

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických vied

**DETEKCIA OXIDAČNÉHO POŠKODENIA DNA POMOCOU
METÓDY COMET ASSAY**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Externý konzultant diplomovej práce: Prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Hradec Králové 2016

Terézia Kúdelová

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Kompletná literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som čerpala pri spracovaní tejto práce, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované.“

Dátum

Podpis

Mnohokrát ďakujem Prof. Rudolfovi Štětinovi, CSc. za možnosť zúčastniť sa na vedeckom výskume na Katedre toxikológie a vojenskej farmácie a vypracovať na tejto katedre svoju diplomovú prácu. Zároveň by som sa mu chcela poďakovať za odborné vedenie. Rovnako veľké poďakovanie patrí Doc. Barbore Szotákovej, Ph.D., ktorá ma po celú dobu spisovania tejto práce viedla tak po odbornej, ako aj formálnej stránke a pani laborantke Věře Škrancovej za veľkú pomoc pri vykonávaní jednotlivých experimentov.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Prahe

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Terézia Kúdelová

Školiteľ: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Školiteľ špecialista: Prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Názov diplomovej práce: Detekcia oxidačného poškodenia DNA pomocou metódy Comet Assay

Opravné mechanizmy majú v organizme dôležitú úlohu. Pri poruche týchto mechanizmov vzniká nerovnováha, čo môže viesť k indukcii mnohých ochorení. Táto práca je zameraná na ochranu DNA pred oxidačným poškodením. Schopnosť ľudských buniek A549 poradiť si s oxidačným stresom bola sledovaná v podmienkach *in vitro*. Oxidačné poškodenie bolo indukované peroxidom vodíka (H_2O_2), ktorý v DNA inicioval vznik jednoreťazcových zlomov (SSBs) a súčasne oxidáciu pyrimidínových a purínových báz. Mechanizmus poškodenia a reparácie sa sledoval dvoma spôsobmi. V prvom prípade sa bunky najskôr ošetrili antioxidantom, a následne sa vystavili pôsobeniu H_2O_2 . V druhom prípade sa bunky najskôr poškodili H_2O_2 , a následne sa nechali reparovať s pridaním antioxidantnej látky. Testovanými antioxidantmi boli epigalokatechin galát (EGCG), glutathion (GSH) a jeho chemické modifikácie – S-allyldithiogluthation (GSH-A) a S-allyltrithiogluthation (GSH-B). Rozsah poškodenia DNA sa odhadoval pomocou metódy Comet Assay v alkalickej verzii, ktorá umožnila rozpad alkalilabilných miest vytvorených v dôsledku oxidačného poškodenia. Špecifické enzýmy, endonukleáza III (Endo III) a formamidopyrimidín-DNA glykozyláza (Fpg), sa použili k detekcii oxidovaných báz. Výsledky jednotlivých experimentov poukazujú na významný terapeutický efekt EGCG spočívajúci v inhibícii indukcie oxidačného poškodenia DNA a zároveň na jeho pozitívny vplyv pri oprave poškodenej DNA. Inhibičný vplyv na indukciu poškodenia bol u látok GSH, GSH-A a GSH-B zaznamenaný hlavne pri použití nižších koncentrácií. Výsledky tejto práce by mohli byť východiskom pre ďalší výskum zaoberajúci sa vznikom závažných ochorení u človeka v spojitosti oxidačného poškodenia DNA.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Terézia Kúdelová

Supervisor: Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Consultant: Prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Title of diploma thesis: Detection of the oxidative damage of DNA by the Comet Assay

The reparative mechanisms have a very important role in organisms. Imbalance develops due to disruption of these mechanisms, which can lead to induction of many disorders. The aim of this diploma thesis was to study protection of DNA against oxidative damage. The ability of A549 cell line to cope with this damage was studied *in vitro*. Oxidative damage was induced by hydrogen peroxide (H₂O₂), which initiated induction of single strand breaks (SSBs) and at the same time oxidation of pyrimidine and purine bases. Mechanism of damage and reparation was detected by two methods. In the first case, cells were treated with antioxidant and then influenced by H₂O₂. In the second case, cells were influenced by H₂O₂ and then let to repair in the presence of antioxidants. Tested antioxidants were epigallocatechin gallate (EGCG), glutathione (GSH) and chemical modifications of GSH – S-allyldithioglutathione (GSH-A) and S-allyltrithioglutathione (GSH-B). The extent of damage was assessed using by alkaline version of Comet Assay, which allowed the disintegration of alkali labile sites induced by oxidative damage. Specific enzymes, the endonuclease III (EndoIII) and formamidopyrimidine-DNA-glykosylase (Fpg) were used for detection of oxidized bases. The results suggest a significant therapeutic effect of EGCG which inhibits the induction of oxidative damage of DNA and has a positive effect to reparation of the damaged DNA. GSH, GSH-A and GSH-B at low concentrations inhibit the induction of DNA damage as well. The results of this research would be base for next research, dealing with the serious disorders connected with oxidative damage of DNA in humans.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEÓRIA	10
2.1 <i>Oxidačný stres</i>	10
2.1.1 Radikály odvodené od kyslíka	12
2.1.1.1 Superoxid	12
2.1.1.2 Peroxid vodíka	13
2.1.1.3 Kyselina chlórna.....	13
2.1.2 Radikály odvodené od dusíka	14
2.1.2.1 Oxid dusnatý	14
2.1.2.2 Peroxynitrit.....	14
2.2. <i>Príčiny vzniku poškodenia DNA</i>	15
2.3 <i>Antioxidanty</i>	16
2.3.1 Karotenoidy a ich vplyv na organizmus.....	18
2.3.2 Kyselina askorbová	19
2.3.3 Vitamín E.....	19
2.3.4 Glutathion	19
2.3.4.1 Súvislosť hladín GSH u vybraných ochorení.....	21
2.3.5 EGCG.....	22
2.4 <i>Detekcia poškodenia</i>	25
2.4.1 Stanovenie produktov nukleových kyselín v dôsledku oxidačného stresu.....	26
2.4.2 Comet Assay	27
2.4.3 Princíp využitia reparačných enzýmov pri stanovení oxidačného poškodenia	31
2.4.3.1 Endonukleáza III (Endo III)	34
2.4.3.2 Formamidopyrimidín-DNA glykozyláza (Fpg)	35
3. CIEĽ	36
4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	37
4.1 <i>Materiál</i>	37
4.1.1 Bunková línia A549	37
4.1.2 Chemikálie	37
4.1.3 Prístroje a pomôcky	37
4.1.4 Programy.....	38
4.2 <i>Roztoky pre Comet assay, ich príprava a použitie</i>	38
4.2.1 Agaróza na potáhovanie sklíčok.....	38
4.2.2 Vysokotuhnúca agaróza HMP.....	38
4.2.3 Nízkotuhnúca agaróza LMP.....	38
4.2.4 Lyzačný roztok.....	39
4.2.5 ENDO III pufor.....	39
4.2.6 Príprava elektroforetického pufru	39
4.2.7 Neutralizačný roztok	40
4.2.8 Ethidium bromid	40
4.3 <i>Comet Assay - metóda jednobunkovej elektroforézy</i>	40

4.3.1	Vysievanie buniek.....	41
4.3.2	Ovplyvnenie buniek A549	41
4.3.3	Postup pri poškodení buniek A549 vplyvom H ₂ O ₂	42
4.3.4	Trypsinizácia a príprava suspenzie buniek.....	43
4.3.5	Príprava sklíčok	43
4.3.6	Lýza buniek.....	43
4.3.7	Odstránenie oxidovaných báz použitím reparačných enzýmov	44
4.3.8	Denaturácia DNA a elektroforéza.....	44
4.3.9	Neutralizácia	44
4.3.10	Farbenie sklíčok EB a vyhodnocovanie pomocou počítačovej analýzy	45
5.	VÝSLEDKY	46
5.1	<i>Eliminácia poškodenia DNA v dôsledku oxidačného stresu.....</i>	46
5.1.1	Vplyv GSH, GSH-A a GSH-B na inhibíciu tvorby SSBs a oxidačného poškodenia pyrimidínov	46
5.1.1.1	Vplyv GSH na tvorbu oxidačného poškodenia DNA a opravu Endo III senzitivných miest u buniek A549	47
5.1.1.2	Antioxidačné účinky GSH-A na úrovni DNA u buniek A549 vystavených oxidačnému stresu	52
5.1.1.3	Vplyv GSH-B na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549.....	59
5.1.2	Účinky EGCG na indukciu a opravu poškodenej DNA v dôsledku oxidačného stresu u buniek A549.....	65
5.1.2.1	EGCG a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549.	66
5.1.2.2	Vplyv EGCG na opravu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549.....	68
6.	DISKUSIA.....	83
7.	ZÁVER.....	88
8.	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	89
9.	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	95

1. ÚVOD

Reparačné mechanizmy zabezpečujú správne fungovanie celého organizmu. Významné uplatnenie majú pri pôsobení oxidačného stresu, ktorý je hlavným iniciátorom vzniku voľných radikálov. Oxidačná záťaž môže byť spôsobená exogénnymi ako aj endogénnymi faktormi. Dlhá expozícia organizmu týmto podmienkam vedie k jeho preťaženiu, čo má za následok narušenie rovnováhy. Reparačné mechanizmy „nestíhajú“ dávať do poriadku škody spôsobené produktmi oxidačného stresu, čím dochádza k poruche jednotlivých komponent bunky. Hlavnými cieľovými štruktúrami pre voľné radikály bývajú predovšetkým bielkoviny, lipoproteíny a DNA.

Do tohto „ničivého“ procesu vstupujú zlúčeniny s protektívnymi účinkami. Jedná sa hlavne o látky s antioxidačnými vlastnosťami. Svojou aktivitou zabraňujú oxidácii dôležitých bunkových štruktúr, zabezpečujú správne fungovanie bunkových mechanizmov, reagujú s voľnými radikálmi za vzniku menej agresívnych radikálových zlúčenín a pod. . Spomenuté účinky, a ešte mnoho ďalších, chránia organizmus pred oxidačným poškodením a zároveň sa podieľajú na oprave už vzniknutého poškodenia. Svojimi účinkami sa antioxidačné zlúčeniny stavajú naproti oxidačnému stresu, čím dostávajú organizmus opäť do rovnovážneho stavu.

Z teoretických poznatkov o účinkoch antioxidantov sa mnoho vedeckých prác zaoberá skúmaním ich vplyvov, ako *in vitro* tak aj *in vivo*, predovšetkým v spojitosti so vznikom závažných ochorení ako sú kardiovaskulárne ochorenia, neurodegeneratívne poruchy alebo diabetes mellitus.

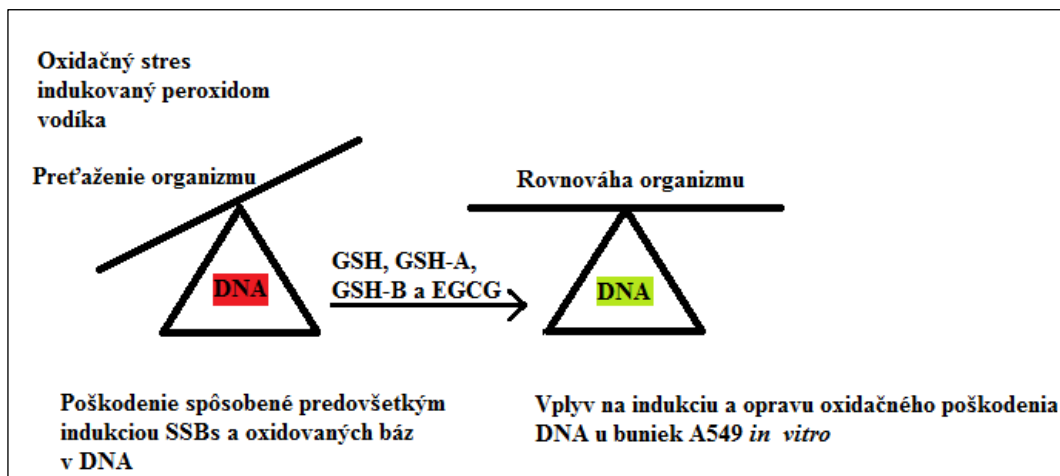
Jedným z najvýznamnejších endogénnych antioxidantov, ktorému je v súčasnosti venovaná veľká pozornosť, je glutathion (GSH). GSH je dôležitou zlúčeninou, ktorá nachádza uplatnenie v rade oblastí zaoberajúcich sa jej ochrannými účinkami proti oxidačnému stresu, vplyvom na účinky a mechanizmus niektorých liečiv, a zásahom do eliminácie xenobiotík, prípadne toxických kovov. Ďalej sa hľadajú súvislosti s koncentračnými hladinami GSH pri jednotlivých ochoreniach a podobne.

Takisto sa sleduje vplyv antioxidačných látok, ktoré sa nachádzajú v ľahko dostupných prírodných zdrojoch. Jedným z príkladov je epigalokatechín galát (EGCG), flavonoidná zlúčenina s protektívnymi účinkami proti oxidačnému stresu. Je predmetom pomerne obsiahleho výskumu týkajúceho sa jeho vplyvu na oxidačné poškodenie

Ľudského organizmu vyvolané negatívnymi faktormi ako sú UV žiarenie, znečistenie ovzdušia, reaktívne formy kyslíka (ROS), farmakoterapia a ďalšie.

Táto práca pokračuje v skúmaní vplyvu vyššie spomenutých antioxidantov na indukciu a opravu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 *in vitro*. Navyše, rozširuje už známe poznatky o GSH tým, že sa zameriava na sledovanie účinkov jeho chemických modifikácií, a to S-allyldithiogluthationu (GSH-A) a S-allyltrithiogluthationu (GSH-B).

Naším cieľom bolo zistiť, do akej miery dokážu testované látky zasiahnuť do indukcie oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H_2O_2 . Sledoval sa ich vplyv na inhibíciu vzniku jednoreťazcových zlomov (SSBs) v DNA priamo indukovaných H_2O_2 ako aj vplyv na tvorbu oxidovaných báz, ktoré bývajú častým produktom oxidačného stresu. Z tohto dôvodu sú považované za „kvalitné“ biomarkery oxidačného poškodenia. Uvedená schéma znázorňuje podstatu a cieľ tejto práce.



2. TEÓRIA

2.1 Oxidačný stres

Superoxidový anión, peroxid vodíka a hydroxylový radikál, označované ako reaktívne formy kyslíka (ROS), majú vysoký podiel na oxidačnom poškodení bunky. Nesú zodpovednosť za poškodenie dôležitých komponent bunky, medzi ktoré patria proteíny, nukleové kyseliny a bunkové membrány. Organizmus spočiatku reaguje tvorbou enzýmov, ktorých hlavnou úlohou je zbaviť bunku ROS. Postupne tak dochádza k reparácii vzniknutej škody. Pri kumulácii ROS môžu reparačné mechanizmy zlyhať, čo často vedie k vzniku mnohých ochorení (*Storz, Imlay, 1999*).

Atómy alebo molekuly s nespárovaným elektrónom sú voľné radikály, ktorých charakteristickými prejavmi sú nestabilita a vysoká reaktivita (*Walsh, 2009, [online]*). V organizme človeka vzniká veľké množstvo ROS a reaktívnych foriem dusíka (RNS) (*Štípek et al., 2000*). Len samotné ROS spôsobujú približne jednu polovicu celkového poškodenia báz v DNA (*Nelson et al., 2014*). Tieto jednotlivé formy sa podieľajú na mnohých fyziologických, ale aj patologických procesoch, ktoré vedú k mnohým závažným ochoreniam ako následku oxidačného poškodenia. Na jednej strane pomáhajú s prenosom energie v bunke, podieľajú sa na imunitnej ochrane, a majú neopomenuteľnú úlohu signálnych molekúl v bunkovej regulácii. Na druhej strane môžu pôsobiť ako toxické a dezinformačné molekuly, následkom čoho vzniká v organizme chaos (*Štípek et al., 2000*).

Voľné radikály nachádzajú svoje uplatnenie predovšetkým pri vzniku aterosklerózy, zhubných nádorov, neurodegeneratívnych ochorení, diabetes mellitus a ďalších ochorení (*Jiráček, 2011*). Oxidačný stres je považovaný za hlavnú príčinu vzniku zápalového ochorenia dýchacích ciest, konkrétne chronického obštrukčného ochorenia pľúc (*Luppi et al., 2005*). V závislosti od závažnosti poškodenia môže takýto stav viesť až k usmrteniu postihnutého organizmu (*Štípek et al., 2000*).

Jednotlivé RNS a ROS sú popísané v *Tab. 1*, ktorá zároveň poukazuje na to, že všetky formy nie sú voľnými radikálmi. Vyplýva to z toho, že v molekule sa nachádzajú orbitály, ktoré majú schopnosť vytvoriť chemickú väzbu medzi danými atómami (*Štípek et al., 2000*).

Tab. 1 Kyslík, dusík a ich reaktívne formy (upravené podľa Štípek et al., 2000).

	Reaktívne formy kyslíka		Reaktívne formy dusíka	
	Voľné radikály	superoxid hydroxylový radikál peroxyl alkoxyl hydroperoxyl	O_2^{\cdot} HO^{\cdot} ROO^{\cdot} RO^{\cdot} HO_2^{\cdot}	oxid dusnatý oxid dusičitý
Neradikálové zlúčeniny	peroxid vodíka kyselina chlórna ozón singletový kyslík chlornan	H_2O_2 $HOCl$ O_3 1O_2 ClO^{\cdot}	nitrosyl nitroxid kyselina dusitá oxid dusitý oxid dusičitý nitronium peroxynitrit alkylperoxynitrit	NO^+ NO HNO_2 N_2O_3 N_2O_4 NO_2^+ ONOO ROONO

Existujú tri spôsoby vzniku voľného radikálu z týchto molekúl. Za prvé, k vzniku môže dôjsť homolytickým štiepením kovalentnej väzby, ktorú tvoria dva elektróny. Vzniknú dva fragmenty. Každý z fragmentov obsahuje po jednom elektróne. Na to, aby tento typ štiepenia prebehol, je potrebné dodať veľké množstvo energie. Energia je buď vo forme tepla alebo ultrafialového či ionizačného žiarenia. Ďalším spôsobom tvorby voľného radikálu je redukcia molekuly. Pre danú molekulu to znamená prijatie jedného elektrónu. Poslednou cestou vzniku je oxidácia, ktorá je opakom redukcie. Molekula pri tejto chemickej reakcii prichádza o jeden elektrón. Posledné dva spomenuté spôsoby vzniku voľných radikálov v biologických systémoch prevládajú, a to z jednoduchého dôvodu - sú energeticky menej náročné (Štípek et al., 2000).

2.1.1 Radikály odvodené od kyslíka

V mitochondriách je lokalizovaný dýchací reťazec, ktorý je nezastupiteľným miestom pre priebeh redukcie molekuly atmosférického kyslíka. Táto redukcia prebieha v štyroch stupňoch za prítomnosti enzýmu cytochrómoxidázy. Výsledkom tejto reakcie sú dve molekuly vody, ktoré sú neoddeliteľnou súčasťou aeróbného spôsobu života. V prvom kroku reaguje molekula kyslíka s elektrónom. Dochádza k redukcii na monoradikál superoxid. Vzniknutý monoradikál sa redukuje na peroxid vodíka, ktorý sa prostredníctvom reakcie s ďalším elektrónom štiepi na vodu a hydroxylový radikál. Molekula vody je v disociovej forme, to znamená, v podobe hydroxidového iónu. V poslednom kroku procesu redukcie kyslíka sa hydroxylový ión redukuje na molekulu vody, ktorá sa nachádza opäť v disociovej forme. Celý tento sled reakcií je znázornený v Tab. 2 (Štípek et al., 2000).

Tab. 2 Štvorelektrónová redukcia molekuly kyslíka (upravené podľa Štípek et al., 2000).

Štvorelektrónová redukcia kyslíka	Rovnica reakcie	Vzniknutá forma kyslíka
I. stupeň	$O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot}$	superoxid
II. stupeň	$O_2^{\cdot} + e + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$	peroxid vodíka
III. stupeň	$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + HO^{\cdot}$	hydroxidový ión, hydroxylový radikál
IV. stupeň	$HO^{\cdot} + e \rightarrow OH^-$	hydroxidový ión

2.1.1.1 Superoxid

Superoxid je typom radikálu kyslíka, ktorý má schopnosť zároveň sa redukovať i oxidovať. Pri tomto deji dochádza k vzniku kyslíka a peroxidu vodíka. Je známe, že tento typ reakcie prebieha veľmi rýchlo, čo je spôsobené aktivitou enzýmu superoxididizmutázy prítomného v organizmoch (Štípek et al., 2000).

2.1.1.2 Peroxid vodíka

Ako bolo uvedené v *Tab.1*, všetky zlúčeniny nevytvárajú voľné radikály. Medzi tieto zlúčeniny patrí i H_2O_2 . Rýchlosť, akou prebieha jeho reakcia s biomolekulami je pomerne nízka (*Štípek et al., 2000*).

Samotná molekula H_2O_2 je veľmi málo reaktívna. Vyznačuje sa veľmi miernymi redukčnými a oxidačnými vlastnosťami. Veľké riziko H_2O_2 nastáva až pri jeho premene na hydroxylový radikál, ku ktorej dochádza pri vystavení UV žiareniu alebo pri reakcii H_2O_2 s niektorými kovmi (*Halliwell et al., 2000*).

Prítomnosť dvojmocného železa (Fe^{2+}) alebo jednomocnej medi (Cu^{1+}) spôsobujú redukciu H_2O_2 na hydroxylový radikál a hydroxidový anión. Dvojmocné železo (Fe^{2+}) sa tak súčasne oxiduje na trojmocné (Fe^{3+}). Práve hydroxylový radikál, známy ako veľmi silné oxidačné činidlo, odoberá nenasýteným masným kyselinám jeden elektrón. Potrebné je uvedomiť si jeho účasť v hydroxylácii aminokyselín a jednotlivých báz nukleových kyselín. Táto reakcia sa nazýva *Fentonova reakcia*. Dôležitým poznatkom pri tejto reakcii je spätná redukcia Fe^{3+} na Fe^{2+} zabezpečená ďalším superoxidom. K tomu, aby sa superoxid eliminoval z organizmu, treba zabezpečiť neškodnosť železa a medi. V organizme sa nachádzajú zásobné systémy, ktoré majú schopnosť vyviazať spomenuté prvky. Ceruloplazmín je zásobným systémom pre meď a transferín pre železo. Tieto systémy inaktivujú tranzitné kovy a superoxid sa tak môže odstrániť pomocou superoxididizmutázy, zatiaľ čo enzým kataláza odstraňuje H_2O_2 . Tým je zabezpečená ochrana organizmu pred oxidačným poškodením (*Štípek et al., 2000*).

Na záver treba spomenúť, že i ďalšie kovy majú podiel na tvorbe ROS. Medzi ne patria mangán, kobalt, kadmium, chróm, nikel a zinok (*Čaprnda, 2005*).

2.1.1.3 Kyselina chlórna

Neutrofilné granulocyty v spolupráci s enzýmom myeloperoxidázou vytvárajú kyselinu chlórnu, zlúčeninu so silnými oxidačnými účinkami (*Štípek et al., 2000*).

2.1.2 Radikály odvodené od dusíka

Cievna stena nepretržite syntetizuje oxid dusnatý (NO[•]), označovaný tiež ako endoteliálny relaxačný faktor, ktorý má vo veľkej miere schopnosť reagovať s kyslíkovými radikálmi. Pri tomto procese sa znižuje fyziologická koncentrácia NO[•] a súčasne vzniká peroxynitrit, ktorý sa vyznačuje svojou toxicitou a účasťou na spúšťaní radikálových reakcií (Čaprnda, 2005).

2.1.2.1 Oxid dusnatý

K syntéze NO[•] v tele človeka dochádza zložitým mechanizmom. Samotný NO[•] a jeho metabolity RNS sú veľmi toxické a zodpovedné za ťažké poškodenie. NO[•] reaguje s väčšinou biomolekúl *in vivo* veľmi pomaly, a to následkom jeho rýchlej difúzie do krvi a zároveň rýchlou inaktiváciou spôsobenou hemoglobínom. Výnimku tvoria tranzitné kovy a radikály, pri ktorých dochádza k rýchlej reakcii s molekulou NO[•]. Biologický polčas tejto molekuly *in vivo* je len niekoľko sekúnd. Podieľajú sa na tom erytrocyty, ktoré NO[•] vychytávajú. Dochádza k reakcii so železom oxyhemoglobínu a k vytvoreniu methemoglobínu s nitrátom. Ide o jeden z najefektívnejších spôsobov organizmu, ako si elegantne poradiť s NO[•] (Štípek *et al.*, 2000)

NO[•] má schopnosť väzby na hemové železo, ktoré je súčasťou enzýmu guanylátcyklázy. To vedie k stimulácii tvorby cGMP, čo navodzuje relaxáciu hladkého svalstva (Štípek *et al.*, 2000). NO[•] sa podieľa na početných fyziologických reakciách akými sú napr. regulácia vazomotorického tonu, neurotransmisia, funkcie imunitného systému a agregácia krvných doštičiek (Walker *et al.*, 1995).

2.1.2.2 Peroxynitrit

NO[•] a superoxid spolu reagujú za vzniku peroxynitritu. Fyziologické podmienky neposkytujú vyhovujúce prostredie pre danú reakciu, ale pri vysokých koncentráciách reaktantov sa môžu tvoriť toxické hladiny produktu. Následne dochádza v organizme k rozkladu protonovaného peroxynitritu na hydroxylový radikál a oxid dusičitý. Dochádza k nitrácii a hydroxylácii aminokyseliny tyrozínu. Enzýmy superoxid-dizmutáza a myeloperoxidáza štiepia peroxynitrit na hydroxidový anión

a nitroniový kation, ktorý modifikuje molekulu tyrozínu na 3-nitrotyrozín. Je však známe, že nitroniový kation sa dokáže rýchlo zlúčiť s vodou za vzniku kyseliny dusičnej, ktorá má pri fyziologických podmienkach krátky polčas (*Štípek et al., 2000*).

2.2. Príčiny vzniku poškodenia DNA

Oxidačný stres má veľký podiel na vzniku chemických modifikácií jednotlivých báz v DNA. Bunky uplatňujú radu mechanizmov, ktorými znižujú toto poškodenie. Pri ich nedostačujúcej funkcii dochádza k zafixovaniu chybnej DNA, čo vedie k jej trvalým zmenám – mutáciám (*Alberts et al., 2005*).

Prejavy jednotlivých mutácií závisia od toho, na ktorom úseku DNA došlo k zmene informácií. Zmena dôležitého úseku DNA môže spôsobiť zánik celého organizmu, naopak, niektoré mutácie sa navonok organizmu nemusia vôbec prejavíť.

Mutagény spôsobujú poškodenie genetickej informácie v dôsledku procesu mutagenézy. Vplyvom mutagénov dochádza k modifikáciám informácií uložených v DNA. Podľa toho, na akej organizačnej úrovni došlo k zmene informácií, mutagény sa delia do troch hlavných skupín. Na najnižšej úrovni sa nachádzajú génové mutácie, za nimi nasledujú chromozómové a nakoniec, na najvyššej úrovni sú genómové mutácie (*Nečas et al., 2000*).

DNA polymeráza má funkciu sebakontroly, čím z veľkej časti eliminuje chyby vznikajúce pri replikácii. Aj napriek tejto jej schopnosti môže nastať situácia, že sa v DNA objavia chybné spárované nukleotidy. V takom prípade dochádza k oprave chybné spárovaných báz (z angl. mismatch repair). Po ukončení tejto opravy sa zvýši presnosť replikácie s výskytom jednej chyby na 10^9 skopírovaných nukleotidov. Súčasťou tohto systému opravy sú proteíny schopné rozpoznať poškodené nukleotidy. Po rozpoznaní dochádza k odstráneniu nesprávneho úseku reťazca DNA za súčasnej syntézy nového. Ak by nevznikol správny úsek chýbajúceho reťazca DNA, došlo by k zafixovaniu mutácie (*Alberts et al., 2005*). Základné kroky opravy poškodenej DNA sú popísané v *Tab. 3*.

K tvorbe chýb v DNA dochádza nielen počas procesu replikácie. Poškodenie DNA môže vzniknúť mnohými ďalšími spôsobmi. V DNA dochádza k chemickým zmenám v dôsledku zrážok s druhými molekulami. Stratou adenínu alebo guanínu

v dôsledku spontánnej depurinácie vnikajú v DNA tzv. apurínové miesta (APS). Spontánnou stratou aminoskupiny z cytozínu sa vytvára uracil. UV žiarenie sa podieľa na tvorbe tymínových dimérov (Alberts et al., 2005).

Tab. 3 Mechanizmus opravy poškodených miest v DNA (vytvorené podľa Alberts et al., 2005).

Základné kroky pri oprave poškodenej DNA	Stručný popis funkcie jednotlivých krokov pri oprave DNA
1. krok: vystrihnutie chybného úseku z DNA	Rozpoznanie poškodených miest v DNA pomocou špecifických nukleáz, následné rozrušenie kovalentnej väzby a odstránenie chybných nukleotidov
2. krok: resyntéza DNA	Syntéza chýbajúceho úseku DNA ku komplementárnemu reťazcu pomocou opravnej DNA-polymerázy
3.krok: ligácia	Spojenie nového reťazca s pôvodným vláknom pomocou DNA ligázy za využitia energie hydrolýzy ATP

2.3 Antioxidanty

Oproti zlúčeninám indukujúcich oxidačné poškodenie sa nachádzajú antioxidantné mechanizmy. Ich prvoradou úlohou je ochrániť organizmus. V závislosti na stupni poškodenia sa delia na tri hlavné skupiny. Prvú skupinu tvoria antioxidanty, ktoré pôsobia preventívne, to znamená, bránia vytvoreniu radikálov. Ak už došlo k vzniku radikálov, tak úlohu preberajú tzv. scavengery - vychytávače voľných radikálov. Posledná skupina sa stará o nápravu už poškodených molekúl. Patria sem reparačné enzýmy (Čaprnda, 2005). Príklady jednotlivých typov molekúl sú uvedené v Tab.4.

Antioxidanty tvoria veľmi širokú škálu zlúčenín, medzi ktoré patria enzýmy, aminokyseliny, vitamíny, minerály a ďalšie. Chránia organizmus pred voľnými radikálmi, t.j. pred oxidačným poškodením. Časť voľných radikálov si telo vytvára samé pri uvoľňovaní energie. Ide predovšetkým o škodlivé produkty metabolizmu,

ktoré vznikajú pri extrémne veľkej telesnej záťaži. Na vzniku oxidačného poškodenia sa podieľajú i faktory ako je znečistenie vzduchu, fajčenie a pochody spojené so starnutím. Nízku hladinu (t.j. takú hladinu, pri ktorej ešte nedochádza k poškodeniu) a elimináciu týchto zlúčenín zabezpečujú látky s antioxidačným potenciálom. Príkladmi takýchto zlúčenín sú napr. enzýmy kataláza a superoxiddismutáza, koenzým Q10, glutathion, melatonín, vitamíny A,C,E, alfa- a beta-karotén, kyselina lipooová, selén a mnoho ďalších (*Mindell, 2000*).

Antioxidanty majú nespočetné množstvo účinkov. Vplývajú na spomalenie starnutia, podieľajú sa na znižovaní hladiny cholesterolu, obmedzujú riziko vzniku aterosklerózy, majú protektívnu funkciu proti vzniku infarktu myokardu a cievnej mozgovej príhody, znižujú riziko vzniku nádorov, inhibujú rast zhubných nádorov, ochraňujú zrak pred degeneratívnymi zmenami sietnice, tlmia následky fajčenia, (*Mindell, 2000*)...

Aby tieto látky dosiahli očakávaný účinok, musia spĺňať niekoľko požiadaviek. Medzi ne patrí dostatočná koncentrácia daného antioxidantu v organizme. Podstatné je, aby došlo k reakcii s ROS a RNS, a čo je najdôležitejšie, novovzniknutá molekula nesmie byť toxickejšia ako odstraňovaný radikál (*Čaprnda, 2005*).

Antioxidačné mechanizmy sa delia na dve hlavné skupiny: na nízkomolekulárne a vysokomolekulárne (*Čaprnda, 2005*).

Nízkomolekulárne antioxidačné mechanizmy sa rozdeľujú na intra- a extracelulárne. Hlavnými antioxidačnými zložkami intracelulárneho priestoru sú GSH, ubichinón a kyselina lipooová, v extracelulárnom priestore sa nachádzajú predovšetkým kyselina askorbová (vitamín C) a α -tokoferol (vitamín E). Patria sem i karotenoidy, nikotínamid, kyselina močová a mnoho ďalších (*Čaprnda, 2005*).

Vysokomolekulárne antioxidačné mechanizmy zahŕňajú neenzýmové proteíny a enzýmy. Zástupcami neenzýmových proteínov sú napr. transferín a laktoferín, ktorých úlohou je vychytávanie trojmocného železa (Fe^{3+}) a ceruloplazmín, ktorý viaže dvojmocnú meď (Cu^{2+}). Tieto mechanizmy obmedzujú výskyt voľných foriem kovov, pričom zároveň dochádza k zníženiu ich katalytického účinku pri vzniku ROS. V intracelulárnom priestore sú lokalizované hlavne enzýmové antioxidačné mechanizmy. Najvýznamnejším je glutathionperoxidáza, ktorá v mitochondriách

umožňuje degradáciu H₂O₂. Ďalšími zástupcami sú enzýmy superoxiddizmutáza, kataláza vyskytujúca sa najmä v pečeni a erytrocytoch a paraoxonáza zabráňujúca oxidácii lipoproteínov (Čaprnda, 2005).

Táto kapitola krátko charakterizuje niektoré z vyššie vymenovaných antioxidantov. Podrobnejšie je zameraná na GSH a EGCG, u ktorých sa v rámci tejto práce sledovali ich účinky na indukciu a opravu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 *in vitro*.

Tab. 4 Príklady molekúl v úlohe antioxidantov pri obrannom mechanizme organizmu (vytvorené podľa Lamichhane et al., 2013).

Prevenia	Vychytávanie voľných radikálov	Reparačné enzýmy
karotenoidy, vitamín E, fofolipid hydroxyperoxid, kataláza, glutathionperoxidáza, tioredoxín, glutathion-S-transferáza, superoxiddizmutáza, transferín, albumín, lactoferín, ceruloplazmín, haptoglobín, hemopexín	kyselina močová, vitamín C, vitamín E, ubiquinol, karotenoidy, albumín, bilirubín	lipázy, proteázy, transferázy, DNA reparačné enzýmy

2.3.1 Karotenoidy a ich vplyv na organizmus

Karotenoidy sú chemické farbivá, väčšinou vo vode rozpustné. Ovocie je ich bohatým zdrojom. Zabezpečujú vysokú ochranu proti UV a iným druhom žiarenia, ktoré iniciujú vznik rakoviny. Medzi najúčinnnejšie karotenoidy patria alfa-karotén, beta-karotén, lykopen, luteín a zeaxantín (Mindell, 2000).

Alfa-karotén sa podľa potreby tela transformuje na vitamín A. V pokusoch na zvieratách sa preukázal jeho inhibičný vplyv na všetky druhy nádorov. V porovnaní s beta-karoténom je pri ochrane kože, očí, pečene a pľúcneho tkaniva 10 krát účinnejší (Mindel, 2000).

Beta-karotén je provitamín transformovaný na aktívnu formu, t.j. vitamín, podľa telesnej potreby. Jeho účinky sa prejavujú v posilnení imunity, v znížení rizika aterosklerózy a očného zákalu (*Mindel, 2000*).

Lykopen je veľmi účinný v potlačaní rastu nádorov a v tlmení následkov UV žiarenia a fajčenia. Ide o zlúčeninu veľmi dobre rozpustnú v lipidoch (*Mindel, 2000*).

Luteín svojimi účinkami chráni zrak pred poškodením v dôsledku UV žiarenia pozastavením degeneratívnych zmien žltej škrvny na sietnici. Podobné účinky vykazuje i zeaxantín (*Mindel, 2000*).

2.3.2 Kyselina askorbová

Kyselina askorbová je jedným z najznámejších a najštudovanejších antioxidantov. Jej účinok spočíva v ochrane lipidov, DNA a iných bunkových štruktúr pred oxidáciou (*Azqueta et al., 2013*).

2.3.3 Vitamín E

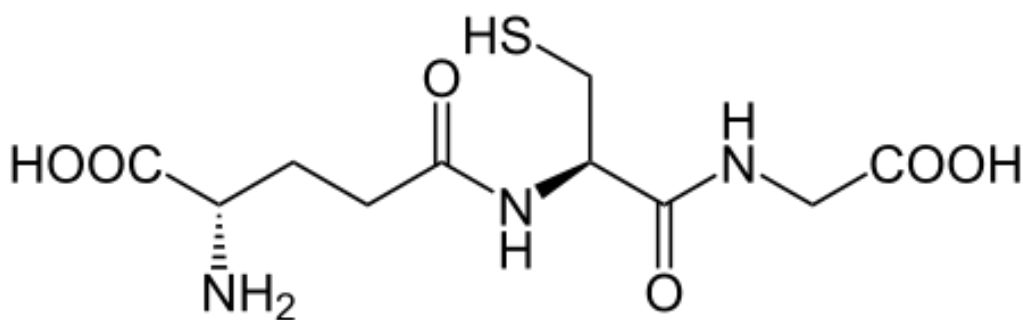
Vitamín E je nevyhnutný pre správne fungovanie fyziologických procesov. Vyskytuje sa v ôsmich izoformách, najčastejšie ako alfa, beta, gama a delta tokoferol a tokotrienol. Malé rozdiely v štruktúre medzi jednotlivými izoformami majú významný dopad na ich biologickú aktivitu. Všeobecne, vitamín E preukazuje antioxidačnú, protizápalovú a antitrombolytickú aktivitu. Jeho silné antioxidačné účinky spočívajú vo vychytávaní voľných radikálov a peroxidov. Týmto mechanizmom pôsobenia ochraňuje lipidy a membrány pred oxidačným poškodením. Najväčšia antioxidačná účinnosť bola preukázaná u izoformy alfa (*Alqahtani et Kaddoumi, 2015*).

2.3.4 Glutathion

GSH je dôležitý pri odstraňovaní spodín metabolizmu a xenobiotík (*Jiráková, 2011*). Je hlavným endogénnym antioxidantom. Vo svojej molekule obsahuje thiolovú skupinu (-SH), dôležitú pre jeho účinky. Schopnosť GSH chrániť bunku pred ROS je vysoká (*Wang et al., 2013*). Chráni organizmus pred následkami oxidácie, je nukleofilným vychytávačom elektrofilných zlúčenín, má úlohu kofaktora pre signálne

prenosy, špeciálne v mozgu (Johnson *et al.*, 2012). Zároveň zabezpečuje udržiavanie exogénnych antioxidantov, hlavne vitamínov E a C, v redukovanej forme. Svojou aktivitou zasahuje do imunitného systému a reguluje produkciu cytokínov (Wang *et al.*, 2013).

Chemická štruktúra GSH nie je zložitá. Jedná sa o tripeptid pozostávajúci z troch aminokyselín (Obr. 1). V organizme človeka sa GSH vyskytuje v dvoch formách. Sú to redukovaná forma, GSH, ktorá za normálnych podmienok prevláda, a oxidovaná forma, GSSG. Oxidovaná forma je tvorená dvomi molekulami GSH spojených disulfidovou väzbou. Hladina GSSG pri oxidačnom poškodení narastá (Jiráček, 2011).



Obr. 1 Chemická štruktúra GSH (prevzaté z <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione>).

GSH vzniká prevažne v intracelulárnom priestore v rozmedzí koncentrácií 0,2 mM – 10 mM. Najbežnejšia koncentrácia vo väčšine buniek sa pohybuje od 1 mM do 2 mM. Hlavným krokom, udávajúcim rýchlosť syntézy GSH, je vznik amidovej väzby medzi γ -karboxylovou skupinou glutámovej kyseliny a aminoskupinou cysteínu. Rýchlosť je založená na aktivite enzýmu γ -glutamylcystein syntetázy a zároveň na dostupnosti cysteínu. Enzým glutathion syntetáza ukončuje syntézu GSH pripojením aminokyseliny glycínu k dipeptidu γ -GluCys. Aktivita enzýmov potrebných pre syntézu GSH je kontrolovaná mnohými pre- i posttranskripčnými mechanizmami. Navyše, aktivita enzýmov zúčastňujúcich sa syntézy GSH môže byť regulovaná prostredníctvom fosforylácie (Johnson *et al.*, 2012).

GSH má v organizme mnoho úloh, a preto je dôležité, aby jeho koncentrácia bola dostatočná. K nízkym hladinám redukovaného GSH dochádza z rôznych príčin,

akými sú infekcie, otravy ťažkými kovmi, neadekvátne zloženie potravy (hlavne nízky príjem cysteínu), starnutie, nedostatok tepla a mnoho ďalších (Haley, 2009 [online]).

Narušenie homeostázy GSH a enzýmov zodpovedných za jeho syntézu vedie k progresii mnohých, vo veľkej miere neurodegeneratívnych ochorení. Častokrát je príčinou týchto závažných ochorení oxidačný stres, ktorý zasahuje do rovnováhy GSH (Johnson et al., 2012).

Príklady ochorení súvisiacich s hladinami GSH sú uvedené v nasledujúcej kapitole.

2.3.4.1 Súvislosť hladín GSH u vybraných ochorení

Meraním koncentračných hladín GSH v organizme sa hľadajú súvislosti so vznikom porúch. Jedným z jeho najvýznamnejších účinkov je vychytávanie voľných radikálov. Takisto sa mu pripisuje funkcia „prírodného chelátora“, čo znamená, že dokáže v prípade intoxikácie organizmu ťažkými kovmi tieto kovy vyviazať a tým umožniť ich elimináciu. Z veľkej časti sa podieľa na znížení aktivity hubových toxínov tým, že sa viaže na ich povrch (Haley, 2009 [online]).

Veľký dôraz sa kladie na úlohu GSH pri prevencii a eliminácii vírusových ochorení. Thiolová skupina (-SH) GSH je nevyhnutná pre narušenie disulfidových väzieb (-S-S-) vírusového plášťového proteínu, nevyhnutného pre ďalšie šírenie vírusových infekcií. Existuje hypotéza, podľa ktorej väzba GSH na proteíny vírusov navodzuje posilnenie imunitnej odpovede na vírusové ochorenia. Javí sa, že nízke hladiny GSH predstavujú veľké riziko indukcie vírusových ochorení (Haley, 2009 [online]).

Je zrejmé, že produkcia GSH má ochrannú úlohu proti toxicite paracetamolu. Za hlavný spôsob ochrany sa považuje zvýšenie koncentrácie thiolových skupín (-SH) prostredníctvom liečby N-acetylcysteínom. Zvýšenie hladín GSH sa zdôrazňuje v spojitosti s ochranou pred ochoreniami súvisiacich s imunosupresiou (Haley, 2009 [online]).

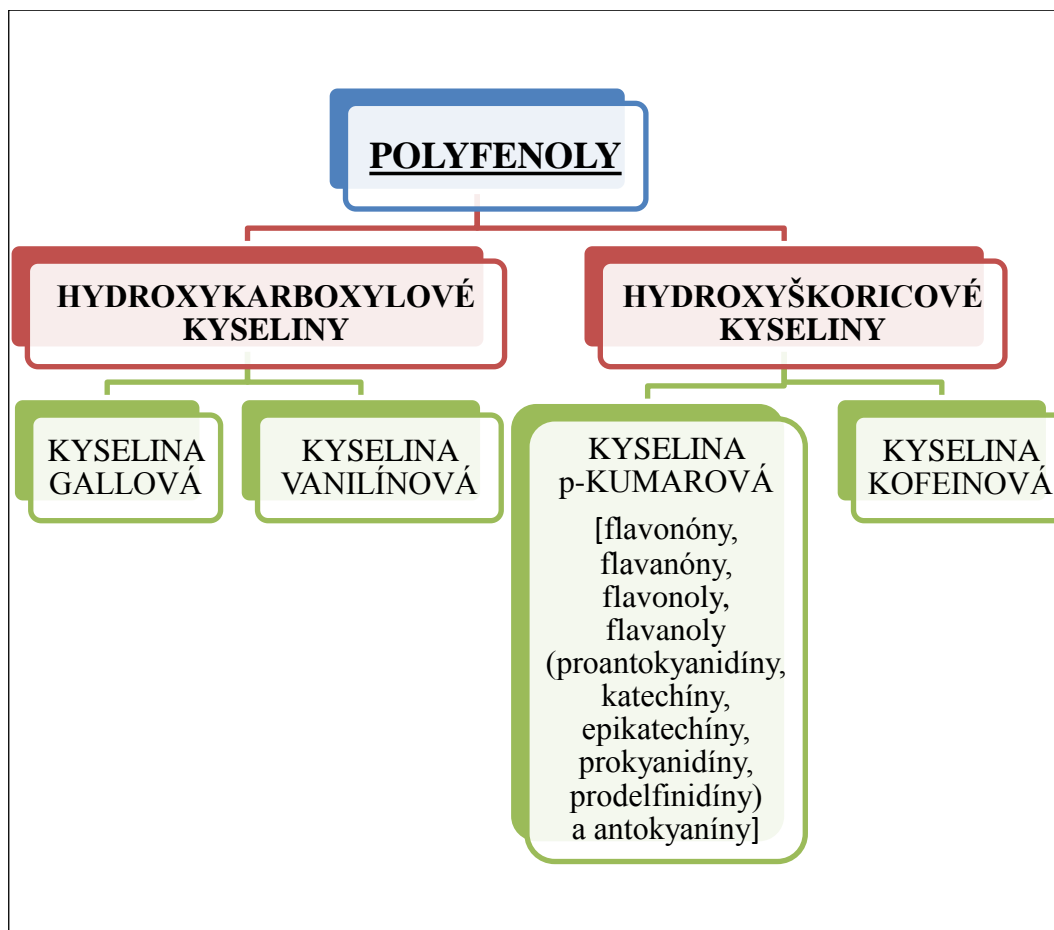
GSH nemožno opomenúť v súvislosti s autismom, pretože sa predpokladá, že práve oxidačný stres môže byť primárnou príčinou vzniku autismu. Toto ochorenie je

typické prítomnosťou biochemických abnormalít, jednou z nich je pokles pomeru GSH/cysteín. Väčšina terapií pri tomto ochorení je práve z tohto dôvodu založená na princípe posilnenia antioxidačnej ochrany, medzi ktoré patrí transdermálna aplikácia alebo injekčné podanie GSH (Walsh, 2009 [online]).

2.3.5 EGCG

Polyfenoly sú jednou z hlavných zložiek zeleného čaju (*Camellia sinensis*, *Theaceae*) (Moravcová et al., 2014). Tieto chemické zlúčeniny patria medzi sekundárne metabolity, ktoré sa delia do niekoľkých tried. Rozdelenie je dané na základe obsiahnutých fenolových kruhov v konkrétnej zlúčenine a na obsahu prvkov spájajúcich jednotlivé fenoly (Georgiades et al., 2014). Polyfenoly obsahujú vo svojej štruktúre jeden alebo viac aromatických kruhov s hydroxylovými skupinami. Vyskytujú sa buď ako jednoduché alebo zložité molekuly. Delia sa na dve hlavné skupiny (Davies et Yáñez, 2013).

Do prvej skupiny patria hydroxybenzoové kyseliny, ako sú gallová a vanilínová kyselina. Druhá skupina obsahuje kyseliny hydroxyškoricové. Príkladom sú kyseliny p-kumarová a kávová. Tieto molekuly sa nachádzajú v esterifikovanom stave s malými molekulami, naviazané na bunkové steny a/alebo proteíny. Flavonoidy sú podskupinou derivátov kyseliny p-kumarovej. Ide o zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí 200-400 g/mol obsahujúcich vo svojej štruktúre benzo- γ -pyrón (Davies et Yáñez, 2013). Prehľad jednotlivých typov polyfenolových zlúčenín je uvedený na Obr. 2.



Obr. 2 Typy polyfenolových zlúčenín (zhotovené podľa Davies et Yáñez, 2013).

Flavonoly majú vysokú schopnosť vychytávať radikály, vďaka svojim antioxidantným účinkom. Pri ich pôsobení dochádza k zmene signálnych dráh, ktoré vedú k zmene génovej expresie a následne k indukcii antioxidantných enzýmov. Tieto vlastnosti sa využívajú pri oxidačnom poškodení biomolekúl, ktoré bývajú indikované v patológii mnohých chronických ochorení (Georgiades et al., 2014).

Jedným z príkladov polyfenolových zlúčenín je EGCG (Obr.3). EGCG má silný antioxidantný účinok. Efektívne sa využíva v prevencii chorôb spojených s oxidačným stresom (Moravcová et al., 2014). Nie je to dávno, čo sa prišlo na jeho ochranné pôsobenie pred nežiaducimi následkami vyvolanými oxidačným stresom (Georgiades et al., 2014). Účinok spočíva hlavne v potlačení zápalových procesov, ktoré vedú k transformácii, proliferácii a iniciácii karcinogenézy. Vplyv na preventívnu ochranu pred vznikom rakoviny je podporovaný výsledkami z epidemiologických, bunkových, zvieracích i klinických štúdií. Zistilo sa, že EGCG môže podporiť komunikáciu medzi

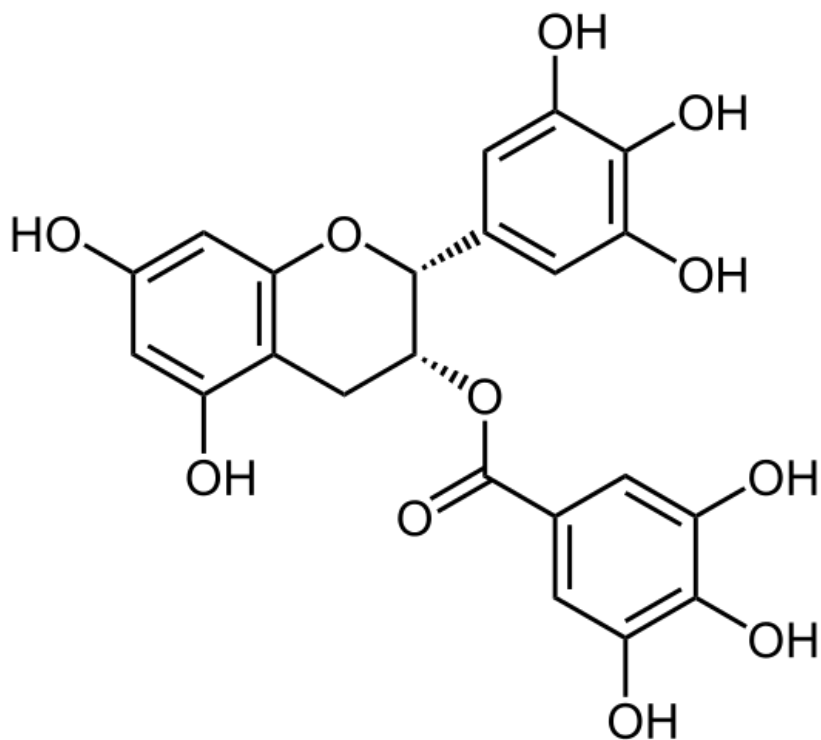
bunkami, ktorou sa zvýši ochrana pred vývojom tumoru (*Singh et al., 2011*). EGCG má celý rad ďalších účinkov, medzi ktoré patria antiartritické, antibakteriálne, angiogenické, protistarnúce, antivírusové, a vo veľkej miere neuroprotektívne účinky. Celkovo, polyfenolové zlúčeniny inhibujú bunkovú proliferáciu a uplatňujú svoje účinky proti radikálovým zlúčeninám (*Singh et al., 2011*). Terapeutické podanie EGCG by z tohto dôvodu mohlo byť vhodnou podpornou liečbou ochorení ako sú napr. ateroskleróza a kardiovaskulárne a metabolické ochorenia (*Zhu et al., 2014*).

Výskumy vplyvu EGCG na bunkových kultúrach *in vitro* poukazujú na účinné navodenie apoptózy a na zastavenie bunkového rastu. K tomu dochádza pri zmene prepisu regulačných proteínov bunkového cyklu aktiváciou kaspáz a potlačením aktivity transkripčného faktoru NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Okrem toho, EGCG stimuluje v nádoroch aktivitu cytotoxických T buniek (*Singh et al., 2011*).

Vplyv EGCG zvyšuje koncentráciu antioxidantných enzýmov súvisiacich s oxidačným stresom. Patria sem enzýmy superoxid-dismutáza, glutamát cysteín ligáza a hem oxygenáza (*Zhu et al., 2014*).

Predpokladá sa, že mechanizmus účinku EGCG spočíva v donácii elektrónu alebo atómu vodíka fenolovej skupiny, to znamená, v ochrane jednotlivých štruktúr pred oxidačným poškodením (*Zhu et al., 2014*).

Experimentálne štúdie poukazujú na mechanizmus spočívajúci v blokáde receptorov v postihnutej bunke, čo by mohlo viesť k inhibícii šírenia nádoru. Ďalšie mechanizmy môžu spočívať v priamej väzbe EGCG na karcinogény. Tieto inhibičné vplyvy môžu v konečnom dôsledku potlačiť záverečné štádia karcinogenézy, konkrétne angiogenézy a metastáz (*Singh et al., 2011*).



Obr. 3 Chemická štruktúra epigalokatechín galátu (EGCG) (prevzaté z https://en.wikipedia.org/wiki/Epigallocatechin_gallate).

2.4 Detekcia poškodenia

Mnohé epidemiologické štúdie využívajú k detekcii poškodenia molekulárne biomarkery, ktoré sú súčasťou väčšiny ochorení. Tieto bunkové a chemické parametre je možné kvantitatívne určiť pomocou neinvazívnych metód. Informujú o tom, do akej miery je organizmus vystavený mutagénnym a karcinogénnym zlúčeninám. Metóda sa vyberá podľa druhu sledovaného poškodenia. Najčastejšie sa jedná o nasledovné poškodenia: oxidačné poškodenie báz, reťazcové zlomy DNA, alkylácia jednotlivých báz v DNA a chromozómové aberácie (Collins *et al.*, 2014).

Dlhodobý oxidačný stres má na organizmus negatívny dopad. Dochádza k postupnému vyčerpaniu antioxidantných molekúl, k zvýšeniu koncentrácie voľných radikálov, k modifikácii báz DNA a k ďalším procesom nasmerovaných k oslabeniu až celkovej likvidácii organizmu.

Existuje celý rad metód, ktoré dokážu stanoviť stupeň oxidačného poškodenia. Na základe typu detekcie poškodenia sa delia do niekoľkých skupín.

Jednu skupinu tvoria metódy, ktoré detekujú voľné radikály. Pomocou nich sa stanovuje koncentrácia voľných radikálov vo vzorke. Nevýhodou je krátky polčas radikálov. Využívajú sa predovšetkým vo výskume. Do tejto skupiny patria napr. elektrónová paramagnetická rezonančná spektrometria, pulzná radiolýza alebo chemoluminiscencia buniek a tkanív (*Štípek et al., 2000*).

Ďalšia skupina je zameraná na meranie produktov oxidačného stresu. Tieto metódy, v porovnaní s vyššie spomenutými, sú používané oveľa častejšie. Jedná sa napr. o stanovenie konjugovaných diénov a lipidových peroxidov alebo stanovenie malondialdehydu (*Štípek et al., 2000*).

Meranie antioxidantov sleduje ďalšia skupina, ako je napr. stanovenie GSH, stanovenie askorbátu, ale i stanovenie glutathionperoxidázy (*Štípek et al., 2000*).

K detekcii poškodenia sa používajú metódy založené na stanovení stopových prvkov, ktoré sú súčasťou antioxidantných enzýmov a katalyzátorov radikálových reakcií. Patria sem i metódy zamerané na testovanie antioxidantnej kapacity, napr. stanovenie celkovej antioxidantnej kapacity alebo peroxidovateľnosti lipoproteínov (*Štípek et al., 2000*).

Na záver tohto stručného prehľadu spomenieme metódy určené na meranie aktivity zdrojov ROS a RNS v organizme. Predovšetkým sa jedná o stanovenie enzýmu xantínoxidoreduktázy ako potenciálneho zdroja superoxidu a peroxidu vodíka či stanovenie aktivity syntáz oxidu dusnatého (*Štípek et al., 2000*).

Ďalej uvedené metódy sa vyžívajú konkrétne ku kvantitatívnemu stanoveniu poškodenia DNA.

2.4.1 Stanovenie produktov nukleových kyselín v dôsledku oxidačného stresu

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je jednou z metód, pomocou ktorej je možno identifikovať 8-hydroxy-2'-deoxyguanozín a 8-hydroxyguanozín, oxidačné deriváty báz DNA charakteristické pri oxidačnom poškodení. K sledovaniu sa využíva detektor elektrónového záchytu. Tento spôsob merania umožňuje vyhodnotiť rozsah oxidačného poškodenia genetického materiálu. Využíva sa hlavne na rozbor tkanivovej DNA a stanovenie modifikovaných báz v moči. Sledované biomarkery môžu upozorniť

na možnosť malignizácie alebo na určitý stupeň starnutia. Výhodou stanovenia miery poškodenia z moču je jednoduchá príprava vzorky (Štípek *et al.*, 2000).

2.4.2 Comet Assay

Kométový test (z angl. Comet Assay) je univerzálny a dostatočne citlivý spôsob využívaný k detekcii jednoreťazcových (SSBs) a dvojreťazcových zlomov (DSBs) v DNA (Collins *et al.*, 2008). Pomocou neho je možné sledovať a zmerať veľmi nízke stupne poškodenia DNA (Liao *et al.*, 2009). Táto metóda dokáže stanoviť od sto až do niekoľko tisíc zlomov prítomných v DNA na jednu bunku. (Collins *et al.*, 2008). Veľkou výhodou je rýchle a kvantitatívne určenie miery na princípe migrácie fragmentov DNA z jadra bunky behom elektroforézy (Liao *et al.*, 2009).

Ako prví túto metódu popísali Ostling a Johanson, v roku 1984. Zistili, že pomocou tejto metódy pri neutrálnych podmienkach môžu kvantitatívne stanoviť DSBs v DNA, a to na úrovni jednej bunky. Od tej doby metóda nadobudla mnoho modifikácií, ako napr. zmena neutrálnych podmienok na alkalické umožňujúce súčasnú detekciu alkalilabilných miest (ALS) a SSBs v DNA alebo využitie špecifických enzýmov k detekcii oxidovaných pyrimidínových (endonukleáza III) a purínových báz (formamidopyrimidín-DNA glykozyláza) (Liao *et al.*, 2009).

Tento spôsob detekcie poškodenia sa s výhodou využíva v rôznych oblastiach, ako napr. biomonitoring, genotoxikológia alebo monitoring životného prostredia (Liao *et al.*, 2009).

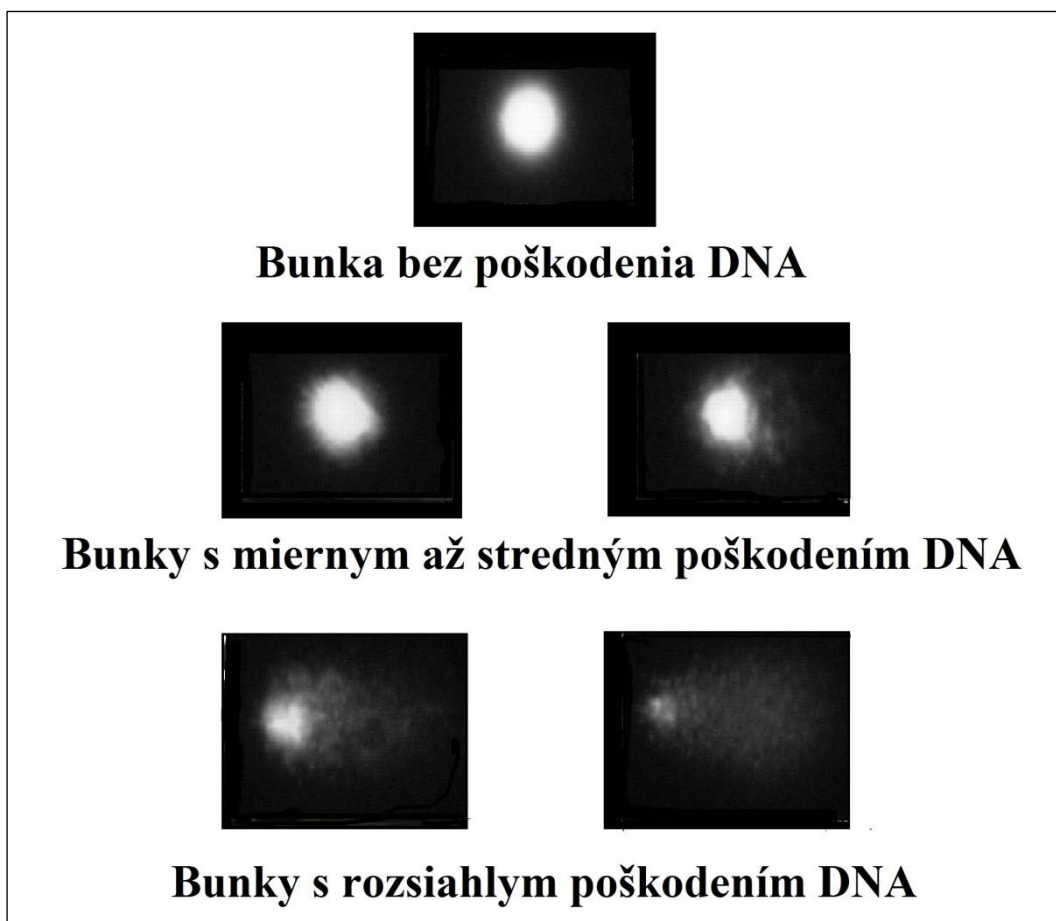
V tejto práci sa k detekcii oxidačného poškodenia DNA použila alkalická verzia kométového testu s využitím špecifických enzýmov endonukleázy III (Endo III) a formamidopyrimidín-DNA glykozylázy (Fpg).

Alkalická modifikácia kométového testu vytvára podmienky pre meranie SSBs a ALS v DNA. Princíp metódy spočíva v alkalickom rozpletaní a následne v migrácii jadrovej DNA behom elektroforézy (Azqueta *et al.*, 2014). Čím je poškodenie DNA väčšie (počet SSBs a ALS sa priamo úmerne zvyšuje s narastajúcim poškodením), tým sa z jadra uvoľňuje väčšie množstvo DNA (Lorenzo *et al.*, 2013). Následkom toho vznikajú pri obrazovej analýze charakteristické útvary v tvare kométy. Intaktná, t.j.

neporušená časť DNA sa nachádza v hlave kométy a poškodená DNA v chvoste (*Obr. 4*) (*Liao et al., 2009*).

Alkalické rozpletanie vyžaduje špecifické podmienky, ktorými sú vysoké pH a relatívne krátky čas rozpletania, aby došlo k čiastočnému rozvinutiu DNA. (*Collins et al., 2008*).

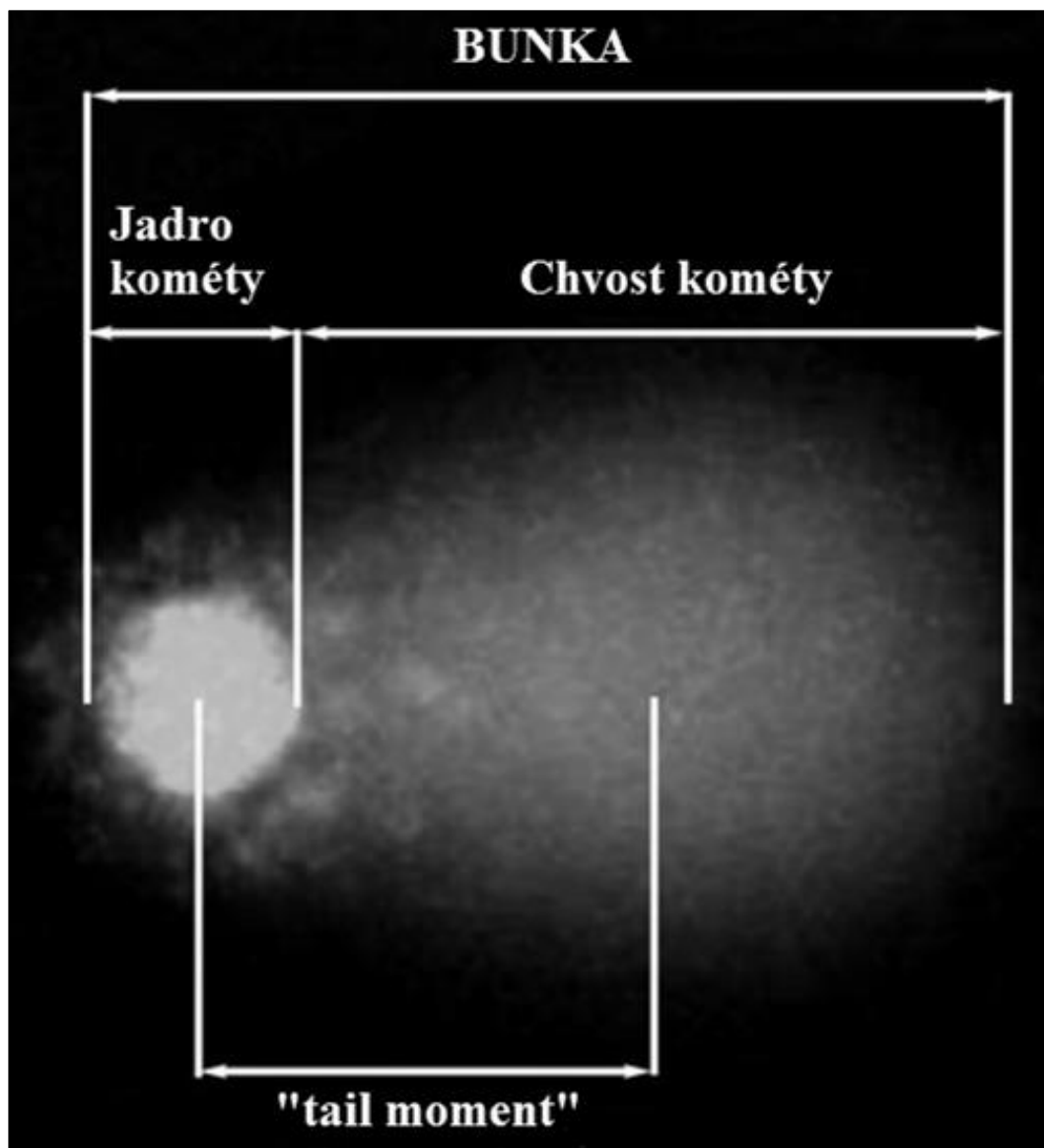
Ako bolo spomenuté v úvode tejto kapitoly, kométový test sa často používa so súčasným aplikovaním špecifických enzýmov, ktoré dokážu rozpoznať oxidované bázy v DNA. Princíp spočíva v ich odstránení z DNA, čím dochádza k tvorbe APS a následnému k vzniku zlomov (*Azqueta et al., 2009*). Často je využívaná kombinácia s enzýmom Fpg k detekcii 8-oxo-7,8-dihydroguanínu (8-oxoGua) v DNA, molekulárneho biomarkera oxidačného poškodenia DNA (*Collins et al., 2014*) ako aj s Endo III k rozpoznaní oxidovaných pyrimidínov. Takto vzniknuté zlomy v DNA, v dôsledku konverzie oxidačne poškodených báz na SSBs, je možné zmerať pomocou kométového testu (*Azqueta et al., 2014*), a tým kvantitatívne odhadnúť množstvo oxidačne poškodených báz v DNA.



Obr. 4 Sledovanie migrácie jadrovej DNA počas elektroforézy pomocou fluorescenčného mikroskopu. Bunky bez poškodenia sa po aplikácii fluorescenčného farbiva zobrazujú v tvare guľatého jadra. Pri miernom až strednom poškodení dochádza k vzniku ALS a následne k migrácii DNA smerom k anóde. Tieto bunky sa pri sledovaní v mikroskope zobrazujú ako kométy, kde chvost kométy obsahuje poškodenú DNA a svietiace guľaté jadrá sú tvorené DNA bez poškodenia. Rozsiahle poškodenie DNA vedie k takmer úplnej migrácii DNA, to znamená, že väčšina DNA je obsiahnutá v chvoste kométy (upravené podľa Waters et al., 2007).

Po vyhodnotení vo fluorescenčnom mikroskope sa pomocou obrazovej analýzy získajú informácie o miere poškodenia DNA. Kométa môže byť popísaná jedným alebo viacerými parametrami, zahŕňajúcimi tvar a veľkosť. Medzi najčastejšie spôsoby merania migrácie DNA patria dĺžka chvostu kométy („tail length“ v μm), jeho intenzita vyjadrená v % popisujúcich intenzitu k migrovanej DNA a tzv. „tail moment“, ktorý sa získa vynásobením hodnôt DNA v chvoste (%) a vzdialenosťou migrácie.

Najpreferovanejším parametrom sledujúcim poškodenie DNA je „tail moment“, Obr.5 (Colins et al., 2014).



Obr. 5 *Obrazová analýza oxidačného poškodenia na úrovni DNA*

(upravené podľa <http://www.antibodies-online.com/kit/2345015/Comet+Assay+3-Well+Slides/>).

2.4.3 Princíp využitia reparačných enzýmov pri stanovení oxidačného poškodenia

Jednou z foriem poškodenia DNA sú reťazcové zlomy. Väčšina chemických zlúčenín s genotoxickým potenciálom indukuje niekoľko ďalších druhov poškodenia. Medzi najpočetnejšie poškodenia patria malé zmeny v štruktúre báz v DNA v dôsledku oxidácie alebo alkylácie, strata báz, križové väzby (cross-links) medzi jednotlivými bázami alebo pripojenie veľkých chemických skupín na bázy DNA (*Gautier, 2011*).

Niektoré poškodenia báz DNA sú potenciálne mutagénne, a tak sa stávajú súčasťou procesu karcinogenézy a starnutia. Ďalšie poškodenia, ako tymín glykol alebo 5,6-dihydrouracil môžu inaktivovať DNA-polymerázu behom replikácie DNA (*Kuznetsov et al., 2015*).

Enzymatické mechanizmy majú dôležitú funkciu pri odstraňovaní poškodených báz v DNA. Vystrihnutie niektorých foriem nesprávnych báz z DNA je iniciované aktivitou špecifických DNA reparačných enzýmov, tzv. glykozyláz. Tieto enzýmy svojou aktivitou katalyzujú hydrolýzu N-glykozidickej väzby, ktorá spája nesprávnu bázu k deoxyribózo-fosfátovej kostre. Tento mechanizmus opravy iniciovaný DNA glykozylázami sa označuje ako bázová excizná reparácia (BER). Vďaka BER sú chemicky modifikované zvyšky odstránené vo forme voľných báz. Ďalší typ poškodenia v DNA vyvolávajú DNA glykozylázy hydrolýzou N-glykozidickej väzby. V dôsledku straty báz vznikajú v DNA APS. Tieto miesta môžu vzniknúť i v dôsledku spontánnej hydrolýzy N-glykozidickej väzby. Oprava APS je niekoľkokrokový proces vedúci ku kompletnej reparácii. Odstránenie APS je sprostredkované druhou triedou BER enzýmov, tzv. AP endonukleázy. (*Friedberg et al., 1995*). Prehľad jednotlivých DNA glykozyláz, ich substrátov a následne vznikajúcich produktov je uvedený v *Tab. 5*.

Glykozylázy spoľahlivo rozpoznávajú narušené miesta DNA medzi nespočetným množstvom nepoškodených báz. Jedná sa o veľmi zložitý proces. S najväčšou pravdepodobnosťou sa viažu na nešpecifické miesta DNA molekuly, pozdĺž ktorej sa posúvajú jednorozmernou difúziou dovtedy, kým nelokalizujú poškodenie alebo sa neoddelia od DNA (*Prakash et al 2012*).

Pre identifikáciu poškodenia pomocou týchto enzýmov bolo prijatých niekoľko hypotéz. Prvá z nich popisuje väzbu glykozylázy na vysunuté poškodené miesta DNA a jej pohyb pozdĺž DNA, pri ktorom kontroluje každú jednotlivú bázu. Tento prípad sa

však javí ako nepravdepodobný, najmä z hľadiska farmakokinetiky (*Prakash et al., 2012*).

Ďalším predpokladom je možnosť glykozyláz vychytať náhodne vysunuté poškodené bázy. Tieto vysunuté miesta DNA väčšinou obsahujú poškodenia v dôsledku vzniku vodíkovej väzby. Vplyvom toho dochádza k nahromadeniu interakcií, ktoré môžu byť následne menené v porovnaní s normálnymi, to znamená nepoškodenými bázami (*Prakash et al., 2012*).

Posledná, tretia hypotéza popisuje posun glykozyláz po DNA a ich schopnosť rozpoznať daný substrát na základe špecifických interakcií medzi jednotlivými glykozylázami a molekulou DNA (*Prakash et al., 2012*).

Ako bolo uvedené na začiatku, enzýmy so špecifickou endonukleolytickou aktivitou sa využívajú v spojení spolu s kométoým testom kvôli zvýšeniu citlivosti a selektivity pri určení veľkosti oxidačného poškodenia DNA. Enzým Endo III (*Obr. 6*) sa používa k sledovaniu prítomných oxidovaných pyrimidínov, enzým Fpg (*Obr.7*) k detekcii oxidovaných purínov. Enzým 3-metyladenín-DNA-glykozyláza vykazuje aktivitu proti alkylovaným bázam v DNA. V dôsledku UV žiarenia vznikajú v DNA diméry, ktoré vykazujú citlivosť k enzýmu endonukleáza V. Enzým uracil-DNA-glykozyláza, ktorý sa zatiaľ neuplatnil v spojení s kométoým testom, dokáže rozpoznať chybné zabudovaný uracil v reťazci DNA (*Gautier, 2011*).

V tejto práci sa k identifikácii oxidovaných báz vzniknutých pri oxidačnom poškodení DNA použili špecifické enzýmy EndoIII a Fpg. V prípade prítomnosti poškodených báz v DNA konvertovali tieto miesta na APS, následkom čoho došlo k tvorbe SSBs, ktorých množstvo bolo odhadnuté použitím kométového testu.

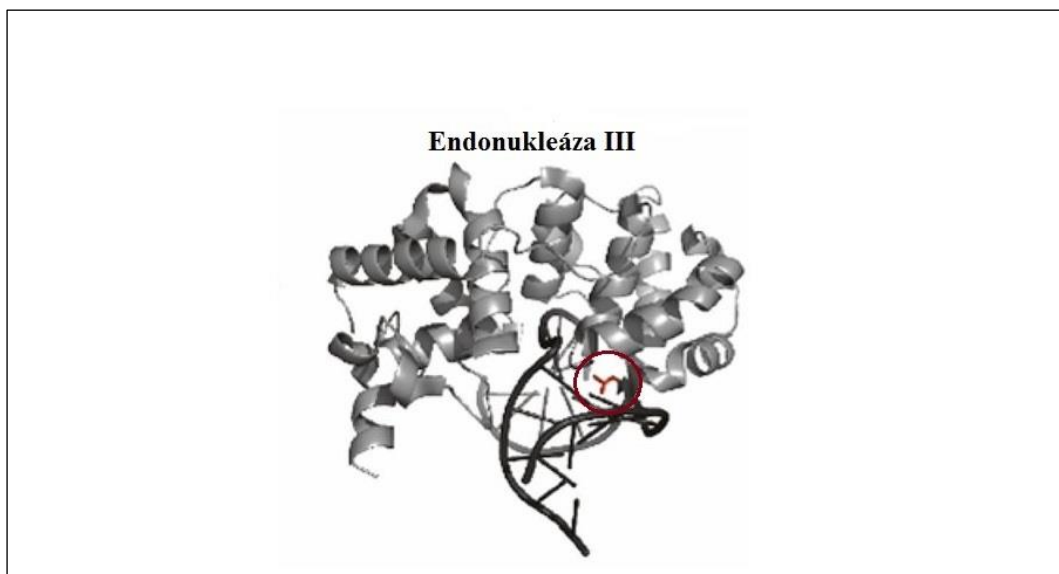
Tab. 5 *Prehľad jednotlivých glykozyláz s ich špecifickými substrátmi a produktmi (upravené podľa Friedberg et al., 1995).*

Enzým	Substrát	Produkty
Ura-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca uracil	uracil, AP miesta
Hmu-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca hydroxymethyluracil	hydroxymethyluracil, AP miesta
5-mc-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca 5-methylcytozín	5-methylcytozín, AP miesta
Hx-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca hypoxantín	hypoxantín, AP miesta
Tymín mismatch-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca G-T mispairs	tymín, AP miesta
MutY-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca G-A mispairs	adenín, AP miesta
3-mA-DNA glykozyláza I	DNA obsahujúca 3-methyladenín	3-methyladenín, AP miesta
3-mA-DNA glykozyláza II	DNA obsahujúca 3-methyladenín, 7-methylguanín alebo 3-methylguanín	3-methyladenín, 7-methylguanín, 3-methylguanín, AP miesta
FaPy-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca foramidopyrimidínové zvyšky alebo 8-hydroxyguanín	2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidín, 8-hydroxyguanín, AP miesta
5,6-HT-DNA glykozyláza (endonukleáza III)	DNA obsahujúca 5-6-hydratované tymínové zvyšky (moieties)	5,6-dihydroxydihydrotymin, 5,6-dihydrotymin, AP miesta
PD-DNA glykozyláza	DNA obsahujúca tymínové diméry	pyrimidínové diméry v DNA s hydrolyzovanými 5' glykozylovými väzbami, AP miesta

2.4.3.1 Endonukleáza III (Endo III)

Enzým Endo III bol pôvodne identifikovaný ako enzým s endonukleolytickou aktivitou pôsobiaci na degradáciu ťažko poškodenej DNA UV žiarením. Ukázalo sa, že má veľmi širokú substrátovú špecificitu. Svojou aktivitou odstraňuje z DNA pyrimidíny s nasýtenými, otvorenými alebo čiastočne fragmentovanými kruhmi. Ochrňuje organizmus pred letálnymi následkami ionizujúceho žiarenia a oxidačnými zlúčeninami a je hlavnou súčasťou obranného mechanizmu proti oxidovaným pyrimidínom v DNA (Krokan *et al.*, 1997).

Ako už bolo uvedené, Endo III odstraňuje z DNA predovšetkým poškodené pyrimidíny, medzi ktoré patria tymín glykol, uracil glykol, 5,6-dihydrouracil, 5,6-dihydrotymín, 5-hydroxy-5,6-dihydrotymín, 5-hydroxy-5,6-dihydrouracil, 5-hydroxyuracil, 5-hydroxycytozín, alloxan, urea, 6-hydroxy-5-hydrouracil, 5,6-dihydroxycytozín, 6-hydroxy-5-hydrocytozín a jednotlivé produkty ich rozpadu (Kuznetsov *et al.*, 2015).



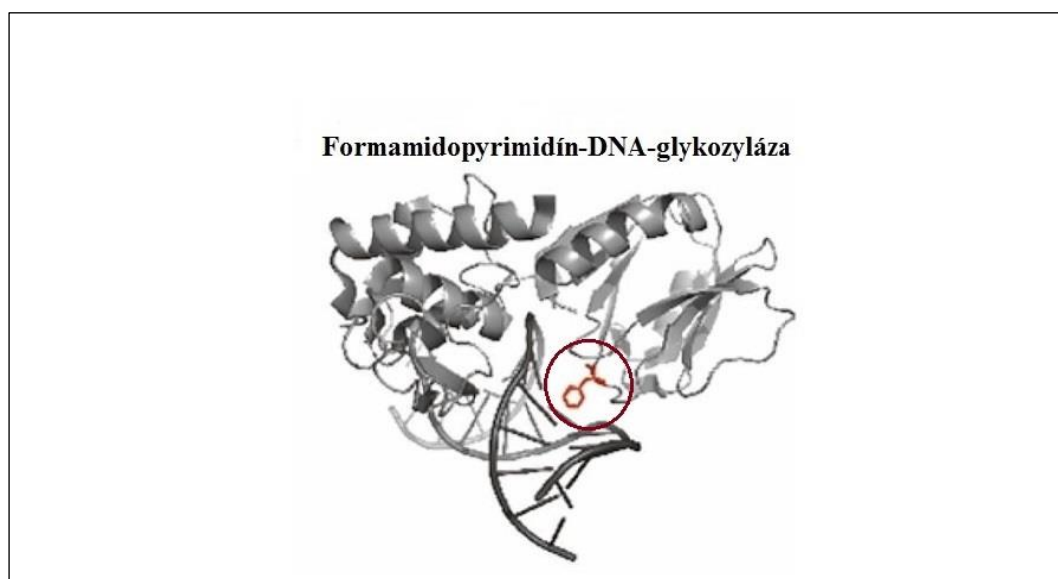
Obr. 6 Enzým Endo III (upravené podľa Nelson *et al.*, 2014).

2.4.3.2 Formamidopyrimidín-DNA glykozyláza (Fpg)

Enzým Fpg je jednou z DNA glykozyláz, ktorá sa podieľa na procese BER. Enzým Fpg vykonáva prvý krok tohto procesu, ktorý je poháňaný tepelnou energiou. Súčasťou tohto kroku je lokalizovanie poškodených báz a rozštiepenie spomínanej N-glykozidickej väzby s následným odstránením bázy. Ako bolo uvedené, Fpg sa podieľa predovšetkým na eliminácii oxidovaných purínov, najčastejšie 8-oxoGua a 2,6-diamino-4-hydroxy-*N*-5-methylformamidopyrimidínu (Nelson *et al.*, 2014).

Mnohé biochemické štúdie dokazujú, že 8-oxoGua je substrátom pre enzým Fpg a zároveň, že Fpg preferuje 8-oxoGua pred 2,6-diamino-4-hydroxy-*N*-5-methylformamidopyrimidínom. Z toho vyplýva dôležitosť tohto biologického substrátu pre Fpg. (Prakash *et al.*, 2012).

Na základe týchto špecifických vlastností Fpg sa môže odhadnúť stupeň poškodenia DNA v dôsledku vzniku oxidovaných purínových báz, ktoré bývajú častým ukazovateľom oxidačného poškodenia DNA.



Obr. 7 Enzým Fpg (upravené podľa Nelson *et al.*, 2014).

3. CIEĽ

Zámerom tejto práce bolo zistiť vplyv GSH, GSH-A, GSH-B a EGCG na indukciu a reparáciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H₂O₂ u buniek A549 *in vitro* pomocou kométového testu. Jednotlivé ciele sú uvedené v nasledujúcich bodoch.

1. Sledovať vplyv GSH, GSH-A a GSH-B na indukciu oxidačného poškodenia DNA na základe stanovenia množstva oxidovaných pyrimidínov, biomarkerov oxidačného stresu, použitím špecifického enzýmu Endo III .
2. Stanoviť koncentračnú závislosť vplyvu GSH, GSH-A a GSH-B na inhibíciu indukcie oxidačného poškodenia DNA.
3. Sledovať vplyv EGCG na indukciu oxidačného poškodenia DNA a zároveň určiť jeho efekt na reparáciu tohto poškodenia.
4. Nájsť koncentrácie EGCG s inhibičným pôsobením na indukciu oxidačného poškodenia DNA a so zosilňujúcim efektom na reparáciu poškodenej DNA bez negatívneho dopadu na bunky.
5. Vytvoriť hypotézu o mechanizme (mechanizmoch) účinku testovaných látok.

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Materiál

4.1.1 Bunková línia A549

A549 je označenie pre bunkovú líniu ľudského karcinómu pľúc, ktorá sa používa na sledovanie toxicity a genotoxicity. Táto línia vykazuje špecifické znaky, ktorými sú vysoká hladina GSH a vysoká expresia génu hemoxygenázy-1, ktorý výrazne prispieva k bunkovej odpovedi na oxidatívny stres (*Speit et Bonzheim, 2003*).

Bunky A549 boli získané z ATCC (z angl. American Type Culture Collection). Kultivovali sa v médiu MEM- α , ktoré bolo doplnené 10% BSA. Pasážovali sa trypsinizáciou dva krát do týždňa v pomere 1:5.

4.1.2 Chemikálie

Agaróza štandard (Sigma-Aldrich, s.r.o.), vysokotuhnúca agaróza (HMP) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), nízkotuhnúca agaróza (LMP) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), dimetylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), EGCG (Sigma-Aldrich, s.r.o.), Endo III (Ústav experimentálnej botaniky), ethidium bromid 95% (EB) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Erba Lachema, s.r.o.), Fpg (Ústav experimentálnej botaniky), GSH (Sigma-Aldrich, s.r.o.), GSH-A (MUDr. R. Hyšpler), GSH-B (MUDr. R. Hyšpler, FNK), H₂O₂ (Peroxides, s.r.o.), HCl p.a. (Lach-Ner, s.r.o.), KCl p.a. (Erba Lachema, s.r.o.), KOH p.a. (Erba Lachema, s.r.o.), minimum essential medium- α (MEM- α) (PAA), NaCl p.a. (Lach-Ner, s.r.o.), NaOH p.a. (Lach-Ner, s.r.o.), N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfónová kyselina (HEPES p.a.) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), phosphate buffered saline tablets (PBS) (Sigma-Aldrich, s.r.o.), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan p.a. (Penta, s.r.o.), Triton X-100 (Serva), tridestilovaná voda, trypsin (PAA).

4.1.3 Prístroje a pomôcky

Analytické váhy (Boeco, Nemecko), CO₂ inkubátor (Shellab, USA), centrifúga Z 400 K (Hermle, Nemecko), elektroforetický tank, fluorescenčný mikroskop Eclipse E 400 (Nikon, Japonsko), chladnička 175 R (Zanussi), kamera ProgRes® CF cool (Jenoptik), kúpeľ 37°C MTA (Kutesz 609/a), laminárny box AURA 2000 (Taliansko),

magnetická miešačka s ohrevom (Yellow line, Nemecko), mikrovlnná rúra (Daewoo, Kórea), mraznička (Bosch), počítač (Hewlett-Packard), predvážky EMB 220-1 (Kern, Nemecko), svetelný mikroskop Eclipse TS100 (Nikon, Japonsko), výrobník ľadovej drte (Angelantoni Industrie, Taliansko).

Automatické pipety, Bürkerova komôrka, Erlenmayerove banky, kadičky, kultivačné fľaštičky, mikroskúmvky, Pasteurove pipety, Petriho misky, podložné a krycie sklíčka, sklenené skúmvky, sklenené kvety, stojany na skúmvky.

4.1.4 Programy

Počítačová analýza obrazu Lucia G. (Laboratory Imaging, s.r.o.), štatistické spracovanie SigamStat

4.2 Roztoky pre Comet assay, ich príprava a použitie

4.2.1 Agaróza na pot'ahovanie sklíčok

K 100 ml vody sa pridal 1 g štandardnej agarózy a za varu dôkladne rozpustil do vzniku číreho roztoku. Do zhotoveného 1% roztoku sa ponorili podložné sklíčka a okamžite z jednej strany utreli, aby bola agaróza len na jednej strane sklíčok (vznik prvej vrstvy). Potom sa sklíčka usušili pri teplote 60°C.

4.2.2 Vysokotuhnúca agaróza HMP

Pridaním 1 g štandardnej agarózy k 100 ml PBS sa po dôkladnom rozpustení za neustáleho varu získal 1% roztok. Pripravený roztok HMP agarózy sa udržoval pri kontinuálnom zahrievaní až do aplikácie na podložné sklíčka (vznik druhej vrstvy).

4.2.3 Nízkotuhnúca agaróza LMP

Nízkotuhnúca agaróza (LMP) v množstve 1 g bola za varu rozpustená v 100 ml PBS, čím vznikol 1% roztok tejto látky. Po zhotovení sa udržiaval v kúpeli pri teplote 37°C. Tesne pred pokladaním na sklíčka sa roztok LMP agarózy poriadne premiešal so suspenziou buniek a aplikoval na stuhnutú vrstvu HMP agarózy (vznik tretej vrstvy).

4.2.4 Lyzačný roztok

Na prípravu roztoku o objeme 100 ml sa navážilo 1,45 g NaCl, 2,92 g EDTA a 0,12 g Tris(hydroxymetyl)-aminometánu (10 mM). pH roztoku sa upravilo pridaním 1,2 g NaOH. Na prípravu roztoku sa používala tridestilovaná voda. Pred pokusom sa k 100 ml roztoku pridal 1 ml Tritonu X-100 (1%) za neustáleho miešania na magnetickej miešačke. Zhotovený lyzačný roztok sa dal pred pokusom vychladiť na 4°C. Jednotlivé podložné sklíčka sa poukladali do kyviet a zaliali sa lyzačným roztokom tak, aby vrstvy agarózy s bunkami boli úplne ponorené. Lýza bunkových membrán jednotlivých štruktúr prebiehala jednu hodinu pri 4°C.

4.2.5 ENDO III pufor

V experimentoch, kde sa pracovalo so špecifickým enzýmami, bolo potrebné pripraviť zásobný roztok Endo III pufru o objeme 1000 ml rozpustením 7,45 g KCl, 9,53 g HEPES, 1,46 g EDTA a 0,2 g BSA v tridestilovanej vode. Jednotlivé podložné sklíčka s bunkami sa poukladali do kyvety a celé sa zaliali Endo III pufrom na 5 minút. Po uplynutí tejto doby sa pufor zliat a oplach sa zopakoval ešte dva razy, vždy s čistým Endo III pufrom, zakaždým v trvaní piatich minút. Po treťom oplachu sa podložné sklíčka s bunkami prichystali na aplikovanie špecifických enzýmov (Endo III, Fpg).

4.2.6 Príprava elektroforetického pufru

Na zhotovenie 2000 ml elektroforetického pufru sa navážilo 24 g NaOH. Navážka sa najskôr rozpustila v menšom objeme tridestilovanej vody za súčasného pretrepávania. Po pridaní 4 ml 0,5 M EDTA sa roztok doplnil na výsledný objem a uložil sa do ľadu. Pufor, schladený na 4°C, sa naliať do elektroforetického tanku uloženého v chladničke, a následne sa doň naležato poukladali podložné sklíčka s bunkami na 40 minútovú alkalickú hydrolýzu DNA. Po ukončení alkalickéj hydrolýzy DNA sa na 30 minút zapla elektroforéza.

4.2.7 Neutralizačný roztok

K príprave 1000 ml roztoku sa navážil Tris(hydroxymetyl)-aminometán v množstve 48,456 g. Rozpustil sa v tridestilovanej vode. pH výsledného roztoku sa upravilo na hodnotu 7,5 pridaním určitého objemu koncentrovanej HCl, približne 25 ml na 1000 ml roztoku. Zhotovený roztok sa používal k neutralizácii podložných sklíčok s bunkami. Neutralizácia sa opakovala trikrát v trvaní päť minút vždy s novým čistým roztokom, to znamená, že po jednej neutralizácii za roztok zliat a opäť nalial nový roztok tak, aby boli bunky úplne ponorené. Ten istý krok sa ešte raz zopakoval. Po tretej neutralizácii sa podložné sklíčka s bunkami povyberali a poukladali na filtračný papier, na ktorom sa nechali voľne vysušiť.

4.2.8 Ethidium bromid

Na hodnotenie buniek sa pripravoval roztok EB s výslednou koncentráciou 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, ktorá vznikla rozpustením 2 mg koncentrovaného EB v 5 ml vody, a následným odobratím 250 μl do 6 ml vody. Roztok EB slúžil k vizuálnemu hodnoteniu buniek vo fluorescenčnom mikroskope.

4.3 Comet Assay - metóda jednobunkovej elektroforézy

Princíp jednobunkovej elektroforézy sa zakladá na sledovaní migrácie jadrovej DNA počas elektroforézy. Táto metóda má dve varianty - môže využívať buď alkalické alebo neutrálne podmienky (*Pohanka et al, 2012*).

Neutrálne podmienky umožňujú odhaliť len DSBs. Pri tejto modifikácii nedochádza k alkalickému denaturácii DNA, z toho vyplýva, že pri elektroforéze migrujú celé DSBs DNA (*Pohanka et al, 2012*).

Druhá modifikácia metódy, ako už bolo na začiatku uvedené, je tzv. alkalická. Práve v alkalickom prostredí dochádza k rozpletaniu DNA. Rýchlosť rozpletania DNA je priamo úmerná počtu zlomov v DNA. Z toho vyplýva, že je možné odhaliť nie len priame zlomy DNA, ale takisto všetky ALS v molekule DNA, medzi ktoré patria alkalilabilné addukty, abazické miesta a aktuálne opravované miesta (oprava pomocou použitia reparačných enzýmov, ktoré z DNA odstránia poškodené bázy, následkom

čoho vzniknú v DNA zlomy). Pri tejto modifikácii je potrebné uviesť, že nedokáže rozlíšiť DSBs a SSBs, z toho vyplýva, že sa stanovujú spoločne (*Pohanka et al, 2012*).

Poškodenie DNA sa vyhodnocuje pomocou fluorescenčného mikroskopu obrazovou analýzou Lucia doplnenou o kométový modul. Pri poškodení DNA behom elektroforézy dochádza k vycestovaniu uvoľnenej DNA z jadra. Migrácia DNA je priamo úmerná poškodeniu, to znamená, čím väčší počet zlomov v DNA, tým je migrácia väčšia. Pri hodnotení vo fluorescenčnom mikroskope vidieť u buniek bez poškodenia guľaté jadrá, zatiaľ čo u buniek s poškodením po uvoľnení a migrácii DNA vidieť štruktúry, ktoré pripomínajú kométy. Chvost kométy tvorí DNA, ktorá sa uvoľnila behom alkalického rozpletania a zvyšná DNA je v jadre kométy. Miera poškodenia, to znamená fluorescencia v chvoste kométy, sa hodnotí vzhľadom k fluorescencii v jadre. Poškodenie DNA sa uvádza v percentách (%), ktoré sú priamo úmerné počtu vytvorených zlomov v DNA (*Pohanka et al, 2012*).

V experimentoch uvedených v tejto práci sa k detekcii poškodenia DNA použila alkalická modifikácia kométového testu.

4.3.1 Vysievanie buniek

Bunky A549 sa vysievali na Petriho misky jeden, prípadne dva dni pred každým experimentom. Používali sa Petriho misky s priemerom 4 cm na 1,5 ml média zmiešaného so suspenziou buniek. Pred vysievaním sa zakaždým stanovil približný počet buniek na jednu mištičku, najčastejšie 200 000. Nakoniec sa na každú mištičku pipetovalo 1,5 ml média dôkladne zmiešaného so suspenziou buniek (cca 2×10^5 buniek na 1,5 ml média).

4.3.2 Ovplyvnenie buniek A549

Pripravili sa jednotlivé roztoky EGCG (0 mM, 12,5 mM, 25 mM a 50 mM) nariedením v DMSO a GSH (0mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 10 mM, 16 mM a 32 mM), GSH-A (0 mM, 0,0078 mM, 0,0156 mM, 0,03125 mM, 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM a 10 mM) a GSH-B (0 mM, 0,0078 mM, 0,0156 mM, 0,03125 mM, 0,0625 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM a 10 mM) nariedením v PBS (*pozn.:*

najnižšie hodnoty koncentrácií látok GSH-A a GSH-B sú v grafoch a tabuľkách kvôli prehľadnosti uvedené v μM). Zhotovené roztoky sa aplikovali na Petriho misky s 1,5 ml média zmiešaného so suspenziou buniek A549 v množstve 150 μl (GSH, GSH-B, GSH-A) a 7,5 μl (EGCG). EGCG sa nechal pôsobiť na bunky dve hodiny. GSH a látky od neho odvodené sa aplikovali k bunkám na jednu hodinu. Ovplyvnenie buniek prebiehalo v CO_2 inkubátore, následne sa v bunkách indukovalo poškodenie pôsobením H_2O_2 (0 mM, 0,01 mM, 0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 0,2 mM) po dobu piatich minút.

V druhom prípade (len pri testovaní EGCG) sa bunky najskôr poškodili H_2O_2 , opäť v trvaní päť minút. Po uplynutí tejto doby sa aplikovali na bunky sledované koncentrácie EGCG, ktoré sa dali následne reparovať v časoch 60, 30 alebo 15minút (sledoval sa účinok EGCG na proces reparácie). Proces reparácie prebiehal v CO_2 inkubátore.

Kontrola sa pripravila ovplyvnením buniek H_2O_2 bez ošetrenia ochrannými látkami. Namiesto EGCG sa na médium s bunkami aplikoval DMSO v objeme 7,5 μl (výsledná koncentrácia DMSO bola veľmi nízka – 0,0075 ml DMSO na 1,5 ml média, takže nedošlo k poškodeniu buniek, ako k tomu pri pôsobení tejto látky dochádza). Namiesto GSH, GSH-A a GSH-B sa k bunkám pridalo 150 μl PBS.

4.3.3 Postup pri poškodení buniek A549 vplyvom H_2O_2

Po ovplyvnení buniek danou látkou boli misky vybraté z CO_2 inkubátora. Médium z misiek sa odsalo. Následne sa Petriho misky s bunkami prepláchli pomocou PBS (približne 2 ml na každú Petriho misku, ktoré sa hneď odsali) a k bunkám sa pridali jednotlivé koncentrácie H_2O_2 v množstve 1 ml. Po piatich minútach sa H_2O_2 odsal a ešte raz sa zopakoval oplach PBS (opäť približne 2 ml PBS na každú Petriho misku). Nakoniec sa k bunkám do Petriho misiek pridal konečný objem PBS, 1,5 ml.

V prípade, keď sa bunky najskôr ovplyvnili H_2O_2 na 5 minút, sa postupovalo následne: po uplynutí piatich minút sa H_2O_2 odsal z Petriho misiek a na oplach sa pridal čistý PBS v objeme 2 ml do každej misky, ktorý sa hneď odsal. Nakoniec sa na každú Petriho misku s bunkami pridalo 1,5 ml média a 7,5 μl EGCG v testovaných koncentráciách, s výnimkou buniek, ktoré sa použili ako kontrola (bez EGCG). K týmto

bunkám sa aplikoval priamo čistý PBS v množstve 1,5 ml a následne sa tieto Petriho misky zobrali na trypsinizáciu. Ostatné Petriho misky sa s ovplyvnenými bunkami dali reparovať do CO₂ inkubátora. Po uplynutí reparácie (60, 30 alebo 15 minút) sa odsalo médium z Petriho misiek a vykonal sa oplach priamo s čistým PBS (2 ml do každej Petriho misky). Nakoniec sa k bunkám pred trypsinizáciou opäť aplikoval čistý PBS v objeme 1,5 ml.

4.3.4 Trypsinizácia a príprava suspenzie buniek

Z Petriho misiek sa PBS odsal a následne sa pridal 0,1 % trypsín tak, aby sa pokrylo celé dno Petriho misiek (približne 0,5 ml). Po troch minútach sa trypsín odsal, a na základe odhadu množstva buniek na dne mištičiek (sledovanie dna Petriho misiek oproti tmavému pozadiu) sa pridal výsledné množstvo PBS. Bunky sa následne zmyli pomocou pipety z dna Petriho misiek za vzniku suspenzie. Z každej misky so suspenziou buniek sa do mikroskúmavky odobralo 35 μ l (stojan s mikroskúmavkami uložený v škatuľke s ľadom). V prípade experimentov, kde sa sledovala prítomnosť oxidovaných báz pomocou špecifických enzýmov, sa z každej Petriho misky s bunkami odobralo buď po 35 μ l do dvoch mikroskúmaviek (bez enzýmu a na Endo III) alebo po 35 μ l do troch skúmaviek (bez enzýmu, na Endo III a Fpg).

4.3.5 Príprava sklíčok

Na podložné sklíčka potiahnuté štandardnou agarózou sa najskôr aplikovala HMP agaróza v množstve 85 μ l, ktorá sa okamžite prikryla krycím sklíčkom. Sklíčka sa ležato poukladali na dosku s ľadom. Po stuhnutí HMP agarózy sa krycie sklíčka stiahli dole. LMP agaróza v objeme 85 μ l sa vždy pridala do konkrétnej mikroskúmavky so suspenziou buniek, zmes sa okamžite zhomogenizovala pomocou pipety a 85 μ l sa aplikovalo na stuhnutú vrstvu HMP agarózy. Táto vrstva sa opäť prikryla krycím sklíčkom, podložné sklíčka sa poukladali na dosku s ľadom a po schladení sa krycie sklíčka post'ahovali dole.

4.3.6 Lýza buniek

Podložné sklíčka s bunkami sa zvislo poukladali do kyvety naplnenou až po okraj schladeným lyzačným roztokom na 4°C (dôležité, aby boli ponorené vrstvy

agarózy) a následne sa dali lyzovať. Proces lýzy jadrových a bunkových membrán prebiehal jednu hodinu pri teplote 4°C.

4.3.7 Odstránenie oxidovaných báz použitím reparačných enzýmov

Pri experimentoch, kde sa sledovala prítomnosť oxidovaných báz v dôsledku poškodenia, sa použili reparačné enzýmy. Pred použitím enzýmov sa podložné sklíčka najskôr poukladali do kyvety naplnenou Endo III pufrom o teplote 37°C. Kyvety boli položené vo vodnom kúpeli s teplotou 37°C. Podložné sklíčka boli v kyvete s pufrom 5 minút, potom sa pufor zliat a do kyvety sa naliať čistý pufor opäť na 5 minút. Postup sa ešte raz zopakoval, potom sa podložné sklíčka s bunkami povyberali z kyvety a poukladali do krabíc s navlhčeným filtračným papierom. Na vrstvu agarózy s bunkami sa z mikroskúmavky s enzýmom aplikovalo 30 µl a prikrylo krycím sklíčkom. Používaný enzým bol tesne pred aplikáciou zahriaty vo vodnom kúpeli na 37°C. Enzým Endo III sa používal k detekcii oxidovaných pyrimidínov a enzým Fpg k sledovaniu oxidovaných purínov v DNA. Krabice s podložnými sklíčkami sa prikryli a uložili na 45 minút do CO₂ inkubátora.

4.3.8 Denaturácia DNA a elektroforéza

Po uplynutí 40 minút pôsobenia enzýmov sa krycie sklíčka dali dole a podložné sklíčka s bunkami sa vodorovne poukladali do tanku uloženého v chladničke. Následne sa do tanku naliať elektroforetický pufor ochladený na 4° C (dôležité, aby všetky sklíčka boli pod hladinou pufru), aby prebehla denaturácia (alkalické rozpletanie) DNA. Rozpletanie trvalo 40 minút a po uplynutí tejto doby sa k tanku pripojili káble a na 30 minút sa spustila elektroforéza. Elektroforéza prebiehala pri stanovených podmienkach - napätie 25 V, intenzita prúdu 0,30 A, čas 30 minút. Intenzita prúdu bola udržiavaná počas elektroforézy odsávaním alebo pridávaním elektroforetického pufru pomocou striekačky (hodnota prúdu sa sledovala na displeji).

4.3.9 Neutralizácia

Po uplynutí elektroforézy sa podložné sklíčka s bunkami zvislo poukladali do kyvety naplnenej ochladeným neutralizačným roztokom na 5 minút. Po uplynutí sa

neutralizačný roztok zliat a do kyvety sa nalial nový roztok na 5 minút, opäť sa zliat a postup sa ešte raz zopakoval. Po ukončení neutralizácie sa podložné sklíčka s bunkami preukladali do čistej kyvety a na 5 minút celé ponorili do tridestilovanej vody. Po ukončení oplachu tridestilovanou vodou sa podložné sklíčka povyberali z kyvety, ležato poukladali na filtračný papier a nechali voľne vyschnúť.

4.3.10 Farbenie sklíčok EB a vyhodnocovanie pomocou počítačovej analýzy

Podložné sklíčka s bunkami sa pred vyhodnocovaním navlhčili v tridestilovanej vode, a následne sa na vrstvu LMP agarózy aplikovalo 0,25 μ l roztoku EB, fluorescenčného farbiva. K detekcii oxidatívneho poškodenia DNA bola použitá počítačová analýza obrazu LUCIA a fluorescenčný mikroskop. Hodnotilo sa 30 buniek na každom podložnom sklíčku.

5. VÝSLEDKY

5.1 Eliminácia poškodenia DNA v dôsledku oxidačného stresu

5.1.1 Vplyv GSH, GSH-A a GSH-B na inhibíciu tvorby SSBs a oxidačného poškodenia pyrimidínov

GSH (resp. GSH-A, GSH-B) pôsobil na bunky A549 jednu hodinu. Ošetrované bunky boli 5 minút vystavené oxidačnému stresu v dôsledku pôsobenia H_2O_2 . Následne sa pridal enzým Endo III, ktorý sa použil k detekcii poškodených pyrimidínov, v dôsledku čoho došlo k ich odstráneniu z DNA a vytvoreniu APS a následnej indukcii tvorby SSBs. Na kontrolu sa pripravili bunky, ktoré neboli ovplyvnené testovanými antioxidantmi, to znamená, namiesto antioxidantnej látky bol aplikovaný čistý PBS.

Hlavnou úlohou bolo zistiť, do akej miery dokáže testovaná látka ochrániť bunky pred následkami oxidačného poškodenia. Sledoval sa vplyv na indukciu poškodenia DNA. Hľadali sa koncentrácie, ktoré dokážu zaistiť inhibíciu indukcie tohto poškodenia bez vedľajších negatívnych účinkov na bunky.

Ako prvý sa testoval účinok GSH. Prvé experimenty boli zamerané na vplyv vyšších koncentrácií. Po prvých dosiahnutých výsledkoch sa zistilo, že 8 mM GSH nemal žiadny významný vplyv na ochranu, dokonca 10 mM vykazoval na bunky toxický vplyv, kedy došlo k ďalšiemu nárastu oxidačného poškodenia DNA. Naopak, nižšie koncentrácie viedli k zníženiu poškodenia DNA indukovaného H_2O_2 . K overeniu sa testoval účinok i extrémne vysokých koncentrácií, pri ktorých bol zaznamenaný nárast poškodenia DNA v dôsledku indukcie vzniku SSBs a oxidovaných pyrimidínových báz. Preto sa v ďalších pokusoch sledoval účinok len nižších koncentrácií, ktoré viedli k významnému odstráneniu následkov oxidačného poškodenia DNA. Získané výsledky o GSH smerovali k testovaniu jeho chemických modifikácií, GSH-A a GSH-B, ktorých vplyv na bunku bol testovaný najskôr v maximálnej koncentrácii 10mM, ktorá nevykázala žiadnu ochranu na DNA pred oxidačným poškodením. Z tohto dôvodu boli jednotlivé testy uvedených látok zamerané na účinky veľmi nízkych koncentrácií, ktoré významne zasiahli do indukcie poškodenia DNA, kedy sa zaznamenal výrazný pokles oxidovaných pyrimidínových báz.

5.1.1.1 Vplyv GSH na tvorbu oxidačného poškodenia DNA a opravu Endo III senzitivných miest u buniek A549

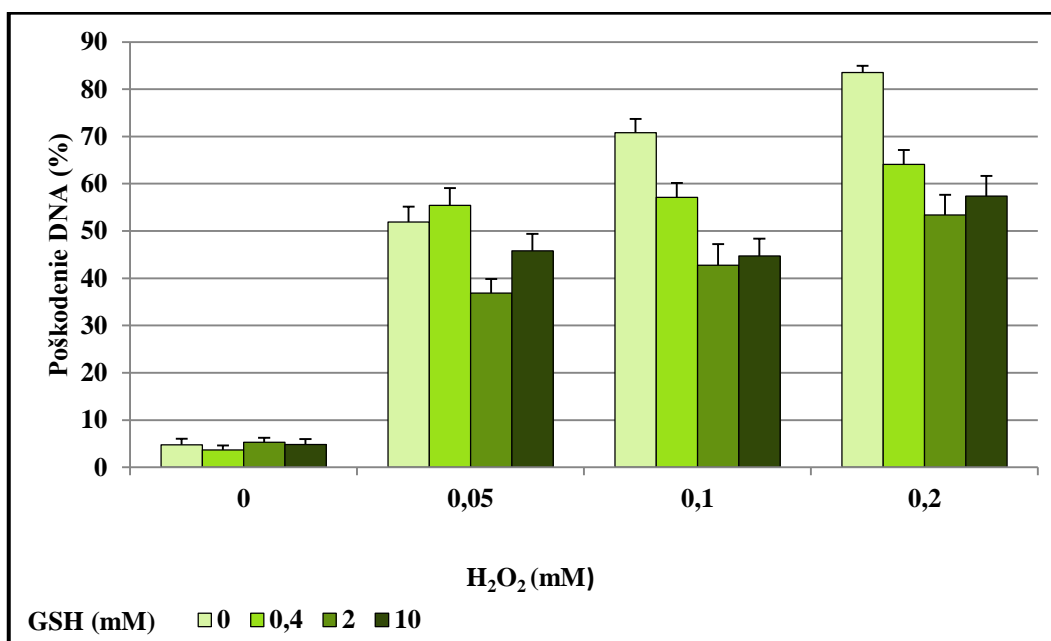
Účinky GSH na inhibíciu vzniku oxidačného poškodenia DNA sa sledovali na bunkovej línii A549 *in vitro*. Oxidačný stres v týchto bunkách vyvolal H₂O₂ pôsobiaci v štyroch vzostupných koncentráciách - 0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 0,5 mM. Kontrolná skupina buniek bola ovplyvnená len samotným H₂O₂ bez pôsobenia antioxidantu, to znamená bez GSH. Čím vyššia koncentrácia H₂O₂, tým bolo v bunkách indukované väčšie poškodenie DNA. Miera poškodenia DNA je vo všetkých výsledkoch jednotlivých experimentov uvedená v %, ktoré popisujú množstvo poškodenej DNA uvoľnenej z jadra kométy.

Na začiatku sa sledovali antioxidantné účinky GSH v koncentráciách 0 mM, 0,4 mM, 2 mM a 10 mM (*Obr. 8, Obr. 9*).

GSH v koncentrácii 0,4 mM nedokázal inhibovať tvorbu SSBs indukovaných 0,05 mM H₂O₂. SSBs vyvolané 0,1 mM a 0,2 mM H₂O₂ boli vyššie uvedenou koncentráciou GSH čiastočne eliminované. Vyššie koncentrácie GSH, 2 mM a 4 mM, inhibovali tvorbu poškodenia DNA pri všetkých koncentráciách H₂O₂. Ako najúčinnější sa ukázal 2 mM GSH, ktorý dokázal zo všetkých najviac ochrániť DNA pred oxidačným poškodením indukovaným 0,1 mM a 0,2 mM H₂O₂ (*Tab. 6, Obr. 8*).

Tab. 6 Vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest(experiment I).

	Pôsobenie Endo III			
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	4,74	51,88	70,82	83,52
	1,31	3,28	2,93	1,46
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4
poškodenie DNA [%] ± SE	3,69	55,44	57,1	64,07
	0,96	3,67	3,07	3,1
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	5,27	36,84	42,72	53,39
	0,95	3,02	4,48	4,25
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	10	10	10	10
poškodenie DNA [%] ± SE	4,82	45,79	44,72	57,38
	1,15	3,58	3,63	4,28

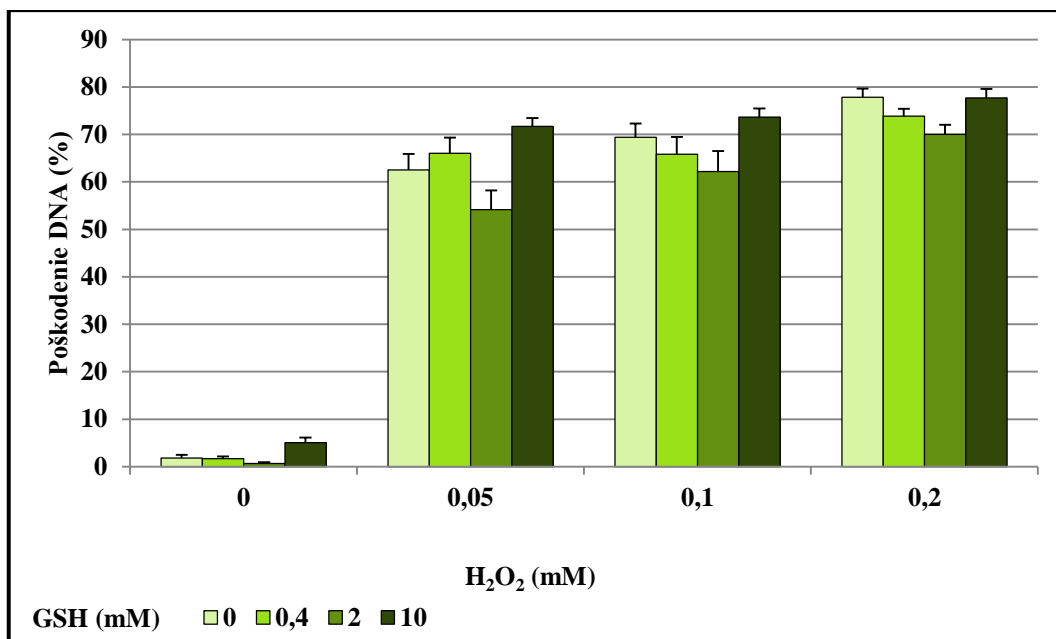


Obr. 8 Vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment I).

Ďalší experiment bol analogickým opakovaním vyššie popísaného pokusu. GSH v koncentrácii 0,4 mM čiastočne znížil poškodenie DNA vyvolaného 0,1 mM a 0,2 mM H₂O₂. Najvyššiu ochranu preukázal 2 mM GSH, čím potvrdil svoj inhibičný účinok na tvorbu SSBs indukovaných vo všetkých vzostupných koncentráciách H₂O₂. Pri pôsobení 10 mM GSH došlo k indukcii SSBs, čo viedlo k ďalšiemu nárastu poškodenia DNA (Tab. 7, Obr. 9)

Tab. 7 Vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia vyvolaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment II).

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	1,85	62,54	69,41	77,82
	0,67	3,37	2,9	1,85
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4
poškodenie DNA [%] ± SE	1,68	66,06	65,8	73,88
	0,48	3,31	3,68	1,56
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	0,7	54,13	62,21	70,04
	0,27	4,08	4,27	1,97
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	10	10	10	10
poškodenie DNA [%] ± SE	5,05	71,69	73,68	77,72
	1,07	1,79	1,8	1,87

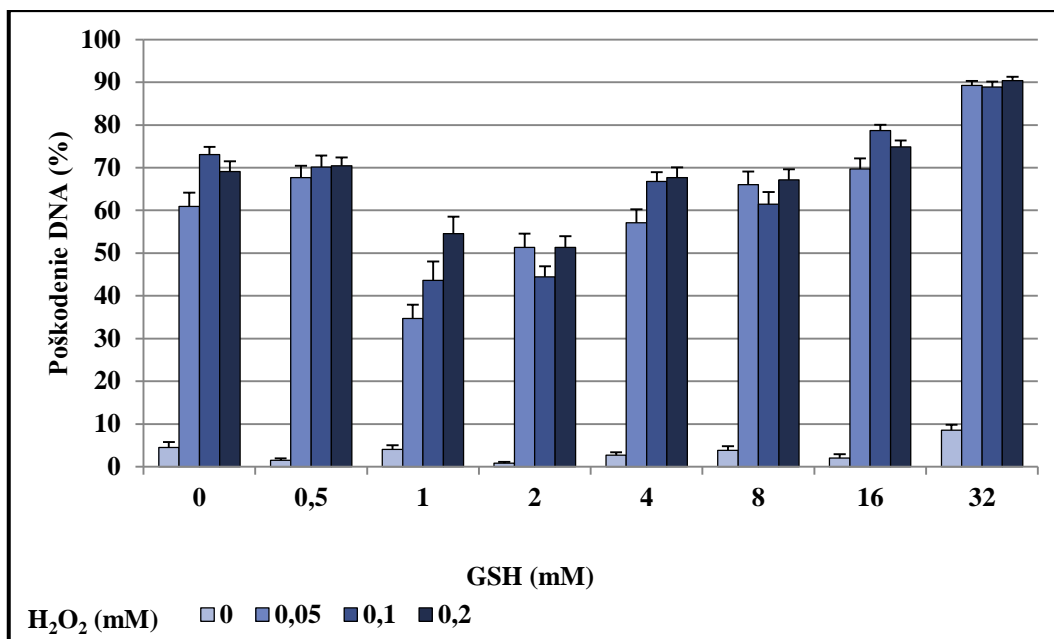


Obr. 9 Vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment II).

Nadväzujúci pokus bol zameraný na vplyv GSH pred oxidačným poškodením DNA sledovaného v ôsmich narastajúcich koncentráciách GSH – 0 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM, 16 mM a 32 mM. H₂O₂ sa zúčastnil na tvorbe oxidačného poškodenia v štyroch koncentráciách: 0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 0,2 mM. Zníženie SSBs v DNA sa nezaznamenalo u 0,5 mM GSH pri poškodení indukovanom 0,05 mM a 0,2 mM H₂O₂, ďalej pri 8 mM GSH pôsobiaceho na bunky poškodené 0,05 mM H₂O₂. Najvyššie testované koncentrácie, 16 mM a 32 mM GSH, vykazovali dokonca toxický vplyv na bunky, ktorý viedol k ďalšiemu nárastu poškodenia DNA. GSH v koncentrácii 4 mM dokázal do istej miery inhibovať tvorbu SSBs pri všetkých stupňoch poškodenia vyvolaného H₂O₂. GSH v koncentráciách 1 mM a 2 mM najviac ochránil bunky pred vystavením oxidačného stresu, v týchto prípadoch došlo k výraznej inhibícii tvorby SSBs vyvolaných H₂O₂ (Tab. 8, Obr. 10).

Tab. 8 Oprava Endo III senzitivnych miest a vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 poškodených H_2O_2 .

	Pôsobenie Endo III			
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	4,46	60,92	73,06	69,09
	1,32	3,26	1,82	2,42
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	0,5	0,5	0,5	0,5
poškodenie DNA [%] ± SE	1,46	67,7	70,15	70,45
	0,48	2,71	2,67	1,96
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	4,08	34,73	43,59	54,54
	0,92	3,15	4,44	3,99
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	0,85	51,36	44,47	51,32
	0,3	3,16	2,45	2,65
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	4	4	4	4
poškodenie DNA [%] ± SE	2,67	57,08	66,75	67,7
	0,72	3,18	2,21	2,4
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	8	8	8	8
poškodenie DNA [%] ± SE	3,85	66,05	61,48	67,17
	0,97	3,05	2,79	2,47
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	16	16	16	16
poškodenie DNA [%] ± SE	2,05	69,67	78,71	74,84
	0,88	2,5	1,36	1,5
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH [mM]	32	32	32	32
poškodenie DNA [%] ± SE	8,55	89,28	88,85	90,38
	1,26	1,03	1,29	0,92



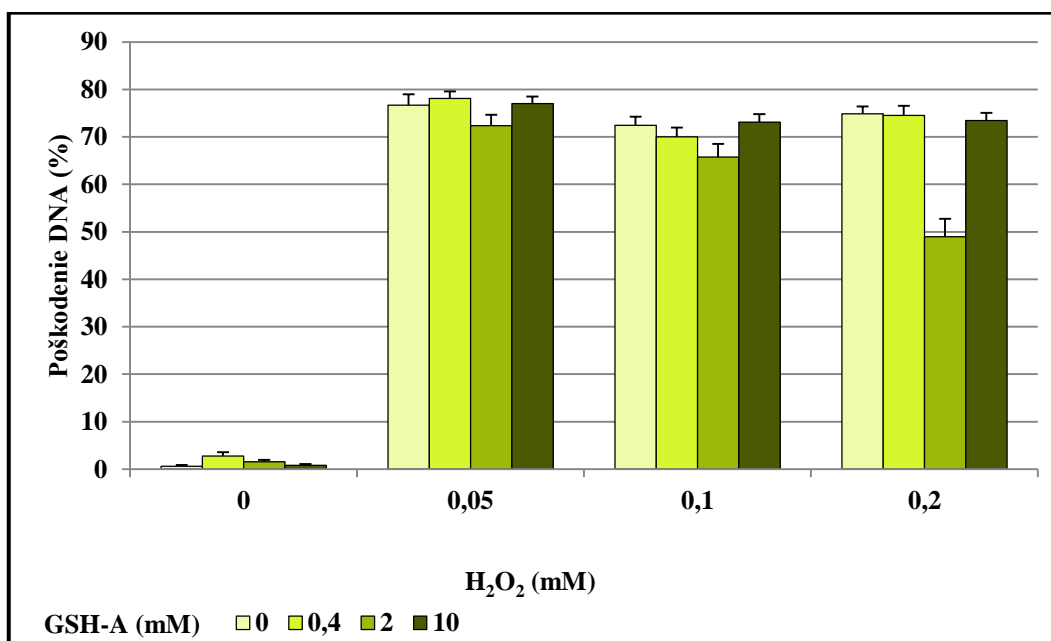
Obr. 10 Oprava Endo III senzitivnych miest a vplyv GSH na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 poškodených H₂O₂.

5.1.1.2 Antioxidačné účinky GSH-A na úrovni DNA u buniek A549 vystavených oxidačnému stresu

Prvé testovanie účinkov látky GSH-A sa zameralo na sledovanie vplyvu týchto štyroch koncentrácií – 0 mM, 0,4 mM, 2 mM a 10 mM. Zisťoval sa účinok GSH-A na inhibíciu tvorby oxidačného poškodenia DNA. H₂O₂ nariadený v koncentráciách 0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM a 0,2 mM indukoval v bunkách oxidačné poškodenie DNA. GSH-A v koncentráciách 0,4 mM a 10 mM nedokázal zaistiť dostatočnú inhibíciu tvorby SSBs v DNA, a tak ochrániť bunky pred následkami oxidačného stresu. Stredná koncentrácia GSH-A, to znamená 2 mM, dokázala pri všetkých stupňoch poškodenia vyvolaného H₂O₂ znížiť poškodenie DNA, kde najvyšší pokles SSBs bol zaznamenaný pri poškodení indukovanom 0,2 mM H₂O₂ (Tab. 9, Obr. 11).

Tab. 9 Účinnok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA spôsobeného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment I).

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	0,59	76,7	72,46	74,88
	0,28	2,31	1,81	1,57
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4
poškodenie DNA [%] ± SE	2,76	78,08	70,02	74,55
	0,8	1,54	1,97	2,02
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	1,53	72,4	65,76	48,98
	0,45	2,28	2,8	3,8
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	10	10	10	10
poškodenie DNA [%] ± SE	0,8	77,03	73,1	73,47
	0,26	1,51	1,7	1,58

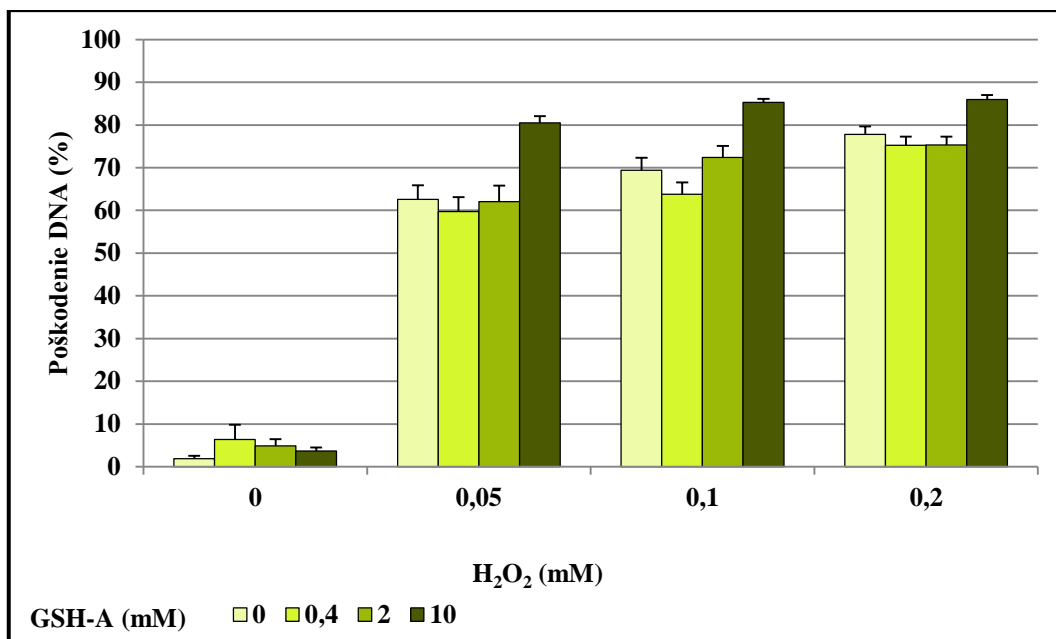


Obr. 11 Účinnok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA spôsobeného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment I).

Následný pokus bol presným zopakovaním predchádzajúceho experimentu. Po vyhodnotení pomocou kométového testu sa zistil inhibičný účinok GSH-A v koncentrácii 0,4 mM na tvorbu SSBs a mierny pokles poškodenia DNA pri pôsobení 2 mM GSH-A na následky oxidačného stresu spôsobených 0,2 mM H₂O₂. Hodnoty namerané po pôsobení 10 mM GSH-A poukazujú na jeho toxický účinok - na rozdiel od nižších koncentrácií (*Tab. 10, Obr. 12*).

Tab. 10 Účinok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitívnych miest (*experiment II*).

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	1,85	62,54	69,41	77,82
	0,67	3,37	2,9	1,85
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4
poškodenie DNA [%] ± SE	6,4	59,7	63,78	75,21
	3,39	3,42	2,76	2,04
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	4,88	62,09	72,43	75,35
	1,55	3,7	2,69	1,92
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	10	10	10	10
poškodenie DNA [%] ± SE	3,69	80,46	85,25	85,96
	0,79	1,59	0,87	1,02

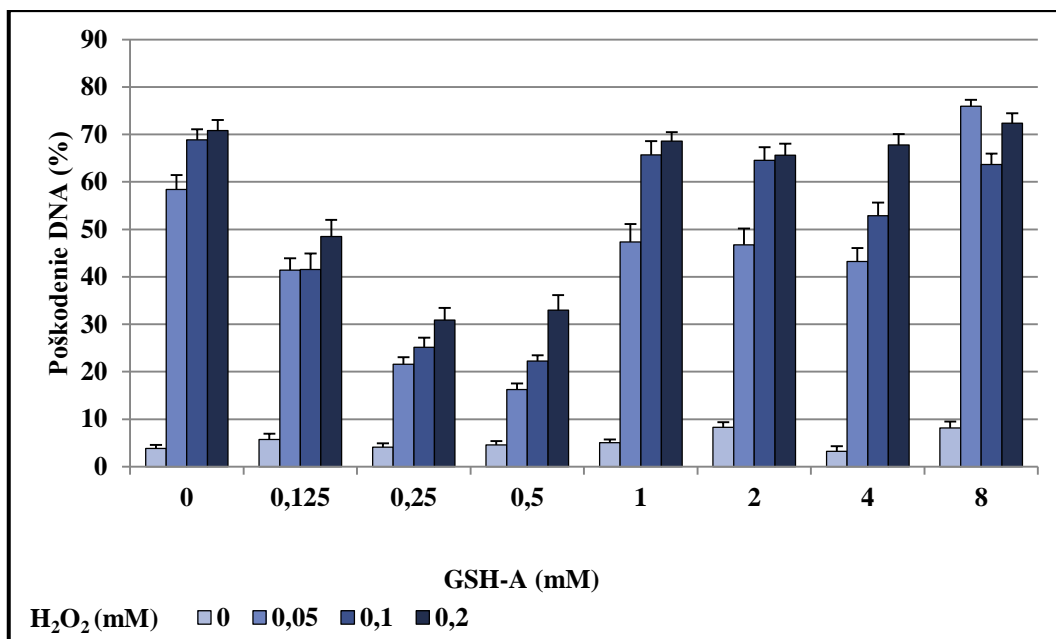


Obr. 12 Účinnok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (experiment II).

V práci sa pokračovalo skúmaním účinkov GSH-A nariadeného na nižšie koncentrácie – 0 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM a 8 mM. Po vyhodnotení metódou Comet Assay sa získali zaujímavé výsledky. Nižšie koncentrácie GSH-A dokázali dostatočne ochrániť DNA pred oxidačným stresom indukovaným H₂O₂. Konkrétne sa jednalo o koncentrácie 0,125 mM, 0,25 mM a 0,5 mM GSH-A. Vyššie koncentrácie GSH-A, 1 mM, 2 mM a 4 mM takisto inhibovali tvorbu SSBs v DNA, ale v porovnaní s nižšími koncentraciami GSH-A bol pokles poškodenia DNA výrazne nižší. Najvyššia testovaná koncentrácia, 8 mM GSH-A, dokázala len čiastočne zabrániť následkom oxidačného poškodenia, a to pri poškodení vyvolanom 0,1 mM H₂O₂. Na poškodenie vyvolané 0,05 mM H₂O₂ a 0,2 mM H₂O₂ pôsobil 8 mM GSH-A dokonca synergicky, to znamená, že indukoval tvorbu SSBs v DNA, čím došlo k ďalšiemu nárastu poškodenia (Tab. 11, Obr. 13).

Tab. 11 Vplyv GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	3,84	58,41	68,89	70,8
	0,73	3,06	2,21	2,24
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0,125	0,125	0,125	0,125
poškodenie DNA [%] ± SE	5,76	41,43	41,56	48,49
	1,15	2,47	3,38	3,49
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0,25	0,25	0,25	0,25
poškodenie DNA [%] ± SE	4,1	21,6	25,14	30,9
	0,86	1,45	2,05	2,56
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	0,5	0,5	0,5	0,5
poškodenie DNA [%] ± SE	4,58	16,25	22,28	32,99
	0,79	1,26	1,16	3,14
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	5,03	47,35	65,68	68,58
	0,67	3,79	2,93	1,92
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	8,3	46,74	64,58	65,61
	1,1	3,43	2,77	2,46
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	4	4	4	4
poškodenie DNA [%] ± SE	3,23	43,21	52,91	67,79
	1,07	2,82	2,71	2,28
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [mM]	8	8	8	8
poškodenie DNA [%] ± SE	8,17	75,98	63,65	72,39
	1,37	1,29	2,34	2,05

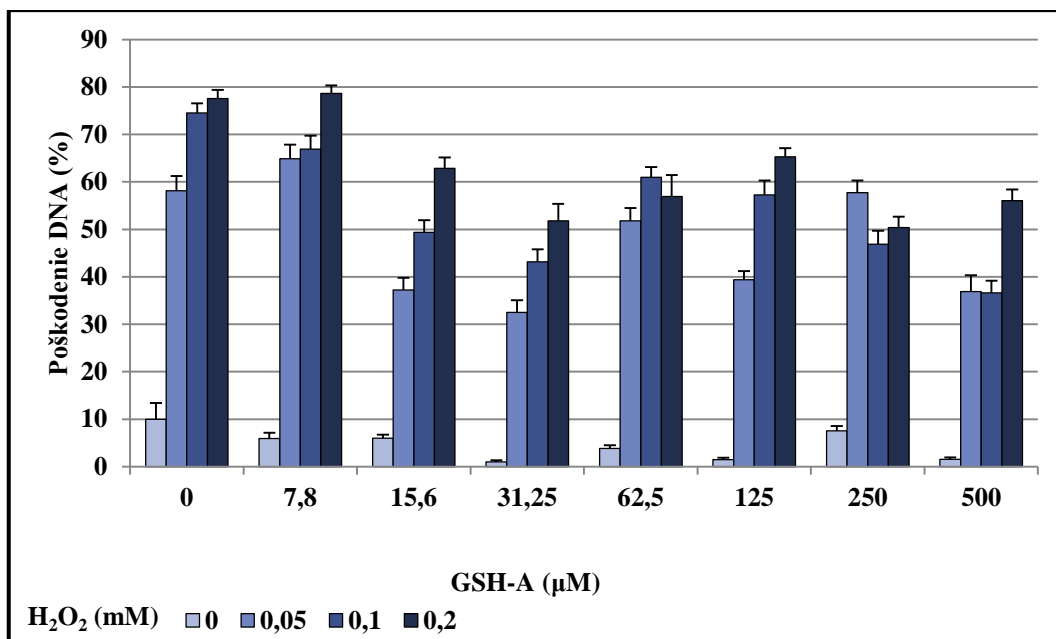


Obr. 13 Vplyv GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

Pokračovalo sa v testovaní GSH-A pôsobiaceho na bunky A549 v extrémne nízkych koncentráciách – 0 μ M, 7,8 μ M, 15,6 μ M, 31,25 μ M, 62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M, 500 μ M. Bunky A549 boli vystavené oxidačnému stresu spôsobeného vplyvom H₂O₂ v koncentráciách 0 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM. GSH-A v koncentrácii 7,8 μ M neinhiboval tvorbu SSBs pri poškodení indukovanom 0,2 mM H₂O₂. Všetky ostatné koncentrácie testované v tomto experimente vykázali určitú mieru ochrany. Najväčší inhibičný účinok na tvorbu SSBs v DNA bol zaznamenaný pri pôsobení 31,25 μ M GSH-A (Tab.12, Obr. 14).

Tab. 12 Účinok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia u buniek A549 spôsobeného H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	9,98	58,17	74,5	77,57
	3,44	3,11	2,02	1,84
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	7,8	7,8	7,8	7,8
poškodenie DNA [%] ± SE	5,93	64,89	66,91	78,62
	1,23	2,95	2,81	1,7
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	15,6	15,6	15,6	15,6
poškodenie DNA [%] ± SE	5,97	37,26	49,4	62,89
	0,76	2,54	2,51	2,24
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	31,25	31,25	31,25	31,25
poškodenie DNA [%] ± SE	1,04	32,51	43,19	51,82
	0,31	2,59	2,58	3,57
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	62,5	62,5	62,5	62,5
poškodenie DNA [%] ± SE	3,84	51,77	61	56,95
	0,67	2,71	2,1	4,47
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	125	125	125	125
poškodenie DNA [%] ± SE	1,48	39,37	57,26	65,29
	0,42	1,84	3,03	1,81
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	250	250	250	250
poškodenie DNA [%] ± SE	7,56	57,71	46,89	50,41
	0,98	2,59	2,83	2,29
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-A [μM]	500	500	500	500
poškodenie DNA [%] ± SE	1,58	36,93	36,61	56,08
	0,41	3,44	2,56	2,32



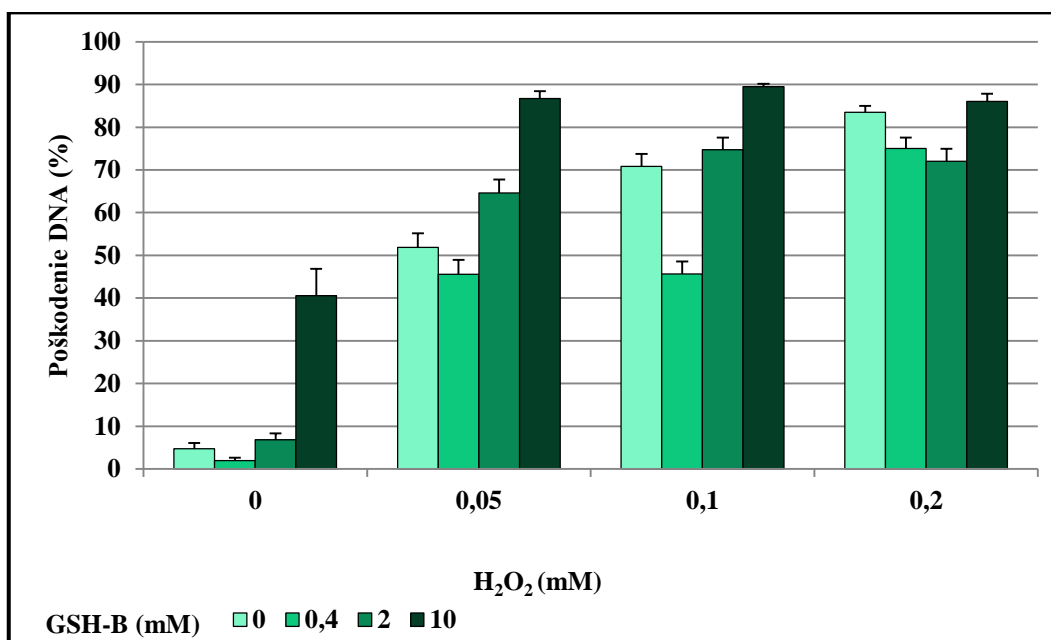
Obr. 14 Účinnok GSH-A na indukciu oxidačného poškodenia u buniek A549 spôsobeného H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.

5.1.1.3 Vplyv GSH-B na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549

Sledovali sa účinky GSH-B na inhibíciu tvorby SSBs v DNA. Pripravili sa štyri koncentrácie tejto látky – 0 mM, 0,4 mM, 2 mM, 10 mM. Pozitívny vplyv na inhibíciu vzniku poškodenia DNA sa dosiahol pôsobením 2 mM GSH-B u buniek A549 vystavených 0,2 mM H₂O₂. Ochranný účinok pred indukciou oxidačného poškodenia DNA u ostatných koncentrácií GSH-B nebol zaznamenaný (Tab. 13, Obr. 15).

Tab. 13 GSH-B a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného pôsobením H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

	Pôsobenie Endo III			
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	4,74	51,88	70,82	83,52
	1,31	3,28	2,93	1,46
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0,4	0,4	0,4	0,4
poškodenie DNA [%] ± SE	1,98	45,58	45,66	75,05
	0,65	3,33	2,93	2,55
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	6,8	64,57	74,7	71,99
	1,49	3,2	2,89	2,95
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	10	10	10	10
poškodenie DNA [%] ± SE	40,53	86,72	89,46	86,01
	6,31	1,69	0,69	1,85

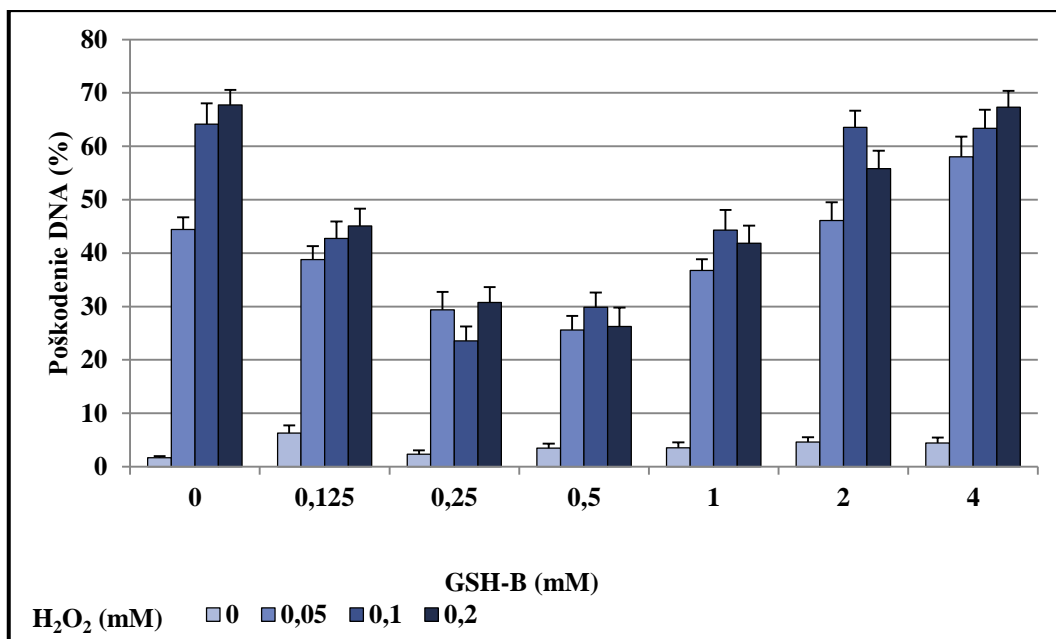


Obr. 15 GSH-B a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného pôsobením H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

GSH-B sa narietil na nižšie koncentrácie, na základe výsledkov získaných testovaním látky GSH-A, kedy práve nižšie koncentrácie dokázali preukázať väčšiu ochranu DNA pred následkami oxidačného poškodenia. Pripravili sa koncentrácie 0 mM, 0,125 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM a 4 mM GSH-B. Výsledky poukazujú na negatívne pôsobenie GSH-B nariadeného v koncentráciách 2 mM a 4 mM na bunky A549 ovplyvnené 0,05 mM H₂O₂. Evidentne došlo k indukcii tvorby SSBs, čím došlo k ďalšiemu nárastu poškodenia DNA. Nižšie koncentrácie GSH-B dokázali DNA ochrániť pred poškodením indukovaným H₂O₂. Najväčší vplyv na inhibíciu indukcie poškodenia DNA bol zaznamenaný u buniek ošetrených 0,25 mM a 0,5 mM GSH-B (*Tab. 14, Obr. 16*).

Tab. 14 GSH-B a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 ovplyvnených H₂O₂ a oprava Endo III senzitivnych miest.

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	1,67	44,42	64,13	67,77
	0,3	2,26	3,93	2,81
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0,125	0,125	0,125	0,125
poškodenie DNA [%] ± SE	6,28	38,79	42,74	45,06
	1,45	2,54	3,18	3,29
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0,25	0,25	0,25	0,25
poškodenie DNA [%] ± SE	2,31	29,4	23,55	30,73
	0,72	3,33	2,71	2,91
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	0,5	0,5	0,5	0,5
poškodenie DNA [%] ± SE	3,45	25,6	29,86	26,29
	0,87	2,63	2,79	3,5
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	3,55	36,77	44,29	41,87
	0,98	2,07	3,82	3,3
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	2	2	2	2
poškodenie DNA [%] ± SE	4,6	46,09	63,53	55,8
	0,9	3,44	3,12	3,35
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [mM]	4	4	4	4
poškodenie DNA [%] ± SE	4,45	58,06	63,35	67,31
	1,01	3,78	3,49	3,07



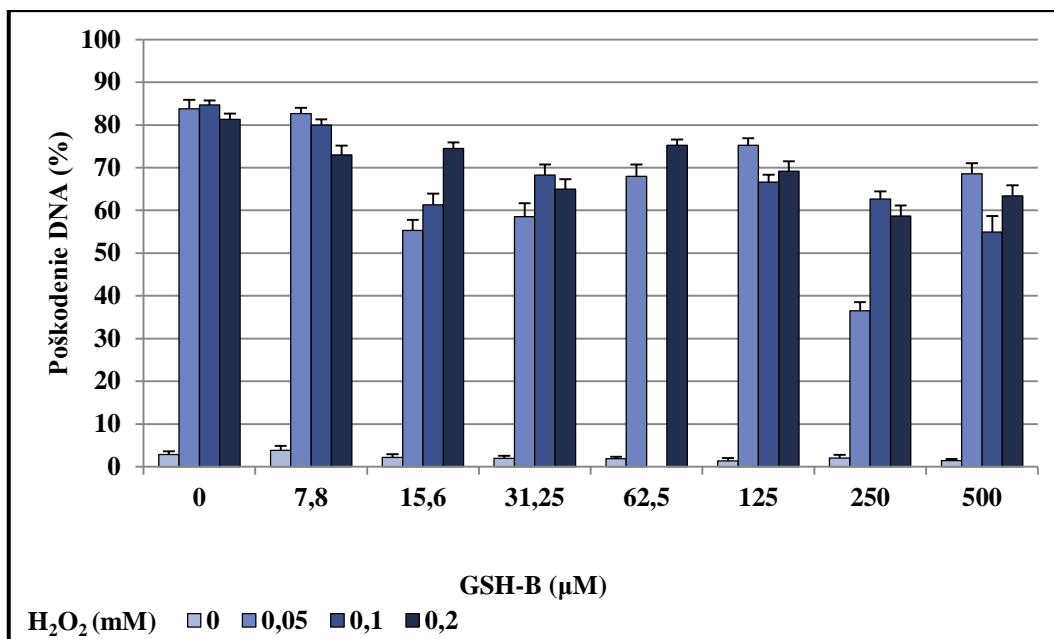
Obr. 16 GSH-B a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 ovplyvnených H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.

Rovnako ako u GSH-A sa pokračovalo v testovaní extrémne nízkych koncentrácií GSH-B – 0 μM, 7,8 μM, 15,6 μM, 31,25 μM, 62,5 μM, 125 μM, 250 μM, 500 μM. Všetky koncentrácie GSH-B inhibovali tvorbu poškodenia DNA, kedy k najväčšiemu inhibičnému účinku vzniku SSBs došlo pri aplikovaní 250 μM a 500 μM GSH-B na bunky A549. Nižšie koncentrácie zabezpečili ochranu DNA predovšetkým pri poškodení indukovanom 0,05 mM H₂O₂ (Tab. 15, Obr. 17).

Účinky 62,5 μM GSH-B pri poškodení buniek 0,1 mM H₂O₂ nie sú v tomto experimente popísané v dôsledku poškodenia podložného sklíčka v priebehu pokusu (chýbajúce hodnoty v Tab. 15 a na Obr. 17).

Tab. 15 Vplyv GSH-B na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	2,89	83,82	84,72	81,34
	0,74	2,06	1,01	1,3
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	7,8	7,8	7,8	7,8
poškodenie DNA [%] ± SE	3,81	82,67	79,96	73
	1,08	1,32	1,35	2,2
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	15,6	15,6	15,6	15,6
poškodenie DNA [%] ± SE	2,15	55,31	61,29	74,48
	0,77	2,51	2,61	1,44
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	31,25	31,25	31,25	31,25
poškodenie DNA [%] ± SE	1,99	58,5	68,26	65
	0,54	3,2	2,51	2,27
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	62,5	62,5	62,5	62,5
poškodenie DNA [%] ± SE	1,91	67,98		75,21
	0,44	2,78		1,41
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	125	125	125	125
poškodenie DNA [%] ± SE	1,33	75,21	66,61	69,18
	0,7	1,66	1,75	2,3
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	250	250	250	250
poškodenie DNA [%] ± SE	2,05	36,53	62,64	58,68
	0,74	1,98	1,82	2,48
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
GSH-B [μM]	500	500	500	500
poškodenie DNA [%] ± SE	1,41	68,55	54,96	63,37
	0,39	2,54	3,72	2,48



Obr. 17 Vplyv GSH-B na indukciu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.

5.1.2 Účinky EGCG na indukciu a opravu poškodenej DNA v dôsledku oxidačného stresu u buniek A549

Enzýmy Endo III (*Obr. 19., Obr. 20., Obr. 21, Obr. 22*) a Fpg (*Obr. 23*) boli použité na sledovanie miest v DNA citlivých k týmto enzýmom, to znamená, k detekcii oxidovaných pyrimidínov a purínov, kedy v prítomnosti týchto enzýmov došlo k vyštípeniu daných miest z DNA a k následnej indukcii tvorby SSBs.

V prvom prípade boli najskôr bunky A549 ošetrené EGCG po dobu dvoch hodín. Po uplynutí sa médium odsalo a bunky sa ovplyvnili vzostupnými koncentraciami H₂O₂, ktorý v nich indukoval oxidačné poškodenie (*Obr. 18*).

V druhom prípade boli bunky A549 najskôr vystavené vplyvu H₂O₂ po dobu piatich minút a následne sa dali reparovať spolu s antioxidačnou látkou EGCG (časy reparácie - 60, 30 a 15 minút).

Bunky bez ošetrenia EGCG slúžili ako kontrola, namiesto testovanej látky sa k nim pridával čistý DMSO v množstve 7,5 µl.

Podstatou tohto testovania bolo zistiť schopnosť EGCG zasiahnuť svojimi antioxidačnými účinkami do indukcie oxidačného poškodenia DNA, tak ako aj do

opravy poškodenej DNA. Sledovala sa inhibícia tvorby SSBs priamo indukovaných H_2O_2 a oprava oxidačného poškodenia DNA v dôsledku oxidačného stresu, v tomto prípade indukovaného H_2O_2 . Cieľom bolo nájsť koncentrácie s najvyšším antioxidantným pôsobením bez vedľajších toxických účinkov. Testovanie prebiehalo v podmienkach *in vitro*.

5.1.2.1 EGCG a jeho vplyv na indukciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549.

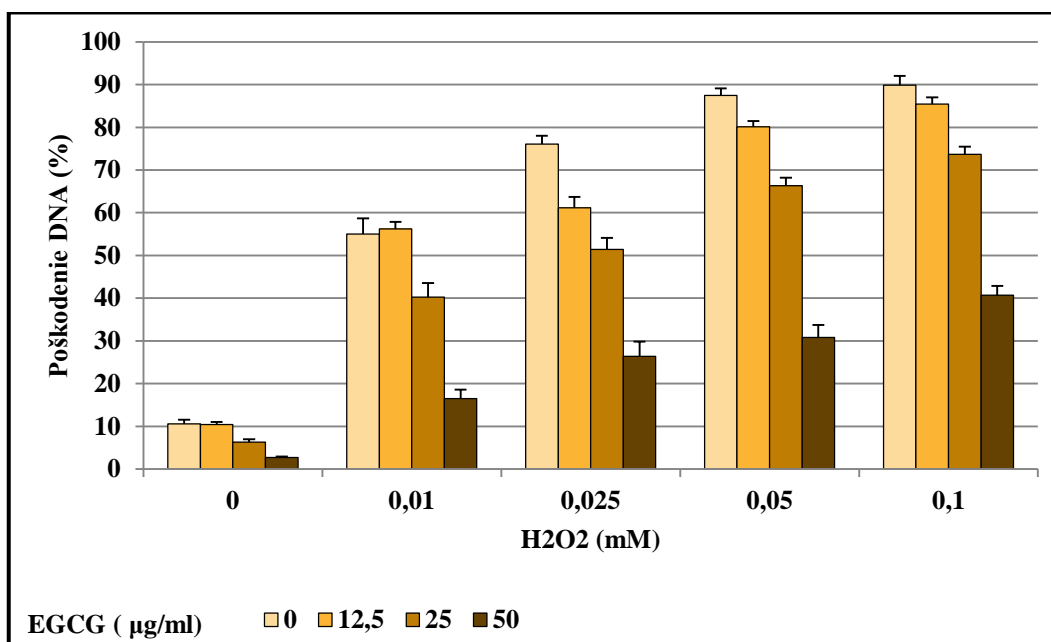
EGCG sa testoval v koncentráciách 0 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$. Uvedené koncentrácie zodpovedajú molárnym koncentráciám: 0 μM , 27,27 μM , 54,54 μM a 109,08 μM . Bunky A549 boli týmito koncentraciami ošetrované ešte pred samotným vyvolaním oxidačného stresu indukovaného H_2O_2 v koncentráciách 0 mM, 0,01 mM, 0,025 mM, 0,05 mM a 0,1 mM.

Všetky testované koncentrácie EGCG znížili poškodenie DNA. Najväčší vplyv na inhibíciu tvorby SSBs v DNA bol zaznamenaný u buniek ošetrovaných najvyššou koncentráciou EGCG, to znamená 50 $\mu\text{g/ml}$ (*Tab. 16, Obr. 18*).

V tomto experimente sa sledoval vplyv na indukciu oxidačného poškodenia, predovšetkým na inhibíciu vzniku SSBs priamo indukovaných H_2O_2 . Vynechalo sa sledovanie oxidovaných báz v DNA ako produktov vznikajúcich v dôsledku oxidačného stresu, to vysvetľuje, prečo sa s enzýmami Endo III a Fpg v tomto uvedenom pokuse nepracovalo.

Tab. 16 Vplyv EGCG na indukciu oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂ u buniek A549.

EGCG [µg/ml]	0	0	0	0	0
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,01	0,025	0,05	0,1
poškodenie DNA [%] ± SE	10,58	54,99	76,04	87,47	89,83
	0,98	3,67	1,95	1,67	2,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,01	0,025	0,05	0,1
poškodenie DNA [%] ± SE	10,43	56,21	61,13	80,11	85,4
	0,61	1,68	2,59	1,33	1,62
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25	25
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,01	0,025	0,05	0,1
poškodenie DNA [%] ± SE	6,27	40,23	51,4	66,31	73,71
	0,72	3,32	2,73	1,9	1,8
EGCG [µg/ml]	50	50	50	50	50
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,01	0,025	0,05	0,1
poškodenie DNA [%] ± SE	2,73	16,5	26,35	30,82	40,72
	0,22	2,11	3,47	2,87	2,16



Obr. 18 Vplyv EGCG na indukciu poškodenia DNA v dôsledku oxidačného stresu vyvolaného H₂O₂ u buniek A549.

5.1.2.2 *Vplyv EGCG na opravu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549*

Bunky vystavené oxidačnému stresu majú do určitej miery schopnosť použiť vlastné reparačné mechanizmy a pomocou nich eliminovať vzniknuté poškodenie.

Nasledujúce výsledky popisujú opravu DNA pomocou reparačných mechanizmov. Sledovalo sa pôsobenie rozdielnych reparačných časov na opravu oxidačného poškodenia DNA na bunkovej línii A549. Zároveň sa sledoval účinok EGCG na reparáciu poškodenej DNA. Bol zaznamenaný synergický vplyv EGCG, ktorý viedol k ďalšiemu poklesu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549.

Na začiatku sa sledovali účinky EGCG na opravu poškodenej DNA v dôsledku vplyvu H_2O_2 pri reparačnom čase 1 hodina. EGCG v koncentráciách 0 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$ sa pridával k bunkám A549 poškodených H_2O_2 v koncentráciách 0 mM, 0,025 mM, 0,050 mM, 0,1 mM a 0,2 mM. Už samotný čas reparácie bez EGCG výrazne eliminoval tvorbu SSBs v DNA v porovnaní s kontrolou (čas 0, EGCG 0 $\mu\text{g/ml}$), to znamená, že sa do veľkej miery podieľal na oprave oxidačného poškodenia DNA. Súčasné ovplyvnenie buniek vyššie popísanými koncentraciami EGCG viedlo k ďalšej oprave DNA, t.j. k poklesu oxidačného poškodenia vyvolaného H_2O_2 v uvedených koncentráciách. Najväčší vplyv EGCG na reparáciu poškodenej DNA bol zaznamenaný pri 12,5 $\mu\text{g/ml}$ EGCG pôsobiaceho na bunky poškodené 0,1 mM a 0,2 mM H_2O_2 . Takisto 25 $\mu\text{g/ml}$ EGCG pri rovnakom stupni poškodenia dokázal zosilniť účinok reparácie oxidačného poškodenia DNA, ale v menšej miere, v porovnaní s nižšou koncentraciou EGCG.

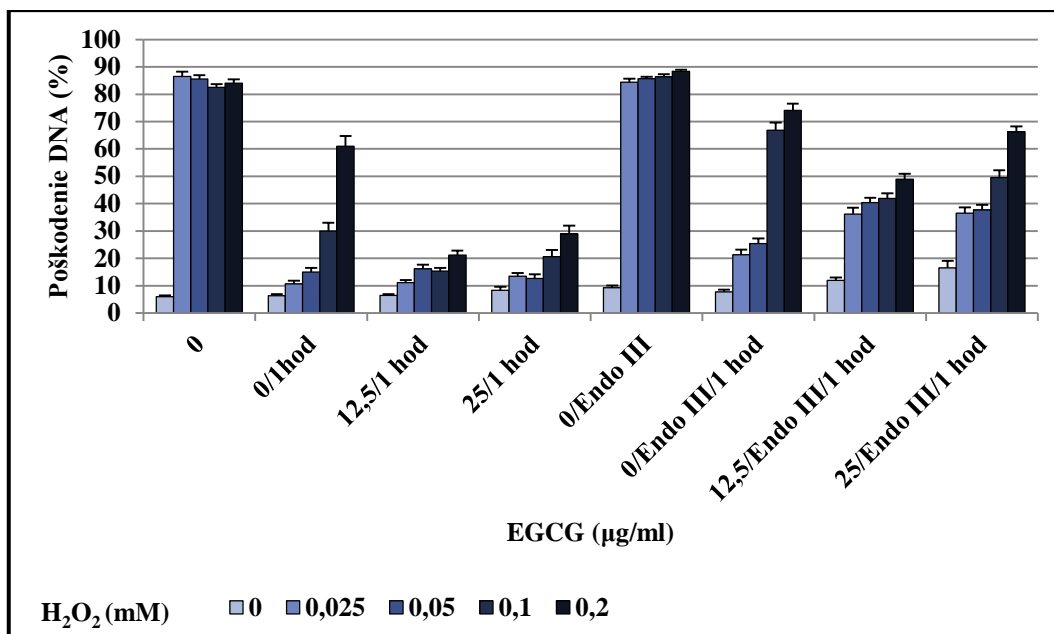
Enzým Endo III sa použil na sledovanie miest v DNA citlivých práve k tomuto enzýmu, to znamená, na detekciu oxidovaných pyrimidínov DNA (produkty vznikajúce v dôsledku oxidačného stresu). V prípade prítomnosti oxidovaných pyrimidínov došlo k ich vyštípeniu z DNA, čo viedlo k ďalšiemu vzniku SSBs. Na základe tohto mechanizmu bolo možné stanoviť vplyv EGCG nielen na inhibíciu indukcie SSBs v DNA priamo vyvolaných H_2O_2 , ale i na opravu oxidačného poškodenia báz v DNA.

Bunky, na ktoré okrem reparačného času pôsobil súčasne i EGCG, vykázali oproti bunkám bez EGCG nižší výskyt oxidovaných báz v DNA, čím sa potvrdil antioxidantný efekt EGCG. Tento efekt bol najvýraznejší pri 12,5 $\mu\text{g/ml}$ EGCG a 50 $\mu\text{g/ml}$ EGCG pri poškodení indukovanom 0,1 mM a 0,2 mM H_2O_2 . Paradoxne, pri

nižšom poškodení H₂O₂ tieto koncentrácie EGCG nedokázali do takej miery eliminovať následky oxidačného stresu u buniek A549 (*Tab. 17, Obr. 19*).

Tab. 17 Vplyv EGCG na opravu oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

	Bez pôsobenia Endo III				
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0	0
čas reparácie [hod]	0	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	5,99	86,53	85,51	82,51	84,01
	0,44	1,7	1,42	1,23	1,38
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0	0
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	6,34	10,61	15,04	29,93	60,95
	0,61	1,17	1,46	3,05	3,74
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	6,39	11,11	16,16	15,28	21,14
	0,57	0,99	1,52	1,26	1,72
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25	25
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	8,32	13,44	12,63	20,65	28,89
	1,28	1,14	1,59	2,46	3,12
	Pôsobenie Endo III				
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0	0
čas reparácie [hod]	0	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	9,19	84,34	85,62	86,42	88,43
	0,87	1,34	0,71	0,86	0,58
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0	0
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	7,68	21,33	25,4	66,86	74,13
	0,9	1,83	1,87	2,77	2,39
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	11,93	36,2	40,35	41,86	48,88
	1,12	2,31	1,82	1,96	2
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25	25
čas reparácie [hod]	1	1	1	1	1
poškodenie DNA [%] ± SE	16,49	36,48	37,65	49,47	66,24
	2,61	2,1	1,93	2,75	1,95



Obr. 19 Účinky EGCG na opravu oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

V nasledujúcom experimente sa doba reparačného času skrátila na 30 minút z dôvodu presnejšieho stanovenia vplyvu EGCG na proces opravy poškodenej DNA v dôsledku oxidačného stresu. Opäť, už samotný čas reparácie dokázal v bunkách vo veľkej miere zasiahnuť do opravy poškodenej DNA v dôsledku pôsobenia H₂O₂ u buniek A549. Pokles poškodenia DNA bol výrazný u buniek vystavených samotnému reparačnému času bez vplyvu EGCG, v porovnaní s bunkami bez reparácie a bez vplyvu EGCG. U buniek ošetrených 12,5 µg/ml a 25 µg/ml EGCG nedošlo k ďalšej významnej oprave oxidačného poškodenia DNA indukovaného H₂O₂. Enzým Endo III pomohol sledovať účinok EGCG na opravu oxidovaných pyrimidínov v DNA. Ako už bolo uvedené, samotných 30 minút bunkám postačilo na odstránenie väčšiny následkov oxidačného poškodenia DNA, avšak po pridaní EGCG došlo k ďalšiemu oprave poškodenej DNA. K výraznému poklesu oxidačného poškodenia báz v DNA došlo pri pôsobení 12,5 µg/ml a 25 µg/ml EGCG súčasne s dobou reparácie 30 minút u buniek poškodených 0,05 mM H₂O₂. K najväčšej oprave oxidovaných pyrimidínov došlo pri ošetrení buniek 25 µg/ml EGCG poškodených 0,1 mM a 0,2 mM H₂O₂ (súčasná aplikácia enzýmu Endo III) v porovnaní s bunkami bez EGCG, vystavených len samotnému času reparácie (Tab. 18, Obr. 20).

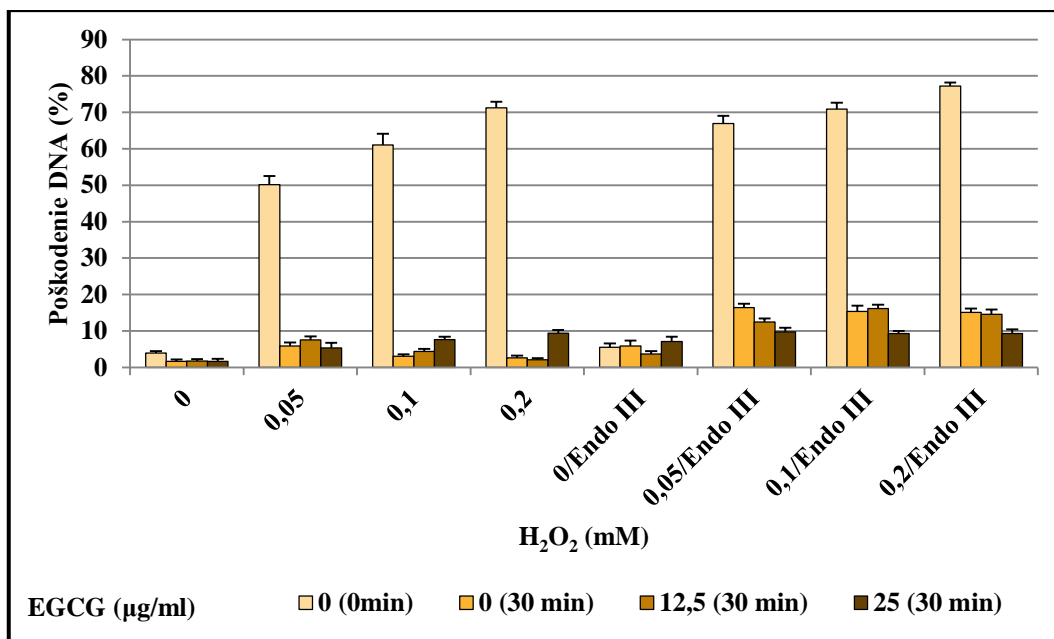
Tieto výsledky dokazujú významné antioxidantné účinky EGCG, ktoré zároveň iniciovali ďalšie testovanie EGCG. Popis výsledkov je uvedený ďalej.

Tab. 18 EGCG a jeho účinky na opravu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

	Bez pôsobenia Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	3,89	50,16	61,1	71,22
	0,61	2,39	3	1,73
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	1,65	5,85	3,08	2,66
	0,54	0,94	0,54	0,55
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	1,75	7,53	4,4	2,07
	0,51	0,95	0,69	0,47
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	1,63	5,34	7,6	9,36
	0,68	1,39	0,81	0,95

Tab. 18 EGCG a jeho účinky na opravu oxidačného poškodenia DNA vyvolaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (pokračovanie).

	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	5,54	66,96	70,89	77,21
	1,03	2,12	1,75	1,02
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	5,86	16,41	15,36	15,07
	1,48	1,09	1,55	1,12
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	3,66	12,42	16,17	14,52
	0,8	1,04	1,02	1,37
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	30	30	30	30
poškodenie DNA [%] ± SE	7,06	9,71	9,32	9,3
	1,34	1,2	0,68	1,1



Obr. 20 Vplyv EGCG na reparáciu poškodenej DNA v dôsledku oxidačného stresu indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

Posledné experimenty sú analogický s vyššie popísanými, až na čas reparácie buniek, ktorý sa skrátil na 15 minút (*Obr. 21, Obr. 22*).

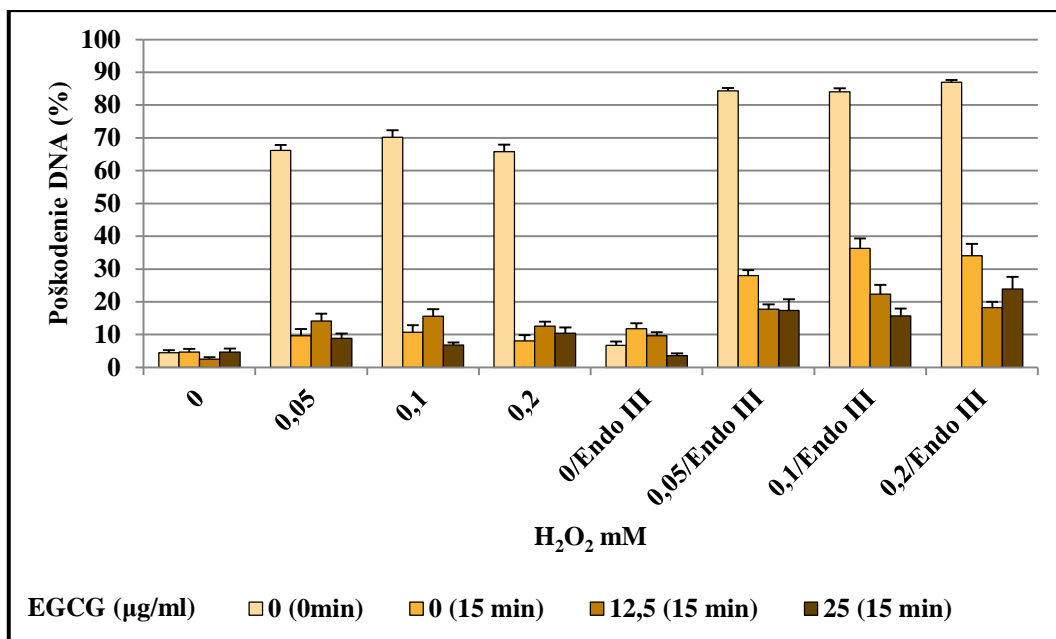
K výraznej reparácii oxidačného poškodenia DNA došlo u buniek A549 vystavených reparácii po dobu 15 minút súčasne ovplyvnených 25 µg/ml EGCG po poškodení indukovanom 0,05 mM a 0,1 mM H₂O₂, avšak EGCG v koncentrácii 12,5 µg/ml nespôsobil ďalší významný pokles SSBs oproti bunkám, kde pôsobil len samotný čas reparácie, ale za to výrazne zasiahol do ďalšej opravy oxidovaných pyrimidínov v DNA (pôsobenie Endo III). Z toho vyplýva, že EGCG spolu s časom reparácie dokázal dostatočne ochrániť bunky pred oxidačným poškodením, v zrovnaní s bunkami bez pridania EGCG. Následky oxidačného stresu u buniek ovplyvnených 0,2 mM H₂O₂ dokázal v najväčšej miere odstrániť 12,5 µg/ml EGCG (*Tab. 19, Obr. 21*).

Tab. 19 Účinky EGCG na opravu poškodenej DNA pôsobením oxidačného stresu indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.

	Bez pôsobenia Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	4,5	66,14	70,15	65,84
	0,7	1,75	2,16	2,11
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	4,69	9,63	10,75	8,04
	0,97	2,05	2,12	1,82
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	2,48	14,12	15,56	12,54
	0,62	2,26	2,22	1,37
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	4,7	8,89	6,83	10,47
	0,99	1,42	0,74	1,76

Tab. 19 Účinky EGCG na opravu poškodenej DNA pôsobením oxidačného stresu indukovaného H_2O_2 u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest (pokračovanie).

	Pôsobenie Endo III			
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [μ g/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] \pm SE	6,68	84,34	84,05	87,01
	1,19	0,88	1,03	0,63
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [μ g/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] \pm SE	11,75	27,98	36,29	34,06
	1,66	1,66	3,01	3,63
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [μ g/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] \pm SE	9,61	17,73	22,34	18,26
	1,1	1,52	2,81	1,76
H_2O_2 [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [μ g/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] \pm SE	3,61	17,4	15,74	23,94
	0,7	3,37	2,2	3,65



Obr. 21 *Ovplyvnenie opravy poškodenej DNA pôsobením EGCG u buniek A549 poškodených H₂O₂ a oprava Endo III senzitivných miest.*

Posledný experiment poukazuje na antioxidačný účinok EGCG, čím sa potvrdil jeho pozitívny vplyv na opravu oxidovaných purínových (pôsobenie Fpg) a pyrimidínových báz (pôsobenie Endo III) vznikajúcich ako produkty oxidačného stresu. Výsledky týkajúce sa jeho účinkov na inhibíciu tvorby SSBs priamo indukovaných H₂O₂ a na opravu pyrimidínových báz sú podobné ako u predchádzajúceho experimentu (*Obr. 21*). Súčasne, ako bolo uvedené, sa sledoval vplyv EGCG na opravu oxidovaných purínových báz vytvorených v dôsledku pôsobenia H₂O₂. EGCG v koncentráciách 12,5 µg/ml a 25 µg/ml s časom reparácie 15 minút viedol k ďalšej oprave oxidačného poškodenia báz indukovaného H₂O₂ pôsobiaceho v koncentráciách uvedených v grafe (*Tab. 20, Obr. 22, Obr. 23*).

Tab. 20 Vplyv EGCG na reparáciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 vyvolaného H₂O₂. Oprava Endo III a Fpg senzitivných miest.

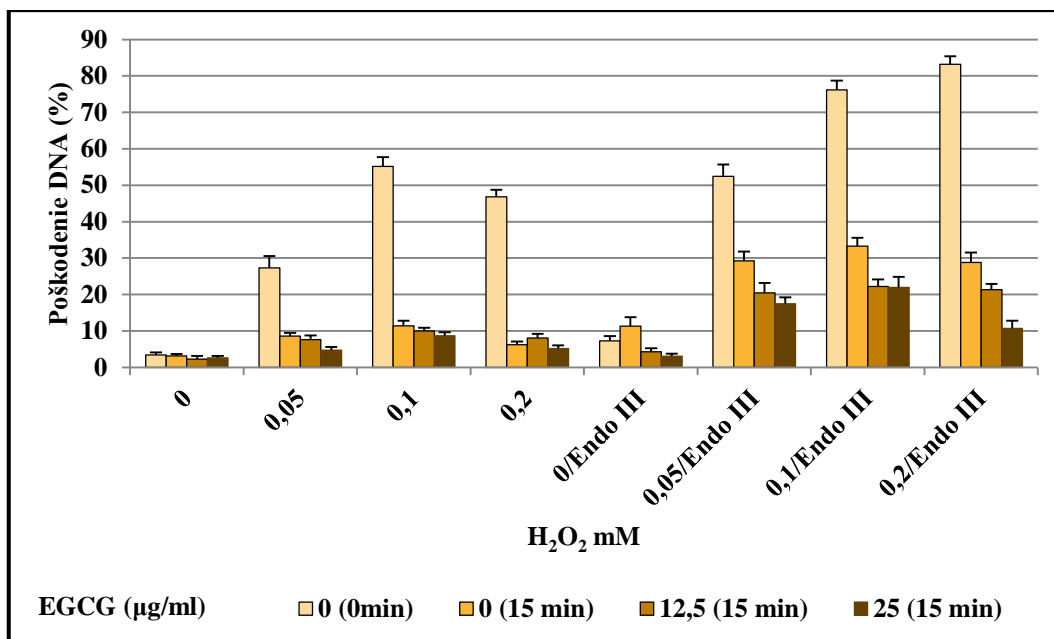
	Bez pôsobenia Endo III a Fpg			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	3,38	27,33	55,14	46,78
	0,74	3,21	2,62	1,94
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	3,12	8,55	11,41	6,2
	0,52	0,89	1,38	0,88
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	2,29	7,64	9,99	8,1
	0,83	1,11	0,85	1,08
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	2,65	4,76	8,64	5,13
	0,48	0,81	0,98	0,93

Tab. 20 Vplyv EGCG na reparáciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 vyvolaného H₂O₂. Oprava Endo III a Fpg senzitivných miest (pokračovanie).

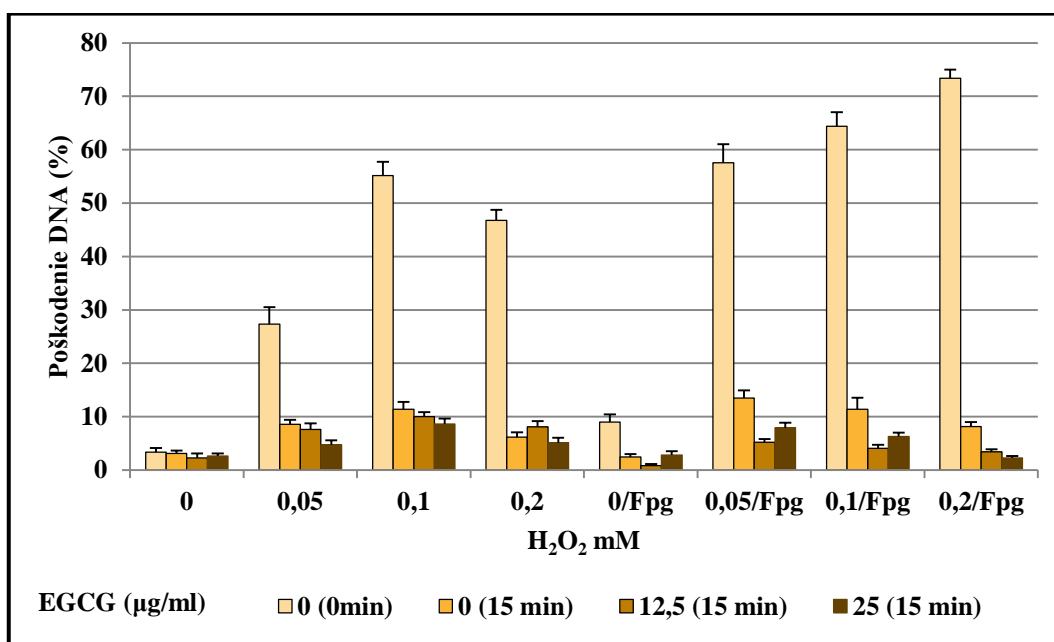
	Pôsobenie Endo III			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	7,31	52,48	76,17	83,23
	1,24	3,25	2,6	2,15
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	11,36	29,27	33,25	28,84
	2,43	2,51	2,29	2,67
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	4,27	20,43	22,25	21,35
	1,01	2,79	1,88	1,52
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	3,04	17,45	21,99	10,74
	0,7	1,81	2,83	2,02

Tab. 20 Vplyv EGCG na reparáciu oxidačného poškodenia DNA u buniek A549 vyvolaného H₂O₂. Oprava Endo III a Fpg senzitivných miest (pokračovanie).

	Pôsobenie Fpg			
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	0	0	0	0
poškodenie DNA [%] ± SE	9,01	57,55	64,39	73,36
	1,45	3,5	2,62	1,66
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	0	0	0	0
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	2,43	13,47	11,37	8,18
	0,57	1,45	2,2	0,81
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	12,5	12,5	12,5	12,5
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	0,86	5,19	4,07	3,42
	0,25	0,62	0,68	0,48
H ₂ O ₂ [mM]	0	0,05	0,1	0,2
EGCG [µg/ml]	25	25	25	25
čas reparácie [min]	15	15	15	15
poškodenie DNA [%] ± SE	2,81	7,91	6,32	2,3
	0,75	0,99	0,69	0,32



Obr. 22 Vplyv EGCG na opravu DNA poškodenej v dôsledku oxidačného stresu indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Endo III senzitivných miest.



Obr. 23 Vplyv EGCG na opravu DNA poškodenej v dôsledku oxidačného stresu indukovaného H₂O₂ u buniek A549 a oprava Fpg senzitivných miest.

Výsledky uvedených experimentov sú dôkazom pozitívneho vplyvu EGCG na indukciu a reparáciu oxidačného poškodenia DNA vzniknutého pôsobením H₂O₂

u buniek A549, testovaného *in vitro*. Bol zaznamenaný výrazný pokles SSBs v DNA priamo indukovaných H_2O_2 a zároveň zníženie počtu oxidovaných pyrimidínových a purínových báz v DNA vznikajúcich pri oxidačnom strese.

6. DISKUSIA

Pri dlhej expozícii organizmu oxidačnému stresu dochádza vytváraniu nepriaznivých podmienok zodpovedných za narušenie bunkových dejov. V tejto súvislosti je potrebné hľadať spôsoby ochrany organizmu pred oxidačným poškodením, v prípade vzniknutej poruchy možnosti jej eliminácie. Veľká časť vedeckého výskumu v oblasti oxidačného poškodenia organizmov a s tým súvisiacich problémov (napr. vznik a priebeh ochorení) sa zaoberá vplyvmi endogénnymi (*Dannenmann et al., 2015*) ako aj exogénnymi antioxidantov (*Farrar et al. 2015*).

Zlúčeniny ako kyslík a voda sú pre existenciu organizmov nevyhnutne potrebné, napriek tomu môžu pôsobiť presne opačne svojou účasťou v niektorých procesoch prebiehajúcich v týchto organizmoch. Jedna sa o hydrolytickú deamináciu báz a oxidačné poškodenie spôsobené ROS, čo vedie k narušeniu štruktúry DNA. Bunka si na základe varovných signálov vybuďovala mechanizmy na zachytenie a odstránenie poškodenia (*Boyne J., [online]*).

Je známe, že hlavnými terčami pre „realizáciu“ oxidačného „ostreľovania“ sú predovšetkým bielkoviny, lipoproteíny a DNA. V dôsledku nadmernej produkcie ROS ako aj nedostatku antioxidantov a nedostatočnej funkcie reparačných mechanizmov, dochádza pri procese karcinogenézy k oxidačnému poškodeniu bunkových makromolekúl (*Klaunig et al., 2010*). Nedostatok antioxidantov môže byť zapríčinený mnohými faktormi. Nízka schopnosť vychytávania ROS a singletového kyslíka môže viesť k nízkym koncentračným hladinám vitamínu E, zmeny v štruktúre membrány buniek k postupnej deplícii selénu, znížená regenerácia vitamínu E ako aj narušenie metabolizmu železa zase k nedostatku vitamínu C a mnoho ďalších (*Zadák et al. 2009*).

Vedecké výskumy v tejto oblasti hľadajú spôsoby ako zabrániť oxidačnému poškodeniu. Jedným z nich je sledovanie účinkov endogénnymi zlúčeninami ako napr. GSH (*Chatterjee, 2013*), ktorý je potrebný pre správny priebeh bunkových procesov. Rovnaká pozornosť ohľadom sledovania antioxidantných účinkov je venovaná exogénnymi látkami ako je napr. EGCG (*Katiyar et al., 1999, Khismatullina, 2010, Sahin et al., 2010*).

GSH má v organizme mnoho úloh. Jedným z jeho hlavných účinkov je ochrana bunkových štruktúr pred ROS, ako aj regulácia génovej transkripcie či modulácia apoptózy (*Armstrong et al., 2002*). Z toho dôvodu je dôležité monitorovanie jeho hladín

v organizme. Cytosolová hladina GSH sa pohybuje v rozmedzí 1 – 10 mmol/l, plazmatické koncentrácie rádovo v $\mu\text{mol/l}$, preto sa kladie dôraz na dosiahnutie jeho dostatočnej koncentrácie.

Experimentálna časť (Kapitola 5.1.1) bola zameraná na sledovanie vplyvu glutathionu (GSH), S-allyldithioglutathionu (GSH-A) a S-allyltrithioglutathionu (GSH-B) na DNA buniek A549 vystavených oxidačnému stresu *in vitro*. Hlavným iniciátorom indukcie oxidačného poškodenia bol H_2O_2 . Z dosiahnutých výsledkov testovania GSH, GSH-A a GSH-B je zrejmé, že všetky látky preukázali významný protektívny efekt pri oxidačnej záťaži DNA *in vitro*.

Podobné účinky boli zistené u GSH v súvislosti medzi jeho plazmatickými hladinami a vznikom kardiovaskulárnych ochorení. Dosiahnuté výsledky štúdie poukazujú na nízke hladiny GSH v plazme ako na jeden z vážnych rizikových faktorov pre vznik týchto ochorení (Shimizu et al., 2004).

Pri použití 2mM GSH (Obr.8 a Obr.9) došlo do istej miery k inhibícii indukcie poškodenia. Treba poznamenať, že na priebeh experimentov môžu do určitej miery vplývať i laboratórne podmienky ako je napr. rýchlosť odstránenia H_2O_2 z Petriho misiek s bunkami. Z toho dôvodu je aplikácia špecifických enzýmov veľmi výhodná. Práve tieto enzýmy rozpoznávajú bázy zmenené len v dôsledku oxidačného poškodenia, čím sa spresní odhad miery oxidačného poškodenia DNA. Pri stúpajúcej koncentrácii GSH, t. j. nad 8 mM, bol zaznamenaný ďalší nárast oxidačného poškodenia DNA (Obr. 9, Obr. 10), čo vysvetľuje, prečo sa vplyv derivátov GSH, t.j. GSH-A a GSH-B, v oblastiach vysokých koncentrácií už nesledoval.

Podobné výsledky poukazujúce na toxické prejavy GSH sa zistili pri poškodení DNA indukovanom 0-1500 μM bromičnanom draselným (KBrO_3). Ovplyvnenie teľacieho týmusu samotným KBrO_3 neindukovalo ďalší nárast 8-oxo-2'-deoxyguanozínu v DNA. Zmeny nastali až pri súčasnom ovplyvnení 500 μM GSH. Tieto zmeny potom indukovali ďalšie oxidačné poškodenie, v závislosti na dávke KBrO_3 . Táto situácia mohla nastať pravdepodobne v dôsledku súčasnej oxidácie GSH na GSSG. Naopak, protektívna úloha extracelulárneho GSH bola zistená u ľudských lymfocytov, kedy došlo k zábrane vzniku ďalšieho poškodenia vďaka zainhibovaniu vstupu reaktívnych produktov do bunky (Parsons et Chipman, 2000). Podobne bol zistený ochranný účinok GSH v súvislosti s oxidačným poškodením DNA v ľudských

pluripotentných kmeňových bunkách, kedy práve jeho deplécia môže zapríčiniť nedostatočnú ochranu proti poruchám DNA u tohto typu buniek (*Dannenmann et al., 2014*).

Testovaním GSH-A (Kapitola 5.1.1.2) sa zistil jeho významný vplyv pri inhibícii indukcie poškodenia DNA, hlavne pri použití jeho nižších koncentrácií, t. j. 0,25 mM a 0,5 mM, smerom k vyšším koncentráciám tento inhibičný vplyv postupne slabol až vymizol (*Obr. 13*). Smerom do nižších oblastí koncentrácií (15,6 μ M – 250 μ M) došlo k dostatočnej ochrane DNA pred následkami oxidačného poškodenia (*Obr. 14*), predovšetkým zabránením vzniku oxidovaných pyrimidínových báz. U GSH-B (Kapitola 5.1.1.3) boli zistené podobné účinky jednotlivých koncentrácií pri vplyve na oxidačné poškodenie DNA ako u GSH-A. Z dosiahnutých výsledkov testovania vplyvu GSH, GSH-A a GSH-B možno poukázať na ich významnú úlohu ochrany DNA pred následkami oxidačného stresu, hlavne inhibíciou vzniku oxidovaných pyrimidínových báz.

Ako bolo spomenuté na začiatku diskusie, hladiny GSH úzko súvisia so vznikom ochorení v dôsledku oxidačného stresu. Jedným z nich sú vírusové ochorenia.

Vo vzťahu k týmto ochoreniam sa zistila súvislosť s GSH, ktorý významne vplýva na inhibíciu prepisu vírusového základného proteínu a inhibíciu aktivácie kaspázy indukovanej vírusom. Z dosiahnutých výsledkov testovania protichrípkovej aktivity GSH *in vitro* a *in vivo* sa ukázalo, že takisto aj oxidačný stres spôsobujúci nedostatok GSH v orálnom, nasálnom epitele a v epitele horných ciest dýchacích, zosilňuje vnímavosť k chrípkovým infekciám (*Cai et al., 2003*). Štúdie zamerané na skúmanie prejavov nízkych hladín GSH *in vitro* upozorňujú na progresiu ochorenia HIV v dôsledku stimulácie HIV a oslabenia T buniek. To vysvetľuje, prečo by sa pacienti s HIV mali čo najviac vyhýbať nepotrebnému a masívnemu užívaniu paracetamolu a iných liekov spôsobujúcich depléciu GSH (*Herzenberg et al., 1997*). Takisto dokáže GSH inhibovať HIV replikáciu, svojim pôsobením na neskoré štádia životného cyklu tohto vírusu. Exogénny GSH sa výrazne podieľa na inhibícii produkcie p24gag proteínu ako aj nákazlivosti vírusom. Hlavný mechanizmus tohto účinku zrejme spočíva v citlivosti medzireťazcových disulfidových väzieb (-S-S) na redukujúci účinok GSH, ktoré sú súčasťou vírusového obalu (*Palamara et al., 1996*).

Pri sledovaní intracelulárnych hladín GSH *in vitro* u ochorení indukovaných HVS-1 sa zaznamenal ich výrazný pokles, a to hneď po napadnutí daným vírusom. Keď sa však pridal exogénny GSH, došlo k obnove intracelulárnych hladín GSH (okrem neinfikovaných buniek) a súčasne k výraznej inhibícii replikácie HVS-1 (*Palamara et al., 1995*).

V ďalšej časti práce (Kapitola 5.1.2.1) sa sledoval vplyv EGCG na inhibíciu vzniku SSBs a zároveň na reparáciu oxidačného poškodenia DNA. Zistilo sa, že EGCG má významný vplyv na inhibíciu vzniku SSBs v DNA (*Obr. 18.*). U všetkých použitých koncentrácií bol zaznamenaný detekovateľný pokles týchto zlomov, kedy k najvýznamnejšiemu poklesu došlo pri najvyššej koncentrácii EGCG, t.j. 50 µg/ml.

Podobne sa protektívne účinky EGCG preukázali u myši, ktoré boli ošetrované EGCG 3 dni pred vystavením mutagénnym látkam. Na základe vyhodnotenia pomocou alkalickéj verzie kométového testu sa zistilo, že u buniek kostnej drene došlo k výraznému poklesu zlomov v DNA indukovaných aflatoxínom B₁. K výraznému úbytku zlomov indukovaných *N*-nitroso-*N*-methylureou a aflatoxínom B₁ došlo aj v epitele hrubého čreva. Z dosiahnutých výsledkov možno usúdiť, že EGCG okrem vplyvu proti oxidačnému stresu má i účinok antimutagénny (*Šmerák et al., 2006*).

K rozdielnym účinkom EGCG došlo pri ovplyvnení buniek H9c2 (potkanie kardiomyoblasty), kedy bola spozorovaná závislosť účinku EGCG na použitej koncentrácii. Bunky ošetrované 10 µM a 20 µM dokázali efektívne čeliť poškodeniu navodenému 400 µM H₂O₂, avšak pri ovplyvnení 50 µM EGCG došlo k 50 % zániku buniek H9c2 (*Chen W.-Ch. et al., 2014*). Naopak, v inej štúdii zameranej na sledovanie účinkov EGCG sa u buniek poškodených 8-methoxypsoralenom a UV-A žiarením pri použití 50 µM EGCG preukázala jeho významná úloha pri ochrane pred poškodením. Okrem sledovania vplyvu EGCG na oxidačné poškodenie báz sa sledoval i vznik krížových väzieb v DNA. Výsledky poukazujú na protektívnu úlohu EGCG pri inhibícii vzniku 8-oxo-2'-deoxyguanozínu, ktorá sa prejavila u buniek ošetrovaných 50 µM EGCG. Inhibícia krížových väzieb v DNA nastala u buniek ovplyvnených až 750 µM EGCG (*Tahara et al., 2005*).

Uvedené výsledky vedú k záveru, že účinok EGCG nezávisí len od použitej koncentrácie, ale takisto od typu buniek a od iniciátora oxidačného poškodenia. Vplyv EGCG možno teda považovať za veľmi významný v spojitosti s ochranou DNA pred

oxidačným poškodením, predovšetkým inhibíciou vzniku oxidovaných báz, ako aj pred vznikom krížových väzieb v DNA.

Pri expozícii DNA oxidačnému stresu dochádza okrem priamej indukcie SSBs i k vzniku chemicky modifikovaných báz. Bunka má vyvinuté reparačné mechanizmy k eliminácii tohto poškodenia, preto sa zisťovalo, do akej miery dokáže EGCG zefektívniť reparačnú schopnosť buniek. Pozoroval sa jeho vplyv na reparácie v trvaní 60, 30 a 15 minút (Kapitola 5.1.2.2). Už samotný reparačný čas stačil bunkám k dostatočnej oprave, no po pridaní EGCG došlo k zosilneniu tohto účinku. Z jednotlivých výsledkov (*Obr. 19, Obr. 20, Obr. 21, Obr. 22 a Obr. 23*) vyplýva, že po ovplyvnení buniek EGCG sa reparácia zefektívnila, predovšetkým zábranou vzniku oxidovaných báz v DNA.

V tejto súvislosti nemožno opomenúť antioxidantné pôsobenie EGCG pozorované pri jeho testovaní *in vivo*. Konkrétne šlo o sledovanie ochranného vplyvu EGCG pri oxidačnom poškodení rohovky u myši, ktoré bolo indukované UV-B žiarením. Najskôr boli myši vystavené UV-B žiareniu, a následne im bol aplikovaný EGCG vo forme očných kvapiek - 0,01 % a 0,1 % - dvakrát denne po dobu ôsmich dní. Z dosiahnutých výsledkov sa prišlo k záveru, že EGCG výrazne inhibuje oxidačné poškodenie rohovky. Navyše sa zistilo, že jeho pôsobením dochádza k výraznému zvýšeniu aktivity enzýmov superoxiddismutázy, katalázy, glutathionperoxidázy a glutathionreduktázy. Z toho vyplýva, že EGCG svojimi účinkami významne redukuje fototoxické poškodenie rohovky navodené UV-B žiarením *in vivo* (*Chen M.-H. et al., 2014*).

Z diskusie je zrejmé, že ako GSH, tak aj GSH-A a GSH-B vo veľkej miere chránia DNA pred oxidačným poškodením navodeným H_2O_2 *in vitro*. Spôsob ochrany spočíva predovšetkým v inhibícii vzniku oxidovaných pyrimidínov. Podobne i EGCG významne zasahuje do inhibície vzniku oxidovaných báz a SSBs, ako aj do reparácie oxidačného poškodenia DNA. Jednotlivé dosiahnuté výsledky *in vitro* by v budúcnosti mohli byť vhodným podkladom pre testovanie *in vivo* pre potreby prevencie a liečby mnohých ochorení indukovaných oxidačným stresom.

7. ZÁVER

Táto práca sa venovala problematike oxidačného poškodenia na úrovni DNA sledovaného u buniek A549 *in vitro*. Cieľom bolo zistiť, do akej miery a v akom rozsahu koncentrácií dokážu látky GSH, GSH-A, GSH-B a EGCG zasiahnuť do indukcie a opravy oxidačného poškodenia DNA spôsobeného H₂O₂.

1. Výsledky testovania GSH a jeho modifikácií poukazujú na ich významný inhibičný vplyv pri vzniku oxidačného poškodenia DNA. Testované látky boli aktívne hlavne v procese vzniku oxidovaných báz v DNA, konkrétne pri indukcii oxidovaných pyrimidínov. Po vyhodnotení kométovým testom bol u buniek A549, ošetrovaných danými látkami, zaznamenaný ich výrazný pokles.
2. Vysoké koncentrácie GSH ako aj jeho modifikácií stimulovali vznik ďalších oxidovaných pyrimidínov, čo viedlo k nárastu oxidačného poškodenia DNA. Naopak, nižšie koncentrácie pôsobili na indukciu oxidačného pôsobenia inhibične, predovšetkým znížením tvorby oxidovaných pyrimidínov. Tieto koncentrácie mali výrazný účinok na pokles pyrimidínov.
3. Účinky EGCG sa prejavili najmä v jeho najvyššej koncentrácii, tak ako pri zásahu do indukcie, tak aj do opravy oxidačného poškodenia DNA. EGCG mal vplyv na inhibíciu tvorby SSBs priamo indukovaných H₂O₂, kedy došlo k ich výraznému zníženiu. Navyše dokázal zosilniť účinok opravy poškodenej DNA, predovšetkým znížením tvorby oxidovaných pyrimidínov, ale i oxidovaných purínov.
4. Antioxidačný účinok u GSH a jeho modifikácii bol zaznamenaný len v prípade nižších koncentrácií. EGCG pôsobil antioxidačne vo všetkých testovaných koncentráciách. U týchto koncentrácií neboli u buniek A549 preukázané žiadne toxické účinky.
5. H₂O₂ indukoval poškodenie u buniek A549 až po odstránení testovaných látok spolu s kultivačným médiom. To naznačuje, že uvedené látky pôsobili intracelulárne. U EGCG sa sledoval i účinok na opravu, kde sa predpokladá jeho pozitívny vplyv na opravu DNA prostredníctvom eliminácie hydroxylového radikálu zodpovedného za oxidačné poškodenie báz.

8. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Alberts B. et al.: *Základy buněčné biologie : Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydanie, Espero Publishing, 2005, 740 strán, ISBN: 80-902906-2-0.

Alqahtani S. et Kaddoumi A.: *Vitamin E transporters in cancer therapy*. 2015, The AAPS Journal, vol. 17, s. 313-322.

Armstrong J.S. et al.: *Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signalling in a human B lymphoma cell line*. 2002, Cell Death and Differentiation, vol. 9, s. 252-263.

Azqueta A., Lorenzo Y. et Collins A.R.: *In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells*. 2009, Mutagenesis, vol. 24, s. 379-381.

Azqueta A. et al.: *Vitamin C in cultured human (HeLa) cells: lack of effect on DNA protection and repair*. 2013, Nutrients, vol. 5, s. 1200-1217.

Azqueta A. et al.: *Comet assay to measure DNA repair: approach and applications*. 2014, Frontiers in Genetics, vol. 5, article 288, 8 strán.

Boyne J.: *DNA damage and repair*. [online]. [cit. 2016-04-02]. Dostupné z https://www.youtube.com/watch?v=_M5pKs1ILxI.

Cai J. et al.: *Inhibition of influenza infection by glutathione*. 2003, Free Radical Biology and Medicine, vol. 34, s. 928-936.

Collins A.R. et al.: *The comet assay: topical issues*. 2008, Mutagenesis, vol. 23, s. 143-151.

Collins A.R. et al.: *Controlling variation in the comet assay*. 2014, Frontiers in Genetics, vol. 5, article 359, 6 strán.

Collins A. et al.: *The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project*. 2014, Mutation Research, vol. 759, s. 27-39.

Comet Assay Kit (3-Well Slides) [online]. [cit. 2016-04-02]. Dostupné z <http://www.antibodies-online.com/kit/2345015/Comet+Assay+3-Well+Slides/>.

Čaprnda M.: *Oxidatívny stres a kardiovaskulárne ochorenia: možnosti liečby*. 2005, *Súčasná klinická prax*, vol. 3, s. 25-30.

Dannenmann B. et al.: *High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells*. 2015, *Stem Cell Reports*, vol. 4, s. 886-898.

Davies N.M. et Yáñez J.A.: *Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology*. 1.vydanie, John Wiley & Sons, 2013, 338 strán, ISBN: 978-0-470-57871-1.

Epigallocatechin gallate [online]. [cit. 2016-04-02] Dostupné z https://en.wikipedia.org/wiki/Epigallocatechin_gallate.

Farrar M.D. et al.: *A randomized controlled trial of green tea catechins in protection against ultraviolet radiation-induced cutaneous inflammation*. 2015, *Am J Clin Nutr*, vol. 102, s. 608-15.

Friedberg E.C, Walker G.C. et Siede W.: *DNA Repair and Mutagenesis*. 1. vydanie, ASM Press, 1995, 698 strán, ISBN: 1-55581-088-8.

Gautier J-Ch.: *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*. 1.vydanie, Humana Press, 446 strán, e-ISBN: 978-1-60761-849-2.

Georgiades P. et al.: *Tea derived galloylated polyphenols cross-link purified gastrointestinal mucins*. 2014, *PLoS ONE*, vol. 9, 11 strán.

Glutathione [online]. [cit. 2016-04-02]. Dostupné z <https://en.wikipedia.org/wiki/Glutathione>.

Haley B.: *Glutathione and oxidative stress*. 2009, [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=0y6YdENDe18>.

Halliwell B., Clement M.V et Long L.H.: *Hydrogen peroxide in the human body*. 2000, *FEBS Letters*, vol. 486, s. 10-13.

Herzenberg L.A. et al.: *Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease*. 1997, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, s. 1967-1972.

- Chatterjee A.: *Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity?* 2013, *Nutrients*, vol. 5, s. 525-542.
- Chen M.-H. et al.: *Epigallocatechin gallate eye drops protect against ultraviolet B-induced corneal oxidative damage in mice.* 2014, *Molecular Vision*, vol. 20, s. 153-162.
- Chen W.-Ch. et al.: *Molecular identification for epigallocatechin-3-gallate-mediated antioxidant intervention on the H₂O₂-induced oxidative stress in H9c2 rat cardiomyoblasts.* 2014, *Journal of Biomedical Science*, vol. 21, 12 strán.
- Jiráček R.: *Role N-acetylcysteinu v psychiatrii.* 2011, *Farmi news*, vol. 3, s. 50.
- Johnson W.M., Wilson-Delfosse A.L. et Miéyal J.J.: *Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases.* 2012, *Nutrients*, vol. 4, s. 1399-1440.
- Katiyar S.K. et al.: *Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production.* 1999, *Carcinogenesis*, vol. 20, s. 2117-2124.
- Khismatullina Z.R.: *Administration of epigallocatechin-3-gallate for microdermabrasion.* 2010, *Vestn Dermatol Venerol*, vol. 1, s. 99-103.
- Krokan H.E., Standal R. et Slupphaug G.: *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA.* 1997, *Biochem. J.*, vol. 325, s. 1-16.
- Kuznetsov N.A. et al.: *Conformational dynamics of DNA repair by Escherichia coli endonuclease III.* 2015, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, s. 14338-14349.
- Lamichhane A. et al.: *Low molecular weight antioxidants (LMWA) and their orchestration.* 2013, *Nepal Journal of Medical Sciences*, vol. 2, s. 171-80.
- Lorenzo Y. et al.: *The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead.* 2013, *Mutagenesis*, vol. 28, s. 427-432.
- Liao W., McNutt M.A. et Zhu W.-G.: *The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells.* 2009, *Methods*, vol. 48, s. 46-53.
- Luppi F. et al.: *Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells in vitro: role of glutathione.* 2005, *Respiratory Research*, vol. 6, 12 strán.

Mindell E.: *Vitamínová bible pro 21. století*. 1.vydanie, Euromedia Group - Knižní klub v Praze, 2000, 304 strán, ISBN: 80-242-0406-1.

Moravcová A. et al.: *Antioxidative effect of epigallocatechin gallate against D-galactosamine-induced injury in primary culture of rat hepatocytes*. 2014, Acta Medica, 2014, vol. 57, s.3-8.

Nečas O. et al.: *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3.vydanie, H & H, 2000, 554 strán, ISBN: 80-86022-46-3.

Nelson S.R. et al.: *Two glycosylase families diffusively scan DNA using a wedge residue to probe for and identify oxidatively damaged bases*. 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 111, s. 2091-2099.

Palamara A.T. et al.: *Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication*. 1995, Antiviral Research, vol. 27, s. 237-253.

Palamara A.T. et al.: *Glutathione inhibits HIV replication by acting at late stages of the virus life cycle*. 1996, AIDS Research and Human Retroviruses, vol. 12, s. 1537-1541.

Parsons J.L. et Chipman J.K.: *The role of glutathione in DNA damaged by potassium bromate in vitro*. 2000, Mutagenesis, vol. 15, s. 311-316.

Pohanka et al.: *Vybrané laboratorní postupy v toxikologii*. 1. vydanie, Fakulta vojenského zdravotníctví UO, 2012, 67 strán, ISBN: 978-80-7231-350-1.

Prakash A., Doublie S. et Wallace S.S.: *The Fpg/Nei family of DNA glycosylases: substrates, structures and search for damage*. 2012, Prog Mol Biol Transl Sci., vol. 110, s. 71-91.

Sahin K. et al.: *Epigallocatechin-3-gallate prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defense system via modulating hepatic nuclear transcription factors in heat-stressed quails*. 2010, Poultry Science, vol. 89, s. 2251-2258.

Shimizu H. et al.: *Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama Study*. 2004, Stroke, vol. 35, s. 2072-2077.

- Singh B.N., Shankar S. et Srivastava R.K.: *Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications*. 2011, *Biochemical Pharmacology*, vol. 82, s. 1807-1821.
- Speit G. et Bonzheim I.: *Genotoxic and protective effects of hyperbaric oxygen in A549 lung cells*. 2003, *Mutagenesis*, vol. 18, s. 545-548.
- Storz. G., Imlay J.A.: *Oxidative stress*. 1999, *Current Opinion in Microbiology*, vol. 2, s. 188-194.
- Šmerák P. et al.: *Antimutagenic effect of epigallocatechin gallate and its effect on the immune response in mice*. 2006, *Czech J. Food Sci.*, vol. 24, s. 180-192.
- Štípek S. et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1.vydanie, Grada, 2000, 320 strán, ISBN: 80-7169-704-4.
- Tahara S. et al.: *Protective effect of epigallocatechin gallate and esculetin on oxidative DNA damage induced by psoralen plus ultraviolet A therapy*. 2005, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 69, s. 620-622.
- Walker M. W. et al.: *Nitric oxide-induced cytotoxicity: involvement of cellular resistance to oxidative stress and the role of glutathione in protection*. 1995, *Pediatric research*, vol. 37, s. 41-49.
- Walsh W.: *Oxidative stress in autism spectrum disorders*. 2009, [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=8HyW20ZMaJo>.
- Wang J. et al.: *Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice*. 2013, *PLoS ONE*, vol. 8, 11 strán.
- Waters D.J. et al.: *Noninvasive prediction of prostatic DNA damage by oxidative stress challenge of peripheral blood lymphocytes*. 2007, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, vol. 16, s. 1906-1910.
- Zadák Z. et al.: *Antioxidants and vitamins in clinical conditions*. 2009, *Physiol. Res.*, vol. 58, s. 13-17.

Zhu W. et al.: *Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) protects skin cells from ionizing radiation via heme oxygenase-1 (HO-1) overexpression*. 2014, Journal of Radiation Research, vol. 55, s. 1056-1065.

9. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ALS = alkalilabilné miesta

APS = apyrimidínové a apurínové miesta

BER = bázová excizná reparácia

BSA = hovädzí sérový albumín

DMSO = dimethylsulfoxid

DSBs = dvojreťazcové zlomy

EB = ethidium bromid

EDTA = ethylendiamintetraoctová kyselina

EGCG = epigalokatechín galát

Endo III = endonukleáza III

Fpg = formamidopyrimidín-DNA glykozyláza

GSSG = oxidovaná forma glutathionu

GSH = glutathion

GSH-A = S-allyldithioglutathion

GSH-B = S-allyltrithioglutathion

HEPES = N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfónová kyselina

HMP agaróza = vysokotuhnúca agaróza

H₂O₂ = peroxid vodíka

LMP agaróza = nízkotuhnúca agaróza

NO[•] = oxid dusnatý

8-oxoGau = 8-oxo-7,8-dihydroguanín

PBS = z angl. phosphate buffered saline tablets

RNS = reaktívne formy dusíka

ROS = reaktívne formy kyslíka

SSBs = jednoreťazcové zlomy