

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova v Prahe**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biochemických vied**

**Kandidát:** Terézia Kúdelová

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

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

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

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

