

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Vplyv anestézie na mieru oxidatívneho poškodenia DNA

Bc. Veronika Zubáňová

Vedúci diplomovej práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Konzultant: prof. MuDr. Zdeněk Zádák, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala všetkým, ktorí sa podieľali na vypracovaní mojej diplomovej práce.

Obrovská vďaka patrí mojej školiteľke Mgr. Monike Kuchařovej PhD. za pomoc pri meraniach a usmerňovaní pri písaní konečnej práce. Ďalej by som sa rada poďakovala prof. MuDr. Zdeňkovi Zadákovi CSc., MuDr. Astapenkovi, MuDr. Černému, prof. Štětinovi a Chirurgickej klinike vo Fakultní nemocnici v Hradci Králové za výpomoc a ochotu pri odbere vzoriek a konečnom vyhodnocovaní. Veľká vďaka patrí aj RnDr. Jane Nektivdovej, PhD. za jej pomoc pri dokončení štúdia popri pracovných povinnostiach a za jej cenné rady. Chcem poďakovať aj svojej rodine za dlhoročnú podporu, či už po stránke psychickej alebo finančnej.

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

V Hradci Králové 15.5.2017

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD.....	8
2. CIEĽ PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČASŤ	10
3.1 Oxidačný stres	10
3.2 Genotoxikológia	12
3.2.1 Metódy stanovenia oxidatívneho poškodenia.....	13
3.2.2 Metódy stanovenia opráv poškodenej DNA.....	15
3.2.2.1 Fotoreaktivácia.....	16
3.2.2.2 BER.....	16
3.2.2.3 NER.....	17
3.2.2.4 Oprava nesprávne zaradených báz.....	18
3.3 Comet Assay, CA	19
3.3.1 Stanovenie poškodenia DNA.....	19
3.3.1.1 Modifikácie metódy	19
3.3.2 Stanovenie reparácie DNA	23
3.3.2.1 Princíp metódy reparácie.....	23
3.3.2.2 Štúdie zamerané na rýchlosť reparácie.....	25
3.3.3 Princíp kométovej metódy.....	26
3.3.3.1 Farbenie kométiiek.....	27
3.3.3.2 Hodnotenie komét	28
3.3.4 Výhody metódy.....	30
3.3.5 Faktory ovplyvňujúce kométovej analýzy.....	30
3.3.6 Aplikácie kométovej analýzy v medicíne.....	31
3.4 Anestézia.....	32
3.4.1 Rozdelenie anestetík.....	33
3.4.2 Účinky anestetík.....	35
3.4.2.1 Štúdie zamerané na účinky anestetík.....	36

4.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	39
4.1	Výber pacientov	39
4.2	Priebeh anestézie	41
4.3	Prístroje.....	41
4.4	Pomôcky	42
4.5	Chemikálie	43
4.6	Comet assay pre stanovenie poškodenia DNA.....	44
4.6.1	Postup metódy	44
4.6.2	Štatistická analýza.....	53
4.7	Comet assay pre stanovenie reparácie DNA	53
4.7.1	Princíp metódy.....	54
4.7.2	Hodnotenie a štatistika	56
5.	VÝSLEDKY	57
5.1	Stanovenie poškodenia DNA	57
5.1.1	Štatistická významnosť	57
5.1.2	Celkové poškodenie	58
5.1.3	Závislosť na pohlaví, veku a dĺžke anestézie.....	61
5.2	Stanovenie reparačnej schopnosti lymfocytov	70
6.	DISKUSIA.....	72
7.	ZÁVER.....	75
8.	POUŽITÉ SKRATKY.....	76
9.	ZOZNAM TABULIEK	78
10.	ZOZNAM OBRÁZKOV	79
11.	ZOZNAM GRAFOV.....	80
12.	POUŽITÁ LITERATÚRA	81

ABSTRAKT

Ciel práce: Oxidatívne poškodenie je jedným z najčastejších typov poškodenia bunkových komponent, ktorý vedie k oxidácii lipidov, proteínov ale aj molekúl DNA (deoxyribonukleová kyselina). V dôsledku toho dochádza k vyššiemu výskytu rôznych patológií ako sú ateroskleróza, neurodegeneratívne ochorenia, rakovina alebo diabetes. V našej štúdii sme sa zamerali na vplyv celkovej anestézie na poškodenie DNA počas menšej operácie s použitím techniky kométovej analýzy.

Metódy: Základným princípom tejto metódy je fixácia buniek (lymfocytov) v agaróze, ich lýza pre odstránenie membrán, inkubácia so špecifickými enzýmami a elektroforéza uvoľnených bunkových jadier. Počas elektroforézy sa voľné nízkomolekulárne a negatívne nabité fragmenty DNA pohybujú smerom k anóde, čo spôsobuje tvorbu typického kométového tvaru bunky. Na konci boli gély nafarbené etídiom bromidu (DNA interkalačná farbička) a vizualizované.

Výsledky: Skúmali sme jednoreťazcové zlomy a, s použitím modifikovanej metódy s využitím špecifických enzýmov na detekciu špecifických lézií, tiež oxidované puríny a pyrimidíny. Navýšenie DNA poškodenia, určené intenzitou chvosta kométy, bolo kvantifikované použitím LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) softvéu pre obrazovú analýzu.

Záver: Výsledky boli použité na porovnanie poškodenia DNA pred a po anestézii pacientov. Štatistické zhodnotenie bolo vykonané pomocou programu SigmaStat 3.5 (Systat Software, USA). Výsledky ukazujú štatisticky významné zvýšenie DNA poškodenia spôsobeného anestéziou počas menšej operácie.

Štúdia bola podporená MH CZ - DRO (UHHK, 00179906) a Oddelením pre vývoj a výskum, Fakultnej nemocnice Hradec Králové.

Kľúčové slová: comet assay, kometová analýza, anestézia, poškodenie DNA, reparácia

ABSTRACT

Background: Oxidative damage is one of the most frequent types of cell components damage leading to oxidation of lipids, proteins and the molecule of DNA. As a consequence, there is a higher occurrence of several pathologies such as atherosclerosis, neurodegenerative diseases, cancer; or diabetes. In our study, influence of whole body anesthesia during minor surgery on the level of DNA damage was examined using comet assay technique.

Methods: The basic principle of this method is fixing the cells (lymphocytes) in agarose, their lysis for the removal of membranes, incubation with the specific enzymes and electrophoresis of the released cell nuclei. During the electrophoresis, free low-molecular weight and negatively charged fragments of DNA move towards anode which causes the formation of the typical comet cell shape. Finally, the gels are stained by ethidium bromide (DNA intercalating dye) and visualized.

Results: We have observed single strand breakages (SSBs) and, with the use of modified assay using specific enzymes for detection of specific lesions, also oxidized purines and pyrimidines. The extent of DNA damage as determined by the intensity of the tail of the comet was quantified using LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) software for image analysis. The results were used for the comparison of DNA damage before and after the anesthesia of the patients. Statistical evaluation was performed in SigmaStat 3.5 (Systat Software, USA).

Conclusions: Results showed a statistically significant increase of DNA damage caused by anesthesia during minor surgery. These findings imply further investigations, namely evaluation of the changes in the capacity of the affected lymphocytes to repair DNA damage.

The study was supported by MH CZ - DRO (UHHK, 00179906) and Department of Research and Development, University Hospital Hradec Králové.

Key words: comet assay, anesthesia, DNA damage, repair

1. ÚVOD

K poškodeniu DNA dochádza trvale a priebežne po celý život, a to vplyvom rôznych činiteľov, či už vonkajších (napr. žiarenie okolo nás, fajčenie, smog, ale aj napr. opakované RTG vyšetrenia, toxický vplyv látok v potrave, cytostatiká a i.), alebo vnútorných (bunkové dýchanie a metabolizmus).

Zatiaľ existuje málo údajov o tom, či operácia a/alebo anestézia vedie k poškodeniu DNA a výsledky existujúcich štúdií vzájomne nesúhlasia. Tento výskum má slúžiť k získaniu informácií o tom, či operácia, ktorú pacienti podstupujú vedie k poškodeniu DNA a pokiaľ áno, do akej miery. Naším cieľom je zistiť rozdiel vo výskyte rôznych typov zmien v DNA (jednoreťazcové zlomy, oxidované bázy) medzi bunkami získanými pred operáciou a následne po operácii, pri ktorej bol pacient pod vplyvom celkovej anestézie.

V rámci štúdie bolo získaných 20 pacientov, ktorých krv sme použili na analýzu. Pri stanovení množstva pozmenenej DNA sme využívali metódu tzv. kométovej analýzy. Základným princípom metódy je schopnosť buniek s poškodenou DNA, zafixovaných do agarózy, meniť svoj tvar z guľatého do tvaru komét počas elektroforézy. Platí, že čím viac DNA je v danej bunke poškodennej, tým viac bunka stráca svoj pôvodný tvar.

Vyšetrenie sa vykonáva v bielych krvinkách- konkrétne lymfocytoch. Toto vyšetrenie nie je priamou analýzou DNA, nedochádza k identifikácii genetického kódu daného pacienta, ale stanovuje rozsah poškodenia DNA. Na získanie periférnych lymfocytov bola použitá nezážňavá krv s citrátom sodným ako protizrážanlivým činidlom.

Výsledky experimentu boli porovnané s inými, podobnými experimentmi a získané údaje a výsledky projektu môžu do budúca poslúžiť k zlepšeniu liečebných postupov tak, aby sa hľadali také postupy, ktoré povedú k čo najmenšiemu riziku poškodeniu DNA u pacientov.

2. CIEĽ PRÁCE

Teoretická časť:

Oxidatívny stres je úzko prepojený so stresovými a patologickými stavmi. Pretože anestézia, či už celková alebo epidurálna, predstavuje významný stresový faktor, je možné predpokladať, že u pacientov podstupujúcich anestéziu dochádza k nadmernej produkcii reaktívnych foriem kyslíka a dusíka. Tie potom ovplyvňujú celú škálu biomolekúl vrátane DNA. Cieľom tejto diplomové práce je preto stanoviť mieru oxidatívneho poškodenia molekúl DNA u pacientov podstupujúcich anestéziu a zmeny oxidatívneho poškodenia buniek v priebehu zotavovania sa z predchádzajúceho operačného zákroku metódou comet assay.

Z dostupnej literatúry som vypracovala teoretickú časť zameranú na vysvetlenie metodiky kométovej analýzy v klasickom prevedení a modifikácii pre stanovenie reparačnej schopnosti buniek. V mojej práci sú vysvetlené možnosti využitia tejto metódy pri stanovení oxidatívneho poškodenia DNA, v našom prípade najmä v zameraní sa na vplyv celkovej anestézie na ľudský organizmus.

Experimentálna časť:

Cieľom experimentu bolo stanoviť mieru oxidatívneho poškodenia v lymfocytoch vyizolovaných z krvi pacientov podstupujúcich operačný zákrok pod vplyvom anestézie s použitím kométovej analýzy. Určili sme rozdiel v oxidatívnom poškodení buniek pred a po anestézií. Následne sme stanovili reparačnú schopnosť extraktov získaných z takto odobraných lymfocytov po inkubácii s HeLa bunkami. U oboch stanovení boli získané výsledky zhodnotené a bola určená ich štatistickú významnosť.

3. TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 *Oxidatívny stres*

Oxidatívny stres je stav, ktorý nastáva pri zvýšenom výskyte oxidačných činiteľov (voľných radikálov) alebo nedostatočnej funkčnosti antioxidantného systému. (Esterbauer et al., 1993) Tiež je dôležité podotknúť, že u chorobných stavov sa dá predpokladať prítomnosť zvýšeného výskytu oxidatívneho poškodenia v biomolekulách. (Collins, 2009)

Telo sa musí každodenne ochraňovať pred ROS (reaktívnymi formami kyslíka, najmä superoxidu) uvoľnenými z mitochondriálneho dýchacieho reťazca a antioxidantný systém musí byť schopný poradiť si z takýmto problémom predtým, než dôjde k poškodeniu biomolekúl (lipidov, proteínov, nukleových kyselín). V normálnom stave sú tieto procesy v rovnováhe. Tento stav je popisovaný ako biologicky tolerantné množstvo voľných radikálov, ktoré zodpovedá určitému oxidačnému poškodeniu. Je ale dôležité podotknúť, že sa musí jednať o poškodenie, ktoré je stále prítomné. (Collins, 2009)

Bunky ľudského tela sú neustále pod vplyvom škodlivých faktorov, ktoré majú potenciál spôsobovať poškodenie ich DNA- nositeľku genetickej informácie. Zväčša sa jedná o látky oxidatívneho charakteru, ktoré sa dajú rozdeliť do dvoch kategórií: na látky endogénneho a exogénneho pôvodu (Tabulka č.1). Endogénne zložky vznikajú v spojení s normálnym metabolizmom bunky alebo pri niektorých patológiách ako je zápal. (De Bont, 2004; Durackova, 2010)

Medzi exogénne faktory patria chemikálie v prostredí- pesticídy, kovy, polycyklické aromatické uhľovodíky, rozpúšťadlá, liečivá a iné. Tieto chemikálie interagujú s tkanivami (ich makromolekulami) a narúšajú normálne funkcie bunky. (COMET ASSAY FORUM, 2006)

Tabulka 1: Faktory vplyvajúce na poškodenie DNA (zdroj: Gunasekarana, 2015)

Endogénne faktory	Exogénne faktory
Reaktívne formy kyslíka vznikajúce pri normálnom metabolizme	Rastlinné toxíny, chemoterapeutiká, rádioterapia
Metabolizmus estrogénov	UV, röntgenové a gamma žiarenie
Reaktívne formy dusíka, karbonylu	Vírusy
Hydrolyza glykozidových v DNA	Ťažké kovy, ktoré interkalujú DNA (arzén, ortuť)

Veľa ochorení má zápalový charakter, ktorého hlavnou súčasťou je produkcia ROS makrofágmi. Makrofágy síce zohrávajú úlohu v imunitnej odozve, ale sú aj zdrojom škodlivých voľných radikálov. Zápalové ložisko sa teda stáva „živnou pôdou“ pre rozvoj tumoru. (Coussens et. Werb, 2002) U rakoviny existuje priama spojitosť oxidovaných báz (8-oxoguanínu) s mutagénnym vplyvom, a to vďaka chybnému párovaniu 8-oxoguanínu s adenínom (Grollman et. Moriya, 1993). Zlé zaradenie báz v dôležitých génoch je zdrojom somatických mutácií, a teda priamo súvisí s výskytom rakoviny. (Kadioglu et al., 2004) Produkty lipidovej peroxidácie sa zúčastňujú tvorby ateriálnych plakov, čo prispieva k výskytu mŕtvice, infaktu myokardu, trombózy a iných vaskulárnych ochorení. (Esterbauer et al., 1993) Katarakta vzniká pri oxidatívnom poškodení šošovky vplyvom UV žiarenia. (Vinson, 2006) Ďalším faktom je, že vyššie poškodenie sa nachádza u ľudí s Alzheimerovou chorobou (Kadioglu et al., 2004; Thanan et al., 2015; Hedge et al., 2011), aterosklerózou (Cervelli et al., 2012; Fetterman et al., 2016; Harrison et al., 2003) a diabetom (Fetterman et al., 2016; Grindel et al., 2016).

Akákoľvek zmena v štruktúre DNA teda dáva potenciál vzniku patológiám rôzneho druhu. Preto je nevyhnutné testovať genotoxicitu látok pred ich vypustením do prostredia.

Výsledkom nesprávnej opravy poškodenej DNA sú mutácie, chromozómové aberácie a s tým súvisí vznik nádorov, zvýšená genetická rekombinácia, prípadne zvýšený výskyt buniek podstupujúcich apoptózu, alebo predčasný nástup bunkovej smrti. Všetky uvedené faktory sú spúšťačmi patologických procesov a vzniku rôznych druhov ochorení (rakovina). (De Bont, 2004; Kumari et al., 2008)

3.2 Genotoxikológia

Genotoxikológia objasňuje účinky pôsobenia chemických a fyzikálnych činiteľov na genetický materiál alebo deoxyribonukleovú kyselinu (DNA), ktoré spôsobujú zmeny v štrukturálnej integrite genómu. Pomocou kombinácií metód *in silico*, *in vitro* a *in vivo* je možné získať dôveryhodné výsledky o mutagénnom a karcinogénnom účinku chemikálií. Poškodenie DNA sa vyskytuje prirodzene, a to ako dôsledok oxidatívnej respirácie a metabolizmu, ale bunka disponuje mechanizmami, ktoré sú schopné neustále opravovať takto vzniknuté poškodenie. V prípade, že je oxidatívnych činiteľov príliš a bunka nestíha zmeny opravovať do správneho stavu, genetické lézie sa hromadia a v konečnom dôsledku vedú k apoptóze, zmenám v proliferácii bunky, replikácii DNA a k mutagenéze, ktorá vedie k rozvoju rakoviny (karcinogenéze). Poškodená DNA zastáva dôležitú úlohu pri iniciačnom kroku karcinogenézy, kedy sa karcinogen alebo jeho aktívny metabolit kovalentne naviaže na DNA a vytvorí s dvojreťazcom adukt, ktorý má byť reparačnými procesmi opravený, v opačnom prípade zostáva v bunke ako mutácia a ďalej sa rozvíja pri bunkovom delení. Mutácie vznikajú prirodzene počas evolúcie a s každou replikáciou DNA a veľa z nich sa vyskytuje v oblastiach, kde nemajú škodlivý vplyv na organizmus (tiché mutácie). Ale ak sa vyskytujú v kódujúcich oblastiach alebo v oblastiach regulácie génov, vedú k zmenenej génovej expresii, a teda k vzniku nefunkčných alebo zmenených proteínov, čo má zásadný vplyv na funkčnosť bunky. (Beedanagari et al., 2014)

Molekulárne epidemiologické štúdie uvádzajú veľkú interindividuálnu variabilitu v citlivosti ku karcinogénom v prostredí a k riziku rozvoja rakoviny, ktoré môžu byť určené genetickými odchýlkami v nukleotidovej excíznej reparácii. (Lin et al., 2007) Množstvo metód sa využíva na sledovanie bežných typov genotoxického poškodenia. *In vitro* eseje vo všeobecnosti disponujú vysokou senzitivitou, čo ale znižuje ich špecifitu. *In vivo* eseje majú presne opačné vlastnosti: vysokú špecifitu ale nízku senzitivitu. Preto

je výhodné kombinovať tieto dva typy metód a získať tak vhodnú úroveň senzitivity a špecificity. (Kirkland et al., 2005)

3.2.1 Metódy stanovenia oxidatívneho poškodenia

Existuje niekoľko metód schopných určiť mieru poškodenia DNA. Každá má svoje výhody, ale aj nevýhody.

In silico postupy využívajú aplikáciu matematiky, štatistiky, chémie a výpočtovej techniky, aby bolo možné vyvinúť efektívnu metódu pre genotoxické štúdie. Tieto metódy sú rýchle, spoľahlivé a ekonomicky výhodné, preto sú využívané pri stanovení účinku mnohých neprebádaných činiteľov. (Beedanagari et al., 2014)

Medzi **in vitro** patrí napríklad známy a hojne využívaný **Amesov test**. Test sa využíva k stanoveniu mutagénneho potenciálu testovanej zložky na organizmus a je označovaný ako zlatý štandard v štúdiách mutagenézy. (Kirkland et al., 2005) Inou metódou je **sledovanie tvorby mikronukleí**. Mikronukleus je tvorený oddelenou časťou chromozómu, alebo vo výnimočných prípadoch aj celého chromozómu, ktorá zostala mimo jadro po bunkovom delení. Tvorbu mikronukleí je možné sledovať *in vitro* (na bunkových líniiach) aj *in vivo* metódou (bunky z krvi, kostnej drene). (Beedanagari et al., 2014) Meranie frekvencie vzniku mikronukleí je spoľahlivým meraním straty chromozómu alebo zlomov, čo tento test vyzdvihuje ako unikátny spomedzi ostatých testov. (Brozovic et al., 2010) Jagetia a Nayak (2000) poukazuje na koreláciu medzi prežitím bunky a množstvom mikrojadier.

Jednou z najtradičnejších metód je mikroskopické sledovanie priamych zmien na chromozómoch po expozícii chemickému činiteľu. **Sledovanie chromozomálnych aberácií** sa využíva ako v klinickej praxi, tak vo výskume. Chromozomálne aberácie sú stanovované v populácii buniek v metafáze, kedy sú chromozómy kondenzované a poškodenie je najlepšie viditeľné. (Beedanagari et al., 2014)

V posledných rokoch sa dostávajú do popredia **metódy molekulárne-genetické**. Vďaka rozvoju **mikroerejí**, **real-time PCR** alebo **sekvenovania** sme schopní určiť expresiu génov, ktorá sa mení vplyvom genotoxických látok. (Beedanagari et al., 2014)

Metódou **PCR (polymerázová reťazová reakcia)** je možné určiť génovo špecifické poškodenie, ale nie je možné určiť typ a mieru poškodenia. Metódou **FISH (fluorescenčná *in-situ* hybridizácia)** je možné určiť špecifický úsek chromozómu pomocou fluorescenčne značených sond, špecificky reagujúcich s poškodenou časťou nukleovej kyseliny. Inými metódami je možné určiť zmenenú DNA: **metóda TUNNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)** je schopná detekovať jedno a dvojreťazcové zlomy pomocou fluorescencie voľných koncov DNA, pomocou **HALO assay** je možné stanoviť zmenenú organizáciu DNA v jednotlivých bunkách, pomocou **FCM (prietoková cytometria)** zase poškodenie DNA výhradne v apoptických bunkách.

Ďalšou skupinou sú **analytické metódy** (plynová a kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou), ktoré sú schopné určiť špecifické typy poškodení DNA (oxidované bázy, tymidinové diméry).

Samostatne spomínanou metódou je **kométová analýza** (comet assay, SCGE-jednobunková gélová elektroforéza), ktorá je v mnohých štúdiách vyzdvihoaná ako najlepšie využiteľná metóda na stanovenie genotoxického vplyvu mnohých látok. (Azqueta et al., 2011; Collins et al., 2001; Evenson et al., 2007; Gaivao et al., 2001; Kumari et al., 2008; Kurasaki, 2012; Mutlu, 2012)

Jednobunková gélová elektroforéza umožňuje detekovať jedno a dvojreťazcové zlomy v jednotlivých bunkách. Na rozdiel od predchádzajúcich metód, kométovou analýzou stanovujeme prechodné poškodenie DNA, ktoré nie je trvale fixované v bunke. Z bunky sa odstráni všetky časti okrem DNA vo forme nukleoidu, pomocou elektroforézy sa oddelí časť poškodenej DNA od nedotknutej a bunka nadobudne tvar kométy. Intenzita DNA vo chvoste vzniknutej kométy určuje množstvo poškodenej DNA. (Azqueta et al., 2011)

Kométová esej teda nie je jediná metóda detekovania oxidatívneho poškodenia DNA, ale je jednou z najcitlivejších a presných, a pri využití stanovenia genetických polymorfizmov tiež vhodnou pri stanovení interakcie medzi genetickými a enviromentálnymi faktormi v udržiavaní genetickej stability. Je ale dôležité vedieť určiť, čo je normálna hodnota oxidovaných báz. Vzhľadom k rozdielnym výsledkom

mnohých štúdií, táto hodnota závisí od použitej metódy a môže sa líšiť aj o niekoľko rádov. (Collins, 2009)

Detailnejší popis metódy sa nachádza ďalej v práci, keďže sme si ju vybrali ako metódu vhodnú k nášmu experimentu.

3.2.2 Metódy stanovenia opráv poškodenej DNA

Existujú rôzne metódy na určenie aktivity reparačných enzýmov od použitia DNA mikroerejí po real-time PCR na detekciu génov, ktoré sa zúčastňujú kódovania opravných enzýmov. Je ale bežne známe, že aktivita enzýmu nezávisí od expície jeho príslušného génu, ale od jeho množstva v cieľovom mieste. (Paz-Elizur et al., 2007) Spoľahlivejšou metódou môže byť fenotypizačná metóda, to znamená aj nami vybraná kométová analýza, modifikovaná na stanovenie reparačnej schopnosti buniek. (Azqueta et al., 2014)

Bunka disponuje niekoľkými opravnými mechanizmami, ktoré sú schopné pozmeniť poškodené časti DNA a zabezpečiť znovunadobudnutie genetickej stability. Tieto mechanizmy zohrávajú dôležitú úlohu pri prevencii vzniku rakoviny. (Azqueta et al., 2014) Medzi ne patrí **fotoreaktivácia, nukleotidová excízna reparácia (NER),** **bázová excízna reparácia (BER) a korekcia správneho párovania bází** (z anglického mismatch repair- **MMR**). (Gunasekarana, 2015)

Vložením jednej alebo viacerých báz, po ktorej nasleduje ligácia, je proces opravy jednoreťazcových zlomov, homologickou rekombináciou a nehomologickým spájaním koncov je možné opraviť závažnejšie dvojreťazcové zlomy, bázovou excíznou reparáciou je zase možné zabezpečiť opravu pozmenených báz (alkylovaných, oxidovaných). Nukleotidová excízna reparácia je najkomplexnejšia cesta opravy, ktorá je schopná odstrániť vytvorené adukty, vzniknuté po kovalentnom naviazaní rôznych molekúl na nukleotidy, kovaletne previazané bázy v rámci jedného reťazca (intramolekulárne cross linky) a medzi oboma reťazcami (intermolekulárne cross linky) a adukty DNA a proteínov. Korekciou správneho párovania báz je možné opraviť nesprávne zaradené bázy. (Azqueta et al., 2014)

Každá cesta pozostáva z početných skupín enzýmov, vzhľadom k typu poškodenia (Friedberg et. al, 2006), ktoré sú regulované rôznymi cestami. Enzýmy bázovej

reparácie sú konštitutívne, čo znamená, že sa tvoria neustále, vplyvom reaktívnych produktov kyslíka, ktoré sa tvoria pri dýchaní a metabolizme, zatiaľ čo tvorba enzýmov nukleotidovej reparácie je indukovateľná, najmä pri expozícii exogénnym činiteľom (UV, škodliviny potravy...). (Azqueta et al., 2014)

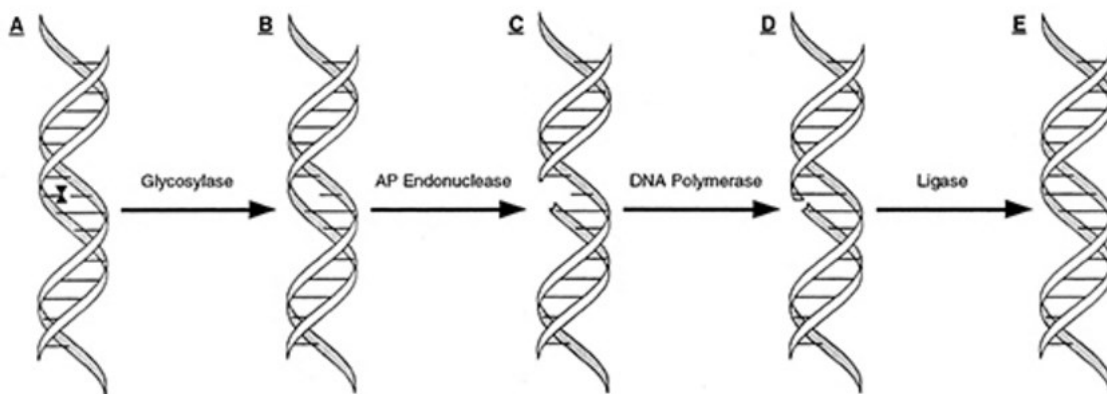
3.2.2.1 Fotoreaktivácia

Jedná sa o proces závislý na svetle, ktorého cieľom je odstránenie pyrimidínových dimérov indukovaných UV žiarením. Enzým fotolyáza sa naviaže na pyrimidínový dimér a katalyzuje ďalšiu reakciu, v ktorej štepí cyklobutánový kruh. Výsledkom je, že sa DNA štruktúra vracia do pôvodnej štruktúry. (Biology LibreTexts library, 2016)

3.2.2.2 BER

Odstraňovanie malých modifikovaných báz spadá pod funkciu BER. BER zabezpečuje opravu oxidovaných (8-oxoguanín), alkylovaných (metylovaných purínov: 3-metyladenín) a deaminovaných báz (odstránenie uracilov po konverzii z cytozínu). Vzhľadom k nízkemu oxidačnému potenciálu je guanín spomedzi báz najviac citlivý k oxidatívne mu poškodeniu. (Neeley et Essigmann, 2006; Deavall et al., 2012)

V kontraste k NER, BER je zahájená DNA glykozylázou, ktorá rozpoznáva poškodené bázy a hydrolyzuje glykozidickú väzbu medzi bázou a deoxyribózou a vytvorí abazické miesto (apurínové, apyrimidínové). (Memisoglu et Samson., 2000) Eukarytické DNA nukleázy sú schopné rozoznávať rôzne modifikácie báz. (O'Connor et Laval, 1991) Po tomto procese dochádza k endonukleolytickému odstráneniu abázového miesta, pomocou AP endonukleázy a vytvorenie jednoreťazcového zlomu. Za dosyntetizovanie reťazca zodpovedá DNA polymeráza beta alebo delta a epsilon a konečným krokom je ligácia, to je spojenie dvojreťazca. (Obrázok č. 1) Odstránený reťazec je u BER kratší ako u NER (2-6 báz). (Memisoglu et Samson, 2000; Rouzer, 2015)



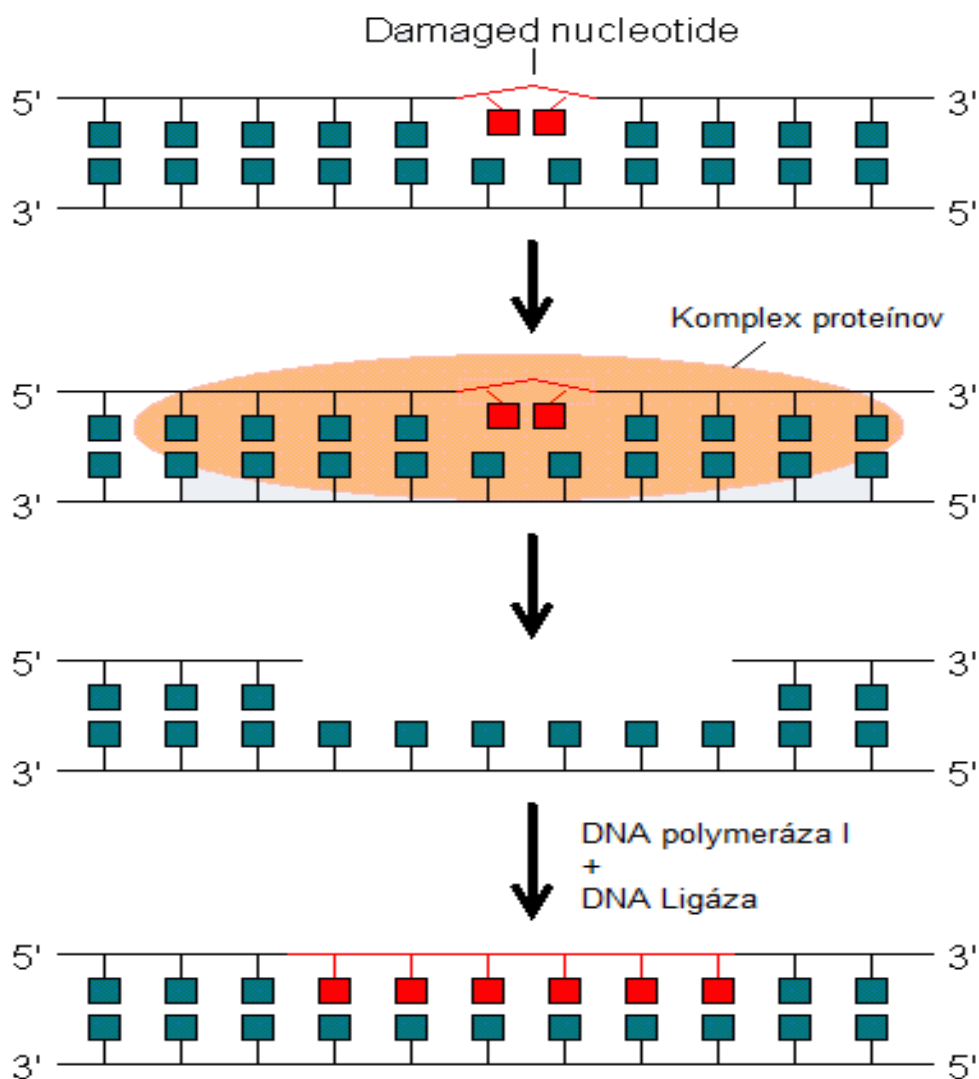
Obrázok 1: Bázová excízna reparácia. (A) Odstránenie lézie z DNA pomocou DNA glykozylázy, ktorá odstráni glykozidickú väzbu medzi bázou a deoxyribózou a vytvorí AP miesto. (B) AP endonukleáza odstráni AP miesto odstránením väzby v cukor-fosfátovej kostre- vzniká jednoreťazcový zlom. (C) DNA polymeráza dosyntetizuje chýbajúci reťazec. (D-E) Činnosťou ligázy dochádza k obnoveniu dvojreťazca (zdroj: Rouzer, 2015)

3.2.2.3 NER

NER slúži na ochranu integrity genómu tým, že rozpoznáva a eliminuje široké spektrum lézií. Slúži na opravu širokého spektra DNA lézií, ako sú cyklobutánové pyrimidínové diméry, ktoré vznikajú po expozícii UV a adukty báz s polycyklickými aromatickými uhl'ovodíkmi (benzo[a]pyren), aflatoxínmi, nitrozamínmi. NER je zvyčajne spájaná aj s odstraňovaním tzv. bulky lézií. (Rastogi et al., 2010) a niektoré enzýmy NER chránia bunku aj pred oxidatívnym poškodením (8-oxoguanín, cyklodeoxyadenozín). Enzýmy tak vystupujú ako kofaktory pri bázevej excíznej reparácii. (Friedberg, 2001)

Proces je podobný ako BER, ale zložitejší a je nutná kooperácia mnohých proteínov. V eukaryotických bunkách je k NER dôležitých minimálne 30 proteínov a NER je zahájená odstránením fosfodiesterovej väzby. (Obrázok č. 2) Excízne miesto je tvorené 20-30 nukleotidmi. (Biology LibreTexts library, 2016; Boer et Hoeijmakers, 2000)

Funkcia NER a BER sa čiastočne prekrýva, čo znamená, že obe sú schopné odstrániť určitý typ poškodenia, ale s odlišnou efektívnosťou. Avšak, tento typ reparácie zohráva dôležitú úlohu pri prevencii rakoviny a mnohé štúdie poukazujú na spojitosti medzi polymorfizmami v génoch pre reparáciu a množstvom poškodenej DNA alebo rýchlosťou reparácie. (Langie et al., 2010) Navyše, Langie a kol. došli k záveru, že NER kapacita je inhibovaná oxidatívnym stresom. (Langie et al., 2007)



Obrázok 2: Schéma mechanizmu nukleotidovej excíznej reparácie. V tomto type opráv je pri excízii nutná kooperácia mnohých proteínov. Excízne miesto je tvorené 20-30 nukleotidmi a k dosyntetizovaniu reťazcu dochádza vďaka činnosti DNA polymerázy I a DNA ligázy. (Zdroj: <http://www.namrata.co/dna-damage-and-repair-a-quick-revision/>)

3.2.2.4 Oprava nesprávne zaradených báz

Tento typ opravy sa využíva pri zlom zaradení báz, aj napriek proofreadingovej aktivite polymerázy počas syntézy reťazca. Enzýmy katalizujúce túto opravu rozpoznávajú nesprávne zaradený nukleotid, vystrihnú ho a nahradia správnym nukleotidom. (Biology LibreTexts library, 2016)

3.3 Comet Assay, CA

Kométová analýza, inak nazývaná tiež jednobunková gélová elektroforéza je všestranná, relatívne pracovne jednoduchá a citlivá metóda pre stanovenie poškodenia DNA a rýchlosti reparácie v jednotlivých eukaryotických bunkách. Limit citlivosti je približne 50 reťazcových zlomov na jednu diploidnú bunku. Metóda bola pôvodne zavedená na biomonitoring u ľudí a zvierat, v súčasnej dobe sa využíva stanovenia poškodenia DNA v špecifických sekvenciách genómu. Jednotlivé bunky je možné získať z biologického materiálu, vypestovaných bunkových kultúr, z kvasiniek, rastlín či vyšších živočíchov. (Olive et Banáth, 2006)

3.3.1 Stanovenie poškodenia DNA

Kométovou metódou je možné analyzovať jednoreťazcové zlomy, ktoré vznikajú pri priamom poškodení dvojreťazca DNA, ale aj tie, ktoré sú počiatočným krokom pri reparácii (alkylovaných bází, pyrimidínových dimérov). Citlivosť tejto metódy vzrastá s množstvom konvertovaných alkali-labilných miest do jednoreťazcových zlomov. (Singh et al., 1988) Metódu je možné využiť na stanovenie množstva jednoreťazcových zlomov a s využitím rôznych jej modifikácií aj na rozšírenie spektra poškodení, a to na detekciu dvojreťazcových zlomov, cross-linkov (DNA-DNA/ DNA-proteín/ DNA-liečivo), poškodených báz alebo apoptotických jadier. (COMET ASSAY FORUM, 2006)

Dvojreťazcové zlomy tvoria len 5% z celkového poškodenia a neopravené lézie môžu byť pre bunku smrteľné. Nesprávna oprava zase prispieva k vzniku chromozómových aberácií a k bunkovej smrti. (Liao et al., 2009; Olive, 2009)

3.3.1.1 Modifikácie metódy

Neutrálna verzia CA

Vo svojich počiatkoch bola mikrogélová elektroforéza využívaná vo svojej pôvodnej verzii- lýza a elektroforéza prebiehala za neutrálnych podmienok. V tejto štúdií bola metóda využitá na detekciu jednoreťazcových zlomov. (COMET ASSAY FORUM, 2006; Ostling et Johanson, 1984) Pri neutrálnom pH ale nedochádza k porušeniu súvislosti dvojreťazca a dvojreťazcové zlomy sa neprejavajú. Toto je dôvod nejednotnosti starších štúdií s novými, ktoré v určitých prípadoch toto tvrdenie využívajú. (Collins, 2004)

V roku 1991 bola použitá neutrálna verzia kométovej analýzy, vďaka ktorej bolo možné detekovať dvojreťazcové zlomy, nezávisle na prítomnosti jednoreťazcových zlomov. (Olive et al., 1991) Dvojreťazcové zlomy sa delia na posunuté alebo zarovnané, na základe toho, či sa nachádzajú protiľahlo k sebe alebo sú na oboch reťazcoch v rôznych ale blízkych miestach. Ku zlomom dochádza v dôsledku prerušenia fosfodiesterovej väzby medzi susednými nukleotidmi.

V dnešnej dobe sa táto metóda využíva na detekciu oboch typov zlomov, bez toho, aby sa dalo medzi nimi rozlišovať. Na samostatné sledovanie dvojreťazcových zlomov sa využíva špeciálne upravenej neutrálne kométovej analýzy s využitím predĺženého natrávenia proteázami pri vysokej teplote (50°C). Zatiaľ nie je úplne jasné, ako táto metóda funguje, predpokladá sa ale, že dochádza k deštrukcii nukleárnej matrix a zavinutia dvojzávitnice. Prípadne, je možné využiť inkubácie s peroxidom vodíka, vďaka ktorému vznikne prebytok jednoreťazcových zlomov a túto metódu je možné využiť na sledovanie spoľahlivosti stanovenia dvojreťazcových zlomov. (Olive et Johnston, 1997)

Ako alkalickou tak aj neutrálnou verziou je možné detekovať nízke úrovne poškodenia DNA. (Collins et al., 1997) Na rozvoľnenie dvojreťazca DNA je potrebných približne 2000 jednoreťazcových zlomov, na detekciu dvojreťazcových zlomov pre neutrálnych podmienkach je potrebných 50-10000 zlomov v rámci jednej bunky. (Olive et Banáth, 2006)

Alkalická kométovej analýza

Alkalická verzia CA bola prvý krát zavedená v roku 1988. (Singh et al., 1988) V súčasnosti je uznávanou metódou pre stanovenie jedno a dvojreťazcových zlomov (Azqueta et Collins, 2013) a s jej pomocou je možné identifikovať nízke počty zlomov s vysokou citlivosťou. (Singh et al., 1988)

Štandardná verzia alkalickéj kométovej analýzy slúži k detekcii DNA zlomov a alkali-labilných miest. Základom je elektroforéza skličok s lyzovanými bunkami (nukleoidmi, ktoré vznikli po lýze cytoplazmatickej membrány a odstránení histónov) v zásaditom roztoku, kedy vzniká typický tvar buniek do tzv. komét. Intenzita chvosta kométy je závislá na počte zlomov, ktoré rozvoľňujú (relaxujú) reťazec DNA a umožňujú putovanie častí DNA obsahujúcich zlomy. (Cook et al. 1976) Ďalej je možné detekovať

alkali-labilné miesta, ktoré sa po vystavení zásaditému roztoku menia na jednoreťazcové zlomy. (Singh et al., 1988) V prípade ovplyvnenia endonukleázami špecificky reagujúcimi s určitými léziami (typmi poškodení) je možné odhaliť iné typy poškodenia. (Azqueta et Collins, 2013)

Singh et al. používali na lýzu buniek 2,5M NaCl, Triton X-100 a Sarkosyl pri pH 10 po dobu 1 hodiny. Ako ďalší krok používali alkalický roztok (0,3M NaOH) počas elektroforézy pri pH viac ako 13. Vtedy vznikol názor, že kométovej analýza je založená na podobnom princípe ako alkalické rozpletanie alebo alkalická elúcia, kde je možné pôsobením alkalického prostredia rozvoľniť dvojreťazec v okolí zlomu jedného alebo oboch reťazcov. (Singh et al., 1988)

Použitie inhibítorov

Ďalšou verziou je CA s pridaním inhibítorov (pomocou hydroxyurey a cytozin arabinozidu) reparačných enzýmov pre stanovenie špecifických typov excíznych miest pri reparačnom procese. Základom je meranie kumulácie poškodení v dôsledku zablokovania reparačných enzýmov špecifickými inhibítormi (napr. zablokovaním opravnej schopnosti DNA polymerázy). (Collins, 2004; Piperakis, 2009; VandeLoock et al., 2010)

U neproliferujúcich buniek (napr. lymfocytov) dochádza ku kumulácii bez inhibície, vzhľadom k nedostatku deoxynukleotid trifosfátu. (Collins et al., 1995)

Použitie endonukleáz

Použitie endonukleáz špecifických pre určitý typ lézií umožňuje určenie špecifického typu DNA poškodenia. (Azqueta et al., 2014; Azqueta et Collins, 2013; Gunasekara, 2015) Používajú sa tieto typy endonukleáz:

- **FPG= Formamidopyrimidin DNA-glykozyláza-** pre stanovenie oxidovaných purínov (necyklický N7 guanín)
- **OGG1= 8-Oxoguanin glykozyláza-** stanovenie oxidovaných purínov a formamidopyrimidínov
- **ENDO III= endonukleáza III-** stanovenie oxidovaných pyrimidínov
- **T4 endonukleáza V-** stanovenie dimérov pyrimidínov vzniknutých po expozícii UV

- **AlkA= 3-methyladenin DNA glykozyláza II-** určenie 3- metyladenínu- stanovenie alkylovaných bází po ich konverzii na apurínové a apyrimidínové miesta (AP miesta)
- **Ľudský FEN-1= flap endonukleáza 1-** určenie lézií dvojreťazcovej a bázovej excíznej reparácie

Comet-FISH

Ďalšou modifikáciou je kombinácia fluorescenčnej *in-situ* hybridizácie (FISH) a kométovej metódy, tzv. Comet FISH. (Azqueta et al., 2014) Základom sú farebne značené próby komplementárne k úseku DNA, čím je možné zistiť poškodenie určitého génu alebo sekvencie. V kombinácii s FISH metódou je možné nájsť priamo poškodený chromozóm, časť chromozómu (centroméra, teloméry, ramienka) alebo samotné gény. (Shaposhnikov et al., 2011)

Stanovenie apoptických buniek

V prípade, že má hlava kométy redukovanú veľkosť a takmer všetka DNA sa nachádza vo chvoste (tzv. hedgehog), predpokladá sa, že by sa mohlo jednať o bunku v apoptóze. (Collins et al., 1995)

Toto tvrdenie však nie je stopercentne správne, a to z dôvodov, že takéto bunky vykazujú určitú mieru reparácie po pridaní malej koncentrácie peroxidu vodíka. Ďalším faktorom je, že pri apoptóze dochádza k fragmentácii DNA do nukleozómových oligomérov, ktoré môžu byť odstránené pri lýze a elektroforéze. Tzv. tiene, ktoré po bunkách zostanú, predstavujú pozostatky vysokomolekulárnej DNA z apoptotických buniek a vykazujú malé percento normálnej fluorescencie. (Collins, 2004) Preto touto metódou nie je možné spoľahlivo určiť bunky v apoptóze.

Spoľahlivejšou metódou je určenie živých buniek pomocou stanovenia integrity cytoplazmatickej membrány trypanovou modrou. Avšak problém nesprávnych výsledkov môže nastať, keď stanovíme ako neživé bunky aj bunky s miernym poškodením membrány po zoškrabovaní bunkovej kultúry alebo po trypsinizácii. Po zoškrabnutí vykazujú bunky 80% trypanovú pozitivitu, zatiaľ čo po trypsinizácii až 90% trypanovú negativotu. Práve z tohto dôvodu sa odporúča stanoviť množstvo zlomov v kontrolných skupinách buniek, ktoré je použiteľné namiesto testu viability. (Hartmann et al., 2003)

Menej známe varianty

Ďalšou metódou je značenie buniek bromodeoxyuridínom na detekciu deliacej sa DNA, keďže CA v bežnej forme nie je možné rozlíšiť medzi bunkami v S- fázi a v iných fázach bunkového cyklu. Dôvodom je, že počet replikačných miest v danom momente v danej bunke nie je až taký veľký alebo, že dochádza k stabilizácii replikačného aparátu. Bunky v S-fázi zvyšujú percento DNA vo chvoste kométy vzhľadom k tomu, že replikačná vidlička sa chová ako reťazcový zlom (aj keď sa nechovajú úplne identicky ako zlomy). Je teda možné označiť bunky v replikácii bromodeoxyuridínom, ktorý je potom zviditeľnený pomocou komplementárnej protilátky. (McGlynn et al., 1999)

3.3.2 Stanovenie reparácie DNA

Modifikácia kométovej analýzy je v súčasnosti hojne využívaná na stanovenie reparačnej schopnosti buniek. Prvou štúdiou, ktorá sa zaoberala touto technikou bola publikácia Ostlinga a Johansona (1984), ktorí študovali opravu jednoreťazcových zlomov v bunkách L5178Y-S (myšacie bunky lymfómu) po expozícii gamma radiácií. (Ostling et Johanson, 1984)

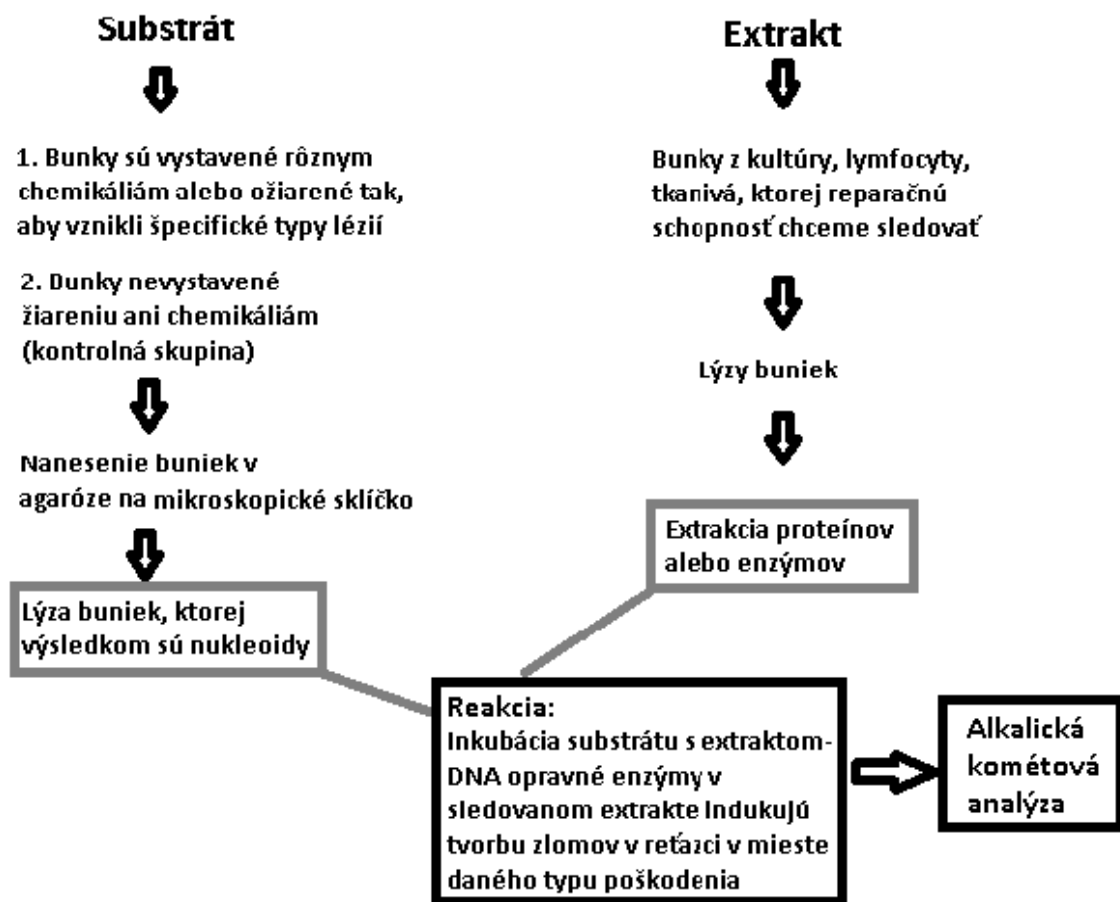
3.3.2.1 Princíp metódy reparácie

Základným princípom je stanovenie reparačnej schopnosti buniek po vystavení špecifickým enzýmom, ktoré odhalia konkrétny typ lézie. (Azqueta et al., 2014) Reparačné mechanizmy zabezpečujú udržiavanie integrity genómu a v jednoduchosti ich môžeme rozdeliť na báзовú a nukleotidovú excíziu reparáciu. Oba tieto procesy zahŕňajú kooperáciu mnohých enzýmov. (Hansen et Kelley, 2000)

Prvotným krokom je tvorba jednoreťazcových zlomov po použití peroxidu vodíka alebo žiarenia (röntgenového, gamma) v substráte. Tvorba oxidovaných bází (8-oxoguanínu) je indukovaná pri použití fotosenzibilizátoru a viditeľného svetla. Alkylované bázy vznikajú po expozícii alkylačným činiteľom (metansulfonát) a diméry pyrimidínov sú produkované po pôsobení UV žiarenia. Substrát môže obsahovať nadbytočné množstvo skúmaných typov poškodení, ale iné typy musia tvoriť minimum. (Azqueta et al., 2009) Na druhú stranu je potrebné určiť dostatočnú dávku radiácie a chemikálií, aby sa dosiahlo menšieho počtu lézií, ako je saturačná kapacita opravnej schopnosti buniek.

(Azqueta et al., 2014) Preto je dôležité optimalizovať dobu expozície činiteľa, za pomoci ktorého dochádza k tvorbe špecifických typov poškodení.

Ďalšou podstatnou kontrolou pred vznikom falošne pozitívnych výsledkov je paralelná inkubácia nepoškodených nukleoidov s bunkovým extraktom a vylúčenie pôsobenie endonukleáz. (Azqueta et al., 2009) V prípade zisťovania BER použijeme nukleoidy obsahujúce 8-oxoguanín a v prípade NER pracujeme s nukleoidmi obsahujúcimi diméry pyrimidínov.



Obrázok 3: Schéma stanovenia reparačnej schopnosti buniek s použitím kométovej metódy

Vzniknuté nukleoidy obsahujúce špecifické lézie (substrát) sú inkubované s bunkovým extraktom, ktorý obsahuje určené množstvo reparačného enzýmu. (Collins et al., 1994) Princípom metódy je, že enzýmy NER nachádzajúce sa v bunkových extraktoch rozpoznávajú špecifické miesta poškodenia v DNA. Následne dochádza k excízii a v miestach lézií v substráte vznikajú zlomy ako výsledok reparačného procesu, ktoré sú detekované pomocou alkalickéj jednobunkovej elektroforézy (obrázok č. 3). Excízna

aktivita extraktu je závislá na koncentrácii proteínov. Na druhej strane, vysoká koncentrácia proteínov spôsobuje zníženie citlivosti metódy. (Langie et al., 2006)

Schopnosť extraktu zahájiť počiatočný krok reparácie je považovaný za krok limitujúci schopnosť opravy, a teda za krok, ktorý indikuje reparačnú aktivitu skúmaných buniek. Dôležitou súčasťou je použitie deoxyribonukleotidov a ATP. (Collins et al., 1994)

V hodnotení sa využívajú parametre Tail Moment a percento fluorescencie vo chvoste, ktorých zvýšenie určuje NER kapacitu v bunkových extraktoch. (Hansen et Kelley, 2000) Popis jednotlivých parametrov sa nachádza v ďalších kapitolách.

Rýchlosť opravy rôznych typov poškodení sa rôzne líši. Oprava jednoreťazcových zlomov trvá menej ako hodinu, u dvojreťazcových zlomov sú to hodiny. Na základe tohto faktu je potrebné analyzovať rýchlosť reparácie vo viacerých intervaloch a stanoviť poločas reparácie. (Collins et Azqueta, 2012)

Pri stanovení cross linkov je stanovenie iné. Medzireťazcové spoje totiž brzdia pohyb rozvoľnenej časti DNA pri elektroforéze. Preto sa cross linky určujú na základe skrátenia chvosta kométy a zvýšenia intenzity chvosta kométy v porovnaní s bunkami bez expozície. (Spanswick et al., 2010)

Niektoré typy reparácie sa môžu detekovať v rámci stanovenia miery poškodenia, keďže pri určitých typoch poškodení (po UV-C, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidíne) dochádza k oprave pomocou excíznej bázovej reparácie, čo spôsobí vystrihnutie bázy (= jednoreťazcový zlom). (Alapetite et al., 1996) U niektorých typov poškodení (po vystavení ionizujúcemu žiareniu) môže nastať problém so stanovením miery reparácie vzhľadom k veľmi rýchlej oprave poškodených častí (3-30 minút). (Peggy et Banáth, 2006)

3.3.2.2 Štúdie zamerané na rýchlosť reparácie

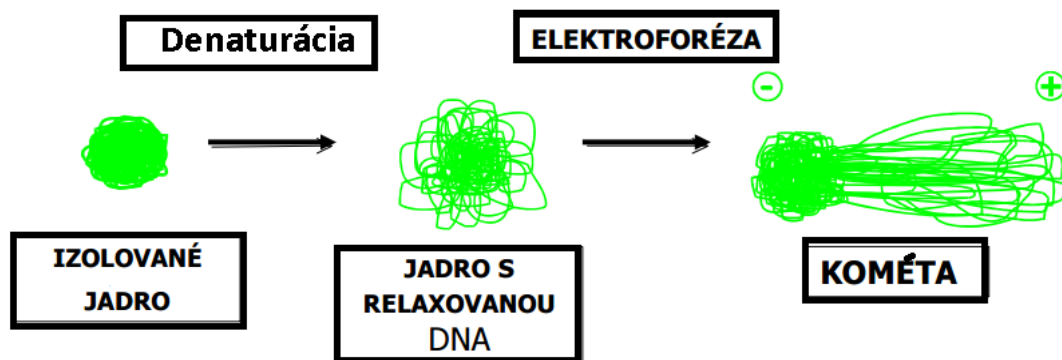
Stanovenie reparačnej schopnosti DNA sa stáva čoraz obľúbenejším parametrom pri sledovaní ľudského biomonitoringu. Z výsledkov fenotypizačných štúdií (zameraných na aktivitu opravných enzýmov) je stále možné získať viac užitočných informácií ako z expresie daných génov. Výsledky výskumov sa však nezhodujú. Štúdie poukazujú na pozitívny, negatívny, ale aj nulový efekt enviromentálnych činiteľov, ako aj vplyvu nutričných faktorov. Vzhľadom k veku bolo preukázané, že sa rýchlosť reparácie

nemení. (Collins et al., 2012) Epidemiologické štúdie poukazujú na rozsiahle inter-individuálne rozdiely v citlivosti na kancerogény v prostredí, a teda na možný vznik rakoviny. Predpokladá sa, že tento rozdiel čiastočne vzniká na základe genetických rozdielov v reparačných procesoch. Niektoré štúdie toto tvrdenie potvrdzujú svojimi experimentmi, ktoré poukazujú na spojitosť medzi polymorfizmami v opravných génoch a rizikom pre vznik rakoviny. (Andrew et al., 2005; Lovatt et al., 2005)

V štúdií Alleva a kol. bolo zistené, že reparačná schopnosť vzrastá 24 hodín po ortopedickej operácii. V rovnakej štúdií došli vedci k výsledku, že reparačná schopnosť korelovala s množstvom jednoreťazcových zlomov, ktoré vznikli ako výsledok reparačnej schopnosti (po 24 hodinách). Naopak negatívna korelácia vznikla medzi počtom oxidovaných báz po zavedení anestézie a rýchlosťou reparácie, z čoho môže vyplývať záver, že počas a po operačnom zákroku dochádza k útlmu reparačnej schopnosti buniek (študovaných lymfocytov). (Alleva, 2003) Nedávne štúdie dokonca dokazujú, že u niektorých typov nádorov sa zvyšuje schopnosť opravy poškodenej DNA, čo môže zvyšovať ich rezistenciu na terapeutické liečivá a znižovať ich účinnosť. (Galvao et al., 2009; Kumari et al., 2008)

3.3.3 Princíp kométovej metódy

V tomto kroku sa cesty stanovenia oxidatívneho poškodenia a reparácie spájajú. Predpokladom je využitie kombinácie gélovej elektroforézy a fluorescenčného mikroskopu ako prostriedku, schopného vizualizovať pohyb poškodenej časti DNA mimo základný guľatý tvar buniek zafixovaných v agarózovom géle. (COMET ASSAY FORUM, 2006; Dusinska et Collins, 2008; Olive et Banáth, 2006; Tice et al., 2000) Lyzačný roztok s vysokomolárnym chloridom sodným a detergentom zabezpečí odstránenie membrán, cytoplazmy a nukleoplazmy, zničí nukleozómy a takmer všetky históny. Po lýze zostáva matrix jadra - štruktúra, ktorá pozostáva z ribonukleovej kyseliny (RNA), proteínov a DNA, tzv. nukleoid. DNA stále zotrúva v superhelikálnej forme, takže sa nemôže voľne otáčať (tvorí zhluk slučiek, nie je lineárna). (Ahuja et Saran, 2001; Azqueta et Collins, 2013; Cook et al., 1976; Dusinska et Collins, 2008; Nandhakumar et al., 2011; Silvina et al., 2001; Tice et al., 2000; Vidya et al., 2014)



Obrázok 4: Zmeny v organizácii DNA po denaturácii (alkalickom rozpletaní) a po elektroforéze

V prípade prítomnosti zlomov v reťazcoch, dochádza k rozvoľneniu poškodenej časti v dvojreťazci DNA, ktorá nadobúda negatívny náboj a počas elektroforézy je unášaná smerom ku kladnej nabitej elektróde (anóde) (obrázok č. 4). V prípade, že bunka zlomy neobsahuje, migrácia je zastavená vplyvom malého množstva voľných koncov a veľkého rozmeru fragmentov (veľká molekulová hmotnosť). (COMET ASSAY FORUM, 2006; Dusinska et Collins, 2008; Olive et Banáth, 2006; Tice et al., 2000)

3.3.3.1 Farbenie kométiiek

Po elektroforéze nasleduje neutralizácia a farbenie. Použitie farbív závisí na potrebách užívateľa a metóde skórovania. Z fluorescenčných farbičiek sa najviac využíva etídium bromid, propídium jodid, DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol), SYBR Green I a YOYO. (Hartmann et al., 2001) U nefluorescenčných techník sa využíva vizualizácia nitrátom strieborným. Použitie zväčšenie závisí na type stanovovaných buniek, veľkosti migrácie, obmedzeniach mikroskopu a obrazového systému. Najbežnejšie používaním zväčšením je rozmedzie medzi 200x a 400x. (Hartmann et al., 2003)

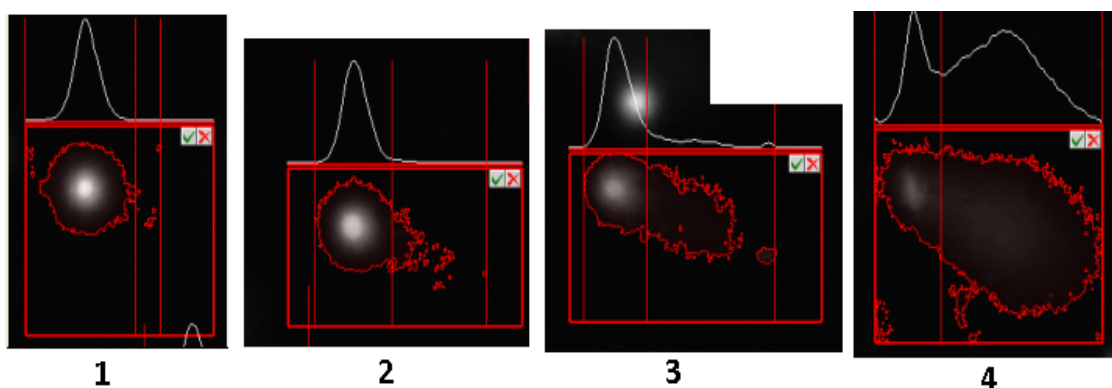
Etídium bromid je pravdepodobne najčastejšie používaným farbivom. Jedná sa o interkalačné farbivo, ktoré sa vmedzeruje medzi dvojreťazec DNA- lepšie sa viaže na dvojreťazcovú ako jednoreťazcovú DNA. Po ňom je druhé najčastejšie využívané DAPI. Farbivo sa viaže do veľkého žliabku, a preto miera fluorescencie závisí na výskyte dvojreťazcovej DNA. Keďže menej interaguje s jednoreťazcovou DNA, pri vyššom výskyte jednoreťazcovej DNA bude celková fluorescencia znížená. (Colins, 2004)

Stanovenie relatívneho množstva migrujúcej DNA poskytuje jednoduchý spôsob stanovenia množstva zlomov v jednotlivých bunkách. (COMET ASSAY FORUM, 2006; Dusinska et Collins, 2008; Olive et Banáth, 2006; Tice et al., 2000) Metódu je možné využiť na stanovenie množstva jednoreťazcových zlomov a dvojreťazcových zlomov, cross-linkov (DNA-DNA/ DNA-proteín/ DNA-liečivo), poškodených báz alebo apoptotických jadier. (COMET ASSAY FORUM, 2006)

3.3.3.2 Hodnotenie komét

Vo všeobecnosti sa dá vyhodnocovanie komét rozdeliť do niekoľkých skupín: **vizuálne** alebo **za použitia softvéru, manuálne alebo automatické**. **Vizuálne hodnotenie** dáva kvalitatívne výsledky, ale je subjektívne. **S použitím softvéru** je možné získať výsledky kvantitatívne s dobrou reprodukovateľnosťou. **Manuálne hodnotenie** vyžaduje experta schopného nastaviť potrebné parametre k hodnoteniu (správny jas pre odlišenie pozadia, správne označenie hlavy kométy). Programy pre **automatické hodnotenie** zlepšujú rýchlosť analýz, umožňujú väčší počet analyzovaných buniek za kratší čas, čo je dôležitý faktor pri zhodnocovaní efektívnosti analýzy a zbere štatistických dát. Vizuálne hodnotenie je rýchlym spôsobom analýzy. Hodnotenie 50 komét zvyčajne nezaberie viac ako 10 minút. (Hartmann et al., 2003)

Na hodnotenie sa využívajú obrazové analýzy, to znamená vizuálne zobrazenie komét (obrázok č. 5). V súčasnosti je veľký výber špecializovaných softvérov. Niektoré sú dostupné aj vo voľnej verzii na internete.



Obrázok 5: Ukážka vyhodnocovania komét pomocou obrazového softvéru LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic)

Alternatívou je vizuálne hodnotenie komét a ich **rozdelenie do skupín** podľa množstva DNA distribuovanej do chvosta. Zvyčajne sa využíva číslovanie 0 (žiadny chvost) po 4

(takmer všetka DNA je vo chvoste). Tu nastáva problém s ľudským faktorom a schopnosťou ľudského oka a mozgu správne zaradiť kométu do danej skupiny aj po opakovaných hodnoteniach. Avšak bolo zistené, že existuje výborná korelácia medzi hodnotením do 5 skupín a počítačovou obrazovou analýzou.

Parametre hodnotenia

Na základe výstupu zo softvéru je možné hodnotiť hneď niekoľko parametrov. Existuje ich asi 34. (COMET ASSAY FORUM, 2006) Odporúčaným parametrom je **per cento DNA vo chvoste** kométy, pretože udáva dobrú linearitu s dávkou škodlivého činiteľa. **Percentuálne zastúpenie Tail DNA je lineárne závislé na počte zlomov.** Táto závislosť bola stanovená pomocou röntgénového žiarenia (Collins, 2004). Obmedzenie závislosti nastáva pri počte zlomov, ktoré sa blížia k saturačnému limitu (všetka DNA je vo chvoste kométy), kde sa krivka odkláňa od linearity. (Collins a kol., 2008). Hlava kométy obsahuje vysokomolekulárnu DNA, zatiaľ čo chvost pozostáva z voľných fragmentov. Nepoškodené bunky neobsahujú rozvoľnené časti a preto chvosty nevytvárajú. Kométy sú vizualizované real-time pomocou vhodného softvéru. (Olive et al., 1990)

Dĺžka chvosta zvyčajne dosahuje svojho maxima aj pri nízkych hodnotách poškodení. Sklíčka by mali obsahovať dostatočný počet buniek v dostatočnej kvalite, aby bolo možné dosiahnuť zmysluplného posúdenia poškodenia DNA. Sklíčka by mali byť hodnotené kódované (pre objektívne hodnotenie) a ako minimum sa považuje 100 komét na 1 vzorku. (Wiklund et Agurell, 2003)

Tail moment je založený na meraní množstva DNA vo chvoste a jej distribúcií, a je popri stanovení dĺžky chvosta a percenta DNA vo chvoste najviac využívaným parametrom. Niektorí odborníci neodporúčajú používať tail moment ako dobrý parameter, pretože podáva najmenej informácií. Nemá žiadne uznávané jednotky a nepodáva žiadne informácie o vzhľade komét. Bol by použiteľný v prípade, že by všetci využívali rovnaké jednotky a mali rovnako nakalibrovaný analytický systém. (Olive et Banáth, 2006)

Kométovou analýzou je možné stanoviť zlomy reťazca, ale nie všetky typy poškodenia. Tieto ostatné typy poškodenia môžu byť ale konvertované do zlomov po pôsobení špecifických endonukleáz. Lézie ako alkylované bázy alebo fosfátové skupiny sa menia

na zlomy po inkubácii v alkalickom roztoku. Dostatočným zvýšením pH (na pH=13, pri použití 0,3M NaOH) sú premieňané alkali-labilné miesta na zlomy. Pri použití 0,03M NaOH (pH=12,1) je metóda omnoho menej účinná. Ďalším dôležitým faktom je tvrdenie, že každý typ lézie má iné pH optimum. Takže stále zostáva nutnosťou optimalizovať používanú metódu. (Olive et Banáth, 2006)

3.3.4 Výhody metódy

Táto metóda má oproti iným používaným metódam pre stanovenie typov DNA lézií hneď niekoľko výhod. Prvou je jej neinvazívnosť a malé množstvo buniek potrebných k analýze- postačí 100 buniek a analýza pomocou softvéru je naozaj rýchla (vzhľadom k iným cytogenetickým technikám, ktoré zaberú niekoľko dní práce). Druhou výhodou je nahradenie rádioizotopov pri vizualizácii komét inými farbivami, ktoré umožnili stanovenie v akýchkoľvek bunkách s jadrom. Ďalšou výhodou je možnosť porovnať rozdiely v odpovedi na poškodzujúce vplyvy v rámci rovnako exponovanej populácie. (Olive et Banáth, 2006)

Stále však zostáva predmetom diskusií, zostavenie univerzálneho protokolu a analýzy, nastavenie vhodného množstva a typu buniek, vhodnej koncentrácie agarózy a lyzačných pufrov na zabezpečenie správnej citlivosti, spoľahlivosti a reprodukovateľnosti metódy. (Banáth et al., 2001; Bauch et al., 1999; Tice et al., 2000)

3.3.5 Faktory ovplyvňujúce kométovú analýzu

Medzi rôznymi verziami metódy, alkalická verzia je odporúčaná ako najuniverzálnejšia na detekciu viacerých typov lézií. Je možné detekovať jedno a dvojreťazcové zlomy, alkali-labilné miesta, ktoré sa pri alkalickej elektroforéze menia na jednoreťazcové zlomy a jednoreťazcové zlomy ako produkty nedokončenej reparácie. Prispôbením podmienok, je možné stanoviť DNA-DNA a DNA-proteínové cross linky, ktoré sa pri absencii iných typov poškodení, dajú určiť z relatívneho zníženia migrácie DNA v porovnaní s kontrolou (bez cross linkov). Pri výskyte týchto typov lézií dochádza k spomaleniu pohybu DNA vo chvoste kométy. Spoľahlivosť a reprodukovateľnosť metódy je ovplyvňovaná mnohými faktormi. Pre získanie optimálnych výsledkov je dôležité dodržiavanie stanoveného protokolu analýzy. Správna detekcia zmenenej DNA závisí na viacerých parametroch ako je **koncentrácia agarózy, pH, teplota, napätie, prúd a dĺžka elektroforézy**. (Hartmann et al., 2003)

Významným faktorom je koncentrácia použitej agarózy, ako aj **dĺžka lýzy** (najmä u alkalickej CA). (Azqueta et Collins, 2013) Každý krok spracovania buniek (skladovanie, extrakcia, analýza) prispieva k tvorbe arteficiálneho poškodenia DNA. (Al-Salmani et al., 2011) Pri dlhšej inkubácii v lyzačnom roztoku totiž dochádza k zvýšeniu rozvoľnených alkali-labilných častí a nárastu % DNA vo chvoste kométy. Ďalšími dôležitými faktormi sú nastavenia elektroforézy- vložený prúd, teplota a dĺžka elektroforézy. (Azqueta et Collins, 2013) Chovanie buniek v elektrickom poli je ovplyvnené aj **fázou bunkového cyklu**. V prípade, že sa bunka nachádza v S fáze bunkového cyklu, replikačné vidličky sa pri alkalickej elektroforéze správajú ako jednoretazcové zlomy- takže DNA migruje rýchlejšie. Naopak v prípade neutrálnych podmienok DNA tvorí replikačné bubliny, ktoré brzdia pohyb DNA počas elektroforézy. (Peggy et Banáth, 2006)

Niekedy je náročné stanoviť poškodenie vzniknuté pôsobením viacerých činiteľov s odlišnými mechanizmami v rámci jedného experimentu. Napríklad nie je možné stanoviť súčasne pôsobenie látky, ktorá spôsobuje tvorbu jednoretazcových zlomov spolu s látkou, ktorá zvyšuje tvorbu cross-linkov. Dôvodom je fakt, že intramolekulárne cross-linky zamedzujú detekcii zlomov jedného reťazca. Z tohto dôvodu sa odporúča, využívať kombinácie viacerých metód, aby bolo možné, čo najlepšie určiť biologický dopad poškodenia genetickej informácie. (Merk et Speit, 1999)

Ďalej je dobré uvažovať aj nad myšlienkou, že poškodenie DNA nemusí jednostranne nastať priamym pôsobením činiteľa, ale je v určitej miere spôsobené rozpadom mitochondriálnej a cytoplazmatickej membrány, čo zvyšuje výskyt apoptotických a nekrotických buniek. Iný možný problém môže nastať pri rýchlej reparácii buniek- je preto potrebné pracovať na ľade (pri teplote 4°C), kedy sa proces opravy buniek spomalí. (Peggy et Banáth, 2006)

3.3.6 Aplikácie kométovej analýzy v medicíne

Kométovej metóde sa stala štandardizovanou metódou na stanovenie poškodenia deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) koncom 90. rokov a na začiatku 21. storočia a množstvo štúdií s jej využitím stále narastá. (Colins, 2004)

Metóda sa využíva pri sledovaní **vplyvu náhodnej alebo stálej expozície genotoxickým látkam**, pri sledovaní ochranného vplyvu antioxidantov alebo

u stanovenia reparačnej schopnosti buniek. (Azqueta et al., 2014) Comet assay môže byť použitá nielen na **biomonitoring** ale aj na **ekologické štúdie**- najčastejšie sa jedná o monitoring závislosti enviromentálnej kontaminácie škodlivinami a ich vplyvom na živočíchy, na ktoré daná škodlivina priamo pôsobí. (Mollet, 2005; Speit et Hartmann, 2005) Ďalšou možnou aplikáciou je stanovenie **predispozície k určitému ochoreniu**, **monitorovanie liekovej terapie**, či určenie spojitosti medzi poškodením DNA a expozíciou UV alebo poškodením DNA spermíí a **mužskou neplodnosťou**. (Jha, 2008)

Dôležitým využitím je aj **štúdium chronických a degeneratívnych ochorení**, kde pacienti s diabetom a pacienti s Alzheimerovou alebo Parkinsonovou chorobou, vykazujú vyššie hodnoty jednoreťazcových zlomov a oxidatívneho stresu vzhľadom k zdravým jedincom. (Collins et al., 2014; Hedge et al., 2011; Kadioglu et al., 2004; Liao et al., 2009; Thanan et al., 2015)

Iné modifikácie tejto metódy (najmä **určovanie reparačnej kapacity buniek**) sa využívajú u *in-vitro* stanovení na bunkových kultúrach, *in-vivo* na zvieracích tkanivách, ale hlavne v ľudskom biomonitoringu. (Azqueta et al., 2014) Reparačná kapacita jednotlivca je považovaná za hodnotný biomarker pri určení náchylností organizmu ku vzniku mutácie a rozvoju rakoviny. Vysoká reparačná aktivita je spájaná so znižovaním výskytu neopravených typov poškodení, ktoré vznikajú pri delení bunky. Na druhej strane odráža výšku expozície DNA poškodzujúcim činiteľom, ktoré indukujú tvorbu reparačných enzýmov. V súčasnosti je potrebné túto problematiku detailnejšie preskúmať. (Azqueta et al., 2014)

V posledných rokoch bol predmetom záujmu **vplyv nutričných faktorov** na reguláciu DNA opráv. Vo všeobecnosti sa dá tvrdiť, že reparačná schopnosť bunky je konštitutívna a závisí na okolitých podmienkach (veľký vplyv exogénnych faktorov). Rozdiely interindividuálne sú závislé na genotype. Polymorfizmy v reparačných génoch vykazujú efekt na dané enzymatické aktivity reparačných enzýmov. (Azqueta et al., 2014)

3.4 Anestézia

Inhalačné anestetiká sú často používané v procese celkovej anestézie pacientov podstupujúcich rôzne operačné zákroky. Chemicky sa jedná o malé hydrofóbne

molekuly, ktoré prechádzajú lipofilnými membránami bunky a spôsobujú depresiu respirácie a oxidatívnej fosforylácie v mitochondriách. Vďaka priamej interakcii s mitochondriálnym elektrónovým transportným reťazcom dochádza po expozícii k vzniku malého množstva ROS alebo nepriamo cez signálnu kaskádu zloženú z G-proteínových receptorov, proteín kinázy a mitochondriálnych ATP-dependentných draselných kanálov. Takýto útlm respirácie môže spôsobiť únik elektrónov z matrix mitochondrií a zvýši tvorbu ROS. (Bienengraeber et al., 2005)

3.4.1 Rozdelenie anestetík

Každoročne podstúpi operačný zákrok okolo 100 miliónov ľudí. Aj napriek tomu, že sa bezpečnosť anestézie zlepšila, stále sa diskutuje o jej negatívnych vplyvoch. Najčastejšie používanými typmi anestetík sú izoflurán (ISF) a sevoflurán (SVF). (Braz et al., 2011)

Izoflurán (ISF) je inhalačné anestetikum využívané pri udržiavaní anestetického účinku, zatiaľ čo **propofol** je krátkodobou účinné **intravenózne anestetikum** využívané pri uvedení a udržiavaní celkovej anestézie. U propofolu boli uvedené aj mnohé neanestetické účinky. (Vasileiou et al., 2009) Rôzne *in vitro* štúdie preukazujú ochranný účinok propofolu voči mnohým radikálom a ROS. Zostáva ale stále otázkou, či tento efekt nastáva aj *in vivo* u pacientov. (Tsuchiya et al., 2010)

ISF bolo prvý krát syntetizované v roku 1965 a uvedené do praxe až o niekoľko rokov neskôr.

V roku 1976 vyšla štúdia, že toto anestetikum spôsobuje rakovinu pečene u potkanov (Corbett, 1976) Toto tvrdenie sa však nepotvrdilo. (Eger et al., 1978) Avšak ISF je s výhodou využívaný najmä vďaka nízkej rýchlosti metabolizmu a nízkej rozpustnosti, čo skracuje dobu nutnú na zotavenie. (Braz et al., 2011b)

K objavu **sevofluránu (SVF)** došlo tiež v 70-tych rokoch, ale do klinickej praxe bol zavedený až o 30 rokov neskôr (1995). SVF v rámci svojho metabolizmu prechádza dehydrofluoráciou reakciou s chemickými zložkami anestetického zariadenia a mení sa na mnoho malých metabolitov, ako napríklad fluoromethyl 2,2-difluoro-1-(trifluorometyl)vinyl éter (compound A). (Yamakage et al., 1995) U tohto typu anestetika bol preukázaný negatívny vplyv na DNA, a to v dôsledku pôsobenia jeho toxického metabolitu (compound A), keďže vďaka nemu dochádzalo k zvýšenej

výmene sesterských chromatíd v ovariálnych bunkách škrečkov. Neexistujú však žiadne dáta, ktoré by SVF priamo spájali s mutagenitou. (Eger et al., 1997) Amesov test mutágeny vplyv nepreukázal. (Morio et al., 1992)

Jedná sa o **inhalačné anestetikum**, podávané vo forme pary. Výhodou použitia SVF je jeho nízky rozdeľovací koeficient medzi krvou a plynom, čo má za následok rýchlejšie prebudenie a skrátenie času potrebného na zotavenie. Plyn má sladkavú vôňu a využíva sa pri zavedení anestézie deťom aj dospelým. (ADC, 2016) SVF sa využíva najmä vzhľadom k jeho výhodám - má nízku rozpustnosť, nie je dráždivý a dokonca bolo preukázané, že má určitú antioxidačnú kapacitu. (Allaouchiche et al., 2001) Výsledky experimentov *in vitro* a *in vivo* zameraných na genotoxický vplyv tohto anestetika sú stále rozporuplné. (Alleva et al., 2003; Brozovic et al., 2010; Kadioglu et al., 2009)

Potrebná dávka je individuálne prepočítaná podľa veku a klinického stavu pacienta. Na začiatku je možné dosiahnuť anestetický účinok podávaním 0,5-1,0% sevofluránu v kombinácii s kyslíkom alebo oxidom dusným. Dávka sa postupne zvyšuje až na maximum (8% koncentráciu). U dospelých dochádza k potrebnej anestézii už za menej ako 2 minúty pri použití 5% SVF. U detí je to do 7 % SVF. Udržanie narkózy je možné predpísanými koncentraciami samostatného anestetika alebo kombináciou s oxidom dusným. (ADC, 2016) Hraničné hodnoty halogénovaných anestetík v USA sú stanovené na hodnotách 2 ppm a 25 ppm pre oxid dusný. V Európe sa tieto hodnoty pohybujú medzi 2- 20 ppm. (Szyfter et al., 2004)

Propofol (PF) patrí medzi **intravenózne anestetikum** a jeho praktické využitie začalo v USA v 90-tych rokoch. Patrí do skupiny alkylfenolov, ktoré obsahujú fenolickú štruktúru. Táto štruktúra sa podobá alfa-tokoferolu (vitamínu E), preto sú mu pripisované antioxidačné vlastnosti. (Murphy et al., 1992)

Dávka je pripravovaná individuálne, podľa reakcií pacienta na počiatočnú dávku. U dospelých pacientov sa vyžaduje dávka 1,5-2,5 mg/kg hmotnosti. Pri minimálnych operáciách je dávka u dospelých (anestetikum vo forme emulzie) na udržiavanie anestetického účinku počas zákroku 4mg PF/kg hmotnosti za hodinu. U pacientov s nestabilným klinickým stavom je dávka upravovaná na základe závažnosti stavu. U detí je počiatočná dávka 2,5 mg PF/kg hmotnosti. U detí od 1 mesiaca do 3 rokov dávka kolísala medzi 2,5-4mg/kg hmotnosti. (ADC, 2013)

Existuje stále mnoho nejasností o jeho škodlivom účinku. Niektoré štúdie poukazujú na jeho negatívny vplyv, avšak ďalšie štúdie toto tvrdenie vylučujú a obhajujú názor, že toto anestetikum nie je škodlivé po podaní deťom aj dospelým. (Braz et al., 2009; Krause et al., 2003)

3.4.2 Účinky anestetík

K eliminácii inhalačných anestetík dochádza cez pľúca vydychovaním, ale malá časť je metabolizovaná v pečeni, obličkách a pľúcach. Vzhľadom k cene, bol po dlhú dobu hlavným anestetikom **halotán**, a to najmä v menej rozvinutých krajinách. Bohužiaľ došlo k zisteniu, že toto anestetikum spôsobuje vznik fulminantnej hepatitídy. (Jaloszynski et al., 1999)

Genotoxický vplyv polyfluorovaných anestetík je spájaný s ich priamou interakciou s časťami dvojreťazca DNA (pravdepodobne dochádza k alkylácii N-7 pozície purínov) alebo nepriamo, vďaka indukcii tvorby reaktívnych molekúl. (Alleva et al., 2003) Reaktívne formy kyslíka (ROS) indukujú tvorbu rôznych typov poškodení- AP miest (apurínových, apyrimidínových), reťazcových zlomov a oxidovaných báz. Radikály tak pôsobia priamo na DNA. (Epe, 1995)

Halotán je teda nahrádzaný inými, menej toxickými halogénovanými étermi- **ISF, SVF, desfluránom a enfluránom**. Jedným zo známych vedľajších účinkov týchto anestetík je podráždenosť alebo delírium najmä pri prebúdzaní z anestézie. (Meyer et al., 2007)

SVF má nízku rozpustnosť v krvi a tkanivách a je metabolizovaný na voľný fluorid a hexafluoroizopropanol, ktorý následne podlieha konjugácii s kyselinou glukurónovou a odchádza z tela ako súčasť moču. 5% vdychovaného anestetika je metabolizované cytochrómom P450 (izoenzýmom 2E1). V štúdií Brozovica a kol. dochádzalo k zvyšovaniu poškodenia DNA v orgánoch pokusných myší po 6 hodinách od expozície, asi zjavne vďaka biotransformácii anestetika a kumulácii škodlivých metabolitov, ktorých efekt sa prejavil navýšením poškodenia a znížením reparačnej schopnosti buniek. (Brozovic et al., 2010)

Toxické reakcie po SVF sú asociované s jeho metabolitmi a po operácii dochádza k indukcii pečenej enzýmov (Pihlainen et Ojanperä, 1998) a hladiny aspartát aminotransferázy, alanín aminotransferázy a alkalickej fosfatázy dosahujú najvyšších

hodnôt 3 dni po operácii. (Nishiyama et al., 2004) Toxicita je ovplyvnená aj jeho interakciou s enzýmami alebo s inými liečivami. SVF priamo ovplyvňuje tvorbu peroxynitritu, superoxidu, intracelulárneho peroxidu a oxidu dusného v periférnych polymorfonukleárnych leukocytoch po 1 hodine po liečbe. (Wong et al., 2006) Podľa Kharasche (1995) by malo ideálne anestetikum odolávať biotransformácii, pretože jeho toxicita súvisí s biotransformáciou na toxický metabolit. (Kharasch, 1995) Ďalej v prítomnosti SVF dochádza k deplécii glutatiónu v neutrofiloch. Takto vzniknutý oxidačný stres má negatívny vplyv na ľudské zdravie. (Wong et al., 2006)

Ďalším známym faktom je, že inhalačné anestetiká spôsobujú zmeny v imunitnom systéme, čoho výsledkom je lymfocytopenia po operačnom zákroku. (Oka et al., 1996) Niektoré *in vitro* štúdie dokonca uvádzajú, že **SVF aj ISF** spôsobujú **zvýšenú apoptózu** lymfocytov, ktorá je priamo prepojená s nadprodukciou ROS. (Delogu et al., 2001; Matsuoka et al., 2001) Jedna zo starších štúdií zase uvádza, že pri expozícii anestetikám dochádza k poškodeniu genetického materiálu rovnako, ako je to spôsobené fajčením 11- 20 cigariet denne. (Hoerauf et al., 1999)

3.4.2.1 Štúdie zamerané na účinky anestetík

Genotoxický alebo mutagénny vplyv anestézie sa stal predmetom záujmu rôznych štúdií. Predpokladá sa, že anestézia prispieva k poškodeniu DNA. (Baden et Simmon, 1980; Sardas et al., 2006) Existujú rôzne štúdie, ktoré porovnávajú vplyv samostatných anestetík, zrovnávajú získané poznatky medzi rôznymi typmi a skupinami anestetík a ich vzájomnými kombináciami.

Výsledky štúdií sa ale navzájom nezhodujú. Rozdiely vo výsledkoch štúdií môžu byť ovplyvnené mnohými faktormi. Rozdielna dĺžka expozície, interindividuálna citlivosť závislá na genetických faktoroch, rozdielne experimentálne podmienky, typ a dĺžka operácie a individuálne parametre pacientov (vek, fyzický stav, liečivá použité pri zákroku, skryté komorbidity) ale aj spôsob štatistickej analýzy, časové a miestne rozdiely, prispievajú k rozdielnosti výsledkov analýz. (Izdes et al., 2009.)

Výsledky štúdie Braza a kol., ktorí sledovali poškodenie DNA pred a po podaní anestézie pri minimálnom otorinologickom zákroku, podávajú negatívne výsledky svojich meraní. Pri operačnom zákroku došlo k minimálnemu alebo takmer žiadnemu navýšeniu poškodenia DNA. (Braz et al., 2011) Negatívny výsledok ukazujú aj *in vitro*

testy s lymfocytmi, na ktoré sa nechal pôsobiť SVF v koncentrácii 10mM aj u anesteziológov pri náhodnej expozícii. (Syfter et al., 2004)

Rovnako aj v experimente Braza a kol. došli výskumníci k záveru, že použitá anestézia neprispieva k zvýšeniu oxidatívneho poškodenia DNA u pacientov bez komorbidít, ktorí podstupia operačný zákrok. (Braz et al., 2015)

Na druhej strane, ako protiklad, uvádzam štúdie, u ktorých bol preukázaný negatívny vplyv anestetík na poškodenie DNA. **Bolo preukázané, že niektoré anestetiká spôsobujú poškodenie DNA.** (Eroglu et al., 2010; Oršolić, 2012)

U 12 pacientov klasifikovaných ako ASA I a II (mierne ochorenie) došlo počas operácie brucha k navýšeniu poškodenia DNA. (Karabiyik et al., 2001) Rovnako aj u skupiny neurologických pacientov, ktorým bola podaná anestézia v kombinácii ISF a oxidu dusného s prídavkom kyslíka, došlo k nárastu poškodenia DNA. (Reitz et al., 1993)

Braz a kol. navrhli experiment, v ktorom porovnávali hladiny antioxidantov v plazme a stanovovali navýšenie oxidatívneho poškodenia DNA (vznik 8-oxoguanínu) u 30 pacientov rozdelených do dvoch skupín podľa typu použitej anestézie (ISF, PF). Výsledky výskumu poukazujú na negatívny vplyv operačného zákroku pod anestéziou na antioxidantný systém- došlo k zníženiu plazmatických hladín alfa-tokoferolu, ostatné antioxidanty zostali nezmenené (kyselina močová, karotenoidy, retinol). Obidva typy anestézie spôsobili nárast kapacity hydrofilného a celkového antioxidantného systému. K nárastu 8-oxoguanínu nedošlo v žiadnej zo skupín. V skupine s PF došlo k zvýšeniu gama-tokoferolu. (Braz et al., 2015)

V štúdií Jalszyńskiego a kol., autori poukazujú na genotoxický vplyv halotánu a slabú genotoxickú aktivitu ISF pri pôsobení na ľudské lymfocyty *in vitro*. Tento efekt sa prejavil vo forme zvýšeného počtu jednoreťazcových zlomov v DNA bunky po predchádzajúcom vplyve anestetika. Stanovenie nárastu zlomov bolo stanovené kométovou metódou. Fragmentácia DNA, ktorú spôsobil efekt halotánu, nakoniec vyústila do bunkovej smrti, pretože bunka nebola schopná opraviť poškodenú genetickú informáciu. Na základe toho došlo v závere štúdie k zhodnoteniu, že ISF má účinky genotoxické, ale halotán má okrem spomínaných účinkov aj účinky cytotoxické. (Jalszyński et al., 1999)

V štúdií zameranej na pôsobenie SVF počas ortopedickej operácie bol zistený nárast oxidatívneho poškodenia (nárast oxidovaných purínov a pyrimidínov) po operačnom zákroku. Následne v post-operačný deň došlo k zvýšeniu množstva jednoreťazcových zlomov, pravdepodobne vplyvom vzniku alkali-labilných miest počas reparácie. (Alleva et al., 2003) Rovnakí autori taktiež poukazujú na výsledky ďalšieho výskumu, vďaka ktorému bolo zistené, že SVF a ISF vykazujú podobné genotoxické vlastnosti u pacientov, ktorí podstúpili operáciu brucha. U tejto skupiny pacientov došlo k navýšeniu poškodenia po 60 až 120 minútach po začiatku anestézie. (Karabiyik et al., 2001) Vyššie množstvo lézií bolo objavené aj u pracovníkov náhodne exponovaných zbytkovým koncentráciám anestetík na operačnej sále. (Sardas et al., 1998) Iný experiment zase toto tvrdenie vyvracia- u 29 osôb dlhodobo pracujúcich pod vplyvom halogénovaných anestetík neboli zaznamenané zmeny v genetickej informácii v porovnaní s kontrolnou skupinou bez expozície. (Szyfter et al., 2004) Ďalšie experimenty sa zaoberali vplyvom anestézie u onkologických pacientov (pacienti s rakovinou prsa) pri mastektómii. (Kadioglu et al., 2009)

Laffon a kol. pozorovali významný nárast oxidatívneho poškodenie u zdravotných sestier na oddeleniach anestézie, ktoré náhodne vdychovali zostatkové množstvá anestetík. (Laffon et al., 2006) Rozgaj a kol. poukazujú na zvýšený výskyt chromozomálnych aberácií u personálu exponovaného anestetickým plynom, zatiaľ čo výmena sesterských chromatíd (SCE) nebola navýšená. (Rozgaj et al., 2001) Rovnako aj Chandrasekhar a kol. podávajú výsledky o náraste množstva poškodenej DNA u personálu na oddelení anesteziológie. Výsledky štúdie dokazujú negatívny vplyv náhodnej expozície kombináciám anestetík a jej vplyv na nárast genotoxicity. (Chandrasekhar, 2006)

Aj v experimentoch na myšiach autori dokázali, že u myši exponovaných SVF dochádza k zvýšeniu parametrov sledovaných kométovou analýzou (dĺžka chvosta, Tail moment aj intenzita DNA vo chvoste) a tvorby mikronuklea vo všetkých sledovaných orgánoch (obličky, pečeň a mozog) aj v leukocytoch. (Brozovic et al., 2010) Podľa Rozgaja a kol. (2009) pri náhodnej expozícii SVF, ISF a oxidu dusného dochádza k poškodeniu DNA. (Rozgaj et al., 2009)

4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Výber pacientov

Cieľom práce bolo posúdenie vplyvu operácie strednej závažnosti v celkovej anestézii na mieru oxidatívneho poškodenia DNA v lymfocytoch. V rámci našej práce bolo zozbieraných 20 pacientov (tabuľka č. 2), od každého pochádzali dve vzorky krvi- pred operáciou a po operácii (v priebehu ktorej podstúpili celkovú anestéziu). Pacientom boli odobrané 3 ml krvi v stanovených intervaloch. Pôvodným cieľom práce bolo ešte navyše stanovenie oxidatívneho poškodenia v rámci rekonvalescencie, a to deň po operácií. Bohužiaľ, tretí odber krvi sa nepodarilo získať (prílišné zaťaženie pacienta odbermi).

Štúdia bola navrhnutá ako pilotná, s prípadným ďalším zberom vzoriek pre iné súvisiace projekty. Účelom výskumu je prispieť získanými výsledkami k zlepšeniu diagnostiky, liečebnej praxe a pre účely lekárskeho výskumu. Získanie údajov by malo prispieť k rozšíreniu znalostí o vplyve operačných výkonov na oxidatívne poškodenie DNA a byť základom ďalšieho výskumu pri hľadaní preventívnych a/alebo protektívnych postupov s cieľom minimalizovať poškodenie DNA v súvislosti s invazívnymi intervenčnými postupmi v klinickej medicíne.

Kritéria pre zaradenie pacientov do štúdie boli nasledovné:

- vek 18- 60 rokov
- plánovaný traumatologický/ortopedický korektívny výkon s odhadom doby trvania minimálne 90 minút
- výkon je vykonaný v celkovej anestézii
- súhlas so zaradením do štúdie

Vylučovacie kritéria boli nasledovné:

- fajčenie v anamnéze
- alkoholizmus v anamnéze
- akútny medicínsky stav
- chronické zápalové ochorenie v anamnéze (napr. artritída, kolagenóza apod.)
- malignita v anamnéze alebo liečená v súčasnosti

Tabulka 2: Súhrnný zoznam údajov o pacientoch získaných pre náš experiment, typy podaných anestetík a údaje o priebehu anestézie

Číslo pacienta	Pohlavie	Vek (roky)	Dĺžka anestézie (min.)	Použité anestetiká	Priebeh operácie a poznámky
1	M	40	440	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	podané 4 TU EBR, krvná strata 1000 ml, bez komplikácií
2	M	62	90	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
3	F	33	180	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
4	M	61	270	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií - vek nad 60 rokov
5	M	32	45	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
6	M	22	110	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
7	M	71	170	Propofol, isofluran, midazolam, sufentanil,	bez komplikácií, kombinácia s RA - ISB, vek nad 60 rokov
8	F	41	120	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
9	F	28	100	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií
10	M	62			vyraďený zo štúdie
11	M	31	180	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií
12	M	18	280	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
13	M	66	360	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií - vek nad 60 rokov
14	F	41	220	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
15	F	26	200	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií
16	M	30	315	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií, kombinácia s RA - ISB
17	M	35	210	Propofol, sufentanil, sevofluran	vyraďený zo štúdie
18	F	52	165	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií
19	M	33	276	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	vyraďený zo štúdie
20	M	38	120	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
21	F	61	120	Propofol, sufentanil, sevofluran	bez komplikácií
22	M	28	165	Propofol, sufentanil, isofluran, oxid dusný	bez komplikácií
23	M	40	280	Propofol, midazolam, sufentanil, isofluran	bez komplikácií
24	F	50	160	Propofol, sufentanil, isofluran	bez komplikácií, kombinácia s RA - popliteálny blok
25	F	25	160	Propofol, sufentanil, sevofluran	bez komplikácií

- imunosupresívna terapia – prebiehajúca alebo ukončená v posledných 12 mesiacoch
- chemoterapia či ožiarenie – prebiehajúca alebo ukončená v posledných 12 mesiacoch

Etická komise Fakultní nemocnice Hradec Králové povolila odber vzoriek od zdravých jedincov podstupujúcich menší chirurgický zákrok. Účasť v štúdiu bola dobrovoľná a každý z účastníkov súhlasil s experimentom (podpisom informovaného súhlasu). Vzorky krvi od pacientov boli odobrané do skúmavky s citrátom sodným. Krv bola ihneď použitá ku kométovej analýze, bez ďalšieho skladovania.

Experiment bol hrađený z grantu MH CZ - DRO (UHHK, 00179906) v spolupráci s Centrom pro výzkum a vývoj Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

4.2 Pribeh anestézie

Pacientom bola vykonaná traumatologická operácia, tzv. ORIF (open reposition and internal fixation) s použitím dláh a skrutiek do kostí. Zákrok bol vykonaný pacientom v celkovej anestézii, v niektorých prípadoch bola použitá kombinácia s nervovým blokátorom. Pacienti boli premedikovaní bromazepamom (Lexaurin 1,5mg - 1 tbl p.o.), mladší pacienti midazolamom (Dormicum 7,5mg - 1 tbl p.o.). Na sále bola zaistená intravenózna linka a dýchacie cesty boli zaistené orotracheálnou intubáciou po úvode do anestézie (Sufentanil 10ug i.v., Propofol 2mg/kg, Tracrium 0,5 mg/kg). Anestézia bola udržiavaná inhalačne, s použitím kombinácie ISF alebo SVF v nosnej zmesi s oxidom dusným s i.v. bolusmi sufentanilu. Trvanie anestézie bolo od 45 do 440 minút (tabuľka č. 2). Počas operácie boli pacienti štandardne monitorovaní (monitorovanie funkcií srdca, krvný tlak, saturácia kyslíkom, monitorovanie oxidu uhličitého vo vydychovanej zmesi, spirometria). U žiadneho pacienta nebola k extubácii potrebná dekurarizácia neostigmínom alebo atropínom. Niektorí pacienti dostali transfúziu krvi, ale vzorka krvi pre náš výskum bola odobraná pred jej zavedením. Po výkone boli pacienti prevezení na dospávaciu jednotku.

4.3 Prístroje

- Centrifúga 5702R Eppendorf (Eppendorf, Germany)
- Centrifúga Minispin- Eppendorf AG22331 (Eppendorf, Germany)

- Mikroskop B-352 PL (OPTIKA microscopes, Italy)
- Fluorescenčný mikroskop- Nikon eclipse 80 i (NIKON INSTRUMENTS INC.,USA)
- Progres MF, laserový optický systém (Jenoptik, Germany)
- Pro SCAN II (Prior Scientific Instruments Ltd, Great Britain)
- Ortuťová lampa- super high pressure mercury lamp power supply (NIKON INSTRUMENTS INC.,USA)
- Platnička Jenway 1000 (P-LAB a.s., Czech Republic)
- Vodná kúpeľ ZP 09824 (KUNZ, Germany)
- Zdroj pre elektroforézu EPS 300 IIV (C.B.S. scientific company, INC., Taiwan)
- Elektroforetická vaňa- Model A5- Owl separation systems, Inc. (Thermo scientific, USA)
- Termobox
- pH meter
- Počítač

4.4 Pomôcky

- Pipety objem 200 a 1000 μ l (International Labmate Limited, United Kingdom)
- Sklíčka- Memel Gläser Superfrost plus (Thermo Scientific, USA)
- Krycie sklíčka- Memel Gläser 22x22 mm- Lamelles couvre objets (Thermo Scientific, USA)
- Bürkerova komôrka (Závody průmyslové automatizace, Czech republic)
- Stopky Vitrum (Inspirion, Germany)
- Halogénová žiarovka s výkonom 500 W
- 25 ml falkonky (Sarstedt, Australia)
- 10 cm skúmavky PS (Gama group a.s., Czech Republic)
- Špičky 200 a 1000 μ l (Sarstedt, Australia)
- Pasteurove pipety (Sarstedt, Australia)
- Eppendorf skúmavky 1,5 ml (Eppendorf, Germany)
- Odmerné valce 50 ml a 25 ml (Simax, Czech Republic)
- Kadičky (2,5l; 400 ml; 250 ml; 100ml; 50 ml) (Simax, Czech Republic)
- Erlenky 100 ml (Simax, Czech Republic)

- Kyvety
- Nádobky na agarózy
- Nitrilové rukavice (Semper care, Austria)
- Fľaše na roztoky 500 ml

4.5 Chemikálie

- Agaróza na elektroforézu (Sigma Aldrich, USA)
- Nízkotaviaca agaróza (LMP agaróza) (Sigma Aldrich, USA)
- HMP agaróza (Sigma Aldrich, USA)
- etídium bromid
- enzýmy (FPG a ENDO III)- dar od UO Hradec Králové
- LSM lymphocyte separation medium (Biotech, Austria)
- redestilovaná voda
- NaCl- Chlorid sodný (s) (Sigma Aldrich, USA)
- EDTA- kyselina etyléndiamíntetraoctová (s) (Sigma Aldrich, USA)
- TRIS- *tris*(hydroxymethyl)aminomethanu (s) (Sigma Aldrich, USA)
- NaOH- hydroxid sodný (s) (Sigma Aldrich, USA)
- KCl- chlorid draselný (s) (Sigma Aldrich, USA)
- Hepes- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina (s) (Sigma Aldrich, USA)
- BSA- albumin bovinného séra (s) (Sigma Aldrich, USA)
- PBS- fosfátový roztok s chloridom sodným (tablety) (Sigma Aldrich, USA)
- Triton X-100 (l) (Sigma Aldrich, USA)
- Fotosenzibilizátor Ro 19-8022
- Dithiotreitol (Sigma Aldrich, USA)
- Glycerol (Sigma Aldrich, USA)

4.6 Comet assay pre stanovenie poškodenia DNA

4.6.1 Postup metódy

Príprava roztokov

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

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

Lyzačný pufor pripravíme zmiešaním 146 g NaCl, 29,2 g EDTA, 1,2 g TRIS do objemu 1000 ml. Roztok je nutné upraviť pomocou pH metru na pH=10,0. pH upravujeme pridaním NaOH, kde pripadá približne 12 g NaOH na 1000 ml. Do takto vopred pripraveného pufru pridáme TRITON X, aby vznikol **1% lyzačný roztok**. Na jednu kyvetu pripadá maximálne 15 sklíčok a výsledný objem roztoku je 60 ml (60ml pufru a 0,6 ml TRITONu X).

Na prípravu **neutralizačného pufru** použijeme 96,612 g TRIS do 2000 ml redestilovanej vody a upravíme pomocou koncentrovaného roztoku HCl na pH 7,5. Na 1000ml roztoku pripadá približne 25 ml HCl.

ENDO pufor pripravíme zmiešaním 14,9 g KCl, 19,06 g Hepes, 2,92 g EDTA, 0,4 g BSA do 2000 ml redestilovanej vody. Roztok upravíme na pH 8,0 pridaním KOH (na 1000 m roztoku pripadá asi 1 g KOH).

Fosfátový pufor (PBS) pripravíme rozpustením jednej zásobnej tablety v 200 ml redestilovanej vody. Všetky pufry je nutné uchovávať v chladničke. Okrem ENDO pufru, ktorý uchovávame v mrazničke a rozpúšťame ho až tesne pred používaním.

Pripravíme si **1% roztok agarózy (LMP, HMP)**- do predváženého množstva agarózy pridáme určené množstvo PBS, to znamená, že vážime 0,1g LMP alebo HMP agarózy do 10 ml PBS. Gél biele farby už nie je vhodný na použitie. Mikroskopické sklíčka si vopred vo väčšom počte potiahneme agarózou pre elektroforézu, aby nám ďalšie agarózy na nich držali a nezliezali.

Príprava sklíčok

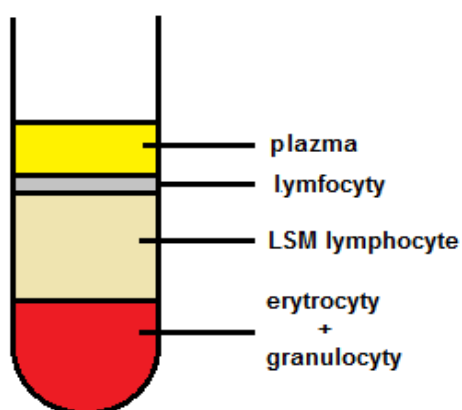
Sklička prevaríme v roztoku 1% peroxidu vodíka, prípadne v roztoku etanolu asi 20 minút. Opláchneme v destilovanej vode a necháme nastojato uschnúť. Pripravíme si 1% roztok agarózy pre elektroforézu (1g agarózy na 100 ml destilovanej vody). **Pozor, nie do PBS!**

Potom vysušené sklíčka dvakrát ponoríme do 1% roztoku agarózy. Do horúcej agarózy v kadičke ponárame sklíčka nastojato a za horný okraj držíme sklíčko pinzetou, prípadne sa ho snažíme neponárať, aby bolo možné popisovať sklíčka na zabrúsený okraj. Zo spodnej strany otrieme buničinou. Pracujeme rýchlo, aby vznikol krásne tenký film na sklíčku. V prípade, že máme veľkú sériu sklíčok, je dobré vložiť kadičku s agarózou do vodného kúpeľa, aby v procese netuhla.

Sklička položíme na plech a dáme na 1 hodinu do sušiarne nastavenej na teplotu 60°C. Takto pripravené sklíčka sa uchovávajú v histologických krabiciach, chránené pred prachom. Je potrebné označiť krížikom stranu, ktorá je potiahnutá agarózou, prípadne všetky sklíčka spracovať rovnako a uložiť ich rovnakým smerom v krabiciach (napríklad potiahnutými stranami k sebe a napravo je orientovaná zabrúsená časť sklíčka pre popisovanie).

Izolácia lymfocytov

Postup metódy je znázornený na obrázku č. 7.



Obrázok 6: Rozdelenie krvných elementov s použitím LSM lymphocyte po centrifugácii

Do 10 ml skúmaviek napipetujeme 4 ml LSM lymphocyte (Biotech, Austria) a opatrne navrstvíme rovnaké množstvo krvi. Centrifugujeme 30 minút, pri 20°C na 1500 otáčok. Separačné médium LSM lymphocyte je nutné skladovať v tme (tmavostennej nádobe).

Po dotočení odoberieme vytvorený lymfocytárny prstenec (obrázok č. 6) pasteurkou a preniesieme do 20 ml plastových falkoniiek (Sarstedt, Australia). Od tohto kroku je nutné pracovať na ľade.

K odobranému prstencu pridáme približne 10 ml PBS a opäť dáme točiť na 10 minút, pri 8°C na 1500 otáčok. Po dotočení sa nám na dne falkonky vytvorí peletka, supernatant zlejeme a peletku resuspendujeme v 10 ml PBS. Tu je potrebné pridať presný objem PBS, pretože z vytvoreného roztoku odoberáme vzorku na počítanie buniek v Bürkerovej komôrke. Bunky počítame pod stonásobným zväčšením (žltý objektív). Falkonku dáme opäť stočiť na 10 minút, pri 8°C a na 1500 otáčok. Po stočení zlejeme supernatant a pridáme taký objem PBS, aby sme získali roztok o koncentrácii 2 milióny buniek/1ml roztoku. Z tohto roztoku odoberieme 1 ml, z ktorého po ďalšom stočení na 5 minút pri 4°C a 4000 otáčok za minútu (opätovnom odstránení supernatantu od peletky a jej vysušení) získame extrakt, ktorý je možné ďalej využiť pri stanovení rýchlosti reparácie na bunčných líniách. Po tomto kroku nasleduje ešte posledné riedenie, a to na koncentráciu 1 milión buniek/ 1 ml roztoku.

Príprava sklíčok pred pokusom

Z roztoku riedeného na 1 milión buniek/ 1 ml odoberieme 35 µl a preniesieme do eppendorfy, s ktorou budeme ďalej pracovať. Pre každú vzorku pripravíme gély v duplikátoch. V našom prípade sú to 2 eppendorf skúmavky pre analýzu SSB (jednoreťazcové zlomy=single strand breaks), dve pre detekciu oxidovaných pyrimidínov (EDNO III= endonukleáza III) a dve pre oxidované puríny (FPG= formaminopyrimidin-DNA-glykosyláza).

Agarózy (LMP a HMP) dobre rozvaríme, aby z nich vznikol číry viskózný roztok. Rozpúšťame ich na výhrevnej platni, v kadičkách vystlaných buničinou, aby nedošlo k rozbitiu nádoby vplyvom vysokej teploty. LMP agarózu premiestnime do vodného kúpeľa a necháme vychladiť na 37°C. Tento krok je dôležitý pre zachovanie celistvosti buniek- vyššia teplota by bunky poškodila. To je potrebné urobiť minimálne 20 minút pred tým, než sú pripravené bunky.

Medzitým si pripravíme HMP agarózu na sklíčka. Na sklíčko vopred potiahnuté agarózou pre elektroforézu pipetujeme 85 µl HMP agarózy, ihneď prekryjeme krycím sklíčkom (2x22 mm) a premiestnite na vychladený kovový podnos (agaróza lepšie tuhne). Podnos so sklíčkami necháme vychladiť na 5 minút v chladničke. Pozor: v letných mesiacoch (pri vyšších teplotách v miestnosti) je nutné nechať chladiť sklíčka aspoň 10 minút. Inak sa môže stať, že agaróza nebude držať na mikroskopickom sklíčku.

Po vychladnutí stiahneme krycie sklíčka plynulým pohybom palca dole z mikroskopického sklíčka. Krycie sklíčka sťahujeme až tesne pred ďalším krokom. Pokračujeme s LMP agarózou a bunkami. Od tohto kroku je nutné pracovať veľmi rýchlo. K bunkám vopred pripraveným v eppendorf skúmavkách (35 µl) pridáme 85 µl LMP agarózy (ktorú sme po rozpustení vytemperovali vo vodnom kúpeli na 37°C), premiešame špičkou a ihneď pipetujeme na podložné sklíčko na 1. vrstvu už zatuhnutej HMP agarózy. Prekryjeme krycím sklíčkom (ktoré sme predtým stiahli z HMP agarózy) a opäť dáme stuhnúť na plechový podnos do chladničky (5 minút, prípadne opäť platí pravidlo, že pri vyššej laboratórnej teplote necháme tuhnúť aspoň 10 minút).

Lýza

Lyzačný pufr je nutné pripraviť do zásoby (je potrebné aby bol roztok dobre vychladený), ale Triton X (na prípravu 1% lyzačného roztoku) sa pridáva až tesne pred použitím. Triton necháme rozmiešať v puffri na platni s magnetickou miešačkou a dáme vychladiť do chladničky.

Po vychladnutí a zatuhnutí LMP agarózy s bunkami, stiahneme krycie sklíčka a mikroskopické sklíčka vložíme do kyvety s vopred pripraveným 1% lyzačným roztokom. Bunky v LMP agaróze na sklíčkach by nemali byť zbytočne dlho, preto je dobré, pripraviť si lyzačný roztok dostatočne vopred tak, aby bol pripravený (aj vychladený) ihneď po zatuhnutí LMP agarózy s bunkami.

Vzorky necháme lyzovať v chladničke minimálne 1 hodinu alebo do ďalšieho dňa. V rámci tejto diplomovej práce sa sklíčka nechávali lyzovať do ďalšieho rána (maximum 24 hodín). Po lýze membrán zostávajú na géle nukleoidy, ktoré sú po nafarbení viditeľné pod fluorescenčným mikroskopom.

Ovplyvňovanie enzýmami

V prípade, že budeme bunky ovplyvňovať enzýmami, je potrebné si nechať vytemperovať termobox na 37°C a rozmraziť ENDO pufo. Následne sklíčka premyjeme trikrát po 5 minútach v ENDO puffre. Enzýmy rozmrazíme tesne pred použitím a pridáme 30 µl z požadovaného enzýmu na určené sklíčka. Prikryjeme krycím sklíčkom, vložíme do uzavierateľnej nádoby s navlhčenou buničinou a necháme inkubovať po dobu 45 minút v termoboxe. Sklíčka, ktoré enzýmami neovplyvňujeme (SSB) necháme naďalej v lyzačnom roztoku. Medzitým si pripravíme

elektroforetický pufor. Miešame na platni s magnetickým miešadlom a po úplnom rozpustení dáme vychladiť do predpripravených fliaš v chladničke.

Alkalické rozpletanie a elektroforéza

Po kroku inkubácie nasleduje alkalické rozpletanie. Pufor pre elektroforézu sa pripravuje vždy čerstvý, vždy ráno pred začatím experimentu, aby sa stihol dostatočne vychladiť. Krycie sklíčka stiahneme zo sklíčok mikroskopických ešte pred vkladáním na elektroforetického tanku. Sklíčka (s popisom orientovaným doprava vložíme do tanku s vychladeným pufrom a necháme alkalicky rozpletať po dobu 40 minút. **Tento čas je vždy nutné dodržať u každej vzorky rovnaký!**

Vlastná elektroforéza

Po 40 minútach nasleduje 30 minút vlastnej elektroforézy. K tanku pripojíme zdroj a prostrednou kontrolkou (prepínanie medzi napätím= voltami (V), prúdom= miliampére (mA) a časom) nastavíme konštantné napätie na hodnotu 33 V a čas na 30 minút. Po zapnutí (tlačidlom START) upravíme odobraním alebo pridaním pufru hodnotu prúdu na 300 mA. Sklíčka ale nesmú byť na suchu, je teda nutné vyskúšať, či je nad sklíčkami viditeľná vrstva pufru. Pri správnom zapojení elektroforetickej zostavy musia byť viditeľné bublinky, ktoré prúdia v roztoku.

Neutralizácia

Po dokončení elektroforézy sklíčka vytiahneme z elektroforetickej vane do kyvety a 3 krát po 5 minút ich prepláchneme neutralizačným pufrom. Následne ešte premývame 5 minút v redestilovanej vode. Vždy je nutné v celom postupe používať redestilovanú vodu (na roztoky aj premývanie), nie obyčajnú vodu, keďže tu hrozí riziko lýzy buniek vplyvom osmotického tlaku.

Farbenie

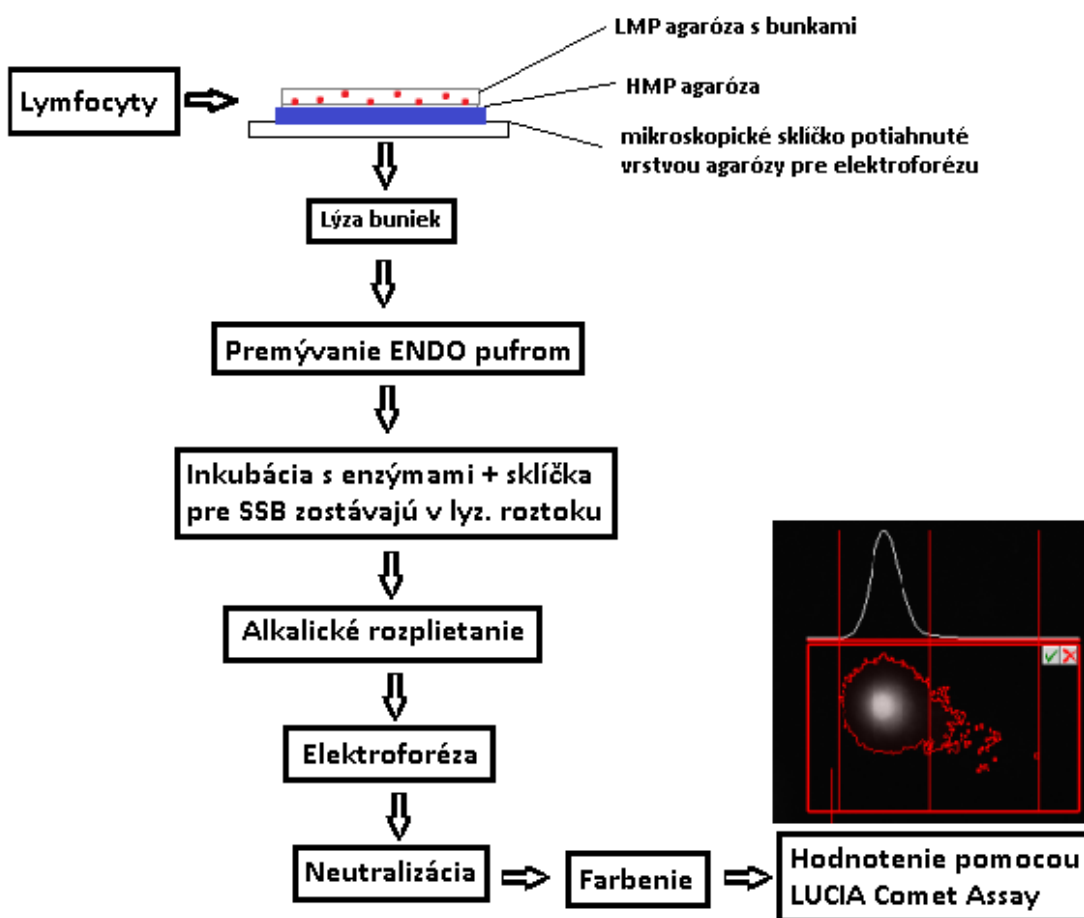
Sklíčka necháme vysušiť pre neskoršie vyhodnocovanie, prípadne priamo nafarbiť etídium bromidom. Na gél nanesieme 20 μ l roztoku etídia bromidu a necháme chvíľu inkubovať (minimálne 5- 10 minút). Takto sú sklíčka pripravené na hodnotenie.

Ak nevyhodnocujeme priamo po neutralizácii a premytí vodou (po elektroforéze) je potrebné aktivovať vysušené sklíčka premytím v redestilovanej vode po dobu 5 minút.

Nasleduje farbenie 20 μ l etídia bromidu a prekrytie krycím sklíčkom. Preparát vložíme pod objektív mikroskopu.

Hodnotenie komét

Hodnotíme pod fluorescenčným mikroskopom v spojení s optickou zostavou (NIKON INSTRUMENTS INC.,USA) napojenou na počítač a s využitím vyhodnocovacieho programu LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic). Po zhodnotení sklíčka omyjeme v redestilovanej vode a necháme vyschnúť. Usušené sklíčka uschováme pre ďalšie prípadné hodnotenie (opakovanie nesprávne vyhodnotených vzoriek).



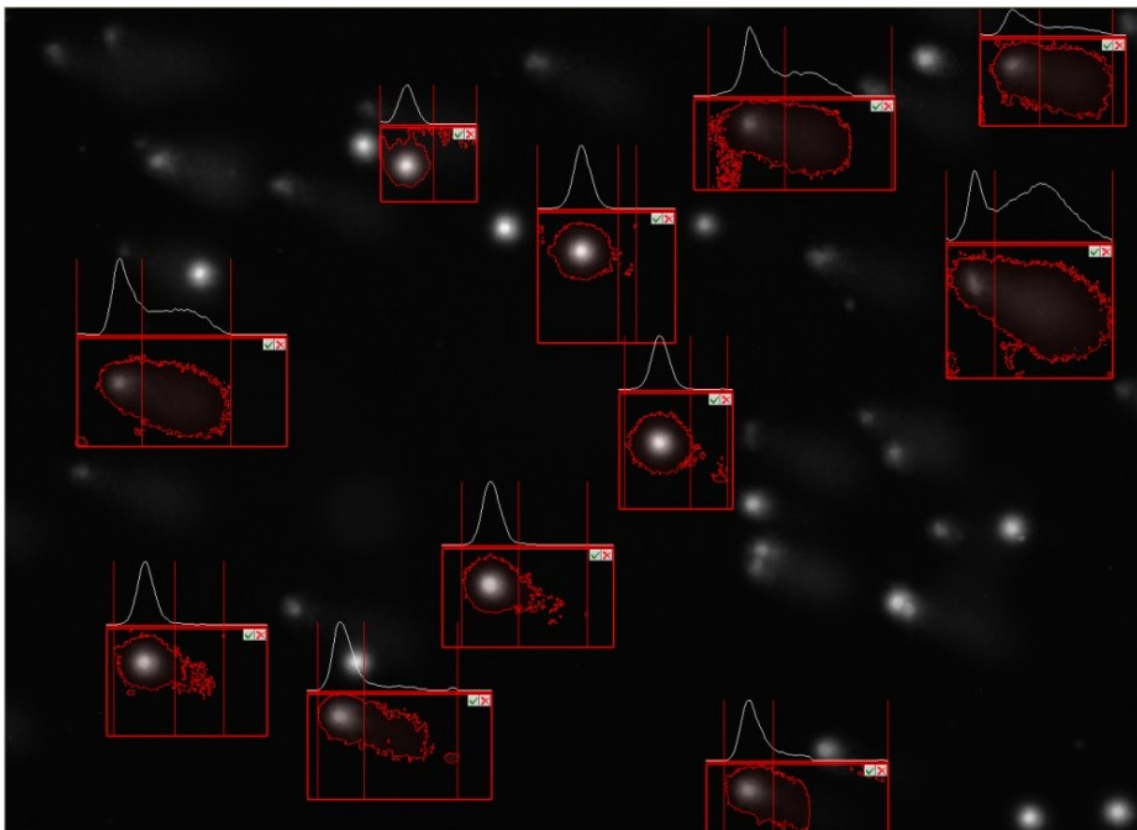
Obrázok 7: Schéma kométovej metódy na detekciu DNA poškodenia

Medzi farbením je nutné spustiť počítač, zapnúť Pro SCAN II, lampu a ako posledný fluorescenčný mikroskop. Nastavíme objektív s 10-násobným zväčšením a prepne na režim 3- zelené svetlo pre etídium bromid. V počítači spustíme program Lucia Comet Assay, klikneme na zelenú šípku v kruhu (Live image). V tomto momente sa nám zobrazuje čierne pozadie s bielymi objektmi. Hľadané bunky majú guľovitý tvar

s neostrými okrajmi (vyzerajú ako slniečko, ježko), ostatné biele objekty s ostrými okrajmi môžu byť rôzne kryštáliky alebo neporiadok. Zaostrujeme makro a mikroskrutka, prípadne kolieskom myšky.

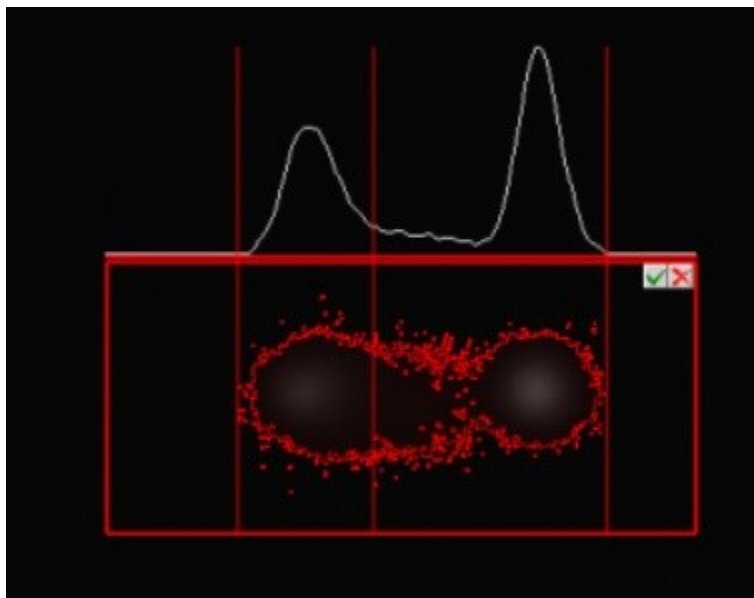
Pre označovanie buniek je možné použiť automatické nastavenie programu. My sme však využili vlastné označovanie, keďže program neoznačoval celé bunky (aj s chvostom kométy), ale len hlavy komét, čo dávalo chybné výsledky. Ľavým tlačidlom myšky označíme vybranú bunku do rámčeka. Je potrebné označovať celú bunku s celým chvostom, ktorý nemusí byť vždy okom viditeľný. Prípadne je možné preostriť obraz pre lepšie rozlíšenie. Veľkosť rámčeka sa dá rôzne upravovať tak, aby bola označená úplne celá bunka. Červeným krížikom napravo v rámčeku sa dá svoj výber zrušiť. Pravé tlačidlo myšky potom slúži na potvrdenie výberu.

Vždy označujeme všetky oddelené bunky (guľatého tvaru aj v tvare kométy) v rámci jedného zobrazeného poľa (obrázok č. 8).



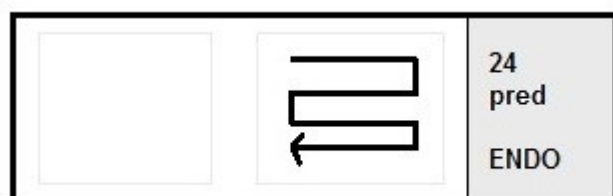
Obrázok 8: Hodnotenie komét- správne označovanie buniek

Ak má bunka pozdĺžnu hlavu, môže to značiť prekrytie dvoch buniek. Takéto lymfocyty neoznačujeme. Ďalší problém môže nastať v prípade, že sú bunky príliš blízko seba a prekrývajú sa niektoré ich časti (obrázok č. 9).



Obrázok 9: Prekryv buniek pri hodnotení

Dôležitým krokom je hodnotenie stredových častí sklíčka. V okrajových častiach sa nachádza výrazne vyššie množstvo poškodených lymfocytov, preto sa pri výbere buniek okrajovým častiam sklíčka vyhýbame. Vplyvom väčšieho počtu poškodených buniek by mohlo dochádzať k falošnému navýšeniu hodnôt percenta Tail DNA (poškodená DNA v chvoste kométy). Ďalšou nevýhodou programu je jeho neschopnosť rozoznať už zhodnotenú bunku. Preto je nutné vytvoriť si systém prezerania sklíčka (napr. meandrovitým pohybom) (obrázok č. 10).



Obrázok 10: Spôsob hodnotenia sklíčok meandrovitým pohybom

Hodnotíme 100 buniek- na každom replikáte je to 50 buniek, keďže každá vzorka je spracovaná v duplikátoch. Výsledky každej vybranej bunky sa zapisujú do tabulky dát,

Tabulka 3: Výsledná tabulka s parametrami z hodnotenia replikátov pomocou obrazovej analýzy (LUCIA Comet Assay)

25 pred FPG	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Integral Intesity	Head Radius	Tail Length	Tail Moment	Olive Moment	Head Area	Tail Area
1	43,38	56,62	1867,55	31,23	48,63	27,53	23,56	1779,85	2799,25
2	99,12	0,88	1938,21	52,12	7,13	0,06	0,45	2314,14	134,1
3	96,12	3,88	2165,91	48,39	27,88	1,08	2,19	2693,31	631,82
4	94,02	5,98	2361,63	40,18	24,64	1,47	2,85	3566,84	1132,48
5	99,31	0,69	1550,47	49,34	12,32	0,08	0,34	2152,3	128,21
6	93,71	6,29	2748,2	40,65	14,26	0,9	2,7	4125,51	1101,37
7	96,92	3,08	2553,2	54,64	25,93	0,8	1,93	3881,7	564,98
8	99,2	0,8	2108,13	55,94	1,3	0,01	0,43	2550,39	115,6
9	99,36	0,64	1963,61	26,89	7,13	0,05	0,17	1465,83	86,6
10	94,18	5,82	2352,67	34,85	18,15	1,06	2,41	2360,38	729,76
11	91,51	8,49	2769,87	25,53	36,96	3,14	3,36	1991,71	1390,16
12	93,1	6,9	3508,26	28,16	45,39	3,13	3,13	1774,38	1304,83
13	91,27	8,73	3811,28	40,95	35,01	3,06	3,97	3697,16	1535,61
14	98,61	1,39	3482,21	55,76	1,3	0,02	0,56	4287,36	242,55
15	95,76	4,24	4045,04	57,23	32,42	1,37	2,71	4025,47	939,53
16	85,73	14,27	4192,32	37,88	37,6	5,37	7,43	3482,35	2639,09
17	91,88	8,12	4222,35	56,31	34,36	2,79	5,51	4526,13	1526,36
18	93,14	6,86	3448,49	46,39	57,06	3,92	4,37	2462,11	1259,01
19	96,19	3,81	1477,28	25,41	64,19	2,44	2,06	1541,08	477,96
20	98,99	1,01	1418,02	21,59	60,95	0,62	0,42	1369,57	114,76
21	86,7	13,3	1570,03	29,44	34,36	4,57	4,59	1912,69	1111,04
22	57,23	42,77	1679,99	18,62	79,1	33,83	13,29	1149,29	2223,76
23	97,4	2,6	1574,09	28,71	40,2	1,05	1,2	1663,41	372,87
24	96,16	3,84	1605,06	27,41	53,81	2,06	1,62	1714,69	498,14
25	73,39	26,61	665,45	17,9	66,13	17,6	7,02	1100,11	1105,99
26	96,5	3,5	626,14	16,27	68,73	2,41	0,95	831,91	213,55
27	99,91	0,09	545,93	18,62	3,24	0,003	0,02	938,27	7,57
28	69,97	30,03	529,93	17,18	38,25	11,49	8,38	941,63	1195,53
29	96,4	3,6	650,04	17,81	35,66	1,28	1,41	962,65	142,51
30	97,77	2,23	1118,05	20,26	47,33	1,05	1,32	1230,84	90,38
31	59,65	40,35	678,7	18,19	64,19	25,9	14,34	1003,42	1533,51
32	78,71	21,29	1260,89	18,99	40,85	8,7	6,93	1172,41	1210,67
33	93,73	6,27	1965,84	59,34	14,91	0,93	3,68	7152,6	945,41
34	80,57	19,43	1581,66	38,14	35,01	6,8	9,53	3700,52	2438,15
35	99,49	0,51	1382,21	25,89	57,06	0,29	0,14	1428,84	66,84
36	94,39	5,61	1327,18	32,85	79,75	4,47	4,21	1779,01	525,46
37	82,56	17,44	1235,47	20,99	55,11	9,61	5,2	1313,24	1109,78
38	99,51	0,49	1175,97	28,89	10,37	0,05	0,11	1142,99	45,4
39	99,84	0,16	2334,05	35,66	0	0	0,05	2274,62	38,25
40	61,04	38,96	1219,56	20,33	88,18	34,36	15,75	1391,01	2636,98
41	94,95	5,05	1158,74	21,64	59	2,98	1,86	1314,5	704,54
42	99,4	0,6	1022,37	21,43	27,23	0,16	0,16	1404,46	68,94
43	99,96	0,04	1193,92	56,73	0	0	0,02	2406,62	5,89
44	61,05	38,95	1240,51	25,45	55,11	21,47	16,5	1643,65	2547,44
45	96,11	3,89	1280,6	34,37	62,89	2,44	2,17	2235,95	564,14
46	98,93	1,07	1155,87	53,33	18,15	0,19	0,63	2138	119,39
47	96,47	3,53	1072,51	27,7	36,96	1,3	1,34	1530,15	359,84
48	97,64	2,36	1251,52	28,43	40,85	0,97	0,97	1651,64	347,65
49	88,46	11,54	1429,52	30,7	22,04	2,54	3,71	2353,23	1079,93
50	99,43	0,57	1175,59	51,63	32,42	0,18	0,29	2149,77	65,16
	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Integral Intesity	Head Radius	Tail Length	Tail Moment	Olive Moment	Head Area	Tail Area
Mean	90,1	9,9	1813,84	33,85	37,19	5,15	3,96	2193,59	844,57
Median	95,94	4,06	1513,87	29,17	36,31	1,42	2,18	1779,43	598,4
SD	13,2	13,2	976,08	13,42	22,52	8,62	4,96	1212,58	789,82
Minimum	43,38	0,04	529,93	16,27	0	0	0,02	831,91	5,89
Maximum	99,96	56,62	4222,35	59,34	88,18	34,36	23,56	7152,6	2799,25

ktorá sa dá zobrazit' kliknutím na „Show data window“. Po označení prvých správnych buniek je potrebné vytvorit' názov súboru a po zhodnotení daného počtu buniek program automaticky ohlási dostatočný počet zhodnotených lymfocytov. Dáta je potom možné spolu so štatistickými dátami odoslať priamo do excelového súboru (tabuľka č. 3). Po ukončení tohto kroku je ešte dobré resetovať predchádzajúce dáta, ktoré by sa potom pri ďalšom exporte do EXCELU exportovali spolu v novými meraniami.

4.6.2 Štatistická analýza

V štatistickej analýze sme využívali parameter percento Tail DNA, aby sme porovnali zmeny v množstve poškodenej DNA po anestézii vzdľaťom k množstvu pred anestéziou.

Štatistické hodnotenie prebehlo v programe SigmaStat 3.5 (Systat Software, USA). Porovnanie bolo stanovené neparametrickým párovým Mann-Whitneyho testom. Pre určenie štatistickej významnosti bola stanovená hladina významnosti 5% ($p < 0,05$).

Pre grafické zobrazenie v stĺpcových grafoch boli určené priemerné hodnoty v skupinách jednotlivých parametrov a štandardná chyba merania v programe Statistica (Statistica, USA). Ďalej bol využitý tento program na tvorbu krabicového grafu určujúceho rozsah hodnôt s určením mediánu a odľahlých hodnôt.

Pre grafické zobrazenie závislosti na pohlaví, veku a dĺžke anestézie bol využitý priemer a štandardná chyba merania zobrazená pomocou chybových úsečiek.

4.7 Comet assay pre stanovenie reparácie DNA

Príprava pufrův

Pufor A sme si pripravili z 45 mM HEPES, 0,4 M KCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM dithiothreitolu a 10% glycerolu. Roztok sme upravili na pH 7,8 použitím KOH. Po upravení pH sme pridali 10 μ l 1% Triton X-100.

Pufor B sme pripravili z 45 mM HEPES, 0,25 mM EDTA, 2% glycerolu a 0,3 mg/ml BSA. Rovnako sme takto vzniknutý roztok upravili na pH 7,8 pomocou KOH.

Poznámka: ostatné pufrův sme používali rovnaké ako pri CA na stanovenie oxidatívneho poškodenia.

4.7.1 Princíp metódy

Aktivita reparačných enzýmov bola stanovená na bunkových extraktoch lymfocytov od uvedených pacientov. Na analýzu bola použitá modifikácia kométovej analýzy. Základným princípom je inkubácia extraktov z lymfocytov s lyzovanými HeLa bunkami, ktoré obsahujú daný typ lézie (tzv. substrátom) a následne určenie schopnosti sledovaných lymfocytov vykonať iniciačný krok pri reparácii poškodenej časti DNA, keďže jednoreťazcové zlomy sú produktami excíznej reparácie. (Collins et Horvathova, 2001)

Jedná sa o fenotypizačné stanovenie reparačnej schopnosti DNA. Táto metóda bola vyvinutá na sledovanie schopnosti extraktov z ľudských lymfocytov vykonať počiatočný krok nukleotidovej excíznej reparácie, to znamená rozpoznať miesto a odstrániť nesprávny nukleotid (incízia). Rýchlosť akou incízia nastáva a zmena v parametroch (tail moment alebo intenzita DNA vo chvoste kométy) je indikátorom pre určenie schopnosti sledovaných lymfocytov opravovať DNA.

Princípom metódy je, že enzýmy BER, ktoré sa nachádzajú v extraktoch z lymfocytov rozpoznávajú špecifické miesta svojho pôsobenia a dochádza k incízii- vystrihnutiu nukleotidu. Takýmto spôsobom sa vytvorí jednoreťazcový zlom, ktorý je možné odhaliť pomocou alkalickéj jednobunkovej gélovej elektroforézy (=kométovej metódy). (Hansen et Kelley, 2000)

Táto metóda je citlivá, rýchla, robustná a ekonomicky nenáročná. Extrakty získavame z izolovaných lymfocytov potrebných na stanovenie poškodenia, takže potrebným materiálom je odber 2-3 ml krvi pre získanie dostatočného množstva materiálu. Extrakty je najlepšie pripravovať zo zamrazených peliet lymfocytov získaných od pacientov tesne pred použitím, aby nedochádzalo k stratám opravných schopností. Lymfocyty sú zamrazené v peletkách bez straty reparačnej kapacity. Pri dlhodobom skladovaní extraktov pri -80°C dochádza k strate reparačnej aktivity. Bolo preukázané, že skladovaním bunkového extraktu počas 3 týždňov dochádza k redukcii reparačných schopností v porovnaní s čerstvými extraktmi až o 80%. V prípade takéhoto typu skladovania je vhodné pridať ATP (adenosintrifosfát) pred použitím do vzoriek. Pridanie ATP pred ich použitím dostatočne zabezpečí ich aktivitu, keďže je dôležitou zložkou pri incíznom kroku NER (rozdielne od BER, kde potrebné nie je). (Langie et al., 2006)

V našej práci sme pozorovali schopnosť sledovaných lymfocytov navodiť tvorbu jednoreťazcových zlomov pri oprave poškodených HeLa buniek. Porovnávali sme reparačnú schopnosť lymfocytov izolovaných z odobranej krvi pred a po zákroku pod vplyvom anestézie.

Príprava substrátu

HeLa bunkové línie sme získali od Katedry toxikologie a vojenskej farmacie, Univerzity obrany, Hradec Králové.

Pred experimentom boli HeLa bunky trypsinizované a nariadené do koncentrácie 10^6 buniek na ml. Spolu so 75 μ l LMP agarózy (rovnaké zloženie ako pri stanovení oxidatívneho poškodenia) boli nanosené na mikroskopické sklíčko potiahnuté normálnou agarózou pre elektroforézu (Sigma Aldrich, Germany) v 1% koncentrácii, prekryté krycím sklíčom a ponechané pri 4°C aby úplne zatuhli. Krycie sklíčka sme stiahli z mikroskopických sklíčok a sklíčka vložili na 1 hodinu do lyzačného roztoku pri 4°C (rovnaký roztok ako pri stanovení oxidatívneho poškodenia), aby sme odstránili nepotrebné kompartmenty bunky (membrány, cytoplazmu). Po lýze nasledovalo 15 minútové premývanie v PBS pufre.

Získané nukleoidy boli osvietené viditeľným svetlom v kombinácii s fotosenzibilizátorom (**Ro 19-8022**). Podmienky ožiarovania boli nasledovné: 5 minút, vo vzdialenosti 33 cm, halogénovou žiarovkou s výkonom 500 W a vzorky boli uložené na ľade, aby nedošlo k ich prehriatiu. Vplyvom fotosenzibilizátora vznikol singletový kyslík, ktorý indukoval vznik modifikovaných purínov (8-oxoguanín), ktorých opravu sme merali po inkubácii s extraktom (vytvoreným zo sledovaných lymfocytov). Množstvo 8-oxoGua by malo prevažovať nad počtom jednoreťazcových zlomov. Sklíčka boli následne 15 minút premývané v roztoku pufru B.

Príprava extraktu

Popis izolácie lymfocytov z venóznej krvi pacientov sa nachádza v praktickej časti tejto práce v kapitole stanovenie oxidatívneho poškodenia.

Na začiatku sme do peliet vytvorených z lymfocytov pridali pufr A a 10 μ l 1% Triton X-100 (10 μ l Triton X-100 do 990 μ l pufru A). Túto zmes je potrebné dostatočne zvortexovať. Následne bola bunková suspenzia centrifugovaná 5 minút pri 4°C a 14000

otáčkach. Získané supernatanty sme premiestnili do ďalšej skúmavky a uložili na ľad až do ich použitia.

50 µl ml extraktu sme napipetovali na HeLa bunky so špecifickými léziami zakotvené v agaróze, prekryli krycím sklíčkom a nechali inkubovať 20 minút pri 37 °C vo vlhkej komôrke. Po inkubácii je nutné položiť sklíčka na ľad, aby došla k zástave reparácie.

Sklíčka inkubované s pufrom B boli použité ako negatívna kontrola a s FPG ako pozitívna kontrola. Následne sme stiahli krycie sklíčka a vykonali kométovú analýzu podľa rovnakého postupu ako u stanovenia oxidatívneho poškodenia.

Sklíčka sme uložili do elektroforetického tanku, zaliali alkalickým pufrom a nechali 40 minút pri 4°C alkalicky rozpletať, následne 30 minút pri rovnakej teplote podliehať elektroforéze pri 25 V a 300 mA. Nasledoval krok neutralizácie a sklíčka boli vysušené a farbené etídiom bromidu pre fluorescenčné hodnotenie.

4.7.2 Hodnotenie a štatistika

Na vyhodnocovanie bol použitý softvér LUCIA Comet Assay (Laboratory Imaging, Czech Republic) pre obrazovú analýzu komét. Na každom sklíčku bolo zhodnotených 50 komét. Ako hodnotený parameter sme si opäť stanovili percento Tail DNA a porovnali hodnoty pred a po anestézii. Naším cieľom bolo stanoviť štatistickú významnosť a graficky znázorniť dané závislosti.

5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovenie poškodenia DNA

5.1.1 Štatistická významnosť

Štatistické hodnotenie prebehlo v programe SigmaStat. Stanovovaných parametrom bolo percento DNA vo chvoste a porovnávali sme hodnoty namerané pred a po anestézii. Výsledky ukazujú štatistický významný rozdiel na hladine $\alpha=0,05$ u všetkých troch stanovovaných parametrov. Využitý bol Mann-Whitney neparametrický párový test a výsledky sú zobrazené v tabuľke č. 4. U stanovenia jednoreťazcových zlomov bola stanovená štatistická významnosť $p<0,035$, u oxidovaných pyrimidínov $p<0,018$ a oxidovaných purínov $p<0,013$. Na základe tohto hodnotenia bol najvýznamnejší rozdiel u oxidovaných purínov ($p<0,013$) (tabuľka č. 4). Výstup so štatistického hodnotenia so získanými údajmi sa nachádza v tabuľke č. 5.

Štatistická významnosť	$p<0,05$
SSB	0,035
ENDO	0,018
FPG	0,013

Tabuľka 4: Štatistická významnosť meraní

Tabuľka 5: Štatistické údaje získané zhodnotením percenta DNA vo chvoste komét

Štatistika	N platných	Priemer	Median	Minimum	Maximum	Dolný kvartil	Horný kvartil	Rozptyl	Smer. odch.	Smer. chyba
SSB pred	20	7,94	7,49	2,70	21,23	5,09	9,66	17,27	4,16	0,93
SSB po	20	10,23	10,05	2,09	27,05	6,97	11,63	27,24	5,22	1,17
ENDO pred	20	9,00	8,65	3,09	23,48	6,12	10,20	20,52	4,53	1,01
ENDO po	20	11,55	11,83	3,73	26,35	8,27	13,47	25,89	5,09	1,14
FPG pred	20	9,13	7,97	2,95	24,16	5,72	12,04	24,22	4,92	1,10
FPG po	19	12,25	11,75	5,33	27,25	8,38	15,32	28,70	5,36	1,23

5.1.2 Celkové poškodenie

Tabulka 6: Tabulka s konečnými hodnotami všetkých troch stanovovaných typov poškodenia

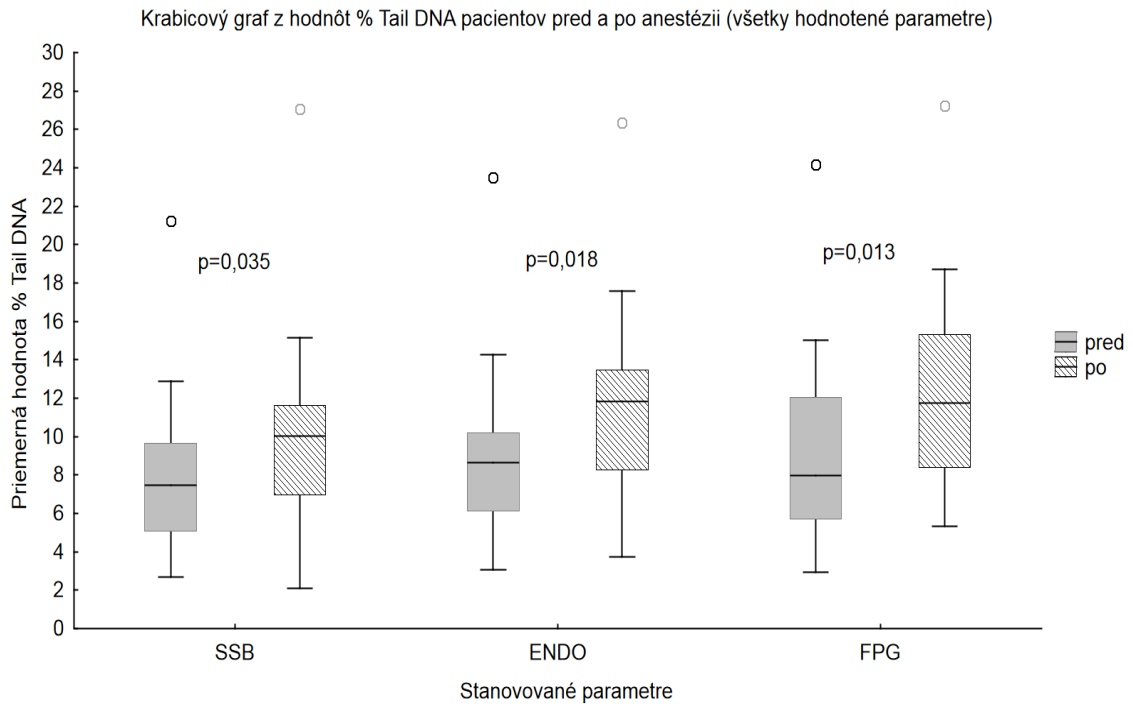
Číslo pacienta	pred / po	SSB	SSB b	Priemer	ENDO III	ENDO III b	Priemer	FPG	FPG b	Priemer
1	pred	7,91	8,37	8,14	9,35	10,64	10,00	8,87	6,85	7,86
	po	15,67	14,64	15,16	10,71	11,47	11,09	15,4	15,53	15,47
2	pred	5,24	5,02	5,13	7,5	8,36	7,93	12,18	13,09	12,64
	po	11,08	12,11	11,60	12,26	13,07	12,67	12,69	15,15	13,92
3	pred	12,83	9,49	11,16	12,36	13,92	13,14	11,86	14,15	13,01
	po	12,89	10,09	11,49	12,21	14,23	13,22	15,18	13,42	14,30
4	pred	11,16	10,09	10,63	12,29	11,82	12,06	12,84	12,78	12,81
	po	12,95	15,39	14,17	18	17,18	17,59	11,19	12,3	11,75
5	pred	20,89	21,57	21,23	24,51	22,45	23,48	24,51	23,81	24,16
	po	27	27,1	27,05	27,37	25,32	26,35	28,48	26,01	27,25
8	pred	8,52	11,67	10,10	15,73	12,84	14,29	12,29	10,58	11,44
	po	9,53	11,52	10,53	14,55	14,81	14,68	19,74	17,71	18,73
9	pred	3,24	2,23	2,74	5,11	3,11	4,11	7,1	3,99	5,55
	po	1,89	2,29	2,09	3,36	4,1	3,73	4,22	7,82	6,02
11	pred	4,09	7	5,55	5,08	4,8	4,94	5,96	5,84	5,90
	po	5,69	7,36	6,53	7,51	6,91	7,21	7,23	6,72	6,98
12	pred	8,79	9,65	9,22	10,06	10,51	10,29	5,24	5,04	5,14
	po	12,91	10,42	11,67	11,314	15,11	13,21	8,83	8,03	8,43
13	pred	12,92	12,87	12,90	9,53	7,87	8,70	17,15	12,93	15,04
	po	12,98	14,66	13,82	14,28	15,37	14,83	19,13	14,44	16,79
14	pred	7,4	7,11	7,26	8,47	6,86	7,67	7,29	6,8	7,05
	po	7,32	8,78	8,05	10,77	8,82	9,80	7,52	9,23	8,38
15	pred	6,82	8	7,41	6,45	7,25	6,85	10,02	10,98	10,50
	po	6,26	9,95	8,11	12,84	12,64	12,74	14,9	15,73	15,32
16	pred	6,86	8,36	7,61	6,97	10,35	8,66	6,8	6,96	6,88
	po	10,43	8,29	9,36	11,47	13,67	12,57	13,15	15,9	14,53
18	pred	9,19	5,96	7,58	7,41	8,4	7,91	8,67	7,5	8,09
	po	12,29	9,83	11,06	10,62	10,91	10,77	8,36	10,62	9,49
20	pred	3,53	4,27	3,90	4,43	6,36	5,40	6,31	5,65	5,98
	po	6,98	3,84	5,41	4,09	5,81	4,95	4,09	7,86	5,98
21	pred	3,14	2,26	2,70	3,81	2,36	3,09	2,66	3,23	2,95
	po	4,07	3,93	4,00	5,66	6,33	6,00	/	/	/
22	pred	5,49	4,6	5,05	3,07	5,06	4,07	4,43	3,07	3,75
	po	9,67	5,14	7,41	5,33	5,59	5,46	5,05	5,6	5,33
23	pred	5,56	4,38	4,97	9,55	7,91	8,73	4,48	4,39	4,44
	po	4,72	8,11	6,42	16,25	11,18	13,72	11,22	14,67	12,95
24	pred	8,42	6,26	7,34	10,16	10,07	10,12	10,89	8,94	9,92
	po	11,16	11,03	11,10	11	10,53	10,77	11,91	9,43	10,67
25	pred	7,95	8,44	8,20	8,43	8,85	8,64	9,1	9,9	9,50
	po	8,8	10,34	9,57	8,43	10,23	9,33	10,56	10,49	10,53

Hodnoty celkového poškodenia v rámci celej skupiny (pred alebo po) a stanovovaného parametra sa nachádzajú v tabulke č. 6. V tabulke sa nachádza 20 zhodnotených pacientov a u každého pacienta sme stanovili poškodenie v 100 bunkách (50 buniek na gél a gély boli nanášané v duplikátoch) pred a po anestézii. Hodnoty získané z duplikátov sme spriemerovali a s týmito dátami sme ďalej pracovali pri hodnotení štatistickej významnosti a zostavovaní grafov.

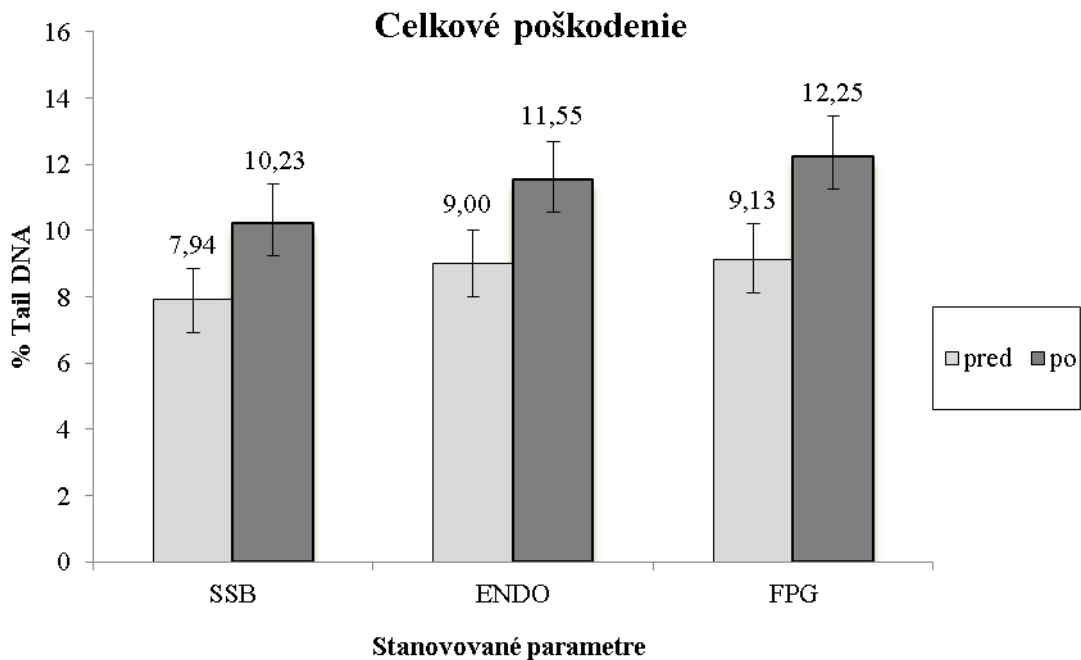
Zo získaných priemerných hodnôt z duplikátov sme si vytvorili tabuľku podľa jednotlivých stanovovaných parametrov (SSB- jednoreťazcové zlomy, ENDO III-oxidované pyrimidíny, FPG- oxidované puríny) a štádia, v ktorom bola vzorka od pacientov odobraná- to je pred a po anestézii. Pre tieto hodnoty sme stanovili medián, priemer, smerodajnú odchýlku a štandardnú chybu merania (tabuľka č. 7) Výsledky týchto štyroch parametrov boli východiskové pre zostavenie krabicového grafu, ktorý nám poukazuje na rozptyl získaných hodnôt, znázorňuje medián a odľahlé hodnoty merania (graf č. 1). Z rovnakých výsledkov sme zostavili stĺpcový graf (graf č. 2), ktorý znázorňuje rozdiely v stanovených jednoreťazcových zlomoch a oxidovaných bázach pred a po anestézii. Na grafe je veľmi pekne viditeľný rozdiel v hladinách poškodenia.

Tabuľka 7: Zjednodušenie tabuľky č. 6- celkové poškodenie DNA

Číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO pred	ENDO po	FPG pred	FPG po
1	8,14	15,16	10,00	11,09	7,86	15,47
2	5,13	11,60	7,93	13,07	12,64	13,92
3	11,16	11,49	13,14	13,22	13,01	14,30
4	10,63	14,17	12,06	17,59	12,81	11,75
5	21,23	27,05	23,48	26,35	24,16	27,25
8	10,10	10,53	14,29	14,68	11,44	18,73
9	2,74	2,09	4,11	3,73	5,55	6,02
11	5,55	6,53	4,94	7,21	5,90	6,98
12	9,22	11,67	10,29	13,21	5,14	8,43
13	12,90	13,82	8,70	14,83	15,04	16,79
14	7,26	8,05	7,67	9,80	7,05	8,38
15	7,41	8,11	6,85	12,74	10,50	15,32
16	7,61	9,36	8,66	12,57	6,88	14,53
18	7,58	11,06	7,91	10,77	8,09	9,49
20	3,90	5,41	5,40	4,95	5,98	5,98
21	2,70	4,00	3,09	6,00	2,95	/
22	5,05	7,41	4,07	5,46	3,75	5,33
23	4,97	6,42	8,73	13,72	4,44	12,95
24	7,34	11,10	10,12	10,77	9,92	10,67
25	8,20	9,57	8,64	9,33	9,50	10,53
median	7,49	10,05	8,65	11,83	7,97	11,75
priemer	7,94	10,23	9,00	11,55	9,13	12,25
smer.odch.	4,156	5,220	4,530	5,088	4,921	5,357
SE	0,929	1,167	1,013	1,138	1,100	1,198



Graf 1: Krabicový graf zostavený pre porovnanie percenta DNA vo chvoste kométy pred a po operácie vo všetkých troch skúmaných parametroch, grafické znázornenie rozptylu hodnôt a mediánu



Graf 2: Stĺpcový graf zostavený pre porovnanie percenta DNA vo chvoste kométy pred a po anestézii vo všetkých troch skúmaných parametroch (použitým parametrom je priemer získaný z hodnôt poškodenia so strednou chybou merania)

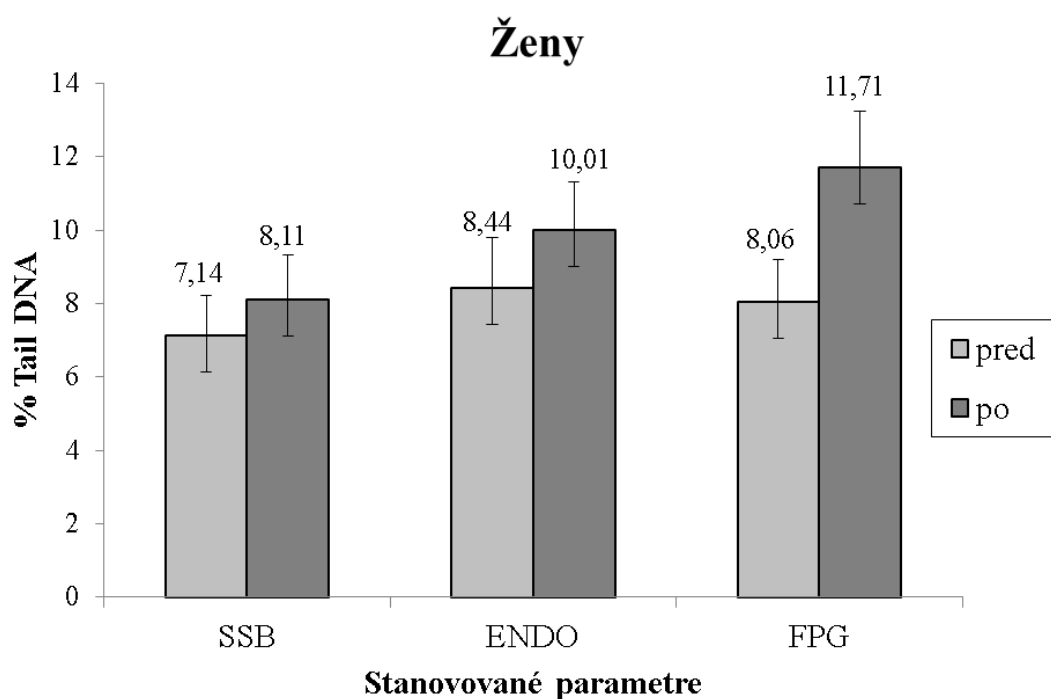
5.1.3 Závislosť na pohlaví, veku a dĺžke anestézie

Ďalším našim cieľom bolo stanoviť závislosť na niektorých parametroch- pohlavie, vek a dĺžka anestézie.

Po rozdelení pacientov na dve skupiny podľa pohlavia (tabuľka č. 8 a 9) bolo preukázané, že u oboch pohlaví dochádza k zvýšeniu poškodenia DNA, a to u všetkých stanovovaných parametrov (graf č. 3 a 4). Pri porovnaní výsledkov medzi pohlaviami sme došli k záveru, že aj napriek tomu, že počiatočné poškodenie bolo u oboch skupín približne rovnaké, u mužov došlo k väčšiemu navýšeniu vo všetkých troch stanovovaných parametroch (SSB aj oxidované bázy) po anestézii v porovnaní s hodnotami po zákroku u žien. Najväčší rozdiel nastal u jednoreťazcových zlomov, rozdiel v oxidovaných purínoch bol zase medzi pohlaviami najmenej výrazný (takmer zanedbateľný) (graf č. 5)

Tabuľka 8: Tabuľka priemerných hodnôt poškodenia DNA u žien

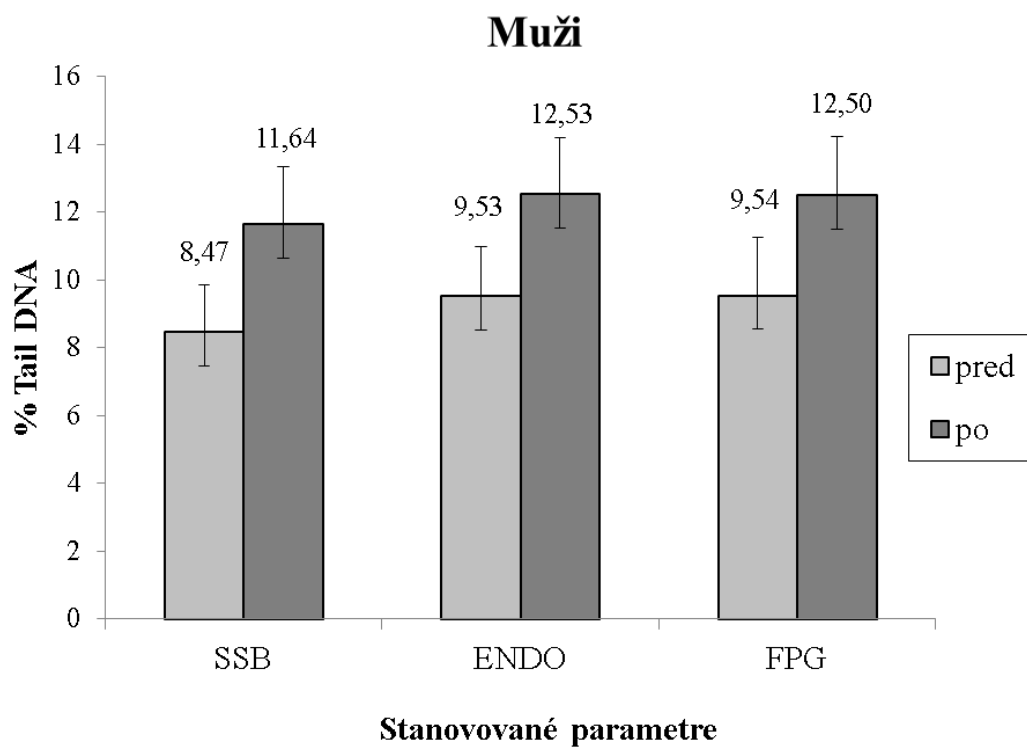
ženy (n=8)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO pred	ENDO po	FPG pred	FPG po
3	11,16	11,49	13,14	13,22	13,01	14,30
8	10,10	10,53	14,29	14,68	11,44	18,73
9	2,74	2,09	4,11	3,73	5,55	6,02
14	7,26	8,05	7,67	9,80	7,05	8,38
15	7,41	8,11	8,66	12,57	6,88	14,53
18	7,58	11,06	7,91	10,77	8,09	9,49
21	2,70	4,00	3,09	6,00	2,95	/
25	8,20	9,57	8,64	9,33	9,50	10,53
priemer	7,14	8,11	8,44	10,01	8,06	11,71
smer.odch.	3,06	3,41	3,87	3,69	3,23	4,35
SE	1,081	1,204	1,367	1,305	1,140	1,539



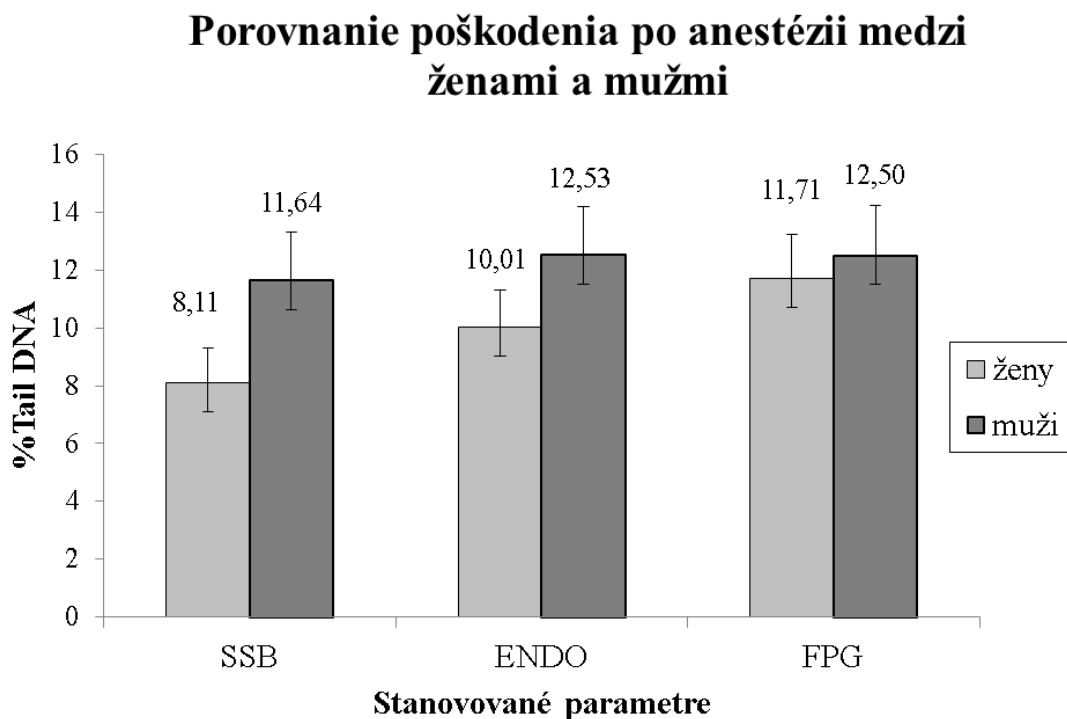
Graf 3: Grafické znázornenie poškodenia DNA u žien

Tabuľka 9: Tabuľka priemerných hodnôt poškodenia DNA u mužov

muži (n=12)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO před	ENDO po	FPG před	FPG po
1	8,14	15,16	10,00	11,09	7,86	15,47
2	5,13	11,60	7,93	12,67	12,64	13,92
4	10,63	14,17	12,06	17,59	12,81	11,75
5	21,23	27,05	23,48	26,35	24,16	27,25
11	5,55	6,53	4,94	7,21	5,90	6,98
12	9,22	11,67	10,29	13,21	5,14	8,43
13	12,90	13,82	8,70	14,83	15,04	16,79
16	7,61	9,36	8,66	12,57	6,88	14,53
20	3,90	5,41	5,40	4,95	5,98	5,98
22	5,05	7,41	4,07	5,46	3,75	5,33
23	4,97	6,42	8,73	13,72	4,44	12,95
24	7,34	11,10	10,12	10,77	9,92	10,67
priemer	8,47	11,64	9,53	12,53	9,54	12,50
smer.odch.	4,81	5,85	5,00	5,76	5,87	6,00
SE	1,388	1,689	1,443	1,662	1,695	1,732



Graf 4: Grafické znázornenie poškodenia DNA u mužov

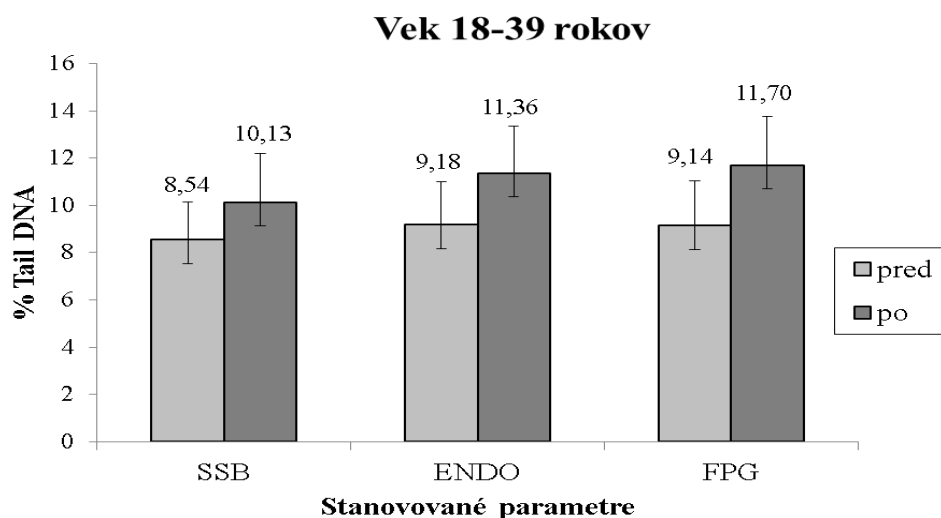


Graf 5: Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi pohlaviami. Počiatočné poškodenie pred anestéziou bolo u oboch pohlaví približne rovnaké.

Na základe vekovej závislosti sme si pacientov rozdelili na dve skupiny- vo veku 18-39 rokov a 40-66 rokov (tabuľka 10 a 11). Rozsah veku bol stanovený náhodne tak, aby sme dostali dve rovnako početné skupiny. Poškodenie pred operáciou bolo približne rovnaké. Na grafickom zobrazení je viditeľné, že u oboch skupín došlo k nárastu poškodenia DNA vo všetkých troch parametroch (graf č. 6 a 7).

Tabuľka 10: Tabuľka priemerných hodnôt poškodenia DNA (vek 18-39 rokov)

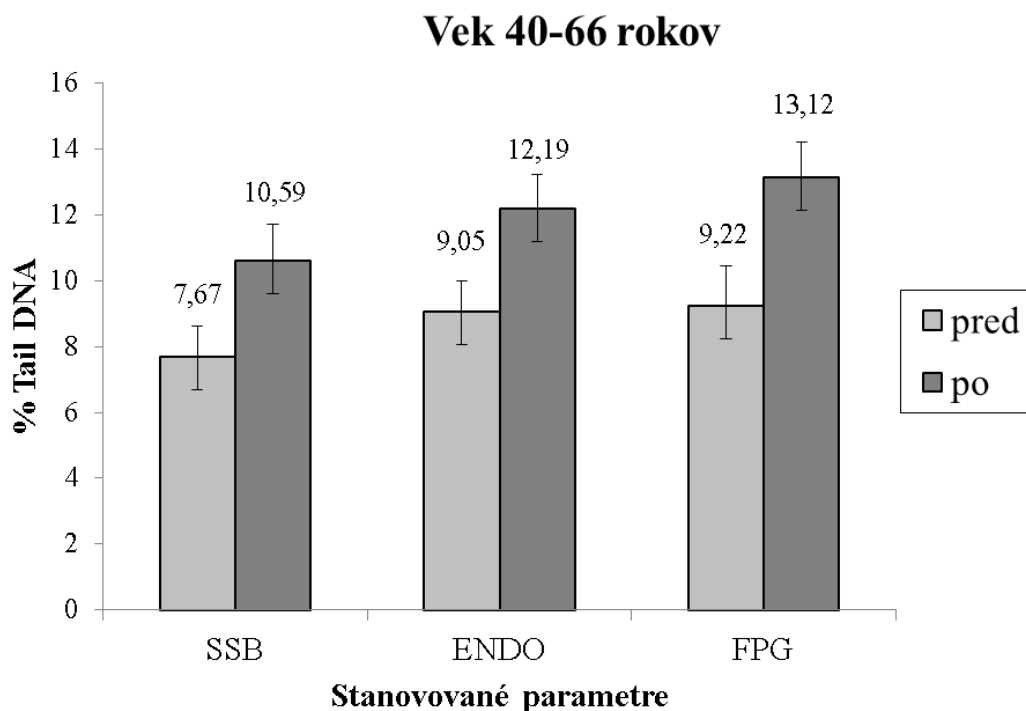
18-39 rokov (n=10)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO před	ENDO po	FPG před	FPG po
3	11,16	11,49	13,14	13,22	13,01	14,30
9	2,74	2,09	4,11	3,73	5,55	6,02
11	5,55	6,53	4,94	7,21	5,90	6,98
12	9,22	11,67	10,29	13,21	5,14	8,43
14	7,26	8,05	7,67	9,80	7,05	8,38
15	7,41	8,11	6,85	12,74	10,50	15,32
16	7,61	9,36	8,66	12,57	6,88	14,53
22	5,05	7,41	4,07	5,46	3,75	5,33
25	8,20	9,57	8,64	9,33	9,50	10,53
5	21,23	27,05	23,48	26,35	24,16	27,25
priemer	8,54	10,13	9,18	11,36	9,14	11,70
smer.odch.	5,02	6,54	5,77	6,25	5,97	6,56
SE	1,589	2,068	1,824	1,977	1,887	2,076



Graf 6: Grafické znázornenie poškodenia DNA u vekovej kategórie 18-39 rokov

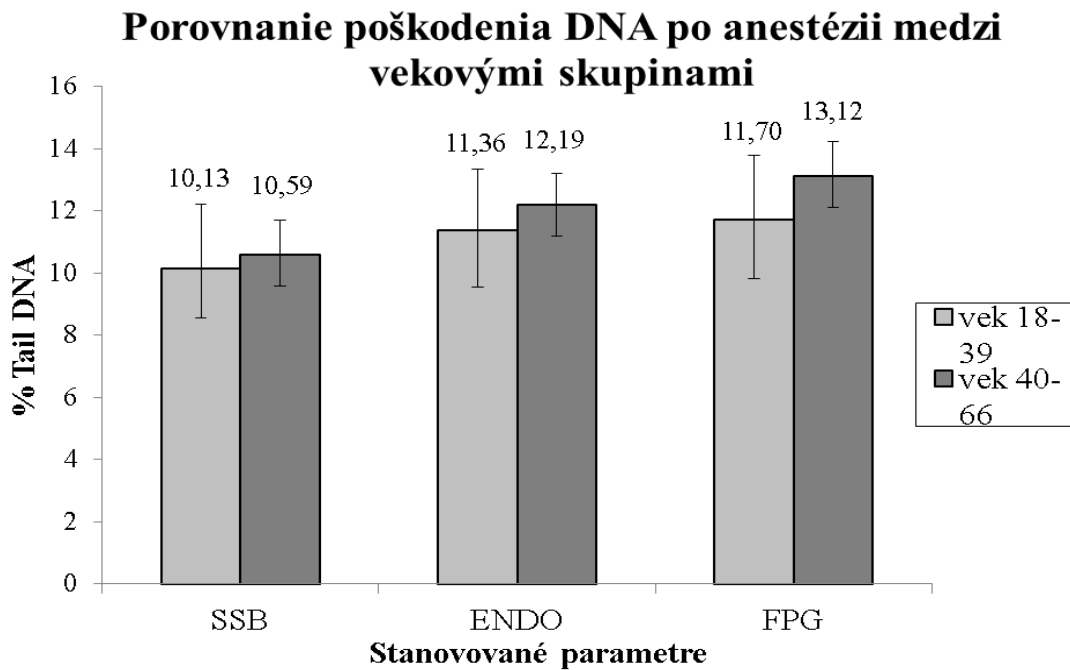
Tabulka 11: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA (vek 40-66 rokov)

40-66 rokov (n=10)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO pred	ENDO po	FPG pred	FPG po
1	8,14	15,16	10,00	11,09	7,86	15,47
2	5,13	11,60	7,93	12,67	12,64	13,92
4	10,63	14,17	12,06	17,59	12,81	11,75
8	10,10	10,53	14,29	14,68	11,44	18,73
13	12,90	13,82	8,70	14,83	15,04	16,79
14	7,26	8,05	7,67	9,80	7,05	8,38
18	7,58	11,06	7,91	10,77	8,09	9,49
21	2,70	4,00	3,09	6,00	2,95	/
23	4,97	6,42	8,73	13,72	4,44	12,95
24	7,34	11,10	10,12	10,77	9,92	10,67
priemer	7,67	10,59	9,05	12,19	9,22	13,12
smer.odch.	3,00	3,54	2,96	3,24	3,86	3,44
SE	0,948	1,120	0,935	1,023	1,220	1,087



Graf 7: Grafické znázornenie poškodenia DNA u vekovej kategórie 40-66 rokov

Na základe porovnanie hodnôt percenta Tail DNA po anestézii medzi skupinami, sme došli k záveru, že u skupiny s vyšším vekom nedošlo k navýšeniu poškodenia DNA vzhľadom k prvej skupine. Najväčší rozdiel nastal v prípade oxidovaných purínov, ale vzhľadom k rozsahu získaných hodnôt je tento rozdiel zanedbateľný a nevýznamný (graf č. 8).

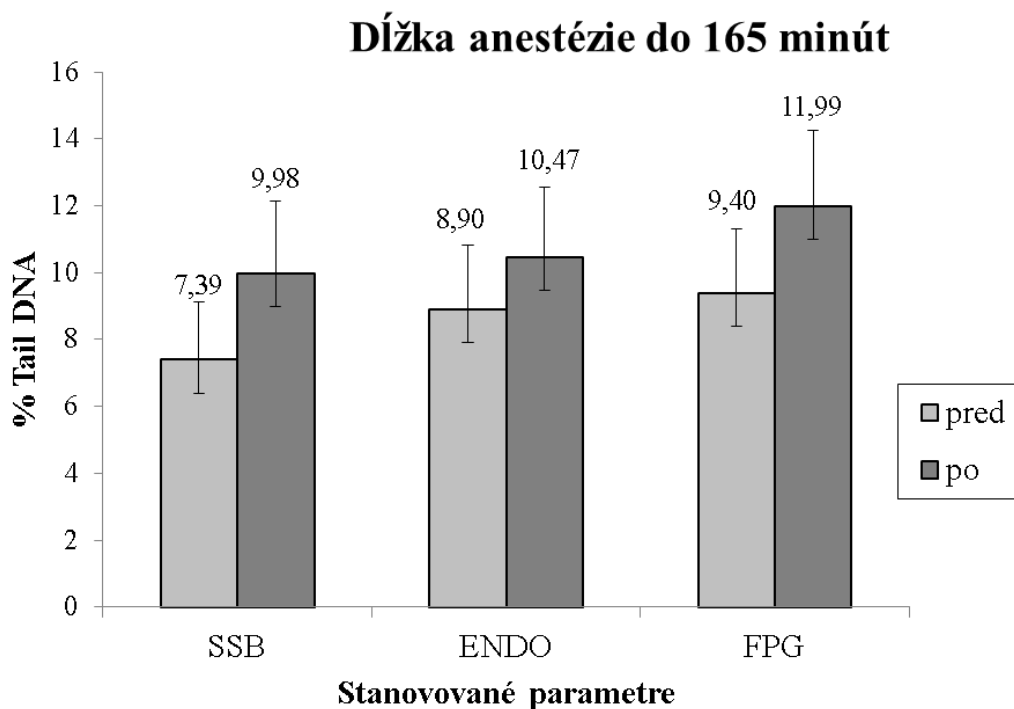


Graf 8: Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi vekovými skupinami. Počiatočné poškodenie pred anestéziou bolo u oboch vekových skupín približne rovnaké.

Po rozdelení pacientov na dve skupiny (dĺžka anestézie do 165 minút a od 170 minút, tabuľka č. 12 a 13) sme došli k záveru, že u oboch skupín dochádza k zvýšenému výskytu zlomov a oxidovaných báz po anestézii (graf č. 8 a 9). U skupiny, ktorá bola dlhšie exponovaná anestetikám je viditeľný väčší nárastu u všetkých troch parametrov, ale pri porovnaní hodnôt parametrov po anestézii medzi týmito dvoma skupinami nie je tento rozdiel významný (graf č. 10). Dôvodom je opäť vysoká variabilita a rozptyl výsledkov.

Tabulka 12: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA u pacientov s dĺžkou anestézie do 165 minút

dĺžka anestézie do 165 minút (n=10)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO před	ENDO po	FPG před	FPG po
2	5,13	11,60	7,93	12,67	12,64	13,92
5	21,23	27,05	23,48	26,35	24,16	27,25
8	10,10	10,53	14,29	14,68	11,44	18,73
9	2,74	2,09	4,11	3,73	5,55	6,02
18	7,58	11,06	7,91	10,77	8,09	9,49
20	3,90	5,41	5,40	4,95	5,98	5,98
21	2,70	4,00	3,09	6,00	2,95	/
22	5,05	7,41	4,07	5,46	3,75	5,33
24	7,34	11,10	10,12	10,77	9,92	10,67
25	8,20	9,57	8,64	9,33	9,50	10,53
priemer	7,39	9,98	8,90	10,47	9,40	11,99
smer.odch.	5,44	6,85	6,12	6,64	6,10	7,14
SE	1,719	2,166	1,936	2,100	1,928	2,259

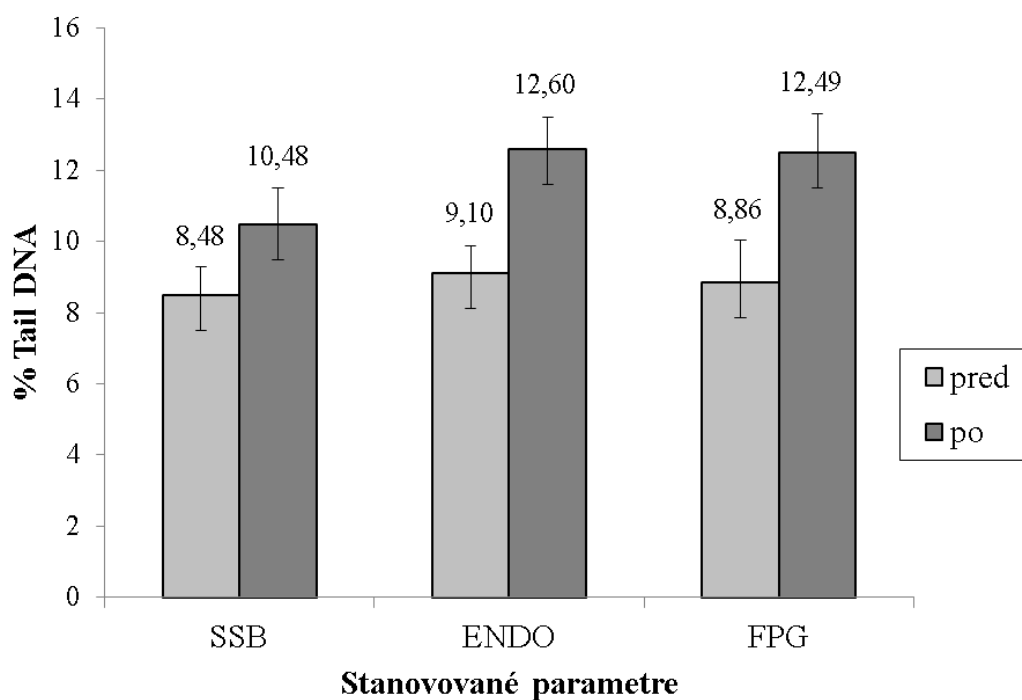


Graf 9: Grafické znázornenie poškodenia DNA u pacientov s dĺžkou anestézie do 165 minút

Tabulka 13: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA u pacientov s dĺžkou anestézie viac ako 170 minút

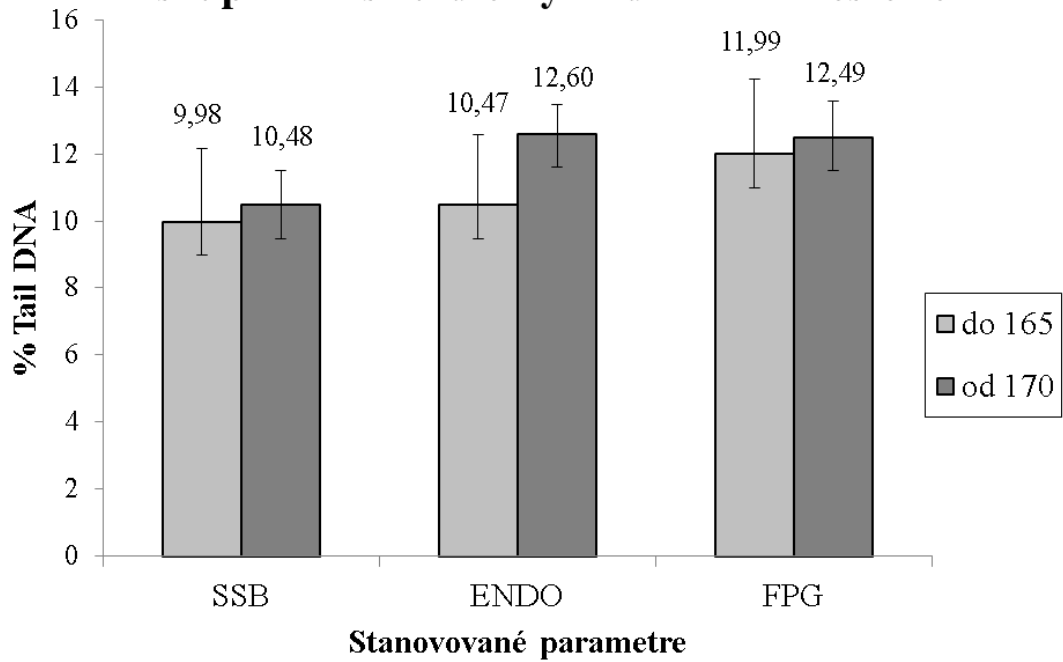
dĺžka anestézie od 170 minút (n=10)						
číslo pacienta	SSB pred	SSB po	ENDO před	ENDO po	FPG před	FPG po
1	8,14	15,16	10,00	11,09	7,86	15,47
3	11,16	11,49	13,14	13,22	13,01	14,30
4	10,63	14,17	12,06	17,59	12,81	11,75
11	5,55	6,53	4,94	7,21	5,90	6,98
12	9,22	11,67	10,29	13,21	5,14	8,43
13	12,90	13,82	8,70	14,83	15,04	16,79
14	7,26	8,05	7,67	9,80	7,05	8,38
15	7,41	8,11	6,85	12,74	10,50	15,32
16	7,61	9,36	8,66	12,57	6,88	14,53
23	4,97	6,42	8,73	13,72	4,44	12,95
priemer	8,48	10,48	9,10	12,60	8,86	12,49
smer.odch.	2,50	3,23	2,41	2,81	3,71	3,45
SE	0,791	1,022	0,761	0,889	1,174	1,092

Dĺžka anestézie od 170 minút



Graf 10: Grafické znázornenie poškodenia DNA skupiny pacientov s dĺžkou anestézie viac ako 170 minút

Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi skupinami s rozdielnymi dĺžkami anestézie



Graf 11: Porovnanie poškodenia DNA po anestéziách medzi skupinami podľa dĺžky anestézie. Počiatočné poškodenie pred anestéziou bolo u oboch skupín približne rovnaké.

5.2 Stanovenie reparačnej schopnosti lymfocytov

číslo sklíčka	číslo pacienta	pred/po	%Tail DNA
1	1	pred	13,44
2		po	6,2
3	2	pred	16,64
4		po	5,75
5	3	pred	9,93
6		po	10,09
7	4	pred	12,53
8		po	12,08
9	5	pred	9,37
10		po	7,24
11	6	pred	9,52
12		po	7,24
13	7	pred	6,87
14		po	5,88
15	8	pred	6,03
16		po	7,89
17	9	pred	4,69
18		po	6,56
19	11	pred	4,32
20		po	5,34
21	13	pred	2,52
22		po	12,43
23	14	pred	5,93
24		po	4,88
25	15	pred	7,37
26		po	4,12
27	16	pred	11,78
28		po	14,82
29	17	pred	11,3
30		po	8,22
31	18	pred	5,03
32		po	6,83
33	20	pred	9,68
34		po	11,59
35	21	pred	22,81
36		po	25,27
37	22	pred	3,88
38	23	pred	8,37
39		po	9,31
40	24	pred	14,09
41		po	7,98
42	25	pred	6,08
43		po	3,23
44		obarvené buňky + svetlo	2,16
45		FPG	2,69
46		farbené bunky + svetlo	2,42
47		bunky + svetlo (bez farby)	2,43
48		bunky	1,08

Tabulka 14: Výsledky odčítania hodnôt % Tail DNA z vyhodnocovacieho softvéru. V červenej kolónke je hodnota, ktorá je východisková pre určenie správnosti metódy. FPG je pozitívna kontrola a udáva správnosť výsledkov.

Ako je zrejmé aj z tabulky č. 14, v prípade stanovenia schopnosti lymfocytov opraviť vzniknuté lézie na HeLa bunkách, bola táto časť experimentu neúspešná. Hodnota pozitívnej kontroly vyšla príliš nízka, a preto sme došli k záveru, že nastala chyba v určitom bode metodiky. Vzhľadom k tomu, že FPG, rovnako ako u stanovenia poškodenia DNA, rozpoznáva miesta s oxidovanými purínmi a premieňa ich na jednoreťazcové zlomy, usudzujeme, že v našom prípade došlo k zlyhaniu tvorby oxidovaných purínov v HeLa bunkách. Chyba zrejme nastala v použití nekvalitného fotosenzibilizátora. Použili sme zamrazený roztok fotosenzibilizátora a ten bol zrejme po tomto skladovaní nefunkčný. Preto v použitých bunkách kultúry nedošlo k tvorbe oxidovaných purínov. Výsledky teda nie sú vhodné pre ďalšie štatistické ani grafické hodnotenie.

6. DISKUSIA

Mnohé liečivá a faktory prostredia spôsobujú poškodenie DNA. Preto je dôležité porozumieť a vedieť správne predpovedať pôsobenie DNA poškodzujúceho činiteľa. Konečný biologický efekt expozície závisí od mnohých procesov v bunke, ktoré ovplyvňujú poškodenie DNA a jej reparáciu. (Brozovic et al., 2010)

Naším cieľom bolo určiť, či má anestézia podiel na poškodení genetickej informácie, a to najmä z dôvodu, že je to nedielná súčasť operačných výkonov, ktorých je bez akýchkoľvek námietok, obrovský počet. Z hodnôt priemerov percenta Tail DNA stanovených z hodnôt získaných od pacientov, boli hodnoty všetkých troch stanovovaných parametrov vyhodnotené ako štatisticky významné. Na základe týchto výsledkov sme usúdili, že **anestézia skutočne prispieva k poškodeniu DNA**. Tento cieľ sme teda splnili. Bohužiaľ, vzhľadom k nejednoznačnosti výsledkov ostatných štúdií sa prikláňam k názoru, že hodnota poškodenia závisí aj od typu operácie. Ak sa jedná o drobnú operáciu, pri ktorej nedochádza k reperfúzii, poškodenie nenastáva. (Braz et al., 2015) Ak ale dochádza k reperfúzii, je možné že kombinácia vyplavených ROS vďaka tomuto stavu s anestéziou výrazne prispieva k navýšeniu poškodenia genetického materiálu v lymfocytoch. Po okamžitej expozícii anestetikám dochádza k poškodeniu DNA (merané 15 minút po zahájení terapie) (Alleva et al., 2003). Druhý deň po anestézii dochádza k rekonvalescencii a zvyšovaniu jednoreťazcových zlomov (pravdepodobne vplyvom reparácie) a v priebehu nasledujúcich dní sa hodnoty oxidovaných báz vracajú naspäť na úroveň pred anestéziou.

Kométovej analýze je vo svojej podstate jednoduchá a relatívne nenáročná metóda s jednoduchou optimalizáciou. Aj napriek možnosti využiť optimalizovanú metódu, vždy je nutné prispôbiť metódu podmienkam experimentu. V našom prípade to bol najmä zber vzoriek a spracovanie ihneď po odbere, pre získanie správnych výsledkov bez arteficiálneho nárastu poškodenia vplyvom skladovania. V určitých krokoch bolo nutné prispôbiť si časy u jednotlivých pracovných krokov. V našom prípade najmä pri tuhnutí agaróz vzhľadom k izbovej teplote laboratória počas horúcich letných dní. Avšak, na rozdiel od metód klinickej medicíny a molekulárnej biológie nemá táto metóda jednotné štandardizované postupy. Tento rozdiel síce umožňuje rozšírenie metódy a jej využitia, ale na druhej strane prekáža pri možnosti porovnávania výsledkov z iných laboratórií. Výsledky získané z viacerých laboratórií je možné porovnávať, ale

v prípade porovnávania hodnôt výsledkov viacerých štúdií je najlepšie vychádzať z výsledkov z jedného laboratória.

Naším ďalším dôležitým zistením bol fakt, že program na vyhodnocovanie (LUCIA Comet Assay) nemusí byť vždy stopercentne spoľahlivý. Viac sa nám osvedčilo manuálne označovanie buniek, keďže program nebol schopný označiť celú bunku (aj s chvostom), ale ohraničil len hlavy komét, čím sme získavali nesprávne výsledky.

Pri porovnaní rozdielov v pohlaví, veku aj dĺžky anestézie sme došli k záverom, že u oboch pohlaví dochádza k nárastu poškodenia vo všetkých troch sledovaných parametroch. Rovnako existuje rozdiel v náraste poškodenia DNA medzi pohlaviami- u mužov je poškodenie vyššie. U oboch vekových kategórií došlo k nárastu poškodenia. Pri porovnaní vekových kategórií sme došli k záveru, že u starších osôb bolo zvýšenie poškodenia malé a nevýznamné vzhľadom k rozptylu nameraných hodnôt. Dĺžka anestézie má rovnako veľmi nepatrný vplyv, a preto pri dlhšej expozícii anestetikám je oxidatívne poškodenie mierne vyššie, ale vzhľadom k rozptylu hodnôt, nevýznamné.

Táto práca bola vypracovaná ako klinická štúdia a predchádzajúce *in vitro* experimenty (testovanie účinkov anestetík na bunkových kultúrach) neprebehli. Dôvodom je fakt, že výsledky *in vitro* štúdií častokrát nekorelujú s výsledkami získanými priamo od pacientov. Táto štúdia bola ale pilotná, takže našim cieľom bolo určiť použiteľnosť metódy v danej problematike a od jej výsledkov sa presunúť ďalej k iným stanoveniam s homogénnejším výberom pacientov a anestetík. V súčasnej štúdií sme boli obmedzení aj možnosťami chirurgickej kliniky, ktorá nám dodávala vzorky od pacientov.

Do budúcnosti by mohli byť naše výsledky užitočné pri zlepšení podmienok pre pacientov, ktorí podstupujú operáciu s anestéziou a docieľiť tak zníženie oxidatívneho stresu pre pacienta a jeho rýchlejšiu rekonvalescenciu. V ďalšom plánovanom experimente by sme chceli porovnávať naše výsledkami s výsledkami plánovaného stanovenia poškodenia po epidurálnej anestézii. Existuje možnosť, že tento typ anestézie nie je, na rozdiel od celkovej, taký škodlivý a u niektorých typov operácií by bolo možné nahradiť celkovú anestéziu epidurálnou.

Rovnako je možné využiť výsledky tohto experimentu pri úvahe o predpríprave pacienta na anestéziu, najmä ak sa jedná o pacientov, ktorí podstupujú opakovane niekoľko zákrokov. Vhodnou predprípravou môže byť podávanie stravy bohatej na

antioxidanty, prípadne je možné zahrnúť zmenu stravy aj po anestézii, aby sa zabezpečila rýchlejšia rekonvalescencia.

Nedostatkom tejto štúdie je nedokončený experiment so stanovením reparačnej schopnosti lymfocytov. Na základe nesprávneho kroku v postupe experimentu sa nepodarilo získať správne výsledky a nebolo možné vykonať štatistické hodnotenie. Naším predpokladom bolo, že po zákroku pod vplyvom anestézie dochádza k útlmu reparačnej schopnosti.

7. ZÁVER

Našimi expermintami sme overili možnosť využitia metódy pri stanovení oxidatívneho poškodenia DNA u pacientov po celkovej anestézii. Využili sme ako klasickú verziu alkalickéj kométovej analýzy, tak aj jej modifikáciu s využitím enzýmov na stanovenie oxidovaných báz (purínov a pyrimidínov). Rovnako sme využili aj modifikáciu CA na stanovenie reparačnej schopnosti získaných lymfocytov na bunkovej kultúre. Preukázali sme štatisticky významné zvýšenie poškodenia DNA vo všetkých troch stanovovaných parametroch (jednoreťazcové zlomy, oxidované puríny a pyrimidíny) a závislosť miery poškodenia na pohlaví, veku a dĺžke operácie. Došli sme k záveru, že u mužov dochádza k väčšiemu navýšeniu poškodenia DNA oproti ženám na základe toho, že hladiny sledovaných parametrov boli pred anestéziou podobné. Takisto sme preukázali závislosti medzi zvyšujúcim sa vekom a dĺžkou anestézie s mierou poškodenia DNA. Avšak experiment so stanovením reparačnej schopnosti lymfocytov nebol úspešný. Na základe nesprávneho kroku v metodike nevyšla správne pozitívna kontrola, a nami získané výsledky nie sú použiteľné pre zhodnotenie štatistickej významnosti.

8. POUŽITÉ SKRATKY

Skratka	Vysvetlenie
% Tail DNA	% DNA, ktoré tvorí chvost kométy
8-oxoGua	8-oxoguanín
A	adenín
a i.	a iné
Alka	3-methyladenin DNA glykozyláza II
AP miesto	apurínové/apyrimidínové miesto
ASA I a II	American Society of Anesthesiology- rozdelenie pacientov do kategórií podľa charakteristiky (I- pacient bez patologického nálezu, II- pacinet s mierne závažným ochorením)
ATP	adenosintrifosfát
BER	base excision repair, bázová excízna reparácia
C	cytozín
CA	comet assay, kométová analýza
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DSB	double strand breaks, dvojreťazcové zlomy DNA
ENDO	endonukleáza III
ENDO III	endonukleáza III
FCM	flow cytometry, prietoková cytometria
FEN-1	flap endonukleáza 1
FISH	fluorescenčná <i>in-situ</i> hybridizácia
FPG	formamidopyrimidín DNA glykozyláza
FPG	Formamidopyrimidin DNA-glykozyláza
G	guanín
HMP agaróza	high melting point agarose, agaróza s vysokou teplotou tavenia
ISF	izoflurán
LMP agaróza	low melting point agarose, agaróza s nízkou teplotou tavenia
MMR	mismatch repair, oprava nesprávne zaradených báz
napr.	napríklad
NER	nucleotide excision repair, nukleotidová excízna reparácia
OGG1	8-Oxoguanin glykozyláza
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová reťazová reakcia
PF	propofol
ppm	parts per million
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species, reaktívne formy kyslíka

SCE	sister chromatid exchange, výmena sesterských chromatíd
SCGE	jednobunková gélová elektroforéza
SVF	sevoflurán
T	tymín
TP53	tumorový proteín p53
TUNNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
tzv.	takzvané
UV	ultraviolet, ultrafialové svetlo

9. ZOZNAM TABULIEK

Tabulka 1: Faktory vplývajúce na poškodenie DNA	11
Tabulka 2: Súhrnný zoznam údajov o pacientoch	40
Tabulka 3: Výsledná tabulka s parametrami z hodnotenia	52
Tabulka 4: Štatistická významnosť meraní	57
Tabulka 5: Štatistické údaje získané zhodnotením percenta DNA vo chvoste komét	57
Tabulka 6: Tabulka s konečnými hodnotami.....	58
Tabulka 7: Zjednodušenie tabulky č. 6- celkové poškodenie DNA.....	59
Tabulka 8: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA u žien.....	61
Tabulka 9: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA u mužov	62
Tabulka 10: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA (vek 18-39 rokov).....	64
Tabulka 11: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA (vek 40-66 rokov).....	65
Tabulka 12: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA (dĺžka anestézie do 165 minút)	67
Tabulka 13: Tabulka priemerných hodnôt poškodenia DNA (dĺžka anestézie >170 minút)	68
Tabulka 14: Výsledky odčítania hodnôt % Tail DNA	70

10. ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Bázová excízna reparácia.	17
Obrázok 2: Schéma mechanizmu nukleotidovej excíznej reparácie.....	18
Obrázok 3: Schéma stanovenia reparačnej schopnosti.....	24
Obrázok 4: Zmeny v organizácii DNA po denaturácii.....	27
Obrázok 5: Ukážka vyhodnocovania komét.....	28
Obrázok 6: Rozdelenie krvných elementov po centrifugácii.....	45
Obrázok 7: Schéma kométovej metódy na detekciu DNA poškodenia	49
Obrázok 8: Hodnotenie komét- správne označovanie buniek	50
Obrázok 9: Prekryv buniek pri hodnotení	51
Obrázok 10: Spôsob hodnotenia sklíčok meandrovitým pohybom	51

11. ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Krabicový graf- porovnanie percenta DNA vo chvoste kométy pred a po anestézii	60
Graf 2: Stĺpcový graf- porovnanie percenta DNA vo chvoste kométy pred a po anestézii	60
Graf 3: Grafické znázornenie poškodenia DNA u žien.....	62
Graf 4: Grafické znázornenie poškodenia DNA u mužov.....	63
Graf 5: Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi pohlaviami.....	63
Graf 6: Grafické znázornenie poškodenia DNA u vekovej kategórie 18-39 rokov.....	64
Graf 7: Grafické znázornenie poškodenia DNA u vekovej kategórie 40-66 rokov.....	65
Graf 8: Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi vekovými skupinami.....	66
Graf 9: Grafické znázornenie poškodenia DNA u pacientov (dĺžka anestézie do 165 minút)	67
Graf 10: Grafické znázornenie poškodenia DNA u pacientov (dĺžkou anestézie >170 minút)	68
Graf 11: Porovnanie poškodenia DNA po anestézii medzi skupinami podľa dĺžky anestézie.....	69

12. POUŽITÁ LITERATÚRA

AHUJA YR a SARAN R. Potential of Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay) in Heavy Ion Radiation Biology. *Indian J. Hum. Genet.* 2001;1(2):151-56.

ALAPETITE C, WACHTER T, SAGE E a MOUSTACCHI E. Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996;69:359-369.

ALLAOUCHICHE B, DEBON R, GOUDABLE J, CHASSARD J a DUFLO F. Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane. *Anaesth. Analg.* 2001;93:981-5.

ALLEVA R, TOMASETTI M, SOLENGHI MD, STAGNI F, GAMBERINI F, BASSI A, FORNASARI PM, FANELLI G a BORGHI B. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death after orthopaedic surgery under general anaesthesia. *Mutagenesis* 2003;18(5):423-428. DOI: 10.1093/mutage/geg013. ISSN 1464-3804.

AL-SALMANI K, ABBAS HHK, SCHULPEN S, KARBASCHI M, ABDALLA I, BOWMAN KJ, SO KK, EVANS MD, JONES GD, GODSCHALK RW a COOKE MS. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radic. Biol. Med.* 2011;51(3):719-725. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.020. ISSN 08915849.

ANDREW AS, NELSON HH, KELSEY KT, MOORE JH, MENG AC, CASELLA DP, TOSTESON TD, SCHNED AR a KARAGAS MR. Concordance of multiple analytical approaches demonstrates a complex relationship between DNA repair gene SNPs, smoking, and bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2005;27(5):1030-7.

AZQUETA A a COLLINS AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 2013;87(6):949-68.

AZQUETA A, GUTZKOW KB, BRUNBORG G a COLLINS AR. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutat. Res.* 2011;724(1-2):41-45. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.05.010. ISSN 13835718.

AZQUETA A, LORENZO Y a COLLINS AR. In vitro comet assay for DNA repair: awarning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis* 2009;24:379-381. DOI: 10.1093/mutage/geb009 .

AZQUETA A, SHAPOSHNIKOV S a COLLINS AR. DNA repair measured by the comet assay. *DNA Repair* 2011, s. 616-636. ISBN 978-953-307-697-3. Získané z: <http://cdn.intechopen.com/pdfs/23171.pdf>.

AZQUETA A, SLYSKOVA J, LANGIE SAS, O'NEILL GAIVÃO I a COLLINS AR. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics* 2014;5:1-8. DOI: 10.3389/fgene.2014.00288. ISSN 1664-8021.

BADEN JM a SIMMON VF. Mutagenic effects of inhalation anaesthetics. *Mutat. Res.* 1980;75:169-189.

BANATH JP, KIM A a OLIVE PL. Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline comet assay. *Radiat. Res.* 2001;155:564-571.

BAUCH T, BOCKER W, MALLEK U, MULLER WU a STREFFER C. Optimization and standardization of the “comet assay” for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther. Onkol.* 1999;175:333-340.

BEEDANAGARI S, VULIMIRI SV, BHATIA S a MAHADEVAN B. Genotoxicity biomarkers. *Biomarkers in Toxicology*. Elsevier 2014, s. 729-742. DOI: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00043-9. ISBN 9780124046306.

BIENENGRAEBER MW, WEIHRAUCH D, KERSTEN JR, PAGEL PS a WARLTIER DC. Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul. Pharmacol.* 2005;42: 243-252.

BOS J. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1988;195:255-271.

BRAZ MG, BRAZ LG, BARBOSA BS, GIACOBINO J, OROSZ JEB, SALVADORI DMF a BRAZ JRC. DNA damage in patients who underwent minimally invasive surgery under inhalation or intravenous anesthesia. *Mutat. Res.* 2011;726(2):251-254. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.09.007. ISSN 13835718.

BRAZ MG, BRAZ LG, FREIRE CMM, LUCIO MC, BRAZ JRC, TANG G, SALVADORI DMF a YEUM KJ. Isoflurane and Propofol Contribute to Increasing the Antioxidant Status of Patients During Minor Elective Surgery. *Medicine* 2015;94(31):1-9. DOI: 10.1097/MD.0000000000001266. ISSN 0025-7974.

BRAZ MG, MAGALHÃES MR, SALVADORI DM, FERREIRA AL, BRAZ LG, SAKAI E a BRAZ JR. Evaluation of DNA damage and lipoperoxidation of propofol in patients undergoing elective surgery. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2009;26:654–660.

BRAZ MG, MAZOTI MA, GIACOBINO J, BRAZ LG, GOLIM MA, FERRASI AC, CARVALHO LR, BRAZ JR a SALVADORI DM. Genotoxicity, cytotoxicity and gene expression in patients undergoing elective surgery under isoflurane anaesthesia. *Mutagenesis* 2011b;26:415-420.

BROZOVIC G, ORSOLIC N, ROZGAJ R, KASUBA V, KNEZEVIC F, KNEZEVIC AH, BENKOVIC V, LISICIC D, BOROJEVIC N a DIKIC D. DNA damage and repair after exposure to sevoflurane in vivo, evaluated in Swiss albino mice by the alkaline comet assay and micronucleus test. *J. Appl. Genet.* 2010;51:79-86. DOI: 10.1007/BF03195714. ISSN 1234-1983.

CHANDRASEKHAR M. Evaluation of genetic damage in operating room personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis* 2006;21(4):249-254. DOI: 10.1093/mutage/gel029. ISSN 0267-8357.

COLLINS AR a AZQUETA A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies: further applications of the comet assay. *Mutat. Res.* 2012;736:122-129. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.005.

COLLINS AR a HORVATHOVA E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of Comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* 2001;29:337-341.

COLLINS AR, DUSINSKA M, HORVATHOVA E, MUNRO E, SAVIO M, a STETINA R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis.* 2001;16(4):297-301.

COLLINS AR, FLEMING IM a GEDIK CM. In vitro repair of oxidative and ultraviolet-induced DNA damage in supercoiled nucleoid DNA by human cell extract. *Biochim. Biophys. Acta* 1994;1219(3):724-727. DOI: 10.1016/0167-4781(94)90236-4.

COLLINS AR, KOPPEN G, VALDIGLESIAS V, DUSINSKA M, KRUSZEWSKI M, MØLLER P, ROJAS E, DHAWAN A, BENZIE I, COSKUN E, MORETTI M, SPEIT G a BONASSI S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2014;759:27-39.

COLLINS AR, MA AG a DUTHIE SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 1995;336:69-77.

COLLINS AR, MITCHELL DL, ZUNINO A, DE WIT J a BUSCH D. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environ. Mol. Mutagen.* 1997;29:152-160.

COLLINS AR, OSCOZ AA, BRUNBORG G, GAIVA I, GIOVANNELLI L, KRUSZEWSKI M, SMITH C a STETINA R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143-151.

COLLINS AR. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* 2004;26:249-261.

COLLINS AR a FERGUSON LR. DNA repair as a biomarker. *Mutat. Res.* 2012;736(1-2):2-4. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2012.03.008. ISSN 00275107. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510712000772>.

COLLINS, AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat. Res.* 2009;681(1):24-32. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.10.002. ISSN 13835742.

COOK PR, BRAZELL IA a JOST E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell. Sci.* 1976;22:303-324.

CORBETT TH. Cancer and congenital anomalies associated with anesthetics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1976;271:58-66.

- COUSSENS LM, a WERB Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–867.
- DE BOER J a HOEIJMAKERS JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000;21:453-460.
- DEAVALL DG, MARTIN EA, HORNER JM a ROBERTS R. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology*. 2012 [cit. 2017-04-25]. DOI: 10.1155/2012/645460. ISSN 1687-8191. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jt/2012/645460/>.
- DELOGU G, MORETTI S, FAMULARO G, ANTONUCCI A, SIGNORE L, MARCELLINI S, LO BOSCO L a DE SIMONE C. Circulating neutrophils exhibit enhanced apoptosis associated with mitochondrial dysfunctions after surgery under general anesthesia. *Acta Anesth. Scand.* 2001;45:87-94.
- DNA Damage and Repair- A Quick Revision. *Biochemistry for medics*. 2013 [cit. 2017-05-09]. Dostupné z: <http://www.namrata.co/dna-damage-and-repair-a-quick-revision/>.
- DUSINSKA M, a COLLINS AR. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 2008;23(3):191-205.
- EGER EI 2ND, WHITE AE, BOWN CL, BIAVA CG, CORBETT TH a STEVENS WC. A test of the carcinogenicity of enflurane, isoflurane, halothane, methoxyflurane, and nitrous oxide in mice. *Anesth. Analg.* 1978;57:678-694.
- EGER EI 2ND, LASTER MJ, WINEGAR R, HAN C a GONG D. Compound A induces sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Anesthesiology* 1997;86:918-922.
- EPE B. DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1995;127:223-248.
- EROGLU F, YAVUZ L, CEYLAN BG, YILMAZ F, EROGLU E, DELIBAS N a NAZIROĞLU M. New volatile anesthetic, desflurane, reduces vitamin E level in blood of operative patients via oxidative stress. *Cell Biochem. Funct.* 2010;28:211-6.

ESTERBAUER H, WAG G a PUHL H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.* 1993;49:566-576.

EVENSON DP, KASPERSON K a WIXON RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007;65:93-113.

FETTERMAN JL, HOLBROOK M, WESTBROOK DG, et al. Mitochondrial DNA damage and vascular function in patients with diabetes mellitus and atherosclerotic cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology* 2016;15(1). DOI: 10.1186/s12933-016-0372-y. ISSN 1475-2840.

FRIEDBERG EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001;1:22-33.

GAIVAO I, PIASEK A, BREVIK A, SHAPOSHNIKOV S a COLLINS AR. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol. Toxicol.* 2009;25:45-52.

GRINDEL A, GUGGENBERGER B, EICHBERGER L, POPPELMEYER C, GSCHAIDER M, TOSEVSKA A, MARE G, BRISKEY D, BRATH H a WAGNER KH. Oxidative stress, DNA damage and DNA repair in female patients with diabetes mellitus type 2. *PLoS One* 2016;11(9).

GROLLMAN AP a MORIYA M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.* 1993;9:246–249.

GUNASEKARANA VA. Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. *J. Clin. Diagn. Res.* 2015;9(3):GE01–GE05. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12062.5622. ISSN 2249782x.

HANSEN WK a KELLEY MR. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;295:1–9.

HARRISON D, GRIENDLING KK, LANDMESSER U, HORNIG B a DREXLER H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 2003;91(3):7-11. DOI: 10.1016/S0002-9149(02)03144-2. ISSN 00029149.

HARTMANN A, AGURELL E, BEEVERS C, BRENDLER-SCHWAAB S, BURLINSON B, CLAY P, COLLINS AR, SMITH A, SPEIT G, THYBAUD V a TICE RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18(1):45-51.

HARTMANN A, KISKINIS E, FJAELLMAN A a SUTER W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 2001;497:199-212.

HEDGE ML, HEDGE PM, RAO KSJ a MITRA S. Oxidative Genome Damage and Its Repair in Neurodegenerative Diseases: Function of Transition Metals as a Double-Edged Sword. *J. Alzheimers Dis.* 2011;24(2):183-198.

HOERAUF KH, WIESNER G, SCHROEGENDORFER KF, JOBST BP, SPACEK A, HARTH M, SATOR-KATZENSCHLAGER S a RUDIGER HW. Waste anaesthetic gases induce SCEs in lymphocytes of operating room personnel. *Br. J. Anaesthesia* 1999;82:764-766.

Introduction. COMET ASSAY FORUM. Indian Institute of Toxicology Research, India, 2006 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <http://www.cometassayindia.org/introduction.htm>.

IZDES S, SARDAS S, KADIOGLU E, KAYMAK C a OZCAGLI E. Assessment of Genotoxic Damage in Nurses Occupationally Exposed to Anaesthetic Gases or Antineoplastic Drugs by the Comet Assay. *J. Occup. Health* 2009;51(3):283-286.

JAGETIA GC a Nayak V. Effect of doxorubicin on cell survival and micronuclei formation in HeLa cells exposed to different doses of gamma-radiation. *Strahlenther Onkol.* 2000;176:422-428.

JAŁOSZYŃSKI P, KUJAWSKI M, WĄSOWICZ M, SZULC R a SZYFTER K. Genotoxicity of inhalation anesthetics halothane and isoflurane in human lymphocytes studied in vitro using the comet assay. *Mutat. Res.* 1999;439(2):199-206. DOI: 10.1016/S1383-5718(98)00195-8. ISSN 13835718.

JHA AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 2008;23(3):207-21.

KADIOGLU E, SARDAS S, ASLAN S, ISIK E a Karakaya AE. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers* 2004;9:203-209.

KADIOGLU E, SARDAS S, ERTURK S, OZATAMER O a KARAKAYA AE. Determination of DNA damage by alkaline halo and comet assay in patient under sevoflurane anesthesia. *Toxicol. Ind. Health* 2009;25:205-212.

KARABIYIK L, SARDAS S, POLAT U, KOCABAS NA a KARAKAYA AE. Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studied in vivo using the comet assay. *Mutat. Res.* 2001;492:99-107.

KHARASCH ED. Biotransformation of sevoflurane. *Anesth. Analg.* 1995;81(6):27-38.

KIRKLAND D, AARDEMA M, HENDERSON L a MÜLLER L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. *Mutat. Res.* 2005;584(1-2):1-256. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.02.004. ISSN 13835718.

KRAUSE TK, JANSEN L, SCHOLZ J, BOTTCHEH H, WAPPLER F, BURMEISTER MA, AM ESCH JS. Propofol anesthesia in children does not induce sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Mutat. Res.* 2003;542:59-64.

KURASAKI M. Measurement of DNA damage by terminal deoxynucleotidyltransferase reaction. *Adv. Biol. Chem.* 2012;2(3):243-47.

LAFFON B, TEIXEIRA JP, SILVA S, LOUREIRO J, TORRES J, PÁSARO E, MÉNDEZ J a MAYAN O. Genotoxic effects in a population of nurses handling antineoplastic drugs, and relationship with genetic polymorphisms in DNA repair enzymes. *Am. J. Ind. Med.* 2005;48(2):128-136. DOI: 10.1002/ajim.20189. ISSN 0271-3586.

LANGIE SA, KNAAPEN AM, BRAUERS KJJ, VAN BERLO D, VAN SCHOOTEN FJ a GODSCHALK RWL. Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis* 2006;21(2):153-158. DOI: 10.1093/mutage/gel013. ISSN 0267-8357.

LANGIE SA, KNAAPEN AM, HOUBEN JM, et al. The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress. *Toxicol. Lett.* 2007;168:302-309.

LANGIE SA, WILMS LC, ÄMÄLÄINEN S, KLEINJANS JC, GODSCHALK RW a VAN SCHOOTEN FJ. Modulation of nucleotide excision repair in human lymphocytes by genetic and dietary factors. *Br. J. Nutr.* 2010;103(04):490. DOI: 10.1017/S0007114509992066. ISSN 0007-1145.

LIAO W, MCNUTT MA a ZHU WG. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods.* 2009;48(1):46-53.

LIN J, SWAN GE, SHIELDS PG, BENOWITZ NL, GU J, AMOS CI, DE ANDRADE M, SPITZ MR a WU X. Mutagen sensitivity and genetic variants in nucleotide excision repair pathway: genotype–phenotype correlation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2065-2071.

LOVATT T, ALLDERSEA J, LEAR JT, HOBAN PR, RAMACHANDRAN S, FRYER AA, SMITH AG a STRANGE RC. Polymorphism in the nuclear excision repair gene ERCC2/XPD: association between an exon 6-exon 10 haplotype and susceptibility to cutaneous basal cell carcinoma. *Hum. Mutat.* 2005;25:353–359.

MATSUOKA H, KUROSAWA S, HORINOUCHE T, KATO M a HASHIMOTO Y. Inhalation anesthetics induce apoptosis in normal peripheral lymphocytes in vitro. *Anesthesiology* 2001;95:1467-1472.

MCGLYNN AP, WASSON G, O’CONNOR J, MCKELVEY-MARTIN VJ a DOWNES CS. The bromodeoxyuridine comet assay: detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells. *Cancer Res.* 1999;59:5912-5916.

MEMISOGLU A a SAMSON L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.* 2000;451:39-51.

MERK O a SPEIT G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 1999;33:167-172.

MEYER RR, MÜNSTER P, WERNER C a BRAMBRINK AM. Isoflurane is associated with a similar incidence of emergence agitation/delirium as sevoflurane in young children – a randomized controlled study. *Paediatr. Anaesth.* 2007;17:56–60.

MOLLER P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005;96(1):1-42.

MORIO M, FUJII K, SATOH N, IMAI M, KAWAKAMI U, MIZUNO T, KAWAI Y, OGASAWARA Y, TAMURA T, NEGISHI A, KUMAGAI Y a KAWAI T. Reaction of sevoflurane and its degradation products with soda lime. Toxicity of the byproducts. *Anesthesiology* 1992;77:1155–1164.

MORIYA M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC→TA transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993;90:1122-1126.

MURPHY PG, MYERS DS, DAVIES MJ, WEBSTER NR a JONES JG. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol). *Br. J. Anaesth.* 1992;68:613-618.

MUTLU AG. Measuring of DNA damage by quantitative PCR. *Polym. Chain React. InTech* 2012;283-92. DOI: 10.5772/38159. Dostupné na: <https://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/measuring-of-dna-damage-by-quantitative-pcr>.

NADIN SB, VARGAS–ROIG LM a CIOCCA DR. A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay. *J. Histochem. Cytochem.* 2001;49:1183-86.

NANDHAKUMAR S, PARASURAMAN S, SHANMUGAM MM, RAO KR, CHAND P a BHAT BV. Evaluation of DNA damage using single cell gel electrophoresis (Comet Assay). *J. Pharmacol. Pharmacother* 2011;2(2):107-11.

NEELEY WL a ESSIGMANN JM. Mechanisms of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chem. Res. Toxicol.* 2006;19(4):491-505. DOI: 10.1021/tx0600043. ISSN 0893-228x. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx0600043>.

NISHIYAMA T, FUJIMOTO T a HANAOKA K. Comparison of liver function after hepatectomy in cirrhotic patients between sevoflurane and isoflurane in anesthesia with nitrous oxide and epidural block. *Anesth. Analg.* 2004;98:990-993.

O'CONNOR TR a LAVAL J. Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;176:1170-1177.

OKA M, HIRAZAWA K, YAMAMOTO K, IIZUKA N, HAZAMA S, SUZUKI T a KOBAYASHI N. Induction of fas-mediated apoptosis on circulating lymphocytes by surgical stress. *Ann. Surg.* 1996;223:434-440.

OLIVE PL a BANÁTH JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 2006;1(1):23-29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5. ISSN 1754-2189.

OLIVE PL a JOHNSTON PJ. DNA damage from oxidants: influence of lesion complexity and chromatin organization. *Oncol. Res.* 1997;9:287-294.

OLIVE PL, WLODEK D a BANÁTH JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.* 1991;51:4671-4676.

OLIVE PL. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat. Res.* 2009;681:13-23.

OLIVE PL, BANÁTH JP a DURAND RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 1990;122:86-94.

PAZ-ELIZUR T, ELINGER D, LEITNER-DAGAN Y, BLUMENSTEIN S, KRUPSKY M, BERREBI A, SCHECHTMAN E a LIVNEH Z. Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals. *DNA Repair* 2007;6:45-60. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.08.003.

PEGGY L A BANÁTH JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 2006;1(1):23-29. DOI: 10.1038/nprot.2006.5. ISSN 1754-2189.

PIHLAINEN K a OJANPERÄ I. Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. *Forensic Sci. Int.* 1998;97:117-133.

PIPERAKIS SM. Comet Assay: A brief history. *Cell Biol. Toxicol.* 2009;25:1-3.

PROPOFOL 1% MCT/LCT Fresenius emu ifj 15x50 ml (liek.inj.sk.). ADC. Bratislava [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: https://www.adc.sk/databazy/produkty/spc/propofol-1-mct-lct-fresenius-980998.html#4_2.

RASTOGI RP, RICHA, KUMAR A, TYAGI MB. a SINHA RP. Molecular mechanisms of Ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. of Nucleic Acids.* 2010. ID592980. DOI: 10.4061/2010/592980.

REITZ M, ANTONINI-RUMPF E a LANZ E. DNA single strand breaks in peripheral human lymphocytes after anesthesia with isoflurane-nitrous oxide-oxygen. *Arzneimittelforschung* 1993;43:1258-1261.

Repair mechanisms. Biology LibreTexts library. The Pennsylvania State University, 2016 [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Working_with_Molecular_Genetics_\(Hardison\)/Unit_II%3A_Replication%2C_Maintenance_and_Alteration_of_the_Genetic_Material/7%3A_Mutation_and_Repair_of_DNA/7.4_Repair_mechanisms](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Map%3A_Working_with_Molecular_Genetics_(Hardison)/Unit_II%3A_Replication%2C_Maintenance_and_Alteration_of_the_Genetic_Material/7%3A_Mutation_and_Repair_of_DNA/7.4_Repair_mechanisms).

ROUZER CA. Mechanisms of DNA Repair. *VICB Communications* 2015;1. Dostupné online: http://www.vanderbilt.edu/vicb/discovery_archives/fresh_insight_mechanisms_DNA_repair.html.

ROZGAJ R, KASUBA V, BROZOVIE G a JAZBEC A. Genotoxic effects of anaesthetics in operating theatre personnel evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2009;212:11-17.

ROZGAJ R, KAŠUBA V a JAZBEC A. Preliminary study of cytogenetic damage in personnel exposed to anaesthetic gases. *Mutagenesis* 2001;16 (2):139–143.

SARDAS S, AYGUN N, GAMLI M, UNAL Y, UNAL N, BERK N a KARAKAYA AE. Use of alkaline Comet assay (single cell gel electrophoresis technique) to detect

DNA damages in lymphocytes of operating room personnel occupationally exposed to anaesthetic gases. *Mutat. Res.* 1998;418:93-100.

SARDAS S, IZDES S, OZCAGLI E, KANBAK O a KADIOGLU E. The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2006;80(2):154-159. DOI: 10.1007/s00420-006-0115-6. ISSN 0340-0131.

Sevoflurane Baxter vap inl 1x250 ml (fl. Al). ADC. Bratislava [cit. 2017-04-27]. Dostupné z: <https://www.adc.sk/databazy/produkty/detail/sevoflurane-baxter-828612.html>.

SHAPOSHNIKOV S, THOMSEN PD a COLLINS AR. Combining fluorescent in-situ hybridization with the comet assay for targeted examination of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 2011;682:115-132. DOI: 10.1007/978-1-60327-409-8_10.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR a SCHNEIDER ET. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;175(1):184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SPANSWICK VJ, HARTLEY JM a HARTLEY JA. Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Methods Mol. Biol.* 2010;613:267-282. DOI: 10.1007/978-1-60327-418-0_17.

SPEIT G a HARTMANN A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* 2005;291:85–95.

SUNITHA KUMARI, RAJESH PR, KANCHAN LS. SHAIENDRA PS a RAJESHWAR PS. DNA damage: Detection strategies. *EXCLI J.* 2008;7:44-62.

SZYFTER K, SZULC R, MIKSTACKI A, STACHECKI I, RYDZANICZ M a JALOSZYŃSKI P. Genotoxicity of inhalation anaesthetics: DNA lesions generated by sevoflurane in vitro and in vivo. *J. Appl. Genet.* 2004;45(3):369-374.

TAKAHASHI T, NAU MM, CHIBA I, BIRRER MJ, ROSENBERG RK, VINOCOUR M, LEVITT M, PASS H, GAZDAR AF a MINNA JD. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989;246:491-494.

THANAN R, OIKAWA S, HIRAKU Y, OHNISHI S, MA N, PINLAOR S, YONGVANIT P, KAWANISHI S a MURATA M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(1):193-217. DOI: 10.3390/ijms16010193. ISSN 1422-0067.

TICE RR, AGURELL E a ANDERSON D. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for In vitro and In vivo genotoxicity testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000;35:206-21.

TSUCHIYA H, UENO T, TANAKA T, MATSUURA N a MIZOGAMI M. Comparative study on determination of antioxidant and membrane activities of propofol and its related compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010;39:97-102.

VANDELOOCK K, DECORDIER I, CIARDELLI R, HAUMONT D a KIRSCH-VOLDERS M. An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis* 2010;25:25-32. DOI: 10.1093/mutage/geb039.

VASILEIOU I, XANTHOS T, KOUDOUNA E, et al. Propofol: a review of its non-anaesthetic effects. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;605:1-8.

VIDYA G, SUMA HY, BHATT BV, PARKASH CHAND a RAO KR. Hypoxia Induced DNA Damage in Children with Isolated Septal Defect and Septal Defect with Great Vessel Anomaly of Heart. *J. Clin. Diagn. Res.* 2014;8(4):1-3.

WIKLUND SJ a AGURELL E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis* 2003;18(2):167-75.

WONG CH, LIU TZ, CHYE SM, LU FJ, LIU YC, LIN ZC a CHEN CH. Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils. *Food Chem. Toxicol.* 2006;44:1399-1407.

YAMAKAGE M, YAMADA S, CHEN X, IWASAKI S, SOUJIGUICHI N a NAMIKI A. Carbon dioxide absorbents containing potassium hydroxide produce much larger concentration of compound A from sevoflurane in clinical practice. *Anesth. Analg.* 2000;91:22-224.