

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Hodnocení poškození a reparace DNA u různých patologických stavů

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.

Hradec Králové 2012

Dana Tenorová

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Experimentální část byla prováděna v rámci výzkumného záměru MZO – 00179906 a SVV/2012/265 003.

V Hradci Králové dne

.....

Poděkování

Touto cestou chci poděkovat RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. a Doc. RNDr. Rudolfu Štětinovi, CSc. za odborné vedení, podporu a trpělivost při zpracování diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Petře Fikrové za vynikající spolupráci při praktické části.

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Oxidační stres	11
2.1.1 Volné radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku	12
2.2 Oxidační poškození biomolekul	15
2.2.1 Poškození lipidů	15
2.2.2 Poškození proteinů	18
2.2.3 Poškození DNA	18
2.3 Opravy DNA	22
2.3.1 Reparační procesy dle mechanismu reparace	23
2.4 Chronická obstrukční plicní nemoc	26
2.4.1 Patogeneze a etiologie	26
2.4.2 Epidemiologie	27
2.4.3 Symptomy a diagnostika	27
2.5 Comet assay	29
2.5.1 Charakteristika metody	29
2.5.2 Historie	30
2.5.3 Hodnocení	31
3 Zadání diplomové práce - cíl práce	34
4 Materiál a metody	35
4.1 Laboratorně připravované roztoky, pufry	35
4.2 Buněčné vzorky	36
4.3 Izolace lymfocytů	36

4.4	Comet assay	37
4.4.1	Mikroskopické hodnocení a obrazová analýza	37
4.4.2	Statistické hodnocení.....	38
5	Výsledky	39
5.1	Detekce poškození DNA	39
5.2	Alkalická verze Comet assay	47
5.3	Enzymatická modifikace Comet assay.....	48
6	Závěr	49
7	Diskuze	50
8	Použité zdroje	52
8.1	Internetové zdroje.....	58

Seznam použitých zkratek

8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosin
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AMK	aminokyselina
Apo A-1	apolipoprotein A-1
BER	base excision repair (bázová excizní reparační)
CA	comet assay (kometová analýza)
DM	diabetes mellitus
DSB	double strand breaks (dvouřetězcové zlomy)
Endo III	endonukleáza III
FEV1	forced expiratory volume in 1 second (usilovně vydechnutý objem za první sekundu)
FPG	formaminopyrimidin-DNA-glykosyláza
FVC	forced vital capacity (usilovná vitální kapacita)
GOLD	global initiative for chronic obstructive lung disease (globální iniciativa pro CHOPN)
HMPA	high melting point agarose (agaróza s vysokým bodem tání)
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
LMPA	low melting point agarose (agaróza s nízkým bodem tání)
MDA	malondialdehyd
mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid (mitochondriální deoxyribonukleová kyselina)
MMR	mismatch repair (reparační chybného párování)
nDNA	nuclear deoxyribonucleic acid (jaderná deoxyribonukleová kyselina)
NER	nucleotide excision repair (nukleotidová excizní reparační)
PBS	phosphate buffered saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
PUFA	polyunsaturated fatty acids (polynenasycené mastné kyseliny)
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
RONS	reactive oxygen nitrogen species (reaktivní formy kyslíku a dusíku)

ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SCGE	single cell gel electrophoresis (elektroforéza jednotlivých buněk)
SSB	single strand breaks (jednořetězcové zlomy)

Abstrakt

autor: Dana Tenorová

název: Hodnocení poškození a reparace DNA u různých patologických stavů

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) je závažné onemocnění charakterizované obstrukcí dýchacích cest, které je způsobeno chronickou bronchitidou nebo plicním emfyzémem. V důsledku těchto změn dochází v organismu k oxidačnímu stresu s následným poškozením různých biomolekul, které můžeme měřit pomocí širokého spektra metod.

Hlavním cílem naší práce bylo měření poškození DNA u pacientů s CHOPN a porovnání s poškozením u zdravé kontrolní skupiny. Pomocí elektroforetické metody comet assay jsme v naší práci analyzovali různá poškození DNA - jednořetězcové zlomy DNA (SSB), oxidované puriny a oxidované pirimidiny. Využívali jsme, jak klasickou alkalickou variantu comet assay, tak i její enzymovou modifikaci, kde jsme pracovali s endonukleázou III (Endo III) a formamidopyrimidin-DNA-glykosylázou III (FPG).

Provedené analýzy nám ukázaly signifikantně vyšší hodnoty poškození DNA u pacientů s CHOPN v porovnání s kontrolní skupinou, zejména při použití modifikované comet assay. Ověřili jsme tak možnost aplikace comet assay při analýze oxidačního poškození DNA u pacientů trpících CHOPN.

Klíčová slova: chronická obstrukční plicní nemoc, poškození DNA, oxidační poškození, comet assay

Abstract

author: Dana Tenorová

title: Evaluation of DNA damage and repair in various pathological stages

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

field of study: Specialist in Laboratory Methods

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a serious disease characterized by airflow obstruction that is caused by chronic bronchitis or pulmonary emphysema. As a result of these changes occurs in the organism the oxidative stress with subsequent damage to various biomolecules, which can be measured using a wide range of methods.

The primary aim of our study was the evaluation of DNA damage in patients with COPD and comparison to the damage found in the healthy control group. We used electrophoretic method comet assay and we analyzed various types of DNA damage - DNA single strand breaks (SSB), oxidized purines and oxidized pyrimidines. We used two forms of this method, i.e. a classical alkaline comet assay and its enzymatic modification, where we worked with endonuclease III (Endo III) and formamidopyrimidin-DNA-glycosylase-III (FPG).

Our results showed the significantly higher levels of DNA damage in patients with COPD compared with the control group, especially when using the modified comet assay. In conclusion, we have examined the possibility of comet assay application in the analysis of oxidative DNA damage in patients with COPD.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, DNA damage, oxidative DNA damage, comet assay

1 Úvod

Rostoucí spotřeba tabákových výrobků, nárůst automobilové dopravy, průmyslu a dalších civilizačních jevů charakteristických pro současnou dobu jsou příčinou, dnes už celosvětového problému, chronického zánětu plic. Prevalence CHOPN v ČR je okolo 8 % dospělého obyvatelstva. Ve skutečnosti ovšem může být toto procento až dvojnásobné, a to z důvodu pozvolného nástupu dušnosti, na kterou se pacienti postupně adaptují, tudíž dochází k poddiagnostikování CHOPN. Studie WHO předpokládá, že se CHOPN v roce 2020 zařadí na páté místo v žebříčku nejčastějších příčin úmrtí (Pauk, 2009; Internet 1).

Při CHOPN je organizmus značně zatížen oxidačním stresem, který je důsledkem oxidačního poškození biomolekul. Mezi nejčastější typy poškození patří oxidace polynenasycených mastných kyselin, oxidace nukleotidů v DNA, snížená metabolická přeměna proteinů, snížená syntéza specifických enzymů a receptorů atd. (Dostálek, 2007). V důsledku oxidačního poškození DNA dochází ke vzniku jednořetězcových zlomů a k chemické modifikaci purinových a pyrimidinových bází. K detekci těchto změn DNA lze použít metodu comet assay, kterou jsme využívali i v naší práci.

2 Teoretická část

2.1 Oxidační stres

V poslední době se studiem oxidantů a antioxidantů intenzivně zabývá řada vědních oborů – chemie radikálových reakcí, biochemie, biologie a medicína. Jejich nerovnováha je označována jako oxidační stres, který může vést k poškození organismu (Zima et al., 2007).

Oxidační stres vzniká ve zdravém aerobním organismu narušením rovnováhy mezi tvořícími se reaktivními kyslíkovými radikály (ROS – reactive oxygen species), reaktivními dusíkovými radikály (RNS – reactive nitrogen species) a obranným antioxidantním systémem. Zvýšené množství reaktivních částic a nedostatečnost antioxidantních procesů způsobuje neschopnost organismu je zneškodňovat a eliminovat. Tento stav může být způsoben tím, že v organismu dochází k poruše tvorby a distribuce antioxidantů, případně k nadbytečnému příjmu ROS z vnějšího prostředí nebo je organismus vystaven nějakému typu stresu (zátěžovému faktoru). Nadbytek ROS/RNS – RONS může způsobit poškození buněčných struktur a to lipidů, proteinů, DNA a také může negativně ovlivnit správnou funkci kyseliny močové. Z charakteru těchto typů poškození vyplývá, že oxidační stres způsobuje vznik a rozvoj lidských onemocnění a stejně tak přispívá k procesům stárnutí buněk (Halliwell a Gutteridge, 1999).

Působení RONS hraje významnou roli v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, jako je ateroskleróza, ischemie a hypertenze. Dále pak u zhoubných nádorů, zánětlivých onemocnění jako je syndrom akutní respirační tísně, chronická obstrukční plicní nemoc, astma, zánětlivé střevní onemocnění, kožní a oční záněty, artritida, u metabolických onemocnění jako je diabetes mellitus (DM), u nemocí centrálního nervového systému jako je amyotrofická laterální skleróza (ALS), Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a iktus.

Na straně druhé se tvorba volných radikálů s úspěchem využívá u některých cytostatik, antivirových a antibakteriálních přípravků. V lidském organismu se však RONS účastní také různých fyziologických regulací, např. účast v procesech přenosu signálu a v regulaci imunitní odpovědi (Dröge, 2002).

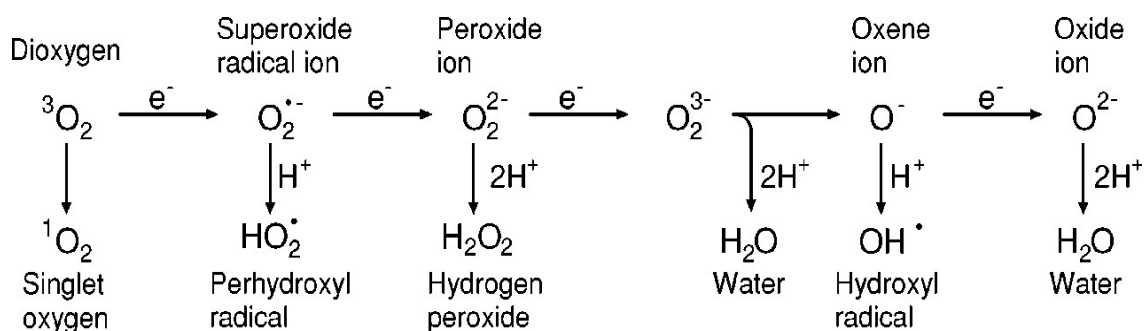
2.1.1 Volné radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku

Radikál je jakákoliv molekula, atom nebo více nepárových elektronů. Radikály mohou vznikat buď homolytickým štěpením kovalentní vazby, kdy každý fragment si ponechá jeden elektron (např. štěpením vazby C-H v methanu CH_4 vznikne methylový radikál $\text{CH}_3\cdot$ a radikál vodíku $\text{H}\cdot$), nebo ztrátou či adicí jednoho elektronu. Nepárový elektron způsobuje jejich vysokou reaktivitu, a tím i nestabilitu těchto látek. Kyslíkové radikály nejsou jen škodlivé toxické látky – je stále více zřejmé, že v organismu mají i řadu fyziologických funkcí. Vznikají při uvolňování energie v mitochondriích, při hydroxylačních reakcích v mikrozomálním oxygenázovém systému a při fagocytóze v leukocytech a makrofázích (Zima et al., 2007).

Pojmem RONS se označují různé částice obsahující atom kyslíku či dusíku vystupující v redoxních reakcích především v živých organizmech. Ne všechny ROS patří mezi radikály, např. peroxid vodíku nebo peroxyinitrit definici radikálu nesplňují, proto ROS představuje širší pojem (Apel a Hirt, 2004). Přehled nejdůležitějších reaktivních forem kyslíku a dusíku je shrnut v Tab. 1. Mechanismus vzniku ROS je znázorněn na Obr. 1.

Tab. 1. Volné radikály a RONS (převzato z Dršata et al., 2009)

Vonné radikály		Látky, které nejsou volné radikály	
A. Reaktivní formy kyslíku			
Alkoxylový radikál	RO•	Chlornan	ClO ⁻
Hydroxylový radikál	HO•	Kyselina chlorná	HOCl
Hydroperoxylový radikál	HO ₂ •	Ozón	O ₃
Peroxylový radikál	ROO•	Peroxid vodíku	H ₂ O ₂
Superoxid	O ₂ • ⁻	Singletový kyslík	¹ O ₂
B. Reaktivní formy dusíku			
Oxid dusnatý	NO•	Alkylperoxynitrit	ROONO ⁻
Oxid dusičitý	NO ₂ •	Kyselina dusitá	HNO ₂
		Nitrosyl	NO ⁺
		Peroxynitrit	OONO ⁻



Obr. 1. Mechanismus vzniku ROS (převzato z Apel a Hirt, 2004)

Velikost reaktivity volných radikálů může být odhadnuta z extrémně krátkého poločasu rozpadu jednotlivých radikálů (Tab. 2). Tato reaktivita stoupá s nestabilní elektronovou konfigurací (Lízalová, 2010).

Tab. 2. Poločasy rozpadu volných radikálů v biologických systémech (převzato z Lízalová, 2010)

Druh	Symbol	Poločas rozpadu při 37 °C [s]
Superoxid	O ₂ • -	1 x 10 ⁻⁶
Hydroxylový radikál	OH•	1 x 10 ⁻⁹
Alkoxylový radikál	RO•	1 x 10 ⁻⁶
Peroxylový radikál	ROO•	1 x 10 ⁻²
Singletový radikál	¹ O ₂	1 x 10 ⁻⁶
Molekulární kyslík	O ₂	> 10 ²

Důležitou úlohu v radikálových reakcích mají i přechodné kovy, které mohou být donory i akceptory elektronu, a tím i účinnými iniciátory vzniku volných radikálů. V lidském organismu se uplatňují především ionty železa a mědi (Zima et al., 2007).

2.2 Oxidační poškození biomolekul

Působení RONS v lidském organismu může poškozovat strukturu lipidů, přičemž dochází ke změnám ve složení biologických membrán a k ovlivnění funkce struktur s nimi spojených (funkce enzymů, iontových kanálů, přenosu signálu aj.). RONS poškozují také strukturu proteinů a DNA. Jsou poškozovány jak purinové a pyrimidinové báze, tak i deoxyribóza. Oxidace deoxyribózy způsobuje destrukci a přerušení řetězce DNA. Modifikace DNA vede k chybnému párování bází při replikaci DNA a ke změnám genetické informace, často s fatálními následky pro organismus (Valko et al., 2007).

2.2.1 Poškození lipidů

Hydroxylový radikál, hydroperoxidový radikál a superoxid běžně zahajují proces autokatalytické lipoperoxidace. Fosfolipidové membrány, konkrétně dvojné vazby nenasycených mastných kyselin, jsou nejčastějším cílem lipoperoxidace. V důsledku těchto změn dochází ke změně permeability poškozených membrán. (Ledvina et al., 2004).

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou mnohem méně odolné na peroxidaci než mononenasycené nebo nasycené mastné kyseliny. Tudiž podíl PUFA v membráně může ovlivnit náchylnost k oxidativnímu poškození. Navíc peroxidace lipidů spouští komplexní řetězcovou reakci zahrnující řadu reaktivních produktů, které mohou způsobit poškození bílkovin a DNA (Monaghan et al., 2009). Mezi tyto produkty patří hlavně nenasycené reaktivní aldehydy, jako je malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 2-propenal (akrolein) a izoprostan. Tyto produkty mohou být měřeny v plazmě i v moči jako nepřímý index oxidačního poškození. Ve srovnání s volnými radikály jsou aldehydy poměrně stabilní a mohou se šířit jak v rámci buňky, tak i mimo ni a působit na cíle daleko od místa vzniku (Dalle-Donne et al., 2006).

2.2.1.1 Malondialdehyd

Zvýšené množství malondialdehydu produkovaného jako důsledek tkáňového poškození může reagovat s DNA (s adeninem je označován zkratkou M1A, s cytozinem M1C, a s guaninem M1G), případně s volnými aminoskupinami proteinů (zejména s lyzinem) za vzniku malondialdehyd modifikovaných proteinových sloučenin. Tyto sloučeniny vykazují antigenní schopnosti a protilátky proti nim jsou přítomny v organismu a mohou podněcovat aterosklerózu a infarkt myokardu (Uchida, 2003).

Zvýšená hladina malondialdehydu, jako produktu oxidativního poškození, může být diagnostikována u Alzheimerovy choroby, ALS, astmatu, aterosklerózy, DM, leishmaniózy a preeklampsie (Dostálek, 2007).

2.2.1.2 4-hydroxy-2-nonenal

HNE je hlavní toxický aldehyd generovaný volnými radikály atakující ω -6 polynenasycené mastné kyseliny. Za fyziologických podmínek je tvořen v bazální koncentraci, jeho množství však výrazně stoupá za patologických stavů spojených s lipoperoxidací. HNE má vysokou biologickou aktivitu, tudíž je silně mutagení, cytotoxický a genotoxický, inhibuje syntézu proteinů a DNA, inaktivuje řadu enzymů, stimuluje fosfolipázu C, redukuje mezibuněčnou komunikaci prostřednictvím gap-junctions, stimuluje chemotaxi neutrofilů a moduluje agregaci trombocytů (Dalle-Donne et al., 2006).

Zvýšená koncentrace se nachází u Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, aterosklerózy, CHOPN a u nemocí kardiovaskulárního systému (Dalle-Donne et al., 2006).

2.2.1.3 Akrolein

Vzniká při různých environmentálních procesech, nejčastějším zdrojem je však cigaretový kouř. Akrolein reaguje s lyzinem apolipoproteinu A-1 (Apo A-1), což velmi narušuje jeho fyziologickou funkci odstraňování cholesterolu z arteriální stěny. Akrolein hraje tedy zásadní roli při vzniku aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění (Dalle-Donne et al., 2006).

2.2.1.4 Izoprostany

Izoprostany jsou blízké prostaglandinům (v angličtině běžně užíván termín prostaglandin-like substances). *In vivo* jsou produkovány neenzymatickými reakcemi nezávislými na cyklooxygenáze, neenzymatickou oxidací kyseliny arachidonové volnými radikály (Klaunig a Kamendulis, 2004).

Zvýšená hladina izoprostanů, jako biomarkeru oxidativního poškození, může být stanovena u Alzheimerovy choroby, astmatu, aterosklerózy, DM, hypercholesterolémie, chronického selhání ledvin, CHOPN, jaterní cirhózy, obezity, onemocnění kardiovaskulárního systému, osteoporózy a plicní hypertenze (Dostálek, 2007).

2.2.2 Poškození proteinů

Z důvodů velké variability proteinů a mechanismů jejich poškozování, je oxidační poškození proteinů v klinické praxi stanovováno mnohem méně než lipoperoxidace (Zima et al., 2007). Nejčastěji jsou bílkoviny poškozovány hydroxylovým radikálem, a to tak, že na postranních řetězcích alifatických aminokyselin (AMK) vznikají hydroxyderiváty. Hydroxylace AMK vyvolává fyziologické změny v makrostruktuře proteinů, přičemž tyto změny lze rozdělit do tří kategorií:

- fragmentace
- agregace
- senzitivita k proteolytickému štěpení (Esterbauer et al., 1982).

Následkem těchto dějů je porucha transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu a změna celkové aktivity proteinů (Rice-Evans, 1988).

2.2.3 Poškození DNA

Reaktivní formy kyslíku vznikající v průběhu aerobního metabolismu jsou hlavní příčinou genetického poškození a v případě, že není opraveno, může docházet k různým mutacím a k potencionálně vyššímu výskytu rakoviny a předčasnému stárnutí (Singh et al., 2011). Během oxidativního poškození DNA dochází k modifikaci bází a cukerných složek, ke vzniku kovalentních křížových vazeb a k jednořetězcovým (SSB) nebo dvouřetězcovým (DSB) zlomům. Poškození DNA má za následek substituci bází nebo delecí či fragmentaci vlákna (Valavanidis et al., 2009).

Oxidativní poškození DNA může být způsobeno endogenními či exogenními zdroji. Mezi endogenní vlivy se řadí nestabilita DNA (např. depurinace), spontánní chyby v DNA během replikace a oprav, RONS a produkty peroxidace lipidů. Exogenní zdroje přispívající k poškození jsou např. ionizující a UV záření, řada genotoxických

chemikálií, produkty pyrolýzy v potravě, nečistoty v ovzduší a ve vodě (Valavanidis et al., 2009).

Rozsah endogenního poškození v důsledku ROS může být obrovský, jelikož každá lidská buňka metabolizuje přibližně 10^{12} molekul kyslíku za den (1 % z kyslíkového metabolismu), což přispívá k tvorbě ROS. Bylo odhadnuto, že za den je v lidské buňce poškozeno přibližně 20 000 nukleotidů v DNA. Vyšší úroveň oxidativního poškození byla prokázána v případech deficitu stopových prvků v organismu (Valavanidis et al., 2009).

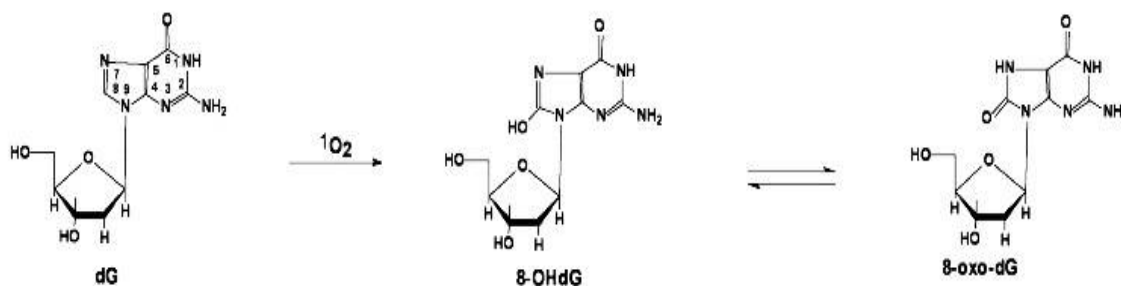
Radikály mohou poškozovat DNA buď přímo, nebo nepřímo. Účinkem přímého působení vznikají SSB, chemické modifikace purinových, pyrimidinových bází a cukerných složek. Příkladem nepřímého účinku je aktivace Ca^{2+} - dependentních endonukleáz, které vedou k fragmentaci DNA. Aktivace je zabezpečena otevřením napětově řízených Ca^{2+} kanálů prostřednictvím poklesu membránového potenciálu. Kromě samotného vlákna nukleové kyseliny může dojít také k poškození jaderných bílkovin, které mají zejména strukturní funkci. Při reakci vznikají proteinové radikály, které mohou následně reagovat s bázemi nukleové kyseliny za vzniku zkřížených vazeb DNA-protein (Halliwell, 2007).

Důsledkem poškození DNA je vznik mutací (např. $\text{AT} \leftrightarrow \text{GC}$ tranzice, $\text{GC} \leftrightarrow \text{TA}$ transverze), následné translační chyby a inhibice proteosyntézy. Křížové vazby brání rozvinutí chromatinu, replikaci a transkripci (Halliwell, 2007).

Během oxidačního poškození je přednostně atakován guanin, jelikož má nejnižší oxidační potenciál ze všech čtyř bází. Výsledkem je, že guanin obsahuje na elektrony bohatou purinovou strukturu, která mu umožňuje s radikály snadno reagovat (Kim et al., 2003).

Za nejdůležitější modifikace DNA, mající značný mutagenní efekt v bakteriálních a savčích buňkách, je považován 8-hydroxy-2-deoxyguanosin (8-OHdG) a jeho tautomerní forma 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosin (8-oxodG) (Obr. 2). Nicméně další studie dokazují, že i jiné oxidační poškození může mít stejně důležitý vliv jako 8-OHdG, např. léze DNA. Tyto bývají odstraňovány buněčnými enzymy,

keré následnými enzymatickými procesy obnovují původní nukleotidovou sekvenci. Nicméně když dojde k replikaci DNA před opravou, DNA polymeráza včlení 2'-deoxyribonukleotid 5'-trifosfát (dNTP) naproti lézi. Pokud je oprava DNA zcela zablokována, léze může být smrtící. Vysoce mutagenní léze částečně blokují syntézu DNA a často dochází k nesprávnému párování bází (Croteau a Bohr, 1997).



Obr. 2. Tautomerní formy 8-OHdG a 8-oxodG (Převzato a upraveno z Internet 2)

Další důležitou formou poškození DNA způsobenou RONS je 8-hydroxyadenin, který představuje izomer 2-OH-adeninu. Kromě toho se 8-hydroxyadenin nachází rovněž u jaterní neoplázie a v lidské rakovinné tkáni. Během oxidačního stresu vznikají i formamidopyrimidinové léze, při kterých dochází k otevření imidazolového kruhu purinů. Působením NO vzniká deaminovaný produkt guaninu, xantin a deaminovaný produkt adeninu, hypoxanthin. Při jiných poškozeních DNA vzniká např. 2-hydroxyadeninu, 2-aminimidazol, 5-formyluracil (Kamiya et al., 2002).

Studie naznačují, že v mitochondriální DNA (mtDNA) se mohou akumulovat větší oxidační poškození DNA, než v jaderné DNA (nDNA). To je připisováno lokalizaci mtDNA v blízkosti vnitřní mitochondriální membrány, stejně jako absenci histonů a snížené aktivitě DNA oprav (Maynard et al., 2009; Gutman a Niyogi, 2009). Tento poznatek se stal jedním ze základních kamenů mitochondriální teorie stárnutí (Croteau a Bohr, 1997).

2.2.3.1 Mechanismus oxidačního poškození purinů

RONS, nejčastěji hydroxylový radikál, přispívají v pozicích C4, C5 a C8 purinů ke vzniku OH radikálových aduktů. V pozicích C4-OH a C5-OH purinů dále dochází k dehydrataci a k přeměně na oxidační purinové radikály, které mohou být redukovány a protonizovány za obnovení purinů. C4-OH• radikál má především oxidační vlastnosti, naproti tomu C5-OH• a C8-OH• mají vlastnosti redukční. Na druhou stranu i jiné mezomerní struktury těchto radikálů mohou být oxidační nebo redukční, tento efekt se nazývá ambivalence (Cooke et al., 2003; Halliwell, 2007).

C8-OH• radikálový adukt purinů může být dále oxidován různými oxidanty včetně kyslíku. Jednoelektronová oxidace vede ke vzniku 8-hydroxypurinu (7,8-dihydro-8-oxopurinu) v DNA. Oxidace C8-OH• radikálových aduktů je v kompetici s bimolekulárním otevřením imidazolového kruhu rozštěpením C8-N9 vazby. Jednoelektronová redukce s otevřením radikálového kruhu vede ke vzniku 2,6 – diamino-4-hydroxy-5-formamidopirimidinu z guaninu a 4,6-diamino-5-formamidopirimidinu z adeninu. Jednoelektronová redukce bez otevření kruhu může mít za následek vznik 7-hydro-8-hydroxypurinu, který může být dále převeden na formamidopirimidin. 8-hydroxypurin a formamidopirimidin vznikají v organismu jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti kyslíku, přičemž 8-hydroxypurin kyslík preferuje (Cooke et al., 2003; Halliwell, 2007).

2.2.3.2 Mechanismus oxidačního poškození pirimidinů

Hydroxylový radikál OH• reaguje s DNA adicí dvojných vazeb bází a abstrakcí H atomů metylových skupin thyminu a každé C – H vazby 2' – deoxyribózy. Adicí dvojných vazeb C5-C6 pirimidinu dochází ke vzniku C5-OH• a C6-OH• radikálů a abstrakcí H atomu thyminu dochází ke vzniku radikálu alylu. Radikálové adukty se velmi liší z hlediska jejich redoxních vlastností, u C5-OH• radikálu jsou redukční, u C6-OH• však oxidační (Cooke et al., 2003).

Pyrimidinové radikály vznikají mnoha různými mechanismy. Radikály se oxidují či redukují v závislosti na jejich redoxním potenciálu, redoxním prostředí a

reaktantech. Vše dále velmi závisí na přítomnosti či nepřítomnosti kyslíku a dalších podmínkách. V nepřítomnosti kyslíku je oxidace C5-OH• radikálu následována adicí OH⁻ (nebo adicí H₂O₂ s následnou deproteinací), což vede ke vzniku glykolu cytosinu a thyminu. K dalším produktům ataku hydroxylového radikálu na thymin patří 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5-formyluracil a 5-(hydroxymethyl)uracil. Nejčastější produkty reakcí s cytosinem jsou cytosinglykol a 5,6-dihydroxycytosin (Cooke et al., 2003).

2.3 Opravy DNA

Genom eukaryotických buněk je pod neustálým útokem různých škodlivých látek (endogenních a exogenních), což vede k rozvoji mnoha typů poškození DNA a k jejím následným opravám (Tab. 3). Poškození DNA, které mohou nastat, jsou SSB, DSB, chybná chemická modifikace bází a cukrů a inter- nebo intrařetězcové křížové vazby. Aby se předešlo škodlivým důsledkům akumulace poškození, vyvinuli se různé cesty oprav DNA, přičemž se každá sdružila s určitými druhy lézí. Pokud se poškození neopraví, může se buňka uchýlit k indukci apoptózy a nekrózy, tudíž nedochází k přenosu mutací na potomstvo buňky a nedochází ke vzniku onemocnění (zejména rakoviny). Ve skutečnosti, mnoho agens poškozujících DNA je užíváno k léčbě rakoviny prostřednictvím navození apoptózy nádorových buněk (Maynard et al., 2009).

Podle charakteru nejčastějšího poškození rozlišujeme dva typy reparačních mechanismů, přičemž uvedené procesy se mohou navzájem kombinovat a doplňovat:

- Opravy chyb v párování bází
- Opravy chemicky poškozených bází, resp. bází s odlišnou chemickou strukturou.

Buněčná odpověď na poškození DNA je v dělící se buňce koordinována, konkrétně v kontrolních bodech buněčného cyklu, kde může být progresse buněčného cyklu (proliferace) zastavena. Mezi převládající opravné cesty v savčích buňkách patří zejména bázová excizní reparace (base excision repair, BER), nukleotidová excizní reparace (nucleotide excision repair, NER), reparace chybného párování (mismatch repair, MMR), ale i opravy DSB. Mnohá poškození DNA opravována pomocí BER jsou produkty útoku ROS (Maynard et al., 2009; Gutman a Niyogi, 2009).

Tab. 3. Typy poškození DNA a jejich opravy (Převzato a upraveno z Maynard et al., 2009).

Zdroj poškození DNA	Typ léze	Typ opravy
ROS, infračervené záření, alkylační činidla	Změny bází, abazické místa, SSB	BER
UV světlo, cisplatina, polyaromatické uhlovodíky	Intrařetězcové křížové vazby, poškozené oligonukleotidy	NER
Infračervené záření, alkylační látky, cisplatina	Interřetězcové křížové vazby, DSB	DSB (rekombinační oprava, non-homologní rekombinace konců)
Chybné replikace	Chybné párování, inserce a delece nukleotidů	MMR

2.3.1 Reparační procesy dle mechanismu reparace

2.3.1.1 Fotoreaktivace

Působením UV záření dochází ke vzniku kovalentních křížových vazeb mezi sousedními bázemi v DNA. Nečastěji jsou produkovány thyminové dimery (tj. kovalentně propojené částice thyminu). Enzym DNA-fotolyáza, která se aktivuje za pomoci světla o vlnové délce 340-400 nm, štěpí kovalentní vazby v dimerech a obnovuje tak původní strukturu nukleotidu. Tento proces se však zřejmě v lidských buňkách neuplatňuje, neboť DNA-fotolyáza byla zjištěna pouze u prokaryot a nižších eukaryot (např. u kvasinek) (Kočárek et al., 2008).

2.3.1.2 Excizní reparace

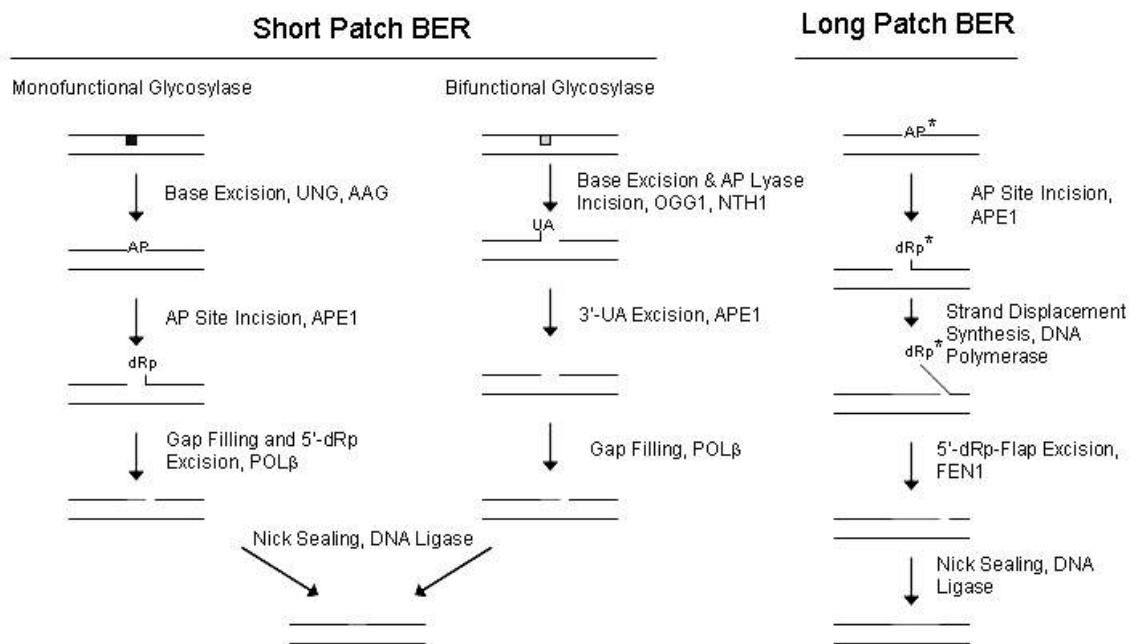
Při excizní reparaci se k eliminaci poškozeného úseku DNA využívá složitý komplex enzymů. Ty zabezpečují vyštěpení chybně spárovaných bází (base mismatches) nebo chemicky modifikovaných bází (včetně thyminových dimerů). Úkolem enzymového aparátu je příslušnou mutaci nejen vyhledat, ale také vyštěpit

poškozenou část řetězce a nahradit ji nově vytvořeným úsekem s původní sekvencí nukleotidů (Kočárek et al., 2008).

Hlavní cestou pro opravu základních oxidačních poškození, jako 8-oxoG a formamidopyrimidin (4,6-diamino-5-formamidopyrimidin, FapyG) je BER (Christmann et al., 2003).

BER může probíhat dvěma drahami (Obr. 3):

1. „Short-patch“ dráha – jednoduchý způsob opravy, při kterém je vyměněn pouze 1 nukleotid, převažuje v savčích buňkách (Klungland a Lindahl, 1997).
2. „Long-patch“ dráha – složitější způsob opravy, zahrnuje více aktivit a kroků a dochází k výměně 2 – 13 nukleotidů (Frosina et al., 1996).



Obr. 3. Mechanismus BER (převzato z Internet 4)

Zatímco BER odstraňuje jednu poškozenou bázi nebo pouze krátký úsek nukleotidů, NER odstraní delší úseky nukleotidů (tzv. oligonukleotidy), které obsahují poškozené báze. Tímto typem reparace jsou velmi složitým procesem opravovány v první řadě cyklické pyrimidinové dimery a to za pomoci minimálně 25 proteinů (Christmann et al., 2003).

Za odstranění chybných bází, které vznikají spontánní a indukovanou deaminací, oxidací, metylací a chybnou replikací je zodpovědný MMR systém (Christmann et al., 2003). MMR opravuje chyby vzniklé při replikaci DNA a během, nebo po rekombinaci DNA (Meyers et al., 2004).

2.3.1.3 Rekombinační oprava

Patří prozatím mezi nejméně prozkoumané reparační mechanizmy. Podstatou je cílená rekombinační výměna poškozených a nepoškozených úseků mezi dvěma molekulami DNA. Oprava připomíná „crossing-over“, jejímž výsledkem je jedna zcela opravená molekula DNA, zatímco ve druhé nefunkční molekule jsou kumulovány všechny mutované oblasti (Kočárek et al., 2008).

2.4 Chronická obstrukční plicní nemoc

Globální iniciace pro CHOPN (GOLD – Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) definuje toto onemocnění následovně: *CHOPN je prevenabilní a léčitelné onemocnění charakterizované obstrukcí dýchacích cest, kdy nedochází k úplné reverzi vzduchu. Obstrukce je obvykle progredující a je spojená s otokem a abnormální zánětlivou odpovědí plic na škodlivé partikule či plyny, vznikající především během kouření cigaret. Exacerbace a doprovodné onemocnění přispívají k celkové závažnosti onemocnění u konkrétního pacienta (Internet 3).*

2.4.1 Patogeneze a etiologie

Stále více důkazů poukazuje na to, že CHOPN je komplexní onemocnění, které nesouvisí pouze se zmiňovanou obstrukcí, ale v systémovém důsledku má též dopad na srdeční funkce a výměnu plynů (Barnes a Celli, 2009; Celli et al., 2004). Zánět způsobuje přímou destrukci plicní tkáně a zároveň porušuje mechanismy používané k reparaci poškozené tkáně. Následkem není jen zničení plicní tkáně (emfyzém), ale také hypersekrece hlenu, zúžení dýchacích cest a fibróza. Na patogenezi CHOPN se podílí široká škála zánětlivých buněk a mediátorů, a to především neutrofilů, makrofágů, CD-8 T-lymfocyty, leukotrien B4, interleukin 8, tumor nekrotizující faktor (Scanlon et al., 2004). Systémový zánět rovněž může zahájit nebo zhoršit průběh přidružené choroby, jako je ischemická choroba srdeční, srdeční selhání, osteoporóza, normocytární anémie, karcinom plic, deprese a DM, a současně přítomnost choroby může mít vliv na rozvinutí CHOPN (Barnes a Celli, 2009; Celli et al., 2004).

Na vzniku CHOPN se podílí kombinace genetických faktorů, přičemž nejčastější příčinou je hereditární deficiencie alfa 1-antitrypsinu, a expozice rizikovým faktorům, přičemž nejhlavnější je cigaretový kouř (Scanlon et al., 2004; Dítě et al., 2007).

2.4.2 Epidemiologie

Celosvětová prevalence se pohybuje kolem 600 milionů osob a je velmi pravděpodobné, že stále poroste, především vlivem tabákové epidemiologie. V současnosti je CHOPN hlavní příčinou chronické morbidity a mortality na světě, kterou trpí asi 4 - 10% světové populace (Dítě et al., 2007).

2.4.3 Symptomy a diagnostika

Onemocnění nejčastěji vzniká mezi 40. – 60. rokem. Hlavním příznakem je kašel s vykašláváním sputa, který přetrvává mnoho let. Sputum je většinou hlenovité konzistence, při exacerbaci je hnisavé. Exacerbace jsou většinou vyvolány infekcí a to především v zimním a jarním období. Mezi další příznaky patří dušnost, která je buď námahová nebo náhlá, provázena pískotem na hrudi. Postupně se dušnost prohlubuje a kašel i expektorace se zhoršují. Přidružují se příznaky cor pulmonale. Příčinou smrti bývá kardiopulmonální selhání (Bureš et al., 2003).

Diagnóza CHOPN je obvykle stanovena až v pozdějších stádiích nemoci, jelikož příznaky se objevují pozvolna a pacient se na ně postupně adaptuje. Diagnózu CHOPN lze usuzovat při splnění nejméně tří z následujících bodů:

- Věk starší 40 let
- Kouření (více jak 10 krabiček za rok)
- Příznaky a abnormální plicní funkce kompatibilní s CHOPN
- Chronické srdeční selhání
- Metabolický syndrom
- Zvýšená hladina C-reaktivního proteinu (CRP) (Fabbri et al., 2007).

Diagnóza musí být potvrzena spirometrickým vyšetřením, které je velmi důležité z hlediska klasifikace fáze nemoci. Hodnotí se FVC (Forced Vital Capacity) – usilovná vitální kapacita, FEV1 (Forced Expiratory Volume in 1 second) – usilovně

vydechnutý objem za první sekundu, a důležitý parametr – poměr FEV1/FVC (u CHOPN pod 70 % náležitých hodnot) (Perná a El Sammanová, 2011).

Na základě provedených vyšetření se CHOPN rozděluje do čtyř stádií dle stupně obstrukce dýchacích cest (Tab. 4).

Tab. 4. Stádia CHOPN (převzato z Internet 5)

Stádium	Charakteristika
0 - rizikové	<ul style="list-style-type: none"> • Normální spirometrie • Chronické příznaky
I - lehké	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 / FVC < 70 % • FEV1 \geq 80 % náležitých hodnot • Jsou nebo nejsou chronické příznaky (kašel, sputum)
II - střední	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 / FVC < 70 % • 50 % NH \leq FEV1 < 80 % náležitých hodnot • Jsou nebo nejsou chronické příznaky (kašel, sputum, dušnost)
III - těžké	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 / FVC < 70 % • 30 % náležitých hodnot \leq FEV1 < 50 % náležitých hodnot • Jsou nebo nejsou chronické příznaky (kašel, sputum, dušnost)
IV – velmi těžké	<ul style="list-style-type: none"> • FEV1 / FVC < 70 % • FEV1 < 30 % náležitých hodnot nebo FEV1 < 50 % náležitých hodnot • Respirační selhání nebo klinické známky cor pulmonale

2.5 Comet assay

2.5.1 Charakteristika metody

Comet assay (kometová analýza, CA) je poměrně jednoduchá, senzitivní (hranice citlivosti je přibližně 50 zlomů na diploidní savčí buňku) a dobře ověřená metoda pro měření zlomů DNA v jednotlivých buňkách. Tento test je nyní široce přijímán jako standardní metoda posuzující poškození DNA, využívána v širokém spektru aplikací, včetně lidského biomonitoringu, genotoxikologie, ekologického monitorování a jako nástroj zkoumání poškození a oprav DNA v reakci na různé poškozující látky (Fikrová et al., 2011).

Název testu vychází z podobnosti obrazu získaného touto metodou s obrazem astronomického objektu komety (Liao et al., 2009). Comet assay, nebo-li gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE - single cell gel electrophoresis) je mikroelektroforetická metoda analyzující poškození DNA přímo v jednotlivých buňkách (Dvořák a Matejovičová, 2008). Přítomnost zlomů v DNA způsobuje místní relaxaci v superhelixu. Když projde gelem malý elektrický náboj, relaxované struktury DNA smyček putují směrem k anodě a vytvářejí tzv. ocas komety. Hlavu komety představuje nepoškozená DNA, která pro svoji velikost gelem putovat nemůže (Wong et al., 2005; Liao et al., 2009).

Hlavní výhody tohoto testu by se tedy daly shrnout do následujících čtyř bodů:

1. Údaje na úrovni jednotlivých buněk, které umožňují robustní statistickou analýzu.
2. Potřeba malého množství buněk na vzorek (< 10 000).
3. Senzitivita detekce poškozené DNA.
4. Použití jakýchkoliv eukaryotických buněk, jak *in vivo*, tak *in vitro* (Kumaravel et al., 2007).

Omezením metody je požadavek na životaschopnost buněk. Pokud vzorek obsahuje převážně nekrotické nebo apoptické buňky, není možné získat přesné informace o přítomnosti lézí a zlomů. Je tedy nezbytné minimalizovat jakékoliv poškození buněk vzniklé během zpracování testu (Olive a Banáth, 2006).

CA se může v podstatě aplikovat na všechny eukaryotické buňky, nicméně v klinické praxi jsou nejčastěji používanými buňkami bílé krvinky a to hlavně lymfocyty, ačkoliv lze použít i neutrofilny. Dále již byly použity, i když ne vždy úspěšně, spermatocyty, fibroblasty, epitelové buňky z orální sliznice, žaludku, slzných kanálek, nosu, močovodů (Wong et al., 2005).

2.5.2 Historie

Své kořeny má již v 70-tých letech 19. století, kdy Cook a kol. zkoumali jaderné struktury po lýze buněk v přítomnosti 2 M NaCl a neionogenních detergentů. Zjistili, že dochází k tvorbě nukleotidů (fosforylovaných nukleosidů), složených ze smyček o velikosti 50-100 Kb, napojených na proteinovou síť. Po přidání ethidium bromidu docházelo k vizualizaci relaxované struktury DNA expandující z jádra za vzniku tzv. „haló“. Tento efekt byl způsoben interkalací ethidium bromidu mezi páry bází relaxované DNA a jeho následnou fluorescencí. Stejný výsledek byl pozorován při působení ionizujícího záření na buňky za vzniku jednořetězcových zlomů (Cook et al., 1976).

Vlastní comet assay byla poprvé představena dvěma švédskými vědci, Ostlingem a Johansonem, v roce 1984. Jednalo se o neutrální verzi CA, která používala velmi sofistikovanou metodu, kdy byly buňky lyzovány v neutrálním roztoku a následně byla provedena elektroforéza. DNA byla obarvena fluorescenčním barvivem (akridovou oranží), které vyzařovalo zelenou emisi měřitelnou fotometrem. Tato neutrální verze však umožňovala pouze detekci dvouřetězcových zlomů DNA (Ostling a Johanson, 1984).

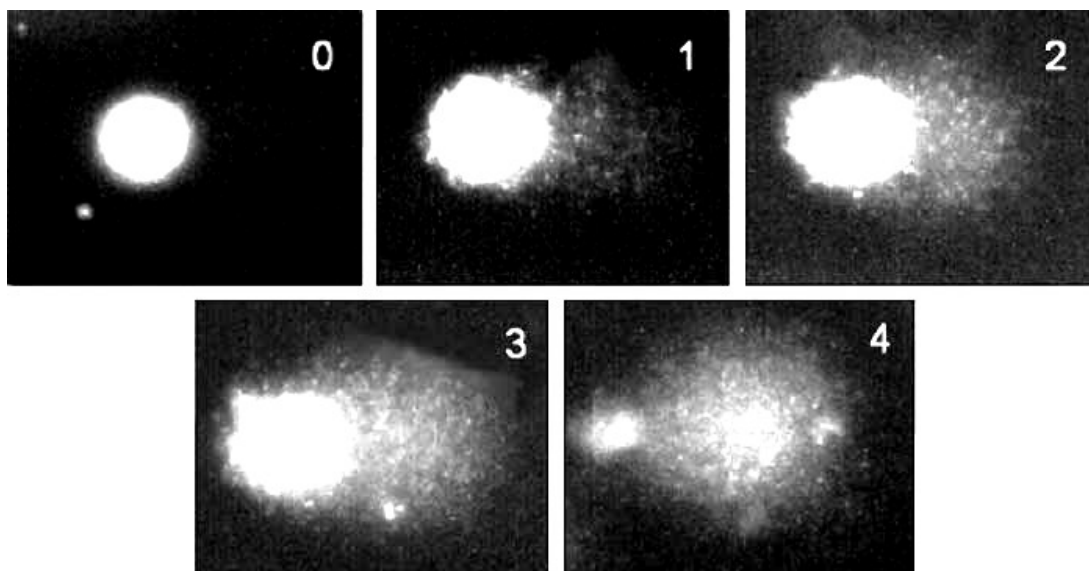
V roce 1988 Singh a kol. vyvinuli alkalickou formu CA, ve které se využívalo délky ocasu ke kvantifikaci míry poškození DNA. Pomocí této verze CA bylo možno

sledovat jak DSB, tak i SSB a to za pomoci poměru zelené fluorescence (DSB) a červené fluorescence (SSB) (Singh et al., 1988).

2.5.3 Hodnocení

Komety jsou vizualizované fluorescenčním mikroskopem a množství DNA v ocasu vzhledem k hlavě je úměrné k množství zlomů. Je třeba se vyhnout hodnocení komet na okraji ploch vzduchových bublin, protože tyto oblasti často zahrnují abnormálně vysokou míru poškození (Wong et al., 2005; Liao et al., 2009).

Collins a kol. v roce 1995 publikoval vizuálně hodnotící metodu (Obr. 4), která klasifikuje komety do 5 stupňů (0-4). Je-li například skórováno 100 komet, je každé kometě přiřazena hodnota 0-4 dle stupně poškození, čímž se výsledné skóre pohybuje v rozmezí 0-400 (libovolné jednotky) na gel (Collins et al., 1995). Toto vizuální hodnocení velmi dobře koreluje s obrazovým měřením pomocí počítačového softwaru, tudíž je stále velmi populární (Kumaravel et al., 2007).



Obr. 4. Vizuální klasifikace CA dle Collinse (převzato z Kumaravel et al., 2007)

Další populární metoda pro vyhodnocení komet byla představena Olivem a kol. a označuje se jako „tail moment“. Pojem „tail moment“ (výpočet: míra délky ocasu x množství DNA v ocasu) je definován jako míra migrace DNA (Olivem et al., 2006). „Tail moment“ se ale pro hodnocení příliš nedoporučuje, protože nemá standardní jednotky a neposkytuje informace o druhu a úrovni poškození v buňce (Liao et al., 2009; Wong et al., 2005).

V hodnocení komet se používá tedy mnoha parametrů. Mezi nejpoužívanější patří však dva: délka ocasu (tail length) a procentuální zastoupení DNA v ocasu (tail DNA %), případně v hlavě (head DNA %). Doporučeným parametrem k hodnocení je procentuální zastoupení DNA v ocasu, jenž lze pokládat za dostatečně robustní a nejvhodnější parametr při inter-laboratorním srovnávání výsledků (Dvořák a Matejovičová, 2008).

V současné době se používá různých druhů komerčních softwarů, které slouží k měření parametrů komet na základě analýzy obrazu. Ačkoliv se různé druhy mohou navzájem mírně lišit, způsob jejich výpočtu poškození je v principu stejný (Kumaravel et al., 2007).

2.5.3.1 Mraky (CLODES)

„Mraky“ neboli „ježky“ je možné pozorovat v mnohých CA experimentech. Jsou to buňky s rozsáhlou migrací DNA, které jsou mimo měřicí schopnost obrazové analýzy nebo mohou poskytovat nevhodné výsledky prostřednictvím obrazové analýzy. Clodes jsou proto skórovány pouze vizuálně. Vyznačují se malou nebo chybějící hlavou s vysoce difúzním ocasem, který je fyzicky oddělen od hlavy (když je přítomna). Přesný původ mraků není znám, ale předpokládanou příčinou je apoptóza, přítomnost vysokého stupně poškození DNA, a stejně tak nekróza. Obvyklou praxí je určení procenta mraků na každý obraz (Kumaravel et al, 2007).

2.5.3.2 Modifikace testu

Základní verze CA byla modifikována k detekci určitých typů lézí, které vznikají účinkem specifických enzymů na poškozená místa DNA. Mezi nejčastěji používané enzymy patří endonukleáza III, která rozpoznává oxidované pirimidiny a formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza III identifikující oxidované puriny. Dále rozlišujeme T4 endonukleázu V k detekci pyrimidinových dimerů, vznikajících působením UV záření, 3-methyladenin DNA glykosylázu k rozeznání alkylovaných bází nebo uracil DNA glykosylázu, která odstraňuje nesprávně inkorporovaný uracil z DNA (Collins a Dusinska, 2009).

3 Zadání diplomové práce - cíl práce

Cílem této práce bylo monitorování poškození DNA u pacientů s CHOPN a zdravých pacientů použitím:

- a) klasické alkalické verze CA pro detekci SSB

- b) enzymatické modifikace CA s využitím endonukleázy III pro detekci oxidovaných pyrimidinů a formamidopyrimidin-DNA-glykosylázy III pro detekci oxidovaných purinů.

4 Materiál a metody

4.1 Laboratorně připravované roztoky, pufry

Agaróza

Potahování sklíček:

- 1 g agarózy do 100 ml destilované vody (1 % roztok)

High melting point agarose (HMPA):

- 100 mg HMP agarózy do 10 ml PBS(1 % roztok)

Low melting point agarose (LMPA):

- 100 mg LMP agarózy do 10 ml PBS (1 % roztok)

Lyzační roztok

- 146 g NaCl (2,5 M), 29,2 g EDTA (100 mM) a 1,2 g Tris (10 mM) do 1000 ml destilované vody
- pH roztoku je 10, úprava pH byla provedena použitím NaOH (cca 12 g do 1000 ml). Před použitím byl přidán 1 % Triton X-100 (1 ml do 100 ml roztoku), směs byla důkladně zamíchána a zchlazena.

Neutralizační roztok

- 48,456 g Tris (0,4 M) do 1000 ml destilované vody
- Hodnota pH = 7,5 byla upravena přidáním koncentrované HCl (cca 25 ml do 1000 ml).

0,5 M EDTA

- 14,612 g do 100 ml destilované vody

Roztok pro elektroforézu

- 18 g NaOH (300 mM), 3 ml EDTA (0,5 M) do 1500 ml destilované vody

Roztok PBS

- 1 zásobní tableta do 200 ml tridestilované vody

Ethidium bromid

- 20 µg do 1 ml destilované vody

4.2 Buněčné vzorky

K pokusům byly použity lymfocyty periferní krve od zdravých lidí (kontrolní skupina, n=10) a pacientů s CHOPN (n=32). Odběry krve byly prováděny na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FN Hradec Králové. Použití vzorků krve a veškerá manipulace s nimi byly schváleny Etickou komisí FN Hradec Králové.

4.3 Izolace lymfocytů

Na 4 ml LSM Lymphocyte (PAA Laboratories) byly navrstveny 4 ml plné krve, odebrané do heparinizované zkumavky. Následně byla provedena 30-ti minutová centrifugace (1400 rpm, 20⁰C). Krev byla rozdělena a vzniklý prstenec lymfocytů byl přenesen do čisté zkumavky, která byla doplněna PBS. Opět byla provedena centrifugace (10 min, 8⁰C, 1400 rpm). Supernatant byl rozředěn v 10 ml PBS. Poté byly lymfocyty spočítány v Bürkerově komůrce, kde z průměrného počtu buněk bylo určeno množství PBS, ve kterém byly lymfocyty resuspendovány pro další centrifugaci (10

min, 8°C, 1400 rpm). Cílem bylo získat lymfocyty o koncentraci 1 milion buněk/1 ml PBS. Suspenze lymfocytů byla rozpipetována po 35 µl do tří mikrozkuvek typu eppendorf. Před dalším zpracováním byly mikrozkuvky chlazeny na ledě.

4.4 Comet assay

Pro každý vzorek izolovaných lymfocytů od jednotlivých pacientů byla primárně potažena 3 podložná sklička 1% roztokem běžné agarózy. Na ně byla navrstvena HMPA agaróza o objemu 85 µl a přikryta krycím sklíčkem. Podložní sklička byla umístěna na dobu 1-5 min na plotnu s ledem. Po ztuhnutí byla krycí sklička opatrně plynulým pohybem stažena. V lázni vytemperované na 37°C byla rozvařena LMPA agaróza, která byla smíchána s připravenými lymfocyty. Do mikrozkuvky eppendorf s izolovanými lymfocyty bylo přidáno 85 µl LMPA. Po promíchání byl obsah nanesen na podložní sklička s vrstvou HMPA agarózy a přikryt krycím sklíčkem. Preparáty byly chlazeny na plotně s ledem a po ztuhnutí byla opět krycí sklička plynulým pohybem odstraněna. Preparáty byly inkubovány 1 hodinu s lyzačním roztokem v lednici při 4°C. Po lýze buněk bylo na první preparát přidáno 30 µl Endo III, na druhý 30 µl FPG a třetí se enzymem nijak neovlivňoval (detekce SSB – alkalická verze CA dle Tica a Vasqueze, 1999). Po 45 minutové inkubaci v termostatu při 37°C, byly preparáty přeneseny do elektroforetického pufru, ve kterém probíhalo rozplétání DNA. Následovala 30 minutová elektroforéza. Elektrický zdroj byl nastaven na hodnoty konstantního napětí 33V a proudu 300mA (velikost proudu bylo možno upravit v závislosti na množství pufru v tanku). V dalším kroku byly preparáty promyté 3 krát 5 minut neutralizačním roztokem. Po konečném oplachu destilovanou vodou byly preparáty nabarveny navrstvením 20µl roztoku ethidium bromidu.

4.4.1 Mikroskopické hodnocení a obrazová analýza

Obraz buněk byl naskenován do počítače pomocí kamery připevněné k fluorescenčnímu mikroskopu a analyzován v programu LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging). Celkově bylo hodnoceno 50 buněk na preparát. Poškozená DNA (komety) byla vyhodnocena jako poměr DNA, která zůstala v jádře a DNA, která se

nacházela v ocasu komety (tail DNA %). Nepoškozené buňky představovaly kruhové útvary (DNA zůstala v jádře).

4.4.2 Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo provedeno použitím softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka průměru (SEM, *standard error of mean*). Pro určení statistických významností byla stanovena hladina $p < 0,05$. Nepárový *t*-test byl proveden při hodnocení výsledků mezi kontrolní skupinou a skupinou s CHOPN.

5 Výsledky

5.1 Detekce poškození DNA

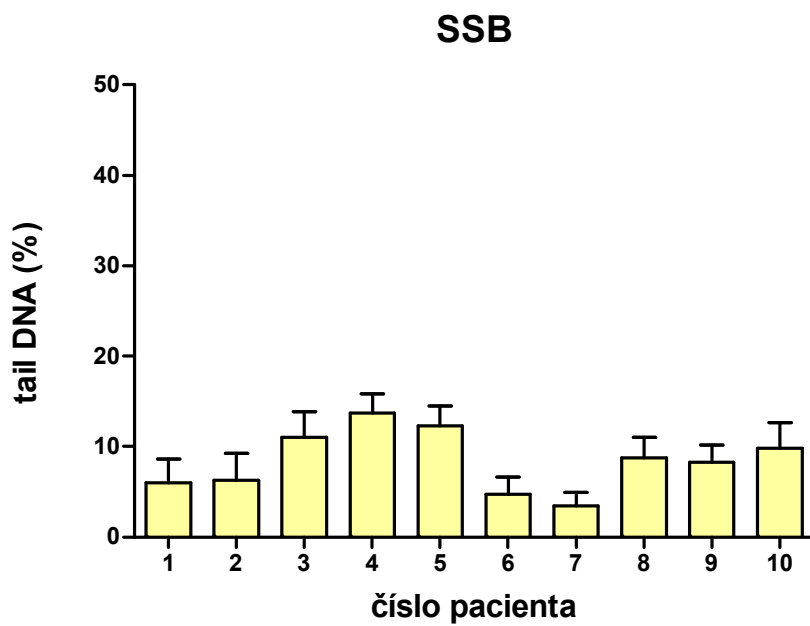
V souvislosti s velkou mírou variability (kontrolní skupina: VC = 22 -40 %; pacienti s CHOPN: VC = 51 -70 %) byl u jednotlivých pacientů prokázán různý stupeň individuálního oxidativního poškození DNA. Vzhledem k tomu, že standardní hodnoty poškození DNA pro populaci nejsou zatím dobře známe, byla u obou skupin k hodnocení míry poškození DNA použita konfrontace vzhledem k intervalu průměr \pm SEM. Referenční interval hodnot u kontrolní skupiny se pohyboval v rozmezí 6,34 – 10,57 % u SSB; 8,22 - 11,42 % u Endo III a 8,55 – 11,38 % u FPG. U pacientů trpících CHOPN byl stanoven referenční interval následovně: SSB 12,22 – 17,60 %, Endo III 15,67 – 23,21 % a FPG 16,87 – 28,84 %. Výsledky jednotlivých měření pomocí klasické metody CA i její modifikované enzymatické verze jsou shrnuty v tabulce Tab. 5 a 6 a v Grafu 1 až 8.

Tab. 5. Výsledky detekce poškození DNA (tail DNA %) u jednotlivých pacientů v kontrolní skupině.

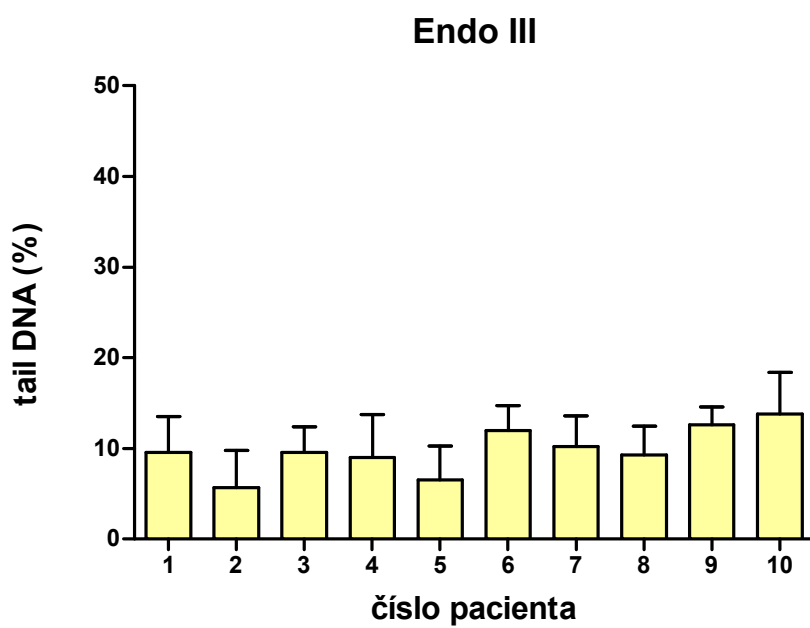
číslo pacienta	tail DNA %		tail DNA %		tail DNA %	
	SSB	SEM	Endo III	SEM	FPG	SEM
1	6,00	2,633	9,57	3,954	10,69	3,544
2	6,30	2,954	5,68	4,062	6,50	4,762
3	11,04	2,807	9,58	2,830	9,81	3,967
4	13,76	2,092	8,98	4,738	13,39	3,066
5	12,31	2,161	6,50	3,754	9,34	4,266
6	4,76	1,872	11,97	2,770	12,18	2,488
7	3,47	1,446	10,19	3,402	7,16	3,352
8	8,78	2,255	9,31	3,180	7,97	2,276
9	8,27	1,888	12,57	2,036	11,31	2,312
10	9,84	2,776	13,83	4,563	11,29	3,900

Tab. 6. Výsledky detekce poškození DNA (tail DNA %) u pacientů s CHOPN.

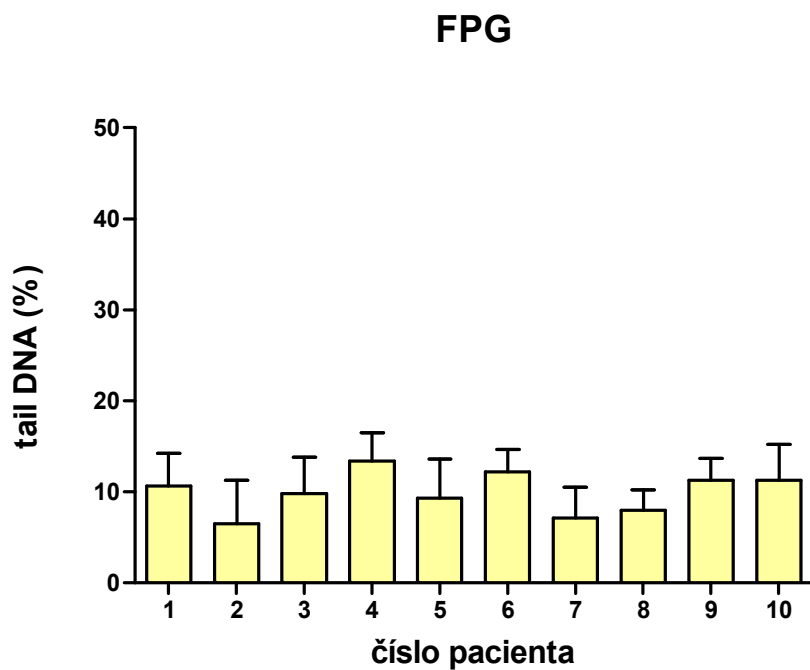
číslo pacienta	tail DNA %		tail DNA %		tail DNA %	
	SSB	SEM	Endo III	SEM	FPG	SEM
1	27,36	2,567	17,82	2,199	20,12	2,502
2	6,95	1,366	13,95	2,507	14,31	2,411
3	13,68	1,847	25,23	1,701	61,85	2,778
4	9,00	2,192	9,15	2,186	10,22	1,489
5	11,56	0,979	31,60	1,646	30,83	3,281
6	10,86	1,216	17,16	2,191	9,06	1,102
7	9,35	1,461	34,62	3,048	30,50	3,563
8	6,37	0,781	11,58	1,310	14,64	1,256
9	29,55	2,280	36,92	2,964	35,21	3,369
10	18,68	3,297	24,32	3,381	23,78	3,726
11	4,88	1,025	11,57	1,543	11,97	2,053
12	3,36	0,619	9,28	1,765	11,23	1,062
13	9,09	0,466	7,70	0,478	15,61	0,527
14	14,26	2,748	13,46	2,625	9,07	1,872
15	7,13	1,936	13,31	1,147	5,60	1,106
16	3,27	0,522	6,94	0,724	2,91	0,380
17	13,62	0,656	8,62	1,406	8,87	1,409
18	7,90	0,618	4,07	0,710	4,44	0,461
19	13,00	1,253	11,11	1,339	13,02	1,930
20	13,73	0,747	9,20	1,113	9,21	1,004
21	21,15	3,906	14,73	2,866	27,14	4,962
22	20,58	1,264	28,15	2,189	22,44	1,908
23	18,24	2,964	17,20	0,361	16,18	2,813
24	18,29	1,877	17,17	1,615	18,27	2,141
25	16,83	1,527	19,93	2,997	18,09	3,041
26	15,14	2,150	9,30	1,983	13,75	2,830
27	25,98	3,320	35,42	3,992	48,77	3,031
28	22,38	1,904	31,84	2,452	54,95	3,813
29	16,75	3,505	30,28	8,365	33,74	6,514
30	23,44	2,669	36,02	3,043	51,22	3,232
31	32,35	1,734	41,82	3,140	44,56	2,837
32	12,52	1,964	22,59	2,759	25,37	2,986



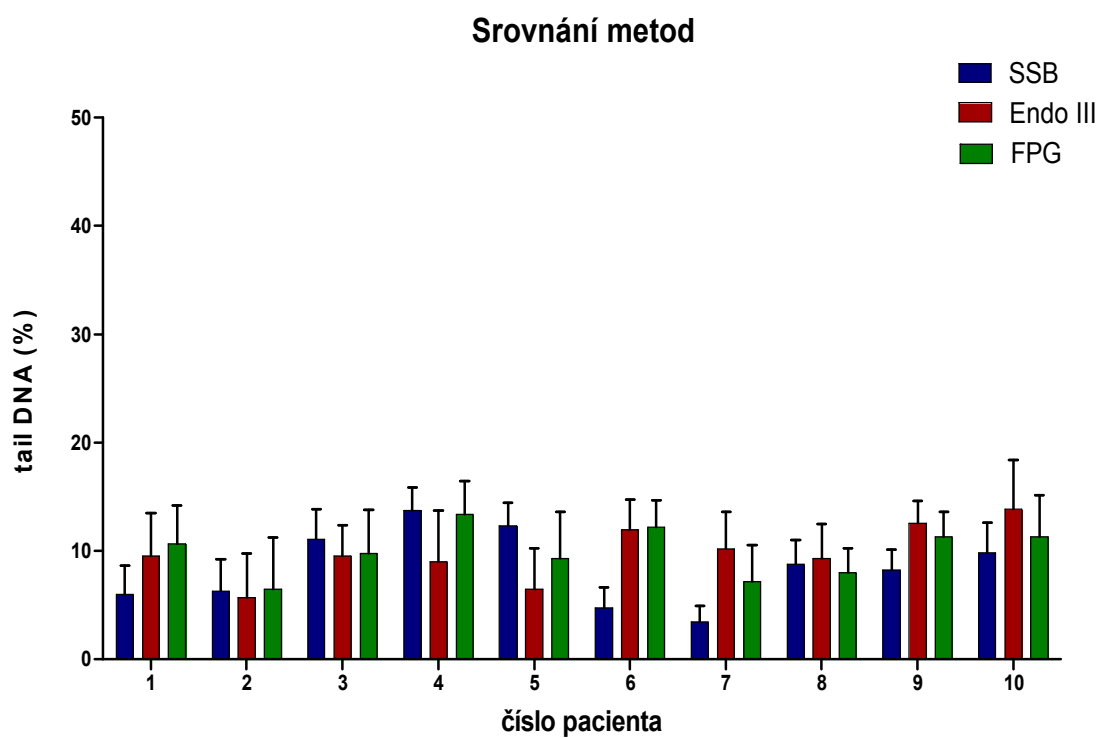
Graf 1. Poškození DNA (tail DNA %) v kontrolní skupině – detekce SSB.



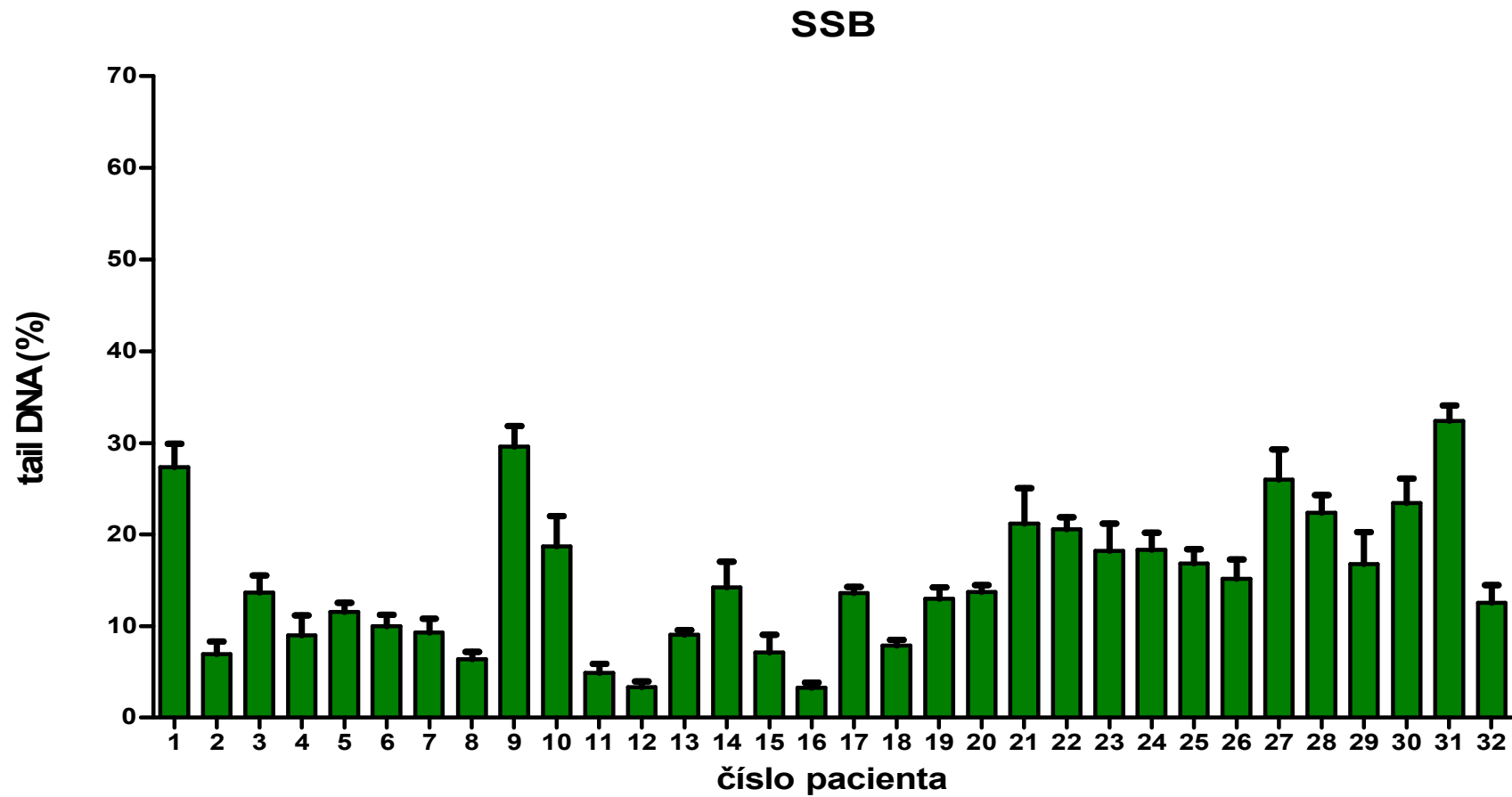
Graf 2. Poškození DNA (tail DNA %) v kontrolní skupině – detekce Endo III.



Graf 3. Poškození DNA (tail DNA %) v kontrolní skupině – detekce FPG.

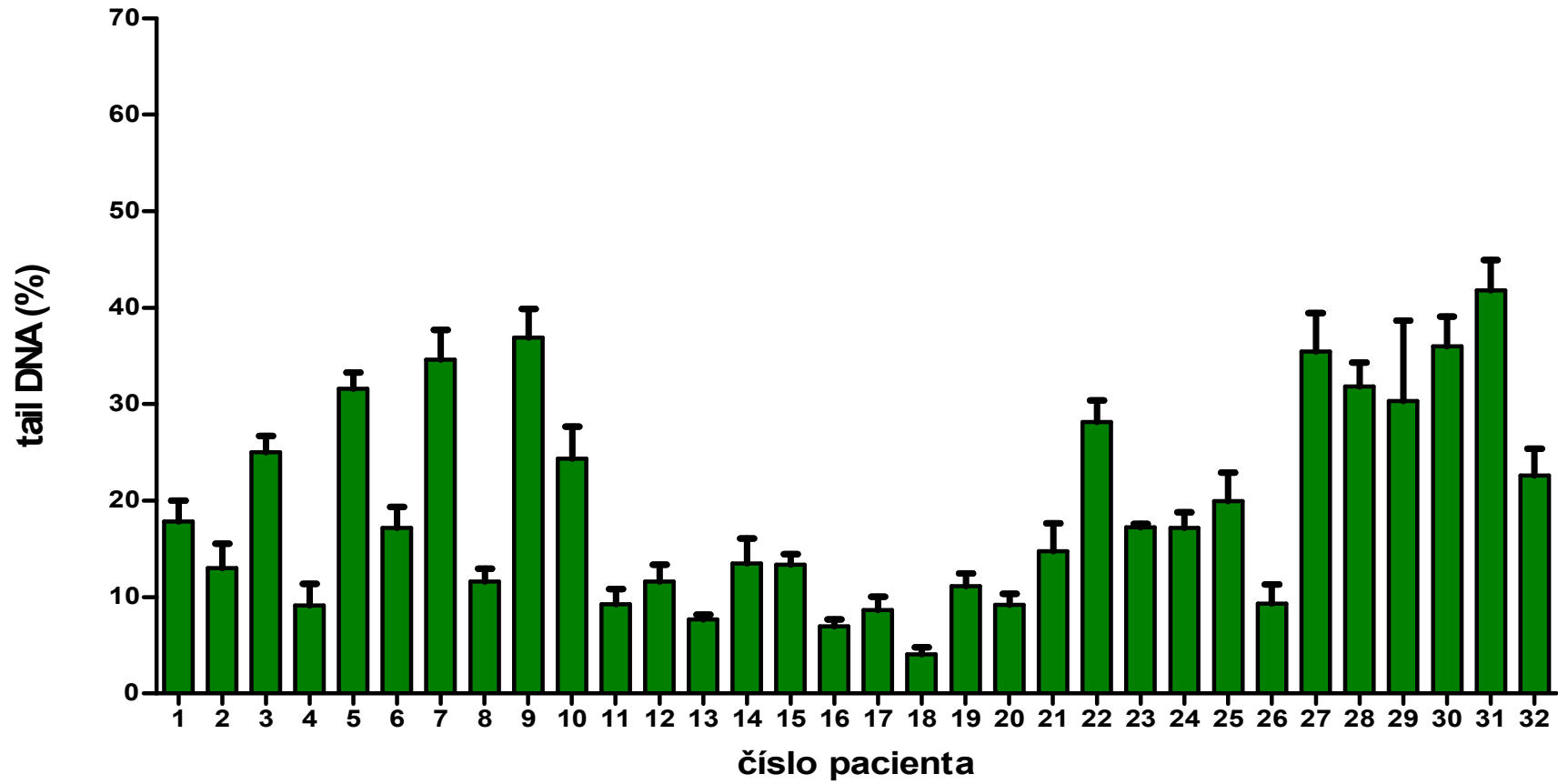


Graf 4. Porovnání citlivosti jednotlivých verzí CA – kontrolní skupina.



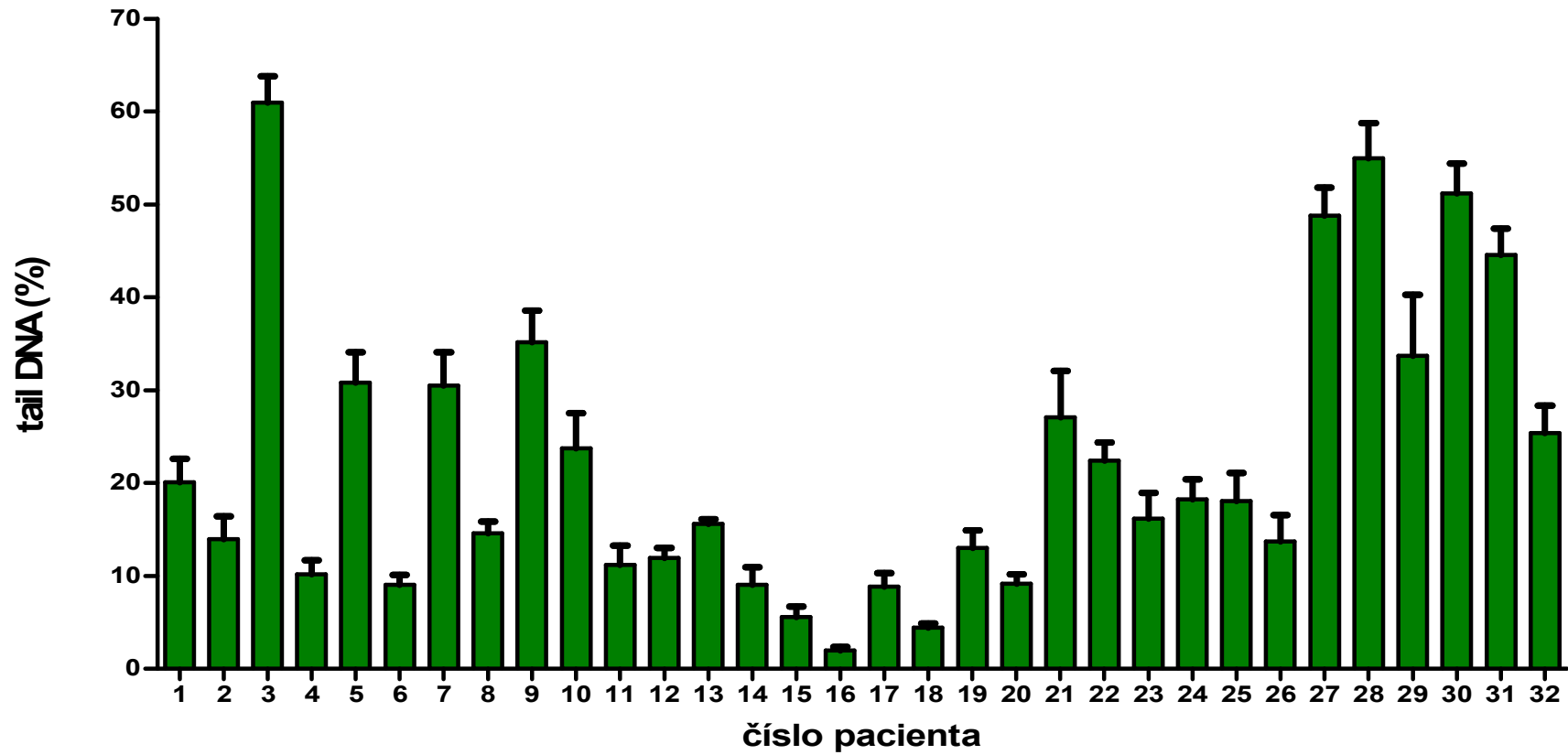
Graf 5. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN – detekce SSB.

Endo III



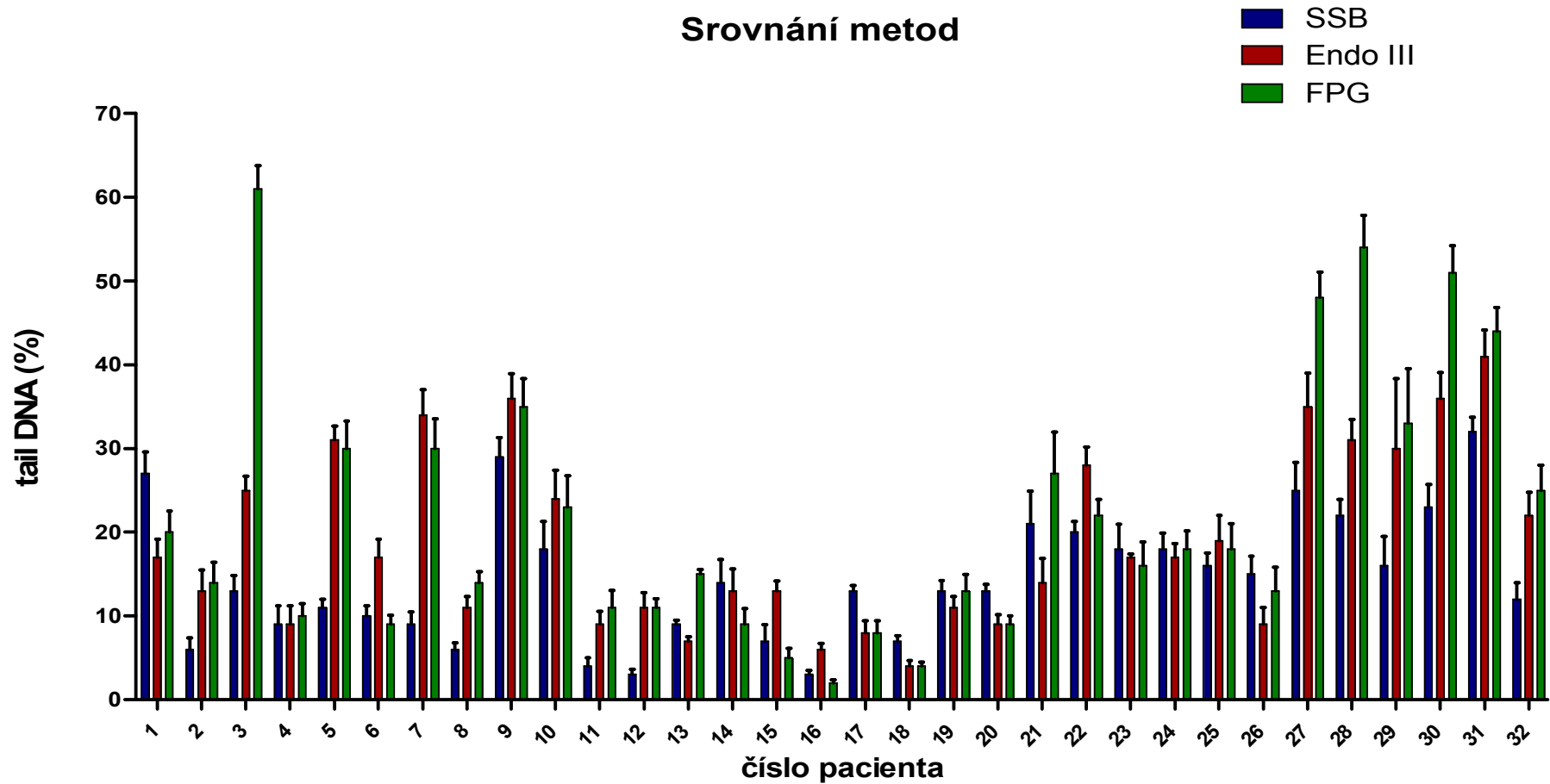
Graf 6. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN – detekce Endo III.

FPG



Graf 7. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN – detekce FPG.

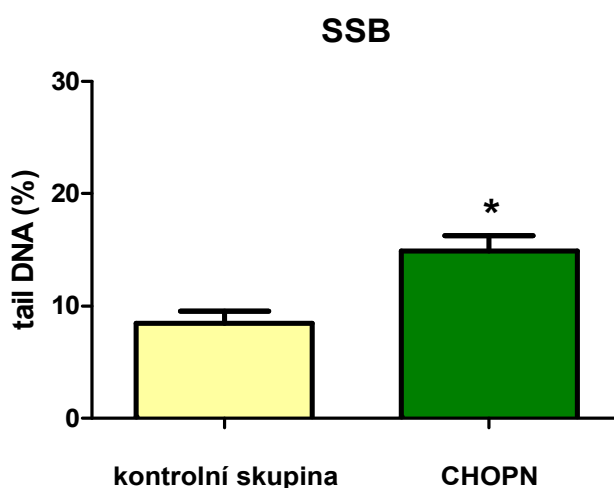
Srovnání metod



Graf 8. Porovnání citlivosti jednotlivých verzí CA – skupina pacientů s CHOPN.

5.2 Alkalická verze comet assay

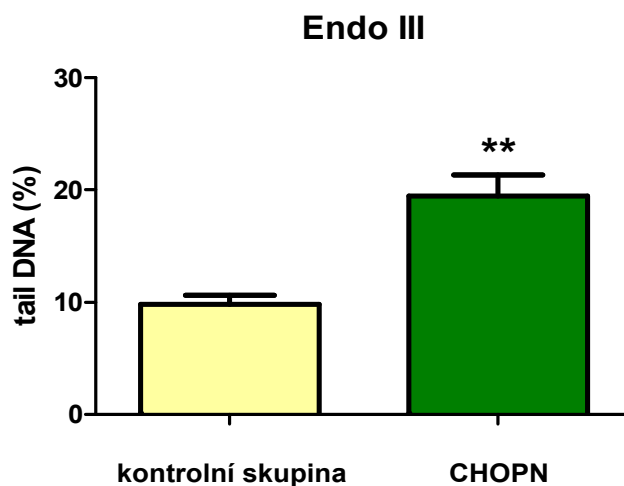
Použitím alkalické verze CA jsme zjistili, že CHOPN indukuje signifikantní nárůst množství SSB zlomů v DNA v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 9). Poškození DNA bylo ve skupině pacientů s CHOPN vyšší až o 75% oproti zdravým pacientům.



Graf 9. Detekce SSB. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN. Statistická významnost (nepárový t-test, $*p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou.

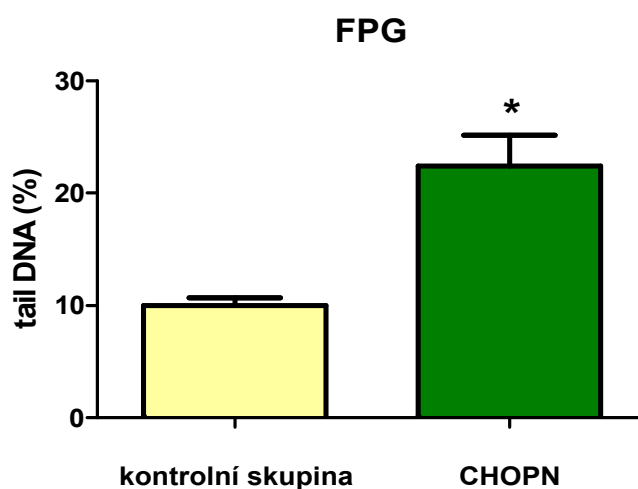
5.3 Enzymatická modifikace comet assay

Výsledky detekce oxidačního poškození DNA naměřené pomocí enzymatické modifikace CA s využitím Endo III nám ukázaly signifikantní nárůst oxidačního poškození pyrimidinů u pacientů s CHOPN v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 10), poškození bylo u CHOPN vyšší o 98%.



Graf 10. Detekce Endo III. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN. Statistická významnost (nepárový t-test, $**p<0,01$) v porovnání s kontrolní skupinou.

Detekce oxidovaných purinů pomocí FPG modifikace CA ukazuje signifikantní zvýšení oxidačního poškození purinů u pacientů s CHOPN v porovnání s kontrolní skupinou (Graf 11). Míra poškození byla u pacientů s CHOPN vyšší o 124%.



Graf 11. Detekce FPG. Poškození DNA (tail DNA %) ve skupině pacientů s CHOPN. Statistická významnost (nepárový t-test, $*p<0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou.

6 Závěr

Našimi pokusy jsme ověřili možnost aplikace comet assay pro analýzu poškození DNA u pacientů trpících CHOPN, a to jak její klasické alkalické verze, tak i enzymatických modifikací Endo III a FPG, a prokázali jsme signifikantní zvýšení poškození DNA, včetně oxidace DNA u pacientů s CHOPN. Rovněž jsme u pacientů s CHOPN i kontrolní skupiny zaznamenali různou individuální míru oxidačního poškození, byla u nich nalezena velká míra variability poškození (VC se pohybuje v rozmezí 51 -70 %). Tato různorodost je způsobena rozličnou vnímavostí k oxidačnímu stresu, genetickým polymorfizmem enzymů účastnících se antioxidační ochrany a různým fyziologickým stavem pacienta.

7 Diskuze

Oxidační stres je považován za jeden z hlavních faktorů patogeneze zánětu dýchacích cest, který je charakteristický i pro CHOPN. RONS způsobují oxidační poškození velkého počtu různých molekul v buněčných komponentech jako jsou membránové lipidy, proteiny a DNA (např. Ceylan et al., 2006). Ze spektra analýz pro měření poškození DNA je CA citlivou a výkonnou metodou pro zjišťování zlomů v řetězci DNA. Enzymatická modifikace klasické verze CA navíc umožňuje detekovat specifitější poškození DNA, a to oxidaci dusíkatých bází DNA.

V naší práci jsme využili klasickou alkalickou verzi CA metody společně s její enzymatickou modifikací a zjistili jsme, že u pacientů s CHOPN dochází k signifikantnímu nárůstu oxidačního poškození DNA v porovnání s kontrolní skupinou zdravých pacientů, zaznamenali jsme jak vyšší počet SSB, tak i oxidaci purinů a pyrimidinů.

Vyšší míru oxidačního poškození DNA u CHOPN potvrdili ve své práci Xie JG a kol. (2005), kteří skupiny pacientů zdravých i s CHOPN rozdělili na skupiny kuřáků a nekuřáků a navíc zjistili, že poškození DNA bylo u pacientů s CHOPN vyšší než u podskupiny kuřáků z kontrolní skupiny. Maluf a kol. (2009) potvrdili pomocí klasické alkalické CA vyšší míru poškození DNA v korelaci se stupněm závažnosti onemocnění.

Naše výsledky nám potvrdili, že všechny použité verze CA jsou schopny detekovat poškození DNA, avšak hodnoty naměřené enzymatickou modifikací dosahovaly vyšší procento poškozené DNA. Dalo by se tedy předpokládat, že Endo III a FPG verze představují senzitivnější metodiku, což potvrzuje práce Kushwahy a kol. (2011), kteří porovnávali možnosti využití alkalické a modifikované CA u experimentálně navozeného DM u potkanů. Existuje však jen velmi malý počet prací zabývajících se detekcí poškození a oxidace DNA u CHOPN metodou comet assay, proto pro potvrzení našeho předpokladu bude potřeba dalších podrobnějších studií, ve kterých budeme přihlížet i k dalším parametrům, jako je věk pacientů, stádium onemocnění, pohlaví a neposlední řadě i kouření, které představuje komplexní směs

více než 4700 chemických produktů a právě volné radikály a další oxidanty jsou zde zastoupeny ve vysokých koncentracích a rozličnými metodami bylo navíc prokázáno, že oxidační poškození je u kuřáků vyšší (např. Ceylan et al., 2006).

8 Použité zdroje

- [1] Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55:373–99
- [2] Barnes PJ, Celli BR (2009) Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 33(5):1165-85
- [3] Bureš J, Král B, Paráková Z, Špásová I, Jílková V (2003) Základy vnitřního lékařství. Pneumologie, 1. vydání, Galén, Praha 5, str. 137 – 40
- [4] Celli BR, MacNee W and committee members (2004) Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD. *Eur Respir J* . 23:932–46
- [5] Ceylan E, Kocyigit A, Gencer M, Aksoy N, Selek S (2006) Increased DNA damage in patients with chronic obstructive pulmonary disease who had once smoked or been exposed to biomass. *Respir Med*. 100(7):1270-6
- [6] Collins AR, Dusinska M (2009) The Comet Assay in Toxicology. Applications of the Comet Assay in Human Biomonitoring. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*. 201–21
- [7] Collins AR, Ma AG, Duthie SJ (1995) The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. *Mutat Res*. 336:69–77
- [8] Cook PR, Brazell IA, Jost E (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*. 22(2):303-24

- [9] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*. 17:1195-1214
- [10] Croteau DL, Bohr VA (1997) Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 272:25409–25412
- [11] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A (2006) Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem*. 52(4):601–23
- [12] Dítě P et al. (2007) Vnitřní lékařství. Pneumologie, 2. vydání, Galén, Praha 5, str. 460–468
- [13] Dostálek M (2007) Oxidativní stres, biomarkery oxidativního stresu. *Postgraduální medicína PM* . 4/200. 385
- [14] Dröge W (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 82:47–95
- [15] Dršata J, Netopilová M, Marklová E, Boušová J (2009) Vybrané kapitoly z patobiochemie II. díl. Volné radikály a oxidační stres, 1. vydání, Karolinum, Praha 1, str. 7-23
- [16] Dvořák M, Matejovičová M (2008) Principy a využití kometové analýzy při detekci poškození DNA. *Chem. Listy*. 102:977–83
- [17] Esterbauer H (1982) Aldehydic products of lipid peroxidation. In: Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer. Academic Press, London, str. 101-20
- [18] Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, Rabe KF (2008) Complex chronic comorbidities of COPD. *Eur Respir J*. 31:204–12

- [19] Fikrová P, Štětina R, Hronek M, Hyšpler R, Tichá A, Zadák Z (2011) Application of the comet assay method in clinical studies. *Wien Klin Wochenschr.* 123(23-24):693-9
- [20] Frosina G, Fortini P, Rossi O, Carrozzino F, Raspaglio G, Cox LS, Lane DP, Abbondandolo A, Dogliotti E (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem.* 271(16):9573-8
- [21] Gutman BL, Niyogi KK (2009) Evidence for Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage in Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 284(25):17006–12
- [22] Halliwell B (2007) Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J.* 401:1–11
- [23] Halliwell B, Gutteridge JM (1999) Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press.* 31(4):261-72
- [24] Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology.* 193:3–34
- [25] Kim Ja-E, Choi S, Yoo Ju-A, Chung (2003) 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. *FEBS Letters.* 556:104-10
- [26] Kamiya H (2003) Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: surfy and summary. *Nucleic Acids Res.* 31:517-31
- [27] Klaunig JE, Kamendulis LM (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:239-67

- [28] Klungland A, Lindahl T (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO Journal*. 16(11):3341–8
- [29] Kočárek E, Calounová G, Minks J (2008) Sborník textu: Vybrané aspekty lékařské genetiky. Reparace poškozené DNA a mutátorové geny, Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048, 33 – 35
- [30] Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN (2007) Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*. 25:53–64
- [31] Kushwaha S, Vikram A, Trivedi PP, Jena GB (2011) Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutat Res*. 726(2):242-50
- [32] Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J (2004) Biochemie pro studující medicíny I. díl. Oxidační pochody - Základní podmínka k získání energie pro život, 1. vydání, Karolinum, Praha 1, str. 95 - 96
- [33] Liao W, McNutt MA, Zhu WG (2009) The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*. 48:46–53
- [34] Lízalová M (2010) Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu. Disertační práce: Volné radikály, VUT Brno, Brno, str. 13
- [35] Maluf SW, Mergener M, Dalcanale L (2007) DNA damage in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Mutat Res*. 626:180–4
- [36] Maynard S, Schurman ShH, Harboe Ch, Souza-Pinto NC, Bohr VA (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*. 30(1):2–10

- [37] Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA (2004) Role of DNA mismatch repair in apoptotic responses to therapeutic agents. *Environ Mol Mutagen.* 44(4):249-64
- [38] Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters.* 12:75–92
- [39] Olive PL, Banáth JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc.* 1(1):23-9
- [40] Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123:291-8
- [41] Pauk N (2009) Oxidační stres a CHOPN. *Interní medicína pro praxi.* 11(4):178–181
- [42] Perná Z, El Sammanová L (2011) CHOPN - Pohled pneumologa a praktického lékaře. *Postgraduální medicína PM.* 9:985-92
- [43] Rice-Evans C (1988) Free Radicals: A Search for a New Methodology. *Int J Radiat Biol.* 53:1013-5
- [44] Scanlon PD, Connett JE, Wise RA, Tashkin DP, Madhok T, Skeans M, Carpenter PC, Bailey WC, Buist AS, Eichenhorn M, Kanner RE, Weinmann G (2004) Loss of bone density with inhaled triamcinolone in Lung Health Study II. *Am J Respir Crit Care.* 170(12):1302-9
- [45] Singh SK, Szulik MW, Ganguly M, Khutsishvili I, Stone MP, Marky LA, Gold B (2011) Characterization of DNA with an 8-oxoguanine modification. *Nucleic Acids Res.* 2011:1–13

- [46] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175:184-91
- [47] Uchida K (2003) 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res.* 42(4):318-43
- [48] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009) 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J Environ Sci Health C.* 27:120–39
- [49] Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84
- [50] Wong V, Szeto YT, Collins AR, Benzie IFF (2005) The Comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research.* 3(1):1-14
- [51] Xie JG, Xu YJ, Zhang ZX, Zhang N, Ni W, Chen SX (2005) DNA damage in lymphocytes from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 44(9):656-8
- [52] Zima T et al. (2007) Laboratorní diagnostika. Reaktivní formy kyslíku a dusíku a antioxidační systémy, 2. vydání, Galén, Praha 5, str. 339-348

8.1 Internetové zdroje

- Internet 1 Rodriguez-Roisin R, Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD (2008 edition).
[http://www.goldcopd.org/Guidelines/guideline-global-strategy-for-diagnosis%2c-management%2c-and-prevention-of-copd-\(2008-edition\).html](http://www.goldcopd.org/Guidelines/guideline-global-strategy-for-diagnosis%2c-management%2c-and-prevention-of-copd-(2008-edition).html)
[cit. 1.3.2012]
- Internet 2 Buettner GR, Some Biological Chemistry of Singlet Oxygen (1O₂).
<http://www.photobiology.info/Buettner.html>
[cit. 10.3.2012]
- Internet 3 Rodriguez-Roisin R, Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD.
http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLD_Report_2011_Feb21.pdf
[cit. 1.3.2012]
- Internet 4 Wilson DM, Sofinowski TM, McNeill DR, Repair mechanisms for oxidative DNA damage.
<http://www.bioscience.org/2003/v8/d/1109/fig3.jpg>
[cit. 26.2.2012]
- Internet 5 Vondta V, Trendy moderních konsenzů u chronické obstrukční plicní nemoci.
<http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakoterapie/Trendy-modernich-konsenzu-u-chronicke-obstrukcni-plicni-nemoci/6-L-aC.magarticle.aspx>
[cit. 2.3.2012]

Internet 6 Tice R, Vasquez M, Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. 1999.
www.cometassay.com
[cit. 2.2.2010]