

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Mgr. Petra Fikrová

Školitel: Doc. PharmDr. Miloslav Hronek, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Název disertační práce: Hodnocení poškození a reparace DNA u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem vzhledem k farmakoterapii deriváty platiny

Rakovina plic je nejčastější celosvětovou příčinou úmrtí spojeného s rakovinou. Tento typ rakoviny je rozdělován do dvou podtypů a to malobuněčného a nemalobuněčného plicního karcinomu. Chemoterapie deriváty platiny je základním kamenem léčby pokročilých stádií nemalobuněčného plicního karcinomu, kterému je tato práce věnována. Cílem této práce bylo zjistit, zda-li je možné využít metodu kometového testu pro monitorování průběhu léčby u těchto pacientů a jestli jsme schopni předpovídat pacientovu odpověď na léčbu či případně i přežití pacienta.

Pro měření poškození jsme tedy používali základní verzi kometového testu či jeho modifikaci pro měření oxidačního poškození DNA a námi validovanou modifikaci pro měření křížových vazeb v DNA. Tato hodnocení probíhala buď *in vitro* na HeLa buňkách a periferních

lymfocytech od zdravých dárců z Transfuzní stanice Fakultní nemocnice v Hradci Králové, nebo v rámci studie v periferních lymfocytech pacientů trpících nemalobuněčným plicním karcinomem, kteří jsou léčeni deriváty platiny na onkologickém stacionáři plicní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Oxidační poškození DNA jsme dále proměřovali pomocí ELISA, kdy jsme hodnotili hladinu 8-OHdG v moči.

Nejprve jsme validovali metodu kometového testu pro měření křížových vazeb v DNA za použití mutagenu styrenoxidu, který vytváří zlomy v DNA. Metoda byla kalibrována v *in vitro* podmínkách na HeLa buňkách a lidských lymfocytech od zdravých dárců. Prokázali jsme, že jsme schopni pomocí této metody v DNA detekovat na dávce cisplatiny závislou tvorbu křížových vazeb. Výsledky následně byly ověřeny i v *in vivo* podmínkách, kdy jsme zjistili, že i přes výrazné inter-individuální rozdíly, jsme schopni u pacientů detekovat změny v tvorbě a reparaci křížových vazeb v průběhu chemoterapeutické léčby. V další části jsme hodnotili poškození a reparaci DNA pomocí měření jednořetězcových zlomů, křížových vazeb a změn v hladinách reparačních kapacit (bázové a nukleotidové excizní reparace) v průběhu chemoterapie. Navíc jsme se pak ještě zaměřili na změny hladin oxidačního poškození v průběhu chemoterapie. Hodnoty poškození a reparace pacientů jsme také porovnávali k hodnotám věkově odpovídajících zdravých jedinců. Při porovnání pacientů a kontrol jsme zjistili zejména signifikantně vyšší hladinu bázové excizní reparace u kontrolní skupiny, zatímco hladina nukleotidové excizní reparace byla u obou skupin v podstatě stejná. U pacientů v průběhu léčby jsme pak zjistili signifikantně vyšší hladiny jednořetězcových zlomů v DNA při měření hned po podání chemoterapeutické dávky v rámci jednotlivých cyklů chemoterapie. Podobné výsledky jsme dostali i při měření křížových vazeb, tedy že největší procento křížových vazeb v DNA nalezneme hned po dokapání chemoterapeutické dávky nebo jeden den po podání této dávky. Zjistili jsme také, že počet jednořetězcových zlomů narůstá v průběhu celé chemoterapie (i když nesignifiakntně) a že po skončení celé chemoterapie (všech cyklů) můžeme v DNA najít residuální křížové vazby, které tam perzistují. Dále jsme porovnali vstupní hodnoty reparačních kapacit u pacientů, kteří absolvovali celou chemoterapii, a u pacientů, kteří v průběhu ní zemřeli. Dostali jsme podobné výsledky jako v případě porovnání skupiny pacientů a kontrol, tedy že ačkoli hladina nukleotidové reparace byla u obou skupin téměř stejná, hladina

bázové excizní reparace byla v případě skupiny pacientů, kteří absolvovali celou chemoterapii, vyšší.

Data z naší pilotní studie potvrzují, že lze pomocí modifikovaného kometového testu užitím mutagenu styrenoxidu monitorovat změny v tvorbě a reparaci křížových vazeb *in vitro* a také u pacientů v průběhu chemoterapeutické léčby. Dále jsme potvrdili výsledky jiných studií, zabývajících se poškozením DNA při maligním onemocnění, jeho následné léčbě a spojitosti nedostatečné účinnosti bázové excizní reparace jako rizikového faktoru těchto onemocnění. Navíc naše výsledky naznačují, že ačkoli je cisplatina z DNA odstraňována nukleotidovou excizní reparací, bázová excizní reparace hraje v klinickém stavu pacienta a v jeho přežití také velmi významnou roli.