

**UNIVERZITA PARDUBICE FAKULTA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

DNA fragmentace – marker cytotoxicity

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. David Hájek

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D

KONZULTANT: Mgr. Pavlína Majtnerová

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

DNA fragmentation – marker of cytotoxicity

THESIS

AUTHOR: David Hájek

SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D

CONSULTANT: Mgr. Pavlína Majtnerová

2019

QUESTION 1

A.112-9411 (2015) 100% **QUESTION 1** **ANSWER**

Year	2014	2015	2016	2017
Revenue	100,000	100,000	100,000	100,000
Operating Expenses	60,000	60,000	60,000	60,000
Operating Income	40,000	40,000	40,000	40,000
Interest Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Income Before Tax	30,000	30,000	30,000	30,000
Tax Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Net Income	20,000	20,000	20,000	20,000

(a)

Year	2014	2015	2016	2017
Revenue	100,000	100,000	100,000	100,000
Operating Expenses	60,000	60,000	60,000	60,000
Operating Income	40,000	40,000	40,000	40,000
Interest Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Income Before Tax	30,000	30,000	30,000	30,000
Tax Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Net Income	20,000	20,000	20,000	20,000

(b)

Year	2014	2015	2016	2017
Revenue	100,000	100,000	100,000	100,000
Operating Expenses	60,000	60,000	60,000	60,000
Operating Income	40,000	40,000	40,000	40,000
Interest Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Income Before Tax	30,000	30,000	30,000	30,000
Tax Expense	10,000	10,000	10,000	10,000
Net Income	20,000	20,000	20,000	20,000



Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 5. 5. 2019

Bc. David Hájek

V první řadě bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D za odborné vedení a profesionální přístup. Dále bych rád poděkoval Mgr. Pavlíně Majtnerové za trpělivost, hlavně při začátcích experimentální části, za cenné rady a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala. Můj dík patří také Mgr. Janu Čapkovi za pomoc při práci s mikroskopem. V neposlední řadě bych rád poděkoval Mgr. Janě Báčové, Bc. Ivaně Fousové a Mgr. Jiřímu Handlovi za přípravu a kultivaci buněk.

Velikou zásluhu na dokončení diplomové práce má také moje rodina a přátelé, kteří mě vždy podporovali a byli mi velkou oporou.

ANOTACE

Tato práce se zabývá fragmentací DNA, což je jeden z hlavních markerů apoptózy. Fragmentaci DNA můžeme stanovovat pomocí kometové metody, která je v této práci zavedena a optimalizována. Vybrané buněčné linie, látky a toxiny jsou následně testovány pomocí optimalizovaného kometového testu.

Klíčová slova:

fragmentace DNA, kometová analýza, apoptóza, senescence.

ANNOTATION

This thesis has been focused on DNA fragmentation which is one of the major markers of apoptosis. DNA fragmentation can be analyzed by the comet assay which was introduced and optimized in this work. The selected cell lines, substances and toxins were subsequently tested by the optimized comet assay.

Key words:

DNA fragmentation, comet assay, apoptosis, senescence.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgNO₃ – dusičnan stříbrný

AP místa – apurinová/apyrimidinová místa

Bid – „BH3 interacting domain death agonist“

BrdUTP – 5-brom-2'-deoxyuridin 5'-trifosfát

CAD – kaspázou aktivovaná DNáza

CDK – cyklin-dependentní kinázy

Cip/Kip – cyklin-dependentní kinázový interagující protein/protein inhibující kinázy

CKI – cyklin-dependentní kinázové inhibitory

DAPI – 4,6-diamidin-2-fenylindol

DFF40 – „DNA fragmentation factor“ 40 kDa

DFF45 – „DNA fragmentation factor“ 45 kDa

DISC – „death-inducing signaling complex“

DLA – DNA ladder assay

DMSO – dimethylsulfoxid

DSBs – dvouřetězcové zlomy

dUTP – deoxyuridintrifosfát

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

FADD – Fas-asociovaná smrtící doména

FITC – fluoresceinisothiokyanát

FasL – Fas ligand

FasR – Fas receptor

H₂O₂ – peroxidu vodíku

IARC – mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny

ICAD – inhibitor kaspázou aktivované DNázy

INK4 – inhibitory cyklin-dependentní kinázy 4

LMP agaróza – nízkotuhnoucí agaróza

NaCl – chlorid sodný

NaOH – hydroxid sodný

PCR – polymerázová řetězová reakce

ROS – reaktivní sloučeniny kyslíku

SA- β -Gal – se senescencí asociovaná β -galaktosidáza

SCGE – jednobuněčná gelová elektroforéza

SDS-TE – dodecylsírán sodný-TrisEDTA

SPE – extrakce na pevné fázi

SSBs – jednořetězcové zlomy

TdT – terminální deoxynukleotidyltransferáza

TiO₂-NPs – nanočástice oxidu titaničitého

TNF – tumor nekrotizující faktor

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

TUNEL – „Terminal deoxynukleotidyl transferase (Tdt) dUTP Nick-End Labeling“

OBSAH

1. ÚVOD	13
2. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Apoptóza	14
1.1.1 Význam apoptózy	14
1.1.2 Mechanismus a markery apoptózy	14
1.1.3 Fragmentace DNA.....	15
1.2 DNA ladder assay	18
1.3 TUNEL metoda	20
1.4 Kometový test	22
1.4.1 Historie kometové metody	22
1.4.2 Neutrální a alkalická verze	23
1.4.3 Princip a postup.....	24
1.4.3.1 Příprava vzorku	25
1.4.3.2 Lýza buněk.....	25
1.4.3.3 Alkalické rozplétání	26
1.4.3.4 Elektroforéza	26
1.4.3.5 Neutralizace	27
1.4.3.6 Barvení DNA a vizualizace komet	27
1.4.3.7 Hodnocení komet	27
1.4.4 Kometová analýza a apoptóza	28
1.4.5 Další využití kometové analýzy.....	29
1.5 Senescence	31
1.5.1 Buněčný cyklus.....	31
1.5.2 Zkracování telomer a ostatní faktory způsobující senescenci	32
1.5.3 Biomarkery senescence	33
1.6 Detekce fragmentace DNA u vybraných látek a toxinů	34
1.6.1 Nanočástice TiO ₂	34
1.6.2 Cisplatina.....	34
1.6.3 Peroxid vodíku.....	36
2. CÍLE PRÁCE	38
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
3.1 Seznam chemikálií.....	39
3.2 Přístroje a laboratorní pomůcky	40

3.3	Příprava roztoků.....	41
3.4	Postup kometového testu.....	43
3.4.1	Příprava sklíček a lyze buněk.....	43
3.4.2	Doba alkalického rozplétání, elektroforéza a neutralizace.....	43
3.4.3	Barvení buněk a vyhodnocení komet	44
3.4.4	Vliv zamrazení buněk	44
3.5	Použití optimalizované kometové analýzy.....	44
3.5.1	Analýza buněčných linií s toxiny	44
4.	VÝSLEDKY	45
4.1	Optimalizace postupu kometové analýzy	45
4.1.1	Optimalizace doby rozplétání	45
4.1.2	Optimalizace doby elektroforézy.....	46
4.1.3	Vliv zamrazení buněk	48
4.2	Použití optimalizované kometové analýzy.....	50
4.2.1	Vliv nanočástic a nanovláken TiO ₂ na buňky A549	50
4.2.2	Vliv nanočástic Al ₂ O ₃ na buňky MG-63.....	52
4.2.3	Vliv cisplatiny na buňky HK-2	54
4.2.4	Vliv melaninu na buňky SH-SY5Y	55
4.2.5	Vliv účinky t-BHP na buňky SH-SY5Y a HK-2	56
5.	DISKUZE.....	59
6.	ZÁVĚR	63
7.	ZDROJE.....	64

1. ÚVOD

Apoptóza patří mezi nejdůležitější procesy lidského těla. Díky ní jsou eliminovány pro tělo nepotřebné buňky, čímž je umožněn správný embryonální vývoj jedince a jeho následné správné fungování, kdy jsou nahrazovány staré buňky novými. Oproti nekróze je apoptóza fyziologický proces. Během a po ukončení tohoto typu buněčné smrti můžeme najít mnoho markerů, které ji charakterizují. Mezi tyto znaky můžeme zařadit aktivaci kaspáz, translokaci fosfatidylserinu do vnější membrány nebo také fragmentaci DNA.

2. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Apoptóza

1.1.1 Význam apoptózy

Pojem apoptóza byl poprvé použit autory Kerrem, Wylliem a Curriem v textu z roku 1972 popisujícím morfologicky odlišnou formu buněčné smrti [1]. Od té doby je apoptóza uznávána jako důležitý proces programované buněčné smrti, která zprostředkovává eliminaci pro tělo nepotřebných buněk. Postupem času byla popsána jako klíčová součást embryonálního vývoje, správného rozvoje a fungování imunitního systému, nebo při nahrazování starých buněk novými. Při nedostatečné apoptóze, nebo při její poruše byla prokázána přímá souvislost se vznikem neurodegenerativních onemocnění, ischemických poruch a se vznikem mnoha druhů nádorových onemocnění. Proto se pochopení tohoto děje ukázalo jako velice žádoucí pro terapeutické účely. Při zmínění apoptózy nemůžeme samozřejmě opomenout ani nekrózu, která byla mnoho let považována za jakousi alternativu k apoptóze probíhající převážně v patologických procesech [2]. V posledních letech se ale spíše ukazuje, že jsou oba děje vzájemně provázány. V obou procesech se uplatňují stejné signalizační dráhy, jako jsou receptory smrti, aktivace pomocí kaspáz nebo uplatnění mitochondrií. Nicméně celkové důsledky nekrotické a apoptotické buněčné smrti pro celý organismus jsou zcela odlišné [3].

1.1.2 Mechanismus a markery apoptózy

Mechanismus apoptózy je velice sofistikovaný a vzájemně provázaný proces zahrnující souhrn kaskádovitých reakcí závislých na energii. Dosavadní výzkumy naznačují, že existují tři základní apoptotické dráhy: dráha vnější reprezentující receptory smrti, dráha vnitřní, kde hrají hlavní roli mitochondrie a dráha zahrnující cytotoxickou aktivitu T-lymfocytů, kdy jsou buňky ničeny pomocí perforinů a granzymů [4]. Perforiny a granzymy mohou indukovat apoptózu pomocí granzymů A či B. Vnější, vnitřní a granzymová dráha následně splývají do jedné dráhy aktivující apoptózu. Tato cesta je iniciována štěpením kaspázy 3, což následně vede k fragmentaci DNA, degradaci cytoskeletárních a nukleárních proteinů, tvorbě apoptotických tělísek s následnou expresí a uvolnění ligandů pro receptory

fagocytujících buněk. Na konci je celý proces zakončen fagocytózou zprostředkovanou fagocyty [2]. Pomocí granzymu A se aktivuje dráha nezávislá na kaspázové aktivitě [5].

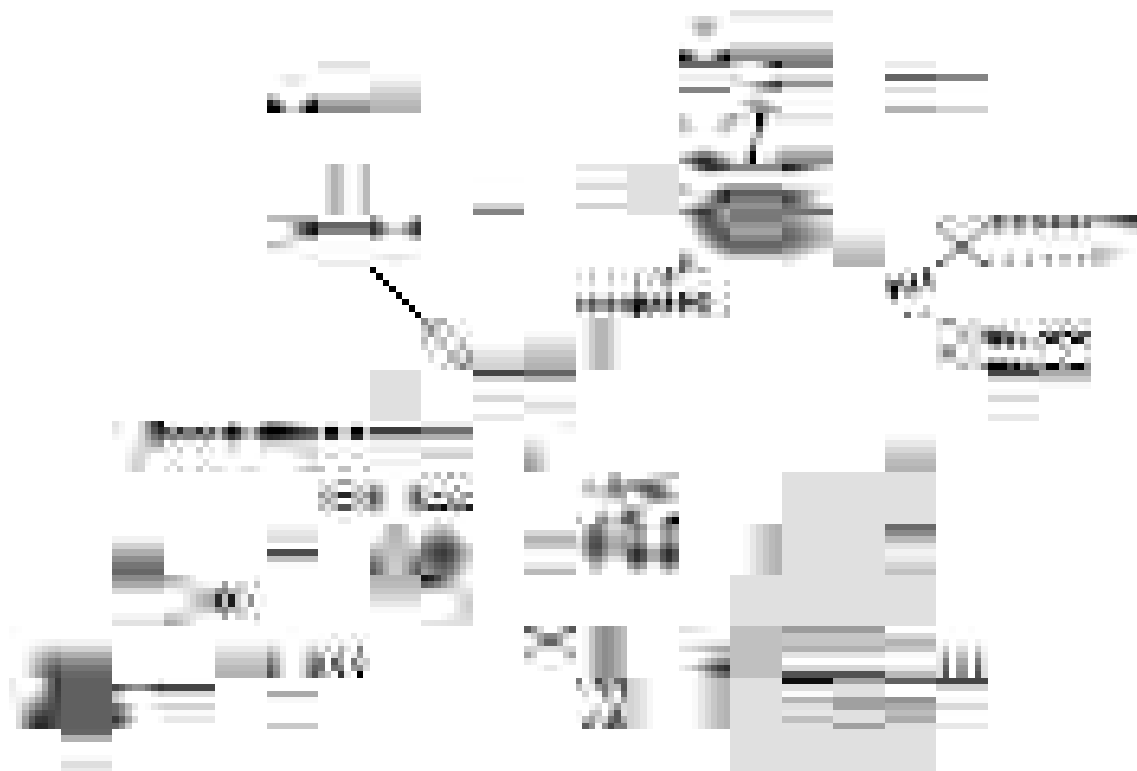
Kaspázy jsou exprimovány jakožto inaktivní proenzymy ve většině buněk a po své aktivaci mohou aktivovat jiné kaspázy, které jsou ještě ve formě proenzymů. Takto uspořádaná kaskáda proteolytických reakcí umožňuje snadné vedení apoptotického signálu a rychlou smrt buňky. Kaspázy patří do skupiny proteáz proteolyticky štěpí proteinovou vazbu za aspartátem. Bylo popsáno několik těchto proteáz jako například kaspázy 2, 8, 9, 10, které jsou na začátku aktivační kaskády a nazývají se tedy iniciační. Kaspázy 3, 6, 7, nacházející se na konci aktivační kaskády a provádějící aktivaci samotného procesu apoptózy, nazýváme jako efektorové. [6]. Další marker apoptózy je rozsáhlé zesíťování proteinů („*cross-linking*“), zapříčiněný zvýšenou expresí a aktivací tkáňových transglutamináz. Rozpad DNA byl již zmíněn a je také zprostředkován enzymy, tentokrát endonukleázami závislými na vápníku a hořčíku. Vzniklé fragmenty dosahují velikosti 180 až 200 párů bazí a tvoří jakýsi žebřík, čehož se využívá u techniky zvané „*DNA ladder*“ [7], o které bude pojednáno v další části práce. Na apoptotických buňkách se také tvoří specifické buněčné markery, díky kterým je apoptotická buňka včas rozpoznána makrofágy a je tím zároveň zajištěna ochrana pro ostatní buňky. Například fosfatidylserin, který je za normálních okolností obsažen ve vnitřní membráně buňky, se translokuje do membrány vnější, kde může být rozpoznán makrofágem. Mezi další membránové markery můžeme zařadit anexin I nebo kalretikulín [2].

1.1.3 Fragmentace DNA

Celý proces aktivace apoptózy začíná již u Fas receptoru (FasR), což je 45 kDa velký membránový protein typu I, patřící do rodiny tumor nekrotizujících faktorů („*tumor necrosis factor*“, TNF). Fas ligand (FasL) je receptor patřící také do TNF rodiny receptorů a je exprimován na aktivovaných NK buňkách a T-lymfocytech. Navázání FasL receptoru na FasR se aktivuje celý proces apoptózy [8]. FasL je homotrimer a jeho navázání na FasR způsobí trimerizaci FasR, čímž se FasR aktivuje. Aktivací FasR dochází k vytvoření komplexu indukujícímu smrt („*death-inducing signaling complex*“, DISC). DISC je složen z receptoru smrti, Fas-asociované death domény („*Fas-associated death domain*“, FADD) a prokaspázy 8

[8]. Prokaspáza 8 se po vytvoření komplexu DISC následně uvolňuje již v aktivované formě, tedy jako kaspáza 8, která má již dostatečnou proteázovou aktivitu. Kaspáza 8 následně může projít dvěma směry, které vedou k aktivaci prokaspázy 3. V prvním případě aktivovaná kaspáza 8 přímo štěpí prokaspázu 3, čímž jí samotnou také aktivuje. V druhém případě kaspáza 8 štěpí „*BH3 interacting domain death agonist*“ (Bid). Bid je proapoptotický člen Bcl-2 rodiny, který po aktivaci migruje do mitochondrie, kde způsobí permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, což má následně za důsledek mimo jiné i vyplavení cytochromu c [9]. Uvolněný cytochrom c následně aktivuje kaspázu 9, která štěpí prokaspázu 3 na aktivovanou formu kaspázu 3 [10].

Aktivovaná kaspáza 3 se následně váže na komplex složený z „*caspase activated DNase*“ (CAD) a „*inhibitor of caspase activated DNase*“ (ICAD). CAD je specifická DNáza ze skupiny endonukleáz, která zapříčiňuje fragmentaci DNA po uvolnění z komplexu. CAD, někdy též označovaná jako „*DNA fragmentation factor 40 kDa*“ (DFF40), je totiž syntetizována společně s ICAD. ICAD neboli „*DNA fragmentation factor 45 kDa*“ (DFF45) navázaný na CAD působí jako jeho inhibitor a zároveň mu pomáhá se správně sbalit do své terciální struktury po syntéze na ribozomu, takže působí také jako chaperon. Během apoptózy dochází pomocí kaspázy 3 k rozdělení komplexu CAD-ICAD a uvolněný CAD může aktivně začít štěpit chromozomální DNA, konkrétně na místech bohatých na adenin a thymin. Bylo zjištěno, že vznikají 180 párů bazí velké nukleotidové jednotky a jednotlivé násobky tohoto čísla (180, 360, 540 atd.) [11]. U buněk, které postrádají ICAD nebo obsahují jeho mutantní formy, nedochází během apoptózy k fragmentaci DNA [12]. Výskyt CAD a ICAD proteinů a jejich mRNA je prokázán téměř ve všech buňkách a tkáních. Pouze fibroblasty a nervové buňky vykazují nízký stupeň exprese těchto proteinů, a proto tedy pouze malé procento jejich chromozomální DNA je degradováno pomocí CAD-ICAD komplexu. Tento způsob aktivace buněčné smrti spojený s fragmentací DNA můžeme zařadit do vnější dráhy aktivace apoptózy a je znázorněn na obr. č. 1 [10].



Obr. 1: Apoptotická fragmentace DNA založená na kaskádové reakci kaspáz a CAD. CAD je syntetizován společně s ICAD, který ho inaktivuje a slouží jako chaperon. Signál vedoucí k aktivaci apoptózy zapříčiňuje kaskádu reakcí, na jejímž konci je aktivace kaspázy 3, která následně štěpí komplex CAD-ICAD. Vzniklý CAD poté již může štěpit chromozomální DNA na jednotlivé nukleotidové zbytky, dosahující velikosti asi 180 párů bazí a její násobky (upraveno) [4].

1.2 DNA ladder assay

„DNA ladder assay“ (DLA) využívá pro detekci DNA fragmentace vzniklé při apoptóze gelovou elektroforézu v agaróze. Během této metody se využívá faktu, že se chromozomální DNA štěpí na jednotlivé nukleotidové jednotky dosahující velikosti 180 párů bazí a násobkům tohoto čísla. Po elektroforéze tak můžeme pozorovat u apoptotických buněk tzv. „DNA ladder“, díky kterému lze jednoduše odlišit buňky apoptotické od ostatních, i nekrotických, kdy vznikají fragmenty nepravidelných velikostí [13]. Základní schéma testu spočívá v kultivaci buněk, jejich lýze, po které následuje izolace fragmentované DNA. Po izolaci by se měla odstranit kontaminující RNA. Když vzorek obsahuje již pouze zkoumanou DNA, můžeme přejít k elektroforéze. Záporně nabitá DNA v agarózovém gelu putuje ke kladné elektrodě. Nakonec se fragmenty DNA obarví a vyhodnotí [14].

Během postupu buňky nejdříve lyzujeme. Většinou se k lýze využívá lyzační pufr, který obsahuje zpravidla tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) a chlorid sodný s následnou úpravou pH na hodnotu pH = 7,5 [14]. Dimethylsulfoxid (DMSO) může být také použit v lyzačním pufru z důvodu inhibice nukleáz, které by mohly štěpit DNA [13]. Po rozrušení buněčné a jaderné membrány je následně fragmentovaná DNA izolována. DNA je izolována například pomocí fenol-chloroformové, nebo fenol-chloroform-isoamylalkoholové extrakce, kdy se využívá faktu, že DNA je polární, a proto se po extrakci nachází disociovaná ve vodné fázi. Proteiny, které obsahují aminokyseliny polární i nepolární, se nachází na rozmezí fáze vodné a organické. K oddělení těchto fází se přidává právě isoamylalkohol [15]. Tento druh extrakce se používá spíše pro DNA fragmenty o větší molekulové hmotnosti, jelikož při srážení DNA ethanolem dochází k odstranění menších DNA fragmentů. K odstranění tohoto problému se může namísto fenol-chloroformové DNA extrakce využít dodecylsírán sodný-TrisEDTA (SDS-TE) pufr, ovšem při uplatnění této úpravy izolovaná DNA již nadále nemůže být použita, kupříkladu pro PCR [13]. Pro izolaci DNA fragmentů o menší molekulové hmotnosti se také může využít extrakce na tuhé fázi („solid phase extraction“, SPE). Fragmentovaná DNA je následně purifikována od kontaminující RNA. Purifikace se provádí nejčastěji pomocí RNázy A, která štěpí řetězce RNA [14].

Jako další krok po izolaci a očištění DNA následuje elektroforéza v agarózovém gelu. Ten se většinou připravuje o 1-2% koncentraci [16]. Velikost

napětí se volí úměrně velikosti zkoumaných fragmentů DNA v rozsahu 2-15 V/cm [17,18]. Pro následné zviditelnění fragmentů se využívají fluorescenční barvy jako například ethidiumbromid, od kterého se ovšem kvůli jeho toxicitě spíše upouští. Proto můžeme aplikovat při barvení fragmentů např. ekologičtější alternativu SYBR Safe [15,16,17]. Po správném provedení testu můžeme fragmentovanou DNA z apoptotických buněk pozorovat jako „DNA ladder“, což ilustruje obr. 2.



Obr. 2: Agarózový gel po DLA. 1 - marker, 2 - buňky U937 bez ovlivnění, 3 - buňky U937 ovlivněny induktorem apoptózy, v tomto případě kamptothecin. 4 - pozitivní kontrola (upraveno) [19].

DLA je metoda jednoduchá na provedení a vybavení v laboratoři. Citlivost metody je poměrně nízká, a to až okolo 10^6 buněk, což není příliš vhodné pro vzorky obsahující nižší počet apoptotických buněk. Další nedostatek spočívá ve faktu, že nejsme stoprocentně schopni přesně odlišit buňky apoptotické od nekrotických, jelikož i při nekróze vznikají fragmenty DNA, nicméně nepravidelných velikostí. Z tohoto důvodu DLA nelze použít jako jedinou metodu ke stanovení apoptózy a musí se zvolit ještě doprovodné testy [16]. Nicméně můžeme pomocí ní určit v jaké fázi apoptózy se buňka nachází, jelikož fragmenty DNA vznikají až v pozdějším stádiu apoptózy [15, 16].

1.3 TUNEL metoda

Terminal deoxynukleotidyltransferase (Tdt) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) metoda patří k dalším technikám stanovujícím fragmentaci DNA. Využívá skutečnosti, že během buněčné smrti vznikají v řetězci DNA zlomy, kam se váže terminální deoxynukleotidyltransferáza („*terminal deoxynukleotidyltransferase*“, TdT), která patří k DNA polymerázám na templátu nezávislým [20]. TdT po navázání začne na řetězec DNA vázat deoxynukleotidy obsahující deoxyuridin, proto také v názvu metody je zkratka dUTP, reprezentující právě místa bohatá na tento deoxynukleotid. Deoxyuridin oproti uridinu obsahuje ve své struktuře deoxyribózu namísto ribózy. dUTP je navíc značen enzymem nebo fluoreskující barvou, které při vyhodnocení vizualizují zlomy v DNA [21].

Poprvé byla metoda popsána v roce 1992 Gavrielim a kolegy [22] a zároveň také týmem okolo polského vědce Gorczyci [23]. Postup metody je založen na kultivaci zkoumaných buněk a následné fixaci. Po zafixování přichází na řadu inkubace společně s TdT, která připojí na DNA řetězce značené dUTP, díky kterým následně můžeme výsledek vizualizovat a vyhodnotit [22].

Nejdříve se buňky nechají inkubovat s vhodným induktorem apoptózy, v případě Gavrieli a kolegů to byl dexamethazon působící na thymocyty [22]. Po uplynutí inkubace se buňky sklídí a po centrifugaci a odstranění supernatantu se přidá formaldehyd nebo jiné fixační činidlo, které zafixuje buňky [24]. Dále je nutné, aby byly buňky propustné pro TdT a další reagenty. K tomu se může využít například 70% ethanol [23]. Pro zvýšení permeabilizace buněk se přidá TdT společně s dUTP a vhodným pufrům, který může být například složen z Tris o pH = 7,2, kakodylátu sodného a chloridu kobaltnatého. Po inkubaci se dále přidá lidský nebo hovězí sérový albumin. TdT váže deoxynukleotidy převážně k ostrým koncům DNA, konkrétně na 3'-konci DNA. TdT využívá jako kofaktor kobalt, proto je do reakčního pufru přidáván ve formě kobaltnaté soli [20]. Když jsou vytvořena na fragmentovaných částech DNA místa bohatá na deoxyuridin, je nutné je vizualizovat [22].

V původní práci od Gavrieli a spol. byl použitý deoxyuridin, na němž byl navázán biotin [22]. Biotin vykazuje velkou afinitu k avidinu, který byl v tomto případě ještě označen peroxidázou. Vzniká tedy komplex dUTP-biotin-avidin-peroxidáza. K tomuto komplexu se přidá peroxidu vodíku jako substrát. Po přidání peroxidu

vodíku ke komplexu a dalšího substrátu můžeme detekovat barevnou změnu pomocí světelného mikroskopu [22]. Namísto biotinu může být použit také digoxigenin, který můžeme následně stanovit pomocí specifické anti-digoxigeninové protilátky [24]. Z důvodu finanční náročnosti byla vytvořena alternativa, která nevyužívá dUTP a další komponenty s ním spojené, nýbrž je založena na inkorporaci 5-brom-2'-deoxyuridin 5'-trifosfátu (BrdUTP) do řetězce DNA. BrdUTP může být po inkorporaci detekován pomocí protilátky anti-BrdUTP, která je konjugována např. s fluoresceinisothiokyanátem (FITC). Po navázání protilátky s FITC může být barevná změna analyzována například pomocí průtokové cytometrie [25]. Princip TUNEL assay znázorňuje obr. 3.



Obr. 3: Princip TUNEL assay. A - TdT inkorporuje do řetězce DNA dUTP značený biotinem, který je následně rozeznám avidinem. Na avidinu je navázána peroxidáza a ta po přidání H_2O_2 změní barvu, kterou detekujeme. B - detekce fragmentované DNA díky inkorporaci BrdUTP. Ten je následně rozeznám protilátkou anti-BrdUTP, značenou FITC, jehož barevnou změnu detekujeme (upraveno) [26].

Fragmentace DNA nastává v pozdní fázi apoptózy a pomocí TUNEL assay, která je velmi specifická, se velmi dobře detekuje. Nicméně k rozpadu DNA dochází také během nekrózy, a proto se musí k jistému průkazu apoptózy využít ještě jiných doprovodných testů založených na jiném principu [27].

1.4 Kometový test

Kometový test, neboli jednobuněčná gelová elektroforéza („*single cell gel electrophoresis*“, SCGE), je metoda, pomocí níž můžeme vizualizovat zlomy deoxyribonukleové kyseliny v jednotlivých buňkách. Celý postup kometové analýzy spočívá ve fixaci zkoumaných buněk do agarózového gelu, následné lýzy buněčné a jaderné membrány, rozpletení DNA následované elektroforézou, neutralizací a detekcí zkoumaných buněk ve fluorescenčním mikroskopu [28]. Výsledný obraz jedné buňky po analýze připomíná kometu, jak znázorňuje obr. 4. Kometa se skládá z hlavy a ocasu.



Obr. 4: Obraz buňky po kometové analýze. Základní rozdělení komety na hlavu a ocas.

1.4.1 Historie kometové metody

O budoucí vznik a rozvoj kometové analýzy se zasloužili pánové Rydberger a Johanson již v roce 1978, kdy vytvořili metodu pro detekci zlomů molekuly DNA [29]. Ke kvantifikaci poškozené DNA použili zafixování buněk do agarózy, následovala lýza buněk, po které přišla na řadu denaturace DNA pomocí NaOH, neutralizace a celý proces byl zakončen obarvením DNA pomocí akridinové oranže. Rozdíl mezi červenou a zelenou fluorescencí z obarvených buněk určoval stupeň poškození měřené DNA. Buňky s menším poškozením DNA fluoreskovaly zeleněji, zatímco buňky s více poškozenou DNA fluoreskovaly červeně. Celý jejich experiment byl založen na dvou předpokladech. První, že dvouřetězcová DNA obsahující ve své

strukturu více poškození denaturuje rychleji do jednořetězcové formy DNA v mírně alkalickém prostředí. Druhý předpoklad se týkal barvení, konkrétně toho, že molekuly akridinové oranže při relativně vysokých koncentracích tvoří polymery s jednořetězcovou DNA v rozsahu její délky. Výsledný polymer barvy a jednořetězcové DNA fluoreskuje červeně. Naopak do dvouřetězcové molekuly DNA interkalace akridinové barvy neprobíhá, a to způsobuje fluorescenci pozorovatelnou v zelené části spektra [29].

Samotný vznik metody nastal v roce 1984 [30]. Na myší lymfatické buňky, které byly umístěny na podložních sklíčkách v agaróze, aplikovali gama záření a po jejich lýze následně provedli elektroforézu v neutrálním prostředí. Ta ukázala, že při zvýšeném množství gama záření dochází k navýšení poškození DNA, která následně migruje v gelu rychleji. Jako jedni z prvních také uvedli vysokou citlivost metody, kdy byli schopni zaznamenat poškození DNA již při 50 rentgenech, což odpovídá dnešním 0,5 Gray (Gy). K barvení použili opět akridinovou oranž [30].

Singh v roce 1988 publikoval další modifikaci, tentokrát provedl elektroforézu v alkalickém prostředí. Vedla ho k tomu skutečnost, že při neutrální elektroforéze, kterou prováděl, se při zvyšujících dávkách rentgenového záření nezvyšovala také délka migrace DNA. To přisoudil faktu, že DNA z lyzovaných buněk byla v agaróze ve formě suprahelixové struktury, což znemožnilo její migraci. Pro vyřešení tohoto problému zvolil tedy alkalickou verzi elektroforézy, jelikož odstraňuje u DNA její suprahelixovou strukturu a denaturuje dvouřetězcovou DNA na jednořetězcovou. Za použití dalších drobných úprav se vygenerovaly dvě základní verze kometové analýzy, a to konkrétně neutrální a alkalická [31].

1.4.2 Neutrální a alkalická verze

Pomocí neutrální verze kometové analýzy detekujeme převážně dvouřetězcové zlomy („*double strand breaks*“, DSBs) v DNA, protože metoda postrádá krok pro denaturaci DNA. Modifikací běžného postupu neutrální verze se dají detekovat i zlomy jednořetězcové („*single strand breaks*“, SSBs), ale je vyžadována vyšší teplota a inkubace s proteázou. Ověření, že jednořetězcové zlomy se nedají detekovat během neutrální verze, se dá poměrně snadno potvrdit použitím peroxidu vodíku, který již při velmi malých koncentracích způsobuje tisícinásobnou převahu jednořetězcových zlomů nad těmi dvouřetězcovými [28].

Při využití alkalické verze se dají detekovat zlomy dvouřetězcové, jednořetězcové a apurinové nebo apyrimidinové (AP místa), což jsou místa v DNA postrádající bázi ve své struktuře. AP místa jsou alkalilabilní a při alkalické verzi kometového testu, kdy je vysoká hodnota pH, jsou přeměněna na jednořetězcové zlomy v DNA [28,33]. V současné době se dá využít ještě kombinace obou metod v podobě alkalicko-neutrální verze [28].

1.4.3 Princip a postup

Nejdříve je nutné připravit podložní sklíčka potažená agarózou, ve které jsou zafixovány vyšetřované buňky. Po zatuhnutí agarózy nastává lýza buněk, konkrétně rozrušení jaderné a buněčné membrány, aby v nadcházejících krocích mohla vycestovat poškozená DNA. Při použití alkalické verze kometové analýzy jako další krok probíhá rozplétání DNA v alkalickém pufru. Díky vysoké hodnotě pH alkalického pufru mohou vzniknout i jednořetězcové zlomy. V případě neutrální verze k tomuto kroku nedochází. Následuje elektroforéza, kdy záporně nabitá DNA putuje ke kladně nabitě elektrodě. Vzápětí se podložní sklíčka umístí do neutralizačního pufru. Po promytí v destilované vodě zbývá pouze obarvit buňky vhodným barvivem a výsledky analyzovat. Schéma metody je znázorněno na obr. 5 [28,31].



Obr. 5: Princip kometové analýzy, alkalická verze. Na začátku aplikujeme buňky společně s agarózou na podložní sklíčko. Po zafixování buněk v agaróze dochází k lýze buněk, dojde k rozrušení jaderné a buněčné membrány. Po rozrušení membrán dochází k rozpletení DNA v alkalickém pufru, kde následně proběhne i elektroforéza, kdy záporně nabitá molekula DNA putuje ke kladně nabitě elektrodě. Po vycestování DNA nastává neutralizace, po které je DNA obarvená a následně analyzována (upraveno) [32].

1.4.3.1 Příprava vzorku

Příprava podložních sklíček pro kometovou analýzu je první a zároveň velmi důležitý krok pro úspěšnou analýzu výsledných komet. Celý experiment totiž spočívá v manipulaci s těmito skly potaženými agarózou, a proto je velice důležité zvolit správnou koncentraci agarózy, nebo například dostatečnou dobu na zaschnutí agarózy, aby se následně ze sklíček během experimentu neoddělila. Počet jednotlivých vrstev agarózy je v rozmezí jedné až tří [33]. Pokud se použije pouze jedna vrstva, buňky jsou smíchány v nízkotuhnoucí agaróze („*low melting point*“, LMP), která se po rozpuštění vytemperuje na 37 °C. Tato směs je aplikována přímo na podložní sklíčka. Další varianta je využít tři vrstvy agarózy. Nejdříve se aplikuje první vrstva klasické agarózy, která polymeruje při teplotě kolem 50 °C [34]. Na ní se po zaschnutí aplikuje vrstva obsahující buňky. Třetí vrstva, obsahující opět LMP agarózu, se aplikuje z důvodu vyplnění volných otvorů ve druhé vrstvě a také aby se zvýšila vzdálenost mezi buňkami a povrchem gelu [33]. Poslední varianta spočívá v tom, že se na vrstvu klasické agarózy aplikuje LMP agaróza s buňkami. Při výběru vícevrstevné varianty se podložní sklíčka přikrývají krycím sklíčkem z důvodu lepšího rozvrstvení gelu a ke zvýšení adheze agarózy. K urychlení tuhnutí agarózy se sklíčka umísťují do lednice. Koncentrace agarózy se pohybuje okolo 1 % [35]. Množství buněk aplikovaných na jedno sklíčko by měl v konečném výsledku poskytovat jednotky buněk v zorném poli mikroskopu. To odpovídá přibližně desítkám tisíc buněk, ovšem záleží to i na jejich typu [33]. Pro lepší přilnutí agarózy se mohou využít sklíčka se zábrusem. Upravením sklíček nicméně klesá kvalita výsledného obrazu při jeho analýze. Jako alternativa by se mohla použít sklíčka vyrobená z jiného materiálu, například z plastu [36].

1.4.3.2 Lýza buněk

Po zatuhnutí agarózy s buňkami se podložní sklíčka umístí do lyzačního pufru, s vysokým obsahem solí a detergentů alespoň na jednu hodinu. Původní lyzační roztok sestavený dr. Singhem obsahoval: EDTA, NaCl, 1% N-lauroylsarkozin, Tris, s následnou úpravou na pH = 10 [37]. Těsně před použitím pufru se přidal 1% Triton X-100, u kterého se následně prokázalo, že úspěšně lyzuje buňky dostatečně, proto se mohlo upustit od používání 1% N-lauroylsarkozinu [38]. Jako prevence proti radikálově vyvolanému poškození DNA asociovanému s uvolněním železa během

lýzy erytrocytů, které jsou přítomny ve vzorcích z tkáně a krve, se k pufru začal přidávat dimethylsulfoxid [35]. Jinak se složení pufru v průběhu let příliš nezměnilo, ale záleží také do značné míry na typu buněk, protože některé vyžadují více detergentů ke kompletní lýze. Pro stabilitu agarózového gelu a lepší lýzy buněk se doporučuje vychladit lyzační pufr. Jak již bylo řečeno v úvodu, během lýzy dochází k rozrušení buněčné a jaderné membrány, což následně umožní vycestování fragmentované DNA a zároveň jsou ostatní buněčné kompartmenty a proteiny vyplaveny do lyzačního roztoku, kde po vyjmutí sklíček z tohoto pufru také zůstanou [33].

1.4.3.3 Alkalické rozplétání

Než se DNA rozdělí pomocí elektroforézy, je nutné rozplést její suprahelixovou strukturu. K tomu napomáhá ponoření opláchnutých sklíček po lýze do alkalického pufru, který následně slouží i k elektroforéze. Roztok pro alkalické rozplétání má vyšší pH. Konkrétně se hodnoty pH nachází okolo $\text{pH} \geq 10$, kdy při prvním použití této metody bylo dokonce používáno i $\text{pH} \geq 13$. Takto vysoké hodnoty pH jsou důležité pro tvorbu jednořetězcových zlomů, které vznikají u alkalilabilních míst, což jsou například místa DNA postrádající ve své struktuře dusíkatou bázi. Při alkalické verzi kometového testu můžeme ještě detekovat zlomy dvouřetězcové. Alkalický roztok je složený z EDTA a hydroxidu sodného. Doba, která se využívá k alkalickému rozplétání, není napříč studii jednotná [35].

1.4.3.4 Elektroforéza

Typické obrázky komet, které můžeme vidět po vyhodnocení, vznikají právě v průběhu elektroforézy. DNA je díky fosfátovým skupinám ve své struktuře záporně nabitá, tudíž během elektroforézy putuje ke kladné elektrodě. Elektroforéza probíhá v pufru pro alkalické rozplétání, využívá se tedy i zde alkalického roztoku pro rozplétání DNA. Podmínky zvolené v původní práci Singha a kolektivu byly 25 V pro elektrické napětí a 300 mA pro elektrický proud, kdy samotná elektroforéza probíhala 20 minut [37]. V současnosti je na trhu velké množství komerčně dostupných elektroforetických soustav, takže se můžeme také setkat se značením napětí V/cm, kdy se nejčastěji používá rozmezí mezi 0,7–1,0 V/cm [33]. Rozdílné hodnoty platí i pro proud a samozřejmě samotnou délku elektroforézy. Co se teploty týče, je

doporučována spíše nižší teplota, která zajišťuje lepší výsledky. Všechny výše zmíněné parametry záleží také na velikosti zvolených buněk a účelu, ke kterému byla kometová analýza použita [37].

1.4.3.5 Neutralizace

Po elektroforéze v alkalickém prostředí následuje neutralizace, kdy jsou sklička ponořena do neutralizačního pufru. Ten obsahuje Tris s upraveným pH na hodnotu $\text{pH} = 7,5$ [37]. Opakované promytí v neutralizačním pufru se provádí u experimentů, kdy je během vyhodnocování pozorován rušivý efekt pozadí. Ovšem musíme počítat s tím, že při každé manipulaci se skly se zvyšuje riziko ztráty gelu s agarózou z podložních sklíček. Po neutralizaci sklička opatrně opláchneme v destilované vodě a můžeme přejít k barvení a následnému vyhodnocení testu [35].

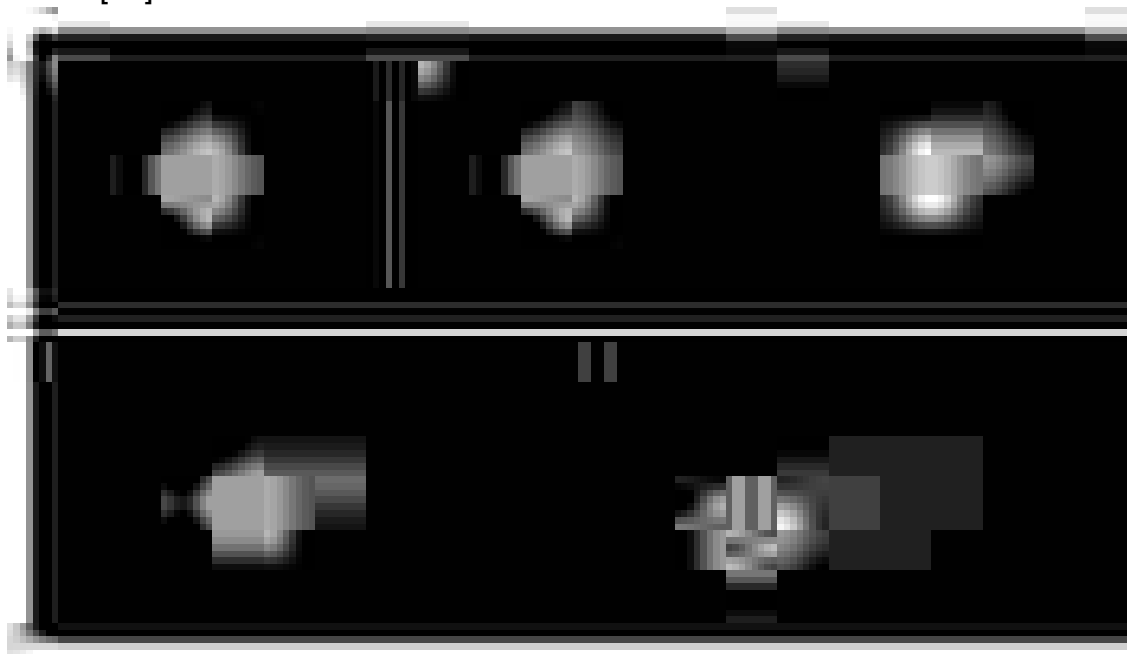
1.4.3.6 Barvení DNA a vizualizace komet

Existuje mnoho specifických barev k barvení DNA a tím k vizualizaci komet. Volba té správné záleží do značné míry na výběru a možnostech dané laboratoře. Jejich vliv na samotnou citlivost a spolehlivost testu by měl být minimální [33]. Nejčastěji používané barvy jsou fluorescenční, kam řadíme ethidiumbromid, propidiumjodid, 4,6-diamidin-2-fenylindol (DAPI), SYBR Green I, anebo barviva Hoechst, kde je princip barvení DNA založen na tom, že barva interkaluje do malého žlábků dvoušroubovice DNA, především do míst bohatých na adenin a thymin [39]. Historicky je nejvíce používaný ethidiumbromid, ale kvůli jeho toxicitě a mutagenním účinkům se stále více používají jiné barvy, které jsou bezpečnější pro pracovníky a zároveň šetrnější k životnímu prostředí [40]. Pro opakované vyhodnocování již obarvených komet lze přidat látky zabraňující ztrátě barviva [41]. Do nefluoreskujících technik pro vizualizaci komet lze zařadit barvení pomocí dusičnanu stříbrného [33].

1.4.3.7 Hodnocení komet

Nejjednodušší a nejrychlejší postup, jak zhodnotit vzniklé komety, je vizuální hodnocení. Při následném hodnocení lze komety obodovat a rozdělit dle jejich poškození do jednotlivých skupin. Podle hodnocení dle Collinse využijeme rozdělení

na skupiny 0-4, kdy s rostoucím číslem roste i poškození DNA, tedy se zvětšuje ohon komety, viz obr. 6 [42]. Nevýhoda vizuálního hodnocení spočívá v použití lidského faktoru, kdy může docházet k subjektivnímu hodnocení a v poskytnutí pouze základního rozdělení. Proto v dnešní době existuje celá řada softwarů a aplikací, které dokáží jednotlivé komety zanalyzovat. Jako příklad můžeme uvést programy CASP, LUCIA, OpenComet nebo CometScore [43,44]. Softwary nabízí hodnocení zcela automatické, kdy si program sám komety vybere a vyhodnotí, nebo si můžeme tento výběr sami vytvořit, což je většinou jediná možnost u volně dostupných programů. V obou případech poskytují následně programy mnoho údajů jako například délku komety, její intenzitu, velikost hlavy, velikost ocasu, procenta DNA v hlavě nebo v ohonu a další. Dnes se setkáváme nejčastěji s parametrem % DNA v ohonu [34].



Obr. 6: Vizuální skórování komet. Rozdělení komet do skupin od 0–4 dle poškození DNA, kde se vzrůstajícím číslem, roste fragmentace DNA. A – žádné nebo velmi malé poškození, B – malé poškození, C – střední poškození, D – velké poškození, E – vysoké poškození, potenciální apoptóza nebo nekróza (upraveno) [15].

1.4.4 Kometová analýza a apoptóza

Pokud je většina DNA obsažena v ohonu komety, velikost hlavy je tím zredukována a výsledný obraz komety je označován jako „*hedgehog*“. Při vizuálním hodnocení by tato kometa odpovídala skupině 4 [45]. „*Hedgehog*“ byly po dlouhou dobu považovány za komety znázorňující apoptózu. V případech, kdy je buňka vážně poškozená, je možné, že se spustí programovaná buněčná smrt. Nicméně ve

většině případů nelze toto tvrzení generalizovat, a to z následujících důvodů. 1) Apoptóza je proces nevratný, ale bylo prokázáno, že buňky ošetřené subletální dávkou H₂O₂ byly identifikovány jako „*hedgehog*“ [42]. Po čase ovšem tyto komety již nebylo možné nalézt z důvodu opravy DNA zlomů, což by základní charakteristiku apoptózy vyvracelo. 2) Při apoptóze dochází ke značné fragmentaci DNA. Vzniklé fragmenty dosahují velice malých velikostí v řádech několika bazí. Tyto malé kousky DNA by po lýze buněk nebo elektroforéze zmizely, a proto by nebylo možné po vyhodnocení nalézt „*hedgehog*“ komety [36].

Nemožnost využití klasické verze kometového testu pro detekci apoptózy byla prokázána například ve studii Morleye a kolektivu [46]. Po zafixování buněk v agaróze a před lýzou samotných buněk byly apoptotické buňky identifikovány pomocí annexinu V. Tato fluorescenční barvicí metoda je založená na faktu, že se na apoptotických buňkách na počátku apoptózy translokují fosfatidylserin z vnitřní strany membrány na vnější. Na fosfatidylserin, který za běžných okolností láká makrofágy k požití apoptotických buněk, se naváže annexin V, což detekujeme zelenou barvou v mikroskopu. V případě pozitivních buněk na annexin V byly výsledné komety stěží detekovatelné z důvodu odplavení vysoce fragmentované DNA během elektroforézy [45,46].

Singh v roce 2000 popsal značně přepracovaný kometový test, kdy se dají apoptotické buňky vizualizovat. Buňky umístěné v agaróze jsou lyzovány, nicméně neproběhne elektroforéza, namísto které DNA precipituje pomocí ethanolu. Tato metoda se pojmenovala jako „*DNA diffusion assay*“ a lze podle ní odlišit buňky apoptotické od nekrotických pod fluorescentním mikroskopem dle morfologických změn [47]. Co se apoptózy týče, lze některé buňky s jistotou pomocí kometové analýzy jako apoptotické určit. Musí se ale nacházet již v pozdní fázi apoptózy, což musí být prokázáno jiným testem [48].

1.4.5 Další využití kometové analýzy

Kometový test lze zařadit mezi standardní testy pro měření účinků nových léků nebo kosmetiky na lidské tělo, či pro stanovení toxicity chemikálií. Hlavními přednostmi jsou rychlost, snadná proveditelnost a použitelnost pro všechny tkáně, které mohou být připraveny jako jednobuněčné suspenze. Při měření citlivosti, ve smyslu detekce mutagenů, karcinogenů a vyhýbání se falešně pozitivním výsledkům,

dosahovala metoda stejných výsledků jako při jiných testech na toxicitu látek, kam můžeme zařadit například test na měření mikronukleí nebo chromozomálních aberací. Testování probíhalo s buňkami HepG2, na které působily různé chemické látky s toxickým účinkem [49]. Zajímavý experiment provedli Kirkland a Speit, kteří našli v literatuře 67 chemikálií, které jsou prokazatelně známé svojí karcinogenézí, ale při testech na měření mikronukleí vyšly hodnoty negativně, tedy, že nejsou chemikálie pro tělo závadné. Kometový test ovšem zařadil 90 % stanovovaných chemikálií jako toxických. Dále bylo zjištěno, že 78 % chemikálií, které nezpůsobují genetické změny, vykazovaly negativní výsledek a tím byla prokázána poměrně velká specifita kometového testu [50].

Lidský biomonitoring je další odvětví, kde může být kometový test aplikován. Můžeme sem zařadit monitorování expozice genotoxickým chemickým látkám nebo záření, hodnocení oxidačního stresu spojeného s různými lidskými nemocemi, anebo detekci DNA spojenou s kouřením. Obecně platí, že i když jsou mezi zkoumanou a kontrolní skupinou subjektů nalezeny významné rozdíly, nelze z výsledků kometového testu diagnostikovat nemoci jako rakovina z důvodu interindividuálního rozdílu v jednotlivých skupinách zahrnujících rozdíly ve stravě, míry stresu nebo druhu infekce [36]. Jako příklad lidského biomonitoringu můžeme uvést studii prováděnou na pracovnících společnosti vyrábějící polyakryl v íránském městě Isfahán [51]. Jako vzorek byla odebrána krev pracovníků továrny a kontrolní skupina byla vybrána z řad personálu továrny pracujících v kancelářích, konkrétně se zkoumaly bílé krvinky. Výsledky byly následující. Množství poškozené DNA bylo ve skupině pracovníků továrny signifikantně větší než v kontrolní skupině. Konkrétně hovoříme o číslech 3,87 oproti 1,52, kdy byl zvolen ukazatel tzv. tail moment. Tail moment je další parametr, dle kterého můžeme hodnotit výsledek kometového testu a značí procenta DNA v ohonu násobená délkou ohonu [51].

Kromě zkoumání poškození lidské DNA můžeme kometový test dále využít při nutričních studiích, při studiu vlivu určitých onemocnění na kvalitu DNA nebo pro testování kvality životního prostředí [52,53]

O kometovém testu můžeme říci, že je to velmi rychlá, citlivá, na vybavení a finance nenáročná metoda, která nachází uplatnění v mnoha odvětvích, hlavně v měření genotoxicity látek. Na vytvoření výsledku stačí pouze malé množství buněk, což ve srovnání s ostatními genotoxickými testy poskytuje také velkou výhodu.

Pokud se použije klasický protokol pro kometovou analýzu, lze stěží odlišit apoptózu od genotoxického poškození buněk bez využití ještě doprovodného testu [31].

1.5 Senescence

Senescence neboli buněčné stárnutí je proces, při kterém je již vyčerpán proliferační potenciál buňky, neprobíhá dále buněčný cyklus a samotná buňka prodělává četné morfologické změny. Při pohledu na lidský organismus z makroskopického hlediska dochází při stárnutí k chýtrání tělesné schránky, snižování funkce orgánů, zhoršení smyslů, což je právě projevem nedostatečné buněčné obnovy a přechodu buněk do senescence [54]. Poprvé můžeme hovořit o pojmu senescence ve spojitosti se studií Hayflicka a Moorheada v roce 1961 [55]. Ti na lidských embryonálních fibroblastech prokázali, že somatické nenádorové buňky mohou projít jen určitým počtem buněčných dělení [55]. Následně díky zkrácení telomer a nemožnosti aktivovat buněčný cyklus může buňka přejít do senescence. Později byl jev, kdy buňka prochází pouze omezeným počtem buněčných dělení označen jako Hayflickův limit [54].

1.5.1 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je proces, kterým prochází buňka mezi jednotlivými buněčnými děleními. Na konci buněčného dělení vznikají z jedné mateřské buňky dvě dceřiné. Během každého buněčného cyklu dochází k manipulaci s DNA, a proto je velmi důležité, aby celý proces proběhl bezchybně. Z tohoto důvodu zde můžeme najít mnoho kontrolních mechanismů a kontrolních bodů, jež jsou součástí jednotlivých fází buněčného cyklu [56].

Nezákladnější rozdělení buněčného cyklu je na dvě části, interfázi a M-fázi. Interfáze je rozčleněna na G1 fázi, ve které dochází ke zvětšování buňky, z důvodu zdvojení buněčné hmoty a vytvoření komponent pro další fázi, kterou je S-fáze. Ta je označována jako fáze syntetická, jelikož se v ní replikuje jaderná DNA. Po zdvojení DNA přichází na řadu G2 fáze, ve které se buňka připravuje na samotné dělení. Příprava na rozdělení probíhá tak, že buňka znásobí svoje organely a syntetizuje proteiny potřebné pro poslední fázi buněčného cyklu. Tou je mitóza. Mitóza je zakončená cytokinezí, kdy dojde k rozdělení mateřské buňky na dvě dceřiné. Během

G1 fáze může buňka přejít také do G0 fáze, což je fáze klidová, do níž vstupují buňky již plně diferenciované, což mohou být právě buňky senescentní [56].

Kontrolní mechanismy buněčného cyklu probíhají na více úrovních. Jedním z nich je cyklin-dependentní kinázová regulace. Ta spočívá v aktivaci cyklin-dependentních kináz („*cyclin-dependent kinases*“, CDK) pomocí cyklinů. Cykliny změň konformaci cyklin-dependentní kinázy, čímž se stanou tyto kinázy více aktivní ve smyslu zvýšení jejich afinity k substrátu. Konkrétní mechanismus CDK spočívá ve fosforylaci proteinů zodpovědných za regulaci buněčného cyklu. Tyto serin/threoninové kinázy a cykliny jsou specifické pro jednotlivé kroky buněčného cyklu. Pomocí jejich koncentrace tedy můžeme identifikovat, v jakém stádiu se buněčný cyklus nachází [57].

CDK mohou být inhibovány pomocí inhibitorů buněčného cyklu nazývaných cyklin-dependentní kinázové inhibitory („*cyclin-dependent kinase inhibitor*“, CKI). CKI se váží na samotné CDK, nebo na komplex CDK s cyklinem, čímž regulují jejich aktivitu. Byly identifikovány dvě odlišné rodiny CDK inhibitorů, a to konkrétně INK4 a Cip/Kip. INK4 obsahuje proteiny p15, p16, p18, p19, které vytváří s CDK komplex zabraňující navázání cyklinů během G1 fáze buněčného cyklu. Rodina Cip/Kip obsahuje proteiny p21, p27, p57 a inhibice spočívá v inaktivaci komplexu CDK-cyklin během celého buněčného cyklu [58].

Exprese CKI je regulována vnitřními i vnějšími signály, kdy například exprese p21 je pod kontrolou proteinu p53, který byl již zmíněn při aktivaci apoptózy. Protein p53 je velice důležitý nádorový supresor, který reguluje expresi mnohých proteinů účastnících se růstu buněk, opravy DNA nebo již zmiňované apoptózy [59].

1.5.2 Zkracování telomer a ostatní faktory způsobující senescenci

Telomeráza je specializovaná reverzní transkriptáza, která svou aktivitou přispívá k prodlužování telomer, čímž například nádorovým buňkám umožňuje nekonečnou proliferaci. Většina nenádorových diferenciovaných somatických buněk oproti nádorovým buňkám, díky zkracování telomer při buněčném cyklu, časem dosáhne replikačního limitu a přestane se dělit. To je způsobeno právě neaktivní telomerázou [60]. Telomery nacházíme na koncích chromozomů, kde plní ochrannou funkci. Při replikaci bylo *in vitro* u buněk pozorováno zkrácení telomer o 50-200 bp v závislosti na typu buňky [61]. Při překročení určité minimální délky telomer by

mohlo dojít k poškození chromozomální DNA, proto buňka může přejít z důvodu ochrany vlastní DNA do senescence [62].

Kromě zkracování telomer může indukovat senescenci velké množství dalších faktorů. Mezi tyto faktory můžeme zařadit látky poškozující DNA nebo ionizující záření, které může způsobit až zastavení buněčného cyklu. Naopak léčiva, která indukují poškození DNA, záměrně mohou způsobit stárnutí nádorových buněk. Tento fenomén nazvaný „senescence vyvolaná léčiv“ může být použit k léčbě nádorových onemocnění [63,64]. Velký vliv na vyvolání senescence mají DSBs vzniklé přímo z výše uvedených faktorů nebo vzniklé nepřímo ze zlomů jednořetězcových při oxidačním stresu [65].

1.5.3 Biomarkery senescence

Mezi biomarkery senescence patří morfologické změny, ukončení buněčného cyklu nebo například se senescencí asociovaná β -galaktosidázová aktivita („*senescence-associated beta-galactosidase*“, SA- β -Gal) [66].

Buněčná senescence je zpravidla doprovázena poměrně značnými morfologickými změnami, které závisí na způsobu indukce senescence. Můžeme sem zařadit zvětšení buňky, její zploštění a také byla pozorována mnohojadernost [61]. Při potlačení exprese proteinu p400 byl pozorován navíc vřetenovitý tvar buňky [67], anebo se při indukci senescence objevila značná vakuolizace způsobená špatnou funkcí endoplazmatického retikula [68].

Ukončení buněčného cyklu je velice dobrý ukazatel buněčné senescence jak *in vitro*, tak také *in vivo*. Nicméně i jiné procesy mohou končit zastavením buněčného cyklu, a proto nelze tento marker považovat za specifický pro senescenci [69].

SA- β -Gal je enzym, který je ve zvýšené míře exprimován v senescentních buňkách, kde můžeme jeho reakční optimum měřit při pH = 6. Buňky, které se nenacházejí ve fázi senescence, vykazují také β -galaktosidázovou aktivitu v lyzozomech, nicméně její optimální pH je okolo pH = 4. Tento biomarker je velice spolehlivý pro měření senescence [66].

1.6 Detekce fragmentace DNA u vybraných látek a toxinů

1.6.1 Nanočástice TiO₂

Nanočástice oxidu titaničitého („*titanium dioxide nanoparticles*“, TiO₂-NPs) jsou v dnešní době hojně využívány v mnoha odvětvích, často je můžeme také nalézt ve farmaceutických a kosmetických přípravcích z důvodů jejich unikátních vlastností a malé velikosti, hlavně pokud hovoříme o nanočásticích menších než 100 nm. Nacházíme je v plastech, potravinách, zubní pastě nebo v opalovacích krémech. Přírodně se oxid titaničitý nachází ve třech krystalických modifikacích. Nejčastěji to je struktura rutil, dále anatas a brookit. Tyto struktury jsou využívány i při výrobě nanočástic, nebo se využívají jejich kombinace [70].

Velice slibně se jeví využití TiO₂-NPs například ve spojení s umělými implantáty. Byla prokázána lepší migrace, adheze, proliferace a následná diferenciace mezenchymálních kmenových buněk do formy osteocytu, pokud byly implantáty potaženy vrstvou těchto částic. Touto modifikací se následně může nově vložený implantát lépe uchytit v organismu [71,72]. Velkou roli také hraje velikost nanočástic, jelikož menší částice sice mohou způsobit lepší adhezi buněk, nicméně mohou být zároveň pro organismus více toxické. To dokazují například testy uvádějící, že po expozici TiO₂-NPs o velikosti 20 nm bylo u hlodavců pozorováno vyšší poškození plic než u zvířat, která byla vystavena částicím o velikosti 250 nm [73]. V záznamech mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny („*international agency for research on cancer*“, IARC) můžeme TiO₂-NPs nalézt jakožto látku s možnou karcinogenezí pro člověka, tedy skupina 2B [74].

Pokud se podíváme na měření toxicity TiO₂-NPs pomocí kometové analýzy lze najít mnoho studií na různých velikostech nanočástic aplikovaných na různé typy buněk. Výsledky se dají velmi obtížně generalizovat, protože z 24 experimentů bylo 7 negativních a zbytek pozitivní [75,76,77,78]

1.6.2 Cisplatina

Cisplatina, tj. cisdiaminodichlor platnatý komplex, je anorganická látka, využívaná velmi často jako cytostatikum k léčbě nádorových onemocnění. Konkrétně nachází uplatnění při léčbě močového měchýře, hlavy, krku, plic, vaječnicků a varlat. Mechanismus jejího účinku spočívá v navázání na purinové báze řetězce DNA,

s kterými vytvoří kovalentní vazbu. Po vytvoření kovalentní vazby dochází k tvorbě „*cross-linků*“ mezi jednotlivými řetězci DNA nebo dokonce i vně jednoho řetězce, což následně vede k zastavení replikace, jelikož není možné oddělit řetězec DNA. Ze stejného důvodu je buňce znemožněna i transkripce. Poškozením DNA v nádorových buňkách může dojít až k zastavení buněčného cyklu, což může způsobit apoptózu aktivací proteinu p53 [79].

Nevýhodou při léčbě cisplatinou je její toxické působení na organismus. Vysoké dávky cisplatiny mohou vést k oxidačnímu stresu vzniklému pravděpodobně z vyčerpání glutathionu, což je jeden z nejdůležitějších antioxidantů v těle. Tento problém se může projevit jako hepatotoxicita, tedy poškození jater způsobené chemickým činidlem. Podobně může cisplatina také indukovat nefrotoxicitu. Ledviny totiž akumulují cisplatinu ve větší míře než ostatní orgány a také je hlavní cestou jejího vylučování. To dokládá fakt, že koncentrace cisplatiny je v proximálních tubulárních epitelálních buňkách přibližně pětikrát větší než v séru. Při zvýšené koncentraci cisplatiny dochází také k inhibici syntézy karnitinu a k jeho zvýšené absorpci proximálním tubulem nefronu, což je způsobeno právě sníženou produkcí karnitinu. Nedostatek karnitinu může být problematický při tvorbě energie v mitochondriích, jelikož se účastní transportu mastných kyselin z cytosolu do mitochondrie během beta-oxidace mastných kyselin [79,80]. Mezi další orgány toxicky postižené cisplatinou můžeme zařadit srdce, zažívací trakt, nebo je také používání cisplatiny spojováno s nedoslýchavostí [81].

Pozitivní vliv cisplatiny byl prokázán při léčbě nádorového onemocnění tlustého střeva. K vyhodnocení byl použit kometový test, kdy byl test analyzován pomocí vizuálního hodnocení komet a pomocí % DNA v ohonu. Koncentrace cisplatin 1 μM vedla u buněk LoVo, HCT-15, HCT-116 a HT55 ke snížené fragmentaci DNA než u buněk kontrolních bez ošetření cisplatinou viz tab. 1 [82].

Tab. 1: Vliv 1 μM cisplatiny na nádorové buňky tlustého střeva. SD = směrodatná odchylka (upraveno) [82].

typ buněk	kontrola (SD)	cisplatina [1 μM] (SD)
LoVo	17,45 (\pm 4,12)	11,72 (\pm 2,29)
HCT-15	21,42 (\pm 4,05)	7,65 (\pm 1,83)
HCT-116	15,08 (\pm 3,27)	8,51 (\pm 1,88)
HT55	17,82 (\pm 2,75)	9,39 (\pm 1,51)

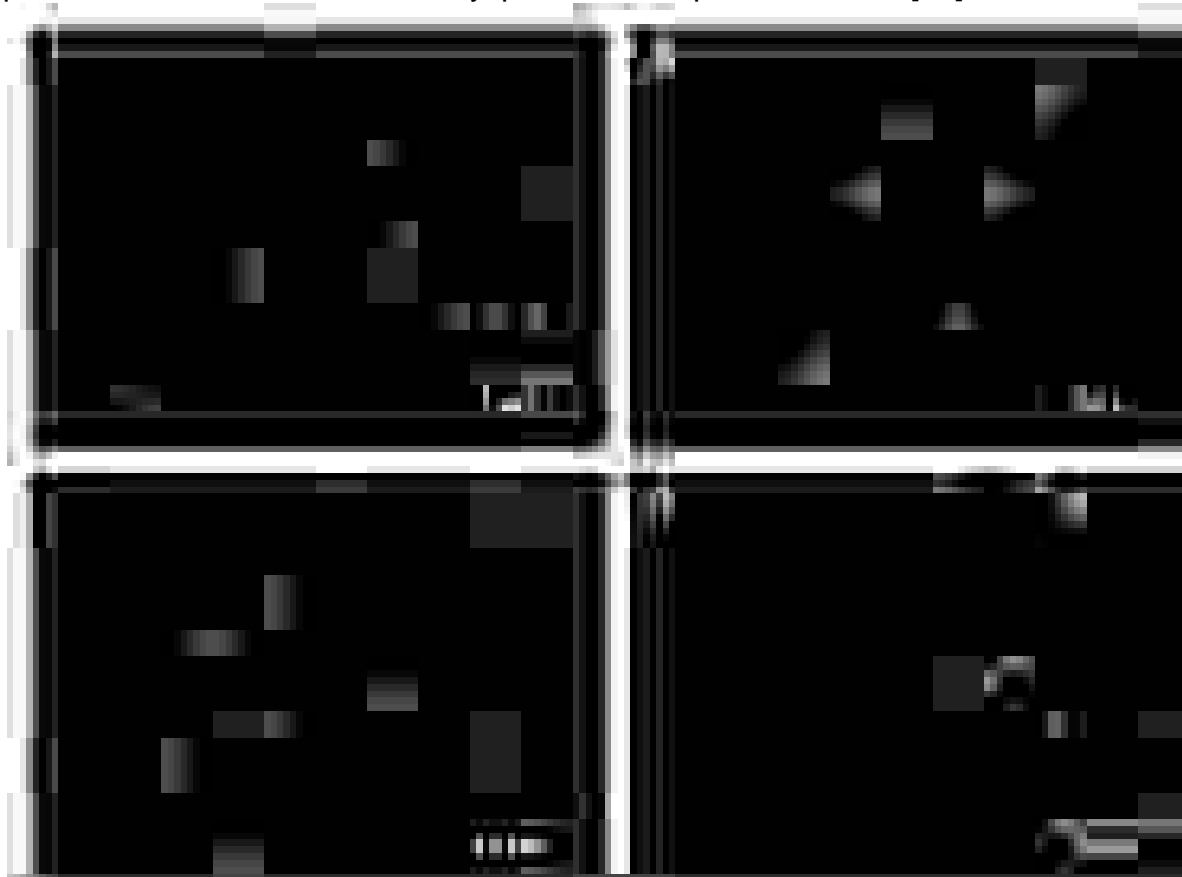
Cytotoxické působení cisplatiny bylo prokázáno již od koncentrace 8 μM , kdy oproti kontrolním buňkám značně klesá viabilita zkoumaných buněk PC12. Nicméně při zkoumání cytotoxicity pomocí kometového testu byly pozorovány menší komety a nižší množství DNA v ohonu. To je pravděpodobně způsobeno sníženou migrací DNA, jelikož cisplatina vytváří s jednotlivými řetězci DNA „cross-linky“ [83].

1.6.3 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je čirá kapalina mající silné oxidační i redukční vlastnosti. Velmi často se využívá jako dezinfekce ve formě 3% vodného roztoku. Je poměrně stálý, nicméně v přítomnosti některých látek, například platiny, stříbra nebo železa se poměrně rychle rozkládá [84]. Reakce peroxidu vodíku s dvojmocným železem je známá jako Fentonova reakce, kdy kromě trojmocného železa vzniká také velmi reaktivní a toxický hydroxylový radikál [85]. Z tohoto důvodu můžeme peroxid vodíku zařadit mezi reaktivní sloučeniny kyslíku („reactive oxygen species“, ROS). Hydroxylový radikál, vznikající také při ionizujícím záření, patří mezi nejreaktivnější formy kyslíku. Vyznačuje se okamžitou reakcí s okolními biomolekulami, z nichž odnímá elektron. Má také schopnost hydroxylovat purinové a pyrimidinové báze v nukleových kyselinách, čímž poškozuje zápis genetické informace [86].

Schopnost peroxidu vodíku produkovat poškození DNA díky oxidačnímu stresu zařadila tuto látku mezi látky vyvolávající senescenci. Buněčná senescence vyvolaná pomocí oxidačního stresu se ukázala jako výborný *in vitro* model pro zkoumání stárnutí buněk. Kromě peroxidu vodíku se využívá pro indukci senescence ultrafialové záření, *tert*-butylhydroperoxid nebo nadbytek kyslíku, z nichž nejvíce používaný je právě peroxid vodíku [87].

Pomocí kometového testu byl potvrzen genotoxický efekt peroxidu vodíku. Například na buňkách HepG2 významně roste poškození DNA se vzrůstající koncentrací peroxidu vodíku. Po 24 hodinové inkubaci nicméně dochází k opravě poškozené DNA viz obr. 7, kde byl použit 50 μM peroxid vodíku [88].



Obr. 7: Vliv doby inkubace peroxidu vodíku na poškození DNA u buněk HepG2, vyhodnoceno pomocí kometového testu. A – kontrolní buňky, B – buňky ovlivněny 5 min, C – buňky ovlivněny 1 hodinu, D – buňky ovlivněny 24 hodin. Buňky byly ovlivněny 50 μM peroxidem vodíku. Delší komety reprezentují větší poškození (upraveno) [88].

2. CÍLE PRÁCE

Obsah diplomové práce je zaměřen na detekci fragmentace DNA indukované toxiny metodou kometové analýzy. V první části se práce zabývá optimalizací metody kometové analýzy. Optimalizovaná metoda je následně aplikována na vybrané buněčné linie a toxiny.

1. Optimalizace kometového testu pro analýzu DNA fragmentace

Zavedení a optimalizace kometového testu na buněčné linii A549 ovlivněných toxinem t-BHP.

2. Použití optimalizovaného kometového testu ke studiu DNA fragmentace indukované modelovými toxiny

Aplikace optimalizovaného kometového testu na různé buněčné linie inkubované s t-BHP, melaninem, cisplatinou, nanočásticemi Al_2O_3 α , nanočásticemi a nanovláknky TiO_2 .

3. Ke studiu DNA fragmentace využít suspenzní a adherentní buněčné linie

Ke studiu DNA fragmentace byly využity buněčné linie A549, HK-2, SH-SY5Y a MG-63.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií

Agaróza GTQ (ROTH, SRN)

Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu\text{S}$)

Dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}_2$; $M_r = 372,24$; Sigma Aldrich, USA)

Fosfátový pufr podle Dulbecca, DPBS 10x (Molecular Probes, USA)

Hoechst 33258 ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O} \cdot 3\text{HCl} \cdot x\text{H}_2\text{O}$; $M_r = 533,88$; Sigma Aldrich, USA)

Hydroxid sodný pecky (NaOH; $M_r = 40,0$; Penta, ČR)

Chlorid sodný (NaCl; $M_r = 58,44$; Sigma Aldrich, USA)

Kyselina chlorovodíková 35% (HCl; $M_r = 36,46$; Penta, ČR)

Nízkotuhnoucí agaróza LMP (Sigma Aldrich, USA)

Tris base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; $M_r = 121,14$; Sigma Aldrich, USA)

Triton TM X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$; $M_r = 647$; Sigma Aldrich, USA)

Vysokotuhnoucí agaróza HMP (Sigma Aldrich, USA)

3.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Elektroforetická vana (Owl Separation Systems, USA)

Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, JAP)

Inkubátor s třepačkou (Grant Instruments, UK)

Krycí sklíčka (Hirschmann, ČR)

Laboratorní sklo (baňky, kádinky) (Simax, Fisherbrand; ČR, UK)

Lednice s mrazákem (-20 °C) (Liebherr, ČR)

Magnetická míchačka (Heidolph, SRN)

Magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)

Mikrocentrifuga (Hettich, ČR)

Mikrovlnná trouba (LG, Jižní Korea)

pH metr (inoLab, SRN)

Pipety Finnpiquette (Thermo Scientific, Finsko)

Podložní sklíčka (Hirschmann, ČR)

Špičky na pipety (Thermo Scientific, Finsko)

Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN, IKA Sweden)

Vodní lázeň (Major Science, USA)

Zdroj napětí (Major science, USA)

Software: Microsoft Office (Word, Excel), Nikon NIS-Elements, CometScore 2.0, PhotoFiltre 7

3.3 Příprava roztoků

Pracovní roztok DPBS (ředěno 10x)

Koncentrovaný roztok DPBS jsme ředili v poměru 1:10, např. bylo pipetováno 2 ml DPBS do 18 ml deionizované vody.

Gel klasické agarózy (c = 1 %)

Gel klasické agarózy jsme připravili rozvařením 1 g agarózy GTQ ve 100 ml deionizované vody v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut.

Gel HMP agarózy (c = 1 %)

Gel HMP agarózy jsme připravili rozpuštěním 0,04 g HMP agarózy ve 4 ml PBS na vodní lázni při 90 °C.

Gel LMP agarózy (c = 1 %)

Gel LMP agarózy jsme připravili rozpuštěním 0,04 g LMP agarózy ve 4 ml PBS na vodní lázni při 70 °C. Pro vytemperování gelu LMP agarózy na 37 °C jsme využili inkubátor.

Pracovní roztok NaOH (c = 4 M)

Pracovní roztok jsme připravili rozpuštěním 16 g NaOH ve 100 ml deionizované vody.

Zásobní pufr pro lyzi buněk

Zásobní pufr jsme připravili rozpuštěním navážky 73,05 g NaCl (2,5 M); 18,612 g Na₂EDTA (0,1 M) a 0,605 g Tris base v 500 ml deionizované vody. pH pufru jsme upravili na pH = 10,1 pomocí NaOH (4 M) a pufr byl skladován při 4 °C v lednici.

Pracovní pufr pro lyzi buněk

Pro přípravu pracovního pufru jsme pipetovali 600 µl Tritonu X-100 do 59,4 ml zásobního lyzačního pufru.

Zásobní pufr pro alkalické rozplétání a elektroforézu

Zásobní pufr jsme připravili rozpuštěním 6 g NaOH (0,3 M) a 0,186 g Na₂EDTA (1 mM) v 500 ml deionizované vody. Pufr byl skladován při 4 °C v lednici.

Zásobní pufr pro neutralizaci

Zásobní pufr jsme připravili rozpuštěním 24,228 g Tris base (0,4 M) v 500 ml deionizované vody. pH pufru jsme upravili na pH = 7,5 pomocí 35% HCl a pufr byl skladován při 4 °C v lednici.

Pracovní roztok pro barvení DNA (ředěno 1000x)

Pro přípravu pracovní roztoku pro barvení jsme přidali 1 µl Hoechst 33258 do 1 ml deionizované vody.

3.4 Postup kometového testu

Pro provedení kometového testu jsme využili publikovaný protokol [37], který jsme upravili a optimalizovali pro použití na našem pracovišti.

3.4.1 Příprava sklíček a lyze buněk

Rozvařenou agarózu GTQ jsme nalili do kádinky a umístili do ní podložní sklíčka. Přibližně po 1 minutě jsme sklíčka vyndali z kádinky a z jedné strany otřeli buničinou a nechali zaschnout první vrstvu agarózy.

Po zaschnutí první vrstvy agarózy GTQ jsme aplikovali na tuto vrstvu 100 μ l rozvařené HMP agarózy a ihned zakryli krycím sklíčkem.

Po zaschnutí druhé vrstvy HMP agarózy jsme stáhli krycí sklíčka. Poté jsme rozvařili LMP agarózu, kterou jsme následně vytemperovali (37 °C) a smíchali s buňkami tak, aby na jednom sklíčku bylo přibližně 50 tisíc buněk. Směs LMP agarózy s buňkami jsme aplikovali na druhou vrstvu agarózy a ihned zakryli krycím sklíčkem.

Po zaschnutí LMP agarózy s buňkami jsme podložní sklíčka umístili na 1 hodinu do vychlazeného (4 °C) lyzačního pufru.

3.4.2 Doba alkalického rozplétání, elektroforéza a neutralizace

V rámci optimalizace doby alkalického rozplétání jsme testovali ponoření sklíček do alkalického pufru po dobu 20, 40 a 60 minut a následně jsme provedli 30minutovou elektroforézu. Pro testování jsme využili buňky A549 s/bez 500 μ M t-BHP.

Po alkalickém rozplétání jsme provedli elektroforézu. Pro optimalizaci doby elektroforézy jsme testovali časy 10, 30 a 50 minut při elektrickém napětí 25 V a elektrickém proudu 300 mA. K testování jsme využili buňky A549 s/bez 500 μ M t-BHP.

Po elektroforéze jsme sklíčka umístili do neutralizačního pufru. Celkem jsme sklíčka promyli v neutralizačním pufru 3x po 5 minutách. Po posledním promytí v neutralizačním pufru jsme sklíčka umístili na 5 minut do deionizované vody a po vyjmutí, jsme sklíčka nechali oschnout.

3.4.3 Barvení buněk a vyhodnocení komet

K obarvení buněk jsme použili pracovní roztok Hoechst 33258 pro barvení DNA. Pipetovali jsme 150 μl tohoto roztoku na jedno sklíčko. Po aplikaci tohoto roztoku jsme umístili sklíčka na 10 minut do inkubátoru, který byl vyhřátý na 37 °C. Po inkubaci jsme sklíčka promyli 300 μl pracovního roztoku DPBS.

Po dokončení pracovního postupu jsme k detekci fragmentace DNA použili fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i. Pro analýzu snímků pořízených mikroskopem jsme využili program CometScore 2.0.

3.4.4 Vliv zamrazení buněk

Vliv zamrazení buněk na poškození DNA byl testován na buněčné linii HK-2 s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM). Pro testování jsme zvolili buňky bez zamrazení a následně jsme použili buňky, které byly zamrazeny 1, 2 a 7 dní.

3.5 Použití optimalizované kometové analýzy

3.5.1 Analýza buněčných linií s toxiny

Optimalizovaný kometový test jsme také aplikovali na porovnání vlivu toxinu t-BHP (100, 500, 1000 μM) na buněčné linie HK-2 a SH-SY5Y a k analýze vlivu melaninu (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$) na buňky SH-SY5Y. Na buněčné linii HK-2 jsme také testovali účinky cisplatiny (25, 50, 100 μM).

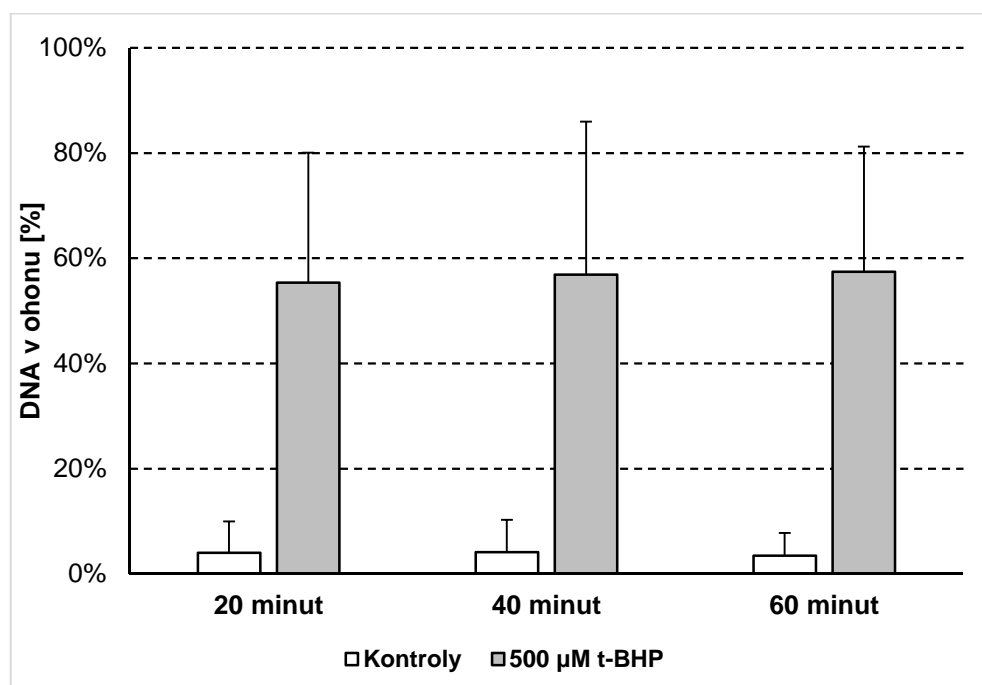
Pomocí optimalizovaného kometového testu jsme dále zkoumali vliv nanočástic a nanovláken TiO_2 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) na buňky A549. Použili jsme nanočástice TiO_2 P25 a nanovláčka TiO_2 . Pro porovnání jsme také testovali nanovláčka Al_2O_3 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$).

4. VÝSLEDKY

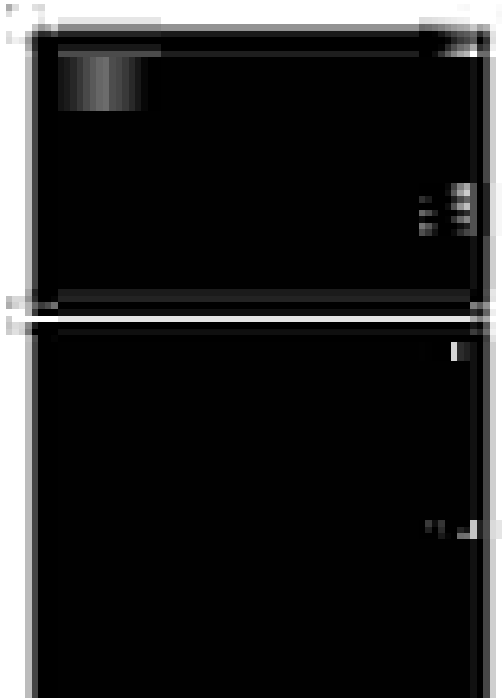
4.1 Optimalizace postupu kometové analýzy

4.1.1 Optimalizace doby rozplétání

Pro optimalizaci doby rozplétání jsme využili buňky A549 inkubované s/bez t-BHP (500 μ M; 30 minut). Dobu rozplétání jsme zvolili 20, 40 a 60 minut (graf 1, obr. 8). Z výsledků je patrné, že mezi námi zvolenými časy rozplétání, při kterých jsou sklíčka ponořená v alkalickém pufru, nedochází k významné změně procentuálního zastoupení DNA v ohonu, tedy ke změně rozplétání poškozené DNA. Pro další práci jsme zvolili dobu rozplétání 40 minut.



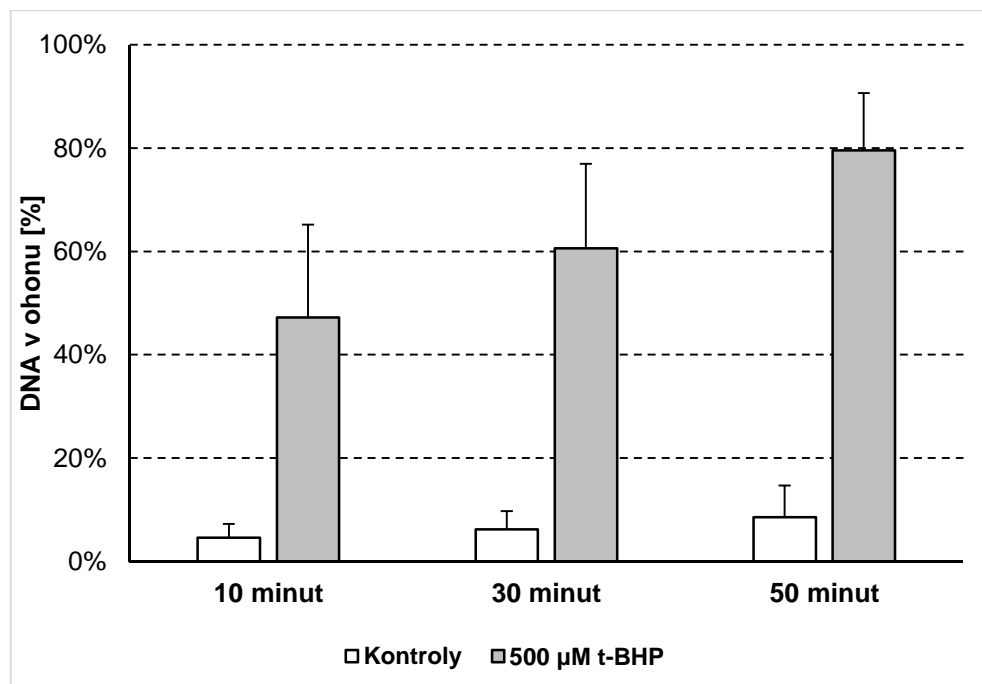
Graf 1: Vliv doby rozplétání na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez t-BHP (500 μ M; 30 min). Poté byly analyzovány Kometovou metodou (doba rozplétání: 20; 40; 60 min; elektroforéza: 30 min). Průměr \pm SD (počet nezávislých pokusů, $n = 2$; počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$).



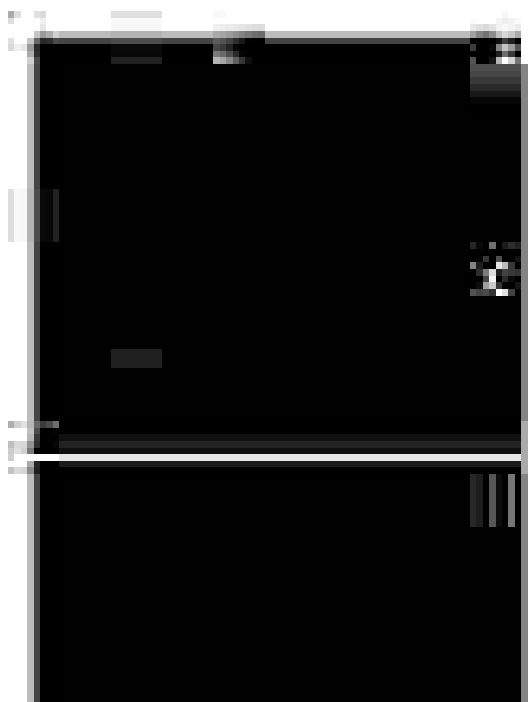
Obr. 8: Vliv doby rozplétání na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez t-BHP (500 μ M; 30 min). A – kontrolní buňka, B – 20 minut rozplétání, C – 40 minut rozplétání, D – 60 minut rozplétání.

4.1.2 Optimalizace doby elektroforézy

K optimalizaci doby elektroforézy jsme využili buňky A549 po 40minutovém rozplétání. Byly použity buňky inkubované s/bez t-BHP (500 μ M; 30 minut). Doba elektroforézy byla zvolena na 10, 30 a 50 minut (graf 2, obr. 9). Z výsledků je patrné, že při zvyšující se době elektroforézy dochází také ke zvýšení procentuálního zastoupení DNA v ohonu. To je pravděpodobně způsobeno možností větší doby migrace rozvolněné DNA. Pro další práci jsme zvolili dobu elektroforézy 30 minut při elektrickém napětí 25 V a elektrickém proudu 300 mA.



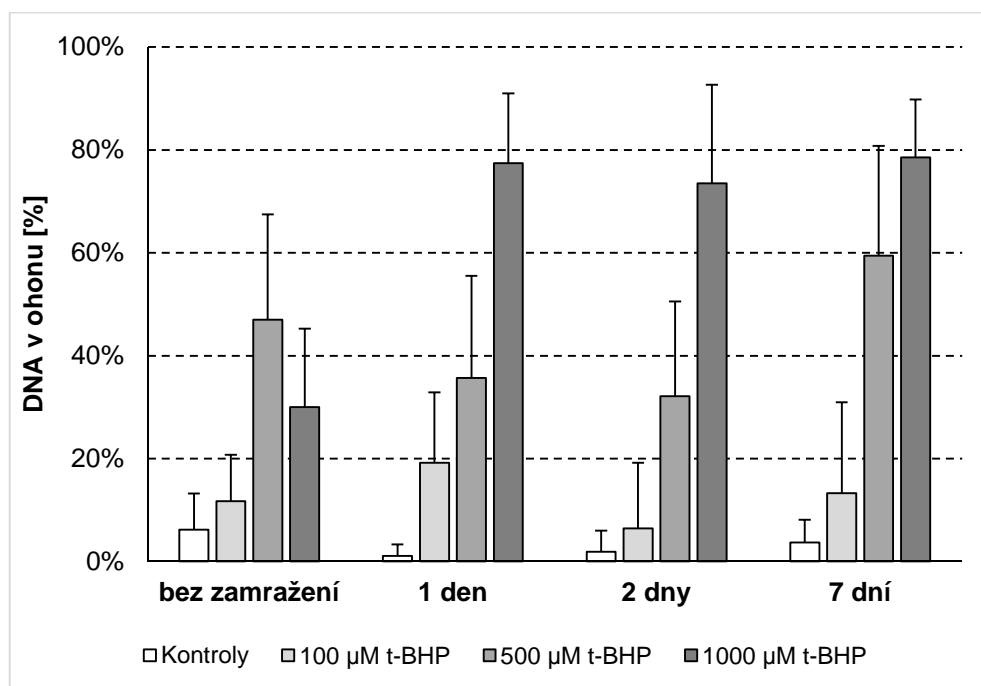
Graf 2: Vliv doby elektroforézy na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez *t*-BHP (500 µM; 30 min). Poté byly analyzovány Kometovou metodou (doba rozplétání: 40 min; elektroforéza: 10; 30; 50 min). Průměr ± SD (počet nezávislých pokusů, $n = 2$; počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$).



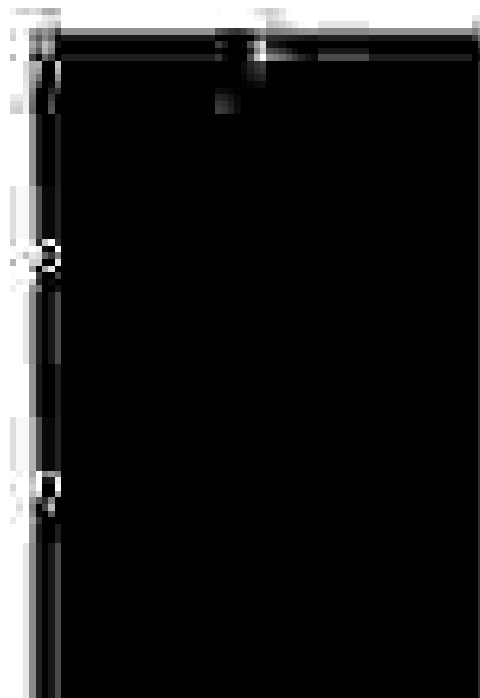
Obr. 9: Vliv doby elektroforézy na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez *t*-BHP (500 µM; 30 min). A – kontrolní buňka, B – 10 minut elektroforéza, C – 30 minut elektroforéza, D – 50 minut elektroforéza.

4.1.3 Vliv zamrazení buněk

Pro opakovanou práci s buněčnými liniemi jsme testovali vliv zamrazení buněk na detekované poškození, vyjádřený jako % DNA v ohonu komet. Pro testování jsme využili buňky HK-2 inkubované s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM ; 30 minut). Testované délky zamrazení buněk jsme zvolili 1, 2, 7 dní a bez zamrazení, což ukazuje graf 3 a obr. 9 a 10. 50minutovou elektroforézu jsme aplikovali na buňky, které jsme analyzovali bez zamrazení. Takto zvolená doba elektroforézy nebyla vhodná z důvodu vysoké migrace DNA a následného špatného vyhodnocení komet. Proto jsme se rozhodli na buňky zamrazené 1, 2 a 7 dní aplikovat 30minutovou elektroforézu. Z uvedených výsledků se dá předpokládat, že zamrazení buněk nemá signifikantní vliv na poškození buněk.

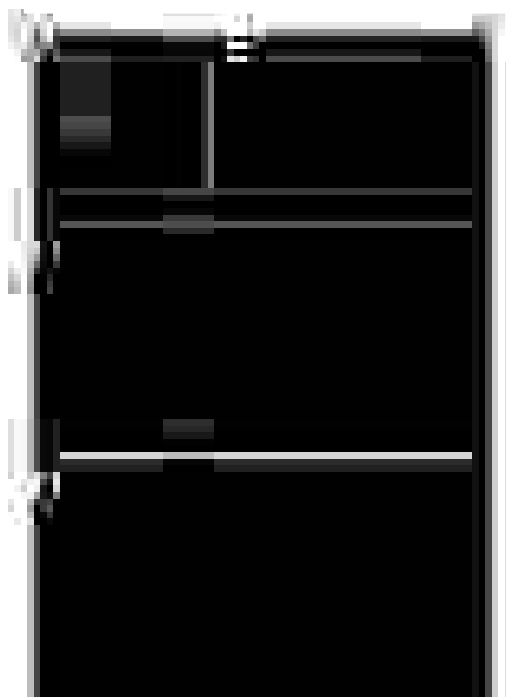


Graf 3: Vliv zamrazení na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM ; 30 min). Poté byly analyzovány Kometovou metodou (bez zamrazení – doba rozplétání: 40 min; elektroforéza: 50 min; 1,2,7 dní zamrazení – doba rozplétání: 40 min; elektroforéza: 30 min). Počet analyzovaných buněk, $n = 30\text{--}35$).



Obr. 9: Vliv zamrazení na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM; 30 min). Bez zamrazení – elektroforéza: 50 min; A – kontrolní buňka, B – 100 μM t-BHP, C – 500 μM t-BHP, D – 1000 μM t-BHP.

Obr. 10: Vliv zamrazení na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM; 30 min). Zamrazení 1 den – elektroforéza: 30 min; A – kontrolní buňka, B – 100 μM t-BHP, C – 500 μM t-BHP, D – 1000 μM t-BHP.



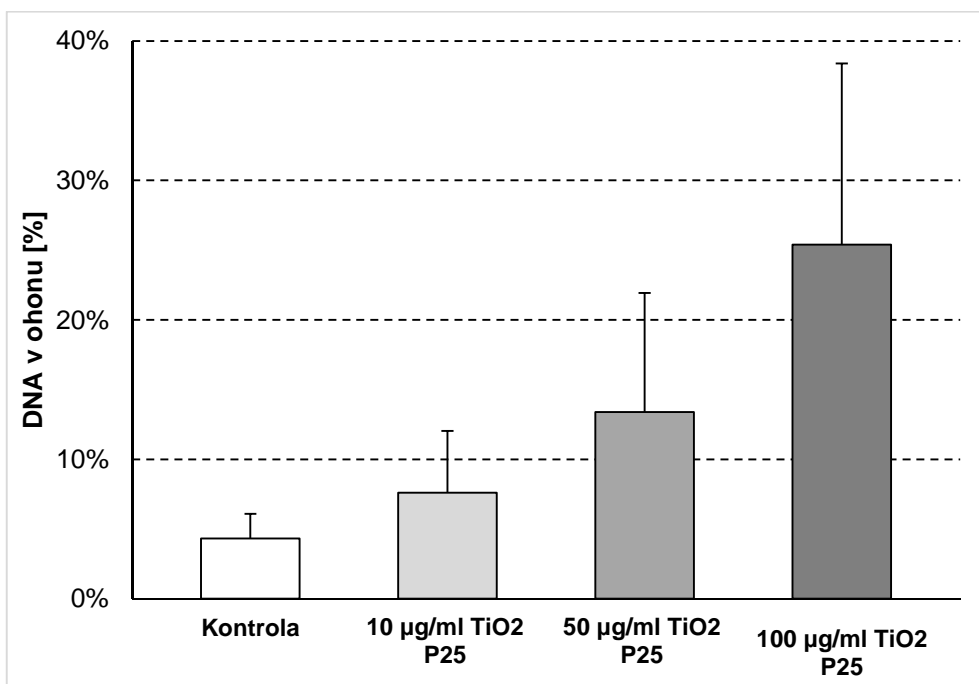
4.2 Použití optimalizované kometové analýzy

Při použití optimalizovaného kometového testu pro detekci poškození buněk u vybraných toxinů byla použita doba rozplétání 40 minut a elektroforéza 30 minut při 25 V a 300 mA. Na jedno sklíčko bylo nanášeno 50 tisíc buněk a analyzováno bylo vždy cca 30 buněk.

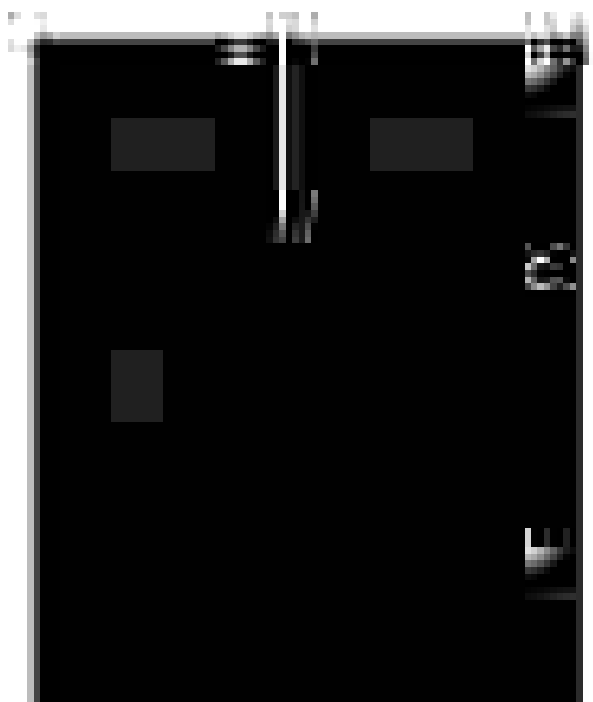
4.2.1 Vliv nanočástic a nanovláken TiO₂ na buňky A549

Optimalizovanou kometovou analýzu jsme využili pro testování toxicity nanočástic a nanovláken TiO₂. K testování byly použity buňky A549 inkubované s/bez nanočástic TiO₂ (10, 50, 100 µg/ml; 24 hodin) zobrazené na grafu 4 a obr. 11. Dále buňky A549 inkubované s/bez nanovláken TiO₂ (10, 50, 100 µg/ml; 24 hodin), což ukazuje graf 5 a obr. 12. Z obou grafů je patrné, že se zvyšující se koncentrací nanočástic a nanovláken TiO₂ se zvyšuje také poškození DNA, vyjádřeno jako %

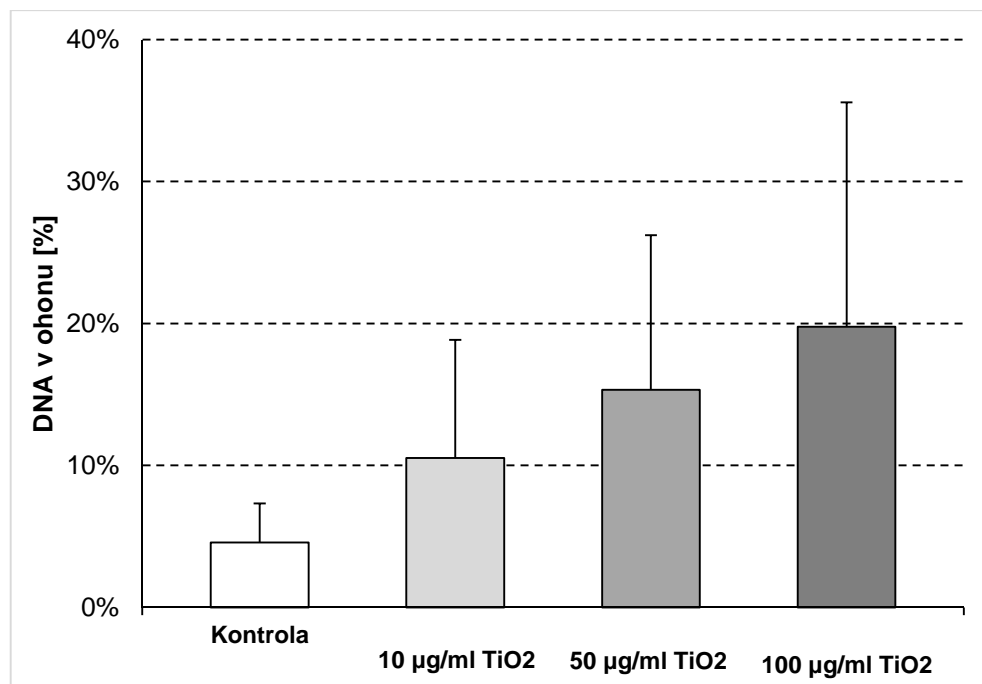
DNA v ohonu. Výsledky také ukazují, že vliv nanočástic a nanovláken TiO_2 na buňky A549 vykazuje podobné poškození DNA.



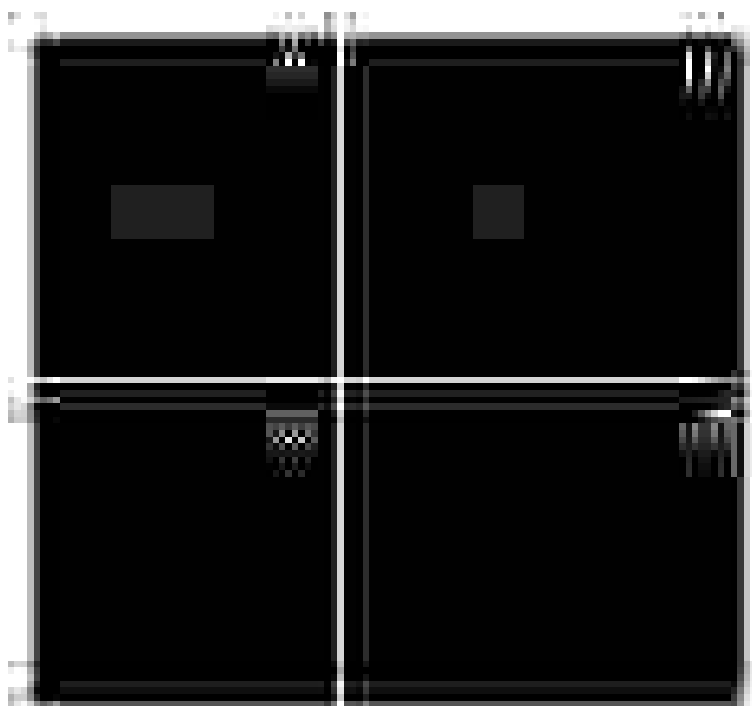
Graf 4: Vliv nanočástic TiO_2 P25 na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez TiO_2 P25 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$.



Obr. 11: Vliv nanočástic TiO_2 P25 na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez TiO_2 P25 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). A – kontrolní buňka, B – 10 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 P25, C – 50 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 P25, D – 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 P25.



Graf 5: Vliv nanovláken TiO_2 na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez nanovláken TiO_2 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30\text{--}35$.

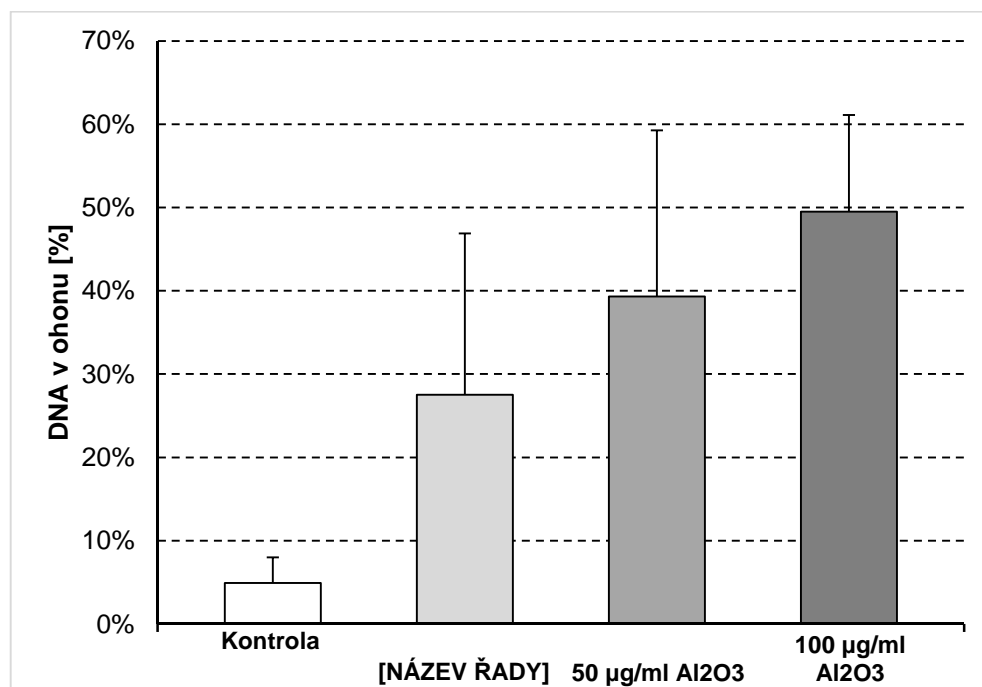


Obr. 12: Vliv nanovláken TiO_2 na % DNA v ohonu. Buňky A549 byly inkubovány s/bez nanovláken TiO_2 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). A – kontrolní buňka, B – 10 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , C – 50 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 , D – 100 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 .

4.2.2 Vliv nanočástic Al_2O_3 na buňky MG-63

Pro porovnání vlivu nanočástic jsme také aplikovali k buňkám MG-63 nanočástice Al_2O_3 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Výsledky z grafu 6 a obr. 13 ukazují, že se zvyšující se koncentrací nanovláken Al_2O_3 roste procentuální zastoupení DNA

v ohonu. Nicméně oproti výsledkům při testování vlivu nanočástic TiO_2 dosahuje poškození až trojnásobné úrovně.



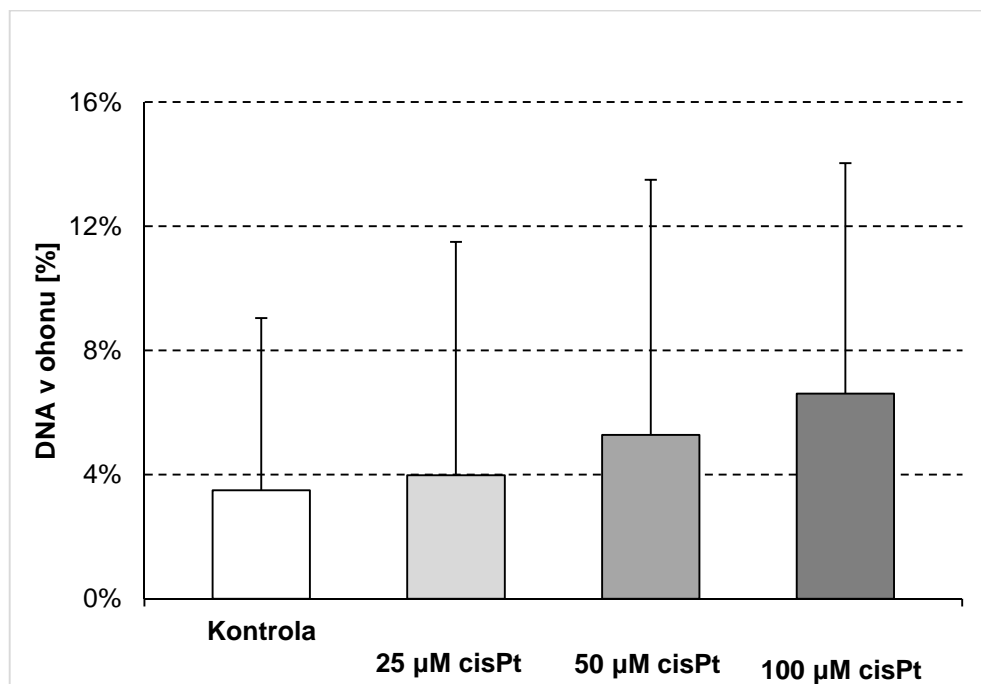
Graf 6: Vliv nanočástic Al_2O_3 na % DNA v ohonu. Buňky MG-63 byly inkubovány s/bez Al_2O_3 (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 24 hodin). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30\text{--}35$.



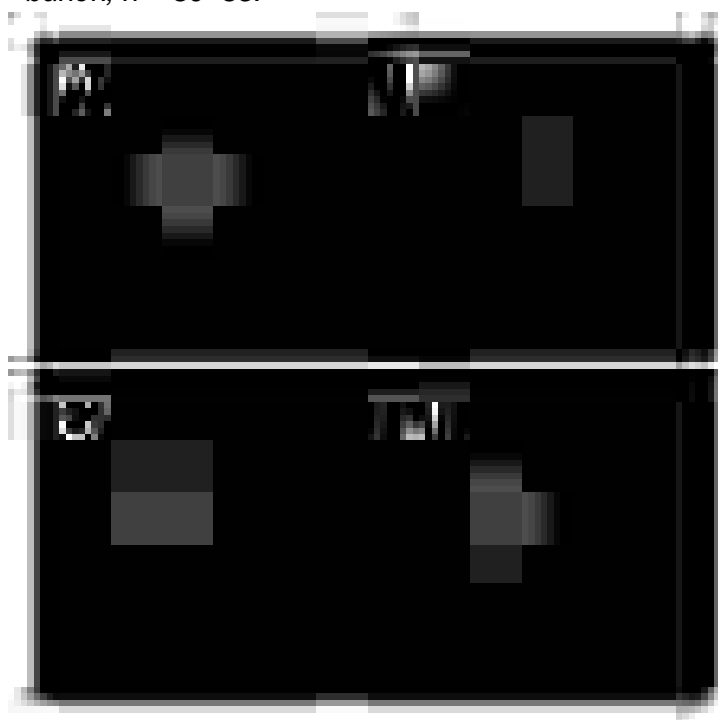
Obr. 13: Vliv nanočástic Al_2O_3 na % DNA v ohonu. Buňky MG-63 byly inkubovány s/bez Al_2O_3 (10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 24 hodin). A – kontrolní buňka, B – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Al_2O_3 , C – 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Al_2O_3 , D – 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Al_2O_3 .

4.2.3 Vliv cisplatiny na buňky HK-2

Optimalizovanou kometovou analýzu jsme využili také pro testování vlivu cisplatiny na buňky HK-2. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez cisplatiny (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Výsledky v grafu 7 a obr. 14 nenaznačují signifikantní změny v nárůstu procent DNA v ohonu komety.



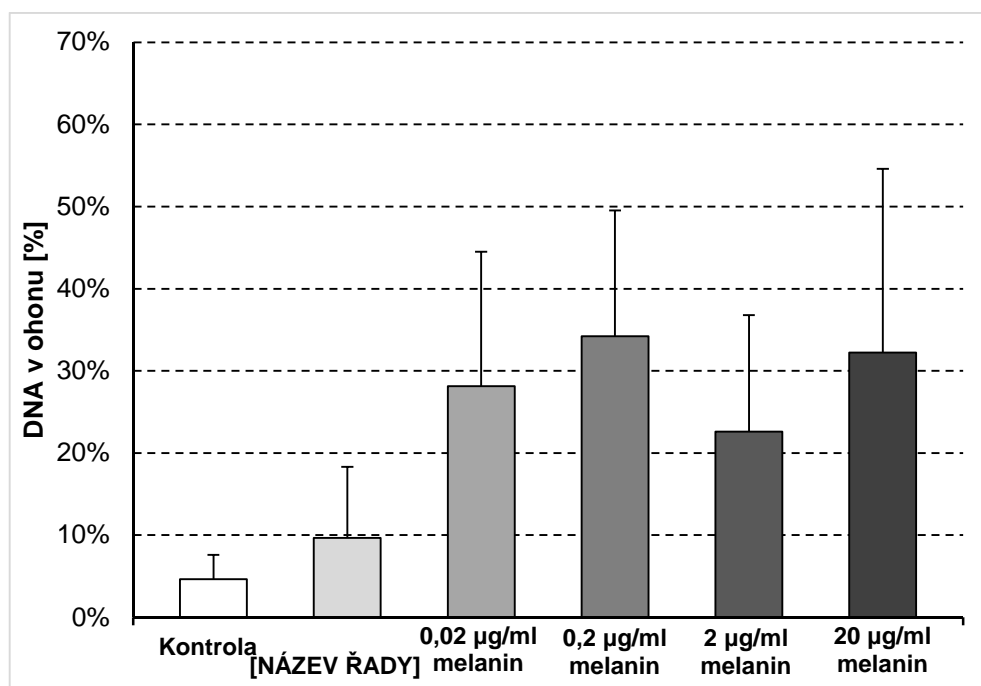
Graf 7: Vliv cisplatiny na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez cisplatiny (10, 50, 100 μM ; 24 hodin). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$.



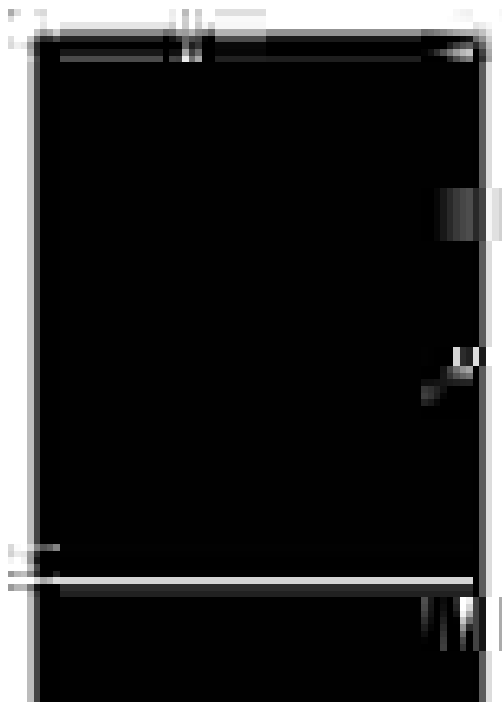
Obr. 14: Vliv cisplatiny na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez cisplatiny (10, 50, 100 μM ; 24 hodin). A – kontrolní buňka, B 10 μM cisplatin, C – 50 μM cisplatin, D – 100 μM cisplatin.

4.2.4 Vliv melaninu na buňky SH-SY5Y

Další testovanou látkou byl melanin. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s/bez melaninu (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin), což zobrazuje graf 8 a obr. 15, a poté analyzovány Kometovou metodou. Výsledky naznačují, že od koncentrace 0,02 $\mu\text{g/ml}$ melaninu dochází ke zvýšenému zastoupení DNA v ohonu komet. Při zvyšování koncentrace melaninu nadále nedochází k signifikantnímu nárůstu poškození DNA.



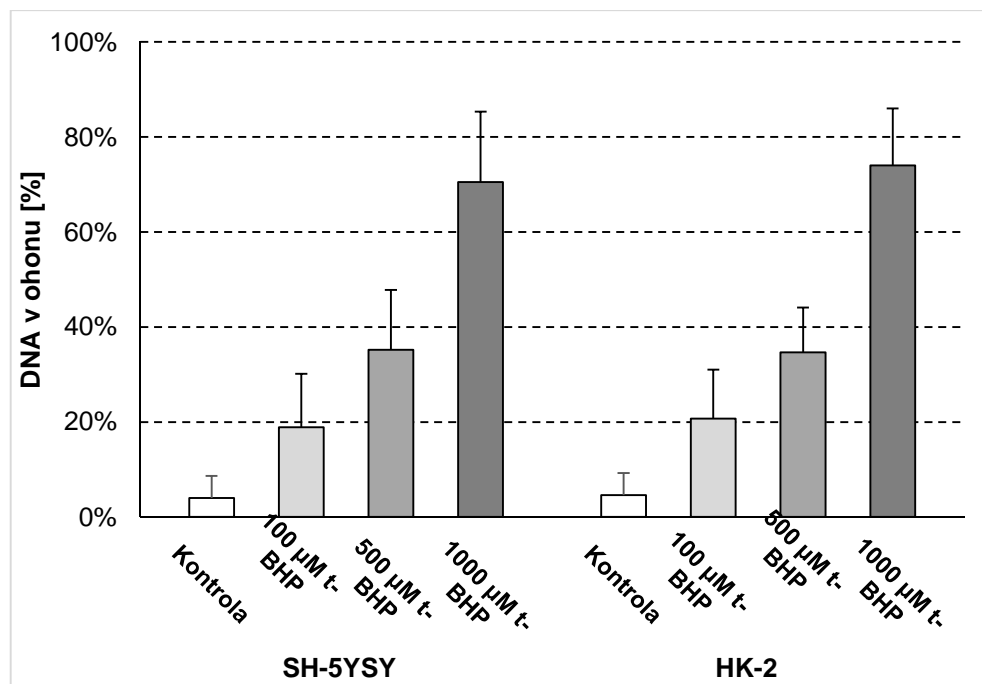
Graf 8: Vliv melaninu na % DNA v ohonu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s/bez melaninu (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$.



Obr. 15: Vliv melaninu na % DNA v ohonu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s/bez melaninu (0,002-20 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). A – kontrolní buňka, B 0,002 $\mu\text{g/ml}$ melaninu, C – 0,02 $\mu\text{g/ml}$ melaninu, D – 0,2 $\mu\text{g/ml}$ melaninu, E – 2 $\mu\text{g/ml}$ melaninu, F – 2 $\mu\text{g/ml}$ melaninu

4.2.5 Vliv účinky t-BHP na buňky SH-SY5Y a HK-2

Pro porovnání účinků t-BHP jsme využili buňky SH-SY5Y a HK-2. Oba druhy buněk byly inkubovány s/bez t-BHP (100; 500; 1000 μM ; 30 minut), což znázorňuje obr. 16 a 17. Při pohledu na graf 9 je patrné, že se zvyšující se koncentrací t-BHP roste také DNA v ohonu komety. Výsledky testu také ukazují, že t-BHP působí na poškození DNA u buněk SH-SY5Y a HK-2 podobně, jelikož výsledné procentuální zastoupení DNA v ohonu komet dosahuje přibližně stejných hodnot.

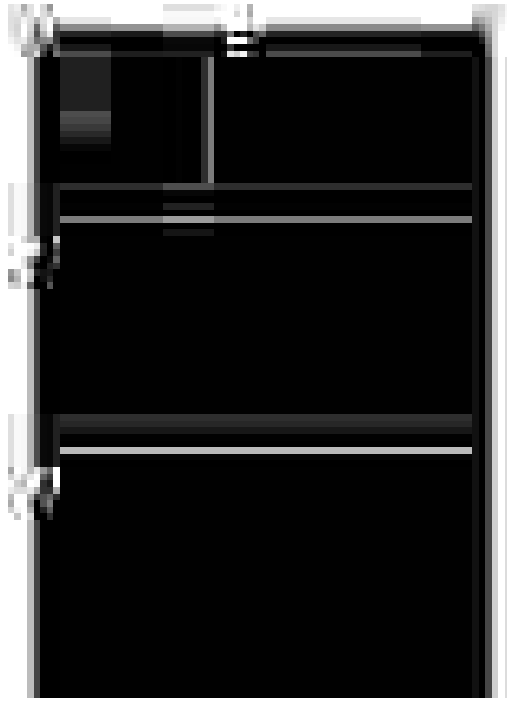


Graf 9: Porovnání účinku *t*-BHP na % DNA v ohonu. Buňky SH-SY5Y a HK-2 byly inkubovány s/bez *t*-BHP (100, 500, 1000 µM; 30 minut). Poté byly analyzovány Kometovou metodou. Počet analyzovaných buněk, $n = 30-35$.



Obr. 16: Porovnání účinku *t*-BHP na % DNA v ohonu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s/bez *t*-BHP (100, 500, 1000 µM; 30 minut). A – kontrolní buňka, B – 100 µM *t*-BHP, C – 500 µM *t*-BHP, D – 1000 µM *t*-BHP.

Obr. 17: Porovnání účinku *t*-BHP na % DNA v ohonu. Buňky HK-2 byly inkubovány s/bez *t*-BHP (100, 500, 1000 µM; 30 minut). A – kontrolní buňka, B – 100 µM *t*-BHP, C – 500 µM *t*-BHP, D – 1000 µM *t*-BHP.



5. DISKUZE

Cílem naší práce bylo zavést a optimalizovat kometový test pro detekci fragmentace DNA. K tomu jsme využili buněčnou linii A549 ovlivněnou t-BHP (500 μ M; 30 minut). Optimalizovaný kometový test jsme následně použili ke studiu DNA fragmentace na vybraných buněčných liniích, látkách a toxinech. Po provedení kometového testu jsme k detekci vzniklých komet využili fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i. Vzniklé komety byly následně analyzovány pomocí programu CometScore 2.0.

Při optimalizaci doby rozplétání jsme nechali sklíčka s buňkami ponořená v alkalickém roztoku po dobu 20, 40 a 60 minut. Při analyzování výsledků jsme nenašli žádné signifikantní rozdíly, které by byly viditelné mezi námi zvolenými časy. Při rešerši literatury jsme zjistili, že při použití alkalické verze kometového testu nechal například dr. Singh rozplétat DNA 20 minut při $\text{pH} \geq 13$ [37]. Stejný čas 20 minut použili pro alkalické rozplétání také ve studii Olive a kol. při $\text{pH} = 12,3$. [33] V naší práci jsme pro alkalické rozplétání zvolili čas 40 minut, i když z výsledku je patrné že mohl být čas zkrácen.

K optimalizaci doby elektroforézy jsme využili testovací časy 10, 30 a 50 minut při elektrickém napětí 25 V a elektrickém proudu 300 mA. Z výsledků je patrné, že při zvyšující se době elektroforézy dochází také ke zvýšení množství DNA v ohonu. Ve studii Singh a kol. [37] použili alkalickou verzi kometového testu Singh a kolektiv, kdy provedli 20minutovou elektroforézu při 25 V a 300 mA. V další publikaci dr. Singha byla použita elektroforéza trvající 1 hodinu při 12 V a 100 mA [31]. Dr. Tice se pozastavuje nad velkou variabilitou velikostí komerčně dostupných elektroforetických van, a proto navrhl používat pro značení napětí V/cm, což by mělo lépe definovat použité napětí vzhledem k velikosti elektroforetické vany. V jeho práci je také uvedeno, že nejčastěji se pohybuje napětí v rozmezí 0,7-1,0 V/cm při době 5-40 minut [28]. V další práci Olive a kol. použil napětí 0,6 V/cm po dobu 25 minut [33]. Z jednotlivých studií tedy vyplývá, že nejdůležitějšími faktory pro optimální průběh elektroforézy je stanovení času a napětí. S rostoucím časem elektroforézy by mělo klesat zvolené napětí, jelikož tyto faktory spolu přímo souvisí a určují míru migrace DNA [89]. Pro naše experimenty jsme jako optimální čas zvolili 30 minut při 25 V a 300 mA.

Zamrazení buněk jsme testovali pro průkaz negativního či pozitivního vlivu zamrazení na poškozenou DNA. Pro testování jsme využili buňky HK-2 inkubované s/bez t-BHP (100, 500, 1000 μM ; 30 minut). Testovací časy zamrazení jsme zvolili 1, 2, 7 dní a bez zamrazení. Při testování buněk bez zamrazení jsme použili 50minutovou elektroforézu, která nebyla vhodná z důvodu vysoké migrace DNA a následného špatného vyhodnocení komet. Proto jsme pro testování zamrazení 1, 2 a 7 dní zvolili kratší elektroforézu, tedy 30 minut. Výsledky ukazují, že námi zvolené časy zamrazení nemají významný vliv na procentuální zastoupení DNA v ohonu komety. Zajímavý experiment uvádí ve své práci Jackson a kol. [90], kdy testovali dobu zamrazení buněk A549 dokonce celý rok, a to opakovaně po dobu 10 let. V práci se uvádí, že každý den prováděli kometovou analýzu a výsledek vznikl jako průměr měření za celý rok. Buňky A549 byly inkubovány s/bez H_2O_2 (15, 30, 60 μM ; 30 minut) a následně zamrazeny při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Výsledky experimentu naznačují, že při dlouhodobém zamrazení buněk při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ je vliv na změnu zlomů v řetězci DNA minimální [90]. Tento výsledek by odpovídal i našemu měření, nutno podotknout, že při našem testování byly buňky zamrazeny při $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Vliv nanočástic a nanovláken TiO_2 jsme testovali na buňkách A549 inkubovaných s/bez nanočástic a nanovláken (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Při porovnání výsledků nanočástice a nanovláken TiO_2 vykazují podobné výsledky, kdy se vzrůstající koncentrací se zvyšuje také poškození DNA, vyjádřeno jako % DNA v ohonu komety. Jugan a kol. ve své studii [77], zkoumali také vliv nanočástic TiO_2 na buňky A549, nicméně nepoužívali typ nanočástic TiO_2 P25. Konkrétně testovali typ A12, A25, A140, R68 a R20. Z jejich výsledků lze obecně říci, že částice s průměrem menším než 100 nm vykazují vyšší poškození, než částice větší jak 100 nm. Tato práce také uvádí, že hlavním parametrem ovlivňujícím cytotoxický potenciál TiO_2 -NPs je spíše průměr částic než jejich krystalická struktura. Proto se nabízí porovnání námi zvoleného typu P25 a ve studii zkoumaného typu A25, při času inkubace 24 hodin a koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Srovnání ukazuje až trojnásobně vyšší procentuální zastoupení DNA v ohonu komety u buněk inkubovaných s námi zkoumaným typem P25. Po 48hodinové inkubaci nicméně dle výsledků této studie dochází k poklesu % DNA v ohonu, což značí opravu poškozené DNA [77].

Optimalizovanou metodu jsme také využili na buňkách MG-63 při hodnocení vlivu nanočástic Al_2O_3 . Buňky byly inkubovány s/bez nanočástic Al_2O_3 (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$; 24 hodin). Nanočástice Al_2O_3 vykazují větší poškození DNA oproti

nanočásticím TiO₂, dokonce až trojnásobně více, což může být způsobeno odlišnou buněčnou linií, anebo také rozdílnou velikostí nanočástic. Dr. Sliwinska a kol. ve své práci [91] také testovali účinek nanočástic Al₂O₃, nicméně na lymfocytech. Buňky byly inkubovány s/bez nanočástic Al₂O₃ (10-1000 μM; 24 hodin). Jejich výsledky také naznačují, že se zvyšující se koncentrací nanočástic Al₂O₃ roste procentuální zastoupení DNA v ocasu komet [91].

Toxicitu cisplatiny jsme testovali na buňkách HK-2, které byly inkubovány s/bez cisplatiny (10, 50, 100 μg/ml; 24 hodin). Výsledky nenaznačují signifikantní změny v procentuálním zastoupení DNA v ohonu komety s narůstající koncentrací cisplatiny. Tento výsledek by mohl značit, že cisplatina nepůsobí na buňky HK-2 toxicky. Nicméně ve studii Mendonça a kolektivu [83] viabilita zkoumaných buněk PC12 od koncentrace 8 μg/ml značně klesá oproti kontrolním buňkám, což negativní toxické působení nepotvrzuje. Ve stejné studii po provedení kometového testu byly pozorovány menší komety a nižší množství DNA v ohonu jako při našem testování. To je pravděpodobně způsobeno sníženou migrací DNA, jelikož cisplatina vytváří s jednotlivými řetězci DNA „*cross-linky*“ [83]. Snížená migrace DNA vyvolána cisplatinou a ostatními „*cross-linkers*“ byla prokázána také ve studii Pfuhrera a Wolfa [92] na leukocytech. Nižší množství DNA v ohonu komety bylo pozorováno po inkubaci s těmito látkami a při pozorování jader v mikroskopu se zdála být jádra kompaktnější [92].

Melanin je znám spíše pro své protektivní vlastnosti, které byly prokázány například ve studii dr. Hoogduijna a kol. [93] pomocí kometové metody. Buňky HaCaT inkubovali s/bez H₂O₂ (40, 100 μM; 15 minut) a zároveň druhou sadu buněk inkubovali navíc s melaninem (167 μg/mg proteinu). Buňky ošetřené H₂O₂ společně s melaninem vykazovaly nižší poškození DNA než buňky bez melaninu, což dokazuje jeho pozitivní účinky na DNA. Navíc ale také při porovnání kontrolních buněk inkubovaných s/bez melaninu bylo prokázáno větší poškození DNA u buněk s melaninem [93]. Toxicitu melaninu by potvrzovalo i naše měření, kdy jsme vliv melaninu testovali na buňkách SH-SY5Y inkubovaných s/bez melaninu (0,002-20 μg/ml; 24 hodin). Od koncentrace 0,02 μg/ml dochází k signifikantnímu nárůstu množství DNA v ohonu komety. Při dalším zvyšování koncentrace melaninu již ale nedochází k nárůstu procentuálního zastoupení DNA v ohonu komety.

Optimalizovanou kometovou metodu jsme aplikovali také při testování účinků t-BHP na buňky SH-SY5Y a HK-2. Oba typy buněk byly inkubovány s/bez t-BHP

(100, 500, 1000 μM ; 30 minut). Se zvyšující se koncentrací t-BHP roste také procentuální zastoupení DNA v ohonu komety, což platí pro obě buněčné linie. Rostoucí trend můžeme sledovat rovněž ve studii Slamenova a kol. [94], kde pracovali s koncentracemi t-BHP (35, 70, 115 μM ; 1 hodina) u buněk HepG2. V naší práci zvolená koncentrace 100 μM t-BHP vykazuje u obou buněčných linií přibližně 20% zastoupení DNA v ohonu komety. Při porovnání se 115 μM t-BHP ze studie Slamenova dosahuje DNA v ohonu téměř 40 %. Doba elektroforézy a napětí je shodná jako v naší práci, nicméně doba inkubace s toxinem je v dané studii dvojnásobná [94]. Poškození DNA indukované t-BHP také prokázali ve své studii Ramos a kol. [95]. Při testování látek snižujících toxicitu t-BHP prokázali, že při zvyšující se koncentraci t-BHP (100-1000 μM , 1 hodina) se zvyšuje také poškození DNA. Pro vyhodnocování výsledků nicméně použili vizuální hodnocení komet, proto lze výsledky s těmi našimi jen obtížně porovnat [95].

6. ZÁVĚR

V diplomové práci jsme zavedli a optimalizovali kometovou analýzu na buňkách A549. Následně jsme využili optimalizovanou kometovou metodu při studiu fragmentace DNA způsobené vybranými látkami a toxiny u různých buněčných linií. Vysoká citlivost metody byla prokázána například při hodnocení vlivu melaninu na buňkách SH-SY5Y, kdy již při velmi malých změnách koncentrací melaninu byl detekován nárůst procentuálního zastoupení DNA v ohonu komety. Další testované látky byly například nanočástice TiO_2 nebo také cisplatina, která ovšem nejspíše z důvodu snížené migrace DNA při elektroforéze neposkytla předpokládané výsledky. Jednoduchost metody, finanční nenáročnost a vysoká citlivost řadí kometovou analýzu mezi hojně využívané metody k měření fragmentace DNA.

7. ZDROJE

1. **J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie**, 'Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics', *British Journal of Cancer*, 26, (1972), p. 239–257.
2. **S. Elmore**, 'Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death', *Toxicologic Pathology*, 35, (2007), p. 495–516.
3. **S. Y. a Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, V. L. Gabai**, 'Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death?', *Experimental Cell Research*, 283, (2003), p. 1–16.
4. **F. H. Igney, P. H. Krammer**, 'Death and Anti-Death: Tumour Resistance to Apoptosis', *Nature Reviews. Cancer*, 2, (2002), p. 277–288.
5. **D. Martinvalet, P. Zhu, J. Lieberman**, 'Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis', *Immunity*, 22, (2005), p. 355–370.
6. **N. K. Rai, K. Tripathi, D. Sharma, et al**, 'Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing', *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4, (2005), p. 138–144.
7. **C. D. Bortner, N. B. Oldenburg, J. A. Cidlowski**, 'The Role of DNA Fragmentation in Apoptosis', *Trends in Cell Biology*, 5, (1995), p. 21–26.
8. **P. E. Carrington, C. Sandu, Y. Wei, et al**, 'The Structure of FADD and Its Mode of Interaction with Procaspase-8', *Molecular Cell*, 22, (2006), p. 599–610.
9. **L. P. Billen, A. Shamas-Din, D. W. Andrews**, 'Bid: A Bax-like BH3 Protein', *Oncogene*, 27, (2008), p. 93–104.
10. **S. Nagata**, 'Apoptotic DNA Fragmentation', *Experimental Cell Research*, 256, (2000), p. 12–18.
11. **S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane, et al**, 'Degradation of Chromosomal DNA during Apoptosis', *Cell Death and Differentiation*, 10, (2003), p. 108–116.

12. **H. Sakahira, M. Enari, S. Nagata**, 'Cleavage of CAD Inhibitor in CAD Activation and DNA Degradation during Apoptosis', *Nature*, 391, (1998), p. 96–99.
13. **S. Suman, A. Pandey, S. Chandna**, 'An Improved Non-Enzymatic "DNA Ladder Assay" for More Sensitive and Early Detection of Apoptosis', *Cytotechnology*, 64, (2012), p. 9–14.
14. **S. C. Tan, B. C. Yiap**, 'DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present', *BioMed Research International*, 1, (2009), p. 1–10.
15. **P. Majtnerová, T. Roušar**, 'An Overview of Apoptosis Assays Detecting DNA Fragmentation', *Molecular Biology Reports*, 45, (2018), p. 1469–1478.
16. **Y. R. Saadat, N. Saeidi, S. Z. Vahed, et al**, 'An Update to DNA Ladder Assay for Apoptosis Detection', *BiolImpacts*, 5, (2015), p. 25–28.
17. **K. Takaki, Y. Higuchi, C. Ogino, et al**, 'Induction of Apoptosis Associated with Chromosomal DNA Fragmentation and Caspase-3 Activation in Leukemia L1210 Cells by TiO₂ Nanoparticles', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, (2014), p. 129–133.
18. **J. P. Gong, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz**, 'A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry', *Analytical Biochemistry*, 218, (1994), p. 314–319.
19. 'Apoptóza detekce význam', [online], [3.1.2019], Dostupné z: <ustavpatologie.upol.cz/vyuka/molpatol/apoptoza.ppt>.
20. **E. A. Motea, A. J. Berdis**, 'Terminal Deoxynucleotidyl Transferase: The Story of a Misguided DNA Polymerase', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804, (2010), p. 1151–1166.
21. **K. Kyrylkova, S. Kyryachenko, M. Leid, et al**, 'Detection of Apoptosis by TUNEL Assay', *Methods in Molecular Biology*, 887, (2012), p. 41–47.
22. **Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson**, 'Identification of Programmed Cell Death in Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation', *The Journal of Cell Biology*, 119, (1992), p. 493–501.

23. **W. Gorczyca, F. Traganos, H. Jesionowska, et al**, 'Presence of DNA Strand Breaks and Increased Sensitivity of DNA in Situ to Denaturation in Abnormal Human Sperm Cells: Analogy to Apoptosis of Somatic Cells', *Experimental Cell Research*, 207, (1993), p. 202–205.
24. **F. D. Cuello-Carrión, D. R. Ciocca**, 'Improved Detection of Apoptotic Cells Using a Modified in Situ TUNEL Technique', *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 47, (1999), p. 837–839.
25. **X. Li, Z. Darzynkiewicz**, 'Labelling DNA Strand Breaks with BrdUTP. Detection of Apoptosis and Cell Proliferation', *Cell Proliferation*, 28, (1995), p. 571–579.
26. 'TUNEL Assay Principle', [online], [3.1.2019], Dostupné z: <<https://www.rndsystems.com/resources/technical/tunel-assay-principle>>.
27. **B. Grasl-Kraupp B. Ruttkay-Nedecky, H. Koudelka, et al**, 'In Situ Detection of Fragmented Dna (Tunel Assay) Fails to Discriminate among Apoptosis, Necrosis, and Autolytic Cell Death: A Cautionary Note', *Hepatology*, 21, (1995), p. 1465–1468.
28. **R. R. Tice**, 'Single Cell Gel/comet Assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing', *Environmental and molecular mutagenesis*, 35, (2000), p. 206–221.
29. **B. Rydberg, K. J. Johanson**, 'Estimation of DNA Strand Breaks in Single Mammalian Cells', *Academic Press*, (1978), p. 465–468.
30. **O. Ostling, K. J. Johanson**, 'Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, (1984), p. 291–298.
31. **N. P. Singh**, 'Microgel Electrophoresis of DNA from Individual Cells', *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, 1, (1996), p. 3–24.
32. **H. L. Karlsson**, 'The Comet Assay in Nanotoxicology Research', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, (2010), p. 651–666.

33. **P. L. Olive, J. P. Banáth**, 'The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells', *Nature Protocols*, 1, (2006), p. 23–29.
34. **W. U. Müller**, 'Comet Assay', *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*, (2007), p. 161–176.
35. **R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, et al**, 'The Single Cell Gel (SCG) Assay: An Electrophoretic Technique for the Detection of DNA Damage in Individual Cells', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283, (1991), p. 157–164.
36. **A. R. Collins**, 'The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations', *Molecular Biotechnology*, 26, (2004), p. 249–261.
37. **N. P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, et al**, 'A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells', *Experimental Cell Research*, 175, (1988), p. 184–191.
38. **V. J. McKelvey-Martin, M. H. Green, P. Schmezer, et al**, 'The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay): A European Review', *Mutation Research*, 288, (1993), p. 47–63.
39. **J. Portugal, M. J. Waring**, 'Assignment of DNA Binding Sites for 4',6-Diamidine-2-Phenylindole and Bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A Comparative Footprinting Study', *Biochimica et Biophysica Acta*, 949, (1988), p. 158–168.
40. **A. M. Haines, S. S Tobe, H. J. Kobus, et al**, 'Properties of Nucleic Acid Staining Dyes Used in Gel Electrophoresis', *Electrophoresis*, 36, (2015), p. 941–944.
41. **R. S. Tebbs, J. E. Cleaver, R. A. Pedersen, et al**, 'Modification of the Comet Assay for the Detection of DNA Strand Breaks in Extremely Small Tissue Samples', *Mutagenesis*, 14, (1999), p. 437–438.
42. **A. R. Collins, M. Ai-guo, S. J. Duthie**, 'The Kinetics of Repair of Oxidative DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Cells', *Mutation Research/DNA Repair*, 336, (1995), p. 69–77.

43. **K. Końca, A. Lankoff, A. Banasik, et al**, 'A Cross-Platform Public Domain PC Image-Analysis Program for the Comet Assay', *Mutation Research*, 534, (2003), p. 15–20.
44. **B. M. Gyori, G. Venkatachalam, P. S. Thiagarajan, et al**, 'OpenComet: An Automated Tool for Comet Assay Image Analysis', *Redox Biology*, 2, (2014), p. 457–465.
45. **A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, et al**, 'The Comet Assay: Topical Issues', *Mutagenesis*, 23, (2008), p. 143–151.
46. **N. Morley, A. Rapp, H. Dittmar, et al**, 'UVA-Induced Apoptosis Studied by the New Apo/necro-Comet-Assay Which Distinguishes Viable, Apoptotic and Necrotic Cells', *Mutagenesis*, 21, (2006), p. 105–114.
47. **N. P. Singh**, 'A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells', *Experimental Cell Research*, 256, (2000), p. 328–337.
48. **R. C. Wilkins, B. C. Kutzner, M. Truong, et al**, 'Analysis of Radiation-Induced Apoptosis in Human Lymphocytes: Flow Cytometry Using Annexin V and Propidium Iodide versus the Neutral Comet Assay', *Cytometry*, 48, (2002), p. 14–19.
49. **A. Azqueta, A. R. Collins**, 'The Essential Comet Assay: A Comprehensive Guide to Measuring DNA Damage and Repair', *Archives of Toxicology*, 87, (2013), p. 949–968.
50. **D. Kirkland, G. Speit**, 'Evaluation of the Ability of a Battery of Three in Vitro Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens III. Appropriate Follow-up Testing in Vivo', *Mutation Research*, 654, (2008), p. 114–132.
51. **M. Etebari, A. Jafarian-Dehkordi, A. Kahookar, et al**, 'Assessment of the Deoxyribonucleic Acid Damage Caused by Occupational Exposure to Chemical Compounds in Isfahan Polyacryl Company', *Journal of Research in Medical Sciences*, 19, (2014), p. 542–548.

52. **D. R. Dixon, A. M. Pruski, L. R. Dixon**, 'Marine Invertebrate Eco-Genotoxicology: A Methodological Overview', *Mutagenesis*, 17, (2002), p. 495–507.
53. **L. Verschaeve, J. Gilles**, 'Single Cell Gel Electrophoresis Assay in the Earthworm for the Detection of Genotoxic Compounds in Soils', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, (1995), p. 112–119.
54. **L. A. Gavrilov, N. S. Gavrilova**, 'The Reliability Theory of Aging and Longevity', *Journal of Theoretical Biology*, 213, (2001), p. 527–545.
55. **L. Hayflick, P. S. Moorhead**, 'The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains', *Experimental Cell Research*, 25, (1961), p. 585–621.
56. **K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman**, 'The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targets in Cancer', *Cell Proliferation*, 36, (2003), p. 131–149.
57. **D. O. Morgan**, 'Principles of CDK Regulation', *Nature*, 374, (1995), p. 131–134.
58. **C. J. Sherr, J. M. Roberts**, 'Inhibitors of Mammalian G1 Cyclin-Dependent Kinases', *Genes & Development*, 9, (1995), p. 1149–1163.
59. **W. S. el-Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, et al**, 'WAF1, a Potential Mediator of P53 Tumor Suppression', *Cell*, 75, (1993), p. 817–825.
60. **M. Serrano, A. W. Lin, M. E. McCurrach, et al**, 'Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and P16INK4a', *Cell*, 88, (1997), p. 593–602.
61. **T. de Lange**, 'Activation of Telomerase in a Human Tumor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, (1994), p. 2882–2885.
62. **H. M. Chane, M. Narita, S. W. Lowe, et al**, 'The P400 E1A-Associated Protein Is a Novel Component of the P53 --> P21 Senescence Pathway', *Genes & Development*, 19, (2005), p. 196–201.

63. **C. Denoyelle, G. Abou-Rjaily, V. Bezrookove, et al**, 'Anti-Oncogenic Role of the Endoplasmic Reticulum Differentially Activated by Mutations in the MAPK Pathway', *Nature Cell Biology*, 8, (2006), p. 1053–1063.
64. **J. W. Shay, S. Bacchetti**, 'A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer', *Eur. J. Cancer*, 33, (1997), p. 787–791.
65. **G. P. Dimri, X. Lee, G. Basile, et al**, 'A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, (1995), p. 9363–9367.
66. **T. Kuilman, C. Michaloglou, W. J. Mooi, et al**, 'The Essence of Senescence', *Genes & Development*, 24, (2010), p. 2463–2479.
67. **A. Di Leonardoe, S. P. Linke, K. Clarkin, et al**, 'DNA Damage Triggers a Prolonged P53-Dependent G1 Arrest and Long-Term Induction of Cip1 in Normal Human Fibroblasts', *Genes & Development*, 8., (1994), p. 2540–2551.
68. **I. B. Roninson**, 'Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment', *Cancer Research*, 63, (2003), p. 2705–2715.
69. **C. Wang, D. Jurk, M. Maddick, et al**, 'DNA Damage Response and Cellular Senescence in Tissues of Aging Mice', *Aging Cell*, 8, (2009), p. 311–323.
70. **R. Baan, K. Straif, Y. Grosse**, 'Carcinogenicity of Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc.', *Lancet Oncol.*, 7, (2006), p. 295-296.
71. **W. Yu, C. Qian, X. Jiang, et al**, 'Mechanisms of Stem Cell Osteogenic Differentiation on TiO₂ Nanotubes', *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 136, (2015), p. 779–785.
72. **P. Malmberg, N. Bigdeli, J. Jensen, et al**, 'Formation of Hydroxyapatite on Titanium Implants in Vivo Precedes Bone-Formation during Healing', *Biointerphases*, 12, (2017), p. 1002–1006.
73. **R. B. Baggs, J. Ferin, G. Oberdörster**, 'Regression of Pulmonary Lesions Produced by Inhaled Titanium Dioxide in Rats.', *Vet Pathol*, 34, (1997), p. 592–597.

74. 'Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–123 – IARC', [online], [17.1.2019], Dostupné z: <<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>>.
75. **T. Chen, J. Yan, Y. Li**, 'Genotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles', *Journal of Food and Drug Analysis, Nanomaterials - Toxicology and Medical Applications*, 22, (2014), p. 95–104.
76. **S. Hackenberg, G. Friehs, M. Kessler, et al**, 'Nanosized Titanium Dioxide Particles Do Not Induce DNA Damage in Human Peripheral Blood Lymphocytes', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52, (2011), p. 264–268.
77. **M. L. Jugan, S. Barillet, A. Simon-Deckers, et al**, 'Titanium Dioxide Nanoparticles Exhibit Genotoxicity and Impair DNA Repair Activity in A549 Cells', *Nanotoxicology*, 6, (2012), p. 501–513.
78. **M. Ghosh, A. Chakraborty, A. Mukherjee**, 'Cytotoxic, Genotoxic and the Hemolytic Effect of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles on Human Erythrocyte and Lymphocyte Cells in Vitro', *Journal of Applied Toxicology*, 33, (2013), p. 1097–1110.
79. **S. Dasari, P. B. Tchounwou**, 'Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action', *European Journal of Pharmacology*, 740, (2014), p. 364–378.
80. **H. R. Yilmaz, M. Iraz, S. Sogut, et al**, 'The Effects of Erdosteine on the Activities of Some Metabolic Enzymes during Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats', *Pharmacological Research*, 50, (2004), p. 287–290.
81. **I. Arany, R. L. Safirstein**, 'Cisplatin Nephrotoxicity', *Seminars in Nephrology*, 23, (2003), p. 460–264.
82. **P. Apostolou, M. Toloudi, E. Kourtidou, et al**, 'Use of the Comet Assay Technique for Quick and Reliable Prediction of in Vitro Response to Chemotherapeutics in Breast and Colon Cancer', *Journal of Biological Research*, 21, (2014), p. 14.

83. **L. M. Mendonça, G. C. dos Santos, R. A. dos Santos, et al**, 'Evaluation of Curcumin and Cisplatin-Induced DNA Damage in PC12 Cells by the Alkaline Comet Assay', *Human & Experimental Toxicology*, 29, (2010), p. 635–643.
84. **G. Goor, J. Glenneberg, S. Jacobi**, 'Hydrogen Peroxide', *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (2007), p. 397–409.
85. **H. J. H. Fenton**, 'LXXIII.—Oxidation of Tartaric Acid in Presence of Iron', *Journal of the Chemical Society*, 65, (1894), p. 899–910.
86. **V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, et al**, 'Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health', *Pharmacognosy Reviews*, 4, (2010), p. 118–126.
87. **J. H. Chen, S. E. Ozanne, C. N. Hales**, 'Methods of Cellular Senescence Induction Using Oxidative Stress', *Methods in Molecular Biology*, 371, (2007), p. 179–189.
88. **G. M. Benhusein, E. Mutch, S. Aburawi, et al**, 'Genotoxic Effect Induced by Hydrogen Peroxide in Human Hepatoma Cells Using Comet Assay', *The Libyan Journal of Medicine*, 5, (2010) p. 1–7.
89. **G. Brunborg, L. Rolstadaas, K. B. Gutzkow**, 'Electrophoresis in the Comet Assay', *Electrophoresis - Life Sciences Practical Applications*, (2018).
90. **P. Jackson, L. M. Pedersen, Z. O. Kyjovska, et al**, 'Validation of Freezing Tissues and Cells for Analysis of DNA Strand Break Levels by Comet Assay', *Mutagenesis*, 28, (2013), p. 699–707.
91. **A. Sliwinska, D. Kwiatkowski, P. Czarny, et al**, 'Genotoxicity and Cytotoxicity of ZnO and Al₂O₃ Nanoparticles', *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25, (2015), p. 176–183.
92. **S. Pfuhler, H. U. Wolf**, 'Detection of DNA-Crosslinking Agents with the Alkaline Comet Assay', *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, (1996), p. 196–201.
93. **M. J. Hoogduijn, E. Cemeli, K. Ross, et al**, 'Melanin Protects Melanocytes and Keratinocytes against H₂O₂-Induced DNA Strand Breaks through Its Ability to Bind Ca²⁺', *Experimental Cell Research*, 294, (2004), p. 60–67.

94. **D. Slamenova, K. Kozics, L. Hunakova, et al**, 'Comparison of Biological Processes Induced in HepG2 Cells by Tert-Butyl Hydroperoxide (t-BHP) and Hydroperoxide (H₂O₂): The Influence of Carvacrol', *Mutation Research*, 757, (2013), p. 15–22.
95. **A. A. Ramos, C. F. Lima, M. L. Pereira, et al**, 'Antigenotoxic Effects of Quercetin, Rutin and Ursolic Acid on HepG2 Cells: Evaluation by the Comet Assay', *Toxicology Letters*, 177, (2008), p. 66–73.