



Bakalářská práce

Hodnocení poškození DNA metodou comet assay

Studijní program:

B0914P360007 Biomedicínská technika

Autor práce:

Marek Jína

Vedoucí práce:

Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Liberec 2023



Zadání bakalářské práce

Hodnocení poškození DNA metodou comet assay

| | |
|----------------------------|-------------------------------------|
| <i>Jméno a příjmení:</i> | Marek Jína |
| <i>Osobní číslo:</i> | D20000006 |
| <i>Studijní program:</i> | B0914P360007 Biomedicínská technika |
| <i>Zadávající katedra:</i> | Fakulta zdravotnických studií |
| <i>Akademický rok:</i> | 2022/2023 |

Zásady pro vypracování:

Cíle práce:

1. Seznámit se s metodami hodnocení poškození DNA eukaryotických buněk.
2. Seznámit se s principem a variantami metody comet assay (kometové analýzy) na savčích buňkách.
3. Provést literární rešerši týkající se využití metody comet assay při hodnocení léčiv a nových lékových forem.
4. Navrhnout optimalizaci lyzačního kroku metody.
5. Provést hodnocení optimalizované metody.

Teoretická východiska (včetně výstupu z kvalifikační práce):

Metoda comet assay je jednou z metod, která poskytuje informaci o možném poškození DNA. Jedná se o elektroforetickou metodu založenou na odlišné rychlosti migrace různě velikých fragmentů DNA v gelu. Proces je ovlivňován řadou proměnných včetně podmínek lýzy buněk. Výstupem práce bude volba optimálních podmínek na základě literárního průzkumu a empirického ověření.

Výzkumné předpoklady / výzkumné otázky:

Pro správné fungování a dosažení správných a relevantních výsledků je nutné optimální nastavení metody. V případě metody comet assay se jedná zejména o zpracování vzorků a jejich zalití do gelu a také použitý lyzační pufr.

Výzkumnou otázkou této BP je právě, jaký lyzační pufr je optimální pro zpracování savčích buněk metodou comet assay, jak jeho složení ovlivňuje délku "ocasu komety".

Metoda:

Kvantitativní.

Technika práce, vyhodnocení dat:

Savčí buňky 3T3 budou zality do gelu a zpracovány metodou comet assay. Následně bude provedeno barvení DNA. Bude pořízena obrazová dokumentace a vyhodnocena obrazovou analýzou. Pro každou testovací skupinu bude naměřena délka ocasu ze statisticky významného počtu buněk. Naměřená data budou statisticky vyhodnocena. Hodnocena bude střední hodnota délky, směrodatná odchylka a další. Výsledky budou staticky zpracovány a porovnány.

Místo a čas realizace výzkumu:

Experimentální část BP bude realizována na Ústavu pro nanomateriály, nové technologie a inovace TUL po domluvě se školitelkou/ konzultantkou v časové době od listopadu 2022 – do března 2023.

Vzorek:

U každého testovaného vzorku (lyzačního pufru) bude nasnímáno a měřeno minimálně 50 buněk.

Rozsah práce:

Rozsah bakalářské práce činí 50–70 stran (tzn. 1/3 teoretická část, 2/3 výzkumná část).

Forma zpracování kvalifikační práce:

Tištěná a elektronická.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy: 50 – 70
Forma zpracování práce: tištěná/elektronická
Jazyk práce: Čeština

Seznam odborné literatury:

- VYCHODILOVÁ, Leona et al. 2019. *Klinická genetika*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-825-8.
- MURRAY, Robert K. a Victor W. RODWELL. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-72-62-907-7.
- NOVOTNÁ, Božena et al. 2001. Kometový test: Princip metody a klinické aplikace. *Časopis lékařů českých*. **140** (24), s. 761 – 766. ISSN 0008-7335. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2001-24/kometovy-test-princip-metody-a-klinicke-aplikace-25794>
- DVOŘÁK, Miroslav a Alena MATĚJOVIČOVÁ. 2008. Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chemické listy*. **102** (11), s. 977 – 983. ISSN 0009-2770. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_11_977-983.pdf
- OECD/OCDE 489. 2016. OECD guideline for the testing of chemicals-Section 4: In vivo mammalian alkaline comet assay. 1. vyd. Paříž: OECD Publishing.
- OTOVÁ, Berta et al. 2022. *Lékařská biologie a genetika (I. díl)*. 3. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-5221-4.
- KOHOUTOVÁ, Milada et al. 2017. *Lékařská biologie a genetika (II. díl)*. 2. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3790-7.
- PANCZAK, Aleš et al. 2013. *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2423-5.
- DVOŘÁK, Miroslav. 2014. Hodnocení kometové analýzy s počítačovou podporou – opakovatelnost a reprodukovatelnost dat. *Chemické Listy*. **108** (12), s. 1149 – 1152. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/425>
- NOVOTNÁ, Božena. et al. 2016. Naše první zkušenosti s využitím kometového testu při hodnocení integrity DNA ve spermích. *Česká urologie*. **20** (4), s. 317 – 325. ISSN 2336-5692. Dostupné z: <https://www.czechurol.cz/pdfs/cur/2016/04/09.pdf>
- COLLINS, Andrew R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. **26**, s. 249 – 261. ISSN 1559-0305. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1385/MB:26:3:249>
- MRAČKOVÁ, Gabriela et al. 1999. Využití "comet assay" při hodnocení profesionální expozice pracovníků v koksárnách. *Pracovní lékařství*. **1**, s. 3 – 8. ISSN 0032-6291. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/pracovni-lekarstvi/1999-1/vyuziti-comet-assay-pri-hodnoceni-profesionalni-expozicepracovniku-v-koksarnach-29502>
- BANGRYANTSEVA, Yana. 2015. *Využití kometového testu při měření integrity DNA v klinice a v aplikovaném výzkumu*. Praha. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/80399>
- BAJPAYEE, Mahima et al. 2016. Chapter 1: The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage, In: BAJPAYEE, Mahima et al. *The Comet Assay in Toxicology*. 2. vyd. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, s. 1 – 64. eISBN 978-1-78262-289-5.
- LU, Yanxin et al. 2017. Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments*. **128**, e56450. DOI: 10.3791/56450. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752397/>
- GAJSKI, Goran et al. 2019. The comet assay in animal models: From bugs to whales. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. **779**, s. 82-113. DOI: 10.1016/j.mrrev.2019.02.003. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574218300589>

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová, Ph.D.
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání práce: 25. října 2022
Předpokládaný termín odevzdání: 5. května 2023

L.S.

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc.,
MBA
děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci 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.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Poděkování

Tímto děkuji Ing. Miroslavě Rysové, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, připomínky a nekončící trpělivost, kterou se mnou během psaní práce měla. Rád bych také poděkoval Ing. Haně Tománkové, MSc. za pomoc s realizací praktické části, za cenné rady, připomínky a za nekonečnou trpělivost, kterou se mnou během trvání praktické části měla. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Martě Zizienové za pomoc s citacemi a úpravou práce. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a mé přítelkyni za podporu a motivaci během celého mého studia.

ANOTACE

Hodnocení poškození DNA pomocí metody comet assay

Metoda comet assay se používá při hodnocení poškození molekul DNA v živých buňkách a díky tomu může být využita i k hodnocení vlivu léčiv a nových lékových forem na poškození DNA především u eukaryotních buněk. Principem metody je migrace a separace řetězců DNA v elektrickém poli v závislosti na jejich délce – tedy míře poškození. Analýza je prováděna na celých buňkách po narušení jejich membrány. Tímto způsobem je v okolí buňky, která tvoří tzv. hlavu komety, tvořen poškozenou DNA tzv. ohon (ocas) komety. Jedním z klíčových parametrů pro úspěšný průběh analýzy je schopnost lyzačního pufru narušit buněčnou membránu. Cílem této bakalářské práce bylo srovnat vhodnost tří typů lyzačního pufru a vliv jeho složení na rozměr komet. Analýza byla provedena na savčích buňkách – myších fibroblastech 3T3. Poškození DNA bylo způsobeno expozicí roztoku peroxidu vodíku. Následně byl zkoumán rozměr ohonu komety. Tedy do jaké míry jsou jednotlivé lyzační pufrы schopny narušovat buněčnou membránu v závislosti na jejich složení.

Klíčová slova: comet assay, poškození DNA, lyzační pufr

Anotation

DNA damage evaluation by comet assay method

The comet assay method is used in evaluation of damage to DNA molecules in living cells and can therefore also be used to assess the effect of drugs and new dosage forms on DNA damage, especially in eukaryotic cells. The principle of the method is migration and separation of DNA chains in an electric field depending on their length - i.e. the level of damage. The analysis is performed on whole cells after disruption of their membrane. In this way, the tail of the comet is formed by damaged DNA in the surroundings of the cell, which forms the so-called head of the comet. One of the key parameters for a successful analysis is the ability of the lysis buffer to disrupt the cell membrane. The aim of this bachelor thesis was to compare suitability of three types of lysis buffer and influence of its composition on the size of the comets. The analysis was conducted on mammalian cells - mouse fibroblasts 3T3. DNA damage was caused by exposure to hydrogen peroxide solution. Afterwards, the size of the comet tail was investigated. Thus, the extent to which the individual lysis buffers are able to disrupt the cell membrane depending on their composition was explored.

Key-words:

comet assay, DNA damage, lysis buffer

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam symbolů a zkratek | 11 |
| 1 Úvod..... | 12 |
| 2 Teoretická část | 13 |
| 2.1 Nukleové kyseliny..... | 13 |
| 2.2 DNA | 13 |
| 2.2.1 Nukleové báze | 14 |
| 2.2.2 Nukleotidy | 14 |
| 2.3 Typy DNA..... | 14 |
| 2.3.1 Jaderná DNA | 14 |
| 2.3.2 Mitochondriální DNA | 15 |
| 2.4 Lidská DNA | 16 |
| 2.5 Metody hodnocení poškození DNA..... | 17 |
| 2.5.1 <i>In vitro</i> testy genotoxicity..... | 18 |
| 2.5.2 <i>In vivo</i> testy genotoxicity..... | 19 |
| 2.6 Kometová analýza | 21 |
| 2.7 Historie metody | 22 |
| 2.8 Varianty kometové analýzy..... | 23 |
| 2.8.1 Alkalická verze | 23 |
| 2.8.2 Neutrální verze | 24 |
| 2.8.3 Enzymy asistovaná metoda | 24 |
| 2.9 Méně obvyklé varianty kometové analýzy | 24 |
| 2.10 Příprava vzorků | 25 |
| 2.11 Lýza buněk..... | 25 |
| 2.12 Denaturace..... | 26 |
| 2.13 Elektroforéza | 27 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.14 | Neutralizace..... | 27 |
| 2.15 | Vizualizace a barvení DNA | 28 |
| 2.16 | Hodnocení poškození DNA v rámci comet assay..... | 28 |
| 2.17 | Využití metody comet assay při hodnocení léčiv a nových lékových forem... | 30 |
| 3 | Praktická část | 35 |
| 3.1 | Cíle a výzkumné předpoklady/otázky | 35 |
| 3.2 | Přístrojové vybavení a laboratorní spotřební materiál | 35 |
| 3.3 | Seznam chemikálií a biologického materiálu | 35 |
| 3.4 | Příprava roztoků | 36 |
| 3.5 | Postup experimentu | 37 |
| 3.5.1 | Analýza komet..... | 39 |
| 3.6 | Dosažené výsledky | 40 |
| 3.6.1 | Lyzační pufr 1..... | 40 |
| 3.6.2 | Lyzační pufr 2..... | 42 |
| 3.6.3 | Lyzační pufr 3..... | 44 |
| 3.7 | Vyhodnocení cílů a výzkumných otázek | 47 |
| 3.8 | Optimalizace metody | 49 |
| 3.8.1 | Koncentrace H ₂ O ₂ a počet buněk | 49 |
| 3.8.2 | Průběh elektroforézy | 50 |
| 3.8.3 | Barvení DNA..... | 50 |
| 3.8.4 | Software..... | 51 |
| 4 | Diskuse..... | 52 |
| 4.1.1 | Limitace metody | 53 |
| 5 | Návrh doporučení pro praxi | 54 |
| 6 | Závěr | 55 |
| | Seznam použité literatury | 56 |

| | |
|---------------------|----|
| Seznam obrázků..... | 60 |
|---------------------|----|

Seznam symbolů a zkratek

- AP místa – apurinové/apyrimidinové místo, místo bez dusíkaté báze
- Bp – base pair, pár bází
- BUdR – bromodeoxyuridin
- CTAB – Cetrimoniumbromid
- DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol
- DNA – deoxyribonukleová kyseliny
- DSB – double-strand breaks, dvouřetězové zlomy (DSB)
- ECHA – European Chemicals Agency, Evropská agentura pro chemické látky
- EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
- EFSA – European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin
- EMA – European Medicines Agency, Evropská agentura pro léčivé přípravky
- EU – evropská unie
- FPG – DNA-Formamidopyrimidin glykosyláza
- H₂KPO₄ – Dihydrogenfosforečnan draselný
- H₂O₂ – Peroxid vodíku
- KCl – Chlorid draselný
- LMP(A) – low melting point (agarose), nízkotající (agaróza)
- LP(1, 2, 3) – Lyzační pufr (1, 2, 3)
- mld. – miliarda
- mRNA - „messenger“ ribonukleová kyselina
- Na₂HPO₄ – Hydrogenfosforečnan disodný
- NaOH – Hydroxid sodný
- PACA - Poly(alkyl cyanoacrylate), Poly(alkyl kyanoakrylát)
- PBS – fosfátový pufr
- PDT – photodynamic therapy, fotodynamická terapie
- px – pixely
- RNA – ribonukleová kyselina
- SCGE – single gell electrophoresis, elektroforéza jednotlivých buněk
- SSB – single stranded break, jednořetězový zlom
- TBE – tris-borát-EDTA
- tRNA – transferová RNA
- UV – ultraviolet, ultrafialové záření

1 Úvod

Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA je naprosto klíčovou molekulou pro život. Jako nositelka genetické informace organismu, ovlivňuje tato molekula funkci, vzhled a chování organismů. Ovšem tato molekula je velmi citlivá a je pod neustálým stresem okolních vlivů. Mezi stresové faktory, které způsobují poškození DNA, patří oxidační stres, volné radikály, nejrůznější chemické sloučeniny nebo například UV záření. DNA disponuje opravnými mechanismy, které jsou schopné vady genetického kódu vyřešit, ovšem ani tyto mechanismy nejsou dokonalé a mohou vadu přehlédnout. Pokud je taková chyba následně přenášena do dalších generací buněk, nazývá se mutace a může se projevit například rakovinným bujením.

Pro správné fungování buňky je esenciální, aby molekula DNA byla nepoškozená a mohla plnit svoji funkci. Jeden ze způsobů, jak otestovat, zda molekula není poškozená, je právě kometová analýza neboli SCGE tedy „single cell gel electrophoresis“ neboli jednobuněčná gelová elektroforéza (Piperakis, 2009).

Kometová analýza (comet assay) je jednoduchá elektroforetická metoda, která slouží k hodnocení poškození DNA na základě rozdílné rychlosti migrace poškozených a nepoškozených řetězců DNA vzhledem k jejich různé velikosti. Buňky jsou po vystavení testované látky imobilizovány v agarovém gelu a jejich membrána je narušena lýzou. Po vystavení buněk elektrickému poli dochází k migraci molekul a jejich fragmentů v závislosti na velikosti. Pokud došlo k poškození DNA, jsou pod mikroskopem po elektroforéze a následném bavení viditelné útvary připomínající kometu. Buněčná hmota a nepoškozené molekuly DNA se drží v útvaru připomínajícím „hlavu“ komety a poškozené molekuly tvoří její „ohon“. Čím více došlo k poškození DNA, tím delší a intenzivnější „ohon“ kometa má, proto kometová analýza.

2 Teoretická část

2.1 Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou makromolekulární látky vyskytující se ve všech buňkách (nejčastěji v jejich jádře). Rozlišujeme dva typy nukleových kyselin - deoxyribonukleová kyselina a ribonukleová kyselina. Jejich hlavním úkolem je uchovávat a předávat genetickou informaci. Uplatňují se v procesu proteosyntézy, kde je na ribozomu syntetizován polypeptidický řetězec. Díky uchovávané genetické informaci ovlivňují činnost celého organismu. Řetězce nukleových kyselin jsou tvořeny nukleotidy. Nukleotid se skládá z cukerné části, zbytku kyseliny fosforečné a dusíkaté báze (Murray et al., eds., 2012).

Cukerná část je tvořena cyklickou pentózou. Pokud je cukernou složkou v kyselině β -D-ribofuranosa, jedná se o ribonukleovou kyselinu. Pokud je cukernou složkou 2 - deoxy- β -D-ribofuranosa jedná se o deoxyribonukleovou kyselinu. Zbytek kyseliny fosforečné je odvozen od kyseliny fosforečné H_3PO_4 odštěpením dvou atomů vodíku. Zbytek kyseliny fosforečné se nazývá hydrogenfosforečnanový anion $(HPO_4)^{2-}$, a pomocí fosfodiesterové vazby spojuje jednotlivé cukerné jednotky. Takto navzájem spojené cukerné složky a zbytky kyseliny fosforečné tvoří kostru celé nukleové kyseliny, na kterou je přes ribózu navázaná dusíkatá báze. Dusíkaté báze jsou tvořeny purinovými a pyrimidinovými cykly. V nukleových kyselinách rozeznáváme pět dusíkatých bází (Murray et al., eds., 2012).

2.2 DNA

DNA je polymerní molekula, která je chemickou nositelkou dědičnosti. Pro většinu organismů jakožto i pro člověka hraje tato molekula klíčovou roli při tvorbě, vývoji, vzhledu a chování organismů. Z chemického hlediska se jedná o makromolekulu – polymer, který je tvořen nukleotidy. Nukleotidy jsou složeny z cukru deoxyribózy, fosfátového zbytku a jednou ze čtyř nukleových bází. Právě nukleové báze mají informační funkci, která spočívá v pořadí jednotlivých bází. Molekula DNA je v její nejnámější podobě tvořena dvěma vlákny, která se spojují a tvoří levotočivou dvoušroubovici (Murray et al., eds., 2012).

2.2.1 Nukleové báze

Nukleové báze neboli dusíkaté báze dělíme na purinové a pyrimidinové. Mezi purinové báze, deriváty purinu, patří adenin (A) a guanin (G) a mezi pyrimidinové báze,

deriváty pyrimidinu, patří thymin (T), cytosin (C) a uracil (U). Tyto báze tvoří vzájemně komplementární páry, kde každý pár představuje jednu purinovou a jednu pyrimidinovou bázi. V DNA se adenin páruje pouze s thyminem a guanin pouze s cytosinem.

Tyto páry tvoří kód k zápisu genetické informace, kterého se využívá při procesu proteosyntézy (Murray et al., eds., 2012).

2.2.2 Nukleotidy

Nukleotidy jsou glykosilaminy, které jsou složeny z nukleové báze, sacharidu a fosfátové skupiny. Nukleotidy vznikají z nukleosidů (ribóza a báze). Fosfát je navázán na 3. uhlík jedné ribózy a 5. uhlík druhé ribózy, čímž je spojuje do řetězce. Proto má každá DNA 5 a 3 konec – 5 konec končí fosfátem a 3 konec volnou OH skupinou, kam se váže příp. další nukleotid s fosfátem. Tato vazba probíhá přes 3' - a 5' - hydroxyskupinu sacharidu. Takto navzájem pospojované řetězce jednotlivých nukleotidů s proměnnou dusíkatou bází tvoří celou molekulu DNA (Murray et al., eds., 2012).

2.3 Typy DNA

V rámci jedné buňky se DNA nachází jak v jádře, tak mimo něj. Jeden typ DNA, který se nachází v jádře, se nazývá jaderná DNA. Druhý typ DNA, který se nachází mimo jádro, se nazývá mimochromosomální. Tento typ DNA se nachází v mitochondriích a označuje se jako mitochondriální DNA.

2.3.1 Jaderná DNA

Jaderná DNA, jak už z názvu vyplývá, se nachází v jádře buněk. Samotná molekula DNA se nachází v chromozomech. Chromozom je specifický lineární útvar, složený ze dvou chromatid, které jsou složeny z nahuštěné DNA, proteinů histonů a nehistonových proteinů. DNA se obtáčí kolem histonů a tím tvoří chromatidu. Obě chromatidy jsou spojeny centromerou. Centromera je kulový útvar uprostřed chromozomů, který je tvořen unikátním typem chromatinu (jaderná hmota), což je komplex DNA a proteinů, které dohromady tvoří chromozomové vlákno.

V chromozomech je schován téměř celý genom člověka. Genom je veškerá genetická informace uložená v DNA. Z hlediska funkce je jaderná DNA důležitou molekulou, protože v sobě uchovává genetickou informaci. Podle informace jsou syntetizovány proteiny. Tudiž tato DNA ovlivňuje činnost celého organismu. Zhruba 60 % jaderné DNA je tvořeno jedinečnou sekvencí, což jsou například již zmiňované geny, ale jen cca 3% genomu tvoří kódující sekvence. Každý gen je specifický a má jinou funkci nebo ovlivňuje jinou činnost. Na koncích chromozomů se nachází telomery (Murray et al., eds., 2012).

Telomery jsou opakující se sekvence nukleotidů na koncích chromozomů (obr. č. 22). U obratlovců je to sekvence TTAGGG. Jelikož v těle dochází k neustálému dělení buněk, je tato sekvence zkracována. Při DNA replikaci pomáhají určit konec genových sekvencí, ale samy jsou ztraceny. Tudiž každá buňka má omezený limit dělení a nemůže se dělit pořád. Ovšem je tu enzym, který se nazývá telomeráza. Tento enzym je schopný prodlužovat telomery a resetovat proces stárnutí. Avšak tento enzym je v lidských buňkách přísně regulovaný a dalo by se říct, že je nefunkční. Ovšem u rakovinných buněk je tento enzym aktivní a nádorové buňky se mohou neomezeně množit. Po inaktivaci tohoto enzymu u nádorových buněk HeLa buňky po 23-26 dělení umírají. Na inaktivaci enzymu telomerázy by mohla být založena léčba rakoviny. Naopak kdyby došlo k úspěšné aktivaci tohoto enzymu v buňkách, mohl by být proces stárnutí zvrácen (Murray et al., eds., 2012).

2.3.2 Mitochondriální DNA

Tato DNA se nachází v mitochondriích. Jelikož se mitochondrie nenacházejí v buněčném jádře, tvoří mimo jadernou genetickou informaci. Do této skupiny můžeme dále zařadit například plastogeny, geny pro plastidy, které jsou typické pro buňky rostlin. Mitochondrie jsou organely, které nalezneme ve většině eukaryotických buněk. Mitochondriální DNA je zpravidla kruhová a je děděna maternálně, tudíž po matce. Spermie totiž svoje mitochondrie odhazuje s ocáskem a do vajíčka tedy nese jen jadernou genetickou informaci (Murray et al., eds., 2012).

Mitochondrie jsou membránově obalené organely. Hrají klíčovou roli v přeměně sacharidů, lipidů a proteinů na energeticky bohaté ATP. Tento proces se nazývá buněčné dýchání a zahrnuje procesy jako je například Krebsův cyklus nebo dýchací řetězec. Mitochondrie se společně s plastidy řadí mezi semiautonorní organely. Semiautonorní organely jsou organely, které obsahují vlastní genetickou informaci, ve formě

prokaryotního uspořádání. V mitochondriích a plastidech je molekula DNA kruhová a je schopná replikace. U těchto organel se předpokládá, že vznikly na základě symbiózy mezi předkem eukaryotických organismů a organismy prokaryotickými. Jde tedy o prokaryotické buňky, které ztratily schopnost samostatně žít a staly se nepostradatelnou součástí eukaryotických buněk. Samotný lidský mitochondriální genom má 16 569 párů bází. Celkem obsahuje 37 genů. Celkem 24 genů jsou geny pro různou nekódující RNA (rRNA a tRNA). Zbývajících 13 genů kóduje vlastní mitochondriální polypeptidy podílející se na enzymatické výbavě mitochondrií. Tyto proteiny jsou využívány během oxidativní fosforylace. Během evoluce došlo k horizontálnímu přenosu mnoha genů z mtDNA do buněčného jádra. Tím je možné vysvětlit, že mnohé geny v jádře kódující různé mitochondriální proteiny silně připomínají bakteriální proteiny (Murray et al., eds., 2012).

2.4 Lidská DNA

Lidská deoxyribonukleová kyselina (DNA) je z pohledu medicínského velmi zajímavou molekulou. Díky jednoduchému mechanismu je schopna uchovat obrovské množství informací, které ovlivňují jak fungování celého organismu, tak vzhled, ale i řadu genetických poruch, nemocí a odlišností. DNA je uchována v chromozomech. Ten je tvořen dvěma chromatidami, které jsou spojeny centromerou. Právě v chromatidách se DNA ukrývá. Chromatida je ve své podstatě nahuštěná dvoušroubovice, která se obtáčí kolem histonů. Soubor všech chromozomů se nazývá karyotyp. Člověk má 22 párů chromozomů a jeden pár pohlavních chromozomů X a Y. Všechn tento genetický materiál společně s mitochondriální DNA tvoří genom. Genom je soubor veškerého genetického materiálu uloženého v DNA. Lidský genom je tvořen asi 20–24 tisíci geny, což odpovídá asi 3,1 - 3,2 mld. párů bází. Problémem je, že každý člověk je specifický a má odlišný genom, tudíž neexistuje univerzální lidský genom, který by odpovídal každému člověku (Murray et al., eds., 2012).

Genetická informace uložená v chromozomech je nesmírně důležitá při procesu proteosyntézy. Proteosyntéza je děj, při kterém dochází ke vzniku peptidu, či bílkoviny. Proces je složen ze dvou kroků. První krok se nazývá transkripce a spočívá v přepisu genetického kódu DNA do „messenger“ ribonukleové kyseliny (mRNA). Tento proces probíhá v jádru buněk a principem je vytvoření kopie DNA. Pro tento proces je důležitý enzym RNA polymeráza, který je schopný vytvářet právě takovou kopii v podobě

mRNA. Když je DNA přepsána do mRNA, tak mRNA vycestuje z jádra skrz jaderné póry do cytoplazmy, kde nasedne na ribozom a začíná druhá část proteosyntézy, která se nazývá translace. Před vycestováním z jádra dochází k sestřihu mRNA, která obsahuje i tzv. introny. Intron je oblast mRNA, která se nepřekládá do proteinu, ale vystříhne se a zůstane v jádře. Z jádra odchází RNA složená jen z exonů, které následně kódují sekvenci aminokyselin. Translace je přepis genetické informace z mRNA do postupně zvětšujícího se polypeptidického řetězce. Celý proces začíná tehdy, když ribozom přečte kodon AUG. AUG je start kodon, který odpovídá aminokyselině methionin. Po přečtení tohoto kodonu začíná samotný proces translace. Proces spočívá v interakci kodonu na mRNA a antikodonu na tRNA. Když dojde k navázání antikodonu na kodon, je aminokyselina z antikodonu uvolněna a přes peptidovou vazbu je navázána na rostoucí polypeptidický řetězec. Peptidová vazba je vazba mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou aminokyselin, kdy dojde k vazbě dvou aminokyselin přes dusík za vzniku vody. K ukončení translace dochází při přečtení stop kodonu. Stop kodony jsou tři. Jsou to kodony UAA, UAG a UGA. Těmto kodonům nepřísluší žádná tRNA s aminokyselinou. Po přečtení jednoho z těchto tří kodonů je zastaven proces proteosyntézy a polypeptidický řetězec je nasyntetizovaný. Avšak není zcela připraven k použití. Je upraven posttranlačními modifikacemi a po těchto modifikacích je připraven k použití (Murray et al., eds., 2012).

Jelikož je DNA každého jedince na naší planetě odlišná, je každý z nás do jisté míry odlišný. Například barva pleti, barva očí, funkce nejrůznějších orgánů či enzymů je ovlivněna sekvencí nukleotidů v DNA. Právě této specifčnosti, že každá deoxyribonukleová kyselina je odlišná, se využívá například při určení pachatele pomocí analýzy biologického materiálu zanechaného na místě činu nebo při určení biologického otce dítěte pomocí otcovského testu.

2.5 Metody hodnocení poškození DNA

Obor, který se zabývá hodnocením poškození DNA, se nazývá genetická toxikologie. Pro testování vlivu vnějšího prostředí na genetický materiál se používá množství metod z oborů mikrobiologie, molekulární biologie a cytogenetiky (Vychodilová et al., 2019).

Nežádoucí vlivy okolního prostředí mohou DNA poškodit jedním nebo hned několika způsoby. Testy genotoxicity jsou navrženy tak, aby detekovaly pouze jedno konkrétní

poškození. Pro rozhodnutí o genotoxicitě daného vnějšího faktoru se tedy provádí mnoho testů za účelem rozšíření portfolia rozdílných způsobů působení genotoxinů na poškození DNA. Pro testy genotoxicity jsou zavedena pravidla. Tato pravidla jsou v rámci EU určována agenturami ECHA (European Chemicals Agency) pro chemické látky, EFSA (European Food Safety Authority) pro potraviny a krmiva a EMA (European Medicines Agency) pro léčiva. Testování podle pravidel výše zmíněných agentur probíhá v několika fázích. Pořadí těchto fází závisí na charakteristice testované látky nebo na tzv. panelu, což je určitý postup, jak vybrané testy provádět. Tyto testy připravuje zmíněná agentura EFSA a dají se použít jen pro vybrané látky (Vychodilová et al., 2019).

2.5.1 *In vitro* testy genotoxicity

In vitro testování genotoxicity je první fází tohoto testování. Využívány a také doporučovány jsou Amesův test a set testů na savčích buňkách, kam patří test na chromozomální aberace a test na přítomnost mikrojader (Vychodilová et al., 2019).

Nejnámějším testem na mutagenitu je Amesův test (OECD TG 471) (Vychodilová et al., 2019). Tento test slouží k určení karcinogenního a mutagenního potenciálu látek. Obvykle se test provádí na bakteriálních kmenech *Salmonella typhimurim*. Princip tohoto testu spočívá ve využití buněk s bodovou mutací v genu, který zodpovídá za syntézu aminokyseliny histidinu. Jako důsledek takové mutace nejsou kmeny těchto buněk schopné růst na médiích bez obsahu histidinu, čehož se využívá při hodnocení testované látky. Hodnotí se, zda je testovaná látka schopná způsobit reverzní mutaci a obnovit růst buněk v médiu bez přidání histidinu. Bakteriální kmeny jsou upravené tak, aby obsahovaly jak bodové mutace, tak mutace posunující čtecí rámeček. Díky tomu je možné detekovat mutageny, které působí různými mechanismy. Pro některé specifické sloučeniny platí, že způsobují reverzní mutaci pouze u jednoho či dvou kmenů. Jelikož jsou testované kmeny mutovány v genech, které zodpovídají za syntézu lipopolysacharidů, je pro mutagen snazší prostoupit jak buněčnou stěnou, tak prostoupit do reparačního systému buňky, což zvyšuje senzitivitu testu. Experiment se dá provádět s metabolickou aktivitou, což má simulovat prostředí těla vyšších živočichů s enzymatickými mechanismy, které mohou s testovanou látkou reagovat a původně bezpečnou látku přeměnit v mutagen. Jako stimulant pro metabolismus se přidává extrakt z krysích jater, který sám o sobě není mutagenní, ale jeho metabolity ano. Kultivace bakterií se provádí na agaru s přidáním malé dávky histidinu, která umožňuje nastartovat buněčný růst. Po spotřebování takové dávky, které se říká iniciační, přežívají pouze

buňky, které jsou reverzně mutované a jsou schopny samostatné tvorby histidinu. Pozorováním kolonií po 48 hodinách se určí mutagenní potenciál látky podle počtu pozorovaných kolonií (Vychodilová et al., 2019).

U testu na chromozomální aberace (mutace na úrovni chromozomů) spočívá princip testu v *in vitro* kultivaci buněk v přítomnosti testované látky. Po uplynutí předepsané doby je pomocí kolchicinu, což je mitotický jed, zastaven buněčný cyklus v metafázi, kdy jsou maximálně kondenzované chromozomy seřazeny v ekvatoriální rovině. Poté se chromozomy vhodně obarví a jednotlivě jsou pozorovány pod mikroskopem. Při pozorování jsou zkoumány a vyhledávány jak numerické (odchylka v počtu chromozomů), tak strukturní (přestavby chromozomů) aberace. Pomocí metody FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) může být zvýrazněna konkrétní oblast chromozomu, pro lepší pozorování změn. Testy na chromozomální aberace vykazují vysokou citlivost pro trizomii 21 – Downův syndrom, trizomii 18 – Edwardsův syndrom, trizomii 13 – Patauův syndrom (Vychodilová et al., 2019).

Test na přítomnost mikrojadér stejně jako předchozí testy využívá mikroskopii. Narozdíl od ostatních metod u tohoto testu nejsou pod mikroskopem pozorovány jednotlivé chromozomy. Princip testu spočívá v zastavení dělení buněčné membrány díky působení cytochalasinu B. Tato látka má schopnost zastavit dělení buněčné membrány, ale nezastavuje dělení jader. Po působení této látky následně pod mikroskopem pozorujeme velké dvoujaderné buňky. Pokud se při pozorování objeví výskyt mikrojadér, je to přímý důsledek působení testované látky. Takto mutagenní látka má za následek tvorbu chromozomálních zlomů a aneuploidií, změnu v počtu chromozomů, což se projevuje právě přítomností mikrojadér. Přítomnost mikrojadér je přímým důsledkem poškození chromozomů (Vychodilová et al., 2019).

2.5.2 *In vivo* testy genotoxicity

In vivo testování genotoxicity je druhá fáze tohoto testování. Nejvíce používané jsou testy na transgenních hlodavcích (OECD TG 488), *in vivo* variace testů na přítomnost chromozomálních aberací (OECD TG 475) a přítomnost mikrojadér (OECD TG 474) a kometový test (OECD TG 489) (Vychodilová et al., 2019).

U testu na transgenních hlodavcích jsou používány speciálně vyšlechtěné kolonie laboratorních hlodavců, v jejichž genomu jsou začleněny kopie cizorodé DNA, která nese jeden nebo více reportérových genů. Tyto reportérové geny, mají neutrální charakter

a žádným způsobem neovlivňují svého hostitele. Transgenní neboli cizorodá DNA pochází nejčastěji z bakterií. Vzorky tkání z transgenního hlodavce, ze kterých je izolována DNA, jsou odebrány po působení testované látky. Izolovaná DNA je zabalena do virového vektoru a přenesena do bakteriálního hostitele. Tento hostitel musí být schopný přenesenou DNA exprimovat. K expresi v bakteriálním systému nedochází, pokud jsou přenesené reportérové geny poškozeny. Výše popsaná změna se u bakterií projeví na vhodně zvoleném selekčním médiu. Často využívané reportérové geny, jsou bakteriální geny, které mají schopnost rezistence vůči antibiotikům. Pokud dojde k poškození těchto genů, nemůže bakterie, jejíž součástí jsou poškozené geny, v přítomnosti daného antibiotika růst na médiu. Jelikož jsou genotoxické látky, které působí selektivně jen v určitých tkáních (tkáň, kde dochází k častému dělení buněk), je velkou výhodou tohoto testu možnost analyzovat jakoukoliv somatickou nebo gametickou tkáň pozorovaného jedince. Test je schopný zejména detekovat bodové mutace a kratší přestavby v rámci jednoho nebo několika málo lokusů (míst v genomu) (Vychodilová et al., 2019).

In vivo varianta testu na chromozomální aberace a testu na přítomnosti mikrojadra má stejný průběh jako již bylo popsáno výše s rozdílem, že analyzovaný materiál pochází přímo z tkáň zkoumaného zvířete, a ne z buněčné kultury (Vychodilová et al., 2019).

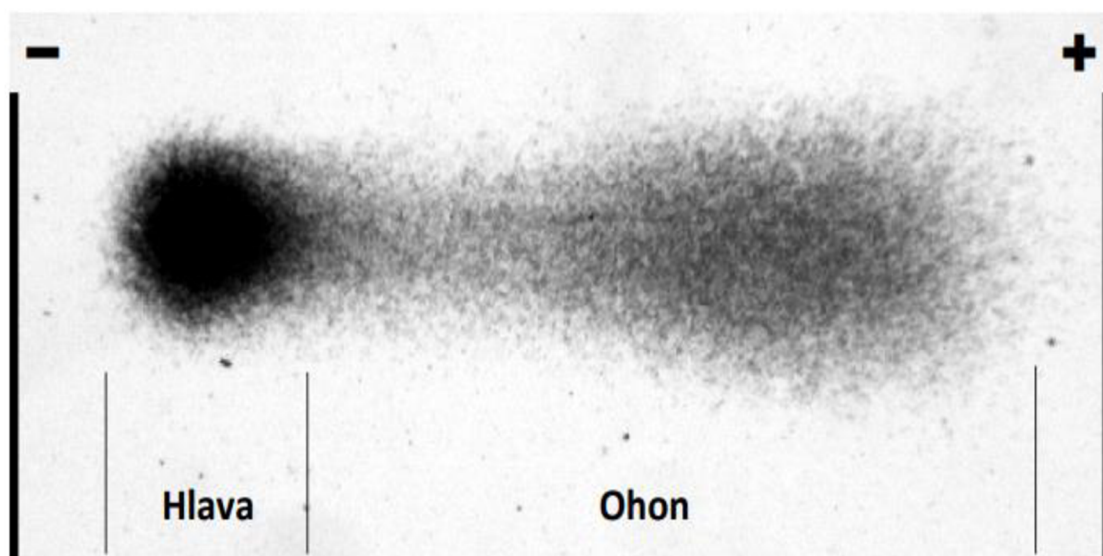
Kometový test je založený na izolaci jednotlivých buněk nebo buněčných jader zkoumaného jedince. Buňka je následně fixována v agarovém gelu. Poté dochází k rozpuštění membrán pomocí lyzačního pufru a DNA je vystavena elektrickému poli, čímž dochází k jejímu putování agarovým gelem. Pokud má DNA po působení elektrického pole v gelu kompaktní tvar, je tato DNA nepoškozená. Pokud má ale DNA tvar připomínající kometu, je to známka fragmentace DNA, a tudíž došlo k jejímu poškození. Tento tvar získá DNA díky tomu, že se fragmenty DNA pohybují v gelu směrem k anodě rychleji než delší intaktní (nepoškozená) vlákna. Vyhodnocení testu probíhá pod mikroskopem nebo pomocí softwaru na počítači, předtím jsou vzorky buněk vhodně obarveny (Vychodilová et al., 2019).

Všechny zmíněné testy se provádějí u látek, které jsou nově syntetizovány, a diskutuje se o jejich využití například ve farmacii. Tento postup se nazývá prospektivní. Naopak postup retrospektivní je takový, při kterém se zkoumá vliv a koncentrace genotoxických látek, které byly do prostředí uvolněny v minulosti. To může spočívat v odběru vzorků, půdy, vody, či biologického materiálu a testováním genotoxicity

můžeme hodnotit dopad a vliv různých chemických látek izolovaných z těchto materiálů. (Vychodilová et al., 2019).

2.6 Kometová analýza

Kometová analýza je citlivá elektroforetická metoda, která slouží ke stanovení poškození DNA v jednotlivých buňkách. Je to poměrně jednoduchá a levná metoda, která je hojně využívána. Základním principem fungování této metody je separace řetězců DNA působením stejnosměrného elektrického proudu v závislosti na jejich poškození. Pokud je DNA poškozená, dochází ke zlomům jejího dlouhého řetězce, což umožňuje její snazší migraci agarózovým gelem. Kratší fragmenty řetězců putují gelem rychleji a tím i dále. Při kombinaci s narušením (lýzou) buněčné membrány vede tento proces k formování tvaru komety. Tato kometa se skládá ze dvou částí: „hlavy“, která obsahuje nepoškozené či dlouhé řetězce DNA a „ohonu“, který obsahuje poškozenou DNA v různé délce, v závislosti na míře poškození DNA (viz obr. 1) (Piperakis, 2009).



Obrázek 1: Buňka inkubovaná s alkaloidem chelerytrinem a obarvená stříbřením. Na obrázku je vyznačena pozice a polarita elektrod při elektroforéze (Dvořák, 2013).

V závislosti na délce a intenzitě „ohonu“ komety můžeme hodnotit míru poškození dané buňky. Jinak řečeno čím delší je délka ocasu, tím více byla buňka poškozena (Dvořák, 2013).

Metoda má velké množství výhod. Jedná se nenáročnou metodu, pro kterou není třeba speciální vybavení, kromě elektroforetické nádoby, kam se připravené vzorky vkládají. Metoda je poměrně rychlá, účinná a vykazuje velkou citlivost vůči zkoumaným vzorkům.

Pro provedení stačí malé množství vzorků. Metoda se využívá jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu (Dvořák, 2013).

Tato metoda má ovšem i některé nevýhody. Jednou z těchto nevýhod je skutečnost, že není schopná detekovat malé fragmenty DNA, protože jsou většinou vymyty při lýze buněk a při následné elektroforéze. Další nevýhodou tohoto testu je absence standardizovaných protokolů, což má za následek horší porovnávání výsledků testů mezi různými vzorky a způsobuje to obtížnou interpretaci výsledků (Dvořák, 2013).

2.7 Historie metody

V roce 1976 byla publikována práce od Cooka a kolektivu, která zkoumá jadernou strukturu na základě lýzy buněk neiontovým detergentem a vysokomolárním chloridem sodným (Cook, Brazel a Jost, 1976). Při tomto postupu dochází k narušení a odstranění cytoplasmatické membrány, cytoplazmy a nukleoplazmy. Dále se naruší nukleosomy, přičemž téměř všechny histony jsou solubilizovány vysokou koncentrací solí. Jsou rozpuštěny v roztoku s vysokou koncentrací solí. Zůstane nukleoid, který se skládá z DNA matrice nebo „lešení“ složené z RNA a proteinů spolu s DNA, která je zavinutá v důsledku závitů dvoušroubovice, která se otáčí kolem histonů v nukleosomu. Díky zachování takových závitů není možná volná rotace DNA. Cook a kolektiv navrhli model s DNA připojenou v určitých intervalech k matici, tak že je ve skutečnosti uspořádána spíše jako řada smyček než jako lineární molekula. Poté, co bylo negativní navíjení rozvinuto přidáním interkalačního činidla (ethidium bromid), smyčky se uvolnily z nukleoidového jádra a vytvořily „svatozář“. K podobnému efektu dochází při použití záření pro uvolnění smyček. Jednovláknový zlom je dostatečný pro uvolnění závitů v této smyčce (Cook, Brazel a Jost, 1976).

První pokus o přímé kvantifikování zlomů vláken DNA provedli Rydberg a Johanson v roce 1978 s buňkami zalitými v agaróze na sklíčkách, které byly lyzovány za mírně alkalických podmínek (Rydberg a Johanson, 1978).

V roce 1984 Ostling a Johanson vyvinuli na výše popsaném přístupu kometový test, známý také jako jednobuněčná gelové elektroforéza (Ostling a Johanson, 1984).

Šlo o test, ve kterém byla elektroforéza a lýza buněk prováděna při neutrálních podmínkách. Pro barvení DNA byla použita akridinová oranž. Získaný obraz připomínal tvar komety. Kde byla zřetelně vidět „hlava“ komety, která je tvořena neporušenou DNA a ocas komety, který obsahuje přerušené části nebo poničenou DNA. Díky této formaci

se vžil název „kometová analýza“. Množství DNA, které je uvolněné z hlavy komety závisí na použité dávce mutagenu, a tedy míře poškození DNA. Avšak při tomto postupu jsou detekovány a analyzovány pouze dvouřetězcové zlomy.

Později byl tento test upravený dvěma skupinami a to Singh et al. v roce 1988 a Olive et al. v roce 1990 (Singh et al., 1988; Olive et al., 1990).

Elektroforéza, kterou prováděla první skupina, byla provedena za vysoce alkalických podmínek ($\text{pH} > 13$). To mělo za následek, že se oddělily komplementární řetězce DNA, DNA se tzv. denaturovala, díky čemu je možné detekovat alkalicky labilní místa a jednořetězcové zlomy v DNA během elektroforézy. Tato metoda je schopná detekovat nízkou míru zlomů vláken s vysokou citlivostí (Singh et al., 1988).

Skupina druhá prováděla elektroforézu za neutrálních nebo lehce alkalických podmínek za účelem detekce jednovláknových zlomů. Tato metoda byla optimalizovaná pro detekci subpopulace buněk s různou citlivostí na léky a záření (Olive et al., 1990).

Po analýze a vyhodnocení bylo zjištěno, že metoda vyvinutá Singhem a spol. je až o dva řády citlivější. Alkalická modifikace kometového testu je dnes pravděpodobně jeden z nejvíce používaných testů pro hodnocení poškození DNA (Piperakis, 2009).

Dvouřetězové zlomy (DSB) je nejjednodušším typem poškození DNA, které můžeme pomocí kometového testu detekovat. Protože DSB poškození vytváří fragmenty DNA, jsme za pomoci elektroforetického testování schopni detekovat poškození, díky měření pohyblivosti těchto zlomů při neutrálním pH. Pro detekci jednořetězových zlomů (SSB) je třeba, aby obě vlákna DNA byla denaturována. Toho může být dosaženo realizací experimentu v alkalickém prostředí, konkrétně při pH kolem 12. (Piperakis, 2009).

Dalším typem poškození, které lze pomocí kometového testu detekovat, jsou tzv. alkalicky labilní místa. Toto poškození se projeví, pokud se test provádí při pH vyšším než 13 (Piperakis, 2009).

2.8 Varianty kometové analýzy

2.8.1 Alkalická verze

Alkalická varianta SCGE je oproti neutrální SCGE variantě prováděna při vysokém pH. Konkrétně se uvádí při $\text{pH} > 13$. To znamená, že vzorky jsou po inkubaci a lýze buněk vloženy do alkalického denaturačního roztoku. Samotná denaturace trvá 20 minut a je prováděna při pokojové teplotě a ve tmě. Po denuraci

přijde molekula DNA o strukturu superhelixu, což má za následek zvýšenou citlivost k poškození a je proto nutné pracovat se vzorky se zvýšenou opatrností. Další kroky se proto provádí pod žlutým světlem. Denní světlo a bílé zářivkové světlo, by mohly mít za následek poškození DNA. Konkrétně by mohlo dojít ke zlomům v DNA a tím by vzniklo poškození celého vzorku, a tudíž i ke znehodnocení celého testu. Tato varianta kometové analýzy je schopná detekovat jednovláčkové zlomy (SSB, single - strand breaks), dvouvláčkové zlomy (DSB, double - strand breaks) a alkalicky labilní místa v DNA. Alkalická verze je optimální metodou pro měření oxidativního poškození buňky a je hojně využívaná pro hodnocení účinků látek s genotoxickou aktivitou (Pu, Wang a Klaunig, 2015).

2.8.2 Neutrální verze

Neutrální modifikace kometového testu probíhá stejně jako již popsaná alkalická modifikace s tím rozdílem, že zde se test provádí při neutrální pH. (Hartley, Spanwick a Hartley, 2011).

2.8.3 Enzymy asistovaná metoda

Pokud dojde k poškození DNA, objeví se v řetězcích DNA AP místa, apurinové či apyrimidinové místo, kde chybí dusíkaté báze. Tato místa jsou alkalilabilní a působením vysokého pH dochází právě na těchto místech ke zlomům v řetězcích. Proto se pro testování specifického poškození DNA do postupu přidává krok, kdy je DNA inkubována s enzymem. Pokud enzym rozpozná AP místo, rozpozná tím konkrétní druh poškození a vytvoří zlom. Mezi enzymy, které jsou schopné detekovat taková místa, patří Endonukleáza III (Endo III). Tento enzym je schopný detekovat oxidaci pyrimidinů. Formamidopyrimidin DNA glykosyláza (FPG) je enzym, který detekuje hlavní produkt oxidace purinů. Nebo T4 endonukleáza, která je schopná rozpoznat UV světlem indukované cyklobutanové pyrimidinové dimery. Po přidání těchto enzymů se vzniklé zlomy projeví zvýšenou intenzitou ohonu komety (Collins, 2004; Dvořák, 2013).

2.9 Méně obvyklé varianty kometové analýzy

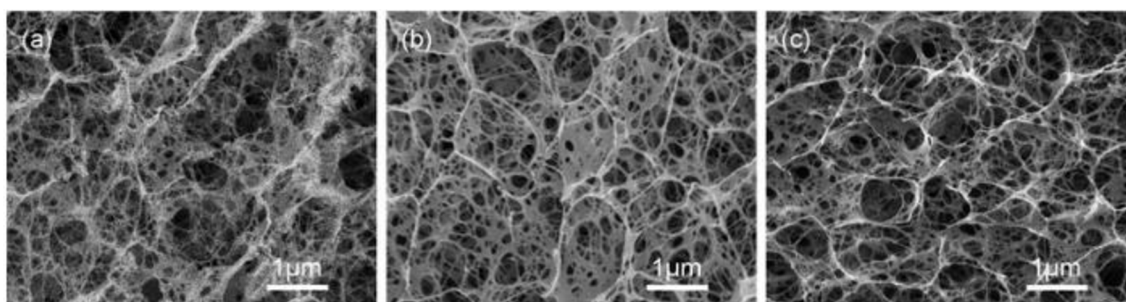
Mezi méně obvyklé modifikace kometové analýzy patří detekce replikační DNA pomocí značení bromodeoxyuridinem. Tato metoda slouží pro vizualizaci zlomů, které nejsou vidět. Protože není možné rozlišit buňky S – fáze a buňky mimo S – fázi,

což je fáze, kdy dochází k replikaci DNA, jelikož množství DNA, které se účastní replikace, je příliš malé, jsou buňky během replikace označeny pomocí bromodeoxyuridinu (BUdR). Takto označené buňky, jsou pomocí anti-BUdR protilátek viditelné v ocasu komety (Collins, 2004).

Detekce mezi-produktů při opravě DNA je další modifikací kometového testu. Tato modifikace slouží k detekci produktů, které mají velmi krátkou životnost. Při inkubaci buněk poškozených zářením s DNA syntézou blokujícími inhibitory jako je hydroxyureaou, cytarabinem nebo aphidicolinem jsou blokovány receptory pro reparaci DNA. To má za následek akumulaci zlomů, což poskytuje citlivou metodu, pro detekci účinků poškozující léčby (Cordelli, Bignami a Pacchierotti, 2021).

2.10 Příprava vzorků

Příprava vzorků spočívá v tom, že vybrané vzorky jsou po určitou dobu vystaveny působení zkoumané potenciálně genotoxické látky. Takovou látkou může být například peroxid vodíku, kyslíkové radikály, těžké kovy nebo, nová léčivá forma. Po uplynutí předepsané doby se roztok stočí v centrifuze a odeberou se buňky, které jsou díky působení mutagenu poškozeny. Smíchají se s LMP (low melting point) agarózou a jsou nanášeny na připravené podložní sklíčko, které je potaženo běžným typem agarózy. Díky smíchání buněk s LMP agarózou jsou buňky po zaschnutí imobilizovány v polymerní síti agarózy (viz obr. 2), což umožňuje separaci různě dlouhých fragmentů DNA při působení stejnosměrného elektrického pole (Dvořák, 2013).

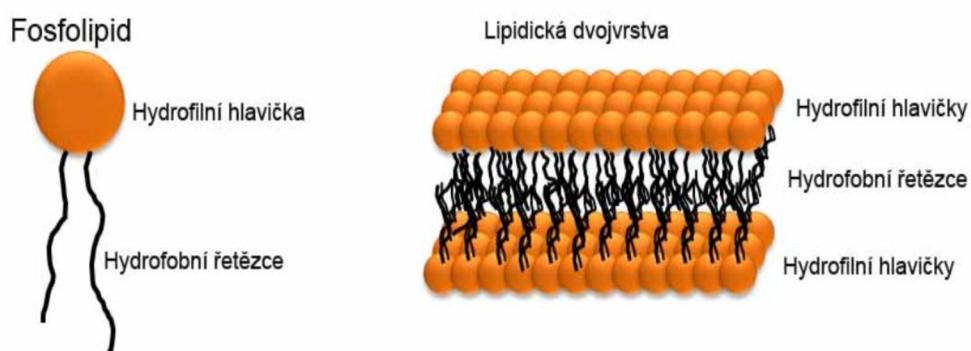


Obrázek 2: Struktura agarového gelu pod mikroskopem (Mao, Divoux a Snabre, 2016)

2.11 Lýza buněk

Při lýze buněk dochází k narušení nebo rozpuštění buněčné membrány. U metody comet assay se pro lýzu buněk používá nejčastěji detergent s vysokým obsahem soli

(Cook, Brazell a Jost, 1976). Detergent se zabudovává do plazmatické membrány buněk, čímž rozruší její strukturu, membrána se následně rozpadá a obsah buňky je uvolněn do prostředí. Mechanismus narušení buněčné membrány spočívá v tom, že buněčné membrány jsou tvořeny fosfolipidy, které jsou stejně jako detergenty tvořeny dvěma částmi. Část hydrofilní a část hydrofobní. Takto tvořené látky můžeme nazvat jako amfipatické. V buněčné membráně jsou dva hydrofobní řetězce navázány na nabitou hydrofilní hlavičku. Dvouvrstvou tvoří interakce mezi hlavičkami a řetězci (viz obr. 3) (Brown a Audet, 2008).



Obrázek 3: Popis fosfolipidu a ložení fosfolipidové dvojvrstvy (LabGuide.cz, 2023)

Po přidání detergentu do roztoku s buňkami dochází k integraci mezi membránou buněk a molekulami detergentu. Molekuly detergentu se stávají součástí buněčné membrány. Pokud je koncentrace detergentu dostatečně vysoká, je membrána nasycená detergenty a dochází k jejímu rozpadu. Po rozpadu membrány může obsah buňky volně vycestovat do roztoku (Brown a Audet, 2008).

2.12 Denaturace

Jedná se o proces, kdy se zlyzované vzorky vloží do denaturačního roztoku, který má za následek „rozpletení“ DNA, tj. DNA je zbavená podoby superhelixu. Při denuraci přijde molekula DNA o strukturu superhelixu, což má za následek zvýšenou citlivost k poškození a je proto nutné pracovat se vzorky se zvýšenou opatrností. Další kroky se proto provádí pod žlutým světlem. Denní světlo a bílé zářivkové světlo, by mohly mít za následek poškození DNA. Konkrétně by mohlo dojít ke zlomům v DNA a tím by vzniklo poškození celého vzorku, a tudíž i ke znehodnocení celého testu. Také to má za následek to, že dojde k „rozpletení“ prostorově složité struktury DNA a fragmenty

a poškozené části DNA mohou v elektrickém poli cestovat, podle jejich polarity (Piperakis, 2009; Dvořák 2013).

2.13 Elektroforéza

Elektroforéza je skupina separačních a analytických metod, které jsou založeny na pohybu biomakromolekul (DNA, RNA, proteiny) a jejich fragmentů ve stejnosměrném elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti či náboji. Jsou to běžně používané metody, které se používají v klinické chemii, biochemii a molekulární biologii pro oddělení a analýzu zkoumaných molekul. Rozlišujeme několik druhů elektroforéz podle média, ve kterém dochází k separaci molekul (Ostling a Johanson, 1984).

Volná elektroforéza je druh elektroforézy, kde k separaci molekul dochází ve vodě. Molekuly se separují v závislosti na náboji, kdy částice putují k elektrodě opačné polarity (Patel a Beveridge, 2003).

Zónová elektroforéza funguje na stejném principu jako volná elektroforéza, ale využívají se zde nosiče. Nosiče jsou hydrofilní porézní látky s co nejmenšími absorpčními schopnostmi. Dnes se jako nosiče používají především gely. A to agarózový gel a polyakrylamidový gel. Gely se při testu připravují čerstvé a stupeň jejich zesíťování je možné ovlivnit koncentrací rozpuštěného nosiče (Bradburne, 2014).

Gelová elektroforéza, jak již z názvu vypovídá, používá pro separaci molekul gel, a to buď v podobě agarózy nebo polyakrylamidu. Fragmenty molekul se oddělují působením stejnosměrného elektrického pole. Molekuly jsou „uvězněny“ v agarovém gelu, který tvoří pórovitou matici (sít'). Po vystavení molekul elektrickému poli dochází k migraci molekul směrem k elektrodě opačného náboje. Díky pórům, které se nachází v agaróze prochází malé molekuly a fragmenty snadněji a rychleji než ty velké. Agaróza se používá především pro separaci a analýzu proteinů velikosti větší než 200 kDa a DNA o velikosti od 50 bp (párů bází) do několika Mbp. Polyakrylamidový gel se využívá především pro separaci a analýzu proteinů o velikosti od 5 do 2 000 kDa (Kunkel, 2006; Bradburne, 2014).

2.14 Neutralizace

Neutralizace je chemická reakce, při níž dochází k reakci kyseliny a zásady. Při tomto ději dojde k dosažení neutralizačního bodu, což odpovídá pH 7. K vyjádření charakteru látky se používá pH, též vodíkový exponent. Právě toto označení vyjadřuje

v chemii, jestli látka bude reagovat kyselé nebo zásaditě. Jedná se o logaritmickou stupnici s hodnotami od 0 až 14, kdy látky, jejichž pH je < 7 se označují jako kyselé. Látky s pH 7 se označují jako neutrální a látky s pH > 7 se označují jako zásadité.

U kometového testu se neutralizace provádí z důvodu odstranění přebytečného alkalického pufru, který byl použitý při elektroforéze, aby bylo dosaženo vhodných podmínek pro barvení (Zumdahl, 2009).

2.15 Vizualizace a barvení DNA

Aby bylo možné vzorky na mikroskopu vyhodnotit, je potřeba je vhodně obarvit. V původním postupu od Ostlinga a Johansona byla použita akridinová oranž (Ostling a Johanson, 1984). Princip detekce na mikroskopu spočívá v ozáření gelu ultrafialovým světlem, pod kterým barvicí látka navázaná na DNA emituje světlo.

Původní postup využil barvení pomocí ethidium bromidu (Singh et al. 1988). Ethidium bromid se do DNA váže pomocí vmezeření mezi jednotlivé báze DNA. Tento děj se také nazývá interkalace. Vzhledem k popisu vazby barviva na DNA se jedná o silný mutagen.

Dalším barvivem, které se používá pro barvení, jsou Hoechstova barviva. Například barvivo Hoechst 33342 (Liu, Trimachi a Keefe, 1999). Tato barviva se vážou do žlábků DNA, do míst bohatých na adenin a thymim. O bezpečnosti barviva se vedou debaty. Jedná se o potenciální mutagenní a karcinogenní látku.

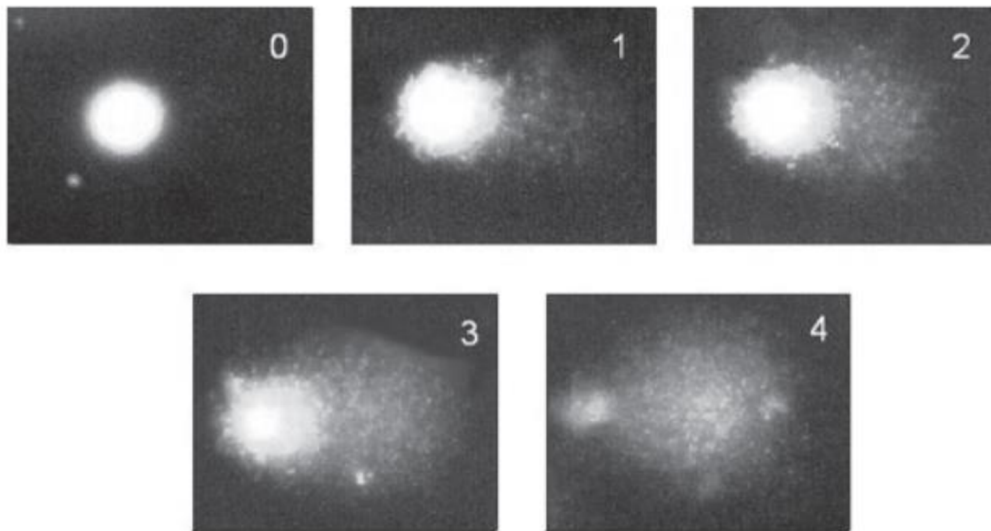
Méně používaným barvivem je DAPI barvivo (Gedik, Ewen a Collins, 1992). Toto barvivo se používá v mikroskopii pro barvení jader, pro jeho schopnost silné fluorescence a schopnosti procházet přes buněčné membrány. Nejsilněji se barvivo DAPI váže na místa bohatá na adenin a thymin. V bezpečnostním listu je DAPI označeno jako netoxické.

2.16 Hodnocení poškození DNA v rámci comet assay

Hodnocení poškození DNA se u nasnímaných vzorků, které jsou pořízeny kamerou mikroskopu, dá provádět několika způsoby. Jedním ze způsobů, jak vyhodnotit nasnímané buňky je pomocí lidského zraku. Takové hodnocení se označuje jako „visual sensing“. Nasnímané komety jsou rozřazeny do kategorií podle délky a intenzity ohonu komety. Největší výhodou tohoto způsobu hodnocení je časový faktor. Komety se dají poměrně rychle vyhodnotit oproti použití počítačového softwaru, avšak je zde faktor

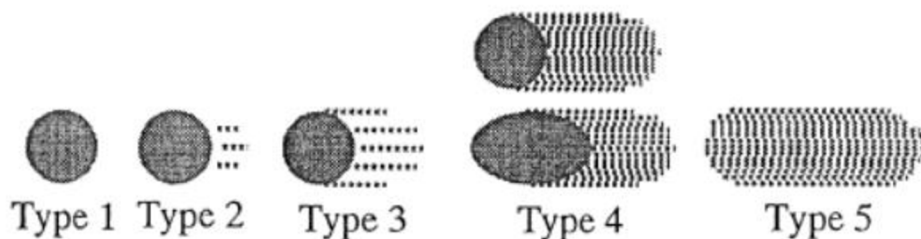
subjektivního názoru, kdy dva jedinci mohou u stejného vzorku zařadit kometu do jiné kategorie (Kumaravel et al., 2009).

Hodnocení dle Collinse (Collins, Ai-guo a Duthie, 1995) se provádí pomocí rozřazení jednotlivých komet do 5 kategorií. Kategorie jsou označeny čísly od 0 do 4, kdy kategorie 0 je pro vzorky, které netvoří žádné komety, tudíž nedošlo k poškození DNA. Kategorie 4 je pro vzorky, kde většina DNA je obsažena v ohonu komety, tudíž došlo k velkému poškození DNA (viz obr. 4).



Obrázek 4: Kategorie poškození podle Collinse (Collins 2004)

Podobné rozřazení je použito pro hodnocení poškození dle Kobayashiho (Kobayashi et al., 1995). Zde jsou nasnímané komety rozřazeny do kategorií 1-5 (viz obr. 5), které odpovídají stejným kritériím jako hodnocení dle Collinse.



Obrázek 5: Kategorie poškození podle Kobayashiho (Kobayashi et al., 1995)

Druhým způsobem hodnocení poškození je pomocí speciálního počítačového softwaru. Existuje celá řada jak freeware, tak komerčních programů, které umí poškození vyhodnotit. Největší výhodou hodnocení s použitím softwaru je, možnost měření hned

několika markerů (parametrů). Parametry jako je délka ohonu (tail length), procentuální zastoupení DNA v ohonu (% tail DNA) a „tail movement“ jsou nejběžněji používanými markery pro hodnocení poškození. U markeru „tail movement“ je nutné rozlišovat „tail moment“ a „olive tail moment“. *“Tail moment je definován jako % tail DNA x tail length, tedy procenta DNA v ohonu násobená délkou ohonu. Olive tail moment je definován jako % tail DNA x (tail mean X – head mean X), tedy procenta DNA v ohonu násobená vzdáleností mezi těžišti DNA v ohonu a hlavě“* (Dvořák, 2013). Nejdoporučovanějším parametrem pro hodnocení poškození DNA je délka ocasu (tail length). Uvádí se, že tento parametr je dostatečný a natolik robustní, že je schopný sám o sobě hodnotit poškození. (Collins 2004; Olive 2002) Je to z důvodu, že tento parametr je ze všech ostatních nejméně ovlivnitelný vnějšími faktory a má nejširší možný rozsah a to 0–100 % DNA v ohonu. Nevýhodou tohoto hodnocení může být překryv komet, které jsou pro počítačový software nerozpoznatelné.

Obě metody hodnocení poškození jsou při přímém porovnání vzájemně korelující, avšak počítačová analýza pomocí softwaru je citlivější, právě díky měření několika markerů (Ladeira et al. 2005). Výběr metody hodnocení poškození je tedy na preferenci testovatele a na povaze testu.

2.17 Využití metody comet assay při hodnocení léčiv a nových lékových forem

Kometový test je běžně používaná metoda, která slouží k hodnocení genotoxicity látek. Pomocí této metody lze také hodnotit oxidační poškození buněk, které vzniká jako následek nejrůznějších onemocnění. Mezi taková onemocnění patří neurodegenerativní onemocnění, například Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba či Parkinsonova choroba. Dále kardiovaskulární onemocnění, kam patří ischemická choroba srdeční, cerebrovaskulární onemocnění a onemocnění periferních cév. Oxidační poškození buněk se hodnotí také při onemocnění diabetes mellitus (Migliore et al., 2005; Fearon a Faux 2009; Şardaş et al., 2001).

V roce 2019 byla publikována práce, která se zabývá studiem účinků fotodynamické terapie s podáním fotosenzitivních látek na nádorové buněčné linie. Fotodynamická terapie (PDT) je druh terapie, která spočívá v reakci fotosenzitivní látky se zářením určité vlnové délky. Tyto fotosenzitivní látky mají tendenci se více zdržovat v nádorové tkáni než ve zdravé tkáni. Po podání se látka pro imunitní systém

„neviditelná“ a tedy nezpůsobuje žádnou imunitní odpověď. Fotosenzitivní látka vlivem záření o určité vlnové délce mění svůj charakter, který už je pro organismus cizí. Tato změna vyvolá imunitní reakci, což má za následek likvidaci takových látek. V této publikaci byly použity dva deriváty ftalocyaninu, konkrétně se jednalo o nekovový (2HPc) a zinečnatý (ZnPc) derivát, za záměrem analýzy poklesu životnosti 2 nádorových a 2 nenádorových buněčných linií. Jednalo se o karcinogenní linie buněk typu (MCF7 – adenokarcinom prsu, HeLa – karcinom děložního čípku a nenádorové linie buněk typu BJ – lidské fibroblasty, HaCat – keratinocyty). Byla stanovena koncentrace, při níž došlo ke snížení životnosti o 50 %, pro každou buněčnou linii a fotosenzitivní látku. Bylo zjištěno, že obě fotosenzitivní látky způsobovaly úhyn buněk při použití plošné hustoty světelné energie 5 Jcm^{-2} . Z výsledků analýzy bylo zjištěno, že zinečnatý derivát je oproti nekovovému derivátu účinnější na všech buněčných liniích. Největší účinnost měl tento zinečnatý derivát u nádorové linie děložního čípku, proto byl vybrán na další testování. Při následném testování byl tedy použit zinečnatý derivát, jehož koncentrace byla 30nM a plošná hustota světelné energie 5 Jcm^{-2} , jelikož se tato kombinace jevila jako velmi nadějná. Byla provedena analýza účinku této kombinace na cytoskeletální strukturu, na mitochondriální membránový potenciál, na míru fragmentace DNA a na produkci kyslíkových radikálů, které vznikají I. a II. typem fotodynamické reakce. Pro detekci fragmentů DNA byl použit kometový test. Po vyhodnocení těchto testů bylo zjištěno, že tato kombinace energie a fotosenzitivní látky se jeví jako velmi perspektivní pro analýzu *in vivo* účinků na karcinom děložního čípku na zvířecích modelech, popřípadě pro zařazení této kombinace do klinických studií (Hošíková, 2019).

V roce 2022 byla publikována studie, která se zabývá potenciální genotoxicitou nanobiomateriálů využívající alkalického kometového testu pro určení genotoxicity. Nanobiomateriály jsou materiály, jejichž velikost se pohybuje v rozmezí od 1 – 100 nm. Tyto materiály jsou intenzivně studovány pro aplikace v medicíně a pro podávání léčiv, kdy se uplatňují jako nosiče léčiv. Vzhledem k velikostem těchto látek, jsou tyto látky náchylné k toxicitě. Zatímco imunotoxicita a cytotoxicita nanomateriálů jsou podrobně prostudovány, údaje o genotoxicitě jsou stále podrobně studovány. Do práce bylo vybráno a hodnoceno 5 různých nanobiomateriálů, z nichž každý má jiné použití. Konkrétně se jednalo o biologicky odolnou zlatou nanočástici (AuNP), liposom s barvivem IR-780, který se používá při zobrazování hlubokých tkání (LipImage™815), nenabitou polymerní nanočástici PACA (polyalkyl kyanoakrylát) používanou jako systém pro doručování

léčiv (PACA) a dva NBM s nabitou PACA, tj. PACA nabitý léčivem kabazitaxelem (CBZ-PACA) a PACA nabitý barvivem NR668 (NR668 PACA) (Tutty et al., 2022).

Různé dosud publikované studie uvádějí genotoxicitu kovových nanočástic s tím, že různé velikosti AuNPs vykazují genotoxicitu v závislosti na velikosti, přičemž aktivní jsou pouze AuNPs s menšími stranami. Xia a kol. prokázali že, zlomy vláken DNA silně závisely na velikosti AuNPs, přičemž větší částice (20 nm a 50 nm) nevykazovaly žádné markantní poškození DNA, zatímco menší AuNPs, (5 nm,) vyvolávaly poškození DNA v závislosti na dávce. To je v souladu s dalšími studii prokazujícími genotoxicitu AuNPs. Jak bylo prokázáno v této studii, buňky HepG2 inkubované s 20 nm AuNP nezpůsobily žádné znatelné poškození DNA ve všech koncentracích pro každý časový bod. Všechny hodnoty % ocasu zůstávají pod 5 %, což je v souladu s kritérii přijatelnosti (tj. <10 % DNA v ocasu) (Tutty et al., 2022).

Liposomy jsou obecně považovány za netoxické, biokompatibilní a bylo prokázáno, že ve skutečnosti maskují část genotoxického potenciálu léčiva nebo materiálů, které zapouzdřují. Při inkubaci s liposomem IR-780 LipImage™815 nevykazují buňky HepG2 žádné významné poškození DNA (tj. < 10 % ocasu) při všech testovaných koncentracích od 10 do 500 µg/ml. Nicméně všechny koncentrace nad 10 µg/ml vykazovaly mírně vyšší hodnoty % ocasu DNA než neošetřená negativní kontrola (1,73-2,45 % ocasu), ačkoli zůstaly pod 10 % poškozením DNA, což je v souladu s kritérii přijatelnosti pro negenotoxický materiál. LipImage™815 však vykazoval vyšší hodnoty % ohonů komet než AuNP a také nezatížený PACA uvedený níže (Tutty et al., 2022).

Zatímco PACA, polymerní nanočástice, se ukázala jako velmi slibný nosič léčiva jak pro solidní nádory, tak pro léčivo, které prochází hematoencefalickou bariérou, způsob její potenciální toxicity není dostatečně konzistentní a musí být ještě plně objasněn. Ještě méně informací je k dispozici o schopnosti této látky vyvolat poškození DNA. Podobně jako ostatní testované přípravky nevyvolal PACA významné poškození DNA, přičemž všechny pozorované hodnoty % ocasu pro všechny koncentrace zůstaly nižší než 10 % poškození DNA, což je v souladu s kritérii přijatelnosti. Kratší inkubační doby (30 min a 3 h) vykazovaly vyšší hodnoty % ocasu než 24hodinová inkubace (Tutty et al., 2022).

Poslední dva experimenty byly rozšířeny o další dva přípravky PACA, a to PACA s CBZ a PACA s NR668. Ze všech předložených výsledků vykazoval CBZ-PACA největší toxicitu (samotný CBZ byl agenturou EMA považován za genotoxický). Po 30minutové inkubaci nebylo pozorováno žádné významné poškození DNA,

avšak po ošetření 20 a 50 $\mu\text{g/ml}$ bylo pozorováno % poškození DNA nad kritérium přijatelnosti a po ošetření 5, 10, 20 a 30 $\mu\text{g/ml}$ po 24 hodinách bylo nad kritérium přijatelnosti (všechny ostatní koncentrace byly blízko prahové hodnoty). Je možné, že se jedná o důsledek úniku CBZ z PACA. Nilská červeň (NR668) je netoxické a dobře tolerované barvivo. Po 30 minutách ani po 3 hodinách po inkubaci s PACA zatíženým NR668 nebylo pozorováno žádné poškození DNA, přičemž hodnoty % DNA v ocasu byly po 24 hodinách pouze nad kritériem přijatelnosti pro největší koncentraci, 50 $\mu\text{g/ml}$ (Tutty et al., 2022).

V roce 2004 byla publikována práce, která pojednává o genotoxicitě chemoterapeutika paklitaxel. Paklitaxel je protinádorový lék, patřící do skupiny taxanů, což je skupina látek, které jsou získávány z tisu. Jejich protinádorový účinek spočívá v tom, že působí na dělicí vřetenko během buněčného dělení. Látka působí na mikrotubuly, čímž zabrání jejich depolymeraci, stabilizuje mikrotubuly, během buněčného dělení a tím také zabrání transportu chromozomů k pólům dělicí se buňky. Tímto mechanismem zablokuje buněčné dělení. Cílem této studie bylo posoudit, zda chemoterapeutikum paklitaxel může vyvolat poškození DNA v lymfocytech periferní krve zdravých lidských dárců a zda lze toto poškození opravit. Venózní krev byla odebrána běžnou venepunkcí, lymfocyty byly izolovány a kultivovány a poté byly po dobu 4 h ošetřeny 100 nM, 500 nM, 10 μM a 30 μM taxolu. Ke kvantifikaci úrovně poškození DNA a reparace DNA v lymfocytech byla použita technika alkalického kometového testu. Výrazného zvýšení poškození DNA bylo dosaženo při inkubaci buněk s paklitaxelem o koncentraci 10 μM nebo vyšší. Pro testování schopnosti opravy DNA byly lymfocyty ponechány k zotavení po dobu 2, 4, 6 a 24 h. Poškození DNA bylo téměř úplně opraveno po 24 h inkubace, což prokazuje schopnost opravy v závislosti na čase. Závěrem jsme prokázali, že paklitaxel vyvolává poškození DNA v lymfocytech periferní krve a že toto poškození lze opravit (Branham et al., 2004).

V roce 2015 byla publikována studie, která se zabývá potenciální genotoxicitou antineoplastických léků. Antineoplastické léky jsou nebezpečné chemické látky, které se většinou používají při léčbě pacientů s rakovinou, avšak zdravotníci, kteří s těmito léky manipulují a podávají je, mohou být vystaveni jejich působení a může u nich dojít k poškození DNA. Pro testování genotoxicity byl použit kometový v kombinaci s enzymem formamidopyrimidinovou DNA glykosylázou (FPG), který specificky detekuje oxidační poškození DNA. Cílem této studie bylo zkoumat genotoxické účinky u pracovníků profesně exponovaných cytostatikům ve srovnání s kontrolní skupinou

bez expozice ve dvou portugalských nemocnicích pomocí alkalického kometového testu. Expozice byla hodnocena zkoumáním kontaminace povrchů a genotoxické hodnocení bylo provedeno pomocí testu alkalické komety v lymfocytech periferní krve. Co se týče hodnocení expozice, z celkového počtu 327 analyzovaných vzorků z obou nemocnic bylo 121 (37 %) vzorků pozitivních. Mezi subjekty s expozicí a bez expozice nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly, pokud jde o poškození DNA a oxidační poškození DNA, nicméně exponovaná skupina vykazovala vyšší hodnoty. Studie nebyla statisticky významná, pokud jde o profesní expozici antineoplastickým léčivům a genetické poškození hodnocené pomocí kometového testu. Zdravotničtí pracovníci by však měli být sledováni z hlediska rizikového chování, aby bylo zajištěno uplatňování bezpečnostních opatření a správné používání ochranných prostředků (Ladeira et al., 2015).

3 Praktická část

3.1 Cíle a výzkumné předpoklady/otázky

Cílem praktické části této bakalářské práce je empirické ověření vlivu složení lyzačního pufru na výsledky comet assay. Na základě literárního průzkumu byly zvoleny tři lyzační pufrы. Následně bylo ověřeno, jaký lyzační pufr je optimální pro realizaci analýzy poškození DNA u savčích buněk – tedy jak složení lyzačního pufru ovlivňuje délku „ocasů komety“.

3.2 Přístrojové vybavení a laboratorní spotřební materiál

Analytické váhy – ABJ – NM/ABS – N (Kern)

Elektroforetická aparatura – Sub – Cell GT (Bio-RAD)

Fluorescenční mikroskop DMi 8 (Leica)

Inkubátor FrioCell

Magnetické míchačka s ohřevem – MR Hei – Standard (Heidolph)

Laboratorní pH metr – Orion STAR A111 (Thermo Scientific)

Pipety řady research plus (Eppendorf)

Software pro analýzu snímků – CommetScore 2.0, CasP

Software pro mikroskop – LAX (Leica)

Zdroj destilované vody – Smart 2 pure s vodivostí 0,055 μ S/cm (Thermo Scientific)

Zdroj pro elektroforézu – PowerPac Basic 300 V/400 mA/75 W (Bio-RAD)

Zdroj lampy k mikroskopu – Ebg – 100 – 04 (Jena)

3.3 Seznam chemikálií a biologického materiálu

β -merkptoethanol – HOCH₂CH₂SH (SIGMA, CAS: 60-24-2)

Agaróza (SIGMA, CAS: 9012-36-6)

Cetrimoniumbromid – CTAB (C₁₉H₄₂BrN) (SIGMA, CAS: 57-09-0)

Chlorid draselný – KCl (PENTA, CAS: 7447-40-7)

Chlorid sodný – NaCl (PENTA, CAS: 7647-14-5)

DAPI (barvivo) – C₁₆H₁₅N₅ (SIGMA, CAS: 28718-90-3)

Dihydrogenfosforečnan draselný – H₂KPO₄ (VWR, CAS: 7778-77-0)

Fetální bovinní sérum – FBS (Gibco)

Hoechstovo barvivo, Hoechst 33342 – bisbenzimid ($C_{27}H_{31}C_{13}N_6O$) (SIGMA, CAS: 875756-97-1)

Hydrogenfosforečnan didodný – Na_2HPO_4 (PENTA, CAS: 7558-79-4)

Hydroxid sodný – $NaOH$ (SIGMA, CAS: 1310-73-2)

Kolonie myších 3T3 fibroblastů

Kultivační buněčné médium – DMEM (Sigma)

Kyselina boritá – H_3BO_3 (PENTA, CAS: 10043-35-3)

Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (SIGMA, CAS: 60-00-4)

LMPA (nízkotající) agaróza (SERVA, CAS: 9012-36-6)

Peroxid vodíku – H_2O_2 (PENTA, CAS: 7722-84-1)

Roztoky pro kalibraci pH metru

Tris(hydroxymethyl)aminomethan – TRIS (VWR, CAS: 77-86-1)

Triton X-100 – $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ (FOSS, CAS: 9036-19-5)

3.4 Příprava roztoků

Zásobní lyzační pufr 1: 146 g NaCl

12,114 g Tris

200 ml 0,5M EDTA

Doplnit ddH₂O na 1 L

Před použitím se k 49,5 ml tohoto lyzačního pufru přidá 0,5 ml tritonu.

Lyzační pufr 2: 30 mL CTAB (10% v ddH₂O)

8,766 g NaCl

1,5756 g Tris

4 ml 0,5M EDTA

0,2 ml β-merkptoethanol

Doplnit ddH₂O na 100 ml

Lyzační pufr 3: 25 ml 10xTBE

12,5 g SDS

doplnit ddH₂O na 500 ml

10xPBS: 80 g NaCl

2 g KCl

2,1 g H₂KPO₄

3,9 g Na₂HPO₄

doplnit ddH₂O na 1 L

pro získání 1xPBS se smíchá 100 ml 10xPBS s 900 ml ddH₂O

10xTBE: 108 g Tris

55 g H₃BO₃

40 ml 0,5M EDTA

doplnit ddH₂O na 1 L

pro získání 1xTBE se smíchá 100 ml 10xTBE s 900 ml ddH₂O

pro elektroforézu se 1xTBE upraví pomocí HCl na pH 8,3

Denaturační roztok: 12 g NaOH

2 ml 0,5M EDTA

doplnit ddH₂O na 1 L

Neutralizační roztok: 24,228 g Tris

upravit pH pomocí HCl na 7,5

doplnit ddH₂O na 500 ml

Zásobní roztok 0,5M EDTA: 146,12 g EDTA

upravit pH na 8 pomocí NaOH

doplnit ddH₂O na 1 L

Barvivo DAPI: 28 µl ze zásobního roztoku (koncentrace 2,5 mg/ml)

doplnit ddH₂O na 70 ml

3.5 Postup experimentu

Schéma postupu experimentu je uvedeno na obrázku níže. Dle tohoto schématu byly provedeny všechny experimenty realizované v této práci. Výjimku tvořily

experimenty provedené za účelem optimalizace metody z hlediska koncentrace peroxidu vodíku a při volbě vhodného postupu barvení DNA.



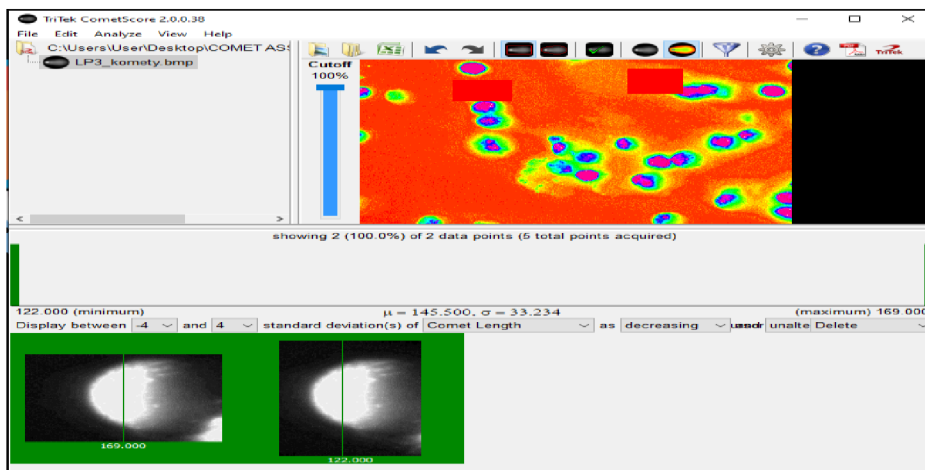
Obrázek 6: Schéma postupu kometového testu (vlastní fotografie)

Prvním krokem pracovního postupu je příprava podložních sklíček. Na ta je nanese tenká vrstva 1% agarózy rozpuštěné ve vodě. Na tuto vrstvu jsou následně nanese buňky v tenké vrstvě agarózy se sníženou teplotou tání (LMPA). Před tímto krokem jsou buňky inkubovány s 50 μM H_2O_2 po dobu 1 hodiny. Poté jsou stočeny při 900 g po dobu 5 min. Supernatant je odstraněn a peleta buněk je resuspendována v 1xPBS (10 ml 10xPBS + 2 ml 0,5 mol/l EDTA doplnit do 88 ml ddH₂O). Před samotným nanesením buněk na sklíčko je 50 μL resuspendovaných buněk smícháno s 200 μL 0,8% LMPA rozpuštěné v 1xPBS. Na připravené podložní sklíčko s agarózou je pak nanese 70 μL této suspenze, která se ihned zafixuje krycím sklíčkem a nechá ztuhnout. Po ztuhnutí jsou sklíčka s agarózou vložena na jednu hodinu do příslušného lyzačního pufru a do chladu. Po inkubaci v lyzačním pufru se sklíčka opláchnou ddH₂O a poté 1xPBS. Následně se vloží na 20 minut do denaturačního roztoku a do tmy. Poté jsou vzorky opláchnuty v ddH₂O a nechají se inkubovat 5 minut v 1xTBE. Po uplynuté době se vzorky vloží do elektroforetické vany s vychlazeným 1xTBE pufrům s pH 8,3,

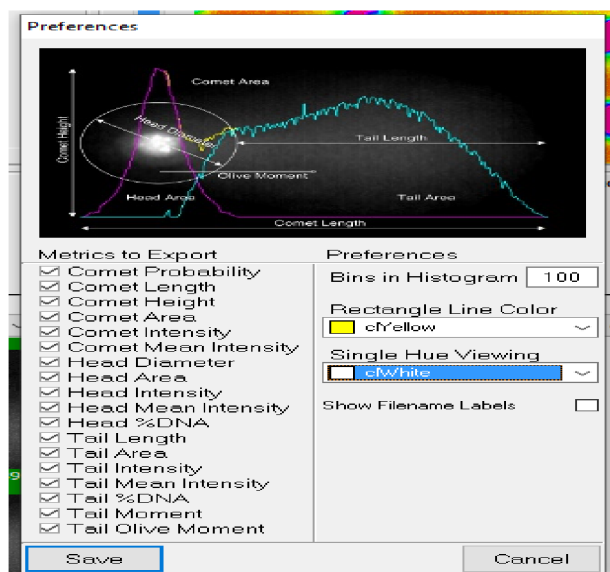
nastaví se parametry elektroforézy v závislosti na vzdálenosti elektrod (1 V/cm) a spustí se na 30 minut. Po elektroforéze se vzorky vloží na 3x5 minut do neutralizačního pufru, který se po 5 minutách vymění za nový. Následně se vzorky ponechají 5 minut v ddH₂O. Po vyjmutí se k vzorkům přidá k nim 10 ml barviva DAPI. Roztok barviva má koncentraci 1 µg/ml. Po přidání barviva se vzorky inkubují ve 37 °C po dobu 25 minut. Následně se promyjí v 1xPBS, nechají oschnout. Takto připravené vzorky jsou umístěny do fluorescenčního mikroskopu a je provedeno snímání na následnou analýzu (viz obr. 6).

3.5.1 Analýza komet

Analýza nasnímaných dat proběhla v případě této bakalářské práce prostřednictvím počítačového programu CometScore 2.0. (viz obr. č. 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16). Pomocí tohoto softwaru bylo změřeno a analyzováno 60 buněk pro každý lyzační pufr. Byla měřena délka ohonu komety. Následně byla data staticky zpracována v programu excel a porovnána. Ukázka analýzy snímků v programu CometScore je uvedena na obrázcích níže.



Obrázek 7: Ukázka prostředí aplikace CometScore 2.0 (vlastní fotografie)



Obrázek 8: Možnosti nastavení preferencí v aplikaci CometScore 2.0 (vlastní fotografie)

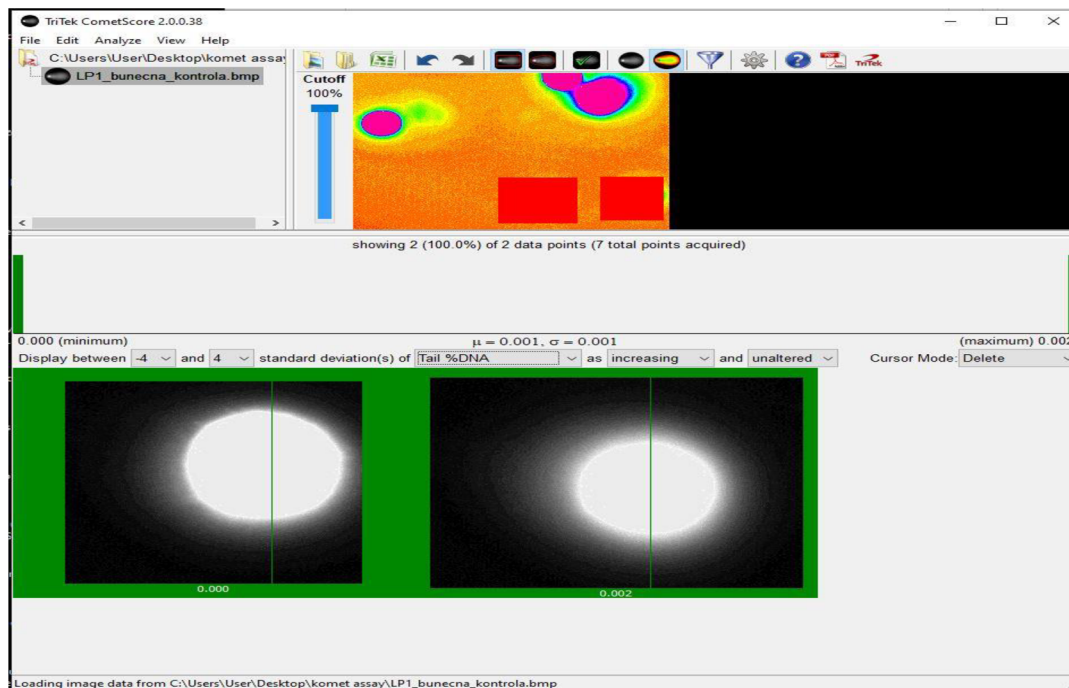
3.6 Dosažené výsledky

U všech testovaných lyzačních pufrů (LP1 – LP3) byla kultivace buněk 3T3 a jejich expozice roztoku peroxidu provedena za shodných podmínek. Narušení řetězců DNA u adheovaných buněk bylo zajištěno expozicí 50 μM H_2O_2 po dobu 1 hodiny. Na sklíčko bylo nanášeno vždy 50 000 buněk. Vizualizace buněk byla provedena barvením DAPI. Koncentrace peroxidu vodíku a barvivo byly zvoleny na základě optimalizačních kroků. Ty jsou popsány v kapitole 3.8. Rozměr ohonu komety v pixelech, stejně jako jeho podíl (%) z celkové délky komety byly generovány přímo měřením v programu CometScore 2.0.

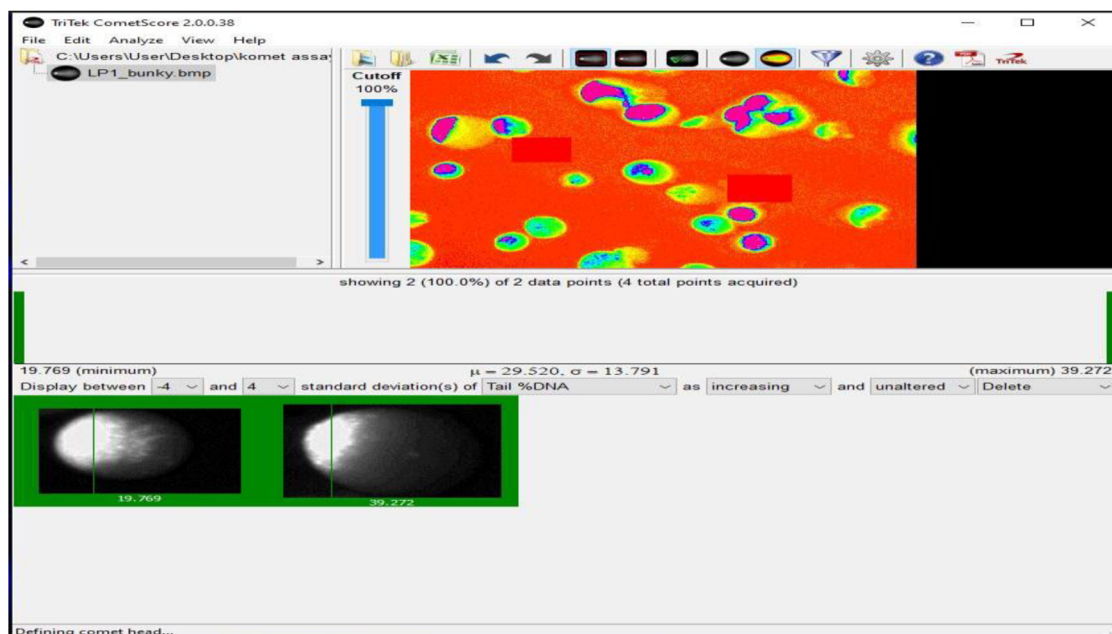
3.6.1 Lyzační pufr 1

U lyzačního pufru 1 byla střední délka ohonu komety rovna 65,500 px a 13,153 %. Směrodatná odchylka byla rovna 78,043 px a 14,423 %. Po nasnímání na fluorescenčním mikroskopu bylo zjištěno, že ne všechny buňky byly dostatečně lyzovány. Konkrétně u 30 nasnímaných buněk bylo změřeno, že délka ohonu komety byla menší než 10 %, což je v souladu s kritérii přijatelnosti (tj. <10 % DNA v ocasu). To znamená, že polovina buněk z celého souboru 60 analyzovaných buněk mělo délku ohonu komety pod 10 %. U šesti analyzovaných buněk byla délka ohonu komety nad 40 %. Konkrétně se jednalo o hodnoty 40,523 % , 40,644 % , 41,330 % , 41,330 % , 43,273 % , 48,523 %. Poslední jmenované číslo je také zároveň vzorek s nejdelší kometou, která byla inkubací lyzačním pufru 1 dosažena (viz obr. 11, 12).

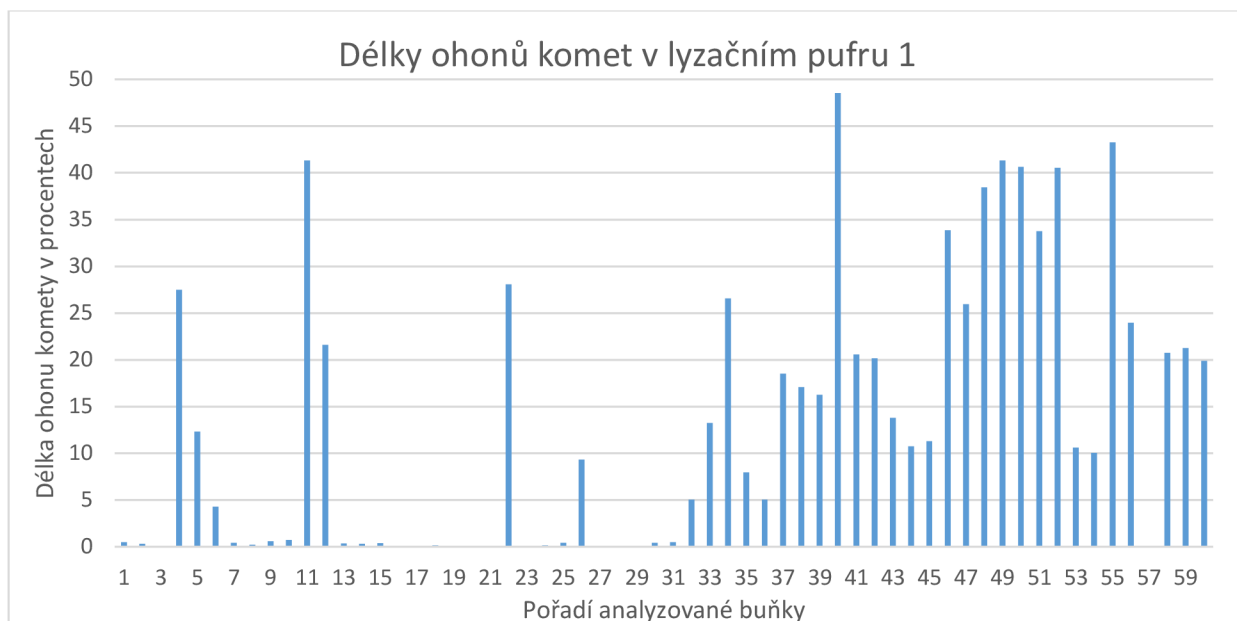
Buňky negativní kontroly, tedy buňky nevystavené působení H_2O_2 , netvořily žádné komety (viz obr. 9).



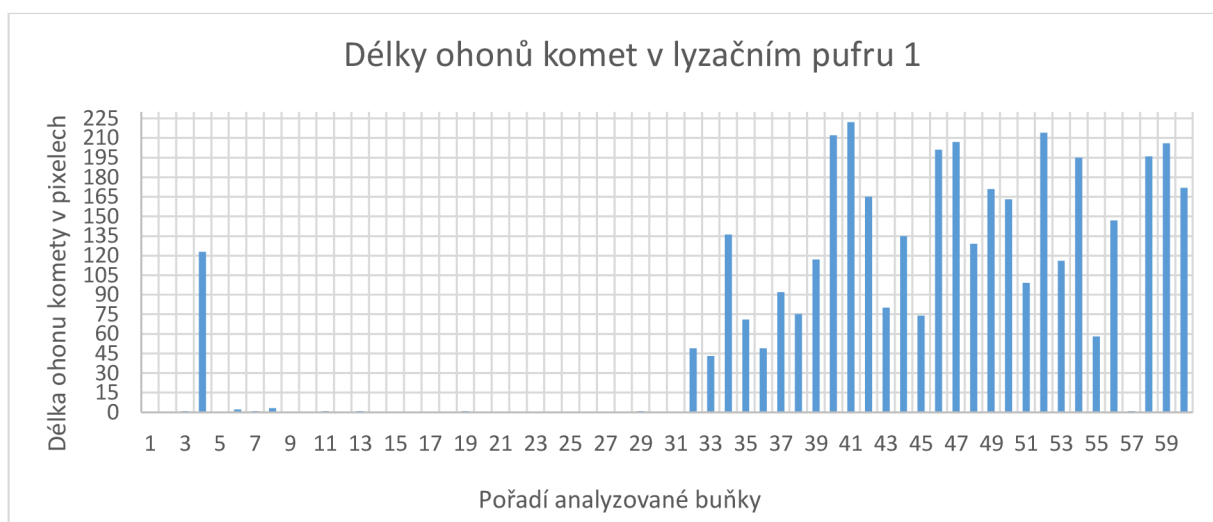
Obrázek 9: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)



Obrázek 10: Ukázka snímku analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)



Obrázek 11: Graf znázorňující délky ohonů komet v procentech v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)



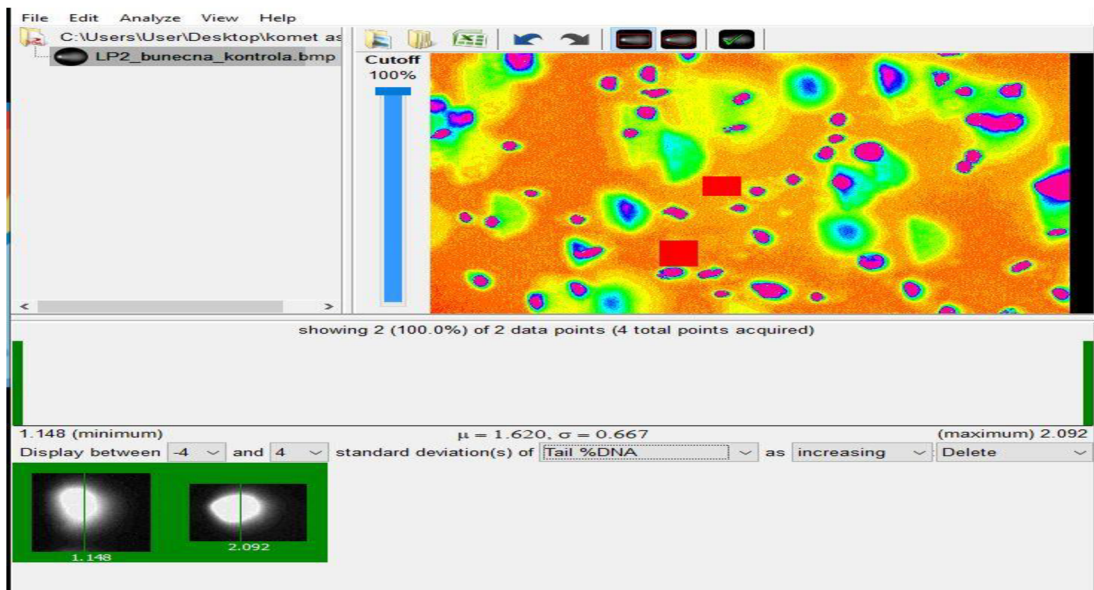
Obrázek 12: Graf znázorňující délky ohonů komet v pixelech v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)

3.6.2 Lyzační pufr 2

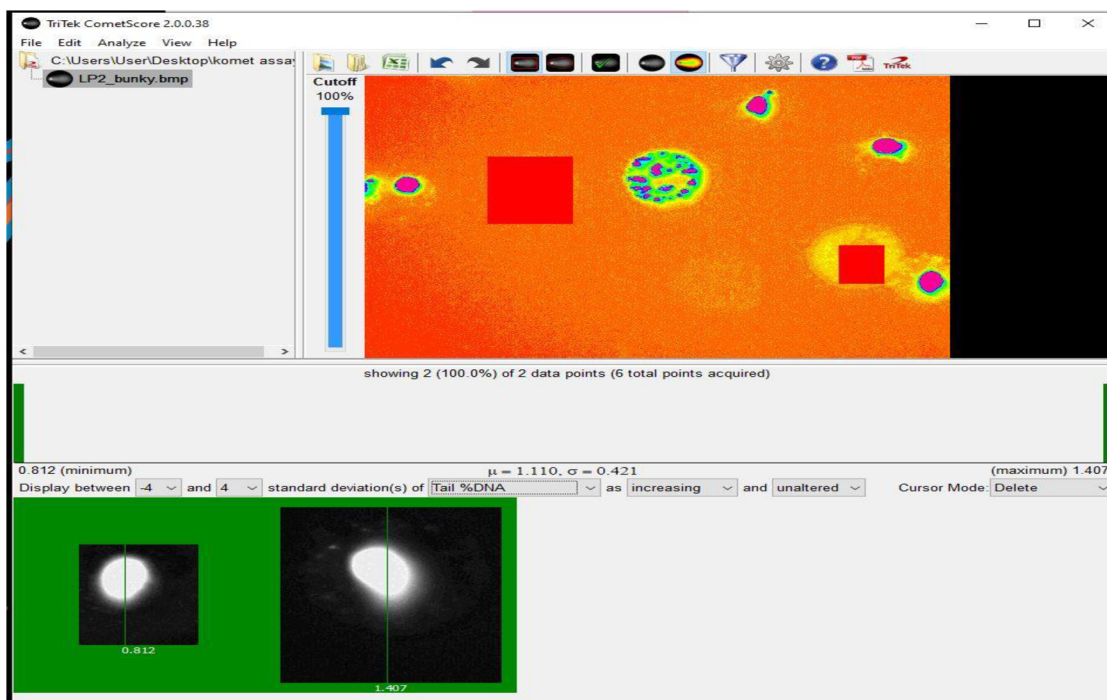
U lyzačního pufru číslo 2 bylo zjištěno, že je pro metodu kometové analýzy na savčích buňkách nevhodný. Důvodem je neschopnost tohoto pufru narušit buněčnou membránu, tudíž vlákna či fragmenty DNA nejsou schopny z buňky pod vlivem elektrického pole migrovat (viz obr. 14). Důvodem je fakt, že CTAB (cetrimoniumbromid) se váže na molekuly polysacharidů. Jelikož je buněčná membrána u živočišných buněk tvořena fosfolipidy (viz obr. 3), není molekula CTAB schopna integrace do buněčné membrány, nedojde k jejímu rozrušení. Z tohoto důvodu u buněk

lyzovaných LP2 nevznikaly žádné ohony komet (střední hodnota jejich délky = 0). Zároveň bylo pozorováno srážení buněk po expozici tomuto lyzačnímu pufru. Střední hodnota průměru buněk po lýze v pufru LP2 byla rovna 34,717 px se směrodatnou odchylkou 10,223 px. Ve srovnání s tím, u pufru LP1 byla střední hodnota průměru buňky (průměru hlavy komety) rovna 255,617 px se směrodatnou odchylkou 80,379 px. U pufru LP3 to byla tato hodnota rovna 135,367 px se směrodatnou odchylkou 45,053 px.

Buňky negativní kontroly netvořily žádné komety (viz obr. 13).



Obrázek 13: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 2 (vlastní fotografie)

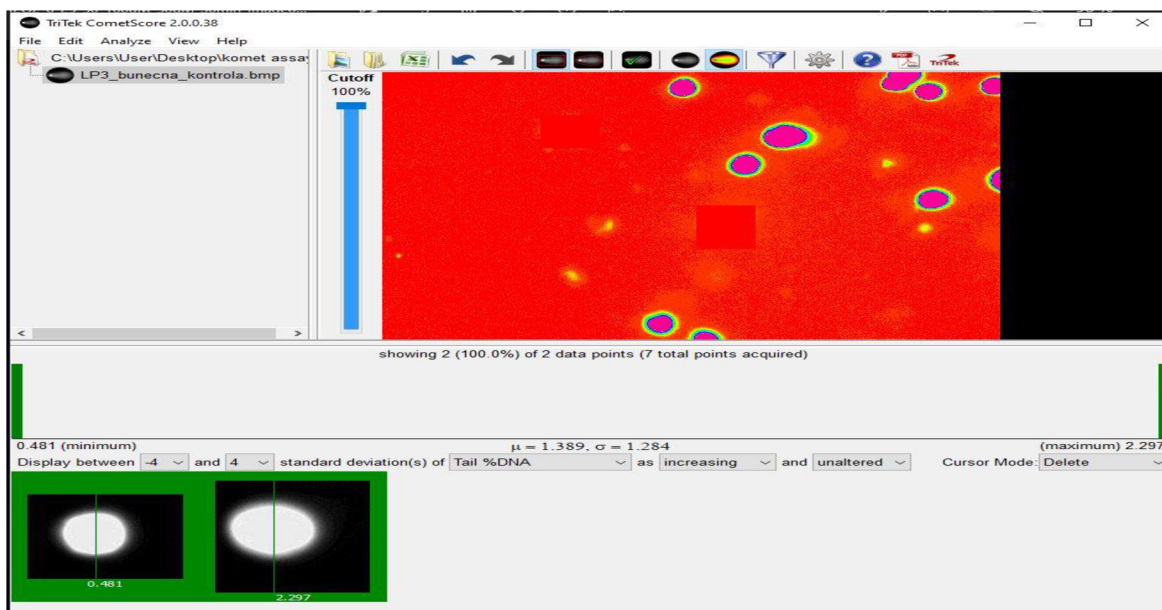


Obrázek 14: Ukázka snímků analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 2 (vlastní fotografie)

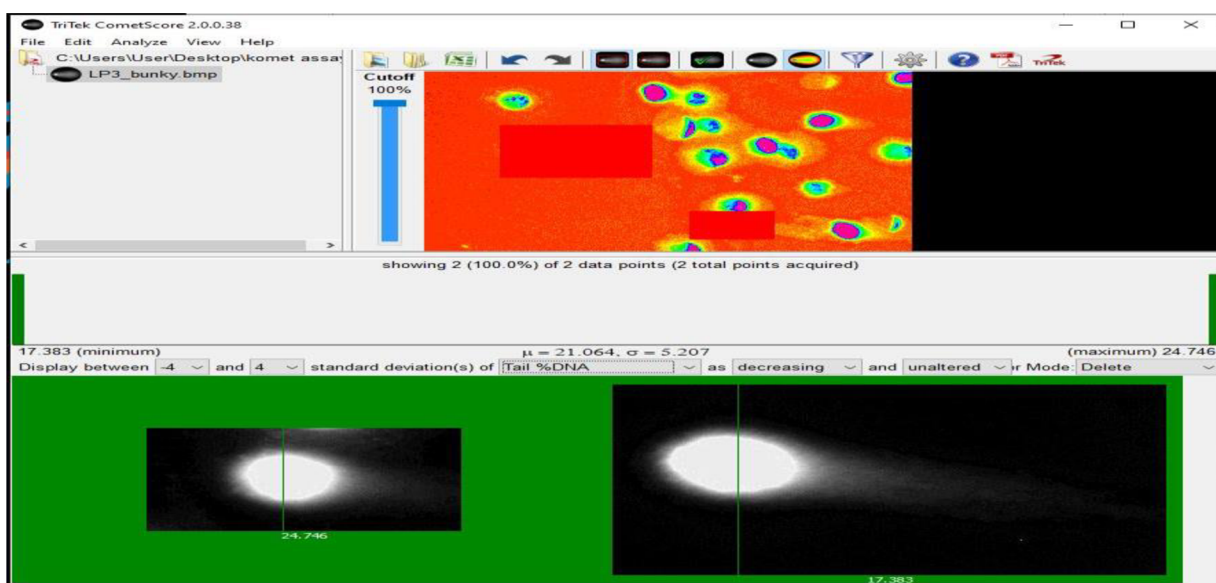
3.6.3 Lyzační pufr 3

U lyzačního pufru 3 byla zjištěna střední délka ohonu komety 72,433 px a 26,254 %. Směrodatná odchylka byla rovna 53,689 px a 18,268 %. Díky analýze bylo zjištěno, že u většiny buněk došlo k narušení buněčné membrány a k formování ohonu komety. Pouze u 11 nasnímaných buněk byla zjištěna délka ohonu komety nižší než 10 %, což je v souladu s kritérii přijatelnosti (tj. < 10 % DNA v ocasu). To znamená, že 18,3 % buněk z celého souboru 60 analyzovaných buněk nebylo lyzováno dostatečně. Celkem 5 analyzovaných vzorků mělo délky ohonu komety nad 60 % a dva vzorky nad 70 %, konkrétně se jednalo o hodnoty 60,347 %, 67,237 %, 69,828 %, 72,831 %, 77,462 %. Poslední jmenované číslo je také zároveň vřezek s nejdelší kometou v lyzačním pufru 3 a také nejdelší měřenou kometou ve všech lyzačních pufrech (viz obr. 16).

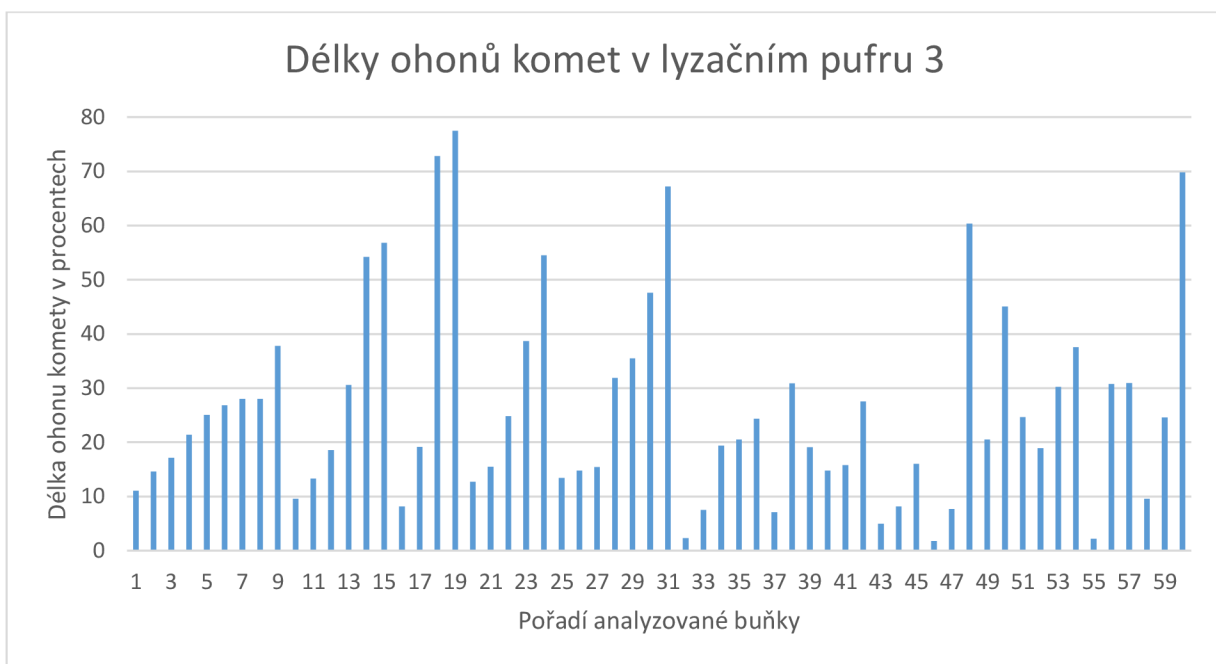
Buňky negativní kontroly netvořily žádné komety (viz obr. 15).



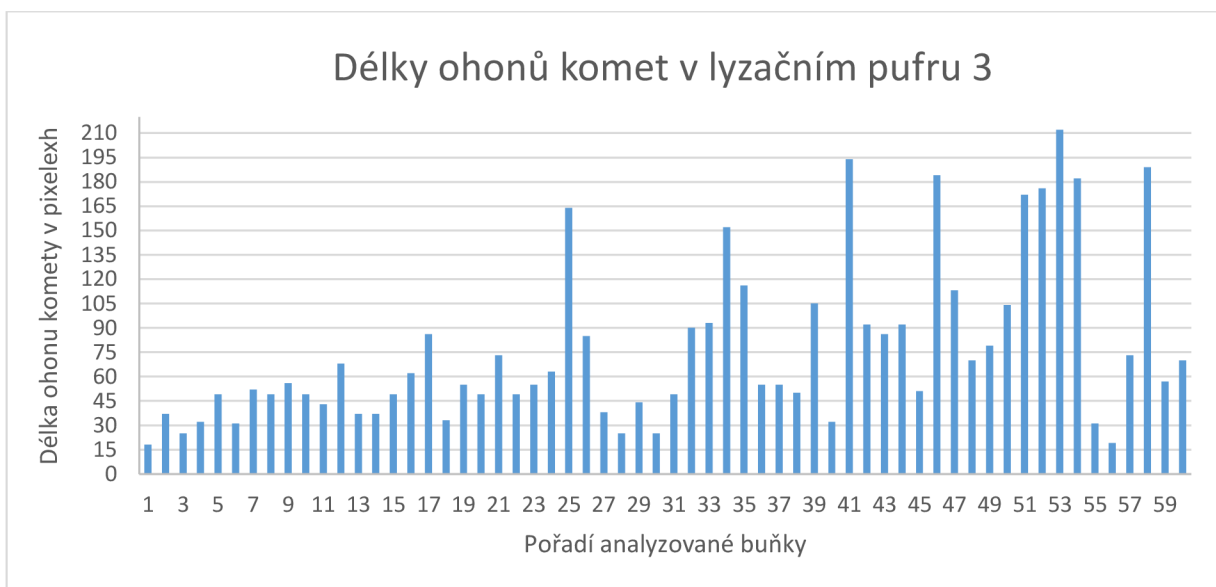
Obrázek 15: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)



Obrázek 16: Ukázka snímků analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)



Obrázek 17: Graf znázorňující délky ohonů komet v procentech v lyžačném pufru 3 (vlastní fotografie)



Obrázek 18: Graf znázorňující délky ohonů komet v pixelech v lyžačném pufru 3 (vlastní fotografie)

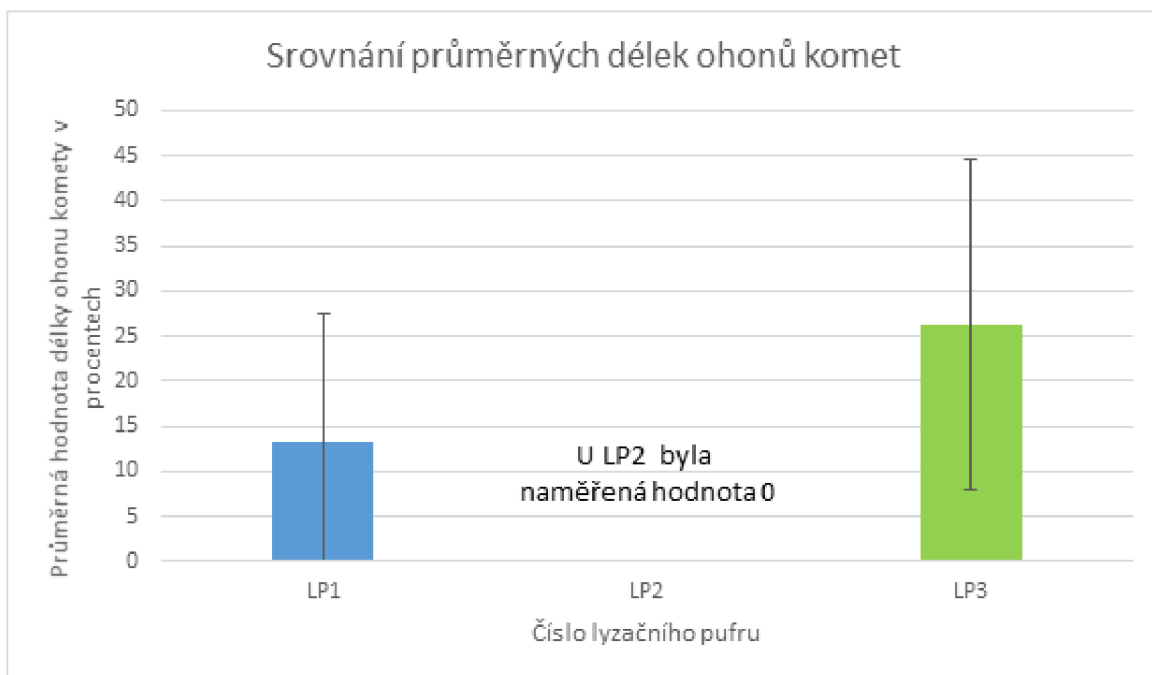
3.7 Vyhodnocení cílů a výzkumných otázek

Výzkumnou otázkou této práce bylo zjistit, jak složení daného lyzačního pufru ovlivňuje délku ocasu komety a jaký lyzační pufr je pro metodu comet assay na savčích buňkách nejvhodnější.

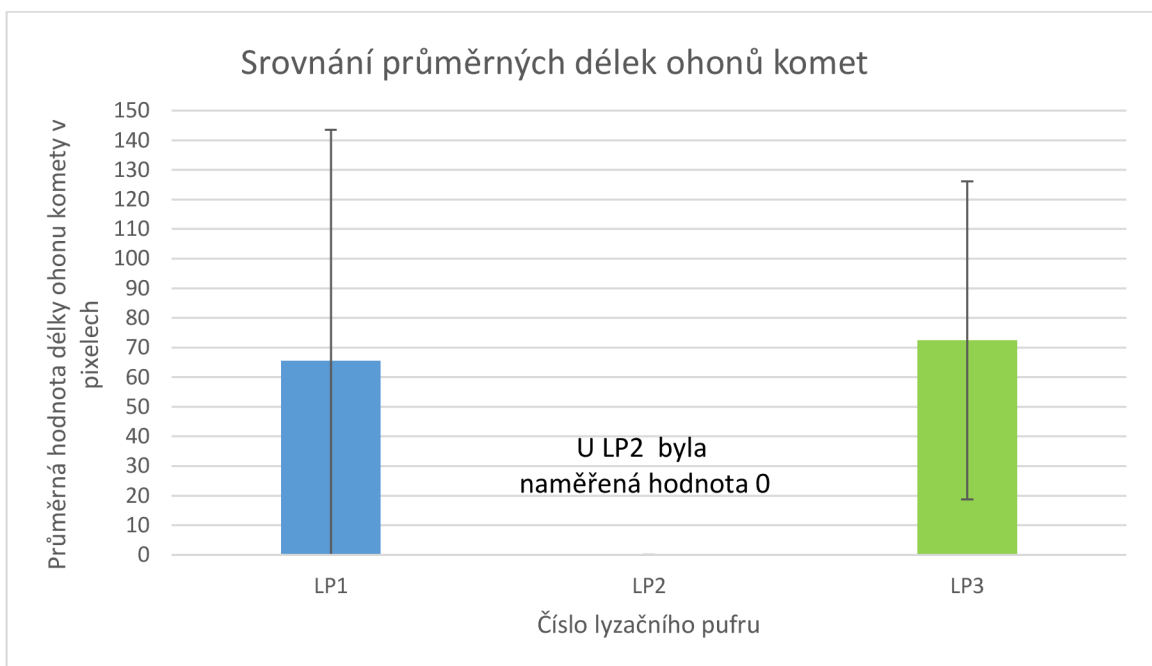
Po vyhodnocení obrazové analýzy bylo zjištěno, že nejvhodnějším lyzačním puftrem pro hodnocení poškození DNA u savčích buněk pomocí kometové analýzy je lyzační pufr 3. Buňky, které byly lyzovány v tomto pufru vykazovaly po vyhodnocení obrazové analýzy nejdelší ohony komet (viz obr. 19, 20). Zároveň u negativní kontroly neovlivněné peroxidem vodíku nedošlo ke vzniku komet. Konkrétně byly střední hodnoty naměřené ze šedesáti měření buněk 72,433 px a 26,254 %. Zároveň měl soubor menší směrodatné odchylky (53,689 px a 18,267 %) ve srovnání s LP1. U lyzačního pufru 1 byla střední hodnota délky ohonu komety rovna 65,500 px a 13,152 %. Směrodatná odchylka byla rovna 78,043 px a 14,423 %. Zároveň byl počet buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3, jejichž délka ocasní části byla větší než 10 %, byla menší než u buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1. Konkrétně se jednalo o 11 buněk (z celkových 60) u lyzačního pufru 3, což odpovídá 18,3 %. U lyzačního pufru 1 to bylo celkem 30 buněk, což odpovídá 50 % z celkového počtu. U lyzačního pufru 3 bylo zlyzováno více buněk a buňky dosahovaly větších délek ohonů komet. U lyzačního pufru 1 hodnoty ohonů komet nedosahovaly větší velikosti než 49 % z celkové délky komety. U lyzačního pufru 3 bylo takových buněk celkem 8. Zároveň v rozmezí od 10 % do 40 % bylo u tohoto pufru zlyzováno celkem 39 buněk. U lyzačního pufru 1 bylo takových buněk celkem 24 v tomto rozmezí.

Lyzační pufr číslo 2 se po vyhodnocení obrazové analýzy ukázal zcela nevhodný lyzační pufr pro metodu comet assay u živočišných buněk. Složení tohoto pufru nebylo schopné narušit buněčnou membránu a poškození buněk, které byly inkubovány v tomto pufru, nebylo možné hodnotit.

Srovnání výsledků dosažených u všech tří testovaných pufrů je uvedeno na obrázcích 19 a 20.



Obrázek 19: Graf znázorňující porovnání středních hodnot a směrodatných odchylek u délek ohonů komet naměřených u jednotlivých pufků. Porovnání v procentech. (vlastní fotografie)



Obrázek 20: Graf znázorňující porovnání středních hodnot a směrodatných odchylek u délek ohonů komet naměřených u jednotlivých pufků. Porovnání v pixelech. (vlastní fotografie)

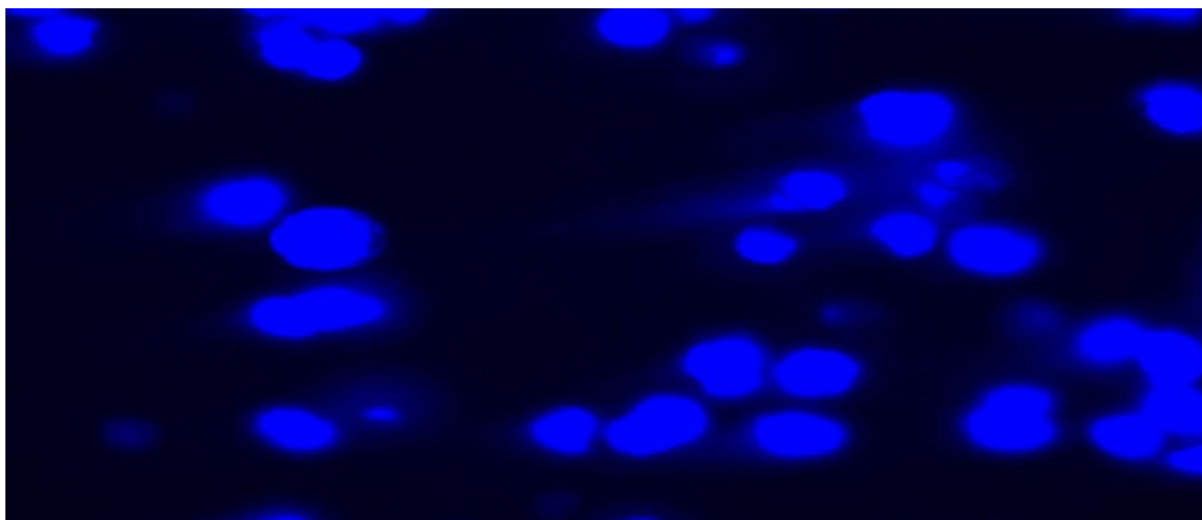
3.8 Optimalizace metody

V rámci praktické části této práce bylo optimalizováno několik kroků kometového testu před realizací hlavního experimentu. Konkrétně byla optimalizována koncentrace H_2O_2 . Ten byl použit k poškození DNA u buněk 3T3. Dále byl optimalizovaný průběh elektroforézy, kdy několikrát došlo k uvolnění gelu z podložního sklíčka a znehodnocení celého testu. Posledním optimalizovaným krokem bylo barvení DNA. Dále byly testovány 2 softwary, které slouží pro analýzu buněk.

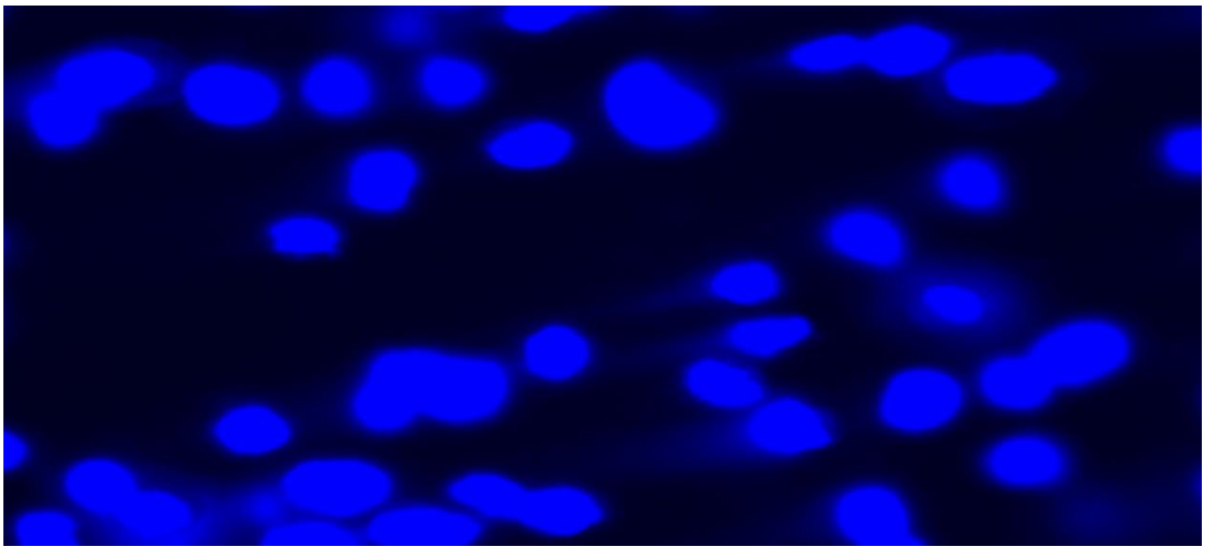
3.8.1 Koncentrace H_2O_2 a počet buněk

Jako modelová chemikálie narušující buněčnou DNA bylo zvoleno působení peroxidu vodíku. Na základě rešerše (Benhusein et al., 2010) byly testovány 3 různé koncentrace peroxidu vodíku a to 25 μM , 50 μM a 100 μM . Testování ukázalo, že nejvhodnější koncentrací peroxidu vodíku pro dostatečnou vizualizaci poškození DNA v tomto experimentu je 50 μM . Při použití koncentrace 25 μM peroxidu vodíku bylo narušení řetězců DNA nedostatečné a nebyly viditelné téměř žádné komety. Při použití 100 μM peroxidu vodíku bylo naopak poškození příliš velké a komety byly tak dlouhé, že zasahovaly do dalších buněk a nedaly se dobře analyzovat.

S tímto problémem souvisí i celková koncentrace buněk, které byly nanášeny na sklíčko. Při nanesení přibližně 100 000 buněk na sklíčko, byla koncentrace buněk příliš vysoká a buňky nebyly dobře analyzovatelné. Při nanesení počtu 50 000 buněk na sklíčko, byla koncentrace buněk dostatečná a jejich následná analýza velmi dobře proveditelná (viz obr. 21, 22).



Obrázek 21: Mikroskopický snímek při počtu 100 000 buněk na preparát (vlastní fotografie)



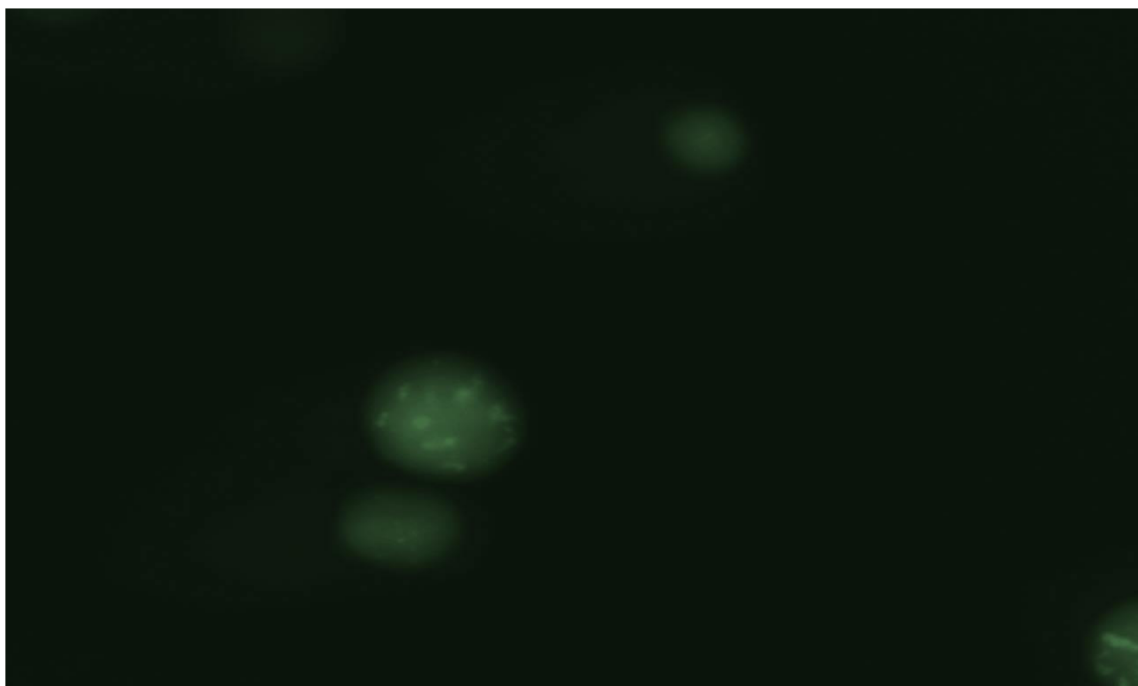
Obrázek 22: Mikroskopický snímek při počtu 100 000 buněk na preparát (vlastní fotografie)

3.8.2 Průběh elektroforézy

Během průběhu elektroforézy docházelo k uvolnění gelu z podložního sklíčka a tím i znehodnocení testu. Problém spočíval v tom, elektrické pole mezi katodou a anodou mělo tendenci unášet gel uvolněný ze sklíčka. Několik gelů tak spadlo až do koncové části elektroforetické vany, což mělo za následek znehodnocení vzorku. Aby k tomuto problému nedocházelo, bylo před zapnutím elektroforézy na vzorky umístěno několik podložních sklíček, aby zatížily gel a ten neměl šanci se během elektroforézy přemístit.

3.8.3 Barvení DNA

Pro barvení vzorků byla vybrána dvě barviva, a to Hoechstovo barvivo (Hoechst 33342) a barvivo DAPI. Během testování bylo zjištěno, že vzorky po obarvení barvivem DAPI jsou jasnější a barvivo vydrží svítit déle. Naopak Hoechstovo barvivo barvilo vzorky s menší intenzitou (viz obr. 23) a vzorky se rychle vysvěcovaly, což mělo za následek to, že vzorky se nestihly nasnímat pod mikroskopem pro další analýzu. Z těchto důvodů bylo pro barvení vzorků použito barvivo DAPI.



Obrázek 23: Snímek buněk obarvených barvivem Hoechst 33342 (vlastní fotografie)

3.8.4 Software

Pro vyhodnocení se osvědčila aplikace CometScore 2.0, pro její jednoduché použití a především funkčnost. Pro hodnocení byla použita také aplikace CasP, ale po spuštění programu pro analýzu a při následné práci je aplikace nestabilní, padá a veškerá data jsou ztracena. Kvůli těmto důvodům je aplikace CometScore 2.0 v porovnání s aplikací CasP vhodnější pro analýzu.

4 Diskuse

Naměřená data ukazují, že pro zvolený pracovní postup a typ buněk je lyzační pufr 3 neoptimálnější variantou. Z dostupných zdrojů vyplývá, že různé laboratoře a pracoviště používají odlišné složení lyzačního pufru. Například Dvořák ve své disertační práci srovnával vliv složení lyzačních pufrů (Dvořák, 2013). Lyzační pufr 1 použitý v této práci byl svým složením obdobný jednomu z pufrů testovaných Dvořákem s tím rozdílem, že já jsem místo 1% lauroyl sarkosinátu použil triton podle návodu od společnosti USB Corporation (USB CORPORATION, 2018). Stejně jako ve Dvořákově práci byl i v mé práci lyzační pufr 1 vyhodnocen jako nevhodný pro zvolenou metodu kometové analýzy. Buňky vystavené působení lyzačního pufru 1 byly nedostatečně lyzované a ohon komety se formoval jen u části buněk. Ve Dvořákově práci vedlo použití lyzačního pufru 1 dokonce k závěru, že buňky po comet assay nevykazovaly komety žádné. V mé práci buňky lyzované v tomto pufru komety tvořily, i když jen částečně. Rozdílné výsledky mých měření mohou plynout z mírných odlišností nastavení experimentu. Důvodem těchto odlišností může být i jiný typ používaných buněk, případně jiný rozměr elektroforetické aparatury. Dvořák ve své práci použil buněčné linie HL-60 a A375. Buněčná linie HL-60 je buněčná linie lidské leukémie a buněčná linie A375 je linie maligního melanomu. Pro tuto bakalářskou práci byla použita linie myších kožních fibroblastů 3T3. Dalším a nejpravděpodobnějším důvodem zmíněných odlišností je použití jiného detergentu ve složení lyzačního pufru. Dvořák ve své práci použil 1% lauroyl sarkosinát, zatím co já jsem pro svůj experiment použil jako detergent triton. Je tudíž možné, že triton X, který byl použit v této bakalářské práci, má vyšší účinnost při narušení buněčné membrány. Lyzační pufr se obdobným složením jako LP3 (použitý v této práci) byl i ve Dvořákově práci vyhodnocen jako vhodný pufr pro metodu comet assay. Stejného výsledku jsem dosáhl i já. Rozdíl ve složení spočíval v koncentraci TBE. Zatímco Dvořák ve své práci použil 0,5xTBE, LP3 použitý v této práci obsahoval 10xTBE. Buňky lyzované v tomto lyzačním pufru měly dostatečně narušenou membránu, díky čemuž formovaly větší počet ohonů komet s větším rozměrem. Z celkového počtu 60 buněk, bylo dostatečně zlyzováno 49 buněk. Lyzační pufr 2 je, jak již bylo zmíněno, pro hodnocení poškození DNA u živočišných buněk kometovou metodou nevhodný. Toto byl jeden ze vstupních předpokladů, který se podařilo experimentálně potvrdit.

Optimalizace potřebných kroků pracovního postupu byla provedena nejméně šestkrát před samotným finálním testem. Během měření jsem se často potýkal s nejrůznějšími problémy. Jednalo se například o kontaminace způsobené nesterilní přípravou gelů. Ke kontaminaci mohlo dojít například nadýcháním kapének na podložní sklíčko s buňkami. Kontaminace byla odhalena při snímání již obarvené DNA. Ke kontaminaci mohlo dojít také při skladování podložních sklíček s podložní agarovou vrstvou. Ta byla ze začátku skladována v lednici déle než týden. Bakterie a plísně rostou na agarózovém médiu velmi ochotně. Pro snížení možných zdrojů kontaminace bylo ve finálních experimentech dbáno na zvýšenou opatrnost při manipulaci se sklíčky i buňkami a sklíčka s agarózou byla připravována maximálně jeden den před použitím.

4.1.1 Limitace metody

Při optimalizaci metody bylo zjištěno, že významnou roli hrají také rozměry elektroforetické vany. Při použití větší elektroforetické vany bylo po analýze mikroskopických snímků zjištěno, že proud prochází jen střední částí vany. U vzorků, které byly během elektroforézy umístěny u okraje vany, byly vidět jen komety s velmi krátkou ocasní částí nebo nebyly k vidění žádné komety. Při optimalizování byly porovnávány preparáty, které byly ošetřeny stejným způsobem s tím rozdílem, že jedna sada vzorků byla umístěna do velké vany a druhá sada byla umístěna do malé vany. Snímky ze vzorků, které byly umístěny do malé vany, vykazovaly na mikroskopických snímcích jasné komety. Jasné komety také byly pozorovány u vzorků, které byly umístěny ve středu elektroforetické vany. Avšak na snímcích vzorků, které byly umístěny na krajích vany, byly k vidění komety jen velmi krátkou neintenzivní ocasní částí nebo komety nebyly k vidění žádné. Pro využití velké vany by byla pravděpodobně nutná optimalizace parametrů nastavení zdroje, což nebylo součástí této práce. Tento problém poměrně velkým způsobem ovlivnil časovou náročnost experiment vzhledem k menší kapacitě malé vany. Do velké elektroforetické vany dá najednou vložit až 6 preparátů, zatímco do malé vany lze najednou vložit pouze 2 preparáty. Při velkém počtu vzorků je díky tomuto problému časově náročnější krok elektroforézy, protože za stejný čas jsme schopni do elektroforetické vany vložit více vzorků.

Velký vliv na celkový výsledek práce má kontaminace. Při měření jsem se často potýkal s rizikem kontaminace vzhledem k realizaci části experimentu v mimo sterilní laminární box. Mnoho preparátů nebylo z důvodu kontaminace možné použít.

5 Návrh doporučení pro praxi

Metoda comet assay je běžně používanou metodou pro hodnocení genotoxicity látek. Z výsledků praktické části je vhodné do praxe implementovat použití lyzačního pufru 3, protože se ukázalo, že v porovnání se zbylými dvěma lyzačními pufrů má schopnost nejlépe lyzovat buňky.

Dále by bylo vhodné pro tuto metodu používat pro barvení buněk barvivo DAPI, pro jeho lepší vlastnosti – delší svítivost a větší intenzitu barvení.

Co se týče počtu nanášených buněk, je vhodné nanášet menší počet buněk (50 000), protože při nanesení většího počtu buněk hrozí překryv buněk a následná obtížná analýza pomocí softwaru.

Pro hladký průběh elektroforézy je vhodné podložní skříčka s gelem zatížit dalšími podložními skříčkami, aby nedocházelo k uvolnění a následné migraci gelu po elektroforetické vaně a následnému znehodnocení vzorku.

Podložní skříčka je třeba připravit maximálně jeden den před použitím, aby bylo minimalizováno riziko kontaminace gelu při skladování. Zároveň musí být zajištěna ochrana před vyschnutím.

Pro vyhodnocení se osvědčila aplikace CometScore 2.0, pro její jednoduché použití a funkčnost. Při hodnocení byla použita také aplikace CasP, ale po spuštění programu pro analýzu a při následné práci aplikace padá, není funkční a veškerá data jsou ztracena. Kvůli těmto důvodům je aplikace CometScore 2.0 vhodnější pro analýzu.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat lyzační krok metody comet assay neboli kometové analýzy. Optimalizace spočívala v testování 3 lyzačních pufrů a následné analýze výsledků. Hlavním cílem bylo zjistit, jak složení lyzačního pufru ovlivňuje délku komety a jaký lyzační pufr je pro zvolený postup experimentu nejvhodnější.

Byly vybrány 3 lyzační pufrы, které byly podrobeny testování a následné analýze, která ukázala výhody a nevýhody jejich použití. Po vyhodnocení jednotlivých lyzačních pufrů bylo zjištěno, že lyzační pufr 3 je nejvíc vhodný pro hodnocení poškození DNA u savčích buněk – konkrétně myších 3T3 fibroblastů. Buňky, které byly inkubovány v tomto pufru, byly lépe zlyzovány. Počet buněk, které byly lyzovány v lyzačním pufru 3 a jejichž délka ocasní části byla větší než 10 % celkové délky komety, byl menší než u buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1. Konkrétně v lyzačním pufru 3 bylo pod 10 % zlyzováno pouze 11 buněk z celého počtu 60 buněk, což odpovídá 18,3 %. U lyzačního pufru 1 bylo takových buněk celkem 30, což odpovídá 50 %, tedy polovině analyzovaných buněk. Délky ohonů komet byly delší u lyzačního pufru 3. Konkrétně střední hodnota délky ohonu buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3 je rovna 72,433 px a 26,253 % v porovnání s hodnotami 65,500 px a 13,153 % pro lyzační pufr 1. Směrodatná odchylka byla u lyzačního pufru 3 menší než u lyzačního pufru 1, 78,043 px a 14,429 % pro lyzační pufr 1 a 53,689 px a 18,268 % pro lyzační pufr 3. Což znamená, že hodnoty délek komet se u lyzačního pufru 1 lišily více od průměrných hodnot.

Lyzační pufr 2 se po zhodnocení ukázal jako nevhodný pro provádění comet assay u myších fibroblastů 3T3. Složení tohoto lyzačního pufru totiž není vhodné pro savčí buňky, protože není schopné rozpustit buněčnou membránu a uvolnit poškozený genetický materiál z buňky ven.

V rámci optimalizace metody byly testovány také různé možnosti barvení DNA. Ze dvou vybraných barviv se jako vhodnější varianta ukázalo barvivo DAPI. Dále byl optimalizován objem buněk nanášený na podložní sklíčko. Po testování a vyhodnocování se ukázalo, že při nanesení počtu přibližně 50 000 buněk na sklíčko, je koncentrace buněk dostačující a nedochází k takovému překryvu buněk jako při nanesení 100 000 buněk. Co se týče softwaru, bylo zjištěno, že software CometScore je pro analýzu buněk vhodnější, především kvůli stabilitě a funkčnosti aplikace.

Seznam použité literatury

BENHUSEIN, Ghazalla M. et al. 2010. Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*. **5**(1), 4637. DOI 10.3402/ljm.v5i0.4637.

BRADBURNE, C. 2014. Electrophoretic approaches to sample collection and preparation for nucleic acids analysis. In: SCHAUDIES, R. Paul, ed. *Biological Identification*. Elsevier, s. 355–369. DOI 10.1533/9780857099167.4.355. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857095015500131>

BRANHAM, María Teresita et al. 2004. DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **560**(1), 11–17. DOI 10.1016/j.mrgentox.2004.01.013.

BROWN, Robert B. a Julie AUDET. 2008. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of The Royal Society Interface*. **5**(suppl_2). DOI 10.1098/rsif.2008.0009.focus.

COLLINS, A. R., M. AI-GUO a S. J. DUTHIE. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*. **336**(1), 69-77. DOI 10.1016/0921-8777(94)00043-6.

COLLINS, Andrew R. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*. **26**(3), 249–261. DOI 10.1385/MB:26:3:249.

COOK, P. R., I. A. BRAZELL a E. JOST. 1976. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science*. **22**(2), 303–324. DOI 10.1242/jcs.22.2.303.

CORDELLI, E., M. BIGNAMI a F. PACCHIEROTTI. 2021. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*. **10**(1), 68–78. DOI 10.1093/toxres/tfaa093.

CREE, Ian A., ed. 2011. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. DOI 10.1007/978-1-61779-080-5.

DVOŘÁK, Miroslav. 2013. *Sledování poškození DNA metodou kometové analýzy*. Brno. Disertace. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Biochemický ústav.

FEARON, Ian M. a Stephen P. FAUX. 2009. Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **47**(3), 372–381. DOI 10.1016/j.yjmcc.2009.05.013.

GEDIK, C. M., S. W. B. EWEN a A. R. COLLINS. 1992. Single-cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UV-C Damage and Its Repair in Human Cells. *International Journal of Radiation Biology*. 62(3), 313–320. DOI 10.1080/09553009214552161.

HARTLEY, J. M., V. J. SPANSWICK a J. A. HARTLEY. 2011. Measurement of DNA Damage in Individual Cells Using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. In: CREE, Ian A., ed. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press, s. 309–320. DOI 10.1007/978-1-61779-080-5_25.

HOŠÍKOVÁ, Barbora. 2019. *In vitro studium účinků fotosenzitivních látek na nádorové buněčné linie*. Olomouc. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Lékařská fakulta, Ústav lékařské biofyziky.

KOBAYASHI, H. et al. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *Mammalian Mutagenicity Study Group Communications*. 3(2), 103–115. ISSN 0918-5976.

KUMARAVEL, T. S. et al. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*. 25(1), 53–64. DOI 10.1007/s10565-007-9043-9.

KUNKEL, Henry G. 2006. Zone Electrophoresis. In: GLICK, David, ed. *Methods of Biochemical Analysis*. Hoboken: John Wiley, s. 141–170. DOI 10.1002/9780470110171.ch6.

LABGUIDE.CZ. 2023. Detergenty. *LabGuide.cz - Průvodce laboratoři* [online]. [Cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <https://labguide.cz/reagencie/detergenty/>

LADEIRA, Carina et al. 2015. Relation between DNA damage measured by comet assay and OGG1 Ser326Cys polymorphism in antineoplastic drugs biomonitoring. *AIMS Genetics*. 02(03), 204–218. DOI 10.3934/genet.2015.3.204.

LADEIRA, Marcelo S.P. et al. 2005. Use of Comet assay to assess DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 586(1), 76–86. DOI 10.1016/j.mrgentox.2005.06.003.

LIU, L., James R. TRIMARCHI a D. L. KEEFE. 1999. Thiol Oxidation-Induced Embryonic Cell Death in Mice Is Prevented by the Antioxidant Dithiothreitol. *Biology of Reproduction*. 61(4), 1162–1169. DOI 10.1095/biolreprod61.4.1162.

MAO, B., T. DIVOUX a P. SNABRE. 2016. Normal force controlled rheology applied to agar gelation. *Journal of Rheology*. 60(3), 473–489. DOI 10.1122/1.4944994.

MIGLIORE, L. et al. 2005. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiology of Aging*. 26(5), 567–573. DOI 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.016.

MURRAY, Robert K. et al., eds. 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-907-7.

OLIVE, Peggy L. et al. 1990. Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the „Comet“ Assay. *Radiation Research*. **122**(1), 86. DOI 10.2307/3577587.

OLIVE, Peggy L. 2002. The Comet Assay: An Overview of Techniques. In: DIDENKO, Vladimir V., ed. *In Situ Detection of DNA Damage*. New Jersey: Humana Press, s. 179–194. DOI 10.1385/1-59259-179-5:179.

OSTLING, O. a K. J. JOHANSON. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **123**(1), 291–298. DOI 10.1016/0006-291X(84)90411-X.

PATEL, P. D. a C. BEVERIDGE. 2003. In-line sensors for food analysis. In: LEES, Michèle, ed. *Food Authenticity and Traceability*. Elsevier, s. 275–298. DOI 10.1533/9781855737181.1.275. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855735262500170>

PIPERAKIS, S. M. 2009. Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology*. **25**(1), 1–3. DOI 10.1007/s10565-008-9081-y.

PU, X., Z. WANG a J. E. KLAUNIG. 2015. Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. *Current Protocols in Toxicology*. **65**(1), 3.12. 1-3.12.11. DOI 10.1002/0471140856.tx0312s65.

RYDBERG, Björn a Karl J. JOHANSON. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: HANAWALT, P. C., E. C. FRIEDBERG a C. F. FOX, eds. *DNA Repair Mechanisms*. Elsevier, s. 465–468. DOI 10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4.

ŞARDAŞ, Semra et al. 2001. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **490**(2), 123–129. DOI 10.1016/S1383-5718(00)00157-1.

SINGH, Narendra P. et al. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. **175**(1), 184–191. DOI 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

USB CORPORATION. 2018. *Tech Tip: Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay* [online]. [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: https://www.affymetrix.com/support/technical/usb/tech_tips/Single_Cell_Gel_Electrophoresis_Comet_Assay.pdf

TUTTY, Melissa Anne et al. 2022. Evaluating nanobiomaterial-induced DNA strand breaks using the alkaline comet assay. *Drug Delivery and Translational Research*. **12**(9), 2243–2258. DOI 10.1007/s13346-022-01178-7.

VYCHODILOVÁ, Leona et al. 2019. *Klinická genetika*. Brno: VFU Brno. ISBN 978-80-7305-825-8. Dostupné také z: https://www.vfu.cz/files/1260_07_vystup.pdf?fbclid=IwAR1HEXcPsLvtn_1vB6HEaxBJNSIly4j5Nx8pDLY1c_miXMd9DhYnKL3EO3I

ZUMDAHL, Steven S. 2009. *Chemical principles*. Boston: Houghton Mifflin. ISBN 978-0-618-94690-7. Dostupné také z: http://archive.org/details/chemicalprincip100zumd_674

Seznam obrázků

Obr. 1: Buňka inkubovaná s alkaloidem chelerytrinem a obarvená stříbřením. Na obrázku je vyznačena pozice a polarita elektrod při elektroforéze (Dvořák et al., 2013).

Obr. 2: Struktura agarového gelu pod mikroskopem (Mao, Divoux a Snabre, 2016)

Obr. 3: Obrázek 3: Popis fosfolipidu a složení fosfolipidové dvojvrstvy (LabGuide, 2023)

Obr. 4: Kategorie poškození podle Collinse (Collins 2004)

Obr. 5: Kategorie poškození podle Kobayashio (Kobayashi et al., 1995)

Obr. 6: Schéma postupu kometového testu (vlastní fotografie)

Obr. 7: Ukázka prostředí aplikace CometScore 2.0 (vlastní fotografie)

Obr. 8: Možnosti nastavení preferencí v aplikaci CometScore 2.0 (vlastní fotografie)

Obr. 9: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1 (autor, 2022)

Obr. 10: Ukázka snímků analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)

Obr. 11: Graf znázorňující délky ohonů komety v procentech v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)

Obr. 12: Graf znázorňující délky ohonů komety v pixelech v lyzačním pufru 1 (vlastní fotografie)

Obr. 13: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 2 (vlastní fotografie)

Obr. 14: Ukázka snímků analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 2 (vlastní fotografie)

Obr. 15: Ukázka snímku analýzy pozitivní kontroly buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)

Obr. 16: Ukázka snímků analýzy buněk lyzovaných v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)

Obr. 17: Graf znázorňující délky ohonů komet v procentech v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)

Obr. 18: Graf znázorňující délky ohonů komet v pixelech v lyzačním pufru 3 (vlastní fotografie)

Obr. 19: Graf znázorňující porovnání středních hodnot a směrodatných odchylek u délek ohonů komet naměřených u jednotlivých pufrů. Porovnání v procentech. (vlastní fotografie)

Obr. 20: Graf znázorňující porovnání středních hodnot a směrodatných odchylek u délek ohonů komet naměřených u jednotlivých pufrů. Porovnání v pixelech. (vlastní fotografie)

Obr. 21: : Snímek buněk mikroskopem při nanesení buněk o přibližném objemu 100 000 (vlastní fotografie)

Obr. 22: : Snímek buněk mikroskopem při nanesení buněk o přibližném objemu 100 000 (vlastní fotografie)

Obr. 23: Snímek buněk obarvených barvivem Hoechst 33342 (vlastní fotografie)