

## Abstrakt

V naší práci jsme zjišťovali druh a rozsah poškození způsobeného sirtým yperitem za použití kometového testu. Sirtý yperit patří mezi bojové chemické látky a je zařazen do kategorie zpuchýřující látek. Reaguje s velkým množstvím buněčných makromolekul (např. DNA, RNA a proteiny). Indukuje alkylaci DNA.

Kometový test je univerzální a citlivá metoda pro měření jednoduchých a dvojitých zlomů, pyrimidinových dimerů indukovaných UV zářením, oxidovaných bází a alkylačních poškození DNA.

Cílem naší práce bylo zjistit, jak mohou souviset rozvolněné fragmenty DNA s množstvím zlomů. Dále jsme se zajímali o mechanismus poškození molekuly DNA v buňkách způsobené sirtým yperitem.

Byly použity buněčné linie HeLa, UV-20, A549 a AA8. Nejprve jsme studovali vliv mezi křížovými vazbami způsobenými sirtým yperitem a zlomy způsobenými styrenoxidem. Zjistili jsme, že sirtý yperit je schopen tvořit křížové vazby už při velmi nízkých koncentracích, čímž zabraňuje rozvolnění fragmentů DNA způsobených zlomy.

Pomocí enzymů jsme zjišťovali druh poškození DNA indukovaného sirtým yperitem. Nejprve jsme použili endonukleasu III (Endo III). Endo III je protein z *E. coli*, který pracuje jako N-glykosylasa i jako AP-lyasa. Způsobuje zlomy v apurinových místech nebo v místech oxidativního poškození molekuly DNA. Postupně jsme srovnávali efekty Endo III a styrenoxidu. Podobně jsme použili enzym Alk A, který katalyzuje odstranění 3-methyladeninu a 7-methylguaninu stejně jako některá ostatní minoritní místa alkylačního poškození molekuly DNA.

Použitím buněk UV-20 v testech s enzymy jsme mohli zúžit okruh druhů lézí DNA způsobených sirtým yperitem, právě díky neschopnosti těchto buněk provádět nukleotidovou excizní reparaci. UV-20 pravděpodobně využívají jiných druhů oprav, např. bázovou excizní reparaci. Tato je zodpovědná za odstranění poškozených bází DNA (např. oxidovaných a alkylovaných).

Zjistili jsme, že zatímco křížové vazby vznikají již při nízkých koncentracích sirtého yperitu, jeho vysoké dávky pravděpodobně způsobují i jiné druhy poškození. Mohly by to být oxidativní nebo apurinové léze, a nebo jiné druhy poškození, které jsou citlivé k Endo III. A mohly by to být alkylační léze citlivé k Alk A. Myslíme si, že by mohlo jít o monoadukty guaninu.