové inkubaci s EGCG se buňky dokázaly lépe chránit před oxidativním poškozením vyvolaném peroxidem vodíku.

Zároveň však inkubace se samotným EGCG bez pozdějšího ovlivnění peroxidem vodíku vedla při použití největší koncentrace EGCG 50 $\mu\text{g/ml}$ k nárůstu počtu zlomů oproti kontrole. Také nízká koncentrace peroxidu vodíku (0,25 mM) vyvolala u kontrol nižší počet zlomů než u buněk s preinkubací v médiu obsahujícím EGCG. Tyto výsledky by mohly dokládat jeho prooxidační účinky.

Dále jsme sledovali účinek EGCG, který byl k buňkám přidán až po jejich ovlivnění peroxidem vodíku. Opět jsme detekovali pouze poškození v místech vzniku oxidovaných

pyrimidinů a purinů za použití specifického enzymu endonukleázy III. Buňky jsou vybaveny různými mechanismy, které slouží k odstranění poškození DNA. Zajímalo nás, zda jsou tyto mechanismy urychleny v přítomnosti EGCG.

Po 30- ti minutové reparaci došlo k částečné opravě Endo III míst i v nepřítomnosti EGCG. Po působení EGCG jsme však mohli pozorovat ještě účinnější reparaci a to zejména při koncentraci 12,5 $\mu\text{mol/ml}$ a vyšších. EGCG výrazně zlepšoval reparaci po ovlivnění buněk peroxidem vodíku o koncentraci 0,25 a 0,5 mM. Při použití vyšší koncentrace (1 mM) nebyla oprava natolik účinná.

Nejvíce se při odstraňování oxidativního poškození uplatňuje mechanismus bazové excizní reparace.

Abychom ověřili vliv EGCG na opravu různých typů oxidovaných bází, pokusili jsme se nejdříve zjistit rozdíly v rychlosti opravy jednořetězcových zlomů, oxidovaných pyrimidinů a purinů za využití endonukleázy III a míst oxidovaných purinů za využití enzymu formamidopyrimidin glykosylázy.

Výsledky ukázaly, že nejrychleji se opravují jednořetězcové zlomy. Po 30- ti minutové reparaci jsme nenalezli téměř žádné poškození. Reparace Endo III míst byla také velice účinná. Do koncentrace 0,5 mM H_2O_2 došlo za 30 minut téměř k úplné opravě. Reparace rozsáhlejšího poškození způsobená vyššími koncentracemi H_2O_2 vykazovala menší účinnost, přesto došlo ke značnému snížení počtu zlomů.

Nejpomaleji se opravují místa oxidovaných purinů. Zlomy se opravily pouze při použití nejnižší koncentrace peroxidu vodíku (0,125 mM). Při vyšších koncentracích H_2O_2 došlo jen k částečné opravě, u nejvyšší použité koncentrace H_2O_2 (2 mM) došlo dokonce k nepatrnému navýšení počtu zlomů.

Naším hlavním cílem bylo zjistit, jestli je reparace oxidativního poškození DNA urychlena v přítomnosti EGCG, příp. jakými mechanismy EGCG k reparaci přispívá.

Stejnou otázkou se zabývali i *Anderson et al. (2001)*. Zkoumali, jakými mechanismy katechiny pracují při odstraňování volných radikálů. Snažili se prokázat význam katechinů mimo jejich roli v přímém vychytávání hydroxylového radikálu. Jejich výzkum podpořil teorii, že katechiny působí při reparaci jako přenašeči elektronů, resp. vodíku. Tento mechanismus také přispívá k redukci poškození DNA. Prokázali pozitivní vliv EGCG na

reparaci jednořetězcových zlomů i míst oxidovaných bází a to zejména při vyšších koncentracích EGCG.

Již zmiňovaný *Johnson et al. (2000)* se zabývali při svých pokusech mechanismem účinku flavonoidů. Prokazovali jejich roli v přímém vychytávání volných radikálů za využití spektrofotometrie. Předpokládali, že tyto reakce jsou umožněny díky chemické struktuře polyfenolických látek. Největší účinnost ve vychytávání volných radikálů byla prokázána u EGCG, který obsahuje ve své molekule osm hydroxy- skupin. Také připouští mechanismus chelatace kovových iontů, čímž se zabrání vzniku hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku.

V naší práci jsme zjistili, že EGCG zřejmě nemá podstatný vliv na opravy jednořetězdových zlomů DNA. Oprava jednořetězcových zlomů DNA probíhá velmi rychle a v našich podmínkách jsme nebyli schopni zjistit, zda je nějak ovlivněna působením EGCG. I při ovlivnění buněk nejvyšší koncentrací H₂O₂ (2 mM) došlo k téměř úplné opravě zlomů, vliv EGCG zde tedy nemůžeme hodnotit.

Oprava Endo III míst je také velmi účinná. Efekt EGCG na opravu Endo III míst demonstruje výsledek pokusu uvedený na grafu č. 2. Oprava Endo III míst, které představují oxidované pyrimidiny, by tak mohla hrát podstatnou roli v cytotoxickém i genotoxickém působení oxidovaných bází DNA.

Nejpomaleji se opravují místa oxidovaných purinů (FPG místa). Zde je patrný vliv EGCG, který zpomaloval opravu především u buněk, které byly vystaveny peroxidu vodíku o koncentracích 1 a 2 mM. Po 30 min reparace poškození DNA indukovaného H₂O₂ byl počet zlomů byl oproti kontrolám zvýšen při všech použitých koncentracích EGCG.

Výsledky naší práce potvrzují, že EGCG kromě antioxidačního účinku je také schopen urychlovat reparaci poškozené DNA. Jeho vliv na reparaci DNA však není stejný. Prakticky není ovlivněna oprava přímých zlomů DNA, urychlena je pouze oprava oxidovaných pyrimidinů. Naproti tomu oprava oxidovaných purinů může být působením EGCG částečně zpomalena.

7 ZÁVĚR

Výsledky našich pokusů dokazují, že EGCG působil na buňky vystavené pozdějšímu působení peroxidu vodíku protektivně a snižoval indukci oxidativního poškození DNA. Samotný EGCG ve vyšších koncentracích (nad 50 $\mu\text{g/ml}$) však indukoval zlomy DNA, což může svědčit o jeho pro-oxidačních vlastnostech.

Dále jsme zkoumali rychlost opravy jednotlivých poškození DNA a jejich ovlivnění EGCG. Opravy jednořetězcových zlomů probíhaly nejrychleji, zde jsme vliv EGCG nemohli posoudit. Místa výskytu oxidovaných pyrimidinů (Endo III místa) se také opravovala velice rychle. V přítomnosti EGCG byla oprava ještě účinnější. Jako nejpomalejší se ukázala oprava míst oxidovaných purinů (FPG míst). Působením EGCG byla oprava tohoto typu poškození mírně zpomalena. EGCG tedy působí rozdílně na různá poškození vyvolaná působením peroxidu vodíku. Na vznik jednořetězcových zlomů nemá žádný vliv, opravu Endo III míst urychluje, reparaci FPG míst částečně zpomaluje.

Další výzkum by měl směřovat k vysvětlení mechanismů, jakými EGCG ovlivňuje reparaci poškozené DNA. Již nyní je známo, že EGCG nepůsobí pouze jako scavenger volných radikálů. Zatím neznámým způsobem ovlivňuje excizní reparaci. Tyto mechanismy však ještě nebyly dostatečně objasněny.

8 ZDROJE

1. Anderson, R. F. - Fisher, L. J. - Hara, Y. et al. Green tea catechins partially protect DNA from ·OH radical- induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*, 2001, vol. 22, no. 8, s. 1189- 1193.
2. Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 2004, vol. 26, s. 249- 261.
3. Collins, A. R. – Oscoz, A. A. – Brunborg, G. et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 2008, vol. 23, no. 3, s. 143- 151.
4. Collins, A. R. - Dobson, V. L. - Dušinská, M. et al. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research*, 1997, vol. 375, s. 183-193.
5. Dizdaroglu, M. – Jaruga, P. – Birincioglu, M. et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology and medicine*, 2002, vol. 32, no. 11, s. 1102- 1115.
6. Evans, M. D. - Dizdaroglu, M. - Cooke, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research*, 2004, vol. 567, s. 1-61.
7. Friedberg, E.C. - Walker, G.C. - Siede, W. *DNA repair and mutagenesis*. Washington: ASM Press, 1995. 698s. ISBN 1-55581-088-8.
8. Johnson, M.K. - Loo, G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research*, 2000, vol. 459, s. 211- 218.
9. Kanadzu, M. - Lu, Y. - Morimoto, K. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes. *Cancer letters*, 2006, vol. 241, s. 250- 255.

10. Kasai, H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free radical biology and medicine*, 2002, vol. 33, no. 4, s. 450- 456.
11. Nečas, O. a kol. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 1. vydání. Jinočany: H & H, 2000. 554s. ISBN 80-86022-46-3.
12. Racek, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. vydání. Praha: Galén, 2003. 89s. ISBN 80-7262-231-5.
13. Rosypal, S. *Úvod do molekulární biologie, Třetí díl*. 3. inovované vydání. Brno, 2000. ISBN 80-902562-2-8.
14. Sugisawa, A. - Umegaki, K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *Biochemical and molecular actions of nutrients*, 2002, s. 1836- 1839.
15. Štípek, S. a kol. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing, 2000. 320s. ISBN 80-7169-704-4.