

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNEJ CHÉMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv kritického stavu pacientov na poškodenie DNA

Bc. Natália Verešpejová

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Monika Kuchařová, PhD.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala všetkým, ktorí mi pomáhali s vypracovaním mojej diplomovej práce.

Veľká vďaka patrí hlavne mojej školiteľke Mgr. Monike Kuchařovej PhD. za pomoc pri práci v laboratóriu a za pripomienky a cenné rady pri spracovaní tejto diplomovej práce.

Ďalej by som sa rada poďakovala prof. MUDr. Zdeňkovi Zadákovi CSc., MUDr. Davidovi Astapenkovi PhD., prof. RNDr. Rudolfovi Štětínovi, CSc. a MUDr. Radomírovi Hyšplerovi PhD. za výpomoc a ochotu pri odbere vzoriek a za usmernenie pri ich spracovaní. Chcem sa tiež poďakovať Mgr. Veronike Bernhauerovej PhD. za pomoc pri konečnom hodnotení výsledkov. Pod'akovanie patrí aj mojej rodine za veľkú podporu počas celého štúdia.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci správne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové,

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
1 ÚVOD	9
2 CIEĽ PRÁCE	10
3 TEORETICKÁ ČASŤ	11
3.1 Voľné radikály a oxidačný stres	11
3.1.1 Oxidačné poškodenie DNA	12
3.1.1.1 Stanovenie oxidačného poškodenia DNA	13
3.1.2 Opravy poškodenej DNA	15
3.1.2.1 BER	15
3.1.2.2 NER	17
3.1.2.3 Korekcia nesprávneho párovania báz	18
3.2 Comet assay (CA)	19
3.2.1 História	20
3.2.2 Modifikácie metódy	21
3.2.2.1 Neutrálna verzia CA	21
3.2.2.2 Alkalická CA	21
3.2.2.3 Comet-FISH	22
3.2.2.4 Apoptické bunky	23
3.2.3 Stanovenie reparácie DNA	24
3.2.4 Princíp a metodika CA	25
3.2.4.1 Vizualizácia komét	27
3.2.4.2 Hodnotenie komét	27
3.2.5 Výhody a limity CA	29
3.2.6 Aplikácia CA	30
3.3 Kritický stav	31

3.3.1	SARS-CoV-2 a COVID-19	31
3.3.1.1	Epidemiológia a prenos	32
3.3.1.2	Genomika SARS-CoV-2	33
3.3.1.3	Patofyziológia a klinické príznaky	34
3.3.1.4	Diagnostika	36
3.3.1.5	Terapeutické prístupy	36
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	38
4.1	Výber pacientov	38
4.2	Prístroje	39
4.3	Pomôcky	39
4.4	Chemikálie	40
4.5	Stanovenie oxidačného poškodenia DNA metódou Comet assay	41
4.5.1	Postup metódy	41
4.5.1.1	Príprava roztokov	41
4.5.1.2	Príprava sklíčok	42
4.5.1.3	Izolácia lymfocytov	42
4.5.1.4	Nanášanie buniek na sklíčka	43
4.5.1.5	Lýza	44
4.5.1.6	Ovplyvňovanie enzýmami	44
4.5.1.7	Alkalické rozleptanie	45
4.5.1.8	Elektroforéza	45
4.5.1.9	Neutralizácia	45
4.5.1.10	Farbenie	45
4.5.1.11	Hodnotenie komét	46
4.5.2	Štatistická analýza	49
4.6	Stanovenie reparácie DNA metódou Comet Assay	49
4.6.1	Postup metódy	49

4.6.1.1	Príprava pufrov	49
4.6.1.2	Príprava HeLa buniek	50
4.6.1.3	Príprava extraktov a inkubácia.....	50
4.6.1.4	Hodnotenie a štatistika	51
5	VÝSLEDKY	52
5.1	Stanovenie poškodenia DNA.....	52
5.1.1	Štatistická významnosť	52
5.1.2	Oxidačné poškodenie DNA jednotlivých pacientov	54
5.1.3	Závislosť poškodenia na BMI	59
5.1.4	Závislosť dĺžky hospitalizácie na BMI	59
5.1.5	Závislosť poškodenia na koncentrácii CRP	60
5.1.6	Závislosť poškodenia na počte leukocytov	61
5.2	Stanovenie reparácie DNA	62
5.2.1	Štatistická významnosť	62
6	DISKUSIA	64
7	ZÁVER.....	67
8	POUŽITÉ SKRATKY	68
9	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	71
10	ZOZNAM TABULIEK.....	72
11	ZOZNAM GRAFOV	73
12	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	74

ABSTRAKT

V decembri 2019 sa začali objavovať prvé prípady pacientov s pneumóniou, ktorá prerástla v syndróm akútnej respiračnej tiesne a spôsobovala problémy s dýchaním. Koronavírusová choroba 2019 (COVID-19) je príčinou globálnej pandémie a spôsobuje ju závažný akútny respiračný syndróm koronavírus 2 (SARS-CoV-2). Za progresiu ochorenia je zodpovedná komplexná súhra faktorov. Niektoré štúdie naznačujú, že podporuje vznik oxidačného stresu a teda môže viesť k oxidačnému poškodeniu buniek a DNA. Cieľom tejto štúdie bolo pozorovanie závislosti medzi oxidačným poškodením DNA a kritickým stavom spôsobeným ochorením COVID-19 s použitím techniky kométovej analýzy.

Základný princíp použitej metódy spočíva vo fixácii lymfocytov v agarózovom gély, odstránení membrány a cytoplazmy buniek, inkubácii so špecifickými enzýmami a elektroforéze. V procese elektroforézy dochádza k migrácii negatívne nabitých fragmentov DNA smerom k anóde a bunka tak nadobúda typický tvar kométy. Kométy vizualizujeme pomocou DNA interkalačného farbiva etídia bromidu.

Kvantifikovali sme jednoreťazové zlomy a s použitím špecifických enzýmov (modifikácia metódy na detekciu špecifických lézií) aj oxidované pyrimidíny a puríny. Výsledky sú udávané ako % tail DNA, teda množstvo DNA vo chvoste kométy v percentách.

Stanovenie DNA poškodenia prebiehalo v poloautomatickom softvéri LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) pre obrazovú analýzu. Hodnotilo sa poškodenie v lymfocytoch pacientov v kritickom stave v priebehu ich hospitalizácie. Štatistická analýza prebehla v programe GraphPad Prism a výsledky pozorovaných parametrov ukazujú štatisticky nevýznamné poškodenie spôsobené SARS-CoV-2.

Kľúčové slová: kométovej analýza, kritický stav, poškodenie DNA, reparácia, SARS-CoV-2

ABSTRACT

The first cases of patients with pneumonia which grew into an acute respiratory distress syndrome and caused breathing problems began to appear in December 2019. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is the cause of a global pandemic and it is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). A complex interplay of factors is responsible for the progression of the disease. Some studies suggest that it promotes oxidative stress and thus may lead to oxidative damage to cells and DNA. The purpose of this study was to observe the relationship between oxidative DNA damage and a critical condition caused by COVID-19 using a comet assay technique.

The basic principle of the used method consists in fixation of lymphocytes in an agarose gel, removal of the membrane and cytoplasm of cells, incubation with specific enzymes and electrophoresis. In the process of electrophoresis, negatively charged DNA fragments migrates towards the anode and the cell thus acquires the typical shape of a comet. Comets are visualized using the DNA intercalation dye ethidium bromide.

We quantified single - strand breaks and oxidized pyrimidines and purines by using specific enzymes (modification of the method for detecting specific lesions). Results are reported as % tail DNA, thus the percentage of DNA in the comet's tail.

Determination of DNA damage was performed in the semi-automated software LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) for image analysis. Damage in lymphocytes of critically ill patients during their hospitalization was assessed. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism and the results of the observed parameters show a statistically insignificant damage caused by SARS-CoV-2.

Key words: comet assay, critical condition, DNA damage, repair, SARS-CoV-2

1 ÚVOD

Molekula DNA je neustále atakovaná poškodzujúcim agens endogénneho aj exogénneho pôvodu, ktoré spôsobujú oxidačné poškodenie. Jej budúcnosť závisí na tom, ako rýchlo a presne zvláda vzniknuté poškodenia eliminovať. Bezchybne fungujúce opravné mechanizmy sú pre opravu DNA zásadné. Niekedy ja naopak narušenie DNA v bunkách žiaduce a vedie k ich zániku. Preto je rozhodujúce poznať mieru možného poškodenia určitým činiteľom a rozdiely v citlivosti orgánov (buniek) na tieto činitele. Medzi metódy so schopnosťou stanoviť poškodenie DNA radíme aj kométovú analýzu a práve túto metódu sme si vybrali ako ideálnu pre náš experiment.

Predpokladá sa, že nový koronavírus môže narušiť rovnováhu medzi produkciu voľných radikálov a kapacitou antioxidantného systému, čím podporí vznik oxidačného stresu. Oxidačný stres následne ovplyvňuje rovnováhu disulfid – tiol na cysteínových zvyškoch ACE2 receptorov, ktorá je zásadná pre vstup a fúziu vírusu do hostiteľskej bunky.

Pomocou kométového testu v jeho základnom aj modifikovanom prevedení detekujeme jedno aj dvojvláknové zlomy DNA, čím stanovíme rozsah poškodenia. Nejedná sa o priamu analýzu DNA, teda neidentifikujeme genetický kód. Princípom metódy je migrácia nukleotidov v elektrickom poli. Dochádza k strate pôvodného tvaru buniek s rastúcim poškodením DNA. Použili sme lymfocyty vyizolované z nezrážlivej plnej krvi od desiatich pacientov s ochorením COVID-19.

Porovnávali sme rozsah poškodenej DNA jednotlivých pacientov v kritickom stave počas hospitalizácie vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové. Zároveň sme využili extrakty získané z rovnakých lymfocytov, na ktorých sme merali poškodenie a pokúsili sa určiť účinnosť opravných mechanizmov bunky. Keďže ide zatiaľ o veľmi málo skúmanú problematiku, výsledky nie je možné porovnávať s inými štúdiami a mohli by slúžiť ako podklad pre ďalšie, podrobnejšie výskumy.

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce je stanovenie oxidačného poškodenia molekúl DNA u COVID-19 pozitívnych pacientov hospitalizovaných na jednotkách intenzívnej starostlivosti pomocou metódy Comet Assay.

Z dostupných zdrojov som vypracovala teoretickú časť, kde som popísala oxidačné poškodenie buniek a ich reparačné schopnosti. Ďalej som sa zamerala na metodiku kométovej analýzy v klasickom aj modifikovanom prevedení. Časť je tiež venovaná problematike kritických stavov so zameraním na SARS-CoV-2 spôsobujúcim ochorenie COVID-19.

Hlavným cieľom bol experiment, v ktorom sme stanovili mieru oxidačného poškodenia v lymfocytoch vyizolovaných z venóznej krvi. S použitím kométovej analýzy sme určili rozdiely v poškodení DNA v priebehu hospitalizácie jednotlivých pacientov. Taktiež bola stanovená reparačná účinnosť extraktov získaných z lymfocytov po inkubácii s HeLa bunkovou líniou. Výsledky oboch stanovení sme zhodnotili a určili ich štatistickú významnosť.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Voľné radikály a oxidačný stres

Chemické častice, ktoré obsahujú jeden alebo viac voľných elektrónov označujeme ako voľné radikály. Tieto elektróny sú súčasťou molekuly a sú dôvodom jej vysokej reaktivity. Môžu fungovať ako oxidačné aj redukčné činidlá a preto reagujú s rôznymi biologickými štruktúrami (napr. aminokyseliny, mastné kyseliny, nukleové kyseliny). Voľné radikály sú nepretržite produkované bunkami alebo vznikajú ako produkty metabolizmu buniek, či únikom z mitochondriálneho respiračného reťazca. Voľné radikály sa stali signálnymi molekulami bunkovej regulácie a významnými prostredníkmi pri prenose energie. (Dey et al., 2018; Halliwell et Gutteridge, 2015; Štípek et al., 2000)

Na druhej strane pôsobia ako toxické a dezinformačné látky, čím vytvárajú v organizme chaos a poškodzujú ho. Rovnaké cytotoxické vlastnosti vykazujú aj voľné radikály z vonkajšieho prostredia a vonkajšie faktory ako fajčenie, ionizačné a UV žiarenie, či znečistené prostredie (pesticídy, kovy). (Štípek et al., 2000) Medzi najvýznamnejšie voľné radikály v aeróbných organizmoch patria kyslík, dusík a ich reaktívne formy (ROS, reactive oxygen species a RNS, reactive nitrogen species). K reaktívnym formám sa zaraďujú nielen voľné radikály, ale aj neradikálové častice. (Storz et Implayt, 1999)

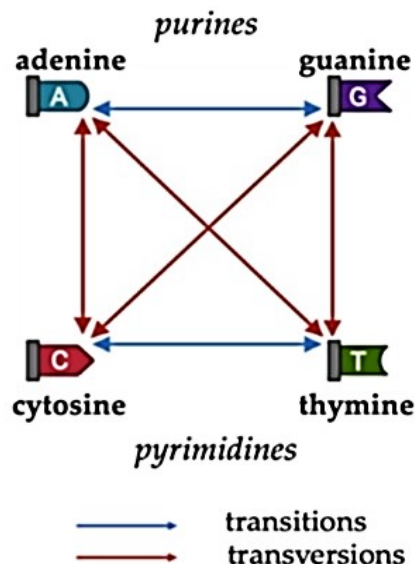
Príklady ROS a RNS:

- Reaktívne formy kyslíka - superoxid, hydroxylový radikál, peroxy, peroxid vodíka, ozón, kyselina chlórna, singletový kyslík
- Reaktívne formy dusíka – oxid dusnatý, nitrosyl, nitroxid, kyselina dusitá, peroxyinitrit, alkylperoxyinitrit

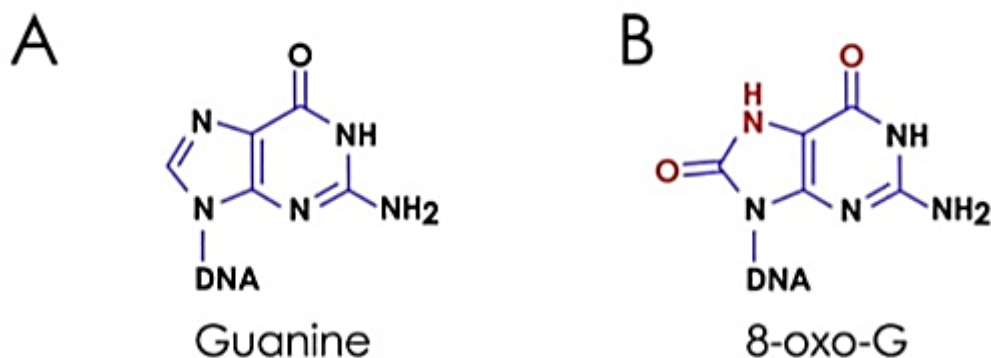
Oxidačný stres vzniká v dôsledku nerovnováhy medzi produkciou ROS/RNS a kapacitou antioxidantného obranného systému. Pri nedostatočnej regulácii tejto nerovnováhy sú reaktívnymi časticami v nadbytku poškodzované makromolekuly vrátane bielkovín, lipidov a DNA (jadrová aj mitochondriálna). Následkom sú patofyziologické zmeny, ktoré prispievajú k indukcii rakoviny a neurodegeneratívnych chorôb, k metabolickému syndrómu alebo starnutiu buniek. (Pizzino et al., 2017; Stefanis et al., 1997)

3.1.1 Oxidačné poškodenie DNA

K oxidačnému poškodeniu jadrovej DNA dochádza na viacerých miestach, ako sú nukleotidy, nukleobázy alebo jednoduché a dvojitlákrové molekuly DNA. Najbežnejším cieľom oxidačného poškodenia sú štyri nukleobázy DNA - adenín, cytozín, guanín a tymín a sú atakované predovšetkým hydroxilovým radikálom. Poškodenie spôsobí ich štrukturálnu modifikáciu, čím je narušené párovanie báz a dochádza k prechodu (zmeny medzi adenínom a guanínom alebo tymínom a cytozínom) alebo transverzii (zmeny medzi purínmi a pyrimidínmi). (Obr. 1) Primárnou reakciou hydroxylového radikálu s DNA je odstránenie vodíkového atómu z deoxyribózy. Dochádza k deštrukcii sacharidu a prerušeniu reťazca. Hydroxilový radikál aduje k bázam a mení ich na oxoderiváty a hydroxyderiváty. Spomedzi nukleobáz je guanín najčastejšie oxidovanou bázou. Jeho najbežnejšia oxidovaná forma je 8-oxo-2'-deoxyguanozín (8-oxoG) (Obr. 2) a v súčasnosti je využívaná ako biomarker oxidačného poškodenia DNA. Lézie v oxidovaných bázach majú značný mutagénny potenciál a tiež nemutagénne dôsledky pre bunky (veľké delécie v DNA, ako dôsledok opravy lézií). Zároveň môže zvýšené poškodenie DNA podporovať zápal v artériosklerotických plakoch zvýšením produkcie cytokínov a tým sa podieľať na patogenéze kardiovaskulárnych ochorení. (Cadet et al., 2013; Fraga et al., 1990; Hu et al., 2021; Malik et Herbert, 2012)



Obr. 1 Štrukturálne modifikácie štyroch nukleobáz DNA
(modrá - prechody a červená - transverzie)
Prevzaté z: Hu et al., 2021



Obr. 2 Vzorce A guanín, a B oxidovaná forma guanínu
 Prevzaté z: Markkanen, 2017

Okrem oxidačného poškodenia DNA v jadre, dochádza aj k oxidačnému poškodeniu DNA v mitochondriách. Mitochondrie sú prevládajúcim zdrojom reaktívnym foriem kyslíka vďaka vysokému toku elektrónov, ako súčasť oxidatívnej fosforylácie na generovanie ATP. Nadprodukcia ROS je spojená s vysokou mierou mutácií mitochondriálneho genómu a indukuje rýchle zvýšenie poškodenia mtDNA (mitochondriálna DNA). (Mikhed et al., 2015; Shokolenko et al., 2009)

Z hľadiska oxidačného poškodenia molekúl DNA predstavujú nebezpečenstvo aj produkty peroxidácie lipidov. 4-hydroxynonenal a malondialdehyd sú dôležité sekundárne produkty peroxidácie, ktoré interagujú s DNA za vzniku rôznych mutagénnych aduktov. Adukty sú zodpovedné za zosieťovanie DNA pomocou krížových väzieb. (Linhart et al., 2014)

3.1.1.1 Stanovenie oxidačného poškodenia DNA

Účinky chemických a fyzikálnych činidiel na genetický materiál, ktoré vyvolávajú zmeny v štruktúrálnej integrite genómu študuje genotoxikológia. Rôzne kombinácie metód (*in vivo*, *in vitro*, *in silico*) umožňujú určiť potenciál chemikálie zodpovednej za genetické poškodenie. Poškodenie DNA je prirodzený jav, ktorý vzniká v dôsledku oxidačného metabolizmu a dýchania a je neustále opravovaný reparačnými procesmi prítomnými vo všetkých bunkách. V prípade nedostatočnosti reparačných mechanizmov dochádza k hromadeniu genetických lézií. Existuje niekoľko genotoxikologických testov schopných monitorovať biomarkery a určiť mieru poškodenia. (Beedanaragi et al., 2014)

Cieľom techník *in silico* je aplikácia štatistických, matematických, chemických a výpočtových nástrojov, ktoré vychádzajú z existujúcich údajov o genetickej toxikológii a následne vývoj efektívnych prediktívnych modelov genotoxicity. Tieto modely môžu byť

použité k predpovedaniu genotoxických vlastností nevyskúšaných chemikálií. Ide o spoľahlivé, rýchle a ekonomicky výhodné skriningové metódy. (Beedanaragi et al., 2014)

Amesov test, formálne nazývaný *Salmonella typhimurium* reverzný test, patrí medzi *in vitro* postupy. Je používaný k stanoveniu mutagénneho potenciálu pôvodcov a identifikuje bodové mutagény. Označuje sa za zlatý štandard v štúdiách mutagenézy. (Ames et al., 1973; Chen et al., 2014) Zložitejšie zmeny v genóme, ako poškodený mitotický aparát alebo samotný chromozóm sú merané mikronukleovým testom. Mikronukleus je chromozómový fragment alebo menej často celý chromozóm, ktorý ostal mimo jadro po bunkovom delení. Môže sa vytvoriť po priamom poškodení DNA alebo následne sekundárnou interakciou s replikačným aparátom DNA. Zvýšená frekvencia vzniku mikronukleí indikuje vyvolané poškodenie chromozómov. Ich tvorbu je možné merať na rôznych typoch bunkových línií, teda *in vitro* a *in vivo* napr. v periférnej krvi. Jednou z tradičných metód je mikroskopické sledovanie chromozomálnych aberácií napr. po expozícii chemickému činiteľu alebo po pôsobení ionizačného žiarenia. Tie sú stanovované v metafáze, kedy sú chromozómy kondenzované a poškodenie je najlepšie viditeľné. (Beedanaragi et al., 2014; Chen et al., 2014; Natarajan et al., 1996; Sommer et al., 2020)

V priebehu rokov boli pokusy vyvinúť imunologické metódy, ako ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) alebo RIA (radioimmunoassay) na meranie oxidačne poškodených báz DNA. Počiatočné úsilie bolo zamerané na prípravu monoklonálnych a polyklonálnych protilátok zameraných proti žiarením indukovaného ThyGly (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrotymin). Následne bol záujem o imunotesty na detekciu 8-oxoG po jeho objavení. Hlavným obmedzením týchto návrhov je nedostatočná špecifickosť testov v dôsledku slabej antigenicity jednotlivých oxidovaných báz a pozoruhodná skrížená reaktivita s väčšinou prekursorov pôvodnej bázy. (Cadet et al., 2017; Ide et al., 1997)

Analytické metódy (kvapalinová a plynová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou) sú tiež schopné určiť špecifické typy poškodenia DNA (oxidované puríny a pyrimidíny). Vďaka rýchlemu rozvoju technológií génovej expresie sa do popredia dostávajú molekulárne – genetické metódy, ako RT-PCR (real time – polymerase chain reaction), mikročipy, či sekvenovanie. Ide o metódy s veľkým potenciálom pre testovanie reakcií na genotoxický stres alebo zmeny v expresii proteínov aj tvorbe metabolitov. Tieto prístupy majú navyše potenciál prekonať obmedzenia tradičných postupov (skúmanie zmien v obmedzenom súbore génov). (Beedanaragi et al., 2014; Cadet et al., 2017)

Samostatne spomínanou metódou je kométovej analýza. Ide o najobľúbenejšiu metódu na meranie poškodenia DNA u ľudí, ktorá je vyzdvihovaná v mnohých štúdiách. V zásade meria jedno a dvojreťazové zlomy DNA prostredníctvom ich schopnosti uvoľniť superšpirálu slučiek DNA. Najlepšou verziou kométovej analýzy na identifikáciu genotoxického účinku je zásaditá. (Azqueta et al., 2020; Olive et Durand, 2005; Souto et al., 2020; Zare Sakhvidi et al., 2016)

Test kométy sa používa od polovice 80. rokov minulého storočia na štúdium účinkov životného prostredia, posúdenie bezpečnosti terapeutických zlúčenín aj zistenie reparačnej kapacity DNA nielen u ľudí. (Spivak et al., 2009) Keďže sme si kométovej analýzy vybrali pre náš experiment, jej detailnejší popis sa nachádza ďalej v práci.

3.1.2 Opravy poškodenej DNA

Bunka disponuje niekoľkými dobre vyvinutými procesmi opravy DNA, pomocou ktorých predchádza oxidačnému poškodeniu. Nukleotidová excízna reparácia (NER) a bázová excízna reparácia (BER) patria medzi dve najdôležitejšie cesty na opravu DNA. Zároveň čoraz viac dôkazov ukazuje, že korekcia nesprávneho párovania báz (MMR, mismatch repair) hrá významnú úlohu pri oprave oxidačného poškodenia DNA. Všetky spomínané reparačné mechanizmy zohrávajú dôležitú úlohu pri prevencii rakoviny a sú potenciálnymi terapeutickými cieľmi srdcových ochorení. (Azqueta et al., 2014; Gunasekarana, 2015; Hu et al., 2021; Yasui, 2013)

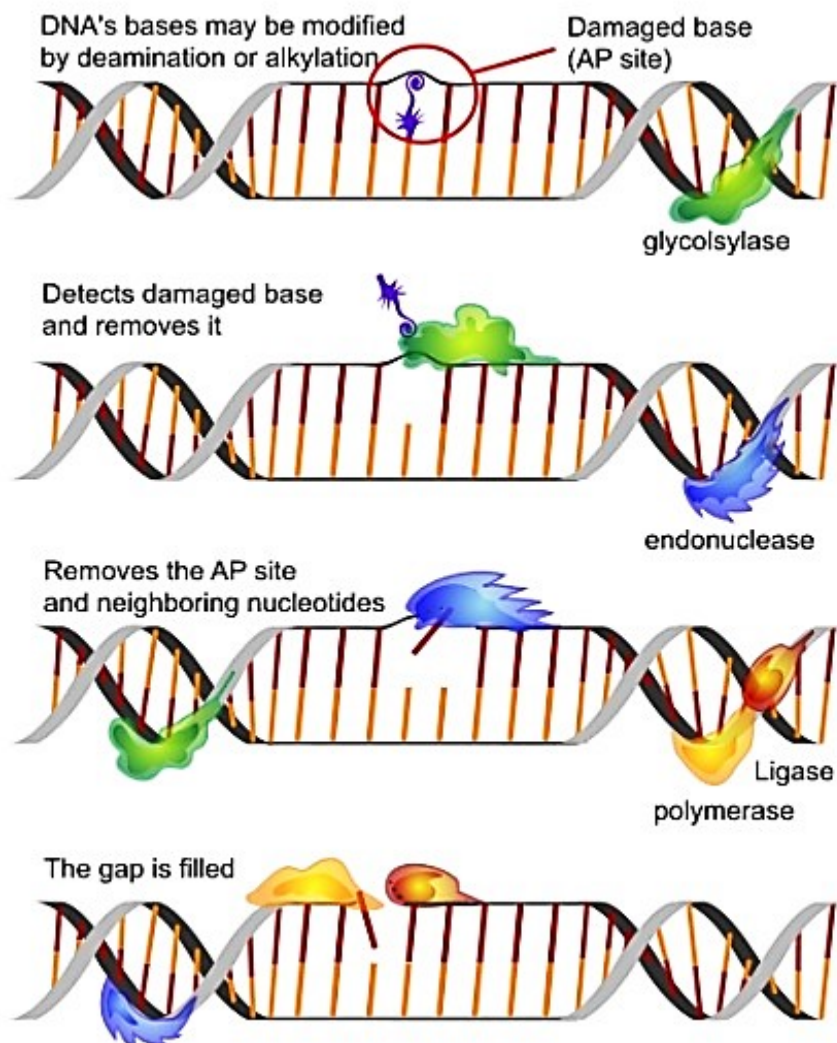
3.1.2.1 BER

Mnohé z génov zapojených do BER sa nachádzajú ako u baktérií, tak u človeka, čo naznačuje že ide o základnú opravnú cestu väčšiny živých organizmov. Dráha BER sa špecializuje na fixáciu lézií, ktoré významne nedeformujú štruktúru špirály, s použitím rôznych proteínových zložiek. Odstraňuje oxidačné, deaminačné a alkylačné poškodenie jednotlivých báz. Veľká časť tohto poškodenia je dôsledkom spontánneho rozpadu DNA aj keď podobné škody sú tiež spôsobované environmentálnymi chemikáliami, žiarením alebo cytostatickou liečbou. (Bohr, 2002; Krokan et Bjoras, 2013; Robertson et al., 2009)

Základný cyklus je zahájený sériou DNA glykozyláz, ktoré rozpoznávajú a odstraňujú modifikované nukleotidové bázy. Zo všetkých glykozyláz prítomných v jadre boli iba niektoré z nich detekované v mitochondriách. DNA glykozylázy štiepia N-glykozidickú väzbu medzi DNA léziou (bázou) a deoxyribózou a vytvárajú AP miesto (apurínové/apyrimidínové miesta).

AP miesta sú odstraňované AP endonukleázou. Reťazec je dosyntetizovaný DNA polymerázou (v prípade 1 poškodenej bázy hovoríme o β DNA polymeráze) a oprava je ukončená spojením dvojreťazca. (Obr. 3) (Khodyreva et al., 2010; Lee et Kang, 2019)

Rozlišujeme monofunkčné a bifunkčné glykozylázy. Monofunkčné glykozylázy sú schopné iba hydrolyzovať glykozidickú väzbu. Niektoré bifunkčné glykozylázy majú aktivitu AP lyázy, ktorá prerušuje fosfodiesterovú väzbu DNA a vytvára jednoreťazový zlom. Pri klasickej BER je dĺžka odstráneného reťazca do šesť báz. V niektorých konkrétnych prípadoch môžu byť odstraňované aj oxidované DNA lézie s dlhou sekvenciou (až 8 nukleotidov). (Jacobs et Schar, 2012; Kumar et al., 2020; Slupphaug, 2003)

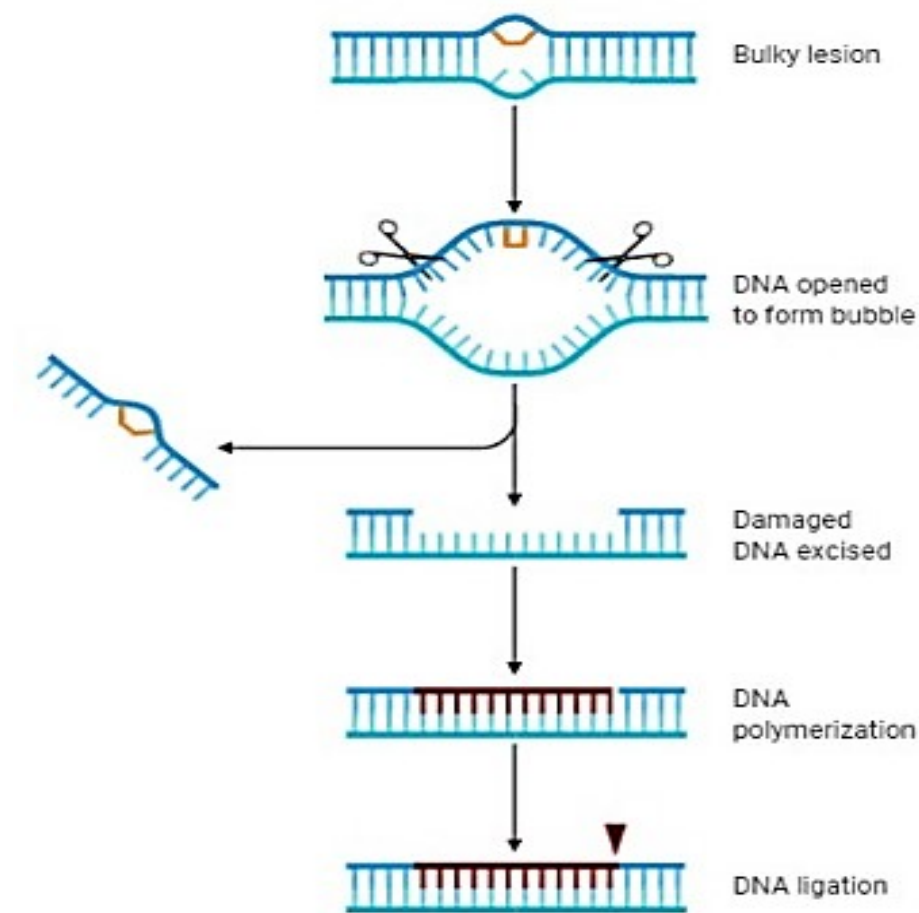


Obr. 3 Schéma BER
Prevzaté z: *Difference Between*, 2017 (online)

3.1.2.2 NER

Nukleotidová excízná reparácia je predovšetkým známa vďaka odstraňovaniu foto-lézií produkovaných UV žiarením, ktoré tvorí hlavne cyklobutánové pyrimidínové diméry (CPD). Okrem toho účinne eliminuje extrémne široký rozsah štrukturálne nesúvisiacich lézií, vrátane objemných chemických aduktov a vnútrošieťových krížových väzieb. (Marteijn et al., 2014) Základom všestrannosti je obchádzanie samotnej lézie. Namiesto toho lézie rozpoznávajúce NER faktory detekujú prítomnosť nepárovej jednovláknovej DNA oproti poškodenému vláknu. (Kusakabe et al., 2019)

NER bežne pozostáva zo štyroch krokov. Po rozpoznaní lézie dochádza k odvnutiu špirály DNA. Vytvorí sa rez a nasleduje excízia poškodeného úseku. Posledným krokom je syntéza a ligácia DNA. (Obr. 4) Na zvládnutie širokého spektra typov poškodenia je do NER zahrnutých viac ako 30 proteínov.



Obr. 4 Schéma NER
Prevzaté z: BioRender, 2021 (online)

NER má zároveň dva čiastkové procesy: s transkripciou spojená NER (TC- NER, transcription-coupled) a globálna genómová NER (GG – NER, global genome NER). Tieto podprocesy sa líšia iba v počiatočnom kroku rozpoznávania lézií. TC - NER je zodpovedný za elimináciu lézií v transkribovanom reťazci aktívnych génov. Stará sa o lézie blokujúce transkripčný proces. GG - NER rozpoznáva a odstraňuje lézie v celom genóme. Keďže skenuje celý genóm je považovaný za relatívne pomalý a o niečo menej účinný proces na opravu poškodenia DNA. (Larsen et al., 2005; Melis et al., 2013)

Aj keď je vzťah medzi poruchou v ľudskom organizme a stratou funkcie špecifického NER génu jasný, medzi narušením BER a poruchami sa vytvorilo menej spojení. Môže to byť spôsobené pravdepodobne množstvom záložných systémov, ako NER pri odstraňovaní malých tzv. non-bulky lézií. (Lee et Kang, 2019)

3.1.2.3 Korekcia nesprávneho párovania báz

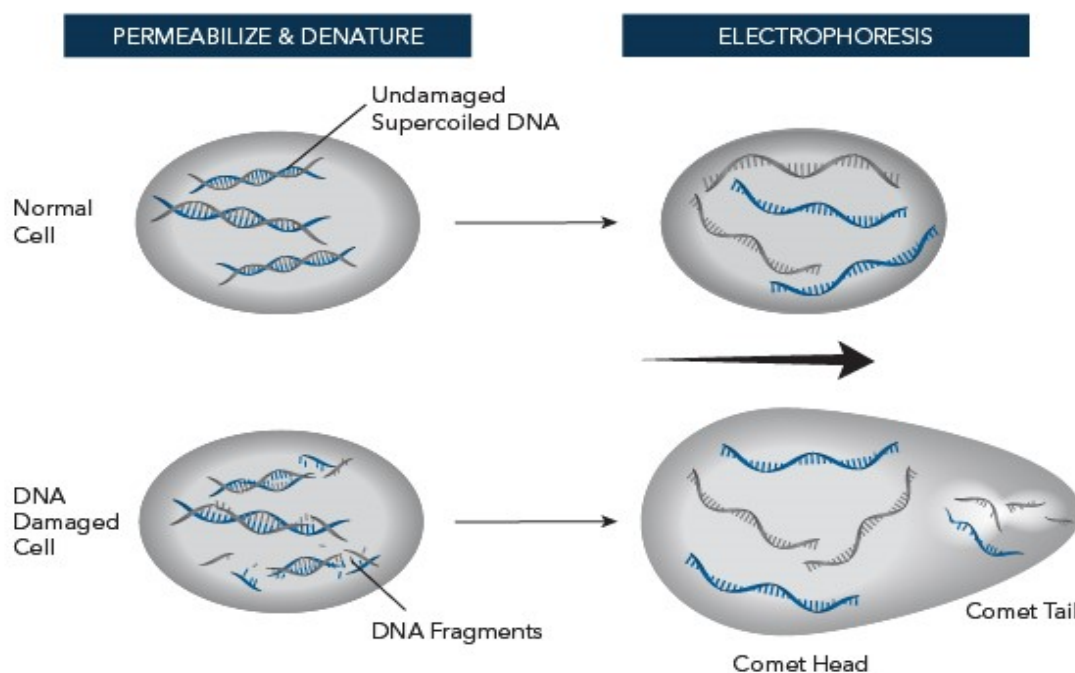
MMR odstraňuje nesprávne párované bázy, ktoré vychádzajú z chýb replikácie, rekombinácie medzi nedokonale zhodnými sekvenciami a deaminácie 5-metyl-cytozínu. Replikácia DNA okolo nezhodného páru by viedla k bodovej mutácii. Predpokladá sa, že systém opravy nesprávne zaradených báz hrá úlohu aj pri reparácii oxidačného poškodenia. Doposiaľ nebol molekulárny mechanizmus eliminácie lézií u MMR úplne pochopený. Zdá sa, že proteíny súvisiace s MMR rozlišujú rodičovské vlákno a novonarodený reťazec DNA. Lézie DNA na novonarodenom vlákne sú opravované s použitím rodičovského vlákna ako opravného templátu. (Curtin, 2012; Gorbunova et al., 2007; Martin et al., 2010)

Niekoľko dôkazov naznačuje dôležitosť systému korekcie nesprávne párovaných báz pri procese starnutia. MMR je zásadné pre udržiavanie opakovaných sekvencií, pretože mutácie v MMR génoch sú spojené s destabilizáciou mikrosatelitov a tá sa u ľudí zvyšuje so starnutím. (Neri et al., 2005; Yehuda et al., 2001)

Súhrnne, existujú tri rôzne cesty opravy DNA, ktoré ju chránia pred oxidačným poškodením. Nahromadené dôkazy ukazujú, že nedostatočná kapacita BER, NER a MMR pozoruhodne korelovala so srdcovými chorobami aj niekoľkými druhmi rakoviny. (Freudenthal, 2017; Hu et al., 2021; Melis et al., 2013; Pascucci et al., 2011)

3.2 Comet assay (CA)

Kometová analýza alebo gélová elektroforéza jednotlivých buniek (SCGE, single cell gel electrophoresis) je mikroelektroforetická metóda, ktorá sa stala jednou zo štandardných metód na hodnotenie poškodenia a rýchlosti reparácie DNA a to na úrovni jednotlivých eukaryotických buniek. Test je založený na schopnosti denaturovaných štiepených fragmentov DNA alebo poškodenej DNA migrovať pri elektroforéze z bunky za vzniku chvosta kométy („comet tail“), zatiaľ čo nepoškodená DNA ostáva v bunkovej membráne a vytvára hlavu kométy („comet head“). (Obr. 5) (Azqueta et al, 2011; CometAssay, 2021)



Obr. 5 Porovnanie zdravej bunky a bunky s poškodenou DNA
Prevzaté z: CometAssay, 2021

Najčastejšie prevedenie testu je za alkalických podmienok, ktoré slúži k detekcii jednoreťazových (SSB, single strand breaks) aj dvojreťazových (DSB, double strand breaks) zlomov DNA. V alkalickom prostredí dochádza k narušeniu neväzbových interakcií medzi dusíkovými bázami DNA a teda k oddeleniu oboch vlákien dvojitej závitnice. Je možné ho uskutočniť aj za neutrálnych podmienok k detekcii iba dvojvláknových zlomov. Ku zlomu dochádza v dôsledku prerušenia fosfodiesterovej väzby medzi dvoma susednými deoxynukleotidmi. Dvojreťazové zlomy sa delia na posunuté, ak vznikajú na oboch reťazcoch na rôznych a zároveň blízkych miestach alebo zarovnané, ktoré vznikajú protiľahlo. Pri vzniku

zlomov v reťazcoch DNA figurujú tzv. AP miesta, ktoré sú alkali-labilné a pri vysokom pH sú premenené na zlomy v reťazcoch. (Dvořák et Matejovičová, 2008; Moller, 2018)

Test je atraktívny svojou jednoduchosťou, citlivosťou, rýchlosťou a všestrannosťou. Je schopný jemnej manipulácie, ktorá nám hovorí nielen o tom, aké veľké je poškodenie, ale aj akú má formu. (Azqueta et Collins, 2013) Metódu je možné aplikovať aj na rastlinné bunky, krvinky zvierat, živočíšne tkanivá, hemolymfové bunky mäkkýšov a hmyzu, spermie, kvasinky. Akýkoľvek typ eukaryotických buniek, ktorý je možné získať ako jednu bunku alebo nukleárnu suspenziu je prístupný kométovej analýze. (Olive et Banáth, 2006) Kométy je možné získať aj z izolovaných chromozómov. (Cortés-Gutiérrez et al 2011)

3.2.1 História

V 70. rokoch minulého storočia Peter Cook a jeho kolektív publikovali článok skúmajúci jadrovú štruktúru založenú na lýze buniek. Týmto postupom dôjde k odstráneniu membrány, bunkových rozpustných zložiek a väčšiny histónov. Ostal nukleoid, ktorý pozostáva z jadrovej matrice alebo kostry zloženej z RNA a proteínov spolu s DNA, ktorá je negatívne nadzávitnicovo zvinutá. Prežitie nadzávitnice znamená, že voľná rotácia nie je možná. Cook navrhol model s DNA pripojenou k templátu tak, aby bola usporiadaná ako séria slučiek, a nie ako lineárna molekula. Čím viac zlomov je prítomných, tým viac slučiek sa uvoľní a tým intenzívnejšia bude intenzita zafarbenia chvosta kométy vzhľadom na jadro nukleoidu. (Collins, 2002; Piperakis 2009)

Test komét vo svojej najbežnejšej forme zahŕňa lýzu s detergentom a s vysokým obsahom solí, po tom ako sú bunky vložené do agarózy na mikroskopickom sklíčku, aby bola DNA imobilizovaná na následnú elektroforézu. Prvú ukážku „komét“ priniesli v roku 1984 Ostling a Johanson, ktorí popisujú chvosty, ako DNA s uvoľnenou nadzávitnicou a odkazujú na nukleoidný model Cooka. Lýza a elektroforéza sa uskutočnili za mierne alkalických podmienok ($\text{pH} < 10$) tak, aby bola DNA čiastočne relaxovaná. Po neutralizácii boli bunky zafarbené pomocou akridínovej oranžovej. Pomer červenej (jednoretazová DNA) a zelenej (dvojretazová DNA) fluorescencie bol zmeraný fotometricky. V tomto postupe bolo možné analyzovať iba dvojláknové zlomy. (Collins, 2014; Ostling et Johanson, 1984)

Test bol neskôr modifikovaný dvoma výskumnými skupinami. Prvá skupina predviedla elektroforézu za vysoko alkalických podmienok ($\text{pH} > 13$). Druhá skupina vykonávala elektroforézu za neutrálnych až mierne alkalických podmienok, aby detekovala zlomy jedného

vlákna. Pri neutrálnom pH však nedochádza k narušeniu súvislosti reťazca dvojitej špirály a jednoreťazové zlomy sa neprejavia. Toto je dôvod nejednotnosti starších štúdií s novými, ktoré toto tvrdenie používajú, ale ani nové sa týmto tvrdeniam nevyhýbajú. Dôvodom nejednotnosti môže byť aj porovnávanie kométovej analýzy s inými metódami na meranie zlomov DNA. (Collins, 2004)

3.2.2 Modifikácie metódy

3.2.2.1 Neutrálna verzia CA

V roku 1991 bola použitá radikálne odlišná neutrálna verzia kométovej analýzy na uľahčenie detekcie dvojreťazových zlomov, bez interferencií jednoreťazových zlomov. (Olive et al., 1991)

Dnes sa metóda využíva na detekciu oboch typov zlomov bez možnosti ich rozlíšenia. Pre samostatné sledovanie dvojreťazových zlomov je nutná špeciálna úprava s využitím inkubácie s proteázou pri vysokej teplote (50°C). Predpokladá sa, že dôjde k narušeniu jadrovej matrice takže naozaj sledujeme správanie dvojvláknových kusov DNA. (Olive et Johnston, 1997) Často používaný detergent Triton X-100 ako súčasť lyzačného roztoku účinnosť proteázy výrazne znižuje. (Singh, 2000b)

3.2.2.2 Alkalická CA

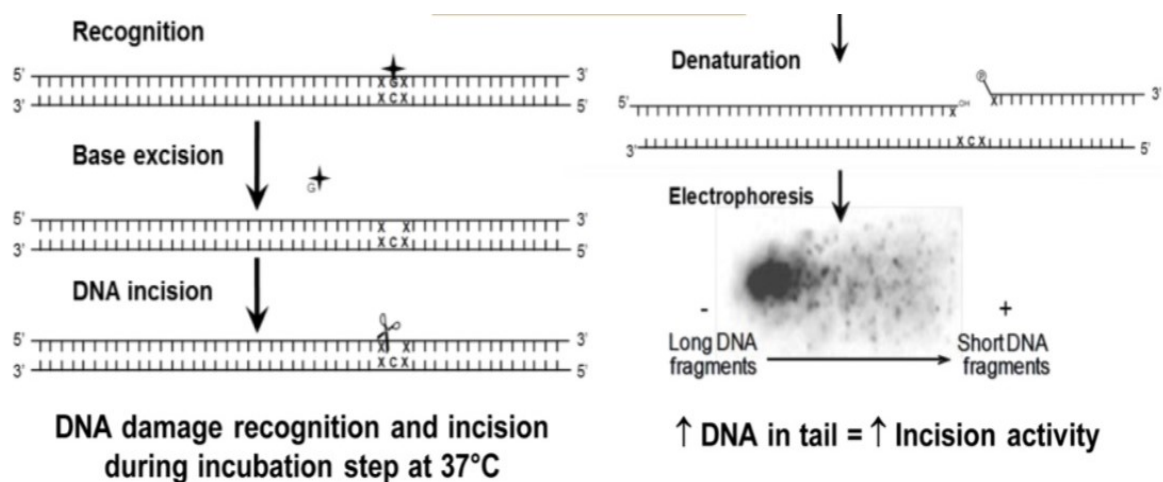
Momentálne sa používa niekoľko verzií kométového testu no najviac populárnou je alkalická. Predstavená bola prvýkrát v roku 1988. (Singh et al., 1988) Štandardná verzia alkalickéj analýzy slúži k detekcii alkali-labilných miest (v zásaditom roztoku sa menia na jednoreťazové zlomy) a jednoreťazových zlomov DNA, spôsobených ako endogénnymi, tak aj exogénnymi látkami (napr. chemikálie, radiácia alebo nanomateriály). (Muzarubal, 2020; Pu et al., 2015) Metóda meria nízku úroveň pretrhnutia vlákna s vysokou citlivosťou. (Singh et al., 1988)

Meranie reťazových zlomov poskytuje obmedzené informácie. Zlomy môžu predstavovať priamy účinok škodlivého činiteľa, ale spravidla dôjde k ich spätnému pripojeniu. V skutočnosti sa môže jednať o AP miesta, ktoré sú labilné voči alkáliám a preto sa javia ako zlomy. Alebo ide o medziprodukty bunkovej opravy, kde sú poškodené nukleotidy nahradené novými. (Collins, 2004) Pre vylepšenie senzitivity a selektivity došlo v postupe ku pridaniu jedného kroku navyše: inkubácia pri 37°C s enzýmami (endonukleázy) špecifickými pre danú

léziu, ktoré konvertujú poškodené bázy na zlomy v DNA a umožňujú určiť špecifický typ poškodenia. (Obr. 6) (Costa, 2014; Azqueta et Collins, 2013)

Používané typy endonukleáz:

- Endonukleáza III (ENDO III) - stanovenie oxidovaných pyrimidínov
- T4 endonukleáza V - stanovenie cyklobutánových pyrimidínových dimérov po expozícii UV
- Formamidopyrimidin DNA glykozyláza (FPG) - stanovenie oxidovaných purínov
- 8-oxoguanin glykozyláza (OGG1) - stanovenie oxidovaných purínov a formamidopyrimidínov
- 3-metyladenin DNA glykozyláza II (AlkA) - stanovenie alkylovaných bází po ich konverzii na AP miesta
- Uracil DNA glykozyláza (UDG) - stanovenie uracilu nesprávne inkorporovaného v DNA



Obr. 6 Inkubácia DNA so špecifickým enzýmom

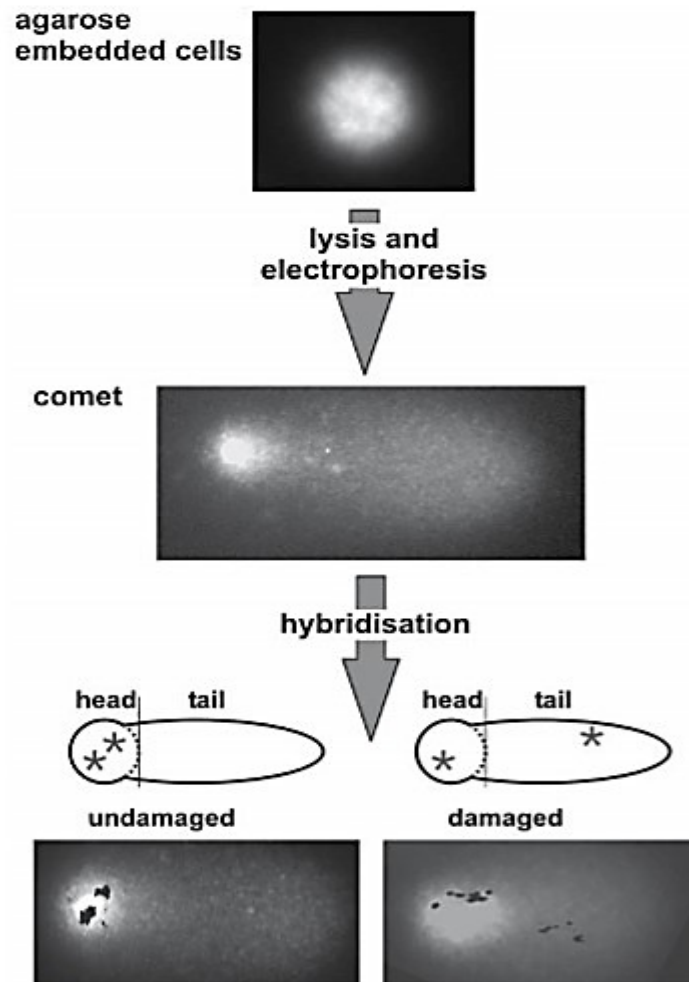
Rozpoznanie poškodeného miesta DNA, jeho zlom počas inkubácie so špecifickým enzýmom, denaturácia a elektroforéza = čím viac DNA v chvoste, tým väčšia aktivita enzýmu (tvorba zlomov)

Prevzaté z: Azqueta, 2019

3.2.2.3 Comet-FISH

Comet-FISH (fluorescenčná *in-situ* hybridizácia) je modifikácia kométového testu, ktorá obsahuje hybridizačný krok po elektroforéze, vďaka ktorému je možné špecifické značenie sekvencií v rámci kométy. (Obr.7) Je výkonnou technikou pre komparatívne analýzy opravy a indukcie poškodenia v genómoch a v špecifických sekvenciách DNA. (Rapp, 2004)

Základom sú sondy komplementárne k úseku DNA, ktoré umožňujú detekciu konkrétnych chromozómov, časti chromozómov (teloméry, centroméra) aj génov. (Santos, 1997)



Obr. 7 Princíp Comet-FISH

Agaróza s imobilizovaným poškodeným jadrom - lýza a elektroforéza (separácia fragmentovanej DNA) - detekcia špecifických sekvencií po hybridizácii *in situ* so značenými DNA sondami (môžu sa priradiť k chvostu/hlave kométy = poškodené/nepoškodené) Tmavé škvrny na obrázkoch komét sú hybridizačné signály.

Prevzaté z: Rapp, 2004

3.2.2.4 Apoptické bunky

Ak sa takmer všetka DNA nachádza na chvoste kométy a jej hlava má redukovanú veľkosť, obraz označujeme ako ježka („the hedgehog“). Predpokladá sa, že ide o bunku v apoptóze. Tieto kométy ale môžu vznikáť aj po pôsobení vysokej dávky gama žiarenia alebo inkubáciou s peroxidom vodíka. Je možné, že niektoré z vážne poškodených buniek prekonajú bunkovú smrť, napriek tomu ich nemožno označiť za apoptické. Jedným z dôvodov je, že

apoptóza je proces nevratný, ale bunky s poškodením sú schopné opravy do takej miery, že ježko nebude viditeľný. Správna hustota komét v géle naznačuje prítomnosť všetkých buniek (nedošlo k odstráneniu poškodených buniek). Zároveň je genetická informácia počas apoptózy degradovaná na úroveň nukleozómu. V jednotlivých krokoch analýzy (lýza, elektroforéza) by sa takto malé fragmenty úplne stratili. (Collins, 2004; Tice et al., 2000)

Singh popísal vizualizačnú metódu pre apoptické bunky. Bunky zaliate do agarózy a lyzované ako pri bežnom kométovom teste neprejdú elektroforézou, ale sú precipitované v etanole. Na vyvolanie apoptózy a nekrózy bol použitý peroxid vodíka, novobiocín, soľný askorbát a mitoxantrón. Bunky apoptické vykazovali „mraky“ s hmlovitým ohraničením, zatiaľ čo nekrotické bunky mali homogénne, ostro ohraničené a nezvyčajne veľké jadro. (Singh, 2000a)

3.2.3 Stanovenie reparácie DNA

Ľudská DNA je vystavovaná látkam, ktoré môžu modifikovať jej štruktúru. Tieto štrukturálne zmeny majú rôznu formu: zlomy v kostre cukru a fosfátu ovplyvňujúce obe vlákna (SSB/DSB), oxidácia/alkylácia báz, objemné DNA adukty, cross-linky (DNA-DNA/ proteín - DNA), nesprávne spárované bázy. Vznikajúce lézie ovplyvňujú transkripciu, ale čo je dôležitejšie, ak nie sú opravené pred replikačným procesom, sú schopné indukovať mutácie. Najjednoduchším spôsobom merania reparačnej aktivity DNA je indukcia poškodenia v bunkách a následné sledovanie rýchlosti opravy/ odstránenia lézií. Aj keď bol alkalický kométový test primárne vyvinutý na meranie poškodenia DNA, používa sa tiež na meranie jej schopnosti opravy. (Azqueta et al., 2019) Po prvýkrát sa touto problematikou zaoberali Ostling a Johanson pri skúmaní bunkovej línie myšieho lymfómu po expozícii gamma rádiácie. Použili neutrálnu verziu, kde DNA nie je denaturovaná. (Ostling et Johanson, 1984)

Dôležité je zaistiť monitorovanie opravy konkrétnej lézie a preto musia byť indukované lézie čo najčistejšie. Jednovláknové zlomy sú ľahko indukované pôsobením peroxidu vodíka, röntgenovým žiarením alebo gamma lúčmi. Oxidované puríny (8-oxoguanín) sa tvoria kombináciou fotosenzibilizátoru a viditeľného svetla. Alkylované zásady vznikajú po expozícii alkylačného činidla, ako je metylmetánsulfonát (MMS). UV(C) žiarenie vyvoláva vznik dimérov pyrimidínov. Aby sme sa vyhli nasýteniu reparačnej schopnosti DNA, je nutná optimálna dávka žiarenia alebo koncentrácie chemikálií. (Azqueta et al., 2014)

Pripravené substráty sa inkubujú s lymfocytmi, ktorých reparačné enzýmy rozpoznávajú typy lézií u nukleotidov. Nukleotidy s 8-oxoguanínom použijeme na skúmanie BER reparácií a pre NER reparácie máme nukleotidy s dimérmí pyrimidínov. Aby sa predišlo falošne pozitívnym výsledkom, dôležitá je paralelná inkubácia lymfocytov s nepoškodenými nukleotidmi. Vylúčime tým účinok nešpecifických endonukleáz. Podľa typu poškodenia je rozdielna aj rýchlosť opráv. Jednovláknové zlomy sa spoja do 30. minút a oprava dvojvláknových zlomov trvá aj niekoľko hodín. (Azqueta et al., 2009)

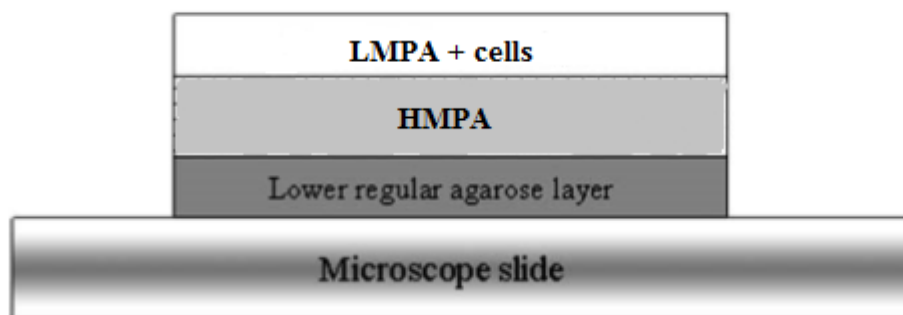
Štúdium opravy jednotlivých génov alebo sekvencií DNA používa modifikovanú verziu kométového testu s fluorescenčnou *in-situ* hybridizáciou (Comet-FISH). V tomto teste je možné opravu poškodenia v konkrétnom géne sledovať monitorovaním ústupu génovo-špecifických signálov z chvosta do hlavy kométy v priebehu času. (Guo et al., 2013; Shaposhnikov et al., 2011)

Ďalším prístupom získania aktivity opravy pomocou CA je meranie akumulácie zlomov DNA blokovaním opravy jej syntézy. Ide o použitie inhibítorov DNA polymerázy (napr. cytozín v kombinácii s hydroxymočovinou), ktorá sa podieľa na ceste opravy. (Speit et Rorhuss, 2012; Vande Lock et al., 2010)

3.2.4 Princíp a metodika CA

Metóda je založená na kombinácii gélovej elektroforézy a fluorescenčnej mikroskopie. Dochádza k vizualizácii pohybu poškodenej časti DNA v agarózovom géle. (Dusinska et Collins, 2008; Olive et Banath, 2006)

Napriek odlišnosti jednotlivých protokolov používaných pri kométovej analýze môžeme postup zovšeobecniť. Podložné mikroskopické sklíčka sú z jednej strany rovnomerne potiahnuté tenkou vrstvou agarózy. Na ňu je pridávaná ďalšia vrstva agarózy, tentokrát s vysokým bodom topenia (HMPA, high melting point agarose). Spravidla ide o „sendvičový“ gél, v ktorom sú bunky obsiahnuté v jeho najvrchnejšej vrstve. Suspenzia analyzovaných buniek v nosnom médiu je zmiešaná s agarózou s nízkym bodom topenia (LMPA, low melting point agarose). (Obr. 8). Tá ma oproti normálnej agaróze nižšiu teplotu tuhnutia a je pri fyziologických teplotách stále tekutá. To znižuje riziko poškodenia buniek vysokou teplotou. Príslušné krycie sklíčko sa používa na vyrovnanie každej roztavenej agarózovej vrstvy. Koncentrácie buniek v agaróze, ako aj koncentrácia samotnej agarózy sú dôležitými parametrami pre zabezpečenie úspešnej analýzy. (Dvořák, 2013; Liao et al., 2009)



Obr. 8 Schéma jednotlivých vrstiev agarózy na mikroskopickom sklíčku
 Prevzaté z: Liao et al., 2009 (upravené autorom)

Pre kométovú analýzu sú k dispozícii štandardné (so zbrúseným koncom) alebo špeciálne (finančne náročné) mikroskopické sklíčka. Použitie štandardných má výhodu v ľahkej dostupnosti, ale nevýhodu predstavuje samovoľná separácia gélu od skla. Riešením môže byť použitie skiel so zábrusom po celej ploche, kde agaróza lepšie adheruje, ale zároveň sťažuje analýzu. (Singh et al., 1994) Na časté problémy týkajúce sa samovoľnej separácie agarózy nie je jednoduché riešenie. Jedným z faktorov prispievajúcim k oddeľovaniu gélu je vlhkosť prostredia. (Olive et Banath, 2006)

Sklíčka s bunkami sú následne vložené do vychladeného lyzačného roztoku. Jeho zloženie nie je medzi laboratóriami jednotné, ale prevažne obsahuje soli a detergenty. Dĺžka pôsobenia roztoku sa pohybuje od desiatok minút, až po hodiny alebo dni. (Liao et al. 2009) Ako už bolo spomínané, účinkom lyzačného roztoku dochádza k odstráneniu membrány, cytoplazmy a väčšiny nukleárných proteínov. Ostáva DNA vo forme nukleoidu. Sklá sú ešte pred elektroforézou vložené do denaturačného roztoku. Denaturácia trvá zvyčajne 20 minút. Pri aplikácii neutrálnej verzie je krok denaturácie vynechaný a hneď po lýze nasleduje elektroforéza v neutrálnom prostredí. V závislosti na použitej modifikácii sa používa pH elektroforetického pufru v rozmedzí 7 - 13. Sklíčka s nukleoidmi, ktoré sú imobilizované v agaróze sa umiestnia do elektroforetickej vane naplnenej pufrom. Podmienky sú prispôbené typom použitých buniek. Napätie je konštantné a pohybuje sa v rozsahu 0,5 – 5 V/cm. (Brunborg et Collins, 2020; Muller, 2007)

V prípade výskytu zlomov v reťazcoch dôjde k relaxácii nadzávitnicového vinutia. Negatívny náboj molekuly DNA spôsobuje migráciu fragmentov k anóde (kladná elektróda). Superhelixová DNA sa príliš nepohybuje vplyvom nízkeho množstva voľných koncov a veľkej molekulovej hmotnosti. (Dusinska et Collins, 2008; Olive et Banath, 2006)

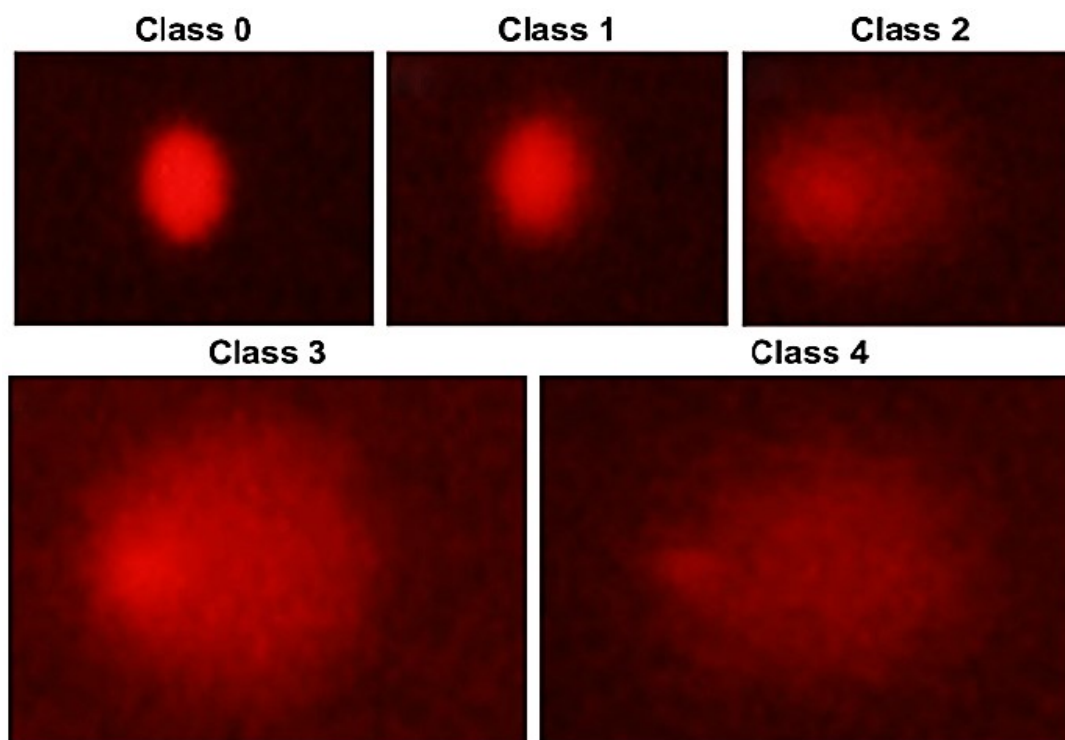
3.2.4.1 Vizualizácia komét

Kométy sú po elektroforéze a neutralizácii s vhodným pufrom vizualizované pomocou fluorescenčných farbív, ale je možné použiť aj farbenie striebrom (metóda striebrenia). Použitie farbív závisí na spôsobe skórovania aj na potrebách užívateľa. (Collins *et al.*, 2008) Medzi najbežnejšie DNA – viažuce sa fluorescenčné farbivá patria etídium bromid (EB), 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), akridínová oranžová, SYBR Green, YOYO-1 alebo propídium jodid. (Tice *et al.*, 2000)

Fluorescenčné látky sú vysoko špecifické a vyžadujú drahý fluorescenčný mikroskop. Aj samotné farbivá sú finančne náročné. Zároveň sú niektoré z farbív mutagénne (etídium bromid, propídium bromid) a je treba dbať na zvýšenú opatrnosť pri manipulácii s nimi. Medzi ďalšie nevýhody patrí blednutie farbiva a zmena intenzity svetla excitačnej lampy. (Kumaravel *et al.*, 2009; Olive, 2002) Použitie nefluorescenčnej techniky je lacnejšie a bez nutnosti špeciálneho mikroskopu. Oproti fluorescenčnej metóde nie je trvácnosť farbenia príliš závislá na skladovacích podmienkach a vďaka tomu môžeme suché gély farbené striebrom lepšie zaostriť. Samotné prevedenie je prácne a kvôli nešpecifickosti musíme metodiku optimalizovať. (Nadin *et al.*, 2001)

3.2.4.2 Hodnotenie komét

Posledným krokom testu je vyhodnotenie komét po ich zafarbení. Najjednoduchší spôsob odhadu efektívnosti výstupu DNA z nukleoidov je číslovanie komét vizuálnou kontrolou. Takáto kontrola zahŕňa klasifikáciu komét do piatich kategórií podľa vzhľadu chvosta. Kométy triedy, ktorá sa označuje ako C0 nemajú žiadny chvost (nepoškodené bunky), triedy C1 – C3 predstavujú kométy s rastúcou intenzitou chvosta. Trieda C4 zahŕňa kométy s vysoko fragmentovanou DNA (napr. apoptické bunky), kde takmer celá DNA migruje do chvosta a vytvára skôr oblak ako chvost, ktorý stráca spojenie s hlavou kométy (Obr. 9). Je zrejmé, že akékoľvek vizuálne hodnotenie je subjektívne. Presnejší kvantitatívny odhad je možný vďaka špeciálnym softvérom, ktoré umožňujú analýzu obrázkov digitálnych komét. Manuálne hodnotenie je oproti špeciálnemu softvéru podstatne rýchlejšie. Používaná technika vyhodnocovania závisí v prípade špeciálneho programu na dostupnosti, ale aj na preferenciách užívateľa. (Afanasieva *et Sivolob*, 2018; Collins *et al.*, 2008)



Obr. 9 Klasifikácia komét

Poškodená DNA v ľudských lymfocytoch pri alkalickjej kométovej analýze, vizualizácia pomocou epifluorescenčného mikroskopu (triedy komét C0 nepoškodené - C4 maximálne poškodené).

Prevzaté z: Yigit et al., 2018

Spravidla sa merajú tieto parametre: relatívne množstvo DNA v chvoste (% tail DNA), dĺžka chvosta (tail length), „tail moment“ a „olive tail moment“. Dĺžka chvosta je definovaná ako vzdialenosť od stredu hlavy k distálnemu koncu chvosta, zatiaľ čo množstvo DNA v chvoste ako pomer intenzity fluorescence chvosta k celkovej intenzite kométy. Tento parameter má najširší možný rozsah (0 - 100% DNA v chvoste) a je najmenej ovplyvnený vonkajšími faktormi. (Lovell, 2008; Moller, 2018) Dĺžka chvosta alebo inak dĺžka migrácie DNA sa vplyvom poškodzujúceho agens ustáli v určitej vzdialenosti a je preto užitočná iba pre nízku úroveň poškodenia. (Olive, 2002) Je nevyhnutné rozlišovať „tail moment“ a „olive tail moment“. Tieto odlišné parametre sú často navzájom zamieňané. „Tail moment“ je výsledkom súčinu % tail DNA a tail length, teda % DNA v chvoste vynásobené dĺžkou chvosta. „Olive tail moment“ je definovaný ako % DNA v chvoste vynásobený vzdialenosťou medzi ťažiskami DNA v chvoste a hlave: $\% \text{ tail DNA} \times (\text{tail mean X} - \text{head mean X})$. Nie je meraný v štandardizovaných jednotkách a v rôznych programoch pre analýzu obrazu nadobúda rozdielne hodnoty. (Kumaravel et Jha, 2006)

Fáza bunkového cyklu a použitý typ kométovej analýzy môžu ovplyvňovať hodnotenie. Bunky v S-fáze obsahujú replikačné štruktúry a ich odpoveď na poškodzujúce agens je odlišná oproti nereplikujúcej sa DNA. Replikačné štruktúry sa pri alkalickkej SCGE chovajú ako SSB a migráciu zvyšujú. Pri neutrálnej verzii však tieto štruktúry migrácii DNA bránia. (Olive, 2002)

3.2.5 Výhody a limity CA

Kométovej analýze je relatívne rýchla, jednoduchá a senzitívna technika na analýzu poškodenia DNA vo všetkých typoch buniek. Ide o kombináciu jednoduchosti detekcie zlomov DNA pomocou biochemickej techniky a jednobunkového prístupu, ktorý je typický pre cytogenetické testy. Oproti iným cytogenetickým postupom, ktoré trvajú aj niekoľko dní je vďaka softvéru rýchlejšia. Metóda je neinvazívna a na analýzu stačí 100 buniek. Ďalšou z výhod je náhrada rádioizotopov pri vizualizácii inými farbivami. Tie umožňujú stanovenia v akýchkoľvek jadrových bunkách. Napriek množstvu výhod, nie je tento, ani žiaden iný samostatný test v súčasnosti úplne spoľahlivým biomarkerom pre genotoxické účinky poškodzujúce DNA. Preto sa dôrazne odporúčajú doplňujúce techniky na štúdium genotoxického pôsobenia. (Liao et al. 2009; Reynoso et al., 2015)

Schopnosť analyzovať jednotlivé bunky je výhodou z hľadiska identifikácie subpopulácií, ktoré reagujú odlišne na cytotoxickú liečbu. Počet buniek a vzoriek, ktoré je možné spracovať je prakticky obmedzený. V najlepšom prípade sa zhodnotí 600 komét za hodinu, ak sú analyzované jednotlivito. Pomocou automatických systémov je možné zhodnotiť okolo 50 snímok denne. Odporúčaná veľkosť vzorky 50 komét nemusí byť primeraná, ak v populácii existuje výrazná heterogenita poškodenia DNA. Obmedzením je aj požiadavka na jednobunkovú životaschopnú suspenziu. Ak vzorky obsahujú prevažne apoptické alebo nekrotické bunky je nemožné získať presné informácie o prítomnosti špecifických lézií. Test zároveň neposkytuje žiadne informácie o veľkosti DNA fragmentov. Fragmenty sa počas krátkeho pôsobenia elektroforézy neoddeľujú, ale vzdiaľujú od hlavy kométy. (Olive et Banath, 2006; Sasaki et al., 2000)

Predmetom diskusií ostáva zostavenie univerzálneho protokolu a nastavenie ideálneho typu aj množstva buniek, vhodných koncentrácií pufrov aj agaróz. To zabezpečí správnu reprodukovateľnosť a spoľahlivosť metódy. Do budúcnosti bude mať štandardizácia a hlbšie

pochopenie princípu testu rozhodujúci vplyv na aplikáciu CA. (Banath et al., 2001 Tice et al. 2000)

3.2.6 Aplikácia CA

CA sa často používa v biomonitorovacích štúdiách týkajúcich sa životného a pracovného prostredia alebo stravovania ako biomarker expozície genotoxických látok (tiež ako ochranné činidlá v prípade fytochemikálií). (Azqueta et al., 2020) Medzi ďalšie aplikácie patrí hodnotenie oxidačného stresu a zlomov v DNA, súvisiace s ľudskými chronickými a degeneratívnymi ochoreniami (napr. Alzheimerova a Parkinsonova choroba), stanovenie predispozície k určitému ochoreniu, monitorovanie liekovej terapie, či detekcia poškodenia DNA spojená s fajčením. (Collins, 2002; Thanan et al., 2015)

Cieľom štúdie, spôsob kontrolovania mätúcich faktorov, odber vzoriek a výber štatistickej analýzy musia byť posudzované od prípadu k prípadu. V súčasnosti nie sú konkrétne znalosti o tom, ktoré faktory sú konzistentné a sú silnými determinantmi pre úroveň poškodenia DNA a ktoré boli spojené s poškodením iba v istých prípadoch. (Azqueta et al., 2020)

Individuálna reparačná kapacita je cenným biomarkerom pri určovaní citlivosti organizmu na vznik mutácií a rakoviny. Vysoká reparačná aktivita znamená zníženú šancu replikácie poškodených buniek a teda vedie k zníženiu množstva potenciálnych mutácií. Na druhej strane môže reflektovať činnosť DNA poškodzujúcich látok, ktoré indukujú syntézu opravných enzýmov. (Azqueta et al., 2014)

Pre svoju jednoduchosť, senzitivnosť a malý počet požadovaných vzoriek sa CA stala ideálnym detekčným systémom pre forenzné aplikácie. Presný odhad posmrtného intervalu (*postmortem interval*, PMI) je opakujúci sa problém v oblasti súdneho lekárstva. (El-Harouny et al., 2008) Na odhad PMI sa používajú rozličné metódy, ale žiadna neposkytuje presnejší odhad ako 8 hodinové okno. Problém vyriešila technika SCGE zavedená Johnsonovou a Ferrisom pomocou kvalitatívneho a kvantitatívneho hodnotenia fragmentácie DNA. (Johnson et Ferris, 2002) Je známe, že po smrti dochádza k fragmentácii DNA účinkom nukleáz, ktorá sa časom zvyšuje. Výsledky štúdie odhalili, že so zvýšením PMI (0 – 56 hodín) bola zvýšená aj fragmentácia. (Chen et al., 2005; Shukla, 2017; Tozzo et al., 2020)

3.3 Kritický stav

Pri fyziologických podmienkach je udržiavaná homeostáza v pomerne úzkom rozmedzí hodnôt a výkonnosti. Fyziologický stav je klinický stav charakterizovaný normálnymi hodnotami a im zodpovedajúcimi vzájomnými vzťahmi. Za bežných podmienok je stabilný. Trvalým patologickým obrazom na závažnej úrovni je charakterizovaný kritický stav. Patologické hodnoty vyjadrujú neschopnosť návratu k normálu (nedostatočná kompenzačná rezerva organizmu, nedostatočná ofenzívna liečba) a prejavujú sa aj v parametroch základných životných funkcií. Rozhodujúci vplyv na zvrátenie má životaschopnosť pacienta, ktorá je daná hlavne poškodením mozgových funkcií, kardiopulmonálnou rezervou, komorbiditou, ale aj vekom a do určitej miery pohlavím. V medicíne kritických stavov nie je možné vždy získať dostatočné a spoľahlivé anamnestické údaje o danom ochorení, ani presný prehľad o pridružených chronických chorobách. (Kazda et al., 2012; Malbrain et al., 2010)

Medzi hlavné klinické diagnózy intenzívnej medicíny patria:

- Traumatologické - polytrauma, mozgolebečné poranenia, špecifické úrazy
- Netraumatologické - šok, náhla zástava srdca, otravy, TRALI syndróm (transfusion-related acute lung injury)
- Spoločné - sepsa, septický šok, polykompartmentový syndróm
- Bezprostredne následné syndrómy – SIRS (systemic inflammatory response syndrome), MODS (multiple organ dysfunction syndrome), MOF (multiple organ failure)

Infekcie dýchacích ciest spôsobené novým koronavírusom sa pohybujú od miernych, až po závažné a u niektorých pacientov vedú ku kritickému poškodeniu viacerých orgánov a ich zlyhaniu. Napriek širokému spektru klinických prejavov sa u veľkého počtu pacientov vyskytla ťažká pneumónia, ktorá prerástla do syndrómu akútnej respiračnej tiesne (ARDS, acute respiratory distress syndrome). Ten je charakterizovaný progresívnou arteriálnou hypoxémiou a problémami s dýchaním. (Chalkias et al., 2021; Hartog et al., 2021; Iwasaki et al., 2021)

3.3.1 SARS-CoV-2 a COVID-19

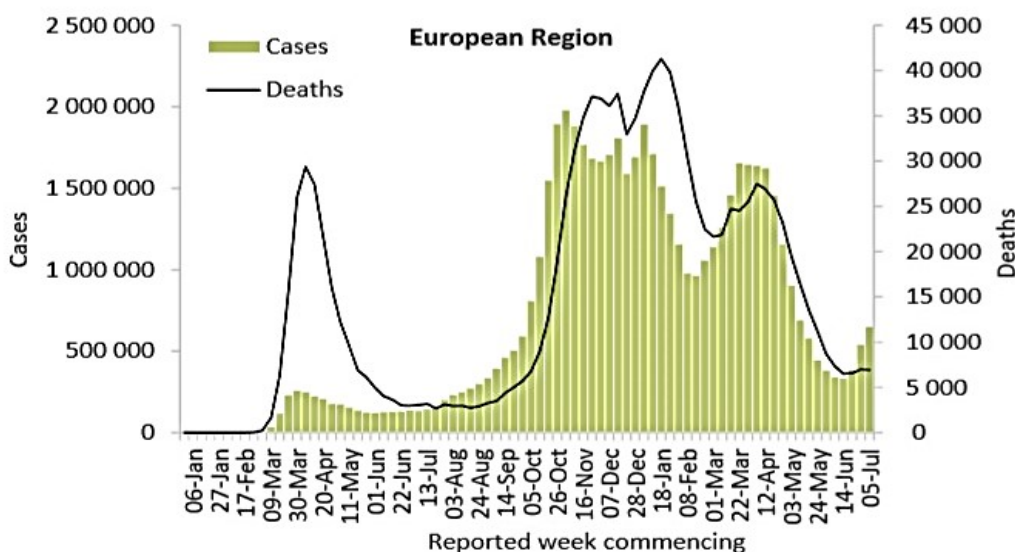
Závažný akútny respiračný syndróm koronavírus 2 (severe acute respiratory syndrom coronavirus 2) je patogénny a vysoko prenosný koronavírus, ktorý sa prvýkrát objavil v Číne, v meste Wu-chan v decembri 2019. Spôsobil pandémiu akútneho respiračného ochorenia

s názvom „koronavírusová choroba 2019“ (COVID-19), ktorá ohrozuje zdravie ľudí a verejnú bezpečnosť. (Hu et al., 2021; Uddin et al., 2020)

Koronavírusy sú tvorené rôznorodou skupinou vírusov, ktoré infikujú mnoho zvierat a môžu u ľudí spôsobovať mierne, až ťažké respiračné infekcie. V rokoch 2002 a 2012 sa u človeka objavili 2 vysoko patogénne koronavírusy zvieracieho pôvodu: SARS-CoV (severe acute respiratory syndrom coronavirus) a MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) spôsobujúce smrteľné respiračné choroby. Tým sa z koronavírusov stal nový problém 21. storočia v oblasti verejného zdravia. (Cui et al., 2019; Iwasaki et al., 2021)

3.3.1.1 Epidemiológia a prenos

Podľa svetovej zdravotníckej organizácie došlo celosvetovo po poklese nových prípadov počas necelých 2 mesiacov opäť k nárastu. Počet úmrtí sa naďalej znižuje. Týždenná úmrtnosť dosiahla necelých 54 000, čo je najnižšia úmrtnosť od októbra 2020. Kumulatívny počet potvrdených prípadov na celom svete presahuje 188 miliónov, s viac ako 4 miliónmi úmrtí (ku dňu 16. 7. 2021). Táto úmrtnosť prevyšuje úmrtnosť bežných ľudských koronavírusov. (WHO, 2021)



Obr. 10 Počet prípadov a úmrtí na/s COVID-19 v Európe
Prevzaté z: WHO, COVID-19 Weekly Epidemiological Update, Edition 48, 2021

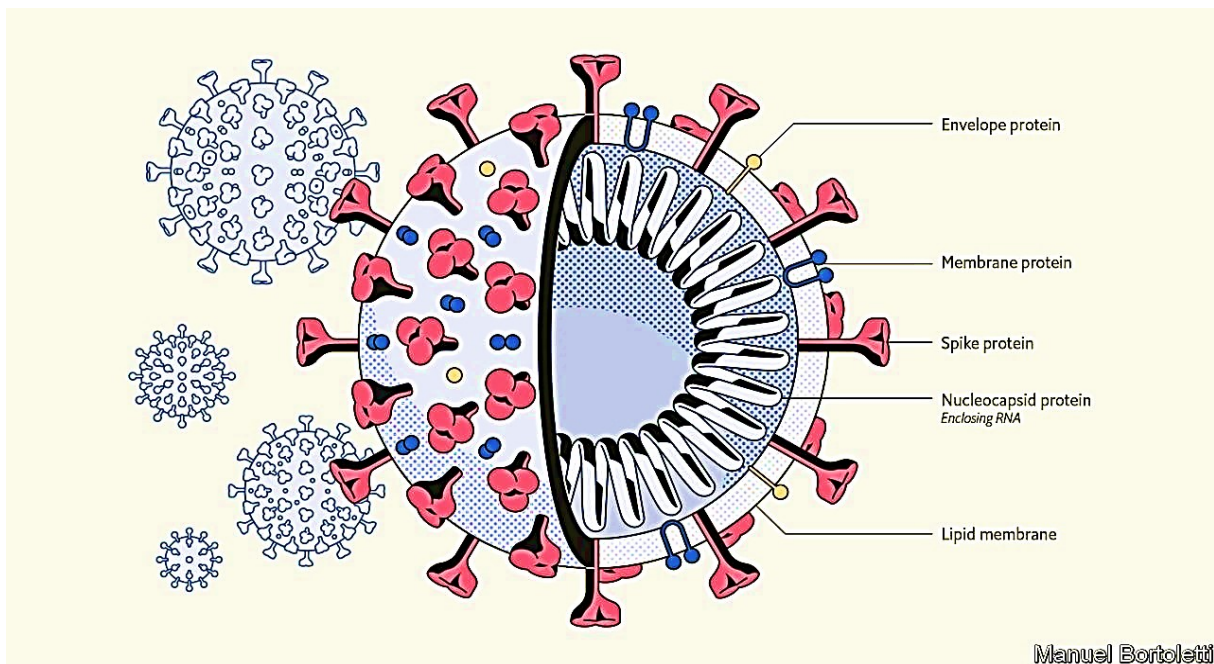
Prípady v Európskom regióne sa posledný mesiac zvyšovali (júl 2021). V týždni od 5. do 11. 7. došlo k 20% nárastu oproti týždňu predchádzajúcemu. Najvyšší počet nových prípadov bolo hlásených v Spojenom kráľovstve (nárast o 30 %), Rusku a Španielsku. Najvyšší počet nových úmrtí bol hlásený z Ruska (nárast o 9 %) a Turecka. Vývoj ochorenia v Európe v priebehu posledného roka a pol je znázornený na obrázku vyššie (Obr.10) (WHO, 2021)

SARS-CoV-2 vírus sa replikuje hlavne v horných a dolných dýchacích cestách. Vírusová RNA môže byť prítomná v periférnej krvi u ťažko chorých pacientov. Primárne sa prenáša vdýchnutím respiračných kvapiek vylučovaných infikovaným pacientom. Ďalším dôležitým zdrojom sú kontaminované povrchy predmetov. Stabilita koronavírusu 2 bola hodnotená v aerosóle aj na povrchoch. Séria experimentov odhalila, že vírus v aerosóle ostal infekčný po celú dobu experimentu, tzn. 3 hodiny. Pokiaľ ide o povrchy, vírus bol najstabilnejší na plaste a oceli (72 hodín). (Salzberger et al., 2021; Van Doremalen et al., 2020) Prenos vírusu je na rozdiel od SARS-CoV, možný aj od asymptomatických a presymptomatických infikovaných jedincov. Pravdepodobná asymptomatická inkubačná doba COVID-19 sa pohybuje od 2 do 14 dní a priemerná inkubačná doba je 5 dní. (Lauer et al., 2020)

Regulovaný prenos z človeka na človeka je zaistený pomocou špecifickej komunikácie medzi receptor-viažucou doménou (RBD, receptor-binding domain) SARS-CoV-2, ktorou je spike proteín a receptorom ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) prítomným v hostiteľovi. Vírus môže používať tento receptor ako vstup do bunky, čím dochádza k patogenéze COVID-19. ACE2 je vo vysokej miere exprimovaný na povrchu pneumocytov 2. typu. Tieto bunky sú zároveň potencionálnym vírusovým rezervoárom, ktorý šíri vírus do ďalších orgánov. (Hoffmann et al., 2020; Loganathan et al., 2021; Zou et al., 2020)

3.3.1.2 Genomika SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je β -koronavírus podobný vírusom spôsobujúcim SARS. Zo siedmich známych druhov vírusu štyri infikujú horné dýchacie cesty a spôsobujú mierne príznaky, zatiaľ čo ostatné sa spájajú s dolnými dýchacími cestami a vyvolávajú závažné ochorenie. Hovoríme o SARS-CoV, MERS-CoV a teraz SARS-CoV-2. Rovnako ako ostatné koronavírusy aj SARS-CoV-2 je obalený, jednovláknový RNA vírus s nesegmentovaným genómom približne o veľkosti 30 kb. Koronavírusy patria medzi jedny z najväčších RNA vírusov. Vírusový genóm kóduje 16 neštruktúrálных proteínov nutných na replikáciu a patogenézu a 4 štruktúralne proteíny vrátane obálky, membrány, nukleokapsidu a spike glykoproteínu, (Obr. 11), ktorý je dôležitý pre určenie podtypu vírusu a zodpovedný za reakciu na vakcíny. S proteín je zložený z dvoch podjednotiek. S1 drží doménu viažucu receptor, ktorá sa viaže na receptor na povrchu hostiteľskej bunky. Podjednotka S2 je potrebná na fúziu vírusu z hostiteľovej bunkovej membrány. (Andersen et al., 2020; Bakhiet et Taurin, 2021; Kim et al., 2020; Lu et al., 2020)



Obr. 11 Štruktúra SARS-CoV-2
 Prevzaté z: *The Economist Newspaper Limited 2021. (online)*

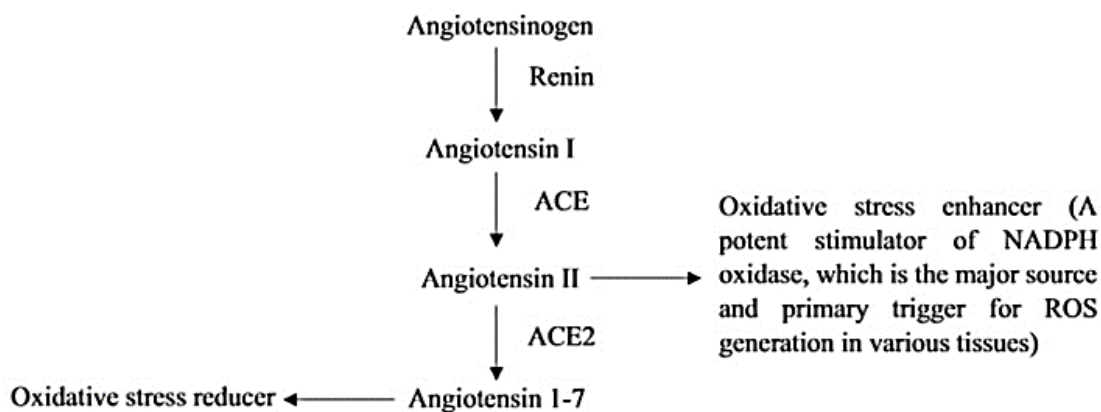
Prvý genóm SARS-CoV-2 bol publikovaný iba pár týždňov po vypuknutí pandémie, 24. januára 2020. Genómová sekvencia vykazuje 75-80 % podobnosť so SARS-CoV najmä v doméne viažucej receptory a 50 % podobnosť s MERS-CoV. Sekvencie zverejnené z mnohých častí sveta sa osvedčili pri sledovaní globálneho šírenia. (Andersen et al., 2020; Hadfield et al., 2018)

3.3.1.3 Patofyziológia a klinické príznaky

Patofyziológia SARS-CoV-2, ktorá ovplyvňuje hlavne dýchací systém je podobná pozorovanej patofyziológii SARS-CoV. Za progresiu ochorenia sa považuje komplexná súhra viacerých patologických mechanizmov, vrátane priamych cytopatických účinkov, zníženej regulácie ACE2 s následnou dysbalanciou systému RAAS (renín-angiotenzín-aldosterón), koagulopatie spojenej s exocytózou prokoagulačných faktorov, trombotickej mikroangiopatie, nekontrolovateľnej systémovej alebo lokálnej trombózy a autoimunity. Jednotlivé interakcie týchto vzájomne prepojených mechanizmov s dysfunkciou orgánov spojených s COVID-19 zostávajú neurčené. (Bakhiet et Taurin, 2021; Eijk et al., 2021)

ACE2 je zodpovedný za degradáciu vazokonstriktora angiotenzínu II (Ang) na vazodilatátor Ang 1-7 (Obr. 12). Ang II produkuje reaktívne formy kyslíka a dusíka stimuláciou membránovo viazanej NADPH oxidázy. Jej degradáciou pomocou ACE2 sa oxidačný stres zmiernuje, pretože inhibuje NADPH oxidázu. Ak je ale ACE2 viazaný na proteín S, bunková koncentrácia Ang II sa zvyšuje. To vedie k zvýšenej prítomnosti RONS a následne

k poškodeniu buniek oxidačným stresom. RONS môžu oxidovať cysteinové zvyšky na peptidázovej doméne ACE2 receptorov a RBD proteínov SARS-CoV-2, pričom ich udržujú v oxidovaných (disulfidových formách). Oxidácia tiolov na disulfidy mechanizmom oxidačného stresu by mohla zvýšiť afinitu proteínov SARS-CoV-2/ SARS-CoV k receptoru ACE2 a zvýšiť tak závažnosť infekcie. (Busse et al., 2020; Hati et Bhattacharyya, 2020; Wen, 2012)



Obr. 12 Renín angiotenzín systém, ACE2

Ang II je považovaný za zosilňovač oxidačného stresu, zatiaľ čo Ang 1-7 oxidačný stres redukuje. NADPH oxidáza je hlavným zdrojom a primárnym spúšťačom tvorby ROS v rôznych tkanivách. Prevzaté z: Suhail et al., 2020

Pacienti so závažnými infekciami majú zvýšené prozápalové makrofágy, neutrofilu a cytokíny, ktoré vytvárajú kaskádový efekt cytokínových búrok vedúci až k syndrómu akútnej respiračnej tiesne. Laboratórne nálezy u týchto pacientov ukazujú lymfopéniu, predĺžený protrombínový čas, zvýšené hladiny CRP (C-reaktívny proteín), laktátdehydrogenázy, kreatínínkinázy, D-dimérov a plazmatických cytokínov (IL2, IL6, IL10). Hladina faktorov sa u pacientov zvyšuje s rastúcim percentom letality. Mnohé z nich poukazujú na systémovú imunitnú komplikáciu. (Hartog et al., 2021; Wang et al., 2020a)

Závažnosť príznakov výrazne súvisí s vekom, čo je možné vysvetliť slabším alebo nedostatočne regulovaným imunitným systémom. Medzi typické príznaky patrí horúčka, suchý kašeľ, dýchavičnosť, závrate, bolesti hlavy, kĺbov a svalov, únava a gastrointestinálne príznaky (hnačky, zvracanie) (Guan et al., 2020; Huang et al., 2020) 2 mesiace po akútnej infekcii hlási viac ako 80 % pacientov chronické príznaky, ktoré zahŕňajú únavu, problémy s dýchaním, bolesti kĺbov a bolesť na hrudníku. Ťažký zápal pľúc vedie k chronickým pľúcnym patológiám vrátane k vzniku fibrotického tkaniva a pľúcnych vaskulárnych chorôb. Mnoho pacientov

z rizikovej skupiny trpí poškodením z dôvodu nadmerne aktívnej imunitnej odpovede. Tá udržiava produkciu cytokínov v pľúcnom tkanive, čo spôsobuje infiltráciu imunitných buniek, ktoré sú zodpovedné za nepretržitú tvorbu škôd. Obnova poškodeného tkaniva trvá pravdepodobne mesiace a následkom sú komplikácie srdca, pečene, obličiek a riziko prekonania hematoencefalickej bariéry. (Carfi et al., 2020; Fraser, 2020; Hartog et al., 2021)

3.3.1.4 Diagnostika

Pre kontrolu šírenia ochorenia je rozhodujúca včasná diagnóza. Klinický obraz, laboratórne a rádiologické nálezy a história expozície jedincov môžu zvýšiť podozrenie na infekciu COVID-19, ale definitívna diagnóza by mala byť stanovená potvrdením prítomnosti vírusovej RNA v klinických vzorkách. Súčasným zlatým štandardom diagnostiky COVID-19 je test amplifikácie nukleovej kyseliny (NAAT, nucleic acid amplification test). Pomocou RT-PCR je detekovaný genetický materiál vo vzorke nazofaryngeálneho výteru alebo spúta. (Konrad et al., 2020; Salian et al., 2021; Wang et al., 2020b)

Prítomnosť SARS-CoV-2 vírusových proteínov je detekovaná pomocou antigénových testov. Najčastejšie zvoleným cieľom je nukleokapsidový proteín, pretože je v klinických vzorkách prítomný vo veľkom množstve. Testy na detekciu protilátok, sú zameriavané na dva antigény: nukleokapsid alebo spike proteín. ELISA a CLIA (chemiluminescent immunoassay) patria medzi bežne užívané laboratórne stanovenia protilátok. (Lai et Wilson, 2021; Lisboa Bastos et al., 2020; WHO, 2020)

Čas detekcie sa pohybuje od niekoľkých minút do niekoľkých hodín, v závislosti od použitej technológie. Aj keď je SARS-CoV-2 detekovaný z rôznych častí dýchacích ciest, vírusová záťaž je vyššia vo vzorkách dolných dýchacích ciest. Vírusová nukleová kyselina sa nachádzala aj v krvi a gastrointestinálnom trakte, napriek negatívnym výsledkom vzoriek z dýchacieho systému. (Wang et al., 2020c; Wolfel et al., 2020)

3.3.1.5 Terapeutické prístupy

Po celom svete boli prijaté mnohé možnosti liečby pacientov s COVID-19. Počas nedostupnosti vakcíny je najpoužívanejšou rekonvalescentná plazmatická liečba a opätovné používanie liekov. (Kumar et al., 2021)

Plazma získaná od pacientov, ktorý úspešne prekonali infekciu sa označuje ako rekonvalescentná plazma (CP, convalescent plasma). Jedná sa o klasickú adaptívnu imunoterapiu, ktorá sa v minulosti používala na liečbu smrteľných vírusových ochorení, ako je SARS, MERS, španielska chrípka a ebola. Je extrahovaná od darcu, ktorý sa zotavil z infekcie

a následne podávaná infikovaným pacientom. CP poskytuje neutralizačné protilátky proti infekčnému agens, ktoré je dôležité pred podaním plazmy pacientovi s COVID-19 zmerať. CP sa nikdy nepoužíva samostatne, ale v kombinácii s inými látkami, napr. s kortikosteroidmi. Okrem tohto klasického prístupu je snaha identifikovať a charakterizovať špecifické protilátky generované zotavujúcimi sa pacientmi. Cieľom je zistiť možné použitie na vývoj funkčných metód liečby COVID-19. (Bloch et al., 2020; Kumar et al., 2021; Marson et al., 2020; Tu et al., 2020)

Opätovné použitie alebo prestavenie lieku (reprofilácia lieku) je prístup k skúmaniu už schválených liekov, ktoré sa používajú k liečbe iných ochorení. Opakovane používané lieky použité na liečbu COVID-19 je možné rozdeliť do piatich kategórií:

- anti-malarické lieky
- lieky proti reumatoidnej artritíde
- modulátory cytokínov
- inhibítory proteázy
- ostatné

Znovu použitie liekov ponúka výhody z hľadiska finančných nákladov a času potrebného v porovnaní s vývojom liekov nových. Zároveň sú schválené Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA, Food and Drug Administration) pre ich farmakologické vlastnosti, bezpečnosť a klinickú účinnosť pre inú indikáciu. (Kumar et al., 2021; Pushpakom et al., 2019)

Súčasný postup výroby vakcíny proti SARS-CoV-2 zahŕňajú inaktivované a oslabené vakcíny, vakcíny založené na vírusových vektoroch, vírusovú podjednotku proteínu S a vakcíny založené na DNA a RNA. Vzhľadom na štúdie o SARS-CoV a MERS bola určená ako najlepšia stratégia cesta štruktúrneho proteínu. Zo štyroch štruktúrnych proteínov vírusu, je spike proteín považovaný za najslubnejší pre vývoj vakcín, pretože je spoločný pre rôzne koronavírusy a je vystavený imunitnému systému jedinca, čo umožňuje telu vytvoriť imunitnú odpoveď. Dochádza k silnej indukcii protilátok, ktoré blokujú väzbu s receptorovými bunkami hostiteľa v pľúcach. (Amanat et Krammer, 2020; Begum et al., 2021; Salian et al., 2021)

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Výber pacientov

Cieľom práce bolo stanovenie miery oxidačného poškodenia DNA vplyvom ochorenia COVID-19. Do štúdie bolo zaradených 10 pacientov (Tabuľka 1), mužov aj žien v kritickom stave vo veku od 42 do 79 rokov. Vylučovacími kritériami boli iba silný nikotinizmus a prekonané onkologické ochorenie s aktívnou liečbou za posledný rok.

Každému z nich boli odobrané vzorky venóznej krvi s heparínom (4 ml), ako protizrážlivým činidlom a to v prvý, tretí a siedmy deň hospitalizácie. Všetky vzorky sa spracovali do 24. hodín. Odber vzoriek bol schválený etickou komisiou Fakultnej nemocnice v Hradci Králové.

Tabuľka 1 Súhrnný zoznam údajov o pacientoch vybraných pre náš experiment

Číslo pacienta	Pohlavie	Vek	Liečba	Osobná anamnéza	BMI
1	M	69	kortikoidy, remdesivir, plazma, vitamíny	DM II. typu	24,7
2	M	68	kortikoidy, vitamíny, minitrombolýza	DM II. typu, ICHS, obezita, arteriálna hypertenzia, artróza	38,1
3	M	57	kortikoidy, vitamíny	arteriálna hypertenzia	25,2
4	M	70	kortikoidy, vitamíny	arteriálna hypertenzia	26
5	F	70	kortikoidy, remdesivir, plazma, vitamíny, ivermektin	arteriálna hypertenzia, dyslipidémia	23,1
6	M	79	kortikoidy, remdesivir, plazma, vitamíny	DM II. typu, arteriálna hypertenzia, dyslipidémia, silikóza pľúc	33,9
7	M	61	kortikoidy, vitamíny	obezita, asthma bronchiale	35
8	M	42	Kortikoidy, vitamíny	arteriálna hypertenzia, asthma bronchiale	27,8
9	M	68	kortikoidy, remdesivir, vitamíny, tocilizumab	DM II. typu, ICHS, obezita, arteriálna hypertenzia, dyslipidémia	32,4
10	F	76	kortikoidy, vitamíny	obezita, arteriálna hypertenzia	31,3

Keďže išlo o pilotnú štúdiu, cieľom bolo poskytnutie prvých údajov o možnom potenciáli SARS-CoV-2 poškodzovať ľudskú DNA a získané výsledky by mohli rozšíriť znalosti o novom koronavíruse.

Súčasťou experimentu bola aj kontrolná skupina pacientov oboch pohlaví vo veku od 63 do 77 rokov.

Vylučovacie kritéria kontrolnej skupiny pacientov:

- onkologická anamnéza s aktívnou liečbou za posledný rok
- silný nikotinizmus
- COVID-19 pozitivita

4.2 Prístroje

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrifúga 5702R Eppendorf (Eppendorf, Germany)
- Centrifúga minispin Eppendorf AG22331 (Eppendorf, Germany)
- Elektroforetická vaňa (Thermo scientific, USA)
- Fluorescenčný mikroskop – Nikon eclipse 80 i (NICON INSTRUMENTS INC., USA)
- chladnička
- Mikroskop B-352 PL (OPTIKA microscopes, Italy)
- pH meter
- Termobox (Thermo Scientific)
- Ortuťová lampa (NICON INSTRUMENTS INC., USA)
- Platnička Jenway 1000 (P-LAB a.s., Czech Republic)
- Pro SCAN II (Prior Scientific Instruments Ltd, Great Britain)
- Progres MF, laserový optický systém (Jenoptik, Germany)
- Počítač
- Vodná kúpeľ ZP 09824 (KUNZ, Germany)
- Zdroj pre elektroforézu

4.3 Pomôcky

- Bürkerova komôrka (Závody průmyslové automatizace, Czech republic)

- Falkonka 20 ml (Sarstedt, Australia)
- Fľaše na roztoky 500 ml
- Halogénová žiarovka s výkonom 1000 W
- HeLa bunky
- Kadičky 50, 120, 250, 400 a 2000 ml (Simax, Czech Republic)
- Krycie sklíčka - Memel Gläser 22x22 mm (Thermo Scientific, USA)
- Kyvety
- Liekovky na agarózy
- Nitrilové rukavice (Semper care, Austria)
- Odmerné valce 10, 50, 250 ml (Simax, Czech Republic)
- Pasteurove pipety (Sarstedt, Australia)
- Pipety 100 a 1000 µl (International Labmate Limited, United Kingdom)
- Podložné sklíčka - Memel Gläser Superfrost plus (Thermo Scientific, USA)
- Eppendorf skúmavky 1,5 ml (Eppendorf, Germany)
- Skúmavky 10 ml (Gama group a.s., Czech Republic)
- Špičky 100 a 1000 µl (Sarstedt, Australia)

4.4 Chemikálie

- Agaróza na elektroforézu (Sigma Aldrich, USA)
- BSA - hovädzí sérový albumín (s) (Sigma Aldrich, USA)
- Dithiotreitol (Sigma Aldrich, USA)
- Enzýmy (FPG A ENDO III) (Biolabs, Inc.)
- Etídium bromid (Thermofisher Scientific)
- EDTA - kyselina etyléndiamíntetraoctová (Sigma Aldrich, USA)
- Fotosenzibilizátor Ro 19-8022
- Glycerol (Sigma Aldrich, USA)
- H₂O₂ - peroxid vodíka (Penta)
- HCl - kyselina chlorovodíková (Penta)
- HEPES - 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetánesulfonová kyselina (s) (Sigma Aldrich, USA)
- HMPA - high melting point agarose (Sigma Aldrich, USA)
- KCl - chlorid draselný (s) (Sigma Aldrich, USA)

- LMPA - low melting point agarose (Sigma Aldrich, USA)
- LSM - lymphocyte separation medium (PromoCell)
- NaCl - chlorid sodný (s) (Sigma Aldrich, USA)
- NaOH - hydroxid sodný (s) (Sigma Aldrich, USA)
- PBS - fosfátový roztok s chloridom sodným (tablety) (Sigma Aldrich, USA)
- Redestilovaná voda
- TRIS - *tris*(hydroxymethyl)aminometán (Sigma Aldrich, USA)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA)

4.5 Stanovenie oxidačného poškodenia DNA metódou Comet assay

4.5.1 Postup metódy

4.5.1.1 Príprava roztokov

Elektroforetický pufor (ELFO pufor) si pripravíme rozpustením 24 g NaOH v 2 litroch redestilovanej vody a pridáme 4 ml 0,5M EDTA.

Roztok 0,5M EDTA sa pripraví rozpustením 14,612 g do 100 µl redestilovanej vody. Keďže je EDTA vo vode málo rozpustná, je nutné zvýšiť pH pridaním NaOH (rozpustnosť pri 20°C je 0,5 g EDTA/l vody).

Na prípravu lyzačného pufru rozpustíme 146 g NaCl, 29,2 g EDTA a 1,2 g TRIS, do objemu 1000 ml redestilovanej vody a pH upravíme pH metrom pomocou NaOH (pH = 10). Do takto vopred pripraveného pufru pridáme Triton X, aby vznikol 1 % lyzačný roztok. Výsledný objem roztoku v 1 kvete je 60 ml.

Neutralizačný pufor pripravíme pridaním 96,612 g TRIS do 2000 ml redestilovanej vody. Pomocou koncertovaného roztoku HCl upravíme pH na 7,5.

ENDO pufor sa pripraví zmiešaním 14,9 g KCl, 19,06 g HEPES, 2,92 g EDTA a 0,4 g BSA do 2000 ml redestilovanej vody. Pridaním KOH upravíme roztok na pH 8,0.

Fosfátový pufor (PBS) sa pripravuje rozpustením jednej zásobnej tablety v 200 ml redestilovanej vody.

Všetky pufré sú uchovávané v chladničke. Jediný ENDO pufor tvorí výnimku a je skladovaný v mrazničke a rozpúšťaný tesne pred použitím.

Roztoky agaróz (LMPA a HMPA) sú pripravené rozpustením predváženého množstva agarózy v PBS tak, aby vznikol ich 1% roztok. Rozpúšťanie prebieha vo vodnom kúpeli pri

vysokej teplote. Mikroskopické sklíčka sú vopred potiahnuté agarózou pre elektroforézu, aby na nich ďalšie vrstvy agaróz pevne držali. 1% roztok agarózy pre elektroforézu je pripravovaný obdobným spôsobom, s tým rozdielom že rozpúšťadlom nie je PBS, ale redestilovaná voda. Gély môžeme užívať opakovane, pokiaľ nenadobudnú bielu farbu, kedy už nie sú vhodné na ďalšiu aplikáciu.

4.5.1.2 Príprava sklíčok

Mikroskopické sklíčka si prevaríme v 10% roztoku peroxidu vodíka (môžeme použiť aj roztok etanolu) 20 minút. Následne ich opláchneme v redestilovanej vode a necháme uschnúť vo vertikálnej polohe. Medzitým si pripravíme 1% roztok agarózy pre elektroforézu (1 g agarózy na 100 ml redestilovanej vody).

Vysušené sklíčka ponárame do 1% roztoku horúcej agarózy v kadičke. Mikroskopické sklíčko držíme za horný okraj pomocou pinzety a prípadne sa ho snažíme neponárať celé, aby bolo možné sklíčka v zabrusenej časti popísať. Sklíčka ponárame nastojato a vždy na dvakrát. Je potrebné pracovať rýchlo, aby na vrchu sklíčka vznikol krásne tenký film. Spodná strana sa otrie buničinou. Ak sa na povrchu tvoria mapy roztoku agarózy, znamená to že agaróza nie je rovnomerne rozprestretá po celej ploche a sklíčko nie je vhodné na ďalšie použitie. K tuhnutiu roztoku dochádza pomerne rýchlo a preto je vhodné vložiť kadičku s agarózou do vodného kúpeľa.

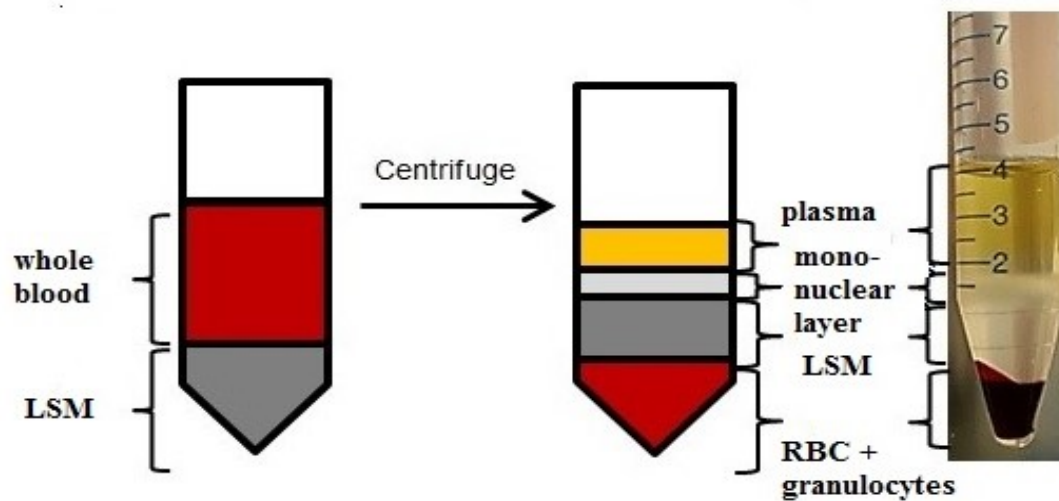
Potiahnuté sklíčka vyskladáme na plech a necháme v sušiarňi 1 hodinu pri teplote 60°C. Sklíčka je nutné označiť malým krížikom v zabrusenej časti, na strane ktorá je potiahnutou agarózou. Takto pripravené sklíčka sú uchovávané v histologických krabiciach, kde sú chránené pred prachom a nečistotami.

4.5.1.3 Izolácia lymfocytov

Do 10 ml skúmavky napipetujeme 4 ml LSM a naň opatrne navrstvíme rovnaké množstvo krvi (väčšinou celá odberová skúmavka). Centrifugujeme 30 minút, pri 20°C a 1500 otáčkach. Rozdelenie do jednotlivých vrstiev po centrifugácii je znázornené na obrázku nižšie (Obr. 13). Po dotočení sa vytvorí lymfocytárny prstenec, ktorý odoberieme pomocou Pasteurovej pipety a preniesieme do 20 ml plastových falkoniiek. Od tohto kroku sa pracuje na ľade.

K získanému lymfocytárnemu prstencu pridáme približne 10 ml PBS a dáme znova stočiť, tentokrát pri 8°C, 1500 otáčkach na 10 minút. Po dotočení sa na dne falkonky vytvorí pelet, vrchný supernatant zlejeme a pelet resuspendujeme v presnom objeme, 10 ml PBS.

Presný objem je dôležitý pretože z vytvoreného roztoku odoberáme vzorku na počítanie buniek v Bürkerovej komôrke pod stonásobným zväčšením (žltý objektív).



Obr. 13 Izolácia lymfocytov pomocou LSM
Prevzaté z: *BioVision*, 2018 (online) (upravené autorom)

Falkonku opäť stočíme pri 8°C na 1500 otáčok po dobu 10. minút. Po stočení zlejeme supernatant a pridáme taký objem PBS, aby sme získali roztok s koncentráciou 2 milióny buniek/1 ml roztoku. Z tohto roztoku odoberieme 1 ml, ktorý dáme následne stočiť na 5 minút pri 4000 otáčkach a 4°C. Po stočení a oddelení supernatantu a peletu získame extrakt, ktorý je možné ďalej využiť pre stanovenie reparácií na bunkových líniách. Posledným krokom je ďalšie riedenie, a to na koncentráciu 1 milión buniek/1 ml roztoku.

4.5.1.4 Nanášanie buniek na sklíčka

Dopredu pripravené sklíčka potiahnuté agarózou pre elektroforézu si popíšeme, aby sme ich vedeli identifikovať. Z roztoku lymfocytov, ktorý sme si nariadili na 1 milión buniek/1 ml, odoberieme 35 μ l a preniesieme do vychladenej eppendorfky, s ktorou budeme ďalej pracovať. Pre každú vzorku si pripravíme gély v duplikátoch. V našom prípade budú na každom sklíčku 2 samostatné gély (2 Eppendorf skúmavky). Z krvi jedného pacienta získame celkovo 3 sklíčka: pre analýzu SSB (jednoreťazové zlomy), pre analýzu oxidovaných purínov (FPG) a pre analýzu oxidovaných pyrimidínov (ENDO III).

Agarózy (HMP a LMP) rozpúšťame na výhrevnej platni v kadičkách vystlaných buničinou, dokiaľ nevznikne číry, viskózný roztok. Zatiaľ čo budeme HMP agarózu nanášať na sklíčka, necháme LMP agarózu vychladiť na 37°C vo vodnom kúpeli. Tento krok je dôležitý z dôvodu zachovania celistvosti buniek (vysoká teplota bunky poškodí). Medzitým, na

agarózou pre elektroforézu vopred potiahnuté a označené mikroskopické sklíčko napipetujeme 85 μ l HMP agarózy a ihneď prekryjeme krycím sklíčkom (2 x 22 mm). Takto pripravené sklíčka vyskladáme na vychladený plechový podnos a premiestnime do chladničky približne na 10 minút. Je dôležité, aby agaróza dostatočne stuhla a na sklíčkach držala.

Po uplynutí času stiahneme krycie sklíčka z vychladeného a zatuhnutého gélu plynulým pohybom palca. Pokračujeme zmiešaním 85 μ l vytemperovanej LMP agarózy s bunkami v ependorfkách (35 μ l), ktoré boli doteraz na ľade. Na už zatuhnutú HMP agarózu pipetujeme zmes buniek a gélu a prekryjeme krycím sklíčkom, ktoré sme stiahli z HMP agarózy. Sklíčka opäť vyskladáme na plechový podnos a necháme stuhnúť v chladničke (asi 10 minút). Počas nanášania oboch typov agaróz je nutné pracovať rýchlo, aby gél nestihol stuhnúť skôr než prácu dokončíme.

4.5.1.5 Lýza

Do pripraveného zásobného lyzačného pufra pridáme Triton X, aby nám vznikol 1% lyzačný roztok (viz. vyššie). Pred použitím na lýzu buniek musí byť roztok zhomogenizovaný (rozmiešame na platni s magnetickou miešačkou) a vychladený (v chladničke).

Po stuhnutí agaróz s bunkami stiahneme krycie sklíčka a mikroskopické sklíčka vložíme do kyvety tak, aby sa navzájom nedotýkali. Kyvetu následne naplníme pripraveným 1% lyzačným pufrom, tak aby pokrýval celú plochu agaróz. Sklíčka v kyvete (vzorky) necháme lyzovať v chladničke minimálne 1 hodinu (podľa niektorých zdrojov môžeme nechať 24 hodín až 2 týždne bez poškodenia buniek). Počas lýzy dochádza k deštrukcii membránových proteínov a v géle ostávajú nukleoidy, ktoré sú po nafarbení viditeľné pod fluorescenčným mikroskopom.

4.5.1.6 Ovplyvňovanie enzýmami

Vzorky určené na identifikáciu špecifických lézií (oxidované pyrimidíny a puríny) sa vystavia pôsobeniu špecifických enzýmov. Sklíčka s označením SSB ostávajú v lyzačnom roztoku. Je potrebné si vopred rozmraziť ENDO pufor a vytemperovať termobox na 37°C. Sklíčka s označením FPG a ENDO III vyberieme z kyvety s lyzačným roztokom a premyjeme v ENDO pufri (3 x 5 minút). Enzýmy rozmrazujeme tesne pred použitím. Na určené sklíčka napipetujeme 30 μ l požadovaného enzýmu, prekryjeme krycím sklíčkom a uložíme do uzatvárateľnej nádoby s navlhčenou buničinou. Necháme inkubovať 45 minút v termoboxe.

Medzitým si pripravíme elektroforetický pufor. Zhomogenizujeme ho na platni s magnetickou miešačkou, nalejeme do predpripravených sklenených fliaš a uložíme do

chladničky. Aby bol roztok dostatočne vychladený je lepšie ho pripraviť o niečo skôr (napr. ešte pred izoláciou lymfocytov).

4.5.1.7 Alkalické rozleptanie

Po inkubácii s enzýmami nasleduje alkalické rozleptanie. Mikroskopické sklíčka už bez krycích sklíčok naskladáme do elektroforetického tanku s vychladeným ELFO pufrom. Uloženie sklíčok musí byť jednotné (zabrúsené časti smerujú doprava) a musia byť úplne ponorené (zároveň nesmú plávať, musia byť fixované na jednom mieste). Vzorky sú takto vystavené alkalickému rozleptávaniu po dobu 40 minút.

4.5.1.8 Elektroforéza

Po 40. minútach rozleptávania nasleduje 30 minút vlastnej elektroforézy. Prostredníctvom vodičov napojíme k tanku zdroj, na ktorom nastavíme vhodné podmienky, ktorými sú konštantné napätie (25 V), čas a po zapnutí zdroja elektrický prúd (upravujeme na 300 mA odoberaním alebo pridávaním objemu elektroforetického pufru). Musíme dbať, aby hladina pufru neklesla pod úroveň sklíčok (sklíčka nesmú byť na suchu). Pri správnom priebehu elektroforézy sú viditeľné bublinky prúdiace v roztoku. V tomto kroku smerujú záporne nabité úseky DNA k anóde a vytvárajú „kométy“.

4.5.1.9 Neutralizácia

Po ukončení elektroforézy sklíčka vyberieme z elektroforetického tanku a ihneď vyskladáme do kyvety. Premyjeme neutralizačným pufrom (3 x 5 minút). Následne ešte premývame 5 minút v redestilovanej vode.

V celom postupe je nutné používať redestilovanú vodu. Vplyvom obvyčajnej vody môže dôjsť k lýze buniek pôsobením osmotického tlaku. Zároveň musí byť pri každej vzorke vždy dodržiavaný rovnaký čas v rámci jednotlivých krokov.

4.5.1.10 Farbenie

Sklíčka môžeme nechať voľne vysušiť a odložiť pre neskoršie vyhodnocovanie alebo ihneď aplikovať farbivo etídium bromid (20 μ l). Prekryjeme krycím sklíčkom a necháme chvíľu inkubovať (5 minút). Sklíčka sú takto pripravené na hodnotenie a preparát vložíme pod objektív mikroskopu.

Ak chceme vyhodnocovať bunky neskôr, (vyhodnocujeme tak väčší počet sklíčok naraz) musíme ich najskôr aktivovať premývaním v redestilovanej vode po dobu 5. minút. Ďalší postup je rovnaký.

4.5.1.11 Hodnotenie komét

Fixované bunky na sklíčkach hodnotíme po predchádzajúcom farbení pod fluorescenčným mikroskopom v spojení s optickou zostavou (NIKON INSTRUMENTS INC., USA) napojenou na počítač s využitím programu LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic).

Čas medzi farbením využijeme na spustenie počítača, zapneme Pro SCAN II, lampu a nakoniec fluorescenčný mikroskop. Toto poradie je nutné dodržať (po ukončení práce vypíname presne v opačnom poradí). Používame objektív s 10 násobným zväčšením a nastavíme režim 3 - zelené svetlo pre etídium bromid. Po spustení programu LUCIA Comet Assay vidíme biele objekty na čiernom pozadí. Bunky, ktoré hľadáme majú guľovitý tvar s neostrými okrajmi (pripomínajú slniečko). (Obr. 14) Iné biele útvary s ostrými okrajmi môžu byť rôzne častice zanesené pri spracovávaní vzoriek. (Obr. 15) Pomocou makro a mikroskrutky si obraz zaostrujeme.



Obr. 14 Bunka zobrazená v programe LUCIA Comet Assay

Na výber máme automatické a manuálne označovanie buniek. V našej štúdií sme sa rozhodli pre vlastné označovanie, pretože program neoznačoval celé bunky, ale iba hlavy komét bez chvosta a naše výsledky tak boli skreslené. Ľavým tlačidlom na myši sa označí vybraná bunka do rámčeka a pravým tlačidlom výber potvrdíme. V rámci jedného zorného poľa hodnotíme všetky oddelené (samostatné) bunky. Ak vidíme, že má bunka predĺženú hlavu, môže ísť o prekrytie dvoch buniek. Tieto bunky nehodnotíme. (Obr. 15)

Pri hodnotení gélu sa sústreďujeme na stredovú oblasť, pretože v okrajových častiach je poškodenie DNA vyššie kvôli možnému mechanickému poškodeniu buniek a mohlo by dochádzať falošnému navýšeniu hodnôt % tail DNA. Taktiež si musíme vytvoriť systém prezerania jednotlivých sklíčok (napr. meandrovitý pohyb), keďže program nie je schopný rozoznať už zhodnotenú lymfocyty.

V rámci jedného gélu sa hodnotí 50 buniek, sumárne je to 100 buniek, pretože sme vzorky robili v duplikátoch. Výsledky každej bunky sú zapisované v tabuľke dát, ktoré je možné exportovať do excelovského súboru (Tabuľka 2). Po dokončení hodnotenia odoberieme krycie sklíčka, gély premyjeme v redestilovanej vode a necháme vyschnúť. Suché, uskladnené sklíčka nám slúžia pre ďalšie prípadné hodnotenie.



Obr. 15 Zorné pole v programe LUCIA Comet Assay

1. prekrytie dvoch buniek (nehodnotíme)
2. samostatná poškodená DNA (hodnotíme)
3. nečistota (nehodnotíme)

Tabuľka 2 Výsledná tabuľka hodnôt poškodenia DNA získaná pomocou obrazovej analýzy LUCIA Comet Assay

	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Integral Intesity	Head Radius	Tail Length	Tail Moment	Olive Moment	Head Area	Tail Area
1	97,01	2,99	1188,68	9,75	1,97	0,06	0,27	294,09	35,24
2	98,2	1,8	697,32	9,13	1,64	0,03	0,16	220,6	17,89
3	95,3	4,7	543,99	8,26	2,3	0,11	0,37	218,01	31,79
4	99,25	0,75	946,46	7,78	0,98	0,01	0,05	180,08	9,7
5	98,4	1,6	434,81	7,92	1,31	0,02	0,13	190,53	10,56
6	95,35	4,65	389,69	7,31	2,95	0,14	0,35	164,88	24,57
7	46,3	53,7	229,68	5,5	11,49	6,17	4,57	99,9	149,69
8	55,99	44,01	357,42	6,68	10,18	4,48	3,95	155,07	169,51
9	79,9	20,1	767,91	7,88	7,55	1,52	1,85	212,3	138,16
10	96,67	3,33	891,32	9,28	3,28	0,11	0,3	266,18	36,64
11	96,46	3,54	997,3	8,18	3,94	0,14	0,29	208,53	38,9
12	93,13	6,87	657,7	8,62	3,94	0,27	0,62	230,83	52,8
13	99,41	0,59	578,55	7,32	0,33	0,002	0,04	161,43	4,96
14	95,16	4,84	937,74	8,19	4,27	0,21	0,46	201,74	48,6
15	99,59	0,41	730,31	6,57	0	0	0,02	139,23	3,99
16	83,57	16,43	551,72	7,99	4,6	0,75	1,3	226,52	93,76
17	99,49	0,51	739,11	7,04	0,66	0,003	0,03	151,95	5,28
18	99,7	0,3	792,48	7,71	0	0	0,02	177,38	3,66
19	94,7	5,3	414	7,77	2,63	0,14	0,41	191,18	29,74
20	98,12	1,88	612,3	7,02	0,98	0,02	0,12	154,75	13,26
21	98,59	1,41	688,42	7,89	0,98	0,01	0,1	194,62	10,24
22	96,17	3,83	417,47	7,28	2,3	0,09	0,27	165,2	20,91
23	99,86	0,14	743,37	7,55	0	0	0,01	176,41	1,72
24	97,71	2,29	653,74	7,83	1,31	0,03	0,17	188,16	19,29
25	99,81	0,19	887,83	7,88	0	0	0,01	187,73	2,59
26	99,28	0,72	465,02	7,36	0,33	0,002	0,05	160,14	5,5
27	91,74	8,26	1718,2	10,75	5,25	0,43	0,89	384,94	120,27
28	90,93	9,07	704,19	9,8	4,6	0,42	0,93	284,39	77,59
29	99,94	0,06	1072,63	9,19	0	0	0,005	253,68	1,08
30	99,72	0,28	626,76	8,61	0	0	0,02	217,69	3,13
31	98,04	1,96	913,09	9,79	1,64	0,03	0,18	293,01	24,46
32	94,67	5,33	920,4	11,56	3,61	0,19	0,61	395,18	56,79
33	98,88	1,12	1489,9	10,26	1,31	0,01	0,11	304,44	20,8
34	99,82	0,18	2106,02	11,7	0	0	0,02	410,48	5,6
35	98,12	1,88	661,35	8,68	2,63	0,05	0,17	214,13	22,31
36	94,13	5,87	572,31	9,41	3,61	0,21	0,57	264,13	49,46
37	99,29	0,71	1018,54	8,67	0,33	0,002	0,06	226,31	10,56
38	98,98	1,02	900,82	7,86	0,66	0,01	0,07	188,8	12,61
39	99,62	0,38	879,3	8,07	0,33	0,001	0,03	198,72	4,74
40	95,86	4,14	277,3	7,68	1,64	0,07	0,31	173,39	16,92
41	99,7	0,3	658,19	8,54	0	0	0,02	223,83	3,13
42	99,71	0,29	889,87	7,88	0	0	0,02	192,04	3,77
43	74,47	25,53	343,38	7,68	8,21	2,1	2,37	189,02	108,84
44	68,8	31,2	568,75	8,6	8,86	2,77	3,04	268,55	168,11
45	74,36	25,64	259,01	7,15	9,85	2,52	2,37	145,27	88,26
46	98,82	1,18	949,86	8,64	1,31	0,02	0,1	223,07	13,79
47	92,74	7,26	848,64	9,76	4,6	0,33	0,71	310,58	68,54
48	99,21	0,79	765,16	8,3	0,66	0,01	0,06	209,5	8,73
49	77,52	22,48	512,07	8,57	16,41	3,69	2,24	243,23	129,75
50	90,07	9,93	424,48	8,44	4,6	0,46	0,82	228,89	53,45
	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Integral Intesity	Head Radius	Tail Length	Tail Moment	Olive Moment	Head Area	Tail Area
Mean	92,97	7,03	747,89	8,35	3	0,55	0,63	219,21	41,03
Median	97,87	2,13	700,76	8,12	1,64	0,04	0,18	209,01	20,85
SD	11,32	11,32	347,47	1,19	3,49	1,26	1,02	63,45	46,73
Minimum	46,3	0,06	229,68	5,5	0	0	0,005	99,9	1,08
Maximum	99,94	53,7	2106,02	11,7	16,41	6,17	4,57	410,48	169,51

4.5.2 Štatistická analýza

V štatistickej analýze sme porovnávali poškodenú DNA medzi jednotlivými dňami hospitalizácie pomocou parametru % tail DNA.

Hodnotenie prebehlo v Exceli a štatistickom programe GraphPad Prism pomocou jednofaktorovej ANOVY pre opakované merania. Pre určenie štatistickej významnosti bola stanovená hladina významnosti 5 % ($p < 0,05$). Priebeh hospitalizácie jednotlivých pacientov bol graficky znázornený pomocou bodových grafov.

Zároveň sme porovnali výsledné hodnoty % tail DNA v prvý deň hospitalizácie s hodnotami kontrolnej skupiny v Exceli pomocou dvojvýberového t testu s nerovnosťou rozptylov.

4.6 Stanovenie reparácie DNA metódou Comet Assay

Pomocou modifikovanej kométovej analýzy bola stanovená aktivita reparačných enzýmov. Hlavným princípom je určenie schopnosti lymfocytov realizovať počiatočný krok pri reparácii poškodenej časti DNA. Inkubujeme lyzované HeLa bunky s určitým typom lézie spolu s extraktmi, ktoré sme získali z lymfocytov pacientov. Enzýmy BER nachádzajúce sa v extraktoch sú schopné rozpoznať špecifické miesto, kde vytvoria jednoreťazový zlom, ktorý odhalíme práve pomocou alkalickej jednobunkovej gélovej elektroforézy. (Collins et Horvathova, 2001)

4.6.1 Postup metódy

4.6.1.1 Príprava pufov

Pufor A sme pripravili z 45 mM HEPES, 0,4 M KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM dithiotreitolu a 10% glycerolu. S použitím KOH sme upravili pH na 7,8 a pridali sme 10 μ l 1% TRITONu X.

Pufor F sme pripravili z 45 mM HEPES, 0,25 mM EDTA, 0,3 mg/ml BSA a 2% glycerolu. Znova sme upravili pH na hodnotu 7,8 pomocou KOH.

Kontrolný roztok bol pripravený zmiešaním 200 μ l pufru A, 1 ml pufru F a 48 μ l 1% roztoku Tritonu X. 1% roztok Tritonu získame pridaním Tritonu X do pufru A.

Všetky ostatné používané roztoky sú rovnaké, ako pri stanovovaní oxidačného poškodenia DNA.

4.6.1.2 Príprava HeLa buniek

HeLa bunkové línie sme získali od Katedry farmakológie a toxikológie na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové.

Pred samotným experimentom boli HeLa bunky trypsinizované a nariadené na koncentráciu 1 milión buniek na 1 ml. Následne sme k bunkám pridali roztok fotosenzibilizátora (Ro 19-8022) a vystavili ich viditeľnému svetlu zo vzdialenosti 33 cm na 5 minút. Použili sme halogénovú žiarovku s výkonom 1000 W a bunky boli po celý čas uložené na ľade, aby nedošlo k ich prehriatiu. Vplyvom fotosenzibilizátora dochádza k vzniku singletového kyslíka, ktorý indukuje vznik modifikovaných purínov (8-oxoG). Práve opravu týchto lézií sme merali po inkubácii s extraktom (pripravený z lymfocytov).

35 μ l buniek sme zmiešali s 85 μ l LMP agarózy a naniesli na mikroskopické sklíčko potiahnuté agarózou pre elektroforézu a vrstvu HMP agarózy (rovnako, ako pri meraní oxidačného poškodenia). Prekryli sme krycím sklíčkom a nechali zatuhnúť v chladničke. Potom sme krycie sklíčko stiahli a mikroskopické sklíčko vyskladali do lyzačného roztoku v kyvete na 1 hodinu. Po lýze nasledovalo premývanie v PBS pufri (3 x 15 minút).

4.6.1.3 Príprava extraktov a inkubácia

Popis izolácie lymfocytov z venóznej krvi pacientov sa nachádza v experimentálnej časti tejto práce v kapitole o stanovení oxidačného poškodenia DNA (kapitola 4.5.1.3).

K peletu lymfocytov sme pridali 20 μ l pufru A a 5 μ l 1% roztoku Tritonu. Zmes je nutné dostatočne zvortexovať a následne centrifugovať 10 minút pri 4°C a 10000. otáčkach. Na stenách skúmaviek sa zachytili rozbité časti lymfocytov a supernatant, ktorý obsahuje aktívne enzýmy, ktoré sme si premiestnili do nových ependorfiek a pridali k nim 80 μ l pufru F. Do ich použitia boli uložené na ľade.

30 μ l pripravených extraktov sme aplikovali na lyzované HeLa bunky v gély, prekryli krycím sklíčkom a nechali inkubovať 45 minút pri teplote 37°C v termoboxe. Zároveň sme si vyhradili gély s HeLa bunkami, ktoré nám slúžili ako kontroly. Ako pozitívnu kontrolu sme použili HeLa bunky s 35. μ l enzýmu FPG (kontrola neobsahovala enzýmy extraktov). Pri negatívnej kontrole sme k HeLa bunkám aplikovali 35 μ l kontrolného roztoku. Počas inkubácie prebieha reparácia modifikovaných purínov v HeLa bunkách pôsobením reparačných enzýmov v extraktoch. Po uplynutí času uložíme sklíčka na ľad, aby sme reparáciu zastavili.

Ďalší postup je rovnaký, ako u stanovenia oxidačného poškodenia DNA. Mikroskopické sklíčka sú bez krycích sklíčok vyskladané to elektroforetického tanku s ELFO pufrom, nechajú sa rozleptávať 40 minút a potom podliehajú elektroforéze (25 V, 300 mA, 30 minút). Nasleduje premytie v neutralizačnom pufri a farbenie etídiom bromidom pre fluorescenčné hodnotenie.

4.6.1.4 Hodnotenie a štatistika

Na vyhodnotenie sme použili softvér LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) pre obrazovú analýzu buniek. Zhodnotili sme 50 komét v každom gély.

Hlavným parametrom na hodnotenie poškodenia DNA bol znova % tail DNA. Pomocou jednofaktorovej ANOVY sme určili štatistickú významnosť poškodenia hospitalizovaných pacientov. Hladinu poškodenie DNA experimentálnej skupiny pacientov sme porovnali so skupinou kontrolnou.

5 VÝSLEDKY

5.1 Stanovenie poškodenia DNA

5.1.1 Štatistická významnosť

Štatistické hodnotenie prebehlo v programe GraphPad Prism pomocou jednofaktorovej ANOVY pre opakované merania. Stanovovaným parametrom bolo percento DNA vo chvoste poškodenej bunky. Porovnávali sme namerané hodnoty medzi prvým, tretím a siedmym dňom hospitalizácie a výsledky medzi jednotlivými dňami na hladine $\alpha = 0,05$ vyšli štatisticky nevýznamné pri všetkých troch stanovovaných parametroch (SSB, FPG, ENDO III). Pre jednoreťazové zlomy bola stanovená štatistická významnosť $p < 0,73$, pre oxidované pyrimidíny $p < 0,3$ a pre oxidované puríny $p < 0,16$. (Tabuľka 3)

Tabuľka 3 Štatistická významnosť meraní

Štatistická významnosť	$p < 0,05$
SSB	0,73
FPG	0,16
ENDO III	0,30

Poškodenie sme stanovovali v 100 bunkách (50 buniek na 1 gél, gély boli nanesené duplicitne) u každého pacienta. Hodnoty z duplikátov sme najskôr spriemerovali a pri hodnotení štatistickej významnosti a zostavovaní grafov sme pracovali už iba s týmito dátami. Spriemerované hodnoty celkového poškodenia v celej skupine (prvý, tretí a siedmy deň hospitalizácie) pre pozorované parametre sú zhrnuté v tabuľke č. 4. Bohužiaľ u troch pacientov (konkrétne č. 7, 8 a 10) sme nezískali hodnoty poškodenia v posledný (siedmy) deň pre parameter FPG, z dôvodu nedostatku tohto enzýmu.

Ďalej sme porovnávali hladinu poškodenia DNA u pacientov z experimentálnej skupiny so skupinou kontrolnou pomocou t testu. Na základe výsledkov získaných pomocou dvojvýberového F testu pre rozptyl sme si na určenie štatistickej významnosti vybrali dvojvýberový t test s nerovnosťou rozptylov. V dvoch prípadoch, konkrétne pre parameter FPG v prvý deň hospitalizácie a pre SSB v siedmy deň nám vyšli štatisticky významné rozdiely hodnôt. Stanovená štatistická významnosť pre oxidované puríny aj pre jednoreťazové zlomy bola $p < 0,04$. K väčšiemu poškodeniu DNA došlo v prvom prípade u kontrolnej skupiny. Štatistická významnosť všetkých meraní je zhrnutá v tabuľke č. 5.

Tabuľka 4 Priemer, medián a smerodatná odchýlka hodnoty Tail DNA v percentách pre stanovované typy poškodenia DNA

ČÍSLO PACIENTA	ODBER (deň)	SSB			FPG			ENDO III		
		priemer (%)	medián (%)	smerodatná odchylka (%)	priemer (%)	medián (%)	smerodatná odchylka (%)	priemer (%)	medián (%)	smerodatná odchylka (%)
1	1.	2,77	0,38	5,01	2,74	1,22	4,00	4,49	1,23	6,38
	3.	15,42	7,87	17,87	15,18	7,02	18,60	15,29	8,78	18,07
	7.	10,93	1,39	23,25	11,45	2,30	19,12	13,22	9,25	15,46
2	1.	3,54	1,87	6,53	3,04	1,77	3,79	2,86	1,79	3,20
	3.	3,45	1,66	4,58	6,24	2,80	12,58	4,13	2,70	4,55
	7.	2,52	1,37	3,44	3,66	2,23	4,33	4,63	2,78	4,79
3	1.	3,26	0,79	8,12	1,82	0,53	2,74	3,05	1,74	4,73
	3.	3,04	0,56	6,83	3,34	1,11	4,42	3,36	1,26	5,07
	7.	3,97	0,58	8,64	2,53	0,76	3,92	3,88	1,38	6,38
4	1.	10,60	7,21	15,06	8,07	4,65	11,45	6,58	4,64	7,62
	3.	7,72	6,03	6,05	7,97	2,25	12,25	9,99	1,99	13,19
	7.	3,30	0,53	6,29	5,66	1,01	9,17	9,23	2,65	12,60
5	1.	0,50	0,26	1,27	0,50	0,31	0,76	0,58	0,27	0,82
	3.	1,57	0,28	4,38	1,20	0,27	3,11	1,21	0,30	3,48
	7.	0,65	0,25	1,66	0,84	0,28	2,35	1,83	0,37	4,63
6	1.	0,73	0,33	1,32	0,94	0,34	2,47	1,75	0,37	4,18
	3.	2,52	0,56	4,43	3,52	0,68	5,47	4,79	2,68	6,35
	7.	2,07	0,53	3,67	2,44	0,53	4,24	2,29	0,63	3,09
7	1.	2,74	0,47	4,41	3,08	0,59	4,14	2,88	0,88	4,03
	3.	2,79	1,13	3,48	4,44	3,43	4,60	4,57	3,16	4,85
	7.	3,25	1,13	5,02				3,69	1,32	5,90
8	1.	5,17	2,32	6,41	3,91	2,22	4,89	10,81	6,82	12,19
	3.	1,65	0,52	2,70	3,41	2,14	3,50	3,44	2,11	3,53
	7.	3,79	0,47	7,44				4,13	1,44	7,15
9	1.	0,97	0,33	1,97	0,68	0,28	1,13	2,05	0,42	4,94
	3.	2,16	0,37	4,92	3,81	0,88	6,33	6,10	2,60	8,83
	7.	1,63	0,66	2,53	1,81	0,54	3,16	4,36	2,06	5,50
10	1.	5,81	1,47	10,58	6,19	2,86	8,68	7,01	2,38	10,35
	3.	4,69	1,38	7,28	4,83	2,42	6,75	5,40	2,78	8,12
	7.	11,96	8,56	14,11				9,48	6,72	9,45

Tabuľka 5 Štatistická významnosť poškodenia DNA medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou pacientov

Štatistická významnosť p < 0,05	1. deň	3. deň	7. deň
SSB	0,055	0,051	0,040
FPG	0,045	0,163	0,086
ENDO III	0,087	0,184	0,169

Tabuľka č. 6 obsahuje hodnoty % tail DNA (pre každý skúmaný parameter) kontrolnej skupiny pacientov, ktoré sme porovnávali s hladinou poškodenia experimentálnej skupiny.

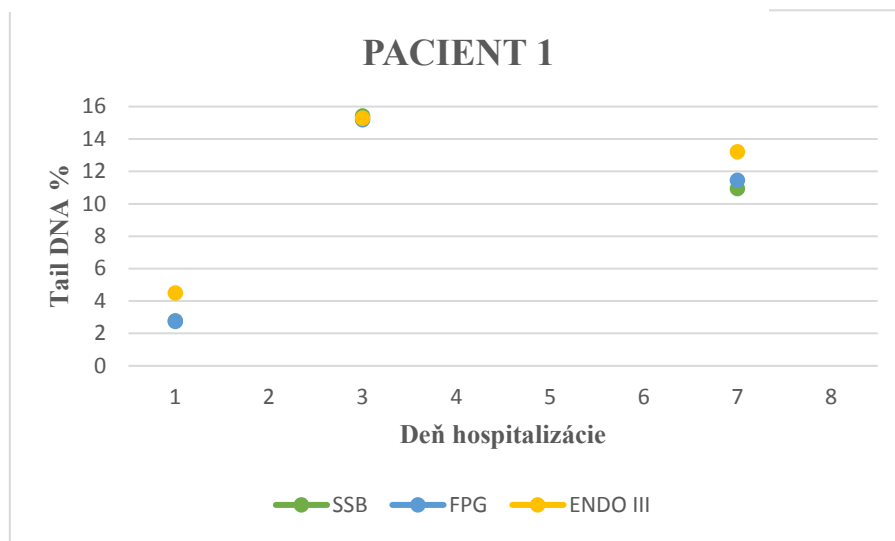
Tabuľka 6 Hladiny poškodenia DNA kontrolnej skupiny pacientov pre 3 skúmané parametre

Číslo pacienta kontrolná skupina	SSB % Tail DNA	FPG % Tail DNA	ENDO III % Tail DNA
1	3,97	17,73	23,85
2	1,19	26,57	32,03
3	1,80	23,64	20,85
4	2,16	14,65	15,42
5	1,61	3,45	3,72
6	0,45	3,09	1,72
7	0,38	1,57	2,14
8	0,82	3,67	3,32
9	0,61	3,62	2,37
10	1,38	4,21	5,62

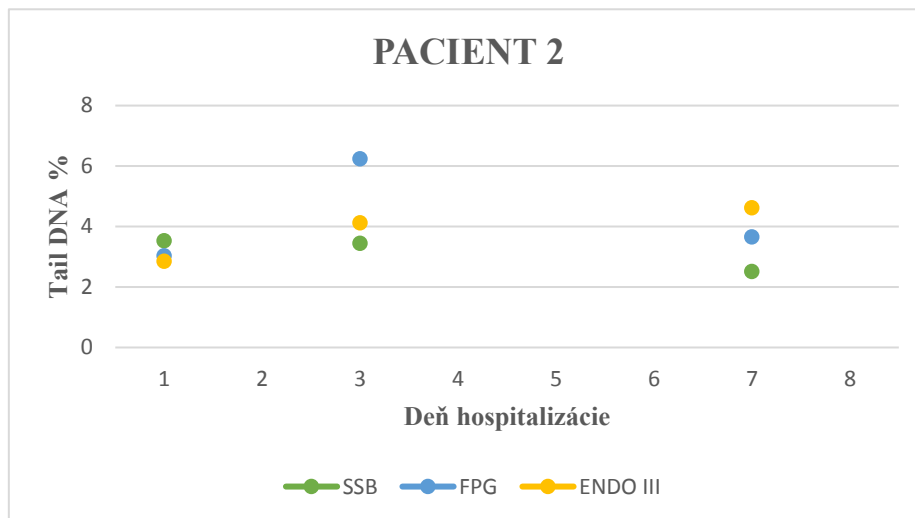
5.1.2 Oxidačné poškodenie DNA jednotlivých pacientov

Pomocou bodových grafov sme znázornili závislosť oxidačného poškodenia DNA (hodnota % tail DNA) na čase, tzn. dni hospitalizácie pacienta. (Grafy 1-10) Napriek štatisticky nevýznamným rozdielom si môžeme všimnúť, že u polovice pacientov dochádza k zhoršeniu poškodenia v tretí deň hospitalizácie, ktoré sa následne zlepšuje. Taktiež je u väčšiny pacientov väčší výskyt oxidovaných pyrimidínov oproti oxidovaným purínom.

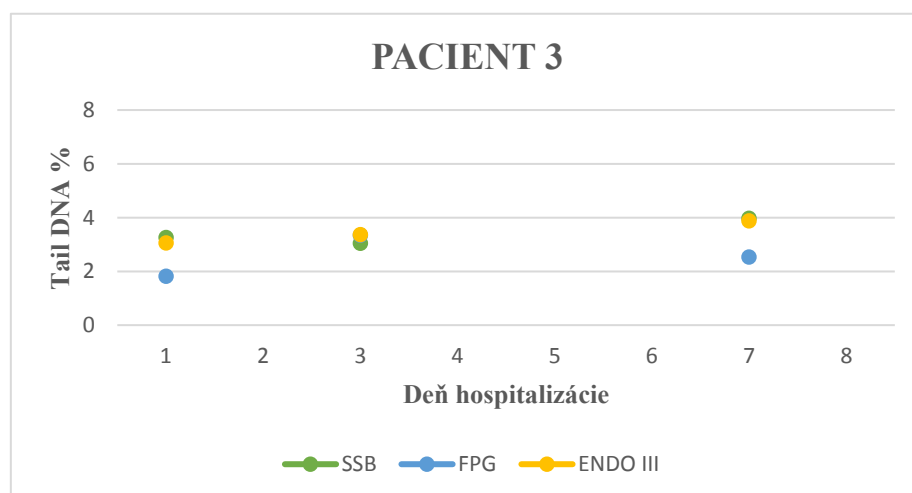
Graf 1 Vývoj poškodenia DNA pacienta 1 v priebehu hospitalizácie



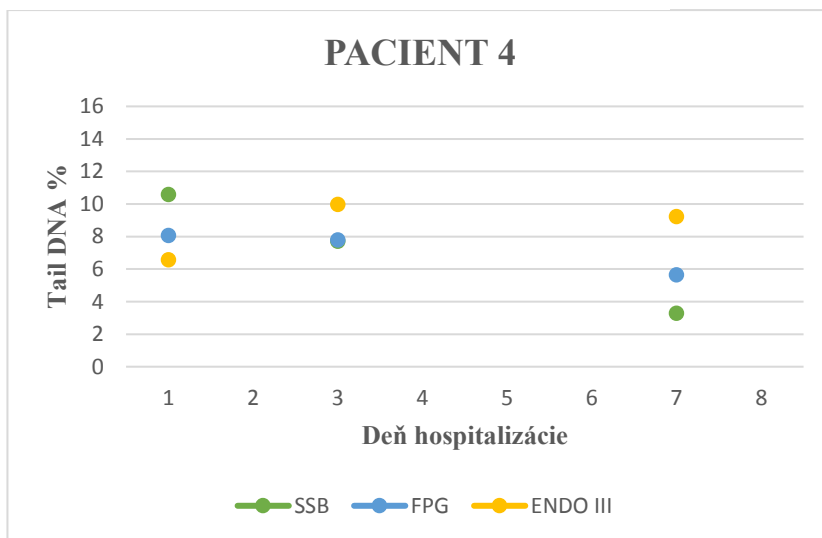
Graf 2 Vývoj poškodenia DNA pacienta 2 v priebehu hospitalizácie



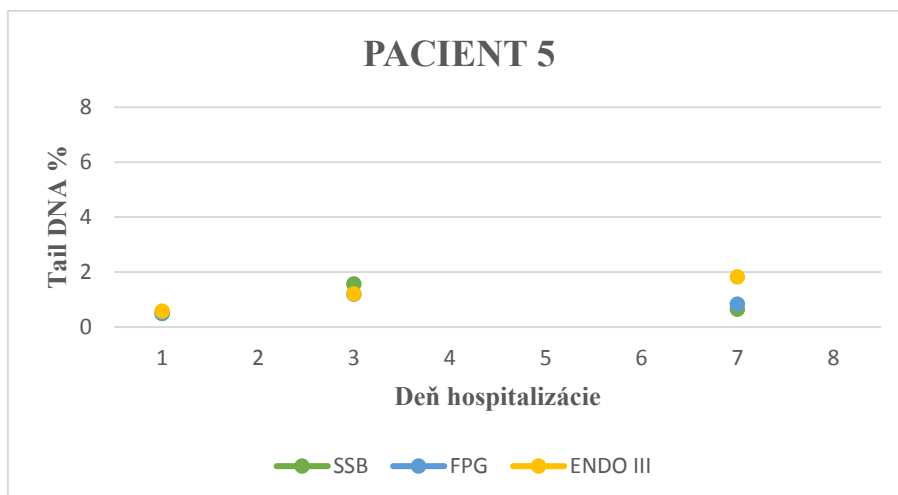
Graf 3 Vývoj poškodenia DNA pacienta 3 v priebehu hospitalizácie



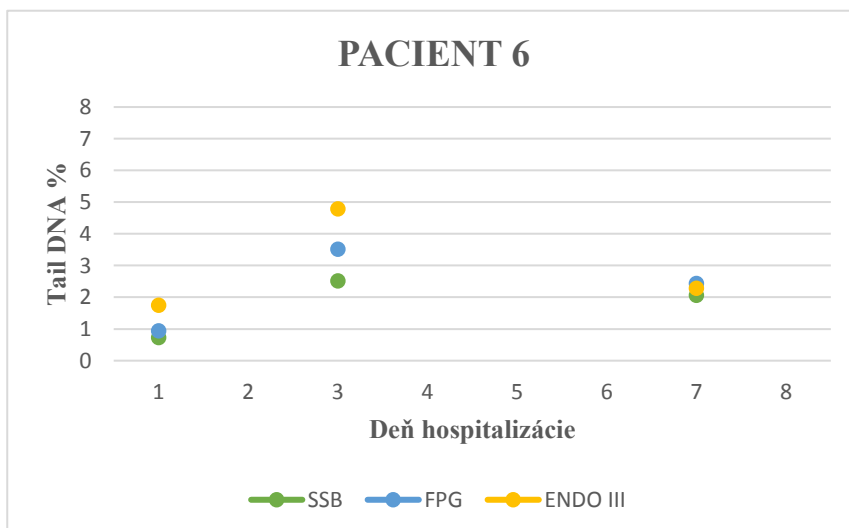
Graf 4 Vývoj poškodenia DNA pacienta 4 v priebehu hospitalizácie



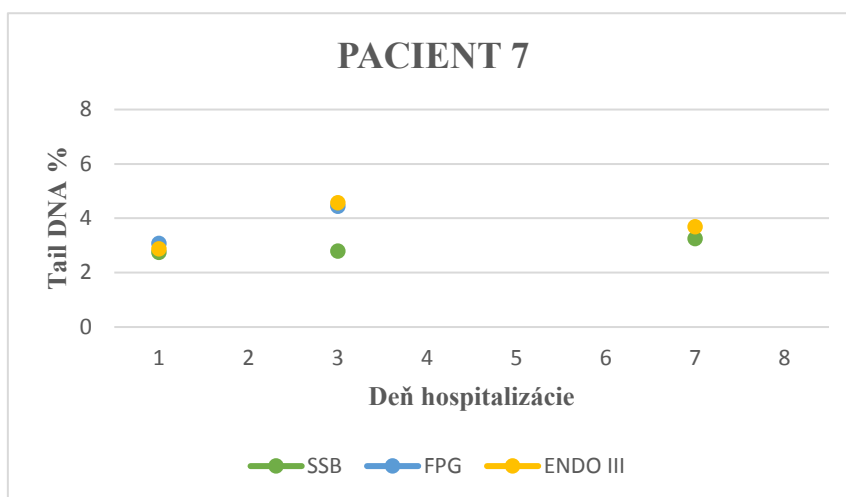
Graf 5 Vývoj poškodenia DNA pacienta 5 v priebehu hospitalizácie



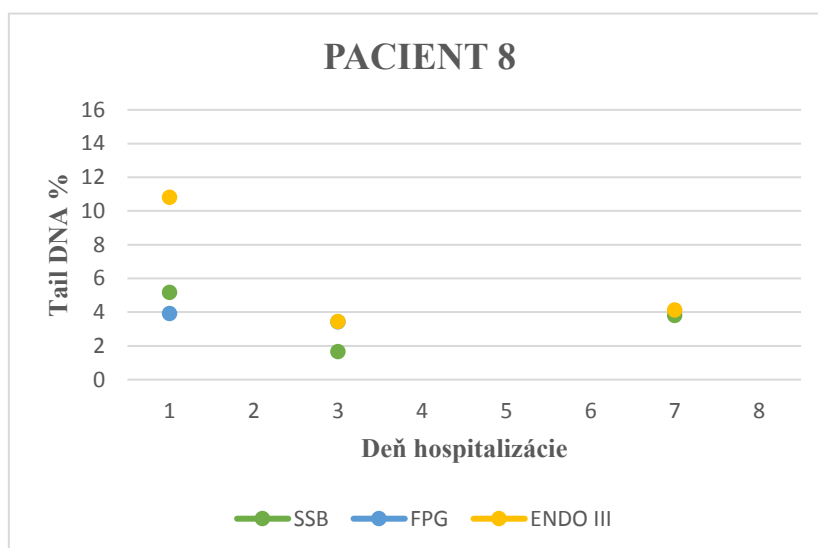
Graf 6 Vývoj poškodenia DNA pacienta 6 v priebehu hospitalizácie



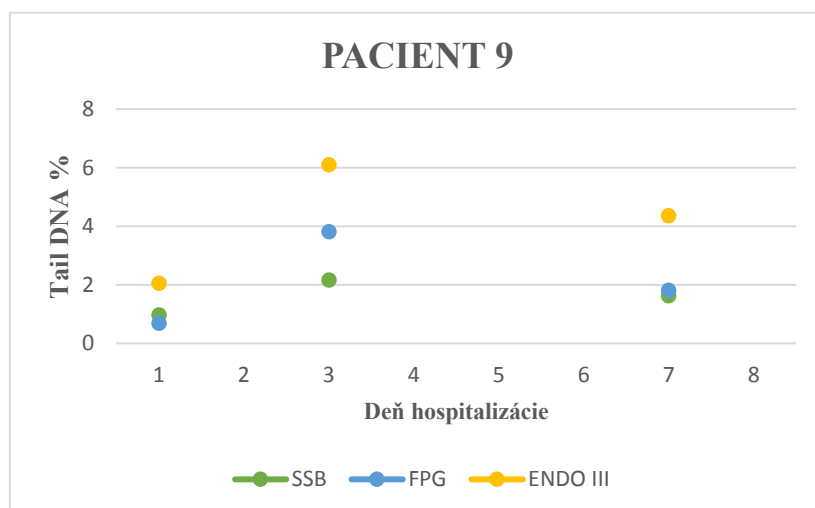
Graf 7 Vývoj poškodenia DNA pacienta 7 v priebehu hospitalizácie



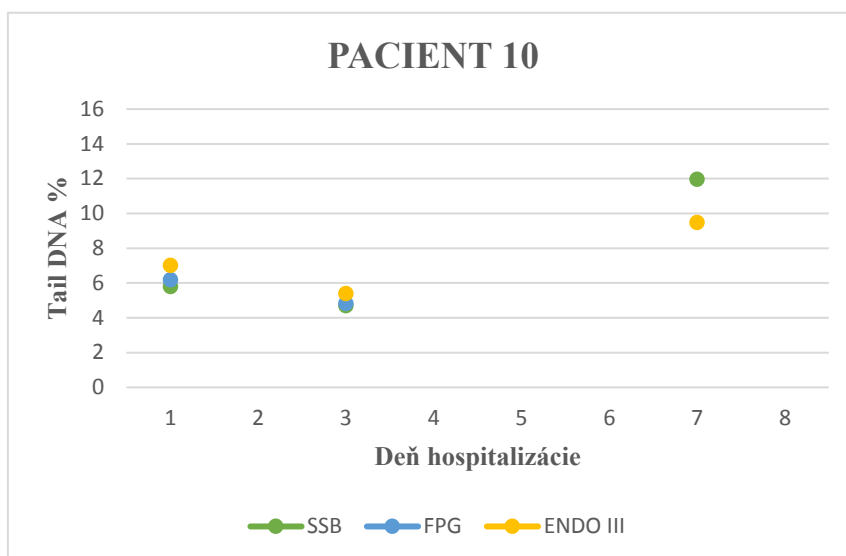
Graf 8 Vývoj poškodenia DNA pacienta 8 v priebehu hospitalizácie



Graf 9 Vývoj poškodenia DNA pacienta 9 v priebehu hospitalizácie



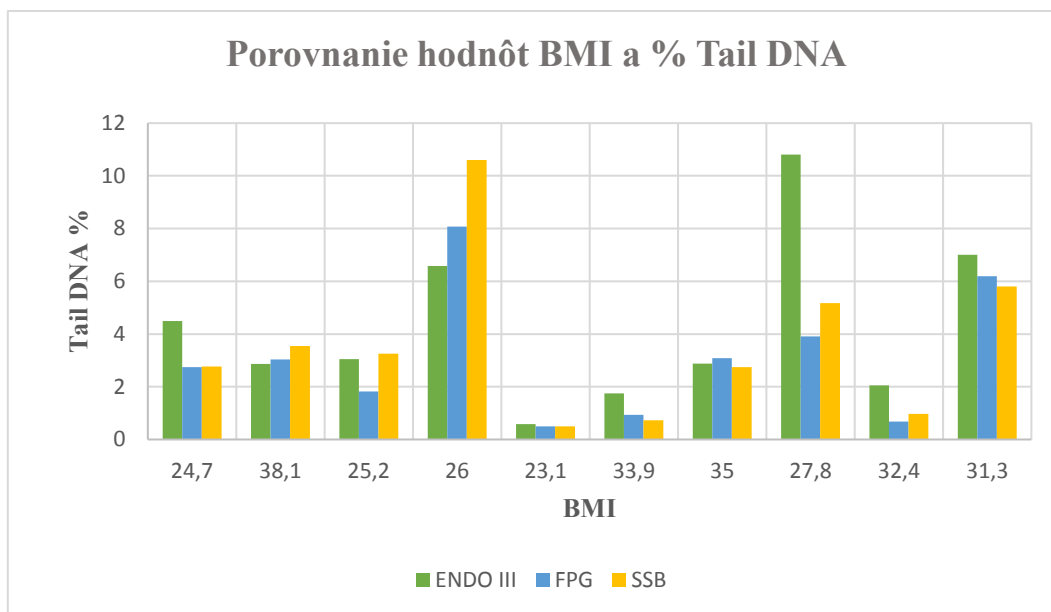
Graf 10 Vývoj poškodenia DNA pacienta 10 v priebehu hospitalizácie



5.1.3 Závislosť poškodenia na BMI

Porovnali sme poškodenú DNA s hodnotami BMI pomocou stĺpcového grafu. Z grafu vyplýva, že poškodenie DNA pre všetky 3 sledované parametre v prvý deň hospitalizácie nezávisí na veľkosti BMI. Závislosti sme nepreukázali ani v tretí a siedmy deň hospitalizácie.

Graf 11 Závislosť hodnôt BMI na hladine poškodenia DNA



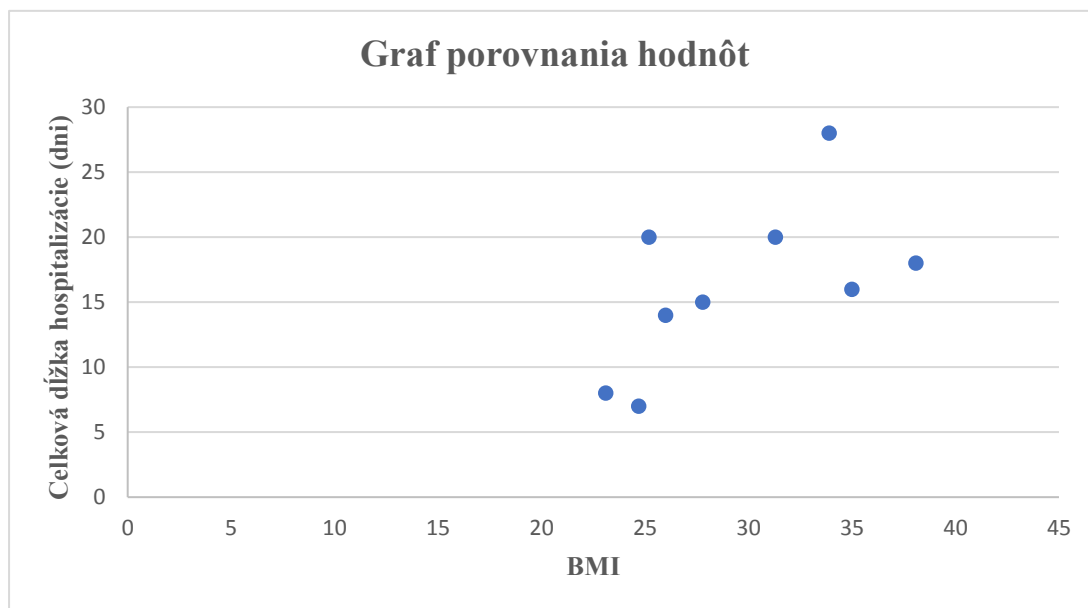
5.1.4 Závislosť dĺžky hospitalizácie na BMI

Taktiež sme sa zamerali na vzťah medzi celkovou dĺžkou hospitalizácie pacientov a hodnotami BMI. Čas strávený na jednotke intenzívnej starostlivosti (JIS), nebol iba 7 dní (Tabuľka 7), ako sme si vybrali na stanovenie poškodenia DNA. Z grafu nevyplýva žiadny vzájomný vzťah týchto parametrov.

Tabuľka 7 Dĺžka hospitalizácie pacientov na jednotke intenzívnej starostlivosti

Číslo pacienta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dĺžka hospitalizácie (dni)	7	18	20	14	8	28	16	15	78	20

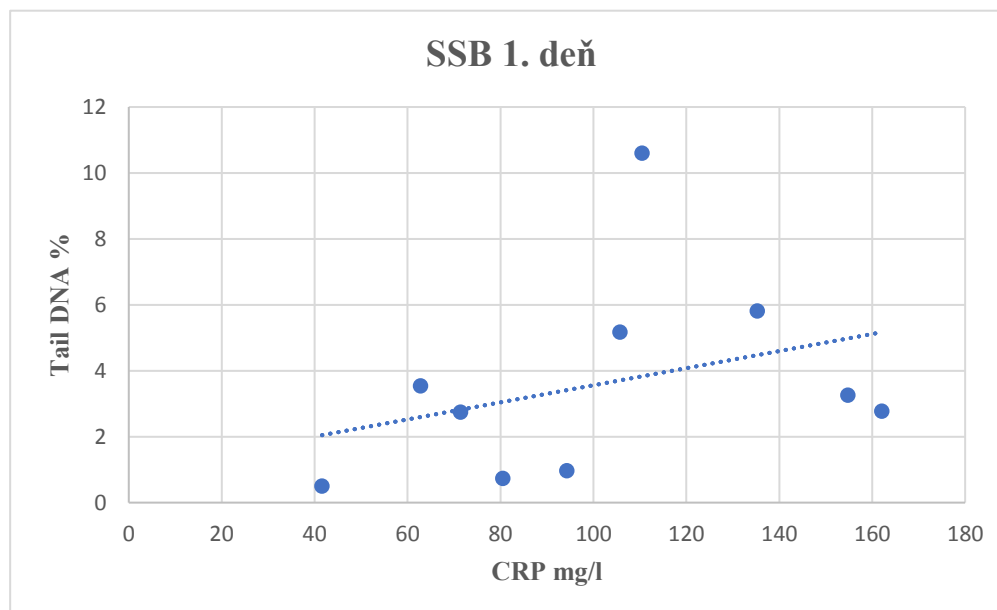
Graf 12 Závislosť hodnôt BMI na dĺžke hospitalizácie
 Pozn. bola vyradená dĺžka hospitalizácie 78 dní



5.1.5 Závislosť poškodenia na koncentrácii CRP

Hodnoty C-reaktívneho proteínu, ako reaktanta akútnej fáze boli v deň prijatia na JIS výrazne zvýšené. Ich hladina sa pohybovala od 62,8 mg/l do 162,1 mg/l (fyziologické hodnoty: 0-9 mg/l). Miera poškodenia DNA pre všetky stanovované parametre výrazne nezávisí na hladine CRP, ale z grafu je vidieť náznak nárastu poškodenia pri vyšších hodnotách CRP.

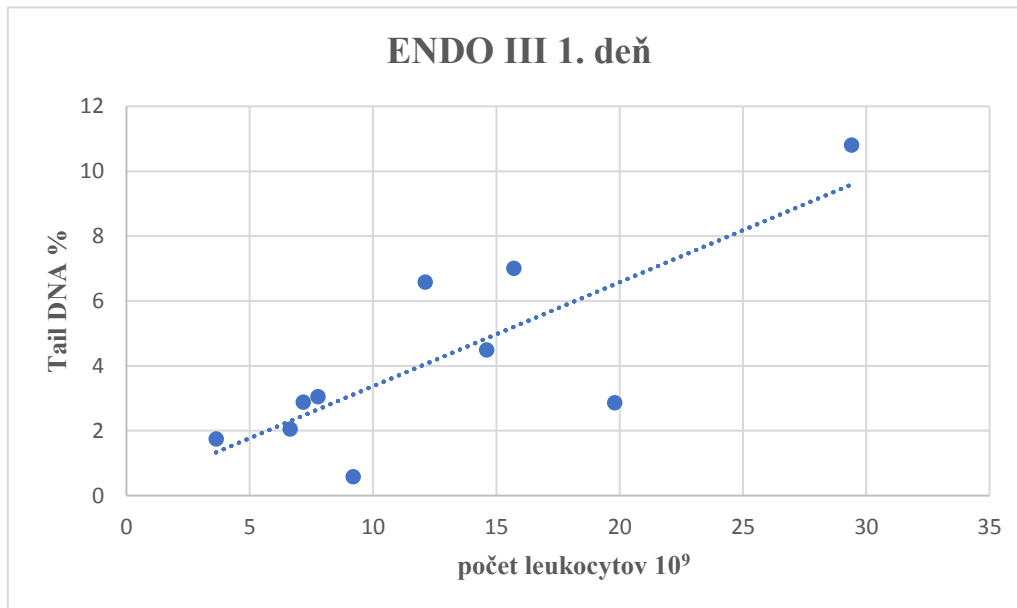
Graf 13 Závislosť koncentrácie CRP na hladine poškodenia pre parameter SSB



5.1.6 Závislosť poškodenia na počte leukocytov

Porovnali sme počet bielych krviniek s mierou poškodenia DNA. Polovica pacientov trpí leukocytózou (fyziologické hodnoty: $6 - 10 \cdot 10^9$). Výsledný graf naznačuje možnú závislosť týchto dát. Pre oxidované pyrimidíny bol vzájomný vzťah najvýznamnejší. Koeficient determinácie (R^2) nadobudol hodnotu 0,63.

Graf 14 Závislosť počtu leukocytov na hladine poškodenia DNA pre parameter ENDO III



5.2 Stanovenie reparácie DNA

5.2.1 Štatistická významnosť

Stanovili sme reparačnú kapacitu lymfocytov od pacientov v kritickom stave a pomocou jednofaktorovej ANOVY sme určili, že v priebehu ich hospitalizácie nedochádza k štatisticky významným rozdielom v poškodení. Hodnoty % tail DNA sú uvedené v tabuľke 8. Negatívne kontroly HeLa buniek nám slúžia na potvrdenie správnosti merania. (Tabuľka 9)

Tabuľka 8 Výsledné hodnoty % tail DNA pri stanovovaní reparačnej kapacity DNA

ODBER	1. deň	3. deň	7. deň
ČÍSLO PACIENTA	% tail DNA	% tail DNA	% tail DNA
1	2,17	13,38	8,14
2	2,18	4,80	6,43
3	8,69	9,20	5,13
4	8,68	8,69	4,30
5	9,35	7,81	5,91
6	6,24	7,82	4,65
7	4,88	11,47	13,81
8	4,72	3,87	5,59
9	5,64	5,21	3,48
10	5,44	4,81	3,82

Opäť sme získané hodnoty % tail DNA porovnali s hodnotami kontrolnej skupiny (Tabuľka 9) s použitím dvojvýberového t testu. Bohužiaľ u pacienta kontrolnej skupiny č. 9 sme neodobrali extrakty, kvôli nedostatku buniek hneď na začiatku experimentu. Vo všetkých prípadoch tzn. v prvý, tretí aj siedmy deň je štatistický významný rozdiel hodnôt % tail DNA. (Tabuľka 10) Zvýšená reparačná kapacita sa prejavila u pacientov experimentálnej skupiny, teda pacientov v kritickom stave.

Tabuľka 9 Výsledné hodnoty % tail DNA pri stanovení reparačnej kapacity DNA kontrolnej skupiny pacientov

Číslo pacienta Kontrolná skupina	% tail DNA
1	2,63
2	0,80
3	5,23
4	1,98
5	1,75
6	0,84
7	1,17
8	1,23
9	nedostupné
10	3,88

Tabuľka 10 Štatistická významnosť reparačnej kapacity DNA medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou pacientov

Štatistická významnosť	p < 0,05
1. deň	0,0016
3. deň	0,0002
7. deň	0,0025

6 DISKUSIA

Pri dlhodobej expozícii oxidačného stresu na organizmus vznikajú nepriaznivé podmienky, ktoré sú zodpovedné za narušenie bunkových dejov. Aj keď sú zlúčeniny ako voda alebo kyslík pre organizmy nevyhnutné, na druhej strane môžu pôsobiť ako toxické a dezinformačné látky. Hlavnými terčmi oxidačného poškodzovania sú bielkoviny, lipoproteíny a DNA. (Pizzino et al., 2017; Štípek et al., 2000) Konečný poškodzujúci efekt expozície závisí aj na reparačných procesoch bunky. (Brozovic et al., 2010)

Kométovej analýze, ako metóde na stanovenie oxidačného poškodenia DNA je jednoduchou a relatívne nenáročnou technikou s ľahkou optimalizáciou. V našom prípade bolo nutné metódu prispôbiť podmienkam nášho experimentu aj napriek možnosti aplikovať už optimalizovanú metódu. Prvou úlohou bol zber vzoriek a zaistenie ich okamžitého spracovania, aby sme nezískali falošne pozitívne výsledky o poškodení vplyvom dlhšieho skladovania. Taktiež sme museli prispôbiť (predĺžiť) čas tuhnutia LMP a HMP agarózy. Pri hodnotení komét v programe LUCIA Comet Assay sme zistili, že automatické hodnotenie nemusí byť vždy spoľahlivé. Program často označoval iba časti buniek (napr. bunku bez chvosta) alebo artefakty zanesené pri práci, čím by vznikali skreslené výsledky a preto sme zvolili manuálne označovanie buniek.

Na rozdiel od metód využívaných v klinickej medicíne alebo molekulárnej biológii nemá kométovej analýze výhody, medzi ktoré určite patria jednotné štandardizované postupy a ľahko dostupné komerčné produkty. Tento nedostatok síce na jednej strane zvyšuje prispôbivosť a rozširuje využitie metódy, ale môže tiež vnášať nežiadúce činitele ktoré nepostrehneme, a ktoré negatívne ovplyvňujú výsledky. (Dvořák, 2013)

Cieľom diplomovej práce bolo pomocou kométovej analýzy zistiť, či kritický stav pacientov spôsobený ochorením COVID-19 môže poškodiť ľudskú DNA. Spracovali sme venóznou krv od pacientov na JIS vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové v ich prvý, tretí a siedmy deň hospitalizácie. Zo získaných hodnôt % tail DNA sme určili, že medzi jednotlivými dňami nie je žiadna štatistická významnosť v miere poškodenia DNA pre ani jeden zo sledovaných parametrov (SSB, FPG, ENDO III). Taktiež sme porovnali hladinu poškodenia DNA experimentálnej skupiny so skupinou kontrolnou pomocou dvojvýberového t testu s nerovnosťou rozptylov a iba v dvoch prípadoch došlo k štatisticky významnému rozdielu. Konkrétne bolo v prvý deň hospitalizácie zvýšené množstvo oxidovaných purínov a na siedmy deň zase jednoreťazových zlomov. Zvýšene poškodenie DNA sme ale namerali u kontrolnej

skupiny, čo by mohlo naznačiť, že kritický stav vyvolaný koronavírusom našu DNA nepoškodzuje.

Vychádzali sme z predpokladu niekoľkých štúdií, ktoré naznačovali, že po obsadení ACE2 receptora S proteínom koronavírusu dôjde k zvýšeniu množstva voľných radikálov a teda ku generovaniu oxidačného stresu. (Busse et al., 2020; Hati et Bhattacharyya, 2020; Suhail et al., 2020)

Pri porovnaní hladiny poškodenia a hodnôt BMI sme nezistili žiadnu významnú závislosť. Rovnako sa nenašla ani korelácia medzi dĺžkou hospitalizácie a BMI, ale slabý náznak tendencie je z grafu pozorovateľný. Napriek tomu mali pacienti s vyššími hodnotami BMI horší priebeh ochorenia, no celkový kritický stav ich DNA nepoškodzoval. Dĺžka hospitalizácie taktiež nezávisela na hladine poškodenia DNA. Keďže vekové rozpätie pacientov bolo pomerne úzke a nenašli sme žiadnu významnú závislosť medzi vekom a poškodením DNA, viac sme sa týmto faktorom nezaoberali. Pomer pohlavia bol výrazne naklonený na mužskú stranu (8:2) a mohlo by sa zdať, že dochádza k častejšiemu zvratu do kritického stavu vplyvom COVID-19 u mužov. To však na tak malom počte pacientov nie je možné potvrdiť.

Laboratórne výsledky z plnej krvi zvyčajne ukazujú nízky počet leukocytov spolu s lymfopéniou. Rýchlosť sedimentácie erytrocytov a hladiny CRP sú spravidla zvýšené aj v piaty a siedmy deň po prijatí. Závažné formy choroby COVID-19 sa prejavujú zvýšenými hladinami laktátdehydrogenázy, D-dimérov alebo kreatínu. (Mohamadian et al., 2021) Metaanalytická štúdia vyšetrila dostupné laboratórne výsledky získané od 2361 pacientov so SARS-CoV-2, ktoré demonštrujú leukopéniu u 26 %, leukocytózu u 13,3 % a lymfopéniu u 62,5 % pacientov. Taktiež spomedzi 2200 pacientov odhalili, že 91 % trpí trombocytózou a u 81 % je zvýšená hladina CRP. (Pormohammad et al., 2020)

Koncentrácie CRP experimentálnej skupiny sa pohybovali medzi 62 - 162 mg/l, čo je jasnou známkou zápalu. Keďže CRP pri bakteriálnych ochoreniach nadobúda koncentrácie nad 200 mg/l, u všetkých pacientov pravdepodobne prebiehala iba vírusová infekcia. Medzi koncentráciou CRP a veľkosťou oxidačného poškodenia nie je výrazný vzájomný vzťah. Napriek tomu sme mohli pre každý z posudzovaných parametrov vypožorovať náznak nárastu poškodenia DNA pri vyšších hodnotách CRP. U polovice pacientov bola hladina leukocytov zvýšená (znova prejav zápalu) a iba u jedného z pacientov došlo k leukopénii (následok vírusovej infekcie). Počet lymfocytov bol variabilný, ale vo väčšine prípadov zvýšený, čo opäť potvrdzuje prítomnosť vírusovej infekcie. Medzi hladinami bielych krviniek a poškodením

DNA sa tiež nepotvrdil žiaden vzájomný vzťah. V prípade leukocytov by bolo vhodné spomenúť, že v rámci všetkých skúmaných laboratórnych ukazovateľov došlo k najvýznamnejšej korelácii s poškodením DNA.

Počet trombocytov väčšinou nadobúdal fyziologické rozmedzie hodnôt. Naopak hladina D-dimérov ako marker trombofilných stavov bola zvýšená. Všetky vyššie spomínané laboratórne ukazovatele potvrdzujú zvýšenú aktivitu imunitného systému, čo však s najväčšou pravdepodobnosťou nepoškodzuje a nezasahuje do ľudskej DNA.

Reparačná účinnosť enzýmov získaných z lymfocytov pacientov nevykazuje žiadnu štatistickú významnosť v priebehu hospitalizácie. Naopak pri porovnaní s kontrolnou skupinou došlo k štatisticky významnému rozdielu. Vyššie poškodenie DNA, ako dôsledok iniciácie opravného procesu (kapitola 3.1.2.1) bolo namerané pri experimentálnej skupine. Keďže imunitný systém pacientov v kritickom stave je nadmerne aktivovaný, pravdepodobne dochádza aj k nabudniu metabolizmu v jadrách buniek a teda aj k zvýšeniu reparačnej schopnosti enzýmov.

Práca predstavuje klinickú štúdiu. Zároveň bola vypracovaná ako pilotná štúdia a priniesla prvotné poznatky o použiteľnosti metódy v danej problematike. Výsledky je potrebné potvrdiť alebo vyvrátiť na väčšej populácii pacientov. Účelom práce bolo rozšíriť poznatky o veľkosti záťaže na organizmus spôsobenou SARS-CoV-2.

7 ZÁVER

V tejto diplomovej práci je v rámci teoretickej časti spracované oxidačné poškodenie ľudskej DNA a jej opravné mechanizmy. Súčasťou je metodika kométovej analýzy na stanovenie tohto poškodenia. Časť je tiež venovaná problematike nového koronavírusu zodpovedného za ochorenie COVID-19, ktoré môže viesť až ku kritickému, život ohrozujúcemu stavu.

V našom experimente sme využili kométovej analýzy na stanovenie miery oxidačného poškodenia DNA desiatich pacientov v kritickom stave. Použili sme klasickú alkalickú aj modifikovanú verziu s pridaním enzýmov pre stanovenie oxidovaných pyrimidínov a purínov. Modifikovanú verziu CA sme aplikovali aj na stanovenie reparačnej kapacity extraktov z lymfocytov pacientov. Pre všetky skúmané parametre (SSB, FPG, ENDO III) vyšli štatisticky nevýznamné rozdiely v poškodení DNA, ako v priebehu hospitalizácie, tak aj pri porovnaní s kontrolnou skupinou. Podľa veľkosti BMI sa napriek horšiemu priebehu choroby nepreukázalo vyššie poškodenie DNA a rovnako na ňom nezávisela ani dĺžka hospitalizácie. Závislosť laboratórnych ukazovateľov na oxidačnom poškodení vyšla vo väčšine prípadov tiež štatisticky nevýznamná.

Reparačná schopnosť lymfocytov na HeLa bunkovej línii nezávisela na priebehu hospitalizácie, ale podarilo sa nám preukázať štatisticky významný rozdiel v účinnosti opravných enzýmov medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou. Reparačná kapacita bola u experimentálnej skupiny zvýšená. Došli sme k záveru, že dôvodom môže byť väčšia záťaž a nároky na DNA vzhľadom na zvýšenú aktivitu a počet imunitných buniek pacientov v kritickom stave spôsobeným ochorením COVID-19.

8 POUŽITÉ SKRATKY

8-oxoG	8-oxo-2'-deoxyguanozín
ACE2	angiotensin-converting enzyme 2, enzým konvertujúci angiotenzín 2
AlkA	3-metyladenin DNA glykozyláza II
Ang	angiotenzín
AP miesto	apurínové/apirimidínové miesto
ARDS	acute respiratory distress syndrome, syndróm akútnej respiračnej tiesne
ATP	adenozintrifosfát
BER	base excision repair, bázová excízna reparácia
CA	comet assay, kométová analýza
CLIA	chemiluminescent immunoassay, chemiluminiscenčná imunoanalýza
Comet-FISH	kométová analýza v spojení s fluorescenčnou in situ hybridizáciou
COVID-19	coronavirus disease 2019, koronavírusová choroba 2019
CP	convalescent plasma, rekonvalescentná plazma
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer, cyklobutánový pyrimidínový dimér
CRP	C-reaktívny proteín
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DSB	double strand breaks, dvojreťazové zlomy
EB	etídium bromid
ELFO pufor	elektroforetický pufor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzýmový imunosorbentný test
ENDO III	endonukleáza III
FDA	Food and Drug Administration, Úrad pre potraviny a liečivá

FPG	formamidopyrimidín DNA glykozyláza
GG-NER	global genome - nucleotide excision repair, globálná genómová NER
HMPA	high melting point agarose, agaróza s vysokou teplotou tavenia
IL	interleukín
JIS	jednotka intenzívnej starostlivosti
LMPA	low melting point agarose, agaróza s nízkou teplotou tavenia
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus, koronavírus respiračný syndróm na blízkom východe
MMR	mismatch repair, oprava nesprávne zaradených báz
MMS	metylmetánsulfonát
MODS	multiple organ dysfunction syndrome, syndróm dysfunkcie viacerých o orgánov
MOF	multiple organ failure, zlyhanie viacerých orgánov
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid, mitochondriálna deoxyribonukleová kyselina
NAAT	nucleic acid amplification test, test amplifikácie nukleovej kyseliny
NADPH	nikotínamid adenín dinukleotid fosfát
napr.	napríklad
NER	nucleotide excision repair, nukleotidová excízna reparácia
OGG1	8-Oxoguanin glykozyláza
PMI	postmortem interval, posmrtný interval
RAAS	renín-angiotenzin-aldosterón systém
RBD	receptor-binding domain, receptor-viažuca doména
RIA	radioimmunoassay, rádioimunoanalýza
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina

RNS	reactive nitrogen species, reaktívne formy dusíka
ROS	reactive oxygen species, reaktívne formy kyslíka
RT-PCR	real time – polymerase chain reaction, polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrom coronavirus, závažný akútny respiračný syndróm koronavírus
SARS-CoV 2	severe acute respiratory syndrom coronavirus 2, závažný akútny respiračný syndróm koronavírus 2
SCGE	single cell gel electrophoresis, jednobunková gélová elektroforéza
SIRS	systemic inflammatory response syndrome, syndróm systémovej zápalovej odpovede
SSB	single strand breaks, jednoret'azové zlomy
TC-NER	transcription-coupled - nucleotide excision repair, s transkripciou spojená NER
ThyGly	5,6-dihydroxy-5,6-dihydrotymín
TRALI	transfusion-related acute lung injury, akútne poškodenia pľúc súvisiace s transfúziou
tzn.	to znamená
tzv.	takzvaný
UDG	uracil DNA glykozyláza
UV	ultraviolet, ultrafialové svetlo
WHO	World Health Organization, Svetová Zdravotnícka organizácia

9 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Štruktúrne modifikácie štyroch nukleobáz DNA	12
Obr. 2 Vzorce A guanín, a B oxidovaná forma guanínu	13
Obr. 3 Schéma BER	16
Obr. 4 Schéma NER	17
Obr. 5 Porovnanie zdravej bunky a bunky s poškodenou DNA	19
Obr. 6 Inkubácia DNA so špecifickým enzýmom	22
Obr. 7 Princíp Comet-FISH	23
Obr. 8 Schéma jednotlivých vrstiev agarózy na mikroskopickom sklíčku	26
Obr. 9 Klasifikácia komét	28
Obr. 10 Počet prípadov a úmrtí na/s COVID-19 v Európe	32
Obr. 11 Štruktúra SARS-CoV-2.....	34
Obr. 12 Renín angiotenzín systém, ACE2	35
Obr. 13 Izolácia lymfocytov pomocou LSM	43
Obr. 14 Bunka zobrazená v programe LUCIA Comet Assay	46
Obr. 15 Zorné pole v programe LUCIA Comet Assay	47

10 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Súhrnný zoznam údajov o pacientoch vybraných pre náš experiment.....	38
Tabuľka 2 Výsledná tabuľka hodnôt poškodenia DNA získaná pomocou obrazovej analýzy LUCIA Comet Assay	48
Tabuľka 3 Štatistická významnosť meraní.....	52
Tabuľka 4 Priemer, medián a smerodatná odchýlka hodnoty Tail DNA v percentách pre stanovované typy poškodenia DNA	53
Tabuľka 5 Štatistická významnosť poškodenia DNA medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou pacientov.....	54
Tabuľka 6 Hladiny poškodenia DNA kontrolnej skupiny pacientov pre 3 skúmané parametre	54
Tabuľka 7 Dĺžka hospitalizácie pacientov na jednotke intenzívnej starostlivosti	59
Tabuľka 8 Výsledné hodnoty % tail DNA pri stanovovaní reparačnej kapacity DNA	62
Tabuľka 9 Výsledné hodnoty % tail DNA pri stanovení reparačnej kapacity DNA kontrolnej skupiny pacientov.....	63
Tabuľka 10 Štatistická významnosť reparačnej kapacity DNA medzi experimentálnou a kontrolnou skupinou pacientov	63

11 ZOZNAM GRAFOV

Graf 1 Vývoj poškodenia DNA pacienta 1 v priebehu hospitalizácie	55
Graf 2 Vývoj poškodenia DNA pacienta 2 v priebehu hospitalizácie.	55
Graf 3 Vývoj poškodenia DNA pacienta 3 v priebehu hospitalizácie.	55
Graf 4 Vývoj poškodenia DNA pacienta 4 v priebehu hospitalizácie	56
Graf 5 Vývoj poškodenia DNA pacienta 5 v priebehu hospitalizácie	56
Graf 6 Vývoj poškodenia DNA pacienta 6 v priebehu hospitalizácie	56
Graf 7 Vývoj poškodenia DNA pacienta 7 v priebehu hospitalizácie	57
Graf 8 Vývoj poškodenia DNA pacienta 8 v priebehu hospitalizácie	57
Graf 9 Vývoj poškodenia DNA pacienta 9 v priebehu hospitalizácie	57
Graf 10 Vývoj poškodenia DNA pacienta 10 v priebehu hospitalizácie	58
Graf 11 Závislosť hodnôt BMI na hladine poškodenia DNA	59
Graf 12 Závislosť hodnôt BMI na dĺžke hospitalizácie	60
Graf 13 Závislosť koncentrácie CRP na hladine poškodenia pre parameter SSB	60
Graf 14 Závislosť počtu leukocytov na hladine poškodenia DNA pre parameter ENDO III..	61

12 POUŽITÁ LITERATÚRA

AFANASIEVA, K. a A. SIVOLOB. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophysical Chemistry* [online]. 2018, **238**, 1-7 [cit. 2021-03-07]. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2018.04.003.

AMANAT, F. a F. KRAMMER. SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* [online]. 2020, **52**(4), 583-589 [cit. 2021-7-18]. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2020.03.007.

AMES, B. N., F. D. LEE a W. E. DURSTON. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1973, **70**(3), 782-786 [cit. 2021-8-4]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.70.3.782.

ANDERSEN, K. G., A. RAMBAUT, W. I. LIPKIN, E. C. HOLMES a R. F. GARRY. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* [online]. 2020, **26**(4), 450-452 [cit. 2021-7-16]. ISSN 1078-8956. Dostupné z: doi:10.1038/s41591-020-0820-9.

AZQUETA, A. a A. R. COLLINS. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology* [online]. 2013, **87**(6), 949-968 [cit. 2021-02-25]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-013-1070-0.

AZQUETA, A., C. LADEIRA, L. GIOVANNELLI, et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2020, **783** [cit. 2021-03-08]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2019.108288.

AZQUETA, A., S. A.S. LANGIE, E. BOUTET-ROBINET, S. DUTHIE, C. LADEIRA, P. MØLLER, A. R. COLLINS a R. W.L. GODSCHALK. DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2019, **781**, 71-87 [cit. 2021-03-01]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2019.03.002.

AZQUETA, A., Y. LORENZO a A. R. COLLINS. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis* [online]. 2009, **24**(4), 379-381 [cit. 2021-03-03]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/geb009.

AZQUETA, A., S. SHAPOSHNIKOV a A. R. COLLINS. DNA repair measured by the comet assay.: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *DNA repair* [online]. 2011, 2012-7-23, s. 616-636 [cit. 2021-02-26]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-953-307-697-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_6.

AZQUETA, A., J. SLYSKOVA, S. A. S. LANGIE, I. ONEILL GAIVÃO a A. COLLINS. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics* [online]. 2014, 5 [cit. 2021-03-01]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2014.00288.

BAKHJET, M. a S. TAURIN. SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 2021, 58, 16-29 [cit. 2021-7-15]. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2020.11.001.

BANÁTH, J. P., A. KIM a P. L. OLIVE. Overnight Lysis Improves the Efficiency of Detection of DNA Damage in the Alkaline Comet Assay. *Radiation Research* [online]. 2001, 155(4), 564-571 [cit. 2021-03-08]. ISSN 0033-7587. Dostupné z: doi:10.1667/0033-7587(2001)155[0564:OLITEO]2.0.CO;2.

BEEDANAGARI, S., S.V. VULIMIRI, S. BHATIA a B. MAHADEVAN. Genotoxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 729-742 [cit. 2021-8-4]. ISBN 9780124046306. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9.

BEGUM, J., N. A. MIR, K. DEV, B. BUYAMAYUM, M. Y. WANI a M. RAZA. Challenges and prospects of COVID-19 vaccine development based on the progress made in SARS and MERS vaccine development. *Transboundary and Emerging Diseases* [online]. 2021, 68(3), 1111-1124 [cit. 2021-7-19]. ISSN 1865-1674. Dostupné z: doi:10.1111/tbed.13804.

BioRender: *Nucleotide Excision Repair* [online]. [cit. 2021-8-7]. Dostupné z: <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/5c8c7ba9d4f2ef3300632942>.

BioVision: Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Isolation and Viability Kit: Simple, one step assay to isolate PBMC. *BioVision Inc.* [online]. 2018 [cit. 2021-8-12]. Dostupné z: <https://www.biovision.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cell-isolation-and-viability-kit.html>

BLOCH, E. M., S. SHOHAM, A. CASADEVALL, et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2020, 130(6), 2757-2765 [cit. 2021-7-18]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI138745.

BOHR, V. A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. "Oxidative DNA Damage and Repair." *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2002, **32**(9), 804-812 [cit. 2021-8-5]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(02)00787-6.

BROZOVIC, G., N. ORSOLIC, R. ROZGAJ, et al. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *Journal of Applied Genetics* [online]. 2010, **51**(1), 79-86 [cit. 2021-8-30]. ISSN 1234-1983. Dostupné z: doi:10.1007/BF03195714.

BRUNBORG, G. a A. COLLINS. Guidance for publishing comet assay results. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2020, **854-855** [cit. 2021-03-07]. ISSN 13835718. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrgentox.2020.503146.

BUSSE, L. W., J. H. CHOW, M. T. MCCURDY a A. K. KHANNA. COVID-19 and the RAAS—a potential role for angiotensin II? *Critical Care* [online]. 2020, **24**(1) [cit. 2021-8-9]. ISSN 1364-8535. Dostupné z: doi:10.1186/s13054-020-02862-1.

CADET, J. a J. R. WAGNER. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(2), a012559-a012559 [cit. 2021-7-27]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012559.

CADET, J., K. J.A. DAVIES, M. HG MEDEIROS, P. DI MASCIO a J. R. WAGNER. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2017, **107**, 13-34 [cit. 2021-8-5]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049.

CARFÌ, A., R. BERNABEI a F. LANDI. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA* [online]. 2020, **324**(6) [cit. 2021-7-15]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2020.12603.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2014, **1840**(2), 794-800 [cit. 2021-02-25]. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.022.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology* [online]. 2004, **26**(3), 249-261 [cit. 2021-02-25]. ISSN 1073-6085. Dostupné z: doi:10.1385/MB:26:3:249.

COLLINS, A. R. The Comet Assay: Principles, Applications, and Limitations. DIDENKO, Vladimir V. *In Situ Detection of DNA Damage* [online]. New Jersey: Humana Press, 2002, s. 163-177 [cit. 2021-03-05]. ISBN 1-59259-179-5. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-179-5:163.

COLLINS, A. R., A. A. OSCOZ, G. BRUNBORG, I. GAIVAO, L. GIOVANNELLI, M. KRUSZEWSKI, C. C. SMITH a R. STETINA. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* [online]. 2008, **23**(3), 143-151 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gem051.

COLLINS, A.R. a E. HORVÁTHOVÁ. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions* [online]. **29**(2) [cit. 2021-8-15]. ISSN 03005127. Dostupné z: doi:10.1042/0300-5127:0290337.

Cometassay. Principle-How To Run Comet Assay: [online]. 2021, [cit. 2021-02-26]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/products/cometassay-assay-principle>.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I., M. I. DÁVILA-RODRÍGUEZ, J. L. FERNÁNDEZ, C. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, A. GOSÁLBEZ a J. GOSÁLVEZ. New Application of the Comet Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. 2011, **59**(7), 655-660 [cit. 2021-02-27]. ISSN 0022-1554. Dostupné z: doi:10.1369/0022155411410884.

COSTA, S. a J. PAULO TEIXEIRA. Comet Assay. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 1020-1023 [cit. 2021-02-25]. ISBN 9780123864550. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.01072-1.

CUI, J., F LI a Z-L. SHI. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2019, **17**(3), 181-192 [cit. 2021-7-11]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-018-0118-9

CURTIN, N. J. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2012, **12**(12), 801-817 [cit. 2021-8-8]. ISSN 1474-175X. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3399.

DEY, S., D. DEMAZUMDER, A. SIDOR, D. B. FOSTER a B. O'ROURKE. Mitochondrial ROS Drive Sudden Cardiac Death and Chronic Proteome Remodeling in Heart Failure. *Circulation Research* [online]. 2018, **123**(3), 356-371 [cit. 2021-8-2]. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.312708.

Difference between: *Difference Between Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair Molecular Biology* [online]. March 30, 2017 [cit. 2021-8-7]. Dostupné z: <https://www.differencebetween.com/difference-between-base-excision-repair-and-vs-nucleotide-excision-repair/>.

DUSINSKA, M. a A. R. COLLINS. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* [online]. 2008, **23**(3), 191-205 [cit. 2021-03-05]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gen007.

DVOŘÁK, M. *Sledování poškození dna metodou kometové analýzy* [online]. 2013, , 1-122 [cit. 2021-03-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/vo8bo/disertace_Dvorak_2013.pdf.

DVOŘÁK, M. a M. MATEJOVIČOVÁ. Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *Chem. Listy* [online]. 102. 2008, 2012-7-23, s. 977-983 [cit. 2021-02-26]. *Methods in Molecular Biology*. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_6.

EIJK, L. E, M. BINKHORST, A. R. BOURGONJE, et al. COVID -19: immunopathology, pathophysiological mechanisms, and treatment options. *The Journal of Pathology* [online]. 2021, **254**(4), 307-331 [cit. 2021-7-15]. ISSN 0022-3417. Dostupné z: doi:10.1002/path.5642.

EL-HAROUNY, M., S. EL-DAKROORY, S. ATTALLA, N., HASAN a S. EL-NABI. The Relationship between Postmortem Interval and DNA Degradation in Different Tissues of Drowned Rats. *Mansoura Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology* [online]. 2008, **16**(2), 45-61 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1110-5437. Dostupné z: doi:10.21608/mjfmct.2008.54094.

FRAGA, C. G., et al. "Oxidative Damage to DNA During Aging: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Rat Organ DNA and Urine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 12, 1990, pp. 4533–4537. [cit. 2021-08-02] Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/2354355>.

FRASER, E. Long term respiratory complications of covid-19. *BMJ* [online]. 2020 [cit. 2021-7-15]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.m3001.

FREUDENTHAL, B. D. Base excision repair of oxidative DNA damage from mechanism to disease. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2017, **22**(9), 1493-1522 [cit. 2021-8-8]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/4555.

GORBUNOVA, V., A. SELUANOV, Z. MAO a C. HINE. Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, **35**(22), 7466-7474 [cit. 2021-8-8]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkm756.

GUAN, W., Z. NI, Y. HU, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* [online]. 2020, **382**(18), 1708-1720 [cit. 2021-7-15]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa2002032.

GUNASEKARANA, V. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2015 [cit. 2021-8-4]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2015/12062.5622.

GUO, J., P. C. HANAWALT a G. SPIVAK. Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. *Nucleic Acids Research* [online]. 2013, **41**(16), 7700-7712 [cit. 2021-03-03]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkt524.

HADFIELD, J., C. MEGILL, S. M BELL, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* [online]. 2018, **34**(23), 4121-4123 [cit. 2021-7-16]. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty407.

HALLIWELL, B. a J. M. C. GUTTERIDGE. *Free Radicals in Biology and Medicine* [online]. Oxford University Press, 2015 [cit. 2021-7-28]. ISBN 9780198717478. Dostupné z: doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

HARTOG, N., W. FABER, A. FRISCH, J. BAUSS, C. P BUPP, S. RAJASEKARAN a J. W PROKOP. SARS-CoV-2 infection: molecular mechanisms of severe outcomes to suggest therapeutics. *Expert Review of Proteomics* [online]. 2021, **18**(2), 105-118 [cit. 2021-7-14]. ISSN 1478-9450. Dostupné z: doi:10.1080/14789450.2021.1908894.

HATI, S. a S. BHATTACHARYYA. Impact of Thiol–Disulfide Balance on the Binding of Covid-19 Spike Protein with Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor. *ACS Omega* [online]. 2020, **5**(26), 16292-16298 [cit. 2021-8-9]. ISSN 2470-1343. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c02125.

HOFFMANN, M., H. KLEINE-WEBER, N. KRÜGER, M. MÜLLER, Ch. DROSTEN a S. PÖHLMANN. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells [online]. 2020 [cit. 2021-7-14]. Dostupné z: doi:10.1101/2020.01.31.929042.

HU, B., H. GUO, P. ZHOU a Z-L. SHI. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(3), 141-154 [cit. 2021-7-11]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00459-7.

HU, L., Z. WANG, C. CARMONE, J. KEIJER a D. ZHANG. Role of Oxidative DNA Damage and Repair in Atrial Fibrillation and Ischemic Heart Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(8) [cit. 2021-7-27]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22083838.

HUANG, Ch., Y. WANG, X. LI, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* [online]. 2020, **395**(10223), 497-506 [cit. 2021-7-15]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

CHALKIAS, A., E. F. BARRETO, E. LAOU, K. KOLONIA, M. H. SCHEETZ, K. GOURGOULIANIS, I. PANTAZOPOULOS a T. XANTHOS. A Critical Appraisal of the Effects of Anesthetics on Immune-system Modulation in Critically Ill Patients With COVID-19. *Clinical Therapeutics* [online]. 2021, **43**(3), e57-e70 [cit. 2021-7-14]. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinthera.2021.01.004.

CHEN, T., J. YAN a Y. LI. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2014, **22**(1), 95-104 [cit. 2021-8-4]. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2014.01.008.

CHEN, X., Y. SHEN a Y. GU. *The research of relationship between DNA degradation and postmortem interval* [online]. 2005, **21**(2), 115-117 [cit. 2021-03-09]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21103540.

IDE, H., Y.W. KOW, B-X. CHEN, B.F. ERLANGER a S.S. WALLACE. Antibodies to oxidative DNA damage: characterization of antibodies to 8-oxopurines. *Cell Biology and Toxicology* [online]. **13**(6), 405-417 [cit. 2021-8-5]. ISSN 07422091. Dostupné z: doi:10.1023/A:1007467726635.

IWASAKI, M., J. SAITO, H. ZHAO, A. SAKAMOTO, K. HIROTA a D. MA. Inflammation Triggered by SARS-CoV-2 and ACE2 Augment Drives Multiple Organ Failure of Severe COVID-19: Molecular Mechanisms and Implications. *Inflammation* [online]. 2021, **44**(1), 13-34 [cit. 2021-7-14]. ISSN 0360-3997. Dostupné z: doi:10.1007/s10753-020-01337-3.

JACOBS, A. L. a P. SCHÄR. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* [online]. 2012, **121**(1), 1-20 [cit. 2021-8-5]. ISSN 0009-5915. Dostupné z: doi:10.1007/s00412-011-0347-4.

JOHNSON, L. A. a J. A.J. FERRIS. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Science International* [online]. 2002, **126**(1), 43-47 [cit. 2021-03-09]. ISSN 03790738. Dostupné z: doi:10.1016/S0379-0738(02)00027-0.

KAZDA, A., M. BALÍK, J. DRÁBKOVÁ, A. JABOR, P. MARUNA a J. VALENTA. *KRITICKÉ STAVY Metabolická a laboratorní problematika* [online]. Praha: Galén, 2012, , 119-127 [cit. 2021-04-05]. ISSN ISBN 978-80-7262-763-9.

KHODYREVA, S. N., R. PRASAD, E. S. ILINA, et al. Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, **107**(51), 22090-22095 [cit. 2021-8-5]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1009182107.

KIM, D., J-Y. LEE, J-S. YANG, J. W. KIM, V. N. KIM a H. CHANG. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* [online]. 2020, **181**(4), 914-921.e10 [cit. 2021-7-16]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.04.011.

KONRAD, R., U. EBERLE, A. DANGEL, et al. Rapid establishment of laboratory diagnostics for the novel coronavirus SARS-CoV-2 in Bavaria, Germany, February 2020. *Eurosurveillance* [online]. 2020, **25**(9) [cit. 2021-7-20]. ISSN 1560-7917. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000173.

KROKAN, H. E. a M. BJORAS. Base Excision Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(4), a012583-a012583 [cit. 2021-8-7]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012583.

KUMAR, N., S. RAJA a B. VAN HOUTEN. The involvement of nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* [online]. 2020, **48**(20), 11227-11243 [cit. 2021-8-5]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkaa777.

KUMAR, P., A. K. SAH, G. TRIPATHI, et al. Role of ACE2 receptor and the landscape of treatment options from convalescent plasma therapy to the drug repurposing in COVID-19. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2021, **476**(2), 553-574 [cit. 2021-7-18]. ISSN 0300-8177. Dostupné z: doi:10.1007/s11010-020-03924-2.

KUMARAVEL, T. S. a A. N. JHA. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* [online]. 2006, **605**(1-2), 7-16 [cit. 2021-03-07]. ISSN 13835718. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrgentox.2006.03.002.

KUMARAVEL, T. S., B. VILHAR, S. P. FAUX a A. N. JHA. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2009, **25**(1), 53-64 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-007-9043-9.

KUSAKABE, M., Y. ONISHI, H. TADA, et al. Mechanism and regulation of DNA damage recognition in nucleotide excision repair. *Genes and Environment* [online]. 2019, **41**(1) [cit. 2021-8-7]. ISSN 1880-7062. Dostupné z: doi:10.1186/s41021-019-0119-6.

LAI, Ch. K C a W. LAM. Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2021, **538**, 226-230 [cit. 2021-7-21]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.069.

LARSEN, N. B., M. RASMUSSEN a L. J. RASMUSSEN. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* [online]. 2005, **5**(2), 89-108 [cit. 2021-8-7]. ISSN 15677249. Dostupné z: doi:10.1016/j.mito.2005.02.002.

LAUER, S. A., K. H. GRANTZ, Q. BI, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of Internal Medicine* [online]. 2020, **172**(9), 577-582 [cit. 2021-7-14]. ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/M20-0504.

LEE, T-H. a T-H. KANG. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(23) [cit. 2021-8-5]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20236092.

LIAO, W., M. A. MCNUTT a W-G. ZHU. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* [online]. 2009, **48**(1), 46-53 [cit. 2021-03-05]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2009.02.016.

LINHART, K., H. BARTSCH a H. K. SEITZ. The role of reactive oxygen species (ROS) and cytochrome P-450 2E1 in the generation of carcinogenic etheno-DNA adducts. *Redox Biology* [online]. 2014, **3**, 56-62 [cit. 2021-08-03]. ISSN 22132317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2014.08.009.

LISBOA BASTOS, M., G. TAVAZIVA, S. K. ABIDI, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [online]. 2020, [cit. 2021-7-21]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.m2516.

LOGANATHAN, S., M. KUPPUSAMY, W. WANKHAR, K. R. GURUGUBELLI, V. H. MAHADEVAPPA, L. LEPCHA a A. K. CHOUDHARY. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2): COVID 19 gate way to multiple organ failure syndromes. *Respiratory Physiology & Neurobiology* [online]. 2021, **283** [cit. 2021-7-14]. ISSN 15699048. Dostupné z: doi:10.1016/j.resp.2020.103548.

LOVELL, D. P. a T. OMORI. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* [online]. 2008, **23**(3), 171-182 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gen015.

LU, R., X. ZHAO, J. LI, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet* [online]. 2020, **395**(10224), 565-574 [cit. 2021-7-16]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8.

MALBRAIN, M. L. N. G., I. DE LAET a J. DE WAELE. The Polycompartment Syndrome: What's all the Fuss About? VINCENT, Jean-Louis, ed. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine 2010* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, s. 465-484 [cit. 2021-04-05]. Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine. ISBN 978-3-642-10285-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-10286-8_44.

MALIK, Q. a K. E. HERBERT. Oxidative and non-oxidative DNA damage and cardiovascular disease. *Free Radical Research* [online]. 2012, **46**(4), 554-564 [cit. 2021-7-27]. ISSN 1071-5762. Dostupné z: doi:10.3109/10715762.2012.663913.

MARKKANEN, E.. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair* [online]. 2017, **59**, 82-105 [cit. 2021-8-3]. ISSN 15687864. Dostupné z: doi:10.1016/j.dnarep.2017.09.007.

MARSON, P., A. COZZA a G. DE SILVESTRO. The true historical origin of convalescent plasma therapy. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2020, **59**(5) [cit. 2021-7-18]. ISSN 14730502. Dostupné z: doi:10.1016/j.transci.2020.102847.

MARTEIJN, J. A., H. LANS, W. VERMEULEN a J. H. J. HOEIJMAKERS. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell*

Biology [online]. 2014, **15**(7), 465-481 [cit. 2021-8-7]. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3822.

MARTIN, S. A., Ch. J. LORD a A. ASHWORTH. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clinical Cancer Research* [online]. 2010, **16**(21), 5107-5113 [cit. 2021-8-8]. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0821.

MELIS, J. P.M., H. VAN STEEG a M. LUIJTEN. Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2013, **18**(18), 2409-2419 [cit. 2021-8-7]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2012.5036.

MIKHED, Y., A. DAIBER a S. STEVEN. Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(7), 15918-15953 [cit. 2021-7-28]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms160715918.

MOHAMADIAN, M., H. CHITI, A. SHOGHLI, S. BIGLARI, N. PARSAMANESH a A. ESMAEILZADEH. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The Journal of Gene Medicine* [online]. 2021, **23**(2) [cit. 2021-9-1]. ISSN 1099-498X. Dostupné z: doi:10.1002/jgm.3303.

MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis* [online]. 2018, **33**(1), 1-7 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gex046.

MÜLLER, W-U. Comet Assay. OBE, G. a VIJAYALAXMI, ed. *Chromosomal Alterations* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, s. 161-176 [cit. 2021-03-06]. ISBN 978-3-540-71413-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-71414-9_10.

MURUZABAL, D., A. COLLINS a A. AZQUETA. The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2021, **147** [cit. 2021-02-25]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111865.

NADIN, S. B., L. M. VARGAS-ROIG a D. R. CIOCCA. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* [online]. 2001, **49**(9), 1183-1186 [cit. 2021-03-07]. ISSN 0022-1554. Dostupné z: doi:10.1177/002215540104900912.

NATARAJAN, A. T., J. J. W. A. BOEI, F. DARROUDI, P. C. M. Van DIEMEN, Fernando DULOUT, M. P. HANDE a A. T. RAMALHO. Current Cytogenetic Methods for Detecting Exposure and Effects of Mutagens and Carcinogens. *Environmental Health*

Perspectives [online]. 1996, **104** [cit. 2021-8-5]. ISSN 00916765. Dostupné z: doi:10.2307/3432801.

NERI, S., A. GARDINI, A. FACCHINI, F. OLIVIERI, C. FRANCESCHI, G. RAVAGLIA a E. MARIANI. Mismatch Repair System and Aging: Microsatellite Instability in Peripheral Blood Cells From Differently Aged Participants. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* [online]. 2005, **60**(3), 285-292 [cit. 2021-8-8]. ISSN 1079-5006. Dostupné z: doi:10.1093/gerona/60.3.285.

OLIVE, P. L. DIDENKO, V. V. The Comet Assay: An Overview of Techniques. *In Situ Detection of DNA Damage* [online]. New Jersey: Humana Press, 2002, s. 179-194 [cit. 2021-03-07]. ISBN 1-59259-179-5. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-179-5:179.

OLIVE, P. L. a J. P. BANÁTH. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(1), 23-29 [cit. 2021-02-27]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.5.

OLIVE, P. L. a P. J. JOHNSTON. *DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair* [online]. 1997, 2012-7-23, s. 287-294 [cit. 2021-02-26]. *Methods in Molecular Biology*. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_6.

OLIVE, P. L. a R. E. DURAND. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry Part A* [online]. 2005, **66A**(1), 1-8 [cit. 2021-8-5]. ISSN 1552-4922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.20154.

OSTLING, O. a K.J. JOHANSON. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1984, **123**(1), 291-298 [cit. 2021-02-27]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X.

PASCUCCI, B., M. D'ERRICO, E. PARLANTI, S. GIOVANNINI a E. DOGLIOTTI. Role of nucleotide excision repair proteins in oxidative DNA damage repair: an updating. *Biochemistry (Moscow)* [online]. 2011, **76**(1), 4-15 [cit. 2021-8-8]. ISSN 0006-2979. Dostupné z: doi:10.1134/S0006297911010032.

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology* [online]. 2009, **25**(1), 1-3 [cit. 2021-02-26]. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1007/s10565-008-9081-y.

PIZZINO, G., N. IRRERA, M. CUCINOTTA, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2017, **2017**, 1-13 [cit. 2021-8-2]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8416763.

PORMOHAMMAD, A., S. GHORBANI, B. BARADARAN, et al. Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes of 61,742 patients with confirmed COVID-19 infection: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2020, **147** [cit. 2021-9-1]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2020.104390.

PU, X., Z. WANG a J. E. KLAUNIG. Alkaline Comet Assay for Assessing DNA Damage in Individual Cells. *Current Protocols in Toxicology* [online]. 2015, **65**(1) [cit. 2021-02-27]. ISSN 1934-9254. Dostupné z: doi:10.1002/0471140856.tx0312s65.

PUSHPAKOM, S., F. IORIO, P. A. EYERS, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2019, **18**(1), 41-58 [cit. 2021-7-18]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd.2018.168.

RAPP, A., M. HAUSMANN a K. O. GREULICH. The Comet–FISH Technique: A Tool for Detection of Specific DNA Damage and Repair. KEOHAVONG, Phouthone a Stephen G. GRANT. *Molecular Toxicology Protocols* [online]. New Jersey: Humana Press, 2004, s. 107-120 [cit. 2021-02-28]. ISBN 1-59259-840-4. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-840-4:107.

REYNOSO, M. S., C. M. ALVAREZ, L. DE LA CRUZ, M. D. ESCOTO a J. J. G. SÁNCHEZ. Evaluation of the genotoxic activity of dicamba and atrazine herbicides in several Mexican and South American varieties of sweetcorn (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Research* [online]. 2015, **14**(4), 16585-16593 [cit. 2021-03-08]. ISSN 16765680. Dostupné z: doi:10.4238/2015.December.11.5.

ROBERTSON, A. B., A. KLUNGLAND, T. ROGNES a I. LEIROS. DNA Repair in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2009, **66**(6), 981-993 [cit. 2021-8-5]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-009-8736-z.

SALIAN, V. S., Jessica A. WRIGHT, P. T. VEDELL, et al. COVID-19 Transmission, Current Treatment, and Future Therapeutic Strategies. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2021, **18**(3), 754-771 [cit. 2021-7-19]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c00608.

SALZBERGER, B., F. BUDER, B. LAMPL, B. EHRENSTEIN, F. HITZENBICHLER, T. HOLZMANN, B. SCHMIDT a F. HANSES. Epidemiology of SARS-CoV-

2. *Infection* [online]. 2021, **49**(2), 233-239 [cit. 2021-7-11]. ISSN 0300-8126. Dostupné z: doi:10.1007/s15010-020-01531-3.

SANTOS, S. J., N. P. SINGH a A. T. NATARAJAN. Fluorescence in Situ Hybridization with Comets. *Experimental Cell Research* [online]. 1997, **232**(2), 407-411 [cit. 2021-02-28]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.1997.3555.

SASAKI, Y. F., K. SEKIHASHI, F. IZUMIYAMA, E. NISHIDATE, A. SAGA, K. ISHIDA a S. TSUDA. The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2000, **30**(6), 629-799 [cit. 2021-03-08]. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408440008951123.

SHAPOSHNIKOV, S., P. D. THOMSEN a A. R. COLLINS. Combining Fluorescent In Situ Hybridization with the Comet Assay for Targeted Examination of DNA Damage and Repair. DIDENKO, Vladimir V., ed. *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, 2011-10-15, s. 115-132 [cit. 2021-03-03]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-60327-408-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-409-8_10.

SHOKOLENKO, I., N. VENEDIKTOVA, A. BOCHKAREVA, G. L. WILSON a M. F. ALEXEYEV. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* [online]. 2009, **37**(8), 2539-2548 [cit. 2021-7-28]. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkp100.

SHUKLA, R. K. Forensic application of comet assay: an emerging technique. *Forensic Sciences Research* [online]. 2017, **2**(4), 180-184 [cit. 2021-03-08]. ISSN 2096-1790. Dostupné z: doi:10.1080/20961790.2017.1379893.

SINGH, N. P. A Simple Method for Accurate Estimation of Apoptotic Cells. *Experimental Cell Research* [online]. 2000a, **256**(1), 328-337 [cit. 2021-02-28]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1006/excr.2000.4810.

SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2000b, **455**(1-2), 111-127 [cit. 2021-03-07]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/S0027-5107(00)00075-0.

SINGH, N. P., M. T. MCCOY, R. R. TICE a E. L. SCHNEIDER. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* [online]. 1988, **175**(1), 184-191 [cit. 2021-02-26]. ISSN 00144827. Dostupné z: doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SINGH, N.P., R.E. STEPHENS a E.L. SCHNEIDER. Modifications of Alkaline Microgel Electrophoresis for Sensitive Detection of DNA Damage. *International Journal of Radiation Biology* [online]. 1994, **66**(1), 23-28 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0955-3002. Dostupné z: doi:10.1080/09553009414550911.

SLUPPHAUG, G. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 2003, **531**(1-2), 231-251 [cit. 2021-8-5]. ISSN 00275107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002.

SOMMER, S., I. BURACZEWSKA a M. KRUSZEWSKI. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(4) [cit. 2021-8-4]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21041534.

SOUTO, E. B., J. R. CAMPOS, R. DA ANA, et al. Ocular Cell Lines and Genotoxicity Assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2020, **17**(6) [cit. 2021-8-5]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph17062046.

SPEIT, G. a A. ROTHFUSS. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. BJERGBÆK, Lotte, ed. *DNA Repair Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 2012-7-23, s. 79-90 [cit. 2021-02-26]. Methods in Molecular Biology. ISBN 978-1-61779-997-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-998-3_6.

SPIVAK, G, R. COX a P. HANAWALT. New applications of the Comet assay: Comet–FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. 2009, **681**(1), 44-50 [cit. 2021-8-5]. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2007.12.003.

STEFANIS, L., R. E. BURKE a L. A. GREENE. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Current Opinion in Neurology* [online]. 1997, **10**(4), 299-305 [cit. 2021-8-2]. ISSN 1350-7540. Dostupné z: doi:10.1097/00019052-199708000-00004.

ŠTÍPEK, Stanislav et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000, 314 s. [cit. 2021-7-31]. ISBN 80-7169-704-4.

STORZ, G. a J. A. IMLAYT. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 1999, **2**(2), 188-194 [cit. 2021-8-2]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-5274(99)80033-2.

SUHAIL, S., J. ZAJAC, C. FOSSUM, et al. Role of Oxidative Stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (COVID-19) Infection: A Review. *The Protein Journal* [online]. 2020, **39**(6), 644-656 [cit. 2021-8-9]. ISSN 1572-3887. Dostupné z: doi:10.1007/s10930-020-09935-8.

THANAN, R., S. OIKAWA, Y. HIRAKU, et al. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2015, **16**(1), 193-217 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms16010193.

TICE, R. R., E. AGURELL, B. BURLINSON, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* [online]. 2000, (35), 206 –221 [cit. 2021-03-07]. Dostupné z: doi:DOI: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j.

TOZZO, P., S. SCRIVANO, M. SANAVIO a L. CAENAZZO. The Role of DNA Degradation in the Estimation of Post-Mortem Interval: A Systematic Review of the Current Literature. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(10) [cit. 2021-03-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21103540.

TU, Y-F., Ch-S. CHIEN, A. A. YARMISHYN, et al. A Review of SARS-CoV-2 and the Ongoing Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(7) [cit. 2021-7-18]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21072657.

UDDIN, M., F. MUSTAFA, T. A. RIZVI, et al. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. *Viruses* [online]. 2020, **12**(5) [cit. 2021-7-11]. ISSN 1999-4915. Dostupné z: doi:10.3390/v12050526.

VAN DOREMALEN, N., T. BUSHMAKER, D. H. MORRIS, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine* [online]. 2020, **382**(16), 1564-1567 [cit. 2021-7-11]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMc2004973.

VANDE LOOCK, K., I. DECORDIER, R. CIARDELLI, D. HAUMONT a M. KIRSCH-VOLDERS. An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis* [online]. 2010, **25**(1), 25-32 [cit. 2021-3-3]. ISSN 1464-3804. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/geb039.

WANG, W., Y. XU, R. GAO, R. LU, K. HAN, G. WU a W. TAN. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* [online]. 2020c, [cit. 2021-7-20]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2020.3786.

WANG, Y., H. KANG, X. LIU a Z. TONG. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *Journal of Medical Virology* [online]. 2020b, **92**(6), 538-539 [cit. 2021-7-20]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.25721.

WANG, Y., Y. WANG, Y. CHEN a Q. QIN. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *Journal of Medical Virology* [online]. 2020a, **92**(6), 568-576 [cit. 2021-7-15]. ISSN 0146-6615. Dostupné z: doi:10.1002/jmv.25748.

WEN, H. Oxidative stress-mediated effects of angiotensin II in the cardiovascular system. *World Journal of Hypertension* [online]. 2012, **2**(4) [cit. 2021-8-9]. ISSN 2220-3168. Dostupné z: doi:10.5494/wjh.v2.i4.34.

WHO, World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays: WHO/2019-nCoV/Antigen_Detection/2020.1 [online]. 2020, 9 [cit. 2021-7-21]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.

WHO, World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update: [online]. 2021, **48** [cit. 2021-7-11]. Dostupné z: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---13-july-2021>.

WÖLFEL, R., V. M. CORMAN, W. GUGGEMOS, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* [online]. 2020, **581**(7809), 465-469 [cit. 2021-7-20]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/s41586-020-2196-x.

YASUI, A. Alternative Excision Repair Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. 2013, **5**(6), a012617-a012617 [cit. 2021-8-5]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a012617.

YEHUDA, A. B., A. GLOBERSON, S KRICHEVSKY, H. BARON, M. KIDRON, Y. FRIEDLANDER, G. FRIEDMAN a D. BEN YEHUDA. Ageing and the mismatch repair system. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 2001, **121**(1-3), 173-179 [cit. 2021-8-8]. ISSN 00476374. Dostupné z: doi:10.1016/S0047-6374(00)00208-6.

YIGIT, M., O. SOGUT, Ö. TATAROGLU, A. YAMANOGLU, E. YIGIT, E. M. GULER, O. F. OZER a A. KOCYIGIT. Oxidative/antioxidative status, lymphocyte DNA damage, and urotensin-2 receptor level in patients with migraine attacks. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* [online]. 2018, **14**, 367-374 [cit. 2021-3-8]. ISSN 1178-2021. Dostupné z: doi:10.2147/NDT.S156710.

ZARE SAKHVIDI, M. J., M. HAJAGHAZADEH, M. MOSTAGHACI, A. H. MEHRPARVAR, F. ZARE SAKHVIDI a E. NAGHSHINEH. Applicability of the comet assay in evaluation of DNA damage in healthcare providers' working with antineoplastic drugs: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Occupational and Environmental Health* [online]. 2016, **22**(1), 52-67 [cit. 2021-8-5]. ISSN 1077-3525. Dostupné z: doi:10.1080/10773525.2015.1123380.

ZOU, X., K. CHEN, J. ZOU, P. HAN, J. HAO a Z. HAN. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Frontiers of Medicine* [online]. 2020, **14**(2), 185-192 [cit. 2021-7-15]. ISSN 2095-0217. Dostupné z: doi:10.1007/s11684-020-0754-0.