

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

DETEKCE FRAGMENTŮ DNA PŘI POŠKOZENÍ
BUNĚK
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Věra Brychtová
VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek

2018

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**DETECTION OF DNA FRAGMENTS
IN DAMAGED CELLS**

THESIS

AUTHOR: Bc. Věra Brychtová
SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra Brychtová**
Osobní číslo: **C16440**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Detekce fragmentů DNA při poškození buněk**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

A. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis apoptózy a metod pro detekci apoptózy. Jmenovitě se zaměřte na obecný popis fází apoptózy, jejích aktivačních cest a porovnání apoptózy vs. nekrózy. Dále detailně popište vybrané metody užívané pro detekci apoptózy (např. TUNEL, ISEL, detekce mitochondriálního membránového potenciálu). Ke zpracování tohoto literárního přehledu využijte elektronické databáze (ScienceDirect, NCBI Pubmed, Web of Science).

B. V rámci praktické části:

- 1) optimalizujte použití metody TUNEL;
- 2) optimalizujte přípravu biologického materiálu in vitro pro použití metody TUNEL na alespoň jedné buněčné linii;
- 3) zavedenou metodu využijte k detekci fragmentů DNA po indukci modelové apoptózy.

C. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Své výsledky následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto diplomovou práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 24. 4. 2018

Bc. Věra Brychtová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat zejména vedoucímu mé diplomové práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za vedení mé práce, odborný dohled, vstřícný přístup a konzultace, které mi při zpracování diplomové práce poskytl. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Janu Čapkovi za cenné rady, výpomoc a trpělivost při laboratorní práci. Poděkování patří i paní laborantce Ivaně Fousové a Mgr. Jiřímu Handlovi za přípravu a kultivaci buněk.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu, vstřícnost a zázemí po dobu studia.

SOUHRN

Tato práce se zaměřuje na detailní popis procesu apoptózy a poskytuje teoretický přehled metod pro detekci apoptózy. Největší pozornost je věnována metodě TUNEL. V dnešní době patří TUNEL metoda mezi nejvíce používané metody pro detekci apoptózy. Cílem naší práce bylo optimalizovat použití TUNEL metody na vybrané buněčné linii, aplikovat optimalizovanou metodu na buněčné linii ovlivněné dvěma toxiny a na závěr práce použít komerční metodu TUNEL na stejné buněčné linii a porovnat ji s optimalizovanou metodou pomocí fluorescenční mikroskopie.

V první části naší práce jsme optimalizovali jednotlivé kroky metodiky TUNEL na renální linii HK-2. Nejprve jsme se zaměřili na optimalizaci fixace buněk. Jako optimální jsme pro fixaci buněk vybrali použití 9,8% formaldehydu. Následně jsme prováděli permeabilizaci buněk Tritonem-X-100 a jako nejvhodnější jsme určili použití 0,5% Tritonu X-100. V dalším kroku jsme optimalizovali inkorporaci bromdeoxyuridinu (*BrdU*) na zlomy DNA terminální deoxynukleotidyltransferázou a zhodnotili jsme, že nepříhodnější je použití BrdU (0,01 μ M) a aplikace 4x ředěného enzymu. Dále jsme optimalizovali denaturaci DNA a blokování nespecifických míst, kdy jsme našli, že optimální je použití 2 M kyseliny chlorovodíkové a použití 1% hovězího sérového albuminu. V posledním kroku jsme optimalizovali navázání anti-BrdU protilátek na BrdU a jako nejvhodnější jsme vybrali ředění protilátek 1:2000. Při aplikaci optimalizované metody na HK-2 buňkách byl z fluorescenčních snímků patrný pozitivní signál fluorescence při ovlivnění buněk cisplatinou (25 μ M, 50 μ M) po době inkubace 16 a 20 hodin a kamptotecinem (2 μ M, 10 μ M) po době 24 a 48 hodin. Po použití komerční metody TUNEL na HK-2 buňkách ovlivněných cisplatinou (50 μ M; 48 hodin) jsme z fluorescenčních snímků zhodnotili, že komerční metoda je senzitivnější než námi optimalizovaná metoda.

Klíčová slova: Apoptóza, fragmentace DNA, bromdeoxyuridin, terminální deoxynukleotidyltranseferáza, fluorescence.

SUMMARY

This thesis is focused on a detailed description of the apoptosis process and provides an overview of methods for detection of apoptosis. The greatest attention has been paid to the TUNEL assay. Presently, TUNEL assay has been one of the most commonly used methods for detection of apoptosis. The aim of our thesis was to optimize the use of the TUNEL assay in a selected cell line, to apply the optimized method in the cell line treated with two toxins. Finally, we aimed to use the commercial TUNEL assay in the same cell line and to compare it with the optimized method.

In our thesis, we optimized the individual steps of the TUNEL assay procedure in renal line HK-2. Firstly, we focused on optimizing cell fixation. As optimal, we chose 9.8% formaldehyde for cell fixation. Subsequently, we performed cell permeabilization by Triton X-100 and we chose the use of 0.5% Triton X-100 as optimal. In the next step, we optimized the incorporation of bromdeoxyuridine (*BrdU*) to DNA strand breaks using the terminal deoxynucleotidyl transferase. The most suitable application of BrdU was 0.01 μM and the application of TdT diluted four times. We also optimized DNA denaturation and blocking of nonspecific interaction. We found the use of 2 M hydrochloric acid and 1% bovine serum albumin as optimal. Finally, we optimized the binding of anti-BrdU antibodies and we chose the 1: 2000 dilutions as the most suitable. When using the optimized method in HK-2 cells, the fluorescence positive signal was visible for cells treated with cisplatin (25 μM , 50 μM) for 16 and 20 hours and cells treated with camptothecin (2 μM , 10 μM) for 24 and 48 hours. Finally, after use of commercial TUNEL assay in HK-2 cells treated with cisplatin (50 μM ; 48 hours), we found that the commercial method is much more sensitive than the optimized method.

Key-words: Apoptosis, DNA fragmentation, bromdeoxyuridine, terminal deoxynucleotidyl transferase, fluorescence.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIF	Apoptózu indukující faktor; <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
AFC	7-amino-4-trifluormethylkumarin; <i>7-amino-4-trifluormethylcoumarine</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
CAD	Kaspázou aktivovaná DNáza; <i>Caspase-Activated DNase</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol; <i>4,6-dimidino-2-phenylindole</i>
DISC	Signální komplex indukující smrt; <i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DR4,5	Receptor smrti; <i>Death Receptor 4,5</i>
dUTP	Deoxyuridintrifosfát; <i>deoxyuridinetriphosphate</i>
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FLIP	<i>FLICE Inhibitory Proteins</i>
FSC	Rozptyl v přímém směru; <i>Forward Scatter</i>
IAP	Inhibitor apoptotických proteinů; <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
ICAD	Inhibitor kaspázou aktivované DNázy; <i>Inhibitor of Caspase-Activated DNase</i>
ISEL	<i>In Situ End Labeling</i>
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimid-azolykARBOKYANIN jodid
MOM	Mitochondriální vnější membrána; <i>Mitochondrial Outer Membrane</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
PCD	Programovaná buněčná smrt; <i>Programmed Cell Death</i>
PI	Propidium jodid; <i>Propidium Iodide</i>
pNA	p-nitroanilid; <i>p-nitroanilide</i>
PS	Fosfatidylserin; <i>Phosphatidylserine</i>
SMAC	<i>Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases</i>
SSC	Rozptyl v kolmém směru; <i>Side Scatter</i>
TNF	Tumor nekrotizující faktor; <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TdT	Terminální deoxynukleotidyl transferáza; <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TMRE	Tetramethylrhodamin ethylester

TMRM	Tetramethylrhodamin methylester
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
TUNEL	<i><u>T</u>erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d<u>U</u>TP <u>N</u>ick-<u>E</u>nd <u>L</u>abeling</i>
VDAC2	Napětově závislý aniontový kanál 2; <i>Voltage-Dependent Anion Channel 2</i>
$\Delta\psi_m$	Mitochondriální membránový potenciál; <i>Mitochondrial Membrane Potential</i>

OBSAH

1. ÚVOD	- 14 -
2. TEORETICKÁ ČÁST	- 15 -
2.1 Buňka	- 15 -
2.2 Apoptóza	- 16 -
2.2.1 Morfologické a biochemické znaky apoptózy	- 17 -
2.2.2 Vnější cesta	- 19 -
2.2.3 Vnitřní cesta	- 21 -
2.2.4 Společná cesta	- 23 -
2.3 Apoptóza vs. nekróza	- 26 -
2.4 Zlomy na DNA	- 28 -
2.5 Detekční metody apoptózy	- 29 -
2.5.1 Metody detekující morfologické znaky apoptózy	- 30 -
2.5.1.1 Světelná a elektronová mikroskopie	- 30 -
2.5.1.2 Průtoková cytometrie	- 31 -
2.5.2 Metody detekující biochemické znaky apoptózy	- 32 -
2.5.2.1 Gelová elektroforéza	- 32 -
2.5.2.2 TUNEL metoda	- 34 -
2.5.2.3 ISEL metoda	- 37 -
2.5.2.4 Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu	- 38 -
2.5.2.5 Stanovení aktivity kaspáz	- 39 -
2.5.2.6 Stanovení markeru asymetrie fosfolipidové membrány	- 40 -
3. CÍLE PRÁCE	- 42 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 43 -

4.1	Seznam chemikálií	- 43 -
4.2	Přístroje a laboratorní pomůcky	- 44 -
4.3	Biologický materiál.....	- 45 -
4.4	Příprava roztoků	- 45 -
4.4.1	Roztoky využívané během použitých stanovení	- 45 -
4.4.2	Příprava biologického materiálu.....	- 47 -
4.4.2.1	Kultivace HK-2 buněk	- 47 -
4.5	TUNEL metoda.....	- 48 -
4.5.1	Princip TUNEL metody.....	- 48 -
4.5.2	Postup TUNEL metody	- 48 -
4.5.2.1	Optimalizace fixace buněk	- 48 -
4.5.2.2	Optimalizace permeabilizace buněk	- 48 -
4.5.2.3	Optimalizace značení zlomů DNA.....	- 49 -
4.5.2.4	Optimalizace denaturace DNA.....	- 49 -
4.5.2.5	Optimalizace blokování nespecifických vazebných míst.....	- 49 -
4.5.2.6	Optimalizace vazby anti-BrdU protilátek	- 49 -
4.5.3	Použití optimalizované TUNEL metody.....	- 50 -
5.	VÝSLEDKY	- 51 -
5.1	Optimalizace postupu TUNEL metody.....	- 51 -
5.1.1	Optimalizace fixace buněk	- 51 -
5.1.2	Optimalizace permeabilizace buněk	- 52 -
5.1.3	Optimalizace postupu značení zlomů DNA.....	- 52 -
5.1.4	Optimalizace blokování nespecifických vazebných míst.....	- 55 -
5.1.5	Optimalizace vazby anti-BrdU protilátek	- 55 -
5.1.6	Optimalizace postupu TUNEL metody.....	- 57 -

5.2	Aplikace TUNEL metody	- 58 -
5.2.1	Aplikace TUNEL metody – toxicita cisplatiny	- 58 -
5.2.2	Aplikace TUNEL metody – toxicita kamptotecinu.....	- 60 -
5.3	Použití komerční metody TUNEL	- 62 -
6.	DISKUZE	- 64 -
7.	ZÁVĚR	- 69 -
8.	SEZNAM LITERATURY	- 70 -

1. ÚVOD

Nezbytnou součástí tkáňové homeostázy organismu je rovnovážný vznik a zánik buněk. Buněčný zánik probíhá buď programovanou, nebo neprogramovanou smrtí. Vysoce regulovanou a energeticky dependentní smrtí buněk je apoptóza. Apoptóza hraje důležitou roli při vývoji organismu a je nepostradatelná při pravidelném obratu vzniku a zániku buněk. Prostřednictvím apoptózy jsou eliminovány abnormální buňky, které jsou patologicky pozměněny, nebo nepotřebné buňky, které ztratily svoji funkčnost. Nepřiměřená apoptóza může vést k narušení homeostatické rovnováhy a stává se rizikovým činitelem spousty patologických stavů, především nádorových onemocnění, neurodegenerativních chorob, autoimunitních onemocnění, ischemického poškození a dalších.

Pro detekci apoptózy existuje mnoho metod fungujících na odlišném principu a zaměřujících se na stanovení různých morfologických a biochemických znaků specifických pro apoptózu. V současnosti je nejhojněji využívanou metodou pro stanovení apoptózy TUNEL metoda. Metoda TUNEL detekuje zlomy na DNA vytvořené v pozdní fázi apoptózy. Technika TUNEL je velmi účinná, spolehlivá, vysoce citlivá a dobře aplikovatelná na spoustu typů buněk a tkáňových řezů. V dnešní době se tato metoda používá *in situ* a *in vitro*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buňka

Základní stavební a funkční jednotkou každého živého organismu je buňka. Výjimkou jsou však nebuněčné organismy, jako jsou viry. Buňka je nejmenší útvar, který je způsobilý samostatné existence a reprodukce. Je to otevřený systém schopný vyměňovat mnoho látek, informací a energie. Transport látek z buňky do vnějšího okolí a naopak, zajišťuje cytoplazmatická membrána, jež je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou. Mezi fosfolipidy jsou vmezeřeny bílkoviny, které mají různou povahu a které slouží, např. jako přenašeče látek nebo jako buněčné receptory. Na vnější straně membrány jsou ukotveny sacharidy tvořící glykokalyx. Cytoplazmatická membrána má charakter fluidní mozaiky díky difuzi lipidů a proteinů v membráně (Alberts et al., 2014).

Vnitřní prostor buňky vyplňuje cytoplazma, která obsahuje polotekutý vodný roztok zvaný cytosol, jež je z velké části tvořen vodou a je složený ze spousty látek, zvláště bílkovin. Kromě bílkovin a iontů jsou v cytosolu obsaženy i buněčné organely. Organely se liší svým počtem v různých buňkách a každá organela má svoji jedinečnou funkci. Mezi buněčné organely živočišné buňky patří jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, ribozomy, cytoskelet, lyzozomy a centrozom. Metabolické děje probíhající v buňce jsou lokalizovány také v cytosolu. Mezi nejvýznamnější organelu eukaryotické buňky patří jádro, kde je uložena většina genetické informace ve formě DNA. Na molekulu DNA jsou navázané histony a dohromady tvoří chromatin. Když se buňka chystá na dělení, tak se její chromatin spiralizuje a vytváří tzv. chromozom. Chromozom je složen ze dvou sesterských chromatid a obsahuje dvě totožné molekuly DNA. Jaderná DNA je chráněna obalem tvořeným dvěma fosfolipidovými membránami. V jaderném obalu se nachází mnoho pórů regulujících transport některých látek přes membrány, např. RNA. Často se také uvnitř jádra vyskytuje jadérko, ve kterém vzniká ribosomální RNA, jež se po transportu do cytoplazmy stává součástí ribozomů (Alberts et al., 2014).

Každá buňka prochází od jejího vzniku po rozdělení několika fázemi. Toto období se nazývá buněčný cyklus a skládá se ze dvou hlavních fází, a to z interfáze a buněčného dělení. Interfáze je doba mezi dvěma buněčnými děleními, kdy se buňka připravuje na následující rozdělení různými mechanismy. Nejprve dochází ke karyokinezi a poté ihned navazuje cytokineze. Jádro může být rozděleno dvěma způsoby buď mitózou u somatických buněk, nebo meiózou u pohlavních buněk (Alberts et al., 2014).

2.2 Apoptóza

Buněčná smrt je souhrn pochodů v buňce vedoucích k jejímu zániku. Buňka umírá dvěma hlavními cestami, a to programovanou buněčnou smrtí (*PCD*; *Programmed Cell Death*) a neprogramovanou smrtí – nekrózou. Programovaná buněčná smrt se často používá jako synonymum termínu apoptóza, avšak apoptotická smrt je jeden z typů PCD. Druhým typem programované buněčné smrti je buněčný zánik autofagie. Hranice mezi těmito mechanismy buněčné smrti není zcela jasná a zároveň se tyto dva děje mohou prolínat. Hlavním rozdílem však je, že proces autofagie vždy nemusí vést ke smrti buňky, zatímco apoptóza vede k buněčné smrti pokaždé (Einseberg-Lerner et al., 2009).

Celý proces apoptotické smrti popsal J. F. R. Kerr v roce 1972. Poprvé použil termín apoptóza z řeckého slova *apoptosis*, které znamená opadávání listů (Kerr et al., 1972). Apoptóza je fyziologický geneticky řízený děj závislý na energii. Tento zánik buněk postihuje jednotlivé buňky v organismu a je nezbytnou součástí tkáňové homeostázy. Základem tkáňové homeostázy mnohobuněčného organismu je rovnováha mezi vznikem a zánikem buněk. Správné rozvíjení a činnost imunitního systému a embryonální vývoj jsou také závislé na apoptóze. Apoptózou jsou také eliminovány buňky na základě impulsu některých hormonů, které vedou k fyziologické atrofii, např. atrofii mléčné žlázy po laktaci. V dospělém lidském organismu zanikne asi 1×10^9 buněk každý den (Renehan et al., 2001).

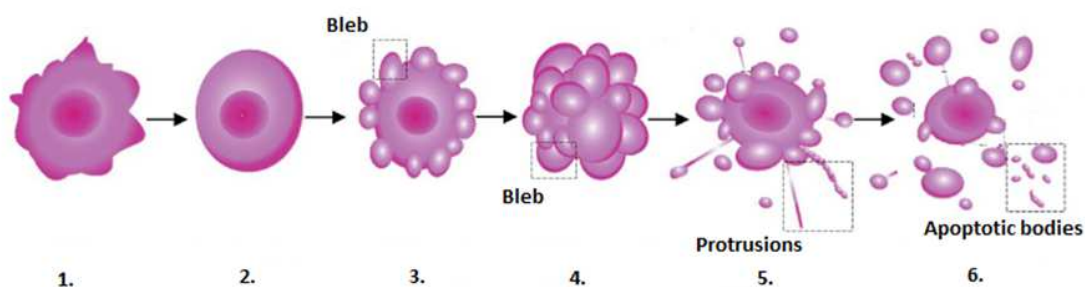
Apoptóza hraje důležitou roli při tvorbě celkového tvaru a uspořádání různých orgánů během vývoje organismu. Nejznámějším příkladem úlohy apoptózy v embryonálním vývoji je proces tvorby prstů. Buňky mezi nově vznikajícími prsty

jsou odstraňovány prostřednictvím apoptózy. U dospělého organismu zastává apoptóza nezbytnou roli ve tkáních, ve kterých dochází k pravidelnému obratu buněk, např. ve střevní sliznici nebo kůži (Abud, 2004; Jakobson et al., 1997). Nepřiměřená apoptóza vede k narušení tkáňové homeostázy organismu. Stává se rizikovým faktorem mnoha patologických stavů, především tvorby nádorů při nekontrolovatelné proliferaci buněk, degenerativního onemocnění, patologické atrofii a ischemického poškození. V důsledku nedostatečné apoptózy autoreaktivních buněk při dozrávání imunitního systému často dochází k propuknutí autoimunitního onemocnění (Renehan et al., 2001). Ozařování a chemoterapie při léčbě nádorů nebo někdy jen stárnutí organismu vede k poškození DNA některých buněk, proto často tyto buňky podléhají apoptóze. Modulace apoptotického procesu přináší velký terapeutický potenciál (Elmore, 2007).

2.2.1 Morfologické a biochemické znaky apoptózy

Apoptóza je charakterizovaná řadou změn v buněčné architektuře, které přispívají nejen k buněčné smrti, ale také připravují buňky na jejich eliminaci fagocyty. Prvním viditelným morfologickým znakem apoptózy je odtržení buňky od lamely vedlejších buněk a od bazální membrány. Odtržení této buňky vede k jejímu zakulacení a smrštění. Krátce po zakulacení a smrštění plazmatická membrána podléhá *blebbingu*, což je tvorba kulovitých puchýřků v důsledku oddělení plazmatické membrány od cytoskeletu (Sebbagh et al., 2001). Jsou rozlišeny dva typy puchýřků, a to povrchové a dynamické. Povrchové puchýřky se vytváří na obvodu buněk v časném stádiu apoptózy, zatímco puchýřky dynamické se objevují v pozdějším stádiu, jsou rozsáhlejší a výrazně mění tvar buňky. Za určitých podmínek a u jistých buněk se může plazmatická membrána po vytvoření puchýřků prodloužit do tenkých membránových výčnělků (obr. 1). Ve finální fázi apoptózy se buňka fragmentuje na subcelulární kompaktní vezikuly označované apoptotická tělíčka (Tixeira et al., 2017). Apoptotická tělíčka obsahují neporušené orgány původní apoptotické buňky a jejich cytoplazmatická membrána je zcela intaktní. Tyto vezikuly jsou ihned fagocytovány makrofágy, dendritickými buňkami nebo dalšími buňkami, jako jsou endotelialní a epitelialní buňky. Při eliminaci apoptotických buněk

fagocyty nedochází k zánětlivé reakci. Z buněk a vezikul nejsou uvolňovány žádné potenciálně toxické buněčné složky do okolí díky rychlé fagocytóze a celistvosti membrány. Zároveň fagocyty neprodukují cytokiny, které by mohly zánětlivou reakci vyvolat (Hart et al., 2008; Kurosaka et al., 2003).



Obr. 1: Charakteristické změny buňky při apoptóze; 1. Buňka připravující se na apoptózu, 2. Zakulacení buňky, 3. Tvorba povrchových puchýřků, 4. Tvorba dynamických puchýřků, 5. Tvorba membránových výčnělků, 6. Fragmentace buňky na apoptotická tělíška (Upraveno dle Tixeira et al., 2017).

Dalšími typickými znaky apoptózy jsou kondenzace a rozpad jaderného chromatinu a fragmentace DNA. Tyto apoptotické změny jádra jsou převážně způsobeny specifickými proteázami v buňce – kaspázami. Kaspázy jsou ve zdravých buňkách přítomny jako zymogeny s velmi nízkou nebo žádnou proteázovou aktivitou. Při apoptóze dochází různými způsoby ke kaskádové aktivaci těchto enzymů, které navozují charakteristické změny v buňce a v jejím jádře (Nicholson, 1999). V současné době je známo 14 druhů savčích kaspáz a na základě podobnosti v jejich aminokyselinové sekvenci jsou rozděleny do tří skupin (tab. 1). Iničiační kaspázy indukují signál k apoptóze a aktivují efektorové kaspázy. Efektorové kaspázy štěpí příslušné substráty a tím dochází ke změnám vedoucím ke smrti buňky. Třetí skupinou jsou prozánětlivé kaspázy, které hrají důležitou roli při zánětlivé reakci v organismu (Fan et al., 2005).

Aby buňka mohla zahájit proces vlastní eliminace, musí obdržet příslušné signály. Tyto signály mohou vycházet z extracelulárního nebo intracelulárního prostředí. Podle vycházejících signálů se rozlišují dvě hlavní cesty apoptózy. Jednou z nich je vnější (receptorová) dráha a druhou cestou je vnitřní (mitochondriální) dráha. Obě dráhy jsou do určité míry propojené a mohou se vzájemně ovlivňovat

(Elmore et al., 2007). Mechanismus apoptózy je tvořen dvěma fázemi, a to iniciační a exekuční fází. V iniciační fázi buňka získává indukční signál ke smrti a v exekuční fázi buňka prodělává typické morfologické a biochemické změny (Ficková, Nagy, 2007).

Tab. 1: Přehled savčích kaspáz (Upraveno dle Ola et al., 2011).

Druh	Typ	Původ
Iniciační	Kaspáza 2	Člověk
	Kaspáza 8	Člověk
	Kaspáza 9	Člověk
	Kaspáza 10	Člověk
Efektorové	Kaspáza 3	Člověk
	Kaspáza 6	Člověk
	Kaspáza 7	Člověk
Prozánětlivé	Kaspáza 1	Člověk
	Kaspáza 4	Člověk
	Kaspáza 5	Člověk
	Kaspáza 11	Myš
	Kaspáza 12	Myš
	Kaspáza 13	Člověk
	Kaspáza 14	Člověk

2.2.2 Vnější cesta

Vnější aktivační dráha apoptózy je indukovaná u poškozených buněk, jako jsou nádorové buňky a mikroorganismy infikované buňky. Tato cesta je aktivována vazbou ligandů smrti některých imunitních buněk na receptory smrti cílové buňky. Mezi ligandy smrti patří, např. CD95L, tumor nekrotizující faktor (*TNF*), *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)* a mezi receptory smrti patří, např. CD95, receptor pro TNF a receptory smrti 4,5 (*DR4,5; Death Receptor*

4,5). Ligandy apoptotické smrti jsou trimerní, a proto po navázání na receptory dochází také k trimerizaci receptorů, což je důležité pro přenos signálu (Locksley et al., 2001). Některé receptory smrti obsahují doménu smrti v cytoplazmě a ostatním receptorům tato doména chybí. Po trimerizaci receptorů interaguje jejich doména s doménou smrti adaptorové molekuly nejčastěji s proteinem *Fas-Associated Death Domain (FADD)*. Protein FADD může tvořit vazbu nejen s receptory Fas, ale i s některými jinými receptory, jako je např. DR4,5. Také protein FADD obsahuje další doménu, kterou se váže na prokaspázu 8, popř. prokaspázu 10 a takto vzniká intracelulární signální komplex indukující smrt (*DISC; Death-Inducing Signaling Complex*). V rámci tohoto komplexu dochází k autokatalytické aktivaci prokaspázy 8 či 10 (Touneur, Chiochia, 2010). Iničiační kaspáza 8, 10 dále aktivuje efektorové kaspázy 3, 6, 7. Aktivované efektorové kaspázy proteolyticky štěpí své substráty, a to přispívá k postupnému zániku buňky. Kaspáza 8, 10 štěpí protein Bid na kratší protein tBid (*truncated Bid*), jež se účastní dalšího apoptotického procesu (Ficková, Nagy, 2007). Takto dochází ke střetnutí vnější dráhy s vnitřní dráhou. Vnější cesta apoptózy může být blokována některými inhibitory. *FLICE Inhibitory Proteins (FLIP)* jsou buněčné nebo virové proteiny, které se váží na FADD namísto prokaspázy 8, 10, a tím brání její aktivaci. Přímo působící inhibitory jsou inhibitory apoptotických proteinů (*IAP; Inhibitor of Apoptosis Proteins*). Tyto proteiny se vážou rovnou na aktivní kaspázy a blokují jejich funkci (Krueger et al., 2001).

Další variantou vnější signalizační cesty je granzym-perforinová dráha. Cytotoxické lymfocyty a NK buňky (*Natural Killers*) uplatňují tuto dráhu na nádorové buňky či viry infikované buňky. Granzymy a perforin jsou hlavní součástí granul cytotoxických lymfocytů a NK buněk. Produkci bílkoviny perforinu se za přítomnosti Ca^{2+} v plazmatické membráně vytváří malé póry, které umožňují vstup granzymům do intracelulárního prostředí buňky. Granzymy jsou serinové proteázy indukující apoptotický proces (Igney, Krammer, 2002). Granzym B aktivuje některé efektorové kaspázy podílející se na zániku poškozené buňky. Kromě toho štěpí i protein Bid na tBid, jenž se transportuje do mitochondrie, a takto dochází opět k propojení vnější a vnitřní signalizační cesty apoptózy (Heibein et al., 2000). Granzym A zahajuje

buněčnou smrt nezávislou na kaspázách a takto dochází k jednovláknovému poškození DNA (Martinvalet et al., 2005).

2.2.3 Vnitřní cesta

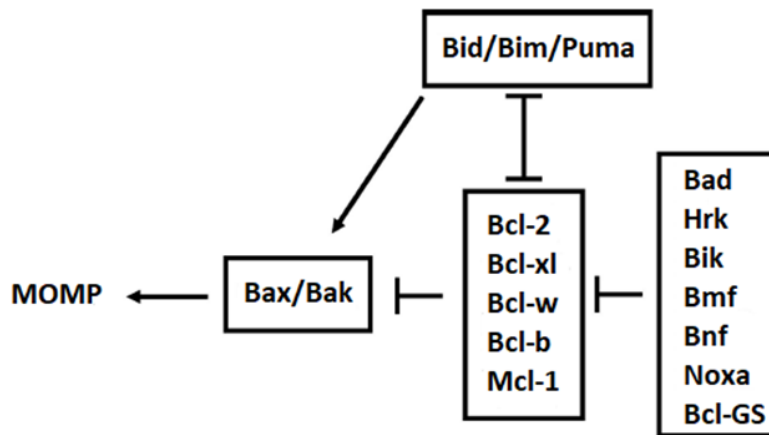
Vnitřní signalizační cesta je indukována na základě stimulů pocházejících z intracelulárního prostředí. Nejčastějšími stimuly z vnitřního prostředí jsou, např. nedostatek živin pro buňku, hypoxie, genetická porucha, poškození DNA vlivem působení ionizujícího záření, cytostatik, volných radikálů, extrémně vysoké hladiny Ca^{2+} v cytosolu a další. Vnitřní signalizační dráha je souhrn několika procesů spjatých s mitochondriemi (Wong, 2011).

Klíčovými regulátory této cesty jsou proteiny *B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)*. Tyto proteiny ovlivňují permeabilitu vnější mitochondriální membrány a jejich rodina tvoří přes 20 členů proteinů. Podle struktury a funkce proteiny dělíme do tří skupin. První skupinou jsou antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-b, Mcl-1, Bcl-2A1), druhou skupinou jsou proapoptotické proteiny (Bax, Bak, Bok) a třetí skupinu tvoří také proapoptotické BH3 proteiny (Bik, Hrk, Bim, Bad, Bid, Puma, Noxa, Bmf, Bnf, Bcl-GS). Hlavním členem rodiny je protein a onkogen Bcl-2. Poprvé byl identifikován v buňkách maligního lymfomu. Protein indukoval tvorbu nádoru tím, že inhiboval apoptózu. Později byly objeveny i další proteiny této rodiny, které mají opačný efekt tedy inhibující, a proteiny se stejným stimulačním účinkem (Birkinshaw, Czabotar, 2017).

Vzájemný poměr proapoptotických a antiapoptotických proteinů určuje, zda bude apoptóza probíhat či nikoliv (Ondroušková, Vojtěšek, 2014). Pokud dojde k narušení rovnováhy mezi těmito dvěma skupinami proteinů, nastává neregulovaná apoptóza v buňce. Specifickým znakem těchto bílkovin je přítomnost homologních domén. Každá skupina obsahuje charakteristický počet domén a některé z nich obsahují i transmembránové domény, které jsou zakotvené v membránách některých buněčných organel, hlavně v mitochondriích. Ostatní členové rodiny se vyskytují v cytosolu (Taylor et al., 2008).

Proteiny BH3 mají funkci jak aktivační, tak inhibiční. Proteiny Bim, Puma a tBid se po přijetí apoptotického signálu vážou s proteiny Bax a Bak a přímo je

aktivují. Naopak antiapoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-x a Mcl-1 mohou blokovat tyto aktivátory tím, že s nimi vytváří komplex a nepřímo brání funkci Bax a Bak. Antiapoptotické proteiny jsou inhibovány zbývajícími členy BH3 skupiny. Například Noxa výhradně inaktivuje Mcl-1, čímž nepřímo aktivuje apoptózu (Kim et al., 2006). K zábraně apoptózy mohou antiapoptické proteiny také využít alternativní cestu, kdy přímou vazbou na Bax a Bak znemožňují jejich aktivaci. Všechny interakce těchto bílkovin jsou přísně regulované (obr. 2) (Birkinshaw, Czabotar, 2017).



Obr. 2: Interakce mezi Bcl-2 proteiny v buňce; MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization), antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-b, Mcl-1), proapoptotické proteiny (Bax, Bak), proapoptotické BH3 proteiny (Bid, Bim, Puma, Bad, Hrk, Bik, Bmf, Bnf, Noxa, Bcl-GS) (Upraveno dle Reed, 2008).

Proapoptotické proteiny se podílí na tvorbě pórů na vnější mitochondriální membráně (MOM; Mitochondrial Outer Membrane). Po přímé nebo nepřímé aktivaci proapoptotických proteinů mohou Bak a Bax na MOM oligomerizovat. Každý protein působí rozdílně díky své odlišné lokalizaci. Neaktivovaný Bak je zakotven na MOM a tvoří komplex s napětově závislým aniontovým kanálem 2 (VDAC2; Voltage-Dependent Anion Channel 2) na membráně. Aktivní je až po navázání BH3 proteinu a uvolněním z komplexu. Po aktivaci Bak interaguje s jinými proapoptotickými proteiny za tvorby homodimerů a následnou oligomerizací se vytvoří pór v MOM. (Lazarou et al., 2010; Willis et al., 2005). Protein Bax se vyskytuje v cytosolu buňky. Po přijetí apoptotického signálu Bax změní svoji konformaci a naváže se na MOM. Na vnější membráně mitochondrie dochází k vytvoření komplexu Bax s BH3 proteinem (tBid, Bim), který se také transportoval z cytosolu

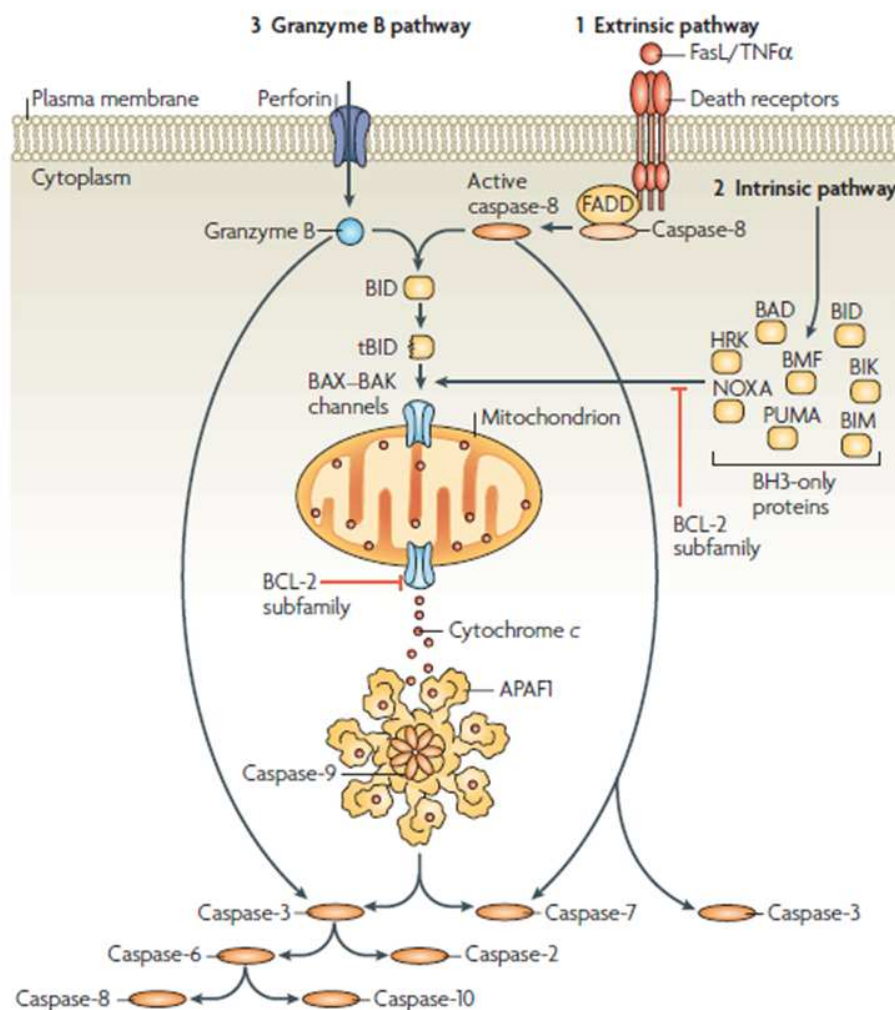
buňky. Interakcí s další molekulou Bax nebo Bak a následující oligomerizací dochází opět k vytvoření póru na membráně (Vela et al., 2013). Póry vytvořené v MOM mohou mít buď bílkovinný, nebo lipidový charakter. Bílkovinné póry jsou složeny pouze z bílkovin a lipidové póry jsou tvořené z lipidů i proteinů. Protein Bax pravděpodobně vytváří v MOM lipidový pór (Westphal et al., 2011). Při permeabilizaci mitochondriální membrány ztrácí mitochondrie svůj transmembránový potenciál. Ztráta mitochondriálního membránového potenciálu je typickým znakem apoptózy a jeho snížení může být jak příčinou, tak i následkem apoptózy (Sinha et al., 2013).

Přes pórovitou MOM dochází k uvolnění některých apoptotických mediátorů do cytosolu. Nejdříve se uvolňují cytochrom c, *Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases (SMAC)* a serinová proteáza HtrA2/Omi. V pozdní fázi se vylévají mediátory apoptózy indukující faktor (*AIF; Apoptosis-Inducing Factor*) a endonukleáza G. SMAC a HtrA2/Omi podporují apoptózu nepřímo inhibicí IAP (Ola et al., 2011). Nejvýznamnějším mediátorem apoptózy je cytochrom c. V mitochondriích je cytochrom c navázaný na kardiolipin. Podílí se na oxidativní fosforylaci, kde působí jako přenašeč elektronů, a naopak v cytosolu má proapoptotické účinky. Cytosolický cytochrom c se váže na molekulu *Apoptotic Protease-Activating Factor 1 (APAF1)* a mění její uzavřenou konformaci. V důsledku konformační změny APAF1 interaguje s prokaspázou 9 a za přítomnosti ATP vzniká komplex složený ze tří složek zvaný apoptozóm. V rámci tohoto proteinového komplexu dochází k autoproteolytické aktivaci prokaspázy 9. Aktivací prokaspázy 9 se spouští apoptotická kaskáda vnitřní signální dráhy. Výsledkem je aktivace efektorových kaspáz 3, 6, 7, které degradují proteinové součásti buňky (Shakeri et al., 2017; Taylor et al., 2008).

2.2.4 Společná cesta

Aktivace efektorových kaspáz probíhá buď vnější, nebo vnitřní signalizační dráhou (obr. 3). Substráty, které jsou štěpeny efektorovými kaspázami, jsou z velké části hlavní složky cytoskeletu. Mezi významné degradované proteiny cytoskeletu jsou, např. aktin, myosin, spektriny, gelsolin, tubulin a tau protein. Kaspázami jsou

také štěpeny proteiny mezibuněčných spojů β -cateniny, γ -cateniny a adhezni proteiny p130 a tensin. Proteolýza těchto a dalších proteinů vede k odtržení buňky z bazální membrány a okolních buněk a k poškození až zániku cytoskeletu. Porušení cytoskeletu se projevuje tvorbou vychlípenin plazmatické membrány (Taylor et al., 2008).



Obr. 3: Aktivační dráhy apoptózy; FADD (Fas-Associated Death Domain), APAF1 (Apoptotic Protease-Activating Factor 1), proapoptotické proteiny (Bax, Bak, Bid, Bad, Hrk, Bmf, Bik, Noxa, Puma, Bim), antiapoptotické proteiny (Bcl-2) (Převzato z Taylor et al., 2008).

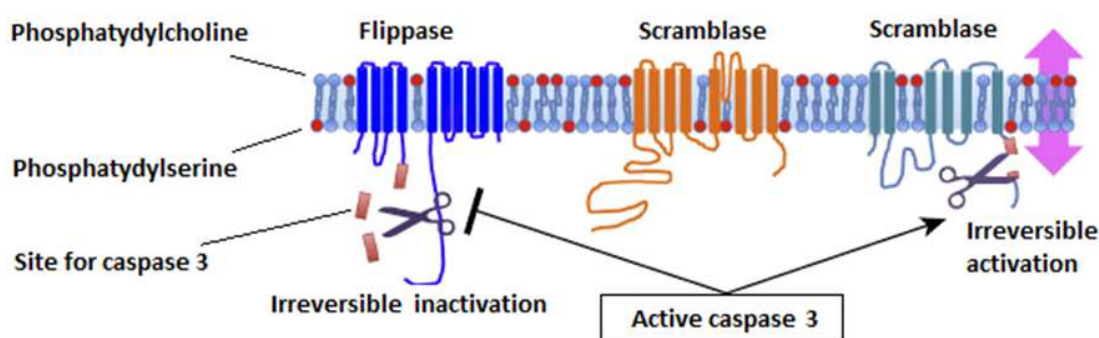
Dalšími důležitými substráty kaspáz jsou proteiny tvořící jádro buňky. Jaderné laminy přítomné v membráně jádra a další intranukleární proteiny jsou štěpeny kaspázou 6. Následkem degradace laminů a aktinových vláken cytoskeletu je fragmentace jádra a kondenzace chromatinu (Rauchaud et al., 2002). Některé

kaspázy, výhradně kaspáza 3 inaktivuje enzym podílející se na opravě DNA – poly ADP-ribóza polymerázu a enzym buněčné replikace –topoizomerázu. Inaktivace těchto enzymů vede k poškození a zábraně replikace DNA (Robertson et al, 2000).

Fragmentace DNA může být jak závislá, tak i nezávislá na kaspázách. V prvním případě kaspáza 3, 7 aktivuje specifickou nukleázu – kaspázou aktivovanou DNázu (*CAD; Caspase-Activated DNase*) lokalizovanou v jádře. Kaspázou aktivovaná DNáza je Mg^{2+} dependentní endonukleáza tvořící komplex s jejím inhibítorem. Inhibitor kaspázou aktivované DNázy (*ICAD; Inhibitor of Caspase-Activated DNase*) není pouze inhibitor aktivity CAD, ale zastává také funkci chaperonu pro správné skládání endonukleázy (Fan et al., 2005). Kaspáza 3, 7 rozštěpí komplex ICAD-CAD a uvolněním CAD z komplexu se tato endonukleáza aktivuje. Fragmentace DNA probíhá nejméně ve dvou fázích. V první fázi je DNA rozštěpena na fragmenty o vysoké molekulární hmotnosti (50–300 kb). V druhé fázi se štěpí tyto fragmenty na nukleosomální jednotky s nízkou molekulární hmotností (180–200 bp). Kaspázou aktivovaná DNáza vytváří na DNA dvouvláknové zlomy s odhalenými OH skupinami na 3' konci. Fragmentace DNA nezávislá na kaspázách je zprostředkována endonukleázou G a AIF. Tyto dva proteiny jsou uvolněny z mitochondrie a jsou transportovány do jádra, kde se podílí na degradaci DNA. Protein AIF dokáže štěpit DNA na fragmenty o velikosti v Mb (Huang et al., 2005; Kitazumi, Tsukahara, 2011).

Poslední fází apoptózy je vystavení signálních molekul pro fagocytózu. Mezi významné signální molekuly pro eliminaci buněk patří fosfatidylserin (*PS; Phosphatidylserine*), kalretikulín a další. Dobře známým rozpoznávacím ligandem pro fagocyty je fosfatidylserin (Elmore, 2007). Fosfatidylserin je u zdravých buněk lokalizován na vnitřní straně membrány, zatímco fosfatidylcholin a sfingomyelin jsou umístěny na vnější straně membrány. Na asymetrickém uspořádání fosfolipidů se z velké části podílí transmembránové enzymy. Enzym flipáza aktivně transportuje PS z vnější strany plazmatické membrány na vnitřní stranu. Opačnou funkci mají fosfolipidové skramblázy, které přispívají k přeskupování fosfolipidů obráceným způsobem než flipáza, transportují tedy PS na vnější stranu plazmatické membrány. Ve viabilních buňkách jsou fosfolipidové skramblázy neaktivní, proto se PS vyskytuje

na vnitřní straně membrány. Některé skramblázy jsou aktivovány zvýšenou hladinou Ca^{2+} . U apoptotických buněk kaspáza 3 inaktivuje enzym flipázu a zároveň aktivuje fosfolipidové skramblázy (obr. 4). Těmito dvěma kroky nastává nevratná externalizace fosfatidylserinu, jenž je nezbytná pro rozpoznávání apoptotické buňky fagocyty (Segawa, Nagata, 2015).



Obr. 4: Narušení asymetrického uspořádání fosfolipidů v plazmatické membráně apoptotické buňky; Oranžově zbarvená molekula je aktivována při vysoké hladině Ca^{2+} a není aktivována kaspázou 3 (Upraveno dle Segawa, Nagata, 2015).

2.3 Apoptóza vs. nekróza

Zda buňka podstoupí proces nekrózy nebo apoptózy závisí na povaze buněčného signálu smrti, typu tkáně, fyziologickém prostředí a vývojovém stádiu buněk. Nekróza je na rozdíl od apoptózy patologický neregulovaný proces bez spotřeby ATP. U probíhající nekrózy je buňka pasivní obětí smrti a u probíhající apoptózy se buňka na své eliminaci aktivně podílí (Zeiss, 2003). Ke smrti buňky nekrotickou dochází působením vnějších faktorů, jako je trauma, fyzické zranění nebo různé infekce. Tyto faktory někdy vyvolávají změnu morfologie živých tkání či orgánů (Banfalvi, 2017). Apoptóza má rozdílné morfologické a biochemické znaky než nekróza (tab. 2). Hlavním rysem nekrotické smrti je narušení integrity plazmatické membrány. Dále dochází k otoku a destrukci buňky a jejích organel, např. mitochondrií, endoplazmatického retikula a lyzozomů. Ztráta integrity buněčné membrány má za následek uvolnění cytoplazmatického obsahu do okolní tkáně a vysílání chemotaktických signálů. Uvolnění buněčných složek do okolí způsobuje zánětlivou reakci. Nekrotické buňky neindukují fagocytózu

externalizací fosfatidylserinu, ale signálem pro fagocytózu je ztráta integrity buněčné membrány. Tyto buňky jsou eliminovány fagocyty makropinocytózovým procesem (Elmore, 2007; Festjens et al., 2006).

Dříve byly apoptóza a nekróza považovány za dva striktně oddělené procesy. Dnes už je známo o propojení těchto dvou typů eliminace buněk. Bylo prokázáno, že *in vivo* probíhá jev zvaný nekroptóza. Nekroptóza je forma programované buněčné smrti, která se často vyskytuje u fyzických traumat, neurodegenerace, ischemie a dalších stavů. Nekroptotická smrt může být vyvolána stejným signalizačním způsobem jako apoptóza (Nikoletopoulou et al., 2013).

Tab. 2: Srovnání morfologických a biochemických znaků apoptózy a nekrózy (Upraveno dle Becila et al., 2010).

Apoptóza	Nekróza
Postihuje jednotlivé buňky	Postihuje skupinu buněk
Smrštění buňky, kondenzace jádra	Bobtnání a zvětšení buňky, otok organel
Zachování integrity plazmatické membrány	Ztráta integrity plazmatické membrány
Fragmentace buňky na apoptotická tělíška	Lýza buňky
Energeticky závislý proces	Energeticky nezávislý proces
Fagocytóza makrofágy a okolními buňkami	Fagocytóza makrofágy
Bez zánětlivé reakce	Zánětlivá reakce

2.4 Zlomy na DNA

Molekula DNA, jakožto nositelka genetické informace, neustále čelí mnoha škodlivým endogenním a exogenním vlivům. Nepříznivé faktory vycházející z vnějšího prostředí a vnitřního prostředí buňky mohou vytvářet na DNA léze v podobě jednovláknových nebo dvouvláknových zlomů. Dvouvláknové zlomy jsou nejtoxičtější léze, a tak musí být opraveny, aby byla zachována integrita chromosomu (Mehta, Haber, 2014). DNA zlomy mohou mít za následek až zastavení buněčného cyklu, inhibici transkripce, replikace a segregace chromosomů, což vede k apoptóze, nebo mutaci a chromozomální aberaci vedoucí ke stárnutí či karcinogenezi (Negritto, 2010).

Během buněčného cyklu vzniká spontánně mnoho jednovláknových zlomů na DNA. Tyto zlomy jsou z velké části opraveny bezchybnými mechanismy aparátu buňky. Nicméně malá část zlomů opravena není, proto může dojít při následné replikaci k zastavení a kolapsu replikační vidlice a k tvorbě dvouvláknových zlomů (Vilenchik, Knudson, 2003). Předpokládá se, že za jeden buněčný cyklus vzniká asi 10 dvouvláknových zlomů (Pfeifer et al., 2000). V mitochondriích vzniká při oxidativní fosforylaci velké množství reaktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku mohou vstupovat do jádra prostřednictvím jaderných pórů a zde mohou reagovat s DNA za vzniku jednovláknových zlomů. Dvě těsně rozložené léze tohoto typu na antiparalelních vláknech DNA dávají vzniku dvouvláknových zlomů. Další příčinou endogenně vzniklých dvouvláknových zlomů je selhání enzymu topoizomerázy II, která přechodně rozplétá obě vlákna dvoušroubovice. Pokud se topoizomeráza II nedokáže znovu připojit na vlákna DNA, výsledným efektem jsou dvouvláknové léze molekuly DNA (Lieber, 2011). Dvouvláknové zlomy nemusí být vždy jen patologické. Fyziologicky se vyskytují u imunitního systému, který zahrnuje programované dvouvláknové léze k V (D) J rekombinaci lymfocytů a u meiotické rekombinace je zařazení těchto zlomů také nezbytné (Jeggo, Löbrich, 2007).

Hlavním faktorem poškození DNA z exogenního prostředí je přirozené ionizující záření životního prostředí. Mezi přirozené ionizující záření patří rentgenové záření a γ -záření. Dalším zářením, které způsobuje léze na DNA je ultrafialové záření (Lieber, 2011). Ionizující záření způsobuje poškození bází, a navíc vytváří

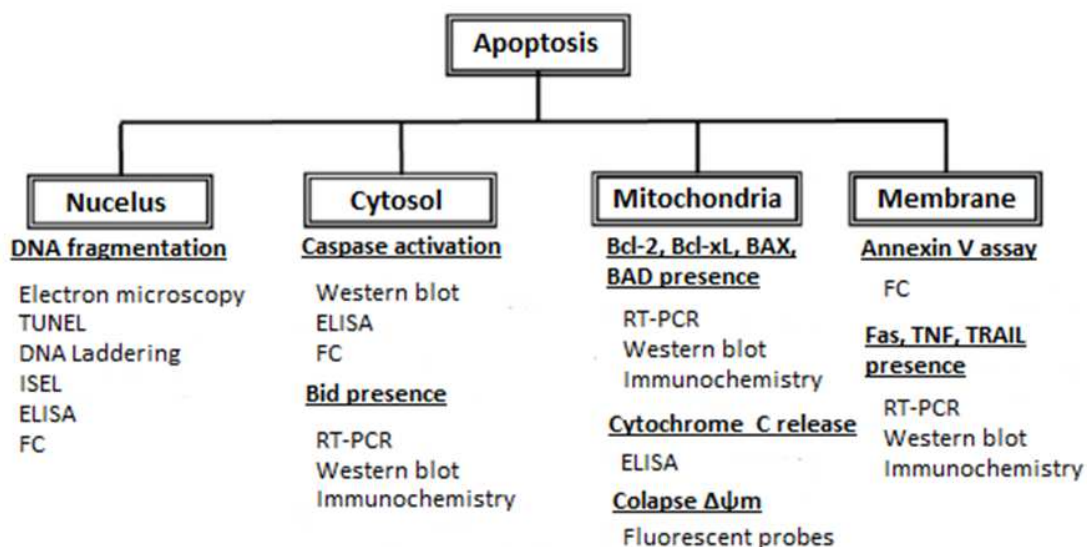
jednovláknové zlomy působením volných radikálů, které vznikly radiolýzou některých látek. Často při vysokých dávkách záření a při hojném výskytu jednovláknových lézí na protilehlých vláknech DNA nacházejících se blízko sebe dochází k vytvoření dvouvláknových zlomů (Mehta, Haber, 2014). Komplexní chemické změny na DNA vyvolané ionizujícím zářením jsou obzvláště náročné na opravu DNA (Pfeifer et al., 2000). Poškození DNA exogenně je také způsobeno některými chemickými činidly, nejčastěji protinádorovými léky cytostatiky. Alkylační cytostatika, cisplatina, mitomycin C a inhibitory topoizomerázy, jako jsou etopozid a camptotecin, mohou vyvolat na DNA jednovláknové nebo dvouvláknové zlomy (Mehta, Haber, 2014; Negritto, 2010).

2.5 Detekční metody apoptózy

Pro správný výběr detekční metody apoptózy je důležité dobře porozumět procesu tohoto typu buněčné smrti. Existuje mnoho metod pro stanovení apoptózy založené na určení morfologických a biochemických znaků. Některé apoptotické mechanismy probíhají v iniciační fázi a jiné jsou charakteristické pro exekuční fázi. Proto jsou metody rozděleny podle času typických změn. Zaměřují se na detekci ranných událostí a pozdních událostí apoptózy. Dále lze detekční testy dělit podle toho na jakou buněčnou organelu cílí při probíhající apoptóze (obr. 5). Ne všechny biochemické události specifické pro apoptózu se odehrávají ve všech apoptotických buňkách a často se tyto změny mohou vyskytovat u nekrotických buněk (Huerta et al., 2007).

Časový průběh biochemických procesů se obvykle liší v závislosti na celé řadě faktorů, jako je např. typ buněčné linie a tkáně, stimul vyvolávající apoptózu a intenzita a doba expozice stimulu. Obecně platí, že kultivované buňky podstupují apoptotickou smrt mnohem dříve než buňky ve tkáních. Také vzhledem k heterogenitě a odchýlkám ve fázích buněčného cyklu se mohou apoptotické děje časově odlišovat u jednotlivých buněk ve stejné populaci. Při zvolení detekční metody je podstatné mít na vědomí určité faktory ovlivňující apoptózu buněk. Důležité je použít minimálně dvě metody zaměřující se na různé charakteristické

znaky a fungující na odlišném principu (Sundquist et al., 2006; Watanabe et al., 2002).



Obr. 5: Vybrané detekční metody; TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling), ISEL (In Situ End Labeling), ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), FC (Flow Cytometry), RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), $\Delta\psi_m$ (Mitochondrial membrane potential) (Upraveno dle Huerta et al., 2007).

2.5.1 Metody detekující morfologické znaky apoptózy

2.5.1.1 Světelná a elektronová mikroskopie

Světelná mikroskopie se využívá k identifikaci specifických morfologických znaků vznikajících u buněk při apoptóze. Slouží k detekci buněčného smrštění, tvorby membránových puchýřků a k vzniku apoptotických tělísek. Nejčastěji se k vizualizaci buněk využívá barvení hematoxylinem a eosinem. Apoptotická buňka se po obarvení jeví jako menší kulatá nebo oválná buňka s tmavě růžovou cytoplazmou a její jádro je kondenzované a purpurově zabarvené. Výhodami světelné mikroskopie jsou finanční nenáročnost a jednoduchost metody. Značnými nevýhodami jsou menší citlivost a nižší specifita (Doonan, Cotter, 2008).

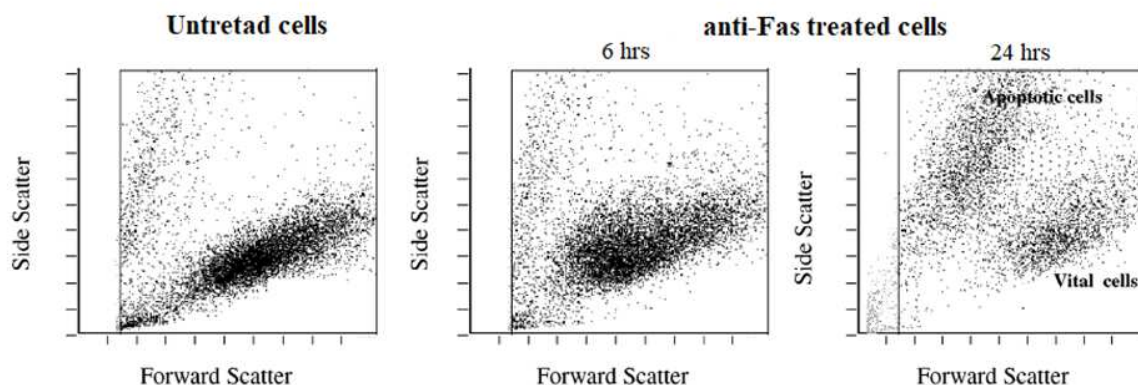
Podrobnější informace o morfologických změnách buňky při apoptóze poskytuje elektronová mikroskopie. Využívají se dvě techniky elektronové mikroskopie poskytující dvojrozměrné a trojrozměrné obrazy buňky. Skenovací elektronová mikroskopie je mikroskopická technika, která dává informace o povrchu

buňky, zejména o tvorbě membránových puchýřků. Transmisní elektronová mikroskopie podává interní obrazy buňky, což umožňuje pochopit biologické vztahy mezi strukturou a funkcí na celulární, subcelulární a molekulární úrovni. Transmisní elektronová mikroskopie se považuje za nejpřesnější metodu pro odlišení apoptózy od nekrózy. Jedná se o vysoce specifickou a citlivou metodu, která může být doplněna barvením. Nevýhodami jsou časová náročnost, vysoká pořizovací cena mikroskopu a obtížná příprava vzorku (Doonan, Cotter, 2008; Krysko et al., 2008).

2.5.1.2 Průtoková cytometrie

Mezi přesné kvantifikační metody apoptózy patří průtoková cytometrie. Průtoková cytometrie je spektroskopická metoda umožňující měření vlastností buněk díky dopadu laserového paprsku na buňku a díky jeho následnému rozptýlení. Na základě rozptylových parametrů lze od sebe odlišit apoptotické buňky od vitálních a nekrotických buněk. Rozptyl laserového paprsku v přímém směru (*FSC; Forward Scatter*) se vztahuje k velikosti buňky a rozptyl v kolmém směru (*SSC; Side Scatter*) podává informace o vnitřních strukturách a morfologii buňky (Krysko et al., 2008).

Apoptotické buňky jsou menší než viabilní buňky a mají vyšší granularitu (obr. 6). Buňky podstupující apoptózu se v počáteční fázi zmenšují, zatímco membrána zůstává neporušená. Naopak nekrotické buňky zvětšují svoji velikost následkem buněčného otoku způsobeným porušením plazmatické membrány. Během počáteční fáze apoptózy se parametr FSC snižuje a SSC se zvyšuje, nebo zůstává nezměněn. V dalších fázích se snižují oba parametry. U nekrotických buněk dochází k okamžitému zvýšení FSC, zatímco signál SSC klesá. Výhodou této metody je možnost kombinace rozptylových parametrů s analýzou buněčných markerů s použitím fluorescenčních specifických protilátek. Průtoková cytometrie umožňuje analýzu až 10 000 buněk za sekundu. Jedná se o multiparametrovou metodu, která poskytuje jednoduché měření velikosti buněk, detekci vlastností buněčné membrány a buněčných organel, stanovení obsahu DNA a mnohé další. Omezením průtokové cytometrie je, že buňky měřené touto metodou musí být v suspenzní formě a nesmí být fixované (Vermes et al., 2000).



Obr. 6: Průtoková cytometrie apoptotických buněk; Buňky Jurkat byly inkubovány se 100 ng/ml anti-Fas po dobu 24 hodin. U neošetřených buněk protilátkami lze vidět velké množství buněk s vysokou hodnotou FSC. Po 6 hod působení anti-Fas je poměrně zvyšován parametr SSC a po 24 hodinách jsou již viditelné dvě různé populace buněk (Upraveno dle Vermes et al., 2000).

2.5.2 Metody detekující biochemické znaky apoptózy

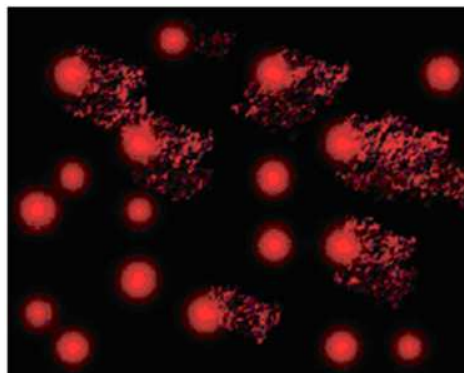
2.5.2.1 Gelová elektroforéza

Jedním z nejvíce charakteristickým znakem apoptózy je internukleozomální DNA fragmentace. Fragmenty mohou být vizualizovány jako „žebřík“ na agarózovém gelu obarveným ethidium bromidem. DNA je nejprve extrahována z apoptotických buněk a vysrážena vhodným srážedlem. Fragmentovaná DNA zůstává v supernatantu a je podrobena gelové elektroforéze. Vzhledem k nízké citlivosti musí být pro vizualizaci DNA ethidium bromidem použito velké množství buněk ($> 1 \times 10^6$). Fragmenty DNA v buňkách podstupujících apoptózu lze detekovat několika způsoby gelové elektroforézy (Otsuki et al., 2003).

Běžnou metodou gelové elektroforézy, jenž se používá pro stanovení fragmentů DNA, je konvekční gelová elektroforéza. Tato metoda se využívá pro separaci molekul DNA s nízkou molekulární hmotností (180–200 bp nebo jejich násobky). Další technikou elektroforézy je pulsní gelová elektroforéza, která je specializovaná na rozdělení DNA molekul v rozsahu kilo až mega bází (50 kb–10 Mbp). Separace fragmentů je založena na různé migraci molekul póry gelu při působení střídavého elektrického pole mezi dvojicí elektrod (Archana et al., 2013). Nevýhodami této metody jsou nízká citlivost a časová náročnost z důvodu lyzace

buněk, extrakce a precipitace DNA. Metoda má i určité výhody, např. finanční nenáročnost a snadnou dostupnost (Saddat et al., 2015).

Další elektroforetickou metodou pro určení poškozené DNA je metoda Comet. Poškození DNA je měřeno na úrovni jednotlivých buněk. Buňky usazené v agarózovém gelu jsou lyzovány detergentem. Po následné elektroforéze porušená DNA putuje v gelu ven z buněčného jádra a tvoří tak ocas komety. Nepoškozená vysokomolekulární DNA zůstává v jádře a představuje hlavu komety. Deoxyribonukleová kyselina se vyskytuje ve zdravé buňce ve formě superšroubovice a při tvorbě zlomů dochází k narušení této struktury. Molekula DNA je tak elektroforeticky přitahována k anodě (Collins, 2004). Množství DNA uvolněné z hlavy komety závisí na účinku použitého mutagenu. V závislosti na pH mohou být detekovány různé zlomy na dvoušroubovici. Při alkalickém pH (> 13) je zvýšená migrace DNA s jednovláknovými zlomy a při neutrálním pH lze zaznamenat DNA s dvojitými zlomy, které jsou charakteristické pro apoptózu. Vytvořené útvary na gelu připomínající tvar komety jsou vizualizovány fluorescenční mikroskopií (obr. 7). Nejčastěji se využívá barvení ethidium bromidem, DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol) akridinovou oranží nebo SYBR green (Liao et al., 2009). Viabilní buňky zobrazují velkou hlavu a malý ocas komety, a naopak apoptotické buňky tvoří útvary komety s menší hlavou a větším ocasem. Jedná se o velice citlivou kvantitativní metodu. Metoda je velmi jednoduchá a komerční kity jsou snadno dostupné. Značnou nevýhodou je interpretace výsledků, protože tento test nemá standardní jednotky. Jednou z možností pro kvantifikaci poškození DNA je provedení kalibrace (Archana et al., 2013; Collins, 2004).



Obr. 7: Fotografický snímek migrace fragmentů DNA detekovaných Comet metodou; K buněčným liniím HCT116 a HepG2 bylo aplikováno 0,1 ng/ml IgG. DNA byla obarvena ethidium bromidem a k detekci byl využit fluorescenční mikroskop s excitačním filtrem 420–490 nm (40x) (Upraveno dle Shaker, Melake, 2012).

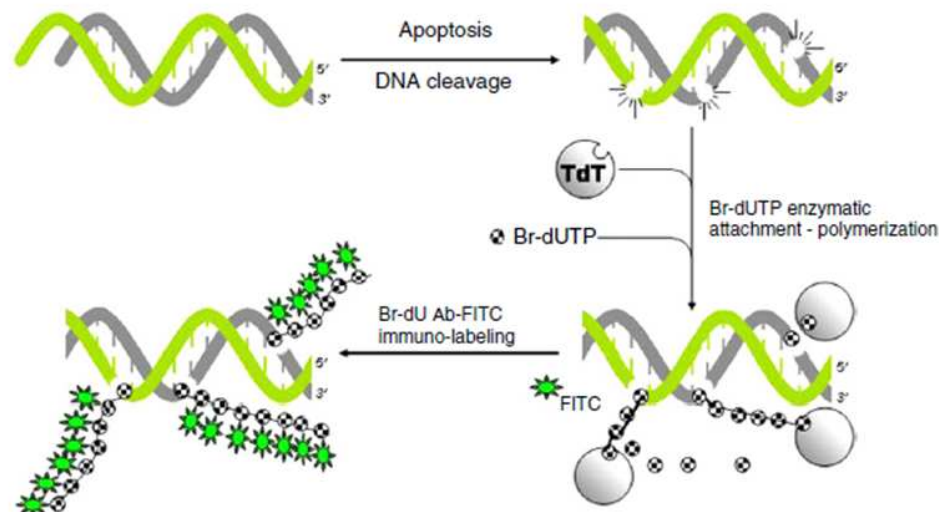
2.5.2.2 TUNEL metoda

Metoda Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) je nejhojněji využívanou metodou pro detekci apoptózy. Tato metoda byla poprvé použita v roce 1992 *in situ* na histologických řezech různých tkání a thymocytech (Gavrieli et al., 1992). Princip tohoto testu spočívá v tom, že do fragmentované DNA je začleňován značený deoxyuridintrifosfát (dUTP) za katalýzy specifického rekombinantního enzymu terminální deoxynucleotidyl transferázy (TdT). Terminální deoxynucleotidyl transferáza inkorporuje dUTP na 3'OH konce jednořetězcových nebo dvouřetězcových zlomů fragmentované DNA. 3' hydroxylové konce slouží jako primery a TdT opakovaně přidává jednotlivé dUTP k sobě. Pro zviditelnění fragmentů DNA je dUTP modifikovaný určitou značkou. Nejčastěji se deoxyuridintrifosfát značí biotinem, fluorochromem, např. fluoresceinem isothiokyanátem nebo bromem. Poškozenou DNA tak můžeme hodnotit pomocí světelné mikroskopie, fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Huerta et al., 2007).

První modifikací TUNEL assay bylo značení dUTP biotinem. Biotinylovaný dUTP je zabudován do místa přerušení DNA a signál je zesílen navázáním avidin-peroxidázy na biotin. Signál je vizualizován pomocí diaminobenzidinu a identifikován světelnou mikroskopií (Gavrieli et al., 1992). Na biotin-dUTP se může

také silně vázat streptavidin konjugovaný s fluorochromem, např. kyaninem 5. Detekce fragmentované DNA je prováděna fluorescenční mikroskopií nebo průtokovou cytometrií (Kyrylkova et al., 2012). Fluorescenční značky jsou k systému vázány kovalentně a po excitaci primárním zářením emitují fluorescenční záření o vlnové délce odlišné od vlnové délky excitace (Lakowicz, 2013).

Další variantou metody založenou na značení zlomů DNA je modifikace dUTP bromem. Modifikace BrdUTP se převážně používá k detekci a kvantifikaci syntézy DNA při proliferaci buněk. Tato metoda nahradila autoradiografii, která byla populární v šedesátých letech (Buck et al., 2008). Bromdeoxyuridintrifosfát se může začlenit do syntetizované DNA nejen při proliferaci buněk, ale např. i při reparaci DNA. Mnoho studií také potvrzuje, že inkorporace BrdUTP se děje také při poškození DNA během apoptózy (Bauer, Patterson, 2005; Kruman et al., 2004). Identifikace fragmentované DNA značením BrdUTP je prováděna imunocytochemicky pomocí anti-BrdUTP protilátek (obr. 8). Primární anti-BrdUTP protilátky mohou být přímo konjugovány s některým fluorochromem nebo enzymem. Při značení protilátek enzymem se do systému přidává příslušný substrát a chromogen pro zviditelnění reakce. K reakci mohou být využity jak primární, tak i sekundární protilátky. Sekundární protilátky zaměřené proti anti-BrdUTP mohou být také značeny fluorochromem nebo enzymem. Následný signál je pozorován světelnou či fluorescenční mikroskopií, nebo je detekován průtokovou cytometrií. Imunocytochemická detekce bromdeoxyuridintrifosfátu v TUNEL assay nevyžaduje nutně denaturaci DNA, která je důležitá u stanovení proliferace DNA (Darzynkiewicz et al., 2008; Hughes, Mehmet, 2005).



Obr. 8: Schématické znázornění značení zlomů řetězce DNA bromdeoxyuridintrifsfátem pomocí TdT; Zlomy na DNA jsou označeny modifikovaným BrdUTP, který je inkorporován do porušené DNA enzymem TdT. Protilátky anti-BrdUTP konjugované s FITC jsou vázány na začleněný BrdUTP. TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase), FITC (Fluorescein isothiocyanate), BrdUTP (Bromdeoxyuridinetriphospate) (Převzato z Darzynkiewicz et al., 2008).

Jednou z dalších nepřímých variant je konjugace dUTP s digoxigeninem. Signál je vizualizován přidáním primárních protilátek proti digoxigeninu, které jsou označené vybraným fluorochromem. Varianta metody TUNEL BrdUTP je bezesporu nejvíce citlivá k identifikaci dvojitých zlomů DNA než ostatní alternativy (Darzynkiewicz et al., 2008). Intenzita značení zlomů DNA pomocí BrdUTP je téměř dvakrát vyšší, než je intenzita nepřímým značením konjugací dUTP s biotinem či digoxigeninem a osminásobně vyšší než v případě přímého značení fluorochromem. Předností modifikace metody TUNEL BrdUTP je, že sloučenina deoxyuridinutrifosfátu s bromem je přibližně o tři řády levnější než konjugace deoxyuridintrofosfátu s digoxigeninem (Li, Darzynkiewicz, 1995).

Při použití varianty testu s fluorochromem je v přítomnosti rozsáhlých zlomů DNA zaznamenána silná fluorescence. Slabší fluorescence nemusí nutně vést k nepřítomnosti apoptózy. V některých případech se fragmentace DNA může zastavit na fragmentech o velikosti 50–300 kb a internukleosomální úseky již nevznikají. Tyto apoptotické buňky vykazují slabé fluorescenční záření (Darzynkiewicz et al., 2008). Do popředí se dostala i metoda využívající

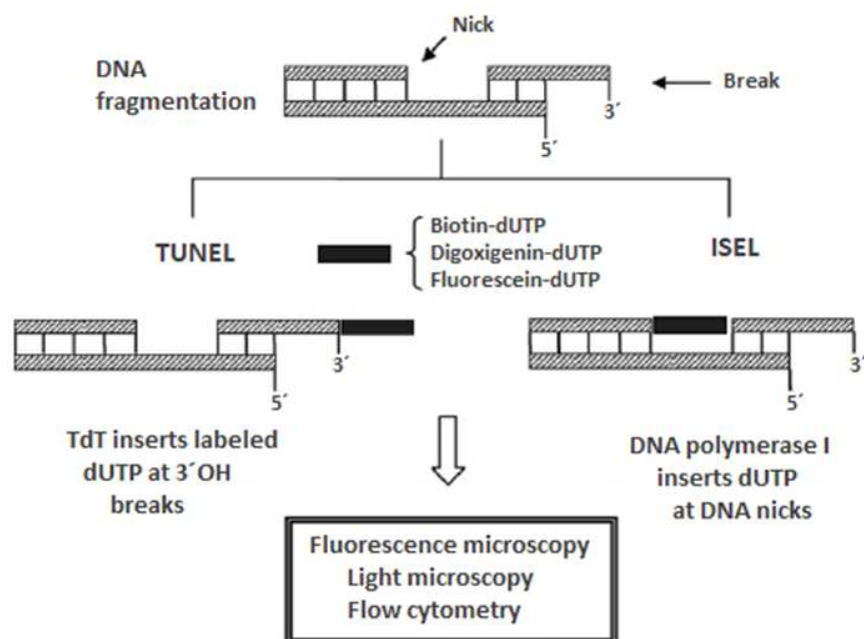
ethynyldeoxyuridintrifosfát namísto bromdeoxyuridintrifosfátu. Brom je nahrazen v páté poloze na dUTP alkynovou skupinou. Alkynová skupina je pak detekována reakcí s fluorescenčně značeným azidem. Tento test je velmi citlivý a rychlejší, než je metoda detekce s BrdUTP (Salic, Mitchison, 2008).

Obecně je TUNEL assay vysoce účinná a spolehlivá metoda k detekci apoptózy. Metoda je vhodná pro mnoho typů buněk a také pro zmrazené a parafínové tkáňové řezy. Pomocí TUNEL assay lze kvantifikovat apoptózu stanovením apoptotického indexu, což je poměr pozitivních jader vůči celkovému počtu buněk. Vyskytuje se však i několik omezení tohoto testu. Nezbytná fixace tkání a buněk může významně měnit a zkreslovat výsledky. Fixace buněk je velmi důležitá, protože působením fixačního činidla dochází k zabránění extrakci vysoce fragmentovaných molekul DNA z apoptotických buněk. Metoda je poměrně drahá, časově náročná a není zcela specifická, protože poskytuje pozitivní výsledky nejen pro apoptotické buňky, ale i pro nekrotické buňky. Ke zvýšení specifity lze rozlišit apoptotické buňky od nekrotických buněk obarvením propidium jodidem (*PI; Propidium Iodide*). V dnešní době je TUNEL aplikován *in situ* a *in vitro* (Darzynkiewicz et al., 2008; Huerta et al., 2007).

2.5.2.3 ISEL metoda

Metoda *In Situ End Labeling (ISEL)* patří mezi další modifikace testu TUNEL. Metoda ISEL byla představena v roce 1993 a byla aplikována na tkáňové řezy prostaty, lymfatických uzlin a dalších. Princip ISEL se velmi podobá principu metody TUNEL. Hlavním rozdílem je, že značené nukleotidy na 3'OH konce připojuje enzym DNA polymeráza I místo TdT (Wijisman et al., 1993). Dalším odlišením je také to, že DNA polymeráza I zabudovává označený dUTP do drážky jednovláknového zlomu DNA a modifikované nukleotidy inkorporuje pomaleji než TdT (obr. 9). Deoxyuridintrifosfát se u této metody rovněž konjuguje s biotinem, digoxigeninem nebo fluorochromem. Technika ISEL umožňuje použití automatické zobrazovací cytometrie pro hodnocení apoptózy, proto může být provedena studie velkého počtu vzorků. Získaný signál může být detekován i pomocí světelné mikroskopie a fluorescenční mikroskopie. Tato metoda je zvláště cenná u tkání nebo buněk, kde

se vyskytuje apoptóza zřídka, tudíž je často využívána při kvantifikaci apoptózy u nádorů. Technika TUNEL je citlivější než ISEL (Archana et al., 2013; Huerta et al., 2007).



Obr. 9: Schématické porovnání metod TUNEL a ISEL; TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling), ISEL (In Situ End Labeling), dUTP (deoxyuridinetriphosphate), TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) (Převzato z Huerta et al., 2007).

2.5.2.4 Stanovení mitochondriálního membránového potenciálu

V průběhu apoptózy dochází k naprosté degradaci mitochondrií. Dysfunkce mitochondrií je zpravidla spojená se snížením membránového potenciálu. Mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\psi_m$) je rozdíl elektrického potenciálu mezi vnitřním a vnějším prostředím mitochondriální membrány v buňce. Existence $\Delta\psi_m$ je dána transportem protonů z matrix mitochondrií do mezimembránového prostoru (Perry et al., 2011). Ke stanovení $\Delta\psi_m$ se hojně začalo využívat lipofilních fluorochromů. Díky své lipofilitě fluorescenční sondy prostupují skrz dvouvrstvou lipidovou membránou buněk až do mitochondrií.

Nejběžnější sondou, která se používá pro detekci mitochondriálního membránového potenciálu je cyaninové kationické barvivo 5,5',6,6'-tetrachloro-

1,1',3,3'-tetraethylbenzimid-azolylykarkobokyanin jodid (*JC-1*). Sonda *JC-1* se vyskytuje jako kation, který je přitahován k opačně nabitému $\Delta\psi_m$ a kumuluje se v mitochondriích (Yousif et al., 2009). Viabilní buňky mají obvykle vysoký mitochondriální membránový potenciál. V těchto buňkách *JC-1* agreguje a emituje na základě excitace červené fluorescenční záření. V buňkách, u kterých došlo z nějakého důvodu ke ztrátě $\Delta\psi_m$, sonda zůstává v monomerní formě a vyzařuje zelené fluorescenční záření. Sonda působící na stejném principu jako *JC-1* je sonda *JC-10* (Perelman et al., 2012). Ostatními kationickými fluorochromy stanovující $\Delta\psi_m$ jsou barviva na bázi rhodaminu. Tetramethylrhodamin methylester (*TMRM*) a Tetramethylrhodamin ethylester (*TMRE*) se hromadí v mitochondriích při vysokém $\Delta\psi_m$. Při nízkém $\Delta\psi_m$ mitochondrie akumulují menší množství barviva. Proto ve zdravých buňkách sondy září intenzivně červeně a v buňkách s poškozenými mitochondriemi vykazují sondy nízkou červenou fluorescenci (Bouchier-Hayes et al., 2008). Akumulace intracelulárních fluorescenčních sond v mitochondriích je tedy opticky detekováno fluorescenční mikroskopií, konfokální mikroskopií, průtokovou cytometrií a dalšími metodami. Stanovení $\Delta\psi_m$ pomocí fluorescenčních sond je senzitivní, rychlá a nenáročná metoda. Omezením sond je jejich rychlé fotovybělování (Perry et al., 2011).

2.5.2.5 Stanovení aktivity kaspáz

Kaspázy štěpí různorodé skupiny intracelulárních substrátů. Tyto události přispívají k charakteristickým projevům apoptózy. Katalytická aktivita kaspáz může být stanovena fluorometricky, kolorimetricky nebo imunochemicky, např. imunoblotem. Nejjednodušším testem pro detekci aktivity kaspáz je fluorometrický a kolorimetrický test. Dochází zde k rozštěpení syntetického substrátu kaspázami, který je konjugován s určitou značkou. Syntetickým substrátem pro kaspázu 3 je tetrapeptid DEVD. Tetrapeptid DEVD je značený buď fluorescenční molekulou, jako je 7-amino-4-trifluormethylkumarin (*AFC*), nebo kolorimetrickou molekulou p-nitroanilidem (*pNA*). Rozštěpením substrátu DEVD-*AFC* se uvolní *AFC* z komplexu a dochází ke změně fluorescence z modré barvy na žlutozelenou. Změna fluorescence se detekuje fluorometricky. Kolorimetrický test je založen na

spektrofotometrické detekci volného chromoforu pNA po rozštěpení komplexu DEVD-pNA kaspázou 3 (Gurtu et al., 1997).

Jelikož kaspázy štěpí intracelulární proteiny, je možné také sledovat aktivitu kaspáz posouzením integrity substrátů. Rozštěpením substrátů, např. poly ADP-ribóza polymerázy nebo lamininu A vznikají charakteristické fragmenty, které se dají určit pomocí imunoblotu. V průběhu apoptózy dochází ke štěpení zymogenních forem kaspáz na efektorové formy, tudíž se může imunoblot využít i ke zjištění, zda byly kaspázy aktivovány. Během aktivace kaspázy prochází různými konformačními změnami. K rozpoznání pouze aktivní konformace je možné využít protilátky, které jsou značené určitým fluorochromem. Aktivní kaspázy lze stanovit fluorescenční mikroskopií nebo průtokovou cytometrií (Kaufmann et al., 2008). Testy k detekci aktivity kaspáz jsou snadné, citlivé a spolehlivé, avšak mají různá omezení. Jedním z problémů je vysoké a proměnlivé pozadí kaspázové aktivity v kontrolních buňkách z důvodu spontánní apoptózy. Často také dochází k překrytí štěpení různých substrátů některými kaspázami, proto nelze vždy přesně určit identifikaci kaspázy (Archana et al., 2013; Kaufmann et al., 2008).

2.5.2.6 Stanovení markeru asymetrie fosfolipidové membrány

Externalizace fosfatidylserinu je typickým apoptotickým znakem změn na buněčném povrchu. Vystavení PS může být identifikováno pomocí Annexinu V, což je Ca^{2+} dependentní fosfolipid-vázající protein. Annexin V je konjugován s některým fluorochromem, nejčastěji s fluoresceinem isothiokyanátem nebo s Alexa Fluor barvivou. Takto modifikovaný Annexin V se váže na PS vyskytující se na povrchu membrány. Pro odlišení apoptotických buněk od nekrotických buněk se provádí doplňující barvení PI. Propidium jodid je barvivo, které neproniká plazmatickou membránou do buňky. Toto barvivo nemůže vstoupit do buňky s neporušenou membránou kvůli své velké molekulové hmotnosti. Při porušení buněčné membrány se PI dostává do buňky, což je charakteristické u nekrotických buněk, ale i u pozdně apoptotických buněk *in vitro* a v buňkách se váže na DNA (Krysko et al., 2008).

Ke stanovení těchto markerů apoptózy či nekrózy se využívá průtoková cytometrie nebo fluorescenční mikroskopie. Viabilní buňky nejsou pozitivní na

Annexin V ani na PI. Časně apoptotické buňky vykazují pozitivitu pouze na navázání Annexinu V. Pozdně apoptotické buňky jsou dvojitě pozitivní jak na Annexin V, tak i na propidium jodid. Nekrotické buňky dávají často pozitivní signál pouze na PI. V některých případech však Annexin V vniká porušenou membránou do buňky a váže se na PS na vnitřní straně buněčné membrány (Pietkiewicz et al., 2015; Wiliingham, 1999). Rozlišení apoptotických buněk od nekrotických buněk tímto testem nemusí být zcela jednoznačné, proto je důležité stanovit další markery apoptózy. Značnými výhodami metody je převážně časová nenáročnost, jednoduchost barvení a senzitivita metody (Pietkiewicz et al., 2015).

3. CÍLE PRÁCE

Obsah diplomové práce je zaměřen na detekci fragmentované DNA při poškození buněk metodou TUNEL. Práce se zabývá především optimalizací metody a její aplikací na vybrané buněčné linii HK-2 buněk. Cíle práce lze rozdělit do tří úseků.

1. Optimalizace postupu provedení TUNEL metody pomocí fluorescenční mikroskopie

Zavedení a optimalizace metody TUNEL na renální linii HK-2 buněk ovlivněných jedním použitým toxinem za stále stejných inkubačních podmínek.

2. Použití optimalizované TUNEL metody na vybrané buněčné linii po buněčném poškození

Aplikování zavedené metody TUNEL na renální linii HK-2 buněk ovlivněných dvěma toxiny o různých koncentracích a s různou dobou inkubace buněk s toxiny.

3. Použití komerční TUNEL metody na vybrané buněčné linii a porovnání výsledků se zavedenou metodou

Použití komerční metody TUNEL a srovnání s optimalizovanou metodou pomocí fluorescenční mikroskopie.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam chemikálií

Bromdeoxyuridin, BrdU ($C_9H_{11}BrN_2O_5$; Mr = 307,10; Sigma Aldrich, USA)
Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor™ 488 Imaging Assay (ThermoFisher, USA)
Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu S$)
Dimethylsulfoxid, DMSO (C_2H_6OS ; Mr = 78,13; Sigma Aldrich, SRN)
Dithiotreitol, DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$; Mr = 154,25; Sigma Aldrich, USA)
Dulbecco's Modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 (1:1) (s/bez fenolové červeně), DMEM/F-12 (Sigma Aldrich, USA)
Cisplatina, CisPt ($Pt(NH_3)_2Cl_2$; Mr = 300,05; Sigma Aldrich, USA)
Fetální bovinní sérum, FBS (Gibco, USA)
Formaldehyd (CH_2O ; Mr = 30,03; Lachema, ČR)
Fosfátový pufr (pH 7,4), PBS (Gibco, USA)
Fosfátový pufr podle Dulbecca, DPBS (Molecular Probes, USA)
HEPES (Gibco, USA)
Hexahydrát chloridu kobaltnatého ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$; Mr = 237,9; Sigma Aldrich, USA)
Hovězí sérový albumin, BSA (Mr = 66,46; Sigma Aldrich, USA)
Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4 ; Mr = 174,18; Sigma Aldrich, USA)
Insulin/transferin/seleničitan sodný, ITS (Sigma Aldrich, USA)
Kamptotecin, CPT ($C_{20}H_{16}N_2O_4$; Mr = 348,35; Sigma Aldrich, USA)
Kyselina chlorovodíková (HCl; 36,46; Fluka Biochemika, Švýcarsko)
Milli-Mark™ Anti-BrdU, clone BU-1 Alexa Fluor™ 488 (Merck KGaA, SRN)
Minimum essential medium eagle, MEM (Sigma Aldrich, SRN)
Penicilin/streptomycin, P/S (Gibco, USA)
Pyruvát sodný, PYR (Gibco, USA)
Rekombinantní epidermální růstový faktor, EGF (Gibco, USA)
Triton™ X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$; Mr = 647; Sigma Aldrich, USA)
Terminální deoxynukleotidyl transferáza, TdT (Roche, Švýcarsko)

4.2 Přístroje a laboratorní pomůcky

Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, JAP)

Cytospiny (SPL, Korea)

Magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)

Termostatovaná míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN, IKA Sweden)

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Vodní lázeň s termostatem a ultrazvukem (Bandelin Sonorex, SRN)

Lednice s mrazákem (-20 °C) (Liebherr, ČR)

Automatické pipety Finnpiquette (Thermo, Finsko)

Laboratorní sklo (baňky, kádinky) (Simax, Fisherbrand; ČR, UK)

Mikrozkumavky (Eppendorf, SRN)

Krycí sklíčka (Hirschmann, ČR)

pH metr (inoLab, SRN)

Software: Microsoft Office (Word, Excel, Picture Manager), Nikon NIS-Elements, Adobe Photoshop CC 2015

4.3 Biologický materiál

Buněčná linie human kidney 2, HK-2 (ATCC, USA)

Kultivační médium pro HK-2 buňky

Základem kompletního kultivačního média bylo médium DMEM/F-12 (1:1), které bylo obohaceno o fetální hovězí sérum (5 % (v/v)), 1 mM pyruvát, 50 µg/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 10 µg/ml insulinu, 5,5 µg/ml transferinu, 5 ng/ml seleničitanu sodného a 5 ng/ml EGF.

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Roztoky využívané během použitých stanovení

Pracovní roztok DPBS

Koncentrovaný roztok DPBS jsme ředili v poměru 1:10, např. byly pipetovány 2 ml pufru DPBS do 18 ml deionizované vody.

Zásobní roztok BrdU ($C_{\text{BrdU}} = 10 \text{ mM}$)

Zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním 3 mg BrdU v 1 ml DMSO a roztok byl skladován v mrazáku při $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pracovní roztok BrdU ($C_{\text{BrdU}} = 1 \text{ mM}$)

Alikvot 5 µl zásobního roztoku BrdU jsme pipetovali do 45 µl pufru DPBS.

Pracovní roztok CH_2O (30%)

Pro přípravu pracovního roztoku 30% CH_2O jsme přidali 52 µl zásobního roztoku 37% CH_2O do 13 µl pufru DPBS.

Pracovní roztok Tritonu X-100 (0,5%)

Pro přípravu pracovního roztoku 0,5% Tritonu X-100 jsme přidali 1 µl zásobního roztoku 100% Tritonu X-100 do 199 µl pufru DPBS.

Pracovní roztok BSA (1%)

Navážku 0,0015 g BSA jsme rozpustili ve 150 μ l pufru DPBS.

Pracovní roztok HCl ($C_{\text{HCl}} = 2 \text{ M}$)

Pro přípravu pracovního roztoku HCl jsme přidali 3,8 ml 32% HCl do 18,1 ml deionizované vody.

Pracovní roztok K_2HPO_4 ($C_{\text{K}_2\text{HPO}_4} = 500 \text{ mM}$)

Navážku 8,709 g K_2HPO_4 jsme rozpustili ve 100 ml deionizované vody.

Pracovní roztok $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($C_{\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}} = 5 \text{ mM}$)

Navážku 0,1190 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ jsme rozpustili ve 30 ml deionizované vody a pracovní roztok jsme smíchali s pracovním roztokem K_2HPO_4 .

Pracovní roztok DTT ($C_{\text{DTT}} = 1 \text{ mM}$)

Navážku 0,003 g DTT jsme rozpustili v 20 ml deionizované vody.

Reakční pufr pro TUNEL

Reakční pufr pro TUNEL jsme připravili smísením pufru DPBS, 5X pufru K_2HPO_4 a $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a DTT (tab. 3). pH pufru jsme upravili na 7,4 a pufr byl skladován při 4 °C v lednici.

Tab. 3: Složení reakčního pufru pro TUNEL.

Chemikálie	Objem (μ l)
DPBS	4000 μ l
5X K_2HPO_4 a $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1000 μ l
DTT	200 μ l

Reakční směs pro TUNEL

Reakční směs pro TUNEL jsme připravili smícháním 1 mM BrdU, TdT a reakčního pufru (tab. 4). Reakční směs jsme připravili vždy čerstvou.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro TUNEL.

Chemikálie	Objem (μl)
BrdU	1,56 μl
TdT	0,33 μl
Reakční pufr	154,36 μl

Pracovní roztok anti-BrdU protilátek (1:20)

Protilátky jsme ředily roztokem pufru DPBS dle pokynu pokynů výrobce.

Zásobní roztok $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ($\text{CPt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2 = 1 \text{ mM}$)

Navážku 0,0015 g $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody.

Zásobní roztok $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{CC}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4 = 5 \text{ mM}$)

Navážku 0,0017 g $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ jsme rozpustili v 1 ml deionizované vody.

4.4.2 Příprava biologického materiálu

4.4.2.1 Kultivace HK-2 buněk

Buněčná linie HK-2 buněk byla kultivována v kompletním kultivačním médiu (viz kapitola). Do kultivačních láhví byl přidán předem daný objem buněk, aby výsledné množství buněk bylo $0,4 \times 10^6$. Poté byla kultivační nádoba doplněna kultivačním médiem na 10 ml. Buňky byly umístěny do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 a 95 % O_2 . Buňky byly kultivovány až do doby, než konfluence dosáhla 60 % (tzn. 60% nárůst buněčné kultury v kultivační nádobě) a poté byly buňky pasážovány. Densita buněk získaných pasáží dané kultivační láhve byla vypočítána s pomocí instrumentálního zařízení CASY counter.

4.5 TUNEL metoda

4.5.1 Princip TUNEL metody

Pro detekci zlomů na DNA při apoptóze buněk je využito specifického enzymu terminální deoxynukleotidyltransferázy, která inkorporuje značený deoxyuridintrifosfát na 3'OH konce fragmentů DNA, přičemž hydroxylové konce slouží jako primery pro enzym. Jednou z nejčastěji používaných modifikací TUNEL metoda je modifikace metody s konjugací deoxyuridintrifosfátu bromem. Detekce fragmentované DNA značením pomocí BrdU je prováděna imunocytochemicky protilátkami anti-BrdU. Anti-BrdU protilátky jsou většinou konjugované s určitým fluorochromem, který po excitaci primárním zářením emituje specifickou barvu, čímž označuje vytvořené zlomy na DNA.

4.5.2 Postup TUNEL metody

4.5.2.1 Optimalizace fixace buněk

Buňky HK-2 jsme nejprve fixovali fixačním činidlem formaldehydem. Do jednotlivých jamek cytopsinu jsme k buňkám do kultivačního média napipetovali 65 μ l formaldehydu (4%, 8%, 20% a 30%). Výsledná koncentrace formaldehydu u buněk byla 1,3 %, 2,6 %, 6,5 % a 9,8 % formaldehydu. Buňky jsme nechali inkubovat v roztoku formaldehydu po dobu 25 minut (4 °C). Po fixaci jsme roztok formaldehydu a kultivačního média odpipetovali a buňky jsme dvakrát promyli 200 μ l pufru DPBS po dobu 5 minut (RT).

4.5.2.2 Optimalizace permeabilizace buněk

Pro permeabilizaci buněk HK-2 jsme k buňkám napipetovali 200 μ l Tritonu X-100 (0,2% a 0,5%). Inkubace buněk s Tritonem X-100 probíhala 5 a 15 minut (RT). Následně jsme permeabilizační roztok z jamek odpipetovali a buňky jsme jednou promyli 200 μ l pufru DPBS po dobu 5 minut (RT).

4.5.2.3 Optimalizace značení zlomů DNA

K označení zlomů DNA u HK-2 buněk jsme využili reakční směs, která obsahovala: BrdU (1 mM), enzym TdT a reakční pufr (K_2HPO_4 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ a DTT). Do jamek cytopsinu jsme pipetovali 150 μ l reakční směsi. K buňkám jsme tak pipetovali 1,56 μ l nebo 3,12 μ l BrdU (1 mM) na jamku. Výsledná koncentrace u buněk byla tedy 0,01 či 0,02 mM BrdU. Také jsme provedli optimalizaci aktivity enzymu TdT, kdy jsme pipetovali 0,08 μ l a 0,33 μ l TdT na jamku. Buňky jsme nechali inkubovat s reakční směsí v časech 1,5 a 24 hodin (37 °C, tma) a buňky jsme promíchali. Po uplynutí inkubační doby jsme reakční směs odpipetovali a buňky jsme dvakrát promyli 200 μ l pufru DPBS po dobu 2 minut (37 °C, tma).

4.5.2.4 Optimalizace denaturace DNA

Pro denaturaci DNA HK-2 buněk HK-2 jsme využili hydrolyzu kyselinou chlorovodíkovou. Do příslušných jamek cytopsinu jsme k buňkám napipetovali 150 μ l HCl (2 M). Buňky jsme s roztokem HCl umístili do vyhřívané komory, kde byly ponechány 10 minut (37 °C). Po inkubaci jsme roztok odpipetovali a buňky jsme třikrát promyli 200 μ l pufru DPBS po dobu 2 minut (37 °C).

4.5.2.5 Optimalizace blokování nespecifických vazebných míst

K zablokování nespecifických míst pro vazbu protilátek jsme použili pracovní roztok hovězího sérového albuminu. K buňkám HK-2 jsme do jamek cytopsinu napipetovali 150 μ l BSA (1%). Inkubace buněk s roztokem BSA probíhala 30 minut nebo 60 minut (37 °C, tma). Následně jsme blokační roztok odpipetovali a buňky jsme dvakrát promyli 200 μ l pufru DPBS.

4.5.2.6 Optimalizace vazby anti-BrdU protilátek

Zlomy na DNA jsme vizualizovali anti-BrdU protilátkami, klonem BU-1 značené Alexa Fluor 488. Anti-BrdU protilátky jsme naředili puftrem DPBS dle pokynů výrobce 1:20. Výsledné ředění protilátek u buněk bylo 1:500; 1:1000 a 1:2000. Buňky jsme s roztokem protilátek promíchali a poté jsme nechali buňky

inkubovat v časech 30, 60 minut a přes noc (37 °C, RT, tma). Po uplynutí inkubační doby byl roztok protilátek odpipetován a následně jsme buňky promyli 200 µl pufru DPBS.

4.5.3 Použití optimalizované TUNEL metody

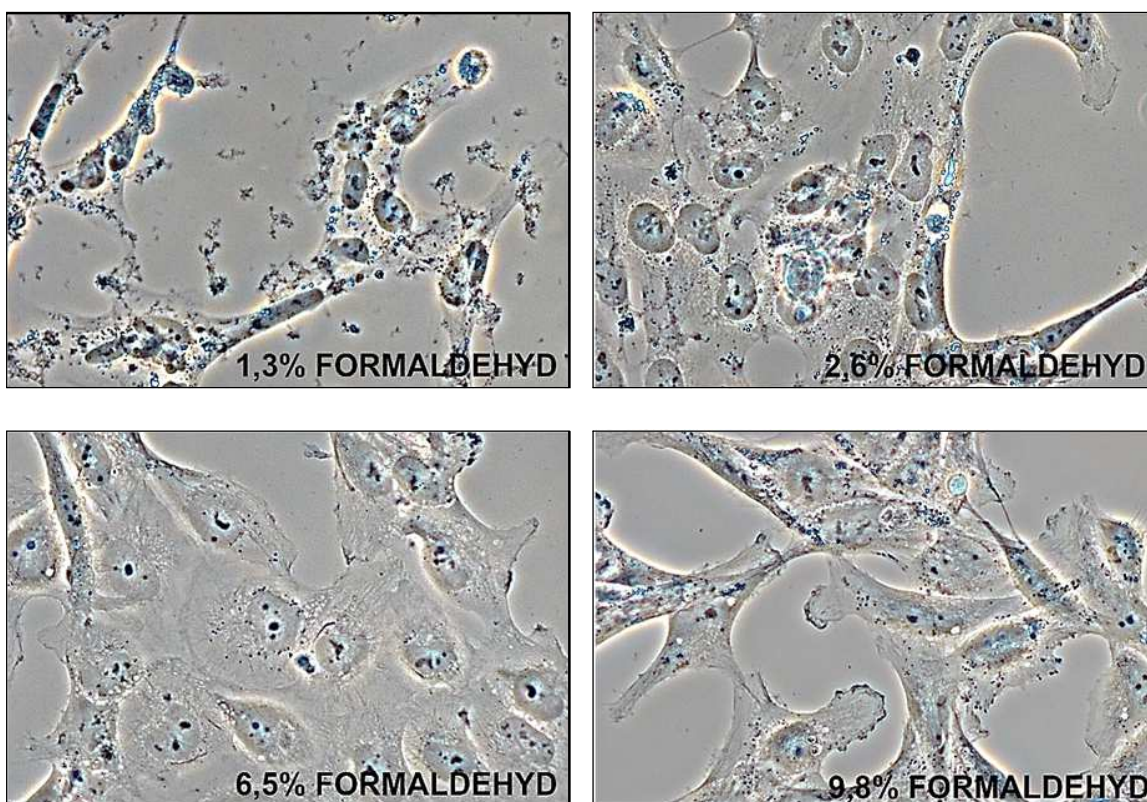
Metodu TUNEL jsme použili při analýze buněk renální linie HK-2 ovlivněné vybranými toxiny. Optimalizovanou metodu TUNEL jsme využili k detekci zlomů vznikajících v průběhu apoptózy u buněk ovlivněných cisplatinou (25 µM, 50 µM) po dobu 16, 20 a 24 hodin a kamptotecinem (2 µM, 10 µM) po dobu 24 a 48 hodin). K detekci zlomů DNA jsme také využili komerční kit (ThermoFisher, USA) pro srovnání s již zavedenou optimalizovanou metodou. Pro detekci fluorescence jsme použili fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i s filtrem FITC.

5. VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace postupu TUNEL metody

5.1.1 Optimalizace fixace buněk

Kontrolní buňky HK-2 jsme fixovali formaldehydem o koncentracích 1,3 %, 2,6 %, 6,5 %, 9,8 % (obr. 10). Pro experiment byl připraven cytospin s kontrolními buňkami a k buňkám jsme napipetovali formaldehyd o vybraných koncentracích. Jak je z výsledků patrné, u fixace nižšími koncentracemi formaldehydu (1,3 % a 2,6 %) (obr. 10) buňky nebyly zcela zafixované na podložním sklíčku. Použitím vyšších koncentrací formaldehydu (6,5 % a 9,8 %) došlo k dostatečnému zafixování buněk, jak lze opět vidět na obrázku 10. Proto jsme pro další práci použili koncentraci 9,8 % formaldehydu.



Obr. 10: Optimalizace fixace kontrolních buněk HK-2 s použitím formaldehydu; (400x); (fázový kontrast; inkubace buněk s formaldehydem 25 minut).

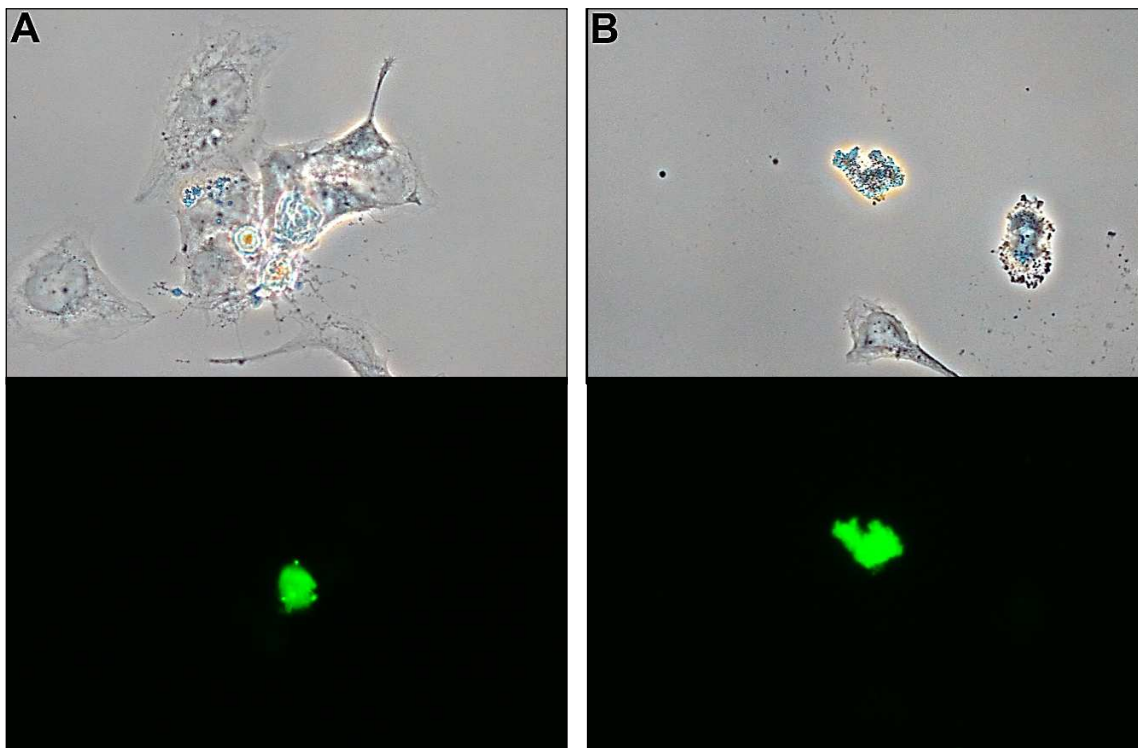
5.1.2 Optimalizace permeabilizace buněk

K HK-2 kontrolním buňkám a k buňkám ovlivněných cisplatinou (50 μ M; 24 hodin) jsme po předešlé fixaci buněk napipetovali permeabilizační činidlo Triton X-100 o koncentracích (0,2 % a 0,5 %). Inkubační doba buněk s permeabilizačním činidlem probíhala v časech 5 a 15 minut (RT). Mezi těmito dvěma koncentracemi (0,2 % a 0,5 %) Tritonu X-100 nebyl při jeho působení na buňky zjištěn viditelný rozdíl. Při dalších experimentech jsme pro permeabilizaci buněk používali 0,5% Triton X-100 po dobu 15 minut.

5.1.3 Optimalizace postupu značení zlomů DNA

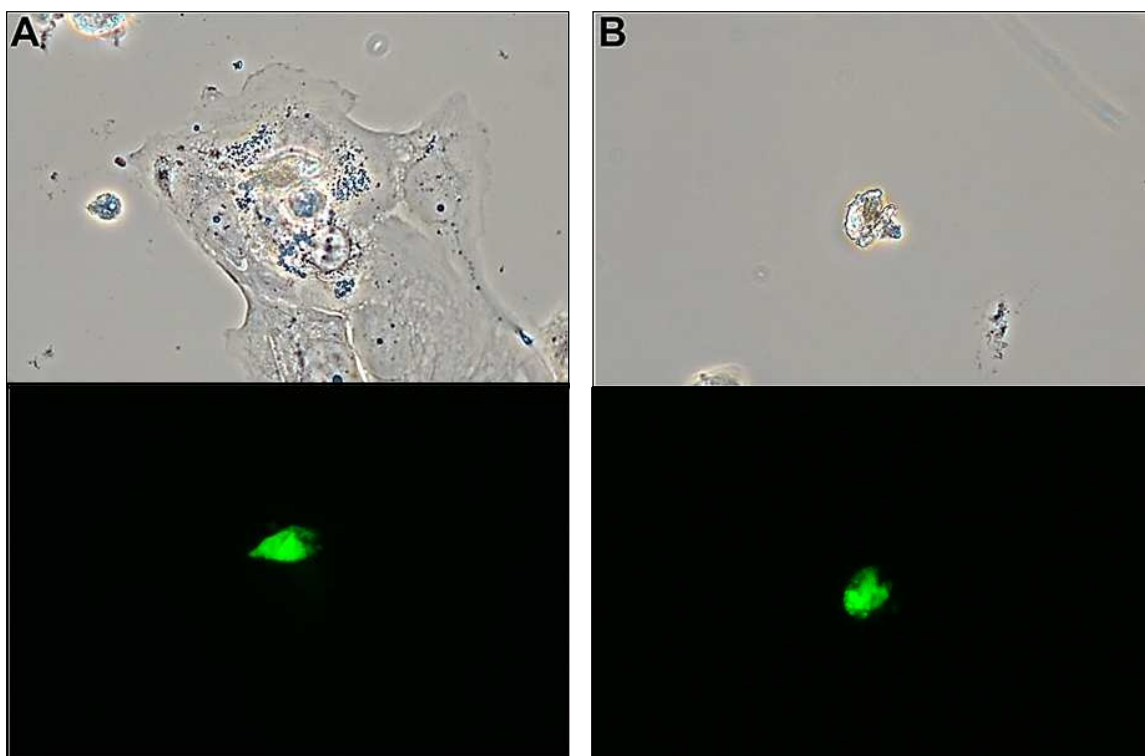
Fragmenty DNA u poškozených buněk byly označeny inkorporací BrdU za katalýzy specifickým enzymem TdT. K buňkám ovlivněným cisplatinou (50 μ M; 24 hodin) jsme po předešlé fixaci a permeabilizaci napipetovali reakční směs obsahující BrdU a TdT.

K buňkám jsme pipetovali BrdU o koncentracích 0,01 a 0,02 mM (obr. 11). Buňky ovlivněné cisplatinou (50 μ M) (obr. 11-A,B) poskytují pozitivní signál zelené fluorescence, což značí fragmentaci DNA při probíhající apoptóze. Při porovnání signálu zelené fluorescence u buněk ovlivněných cisplatinou, ke kterým byl přidán BrdU (0,01 mM) (obr. 11-A) a buněk s BrdU (0,02 mM) (obr. 11-B) nebyl zaznamenán zjevný rozdíl. V další práci jsme, proto používali 0,01 mM bromdeoxyuridin.



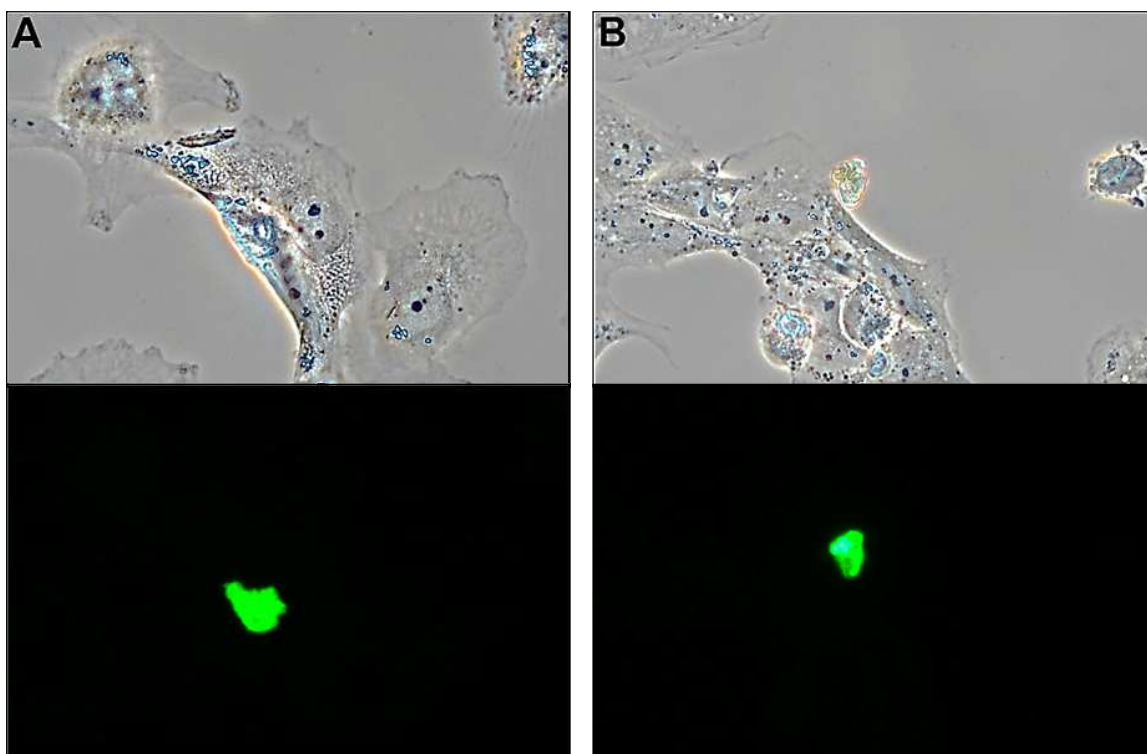
Obr. 11: Optimalizace značení zlomů DNA BrdU u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A,B – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm; A – inkubace buněk s BrdU (0,01 mM) 1,5 hodiny; B – inkubace buněk s BrdU (0,02 mM) 1,5 hodiny; A,B – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 24 hodin).

V rámci optimalizace postupu značení zlomů DNA jsme k HK-2 buňkám ovlivněným cisplatinou (50 μ M; 24 hodin) pipetovali enzym TdT, která byla 4x a 16x naředěna (obr. 12). Buňky jsme nechali inkubovat s enzymem 1,5 hodiny (37 °C). Z fluorescenčních snímků je patrné, že buňky ovlivněné 50 μ M cisplatinou (obr. 12-A,B) vykazují pozitivní signál zelené fluorescence. Proto je zřejmé, že buňky jeví známky poškození DNA. Buňky, které byly inkubovány s nižším ředěním TdT (4x) (obr. 12-A), podávají stejný pozitivní signál fluorescence jako buňky, které byly inkubovány s vyšším ředěním enzymu (16x) (obr. 12-B). Hlavním rozdílem je, že při použití ředění TdT (16x) se vyskytovalo méně pozitivních buněk než při použití ředění enzymu (4x). Proto jsme v dalších krocích provedení TUNEL metody použili TdT, která byla ředěna 4x.



Obr. 12: Optimalizace značení fragmentů DNA BrdU u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA) (400x); (A, B – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm; A – inkubace buněk s TdT (ředění 4x) 1,5 hodiny; B – inkubace buněk s TdT (ředění 16x) 1,5 hodiny; A, B – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 24 hodin).

V dalším optimalizačním kroku metody TUNEL jsme HK-2 buňky ovlivněné cisplatinou (50 μ M; 24 hodin) nechali inkubovat s reakční směsí (BrdU, TdT, reakční pufr – K_2HPO_4 , $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, DTT) 1,5 a 24 hodin (37 °C) (obr. 13). U buněk ovlivněných 50 μ M cisplatinou lze zaznamenat z obrázku 13-A,B zřetelnou zelenou fluorescenci, což svědčí o probíhající apoptóze buněk. Fluorescenční snímky dokazují, že vyšší doba inkubace 24 hodin buněk s reakční směsí nemá zásadní vliv na zvýšení intenzity fluorescence (obr. 13-B). Nižší testovaná doba inkubace 1,5 hodiny (obr. 13-A) vykazuje dostatečnou fluorescenci. Proto jsme jako optimální dobu inkubace pro náš experiment vybrali čas 1,5 hodiny.



Obr. 13: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A,B – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm; A – inkubace buněk s reakční směsí 1,5 hodiny; B – inkubace buněk s reakční směsí 24 hodin; A,B – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 24 hodin).

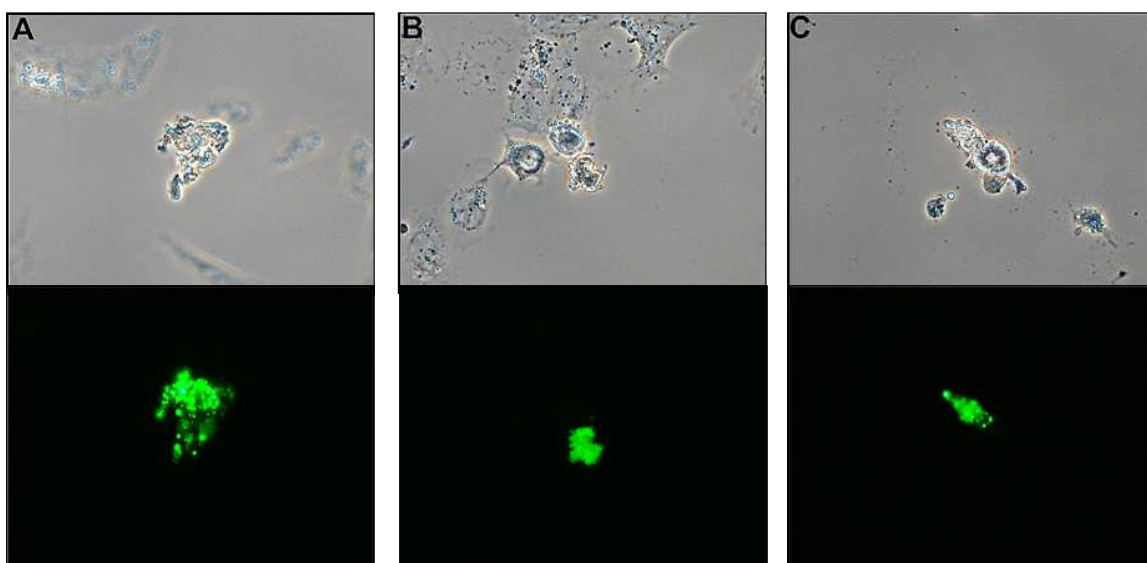
5.1.4 Optimalizace blokování nespecifických vazebných míst

Pro zablokování nespecifických vazebných míst pro protilátky jsme použili 1% roztok hovězího sérového albuminu, který jsme pipetovali k buňkám HK-2 ovlivněným cisplatinou (50 μ M; 24 hodin). Inkubace buněk s blokačním roztokem probíhala 30 a 60 minut (37 °C). Rozdíl ve fluorescenci mezi dvěma inkubačními dobami nebyl při detekci zlomů DNA zaznamenán. Proto jsme pro další práci použili BSA (1 %; 30 minut).

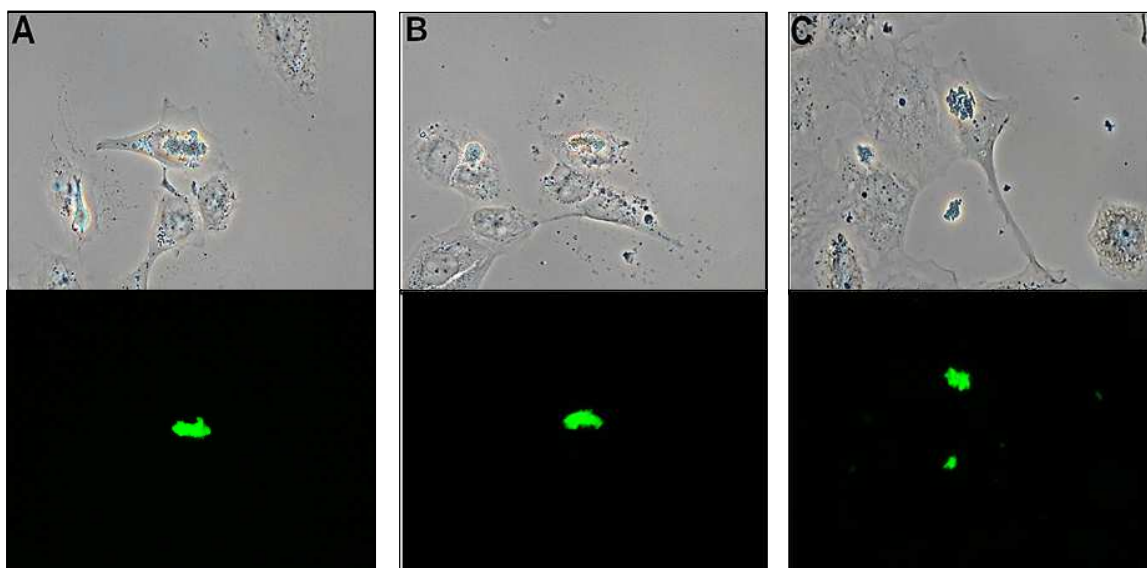
5.1.5 Optimalizace vazby anti-BrdU protilátek

V posledním kroku optimalizace metody TUNEL jsme optimalizovali navázání anti-BrdU protilátek na BrdU. K HK-2 buňkám ovlivněným cisplatinou (50 μ M; 24 hodin) jsme napipetovali roztok protilátek o ředěních (1:500, 1:1000, 1:2000) (obr. 14). Buňky jsme nechali inkubovat s roztokem protilátek v časech 30, 60 minut a 16

hodin (37 °C) (obr. 15). Buňky ovlivněné 50 μ M cisplatinou vykazovaly jasný pozitivní signál zelené fluorescence. Fluorescenční snímky ukazují, že mezi jednotlivými ředěními roztoku protilátek (1:500, 1:1000, 1:2000) (obr. 14-A,B,C) nebyla zaznamenána zřetelná změna ve fluorescenci. Z obrázku 15-A,B,C je patrné, že při inkubaci buněk s roztokem protilátek v inkubačních časech (30, 60 minut a 16 hodin) se pozitivní signál fluorescence zásadně nelišil. Při dalších experimentech jsme použili roztok anti-Brdu protilátek ředěný 1:2000 inkubovaný po 60 minut.



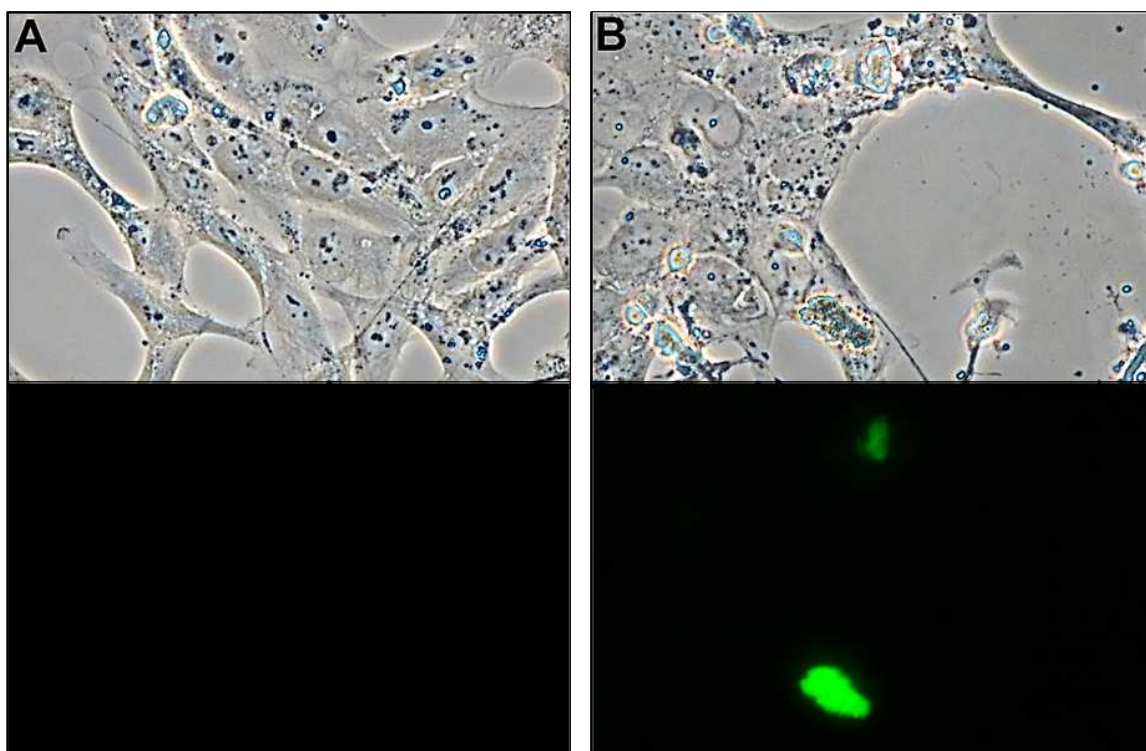
Obr. 14: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A, B, C – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm); (A – inkubace buněk s protilátkami (1:500); B – inkubace buněk s protilátkami (1:1000); C – inkubace buněk s protilátkami (1:2000; A, B, C inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 24 hodin).



Obr. 15: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A, B, C – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm); (A – inkubace buněk s protilátkami (1:2000) 30 minut; B – inkubace buněk s protilátkami (1:2000) 60 minut; C – inkubace buněk s protilátkami (1:2000) 16 hodin; inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 24 hodin).

5.1.6 Optimalizace postupu TUNEL metody

Metodu TUNEL jsme optimalizovali a zavedli na renální linii HK-2 buněk kontrolních a ovlivněných buněk 50 μ M cisplatinou po dobu 24 hodin. Výsledky jednotlivých kroků TUNEL metody jsou popsány v předešlých kapitolách. Po provedení celé metodiky TUNEL je z obrázku 15 patrné, že kontrolní buňky (obr. 16-A) nevykazují pozitivní signál zelené fluorescence. Proto je zřejmé, že buňky jsou viabilní a nepodstupují proces apoptózy. Naopak u buněk ovlivněných cisplatinou (50 μ M) (obr. 16-B) je jasně viditelná zelená fluorescence, což svědčí, že buňky jeví známky poškození DNA a procházejí procesem apoptózy.

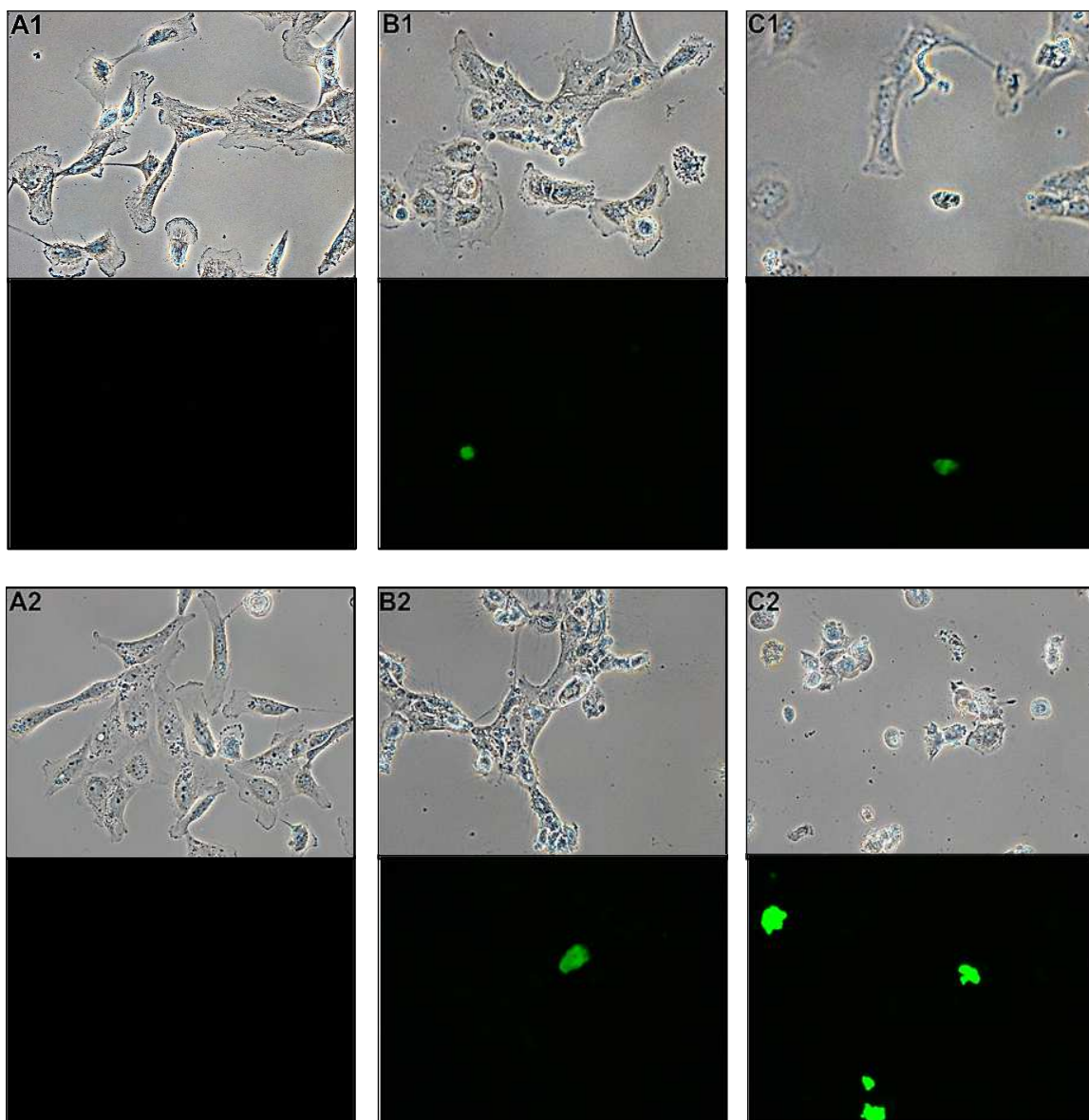


Obr. 16: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A,B – fázový kontrast; B,D – fluorescence 485/535 nm; A – kontrolní buňky; B – inkubace buněk s cisplatinou (50 μM) 24 hodin).

5.2 Aplikace TUNEL metody

5.2.1 Aplikace TUNEL metody – toxicita cisplatiny

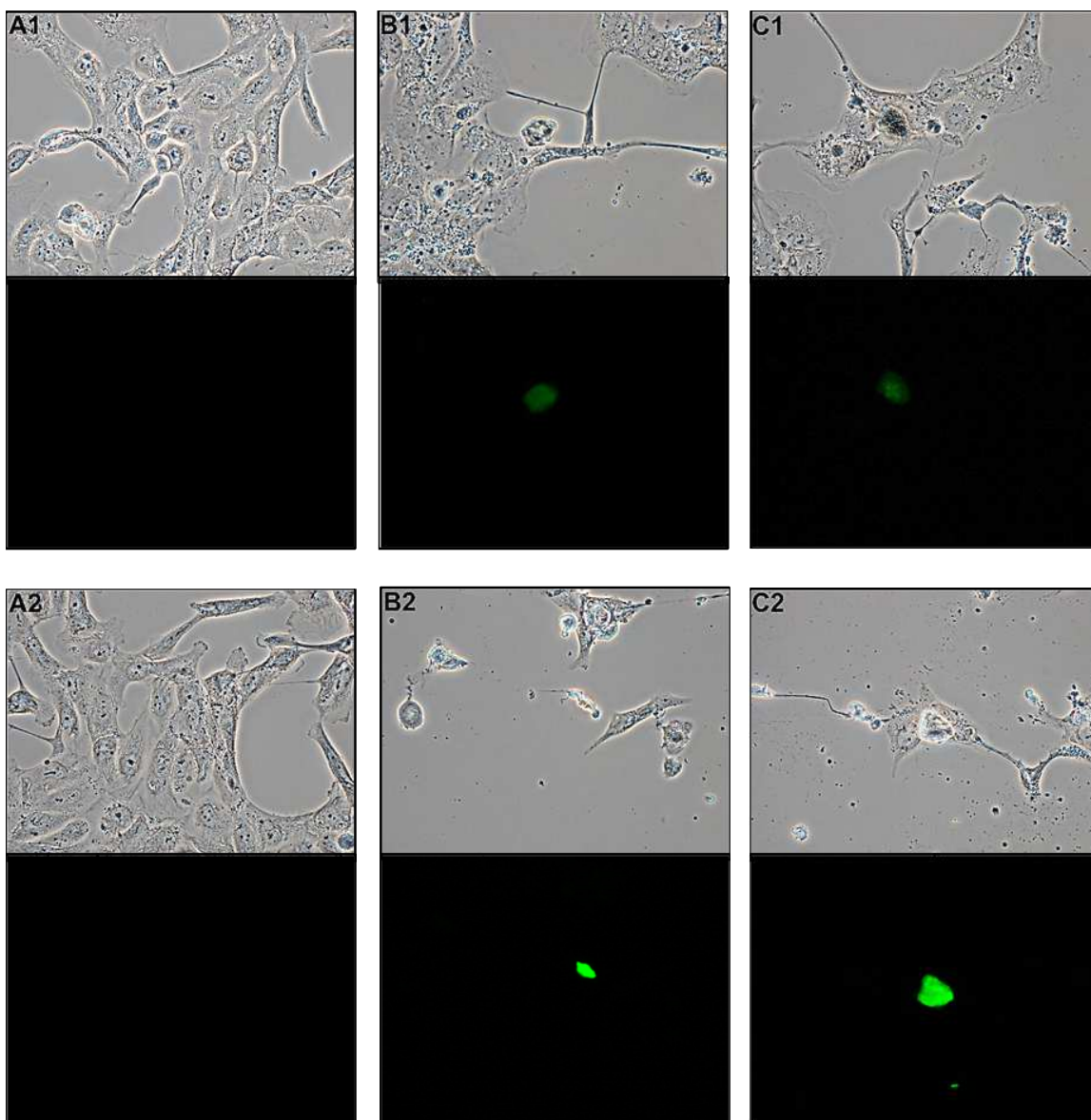
Optimalizovanou metodu TUNEL jsme použili u HK-2 kontrolní buněk a buněk ovlivněných cisplatinou o koncentracích (25 μM a 50 μM) v inkubačních časech 16 a 20 hodin (obr. 17). Jak je z obrázku 17 patrné, u kontrolních buněk (obr. 17-A1,A2) není viditelná zelená fluorescence, což značí, že buňky nemají poškozenou DNA. Buňky ovlivněné cisplatinou (25 μM a 50 μM) mají DNA poškozenou, protože z obrázku 17-B1,C1,B2,C2 lze zaznamenat pozitivní signál zelené fluorescence. Buňky ovlivněné 25 μM cisplatinou (obr. 17-B1,B2) vykazují stejný pozitivní signál fluorescence při obou časech inkubace 16 a 20 hodin. U buněk ovlivněných 50 μM cisplatinou lze z obrázku 17-C1,C2 vidět nárůst pozitivních buněk při 20hodinové inkubaci oproti inkubaci 16hodinové, kdy je vidět nižší počet buněk s pozitivním signálem zelené fluorescence.



Obr. 17: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A1-C2 – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm) (A1 – kontrolní buňky (16 hodin); A2– kontrolní buňky (20 hodin); B1 – inkubace buněk s cisplatinou (25 μ M) 16 hodin; C1 – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 16 hodin; B2 – inkubace buněk s cisplatinou (25 μ M) 20 hodin; C2 – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 20 hodin).

5.2.2 Aplikace TUNEL metody – toxicita kamptotecinu

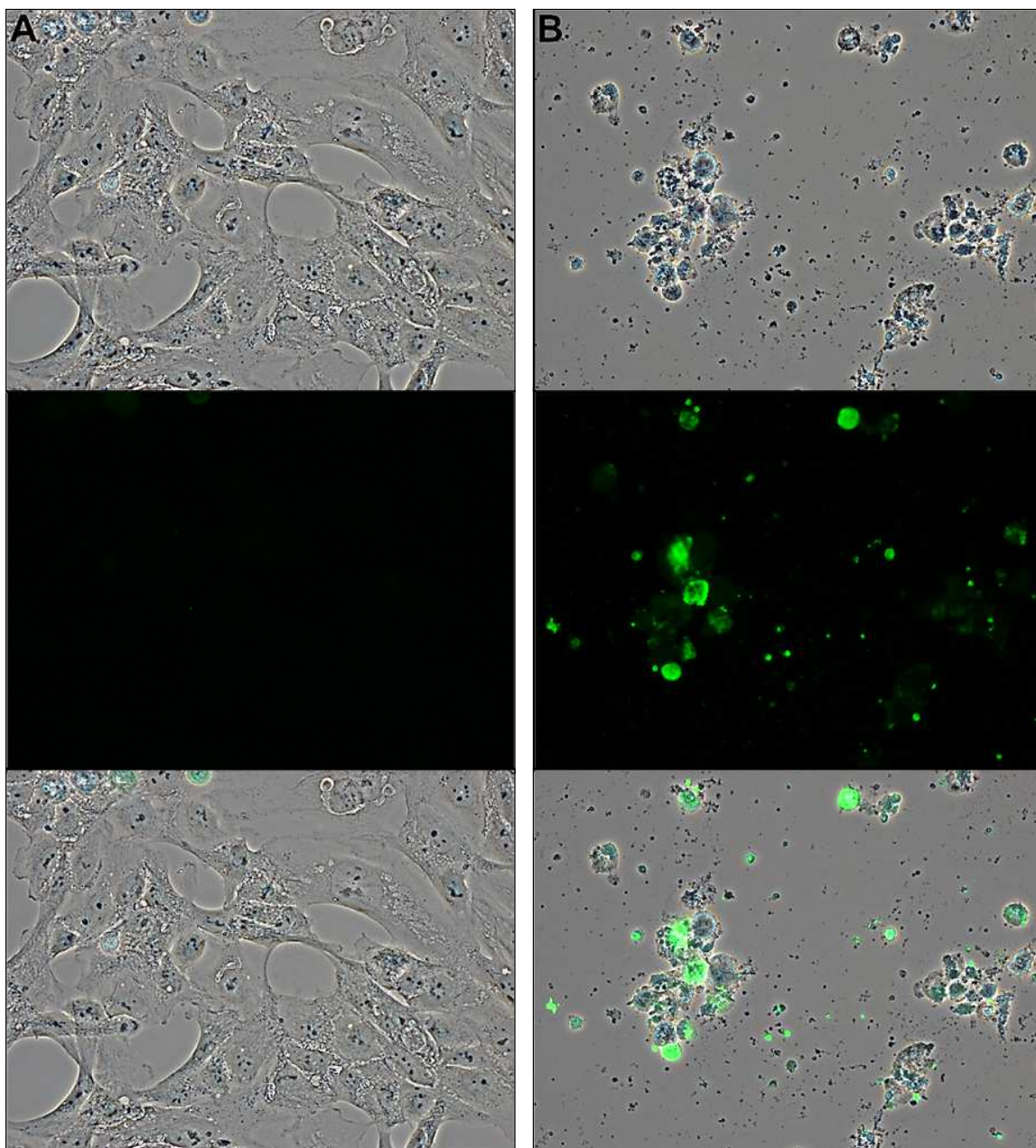
Zavedenou metodu TUNEL jsme aplikovali na HK-2 kontrolní buňky a buňky ovlivněné kamptotecinem o koncentracích (2 μM a 10 μM). Buňky jsme nechali inkubovat s kamptotecinem po dobu 24 a 48 hodin (obr. 18). Z fluorescenčních snímků je zřejmé, že kontrolní buňky (obr. 18-A1,A2) poskytují nulový fluorescenční signál, což svědčí, že buněčná DNA není fragmentovaná a buňky jsou viabilní. Buňky ovlivněné kamptotecinem (2 μM a 10 μM) (obr. 18-B1,C1,B2,C2) podávají pozitivní signál zelené fluorescence, proto je patrné, že se vyskytují četné zlomy na buněčné DNA a buňky procházejí procesem apoptózy. Obrázek 18-B1,C1 dokazuje, že buňky ovlivněné 2 μM a 10 μM kamptotecinem při inkubační době 24 hodin vykazují pozitivní signál ve stejné intenzitě zelené fluorescence. Zároveň lze z obrázku 18-B2,C2 zaznamenat, že účinky kamptotecinu o koncentracích (2 μM a 10 μM) po dobu 48 hodin jsou obdobné, protože takto ovlivněné buňky poskytují stejný pozitivní signál zelené fluorescence. Při 24hodinové inkubační době buněk s kamptotecinem buňky poskytují nižší intenzitu fluorescence než buňky ovlivněné kamptotecinem po dobu 48 hodin.



Obr. 18: Optimalizace značení zlomů DNA u buněk HK-2 metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A1-C1 – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm) (A1 – kontrolní buňky (24 hodin); A2 – kontrolní buňky (48 hodin); B1 – inkubace buněk s kamptotecinem (2 μ M) 24 hodin; C1 – inkubace buněk s kamptotecinem (10 μ M) 24 hodin; B2 – inkubace buněk s kamptotecinem (2 μ M) 48 hodin; C2 – inkubace buněk s kamptotecinem (10 μ M) 48 hodin).

5.3 Použití komerční metody TUNEL

Na závěr práce jsme pro detekci apoptózy u HK-2 kontrolních buněk a buněk ovlivněných cisplatinou (50 μ M; 48 hodin) (obr. 19) aplikovali komerční kit metody TUNEL. Metodika komerčního kitu spočívá na obdobném principu jako námi zavedená optimalizovaná metoda. Hlavním rozdílem je použití ethynyldeoxyuridinu namísto bromdeoxyuridinu a využití azidů označených Alexa Fluor 488 barvivem místo běžně používaných značených anti-BrdU protilátek. Jak je z obrázku 19-A patrné, kontrolní buňky poskytují nulový pozitivní signál zelené fluorescence, proto je zřejmé, že buňky jsou viabilní a nejeví známky poškození DNA. Také lze na obrázku 19-A vidět vysoký počet kontrolních buněk a správný tvar buněk. Naopak u buněk ovlivněných 50 μ M cisplatinou lze z obrázku 19-B zaznamenat redukováný počet buněk a změny ve tvaru buněk. U buněk ovlivněných cisplatinou (50 μ M) (obr. 19-B) je jasně viditelná zelená fluorescence u vysokého počtu buněk. Tyto buňky prochází procesem apoptózy a dochází u nich k fragmentaci DNA.



Obr. 19: Detekce zlomů DNA u HK-2 buněk metodou TUNEL; (zelená fluorescence – fragmentace DNA); (400x); (A,B – fázový kontrast; fluorescence 485/535 nm; spojení snímků fázového kontrastu a fluorescence pomocí funkce MERGE; A – kontrolní buňky; B – inkubace buněk s cisplatinou (50 μ M) 48 hodin).

6. DISKUZE

Základní funkční a stavební jednotkou živých organismů je buňka. Kromě existence, reprodukce a vykonávání svých funkcí buňky podléhají vlastnímu zániku. Jedním z programovaných zániku je apoptóza, která je nezbytnou součástí tkáňové homeostázy organismů. K zahájení vlastní eliminace buňka obdrží signál, buď z intracelulárního, nebo extracelulárního prostředí a dle vycházejících signálů lze rozlišit dvě hlavní dráhy procesu apoptózy. V průběhu apoptózy buňka prodělává řadu změn ve své morfolonii a zároveň dochází i k mnoha biochemickým změnám v aparátu buňky. Specifickými znaky apoptózy jsou smrštění buňky, *blebbing* membrány, tvorba apoptotických tělísek, fragmentace DNA a další. Apoptózu lze detekovat několika detekčními metodami fungujícími na různém principu a zaměřujícími se na identifikaci určitých morfologických a biochemických znaků procesu. Mezi vysoce účinné a senzitivní metody patří metoda TUNEL. TUNEL metoda detekuje fragmenty DNA v pozdní fázi apoptózy. Jednou z nejcitlivějších variant této metody je varianta TUNEL s bromdeoxyuridinem, který je začleňován terminální deoxynukleotidyltransferázou do fragmentované DNA. Fragmenty DNA jsou poté vizualizovány navázáním anti-BrdU protilátek konjugovaných s vybraným fluorochromem na BrdU. Do popředí se dostává moderní modifikace metody TUNEL s využitím ethynyldeoxyuridinu (*EdU*) a azidů konjugovaných s určitým fluorochromem (Darzynkiewicz et al., 2008; Elmore, 2007; Huerta et al., 2007; Salic, Mitchison, 2008).

Cílem naší diplomové práce bylo optimalizovat a zavést postup provedení metody TUNEL na renální linii HK-2 ovlivněné cisplatinou (50 μ M; 24 hodin). Zaváděli jsme variantu TUNEL metody s využitím BrdU a anti-BrdU protilátek konjugovaných s Alexa Fluor 488. Posléze jsme optimalizovanou metodu TUNEL aplikovali na HK-2 buňky, které jsme ovlivnili cisplatinou a kamptotecinem o vybraných koncentracích a při různých inkubačních časech. Na závěr práce jsme použili komerční metodu TUNEL s využitím EdU a azidů značených Alexa Fluor 488 na HK-2 buňkách ovlivněných cisplatinou. K detekci fragmentů DNA metodou

TUNEL jsme využili fluorescenční mikroskopii s použitím fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 80i.

Při optimalizaci jednotlivých kroků provedení metody TUNEL jsme vycházeli převážně ze zahraničních publikací Darzynkiewicz et al. (2008), Hanon et al. (1996). Nezbytnou součástí metody TUNEL je fixace buněk, proto jsme kontrolní buňky HK-2 fixovali formaldehydem o koncentracích 4 %, 8 %, 20 % a 30 % po dobu 25 minut (4 °C). Roztok formaldehydu jsme napipetovali do média, tudíž výsledné koncentrace u buněk byly 1,3 %, 2,6 %, 6,5 % a 9,8 % formaldehydu. Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu je patrné, že 1,3% a 2,6% formaldehyd buňky fixuje nedostatečně. Při použití 6,5% a 9,8% formaldehydu lze ze snímků zaznamenat buňky zcela zafixované. Jiní autoři zahraničních prací například Loo (2002) používal jako fixativum 2% formaldehyd nebo Knutson et al. (2012) používali 4% formaldehyd k fixaci buněk. V naší práci jsme jako optimální použili 30% formaldehyd, který jsme napipetovali do média a výsledná koncentrace u buněk byla 9,8 % formaldehydu. Vyšší koncentraci formaldehydu jsme použili, protože jsme formaldehyd přidávali do média, které jsme neodpipetovali z důvodu ztráty buněk.

K optimalizaci permeabilizace HK-2 buněk jsme použili 0,2% a 0,5% Triton X-100 po dobu 5 a 15 minut (RT). Mezi použitými koncentracemi 0,2 % a 0,5 % Tritonu X-100 a mezi vybranými inkubačními časy 5 a 15 minut nebyl zjevný rozdíl. V publikaci Li et al. (1996) aplikovali 0,1% Triton X-100 na buňky a v publikaci Darzynkiewicz et al. (2011) použili také koncentraci 0,5 % Tritonu X-100 pro permeabilizaci buněk. Pro náš experiment jsme jako vhodnou koncentraci použili 0,5 % Tritonu X-100 po dobu 15 minut.

V dalším kroku metodiky TUNEL jsme optimalizovali postup značení zlomů DNA. Bromdeoxyuridin jsme pipetovali k buňkám o koncentracích 0,01 mM a 0,02 mM. Při porovnání pozitivního signálu fluorescence buněk mezi dvěma koncentracemi (0,01 a 0,02 mM) BrdU nebyla patrná viditelná změna. Proto jsme stejně tak, jako v zahraniční literatuře Moran et al. (1985) použili 0,01 mM bromdeoxyuridin. Terminální deoxynukleotidyltransferázu jsme naředili 4x a 16x a napipetovali k buňkám. Z fluorescenčních snímků jsme nezaznamenali zjevný rozdíl mezi signálem fluorescence u obou ředění enzymu (4x a 16x). Zásadní změna

byla v počtu buněk s pozitivní signálem fluorescence, kdy byl nižší počet pozitivních buněk při použití ředění TdT (16x) než při použití ředění TdT (4x). V diplomové práci jsme, proto jako optimální použili TdT 4x naředěnou. V rámci optimalizace jsme buňky nechali inkubovat s reakční směsí 1,5 a 24 hodin (37 °C). Fluorescenční snímky dokazují, že 1,5-hodinová inkubace je dostačující pro inkorporaci BrdU do fragmentované DNA pomocí TdT. Oproti našim výstupům například autoři Tuschi et al. (2002) inkubovali hepatomové buňky HepG2 s reakční směsí 3 hodiny, nebo autoři Todryk et al. (2001) nechali inkubovat buňky kolorektálního karcinomu CMT93 s reakční směsí 1 hodinu (37 °C). My jsme jako optimální při našem experimentu vybrali 1,5hodinovou inkubaci.

K denuraci DNA HK-2 buněk jsme použili 2 M kyselinu chlorovodíkovou (10 minut; 37 °C). V publikaci Hanon et al. (1996) použili k denuraci DNA buněk také HCl (2 M) po dobu 30 minut. V našem experimentu jsme k denuraci DNA použili HCl (2 M; 10 minut). Oproti zahraniční literatuře jsme zkrátili inkubační dobu, ale naopak jsme zvýšili teplotu, proto došlo k dostatečné denuraci buněčné DNA.

Pro zablokování nescifických míst pro vazbu anti-BrdU protilátek jsme v rámci optimalizace napipetovali k HK-2 buňkám 1% roztok hovězího sérového albuminu po dobu 30 a 60 minut (37 °C). Buňky vykazovaly po aplikaci BSA (1 %) stejný pozitivní signál fluorescence při obou časech 30 a 60 minut. Proto jsme v naší práci použili BSA (1 %; 30 minut). Stejně podmínky pro zablokování nescifických míst pro protilátky potvrzuje zahraniční práce autorů Li et al. (1996).

V poslední části metodiky TUNEL jsme optimalizovali navázání anti-BrdU protilátek na BrdU. V naší práci jsme použili anti-BrdU protilátky (klon BU-1) konjugované s Alexa Fluor 488 a naředěné 1:500, 1:1000, 1:2000 v časech 30, 60 minut a 16 hodin (37 °C). Z fluorescenčních snímků není patrná výrazná změna ve fluorescenci mezi vybranými ředěními protilátek (1:500, 1:1000, 1:2000). Také pozitivní signál fluorescence se zásadně nelišil při inkubačních časech 30, 60 minut a 16 hodin. V publikaci Sun et al. (2011) použili stejný klon protilátek a protilátky ředili 1:1000. My jsme v našem experimentu jako nejvhodnější vybrali roztok protilátek (1:2000; 60 minut).

Při optimalizaci postupu TUNEL metody lze z fluorescenčních snímků u HK-2 kontrolních buněk zaznamenat nulový signál zelené fluorescence, což značí, že jsou buňky viabilní. U buněk ovlivněných (50 μM ; 24 hodin) je patrný jasný pozitivní signál zelené fluorescence, proto je zřejmé, že buňky procházejí procesem apoptózy. Zahraniční publikace ostatních autorů poskytují obdobné výsledky. Hlavním rozdílem je, že v jejich pracích se vyskytuje vyšší počet buněk vykazující pozitivní signál zelené fluorescence než v naší práci. Tato odchylka je pravděpodobně způsobena vyšší citlivostí jejich metody TUNEL oproti naší metodě.

V další části naší práce jsme optimalizovanou TUNEL metodu aplikovali na HK-2 kontrolní buňky a buňky ovlivněné cisplatinou (25 μM a 50 μM) po dobu 16 a 20 hodin. U kontrolních buněk není patrná žádná fluorescence, protože nedošlo k fragmentaci jejich DNA. Buňky ovlivněné cisplatinou (25 μM a 50 μM) vykazují pozitivní signál fluorescence, což svědčí o probíhající apoptóze. Z fluorescenčních snímků lze zaznamenat, že buňky ovlivněné 25 μM cisplatinou v obou časech 16 a 20 hodin poskytují stejný pozitivní signál fluorescence. U buněk ovlivněných 50 μM cisplatinou je zřetelný nárůst buněk s pozitivním signálem v delším inkubačním čase 20 hodin. Ze snímků fázového kontrastu lze zaznamenat u buněk ovlivněných cisplatinou redukovaný počet oproti kontrolním buňkám. Naše výsledky korelují s výsledky práce Choi et al. 2015, kde prokázali pomocí jiných metod, že cisplatin je vhodný induktor apoptózy u HK-2 buněk.

Následně jsme optimalizovanou TUNEL metodu použili na detekci apoptózy u kontrolních buněk HK-2 a buněk ovlivněných kamptotecinem (2 μM a 10 μM) po dobu 24 a 48 hodin. Ze snímků z fluorescenčního mikroskopu se kontrolní buňky jeví viabilně, protože neposkytují pozitivní signál fluorescence. Naopak u buněk ovlivněných kamptotecinem (2 μM a 10 μM) je zjevná zelená fluorescence, což značí probíhající apoptózu u buněk. Při 24hodinové inkubaci buňky vykazují nižší intenzitu fluorescence oproti buňkám při 48hodinové inkubaci, kdy jsme zaznamenali vyšší intenzitu fluorescence. Počet buněk ovlivněných kamptotecinem je výrazně nižší, než je počet kontrolních buněk. V naší práci jsme potvrdili, že kamptotecin dostatečně indukuje apoptózu HK-2 buněk stejně jako v zahraniční práci autorů Li et al. (2016).

Na závěr práce jsme aplikovali komerční kit metody TUNEL na HK-2 kontrolní buňky a buňky ovlivněné cisplatinou (50 μ M; 48 hodin). Princip metody komerčního kitu se podobá principu naší optimalizované metodě TUNEL. Tato moderní metoda TUNEL využívá EdU namísto BrdU a místo protilátek jsou zde použity azidy značené Alexa Fluor 488. Fluorescenční snímky dokazují, že kontrolní buňky nejeví známky poškození DNA, proto u nich není patrný signál fluorescence. Buňky ovlivněné 50 μ M cisplatinou poskytují jasně viditelnou fluorescenci, což svědčí o probíhající apoptóze. Naše výsledky korelují s publikacemi ze zahraničí. Komerční metoda TUNEL je senzitivnější než námi zavedená metoda v této diplomové práci, protože při použití komerčního kitu se na fluorescenčních snímcích vyskytuje mnohem více buněk a fragmentů buněk s pozitivním signálem oproti výsledkům naší metody, kde byl výskyt pozitivních buněk nižší. Varianta metody TUNEL s EdU je senzitivnější pravděpodobně díky malé velikosti azidů, které se mohou snadno a rychle dostat k začleněnému EdU na DNA oproti protilátkám a díky vytvoření pevné kovalentní vazby mezi EdU a azidy (Salic, Mitchison, 2007). Výhodami použití komerční metody je menší časová náročnost a vysoká citlivost a nevýhodou je finanční náročnost oproti naší zavedené metodě.

7. ZÁVĚR

V naší práci jsme zavedli použití TUNEL metody na linii renálních HK-2 buněk ovlivněných cisplatinou pomocí fluorescenční mikroskopie. Zavedenou TUNEL metodu jsme aplikovali na HK-2 buňky ovlivněné cisplatinou a kamptotecinem. Na základě fluorescenčních snímků jsme prokázali fragmentaci DNA buněk při probíhající apoptóze po ovlivnění buněk cisplatinou a kamptotecinem. Na závěr práce jsme použili komerční TUNEL metodu na buněčné linii HK-2 buněk ovlivněných cisplatinou a porovnali jsme výsledky se zavedenou metodou pomocí fluorescenční mikroskopie. Při srovnání výsledků komerční TUNEL metody a zavedené TUNEL metody jsme zjistili, že komerční metoda je více senzitivní než zavedená metoda.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Abud H. E.: Shaping developing tissues by apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2004, 11, p. 797.
2. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A. et al.: *Essential cell biology*. Garland Science, 2014, 4, p. 15-23, 604-607, ISBN 978-0-8153-4454-4.
3. Archana M., Yogesh T. L., Kumaraswamy K. L.: Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. *Indian Journal of Cancer*, 2013, 50, p. 274.
4. Banfalvi G.: Mille modis morimur: We die in a thousand ways. *Apoptosis*, 2017, 22, p. 169-174.
5. Bauer S., Patterson P. H.: The cell cycle–apoptosis connection revisited in the adult brain. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 171, p. 641-650.
6. Becila S., Herrera-Mendez C. H., Coulis G., Labas R. et al.: Postmortem muscle cells die through apoptosis. *European Food Research and Technology*, 2010, 231, p. 485-493.
7. Birkinshaw R. W., Czabotar P. E.: The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017, p. 1-11.
8. Bouchier-Hayes L., Muñoz-Pinedo C., Connell S., Green D. R.: Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods*, 2008, 44, p. 222-228.
9. Buck S. B., Bradford J., Gee K. R., Agnew B. J. et al.: Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques*, 2008, 44, p. 927-929.
10. Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivao I. et al.: The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 2008, 23, p. 143-151.
11. Darzynkiewicz Z., Galkowski D., Zhao H.: Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 2008, 44, p. 250-254.
12. Darzynkiewicz Z., Zhao H.: Detection of DNA strand breaks in apoptotic cells by flow-and image-cytometry. In *DNA damage detection *in situ*, *ex vivo*, and *in vivo**. Humana Press, Totowa, 2011, p. 91-101.

13. Doonan F., Cotter T. G.: Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 2008, 44, p. 200-204.
14. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H. U., Kimchi A.: Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death and Differentiation*, 2009, 16, p. 966.
15. Elmore S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35, p. 495-516.
16. Fan T. J., Han L. H., Cong R. S., Liang J.: Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2005, 37, p. 719-727.
17. Festjens N., Berghe T. V., Vandenaabeele P.: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2006, 1757, p. 1371-1387.
18. Ficková M., Nagy, M.: Apoptóza – Programovaná bunková smrť a rastlinné metabolismy. *Chemické Listy*, 2007, 101, p. 131-137.
19. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 1992, 119, p. 493-501.
20. Gurtu V., Kain S. R., Zhang G.: Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry*, 1997, 251, p. 98-102.
21. Hanon E., Vanderplasschen A., Pastoret P. P.: The use of flow cytometry for concomitant detection of apoptosis and cell cycle analysis. *Biochemica*, 1996, 2, p. 25-27.
22. Hart S. P., Dransfield I., Rossi A. G.: Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*, 2008, 44, p. 280-285.
23. Heibein J. A., Goping S., Barry M., Pinkoski, M. J. et al.: Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192, p. 1391-1402.

24. Huang X., Halicka H. D., Traganos F., Tanaka T. et al.: Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Proliferation*, 2005, 38, p. 223-243.
25. Huerta S., Goulet E. J., Huerta-Yepez S., Livingston E. H.: Screening and detection of apoptosis. *Journal of surgical Research*, 2007, 139, p. 143-156.
26. Hughes D., Mehmet H.: *Cell proliferation and apoptosis*. Garland Science, 2005, p. 26, ISBN 0-203-49586-1.
27. Choi Y. M., Kim H. K., Shim W., Anwar M. A. et al.: Mechanism of cisplatin-induced cytotoxicity is correlated to impaired metabolism due to mitochondrial ROS generation. *PLoS One*, 2015, 10, p. 1-21.
28. Jacobson M. D., Weil M., Raff M. C.: Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, 88, p. 347-354.
29. Jeggo P. A., Löbrich M.: DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene*, 2007, 26, 7717-7719.
30. Kaufmann S. H., Lee S. H., Meng X. W., Loegering D. A. et al.: Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*, 2008, 44, p. 262-272.
31. Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 1972, 26, p. 239.
32. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H. C., Jeffers J. R. et al.: Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nature Cell Biology*, 2006, 8, p. 1348-1358.
33. Kitazumi I., Tsukahara M.: Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. *The FEBS Journal*, 2011, 278, p. 427-441.
34. Knutson A. K., Welsh J., Taylor T., Roy S. et al.: Comparative effects of histone deacetylase inhibitors on p53 target gene expression, cell cycle and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 2012, 27, p. 849-853.
35. Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P. H. et al.: Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276, p. 20633-20640.

36. Kruman I. I., Wersto R. P., Cardozo-Pelaez F., Smilenov L. et al.: Cell cycle activation linked to neuronal cell death initiated by DNA damage. *Neuron*, 2004, 41, p. 549-561.
37. Krysko D. V., Berghe T. V., D'Herde K., Vandenabeele P.: Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 2008, 44, p. 205-221.
38. Kurosaka K., Takahashi M., Watanabe N., Kobayashi Y.: Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology*, 2003, 171, p. 4672-4679.
39. Kyrylkova K., Kyryachenko S., Leid M., Kioussi C.: Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis: Methods and Protocols*, 2012, p. 41-47.
40. Lakowicz J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013, p. 6-8, ISBN 978-0387-31278-1.
41. Lazarou M., Stojanovski D., Frazier A. E., Kotevski A. et al.: Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285, p. 36876-36883.
42. Li X., Darzynkiewicz Z.: Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Proliferation*, 1995, 28, p. 571-579.
43. Li X., Melamed M. R., Darzynkiewicz Z.: Detection of apoptosis and DNA replication by differential labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. *Experimental Cell Research*, 1996, 222, p. 28-37.
44. Li S., Zhao J., Huang R., Steiner T. et al.: Development and application of human renal proximal tubule epithelial cells for assessment of compound toxicity. *Current Chemical Genomics and Translational Medicine*, 2017, 11, p. 19.
45. Liao W., McNutt M. A., Zhu W. G.: The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 2009, 48, p. 46-53.
46. Lieber M. R.: The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 2010, 79, p. 181-211.

47. Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J.: The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, 104, p. 487-501.
48. Loo D. T.: TUNEL assay. *In Situ Detection of DNA Damage*. Humana Press, 2002, p. 21-30.
49. Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J.: Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 2005, 22, p. 355-370.
50. Mehta A., Haber J. E.: Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6, p. 1-17.
51. Moran R., Darzynkiewicz Z., Staiano-Coico L., Melamed M. R.: Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1985, 33, p. 821-827.
52. Negritto C.: Repairing double-strand DNA breaks. *Nature Education*, 2010, 3, p. 26.
53. Nicholson D. W.: Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 1999, 6, p. 1028-1042.
54. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N.: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013, 1833, p. 3448-3459.
55. Ola M. S., Nawaz M., Ahsan H.: Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011, 351, p. 41-58.
56. Ondroušková E., Vojtěšek B.: Programovaná buněčná smrt v nádorových buňkách. *Klinická Onkologie*, 2014, 27, p. 1-8.
57. Otsuki Y., Li Z., Shibata M. A.: Apoptotic detection methods—from morphology to gene. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2003, 38, p. 275-339.
58. Perelman A., Wachtel C., Cohen M., Haupt S. et al.: JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death & Disease*, 2012, 3, p. 430.

59. Perry S. W., Norman J. P., Barbieri J., Brown E. B. et al: Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, 2011, 50, p. 98.
60. Pietkiewicz S., Schmidt J. H., Lavrik I. N.: Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *Journal of Immunological Methods*, 2015, 423, p. 99-103.
61. Reed J. C.: Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 2008, 111, p. 3322-3330.
62. Renehan A. G., Booth C., Potten C. S.: What is apoptosis, and why is it important? *British Medical Journal*, 2001, 322, p. 1536.
63. Robertson J. D., Orrenius S., Zhivotovsky B.: Nuclear events in apoptosis. *Journal of Structural Biology*, 2000, 129, p. 346-358.
64. Ruchaud S., Korfali N., Villa P., Kottke T. J. et al.: Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *The EMBO Journal*, 2002, 21, p. 1967-1977.
65. Saadat Y. R., Saeidi N., Vahed S. Z., Barzegari A. et al.: An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *BiolImpacts: BI*, 2015, 5, p. 25.
66. Salic A., Mitchison T. J.: A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105, p. 2415-2420.
67. Sebbagh M., Renvoizé C., Hamelin J., Riché N. et al.: Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nature Cell Biology*, 2001, 3, p. 1-7.
68. Segawa K., Nagata S.: An apoptotic 'eat me'signal: phosphatidylserine exposure. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25, p. 639-650.
69. Shaker G. H., Melake N. A.: Use of the single cell gel electrophoresis (comet assay) for comparing apoptotic effect of conventional antibodies versus nanobodies. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2012, 20, p. 221-227.
70. Shakeri R., Kheirollahi A., Davoodi J.: Apaf-1: regulation and function in cell death. *Biochimie*, 2017, p. 1-15.

71. Sinha K., Das J., Pal P. B., Sil P. C.: Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 2013, 87, p. 1157-1180.
72. Sun Y., Fujigaki Y., Sakakima M., Fujikura T. et al.: Acquired resistance to rechallenge injury in rats that recovered from mild renal damage induced by uranyl acetate: accelerated proliferation and hepatocyte growth factor/c-Met axis. *Clinical and Experimental Nephrology*, 2011, 15, p. 666.
73. Sundquist T., Moravec R., Niles A., O'Brien M. et al.: Timing your apoptosis assays. *Cell Notes*, 2006, 16, p. 18-21.
74. Taylor R. C., Cullen S. P., Martin S. J.: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9, p. 231-241.
75. Tixeira R., Caruso S., Paone S., Baxter A. A. et al: Defining the morphologic features and products of cell disassembly during apoptosis. *Apoptosis*, 2017, 22, p. 475-477.
76. Todryk S., Melcher A., Bottley G., Gough, M.: Cell death associated with genetic prodrug activation therapy of colorectal cancer. *Cancer Letters*, 2001, 174, p. 25-33.
77. Tourneur L., Chiocchia G.: FADD: a regulator of life and death. *Trends in Immunology*, 2010, 31, p. 260-269.
78. Tuschl H., Schwab C.: Cytotoxic effects of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41, p. 385-393.
79. Vela L., Gonzalo O., Naval J., Marzo I.: Direct interaction of Bax and Bak proteins with Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins in living cells revealed by fluorescence complementation. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, p. 4935-4946.
80. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243, p. 167-190.
81. Vilenchik M. M., Knudson A. G.: Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, p. 12871-12876.

82. Watanabe M., Hitomi M., Van der Wee K., Rothenberg F. et al.: The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microscopy and Microanalysis*, 2002, 8, p. 375-391.
83. Westphal D., Dewson G., Czabotar P. E., Kluck, R. M.: Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011, 1813, p. 521-531.
84. Wijsman J. H., Jonker, R. R., Keijzer R., Van de Velde et al.: A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1993, 41, p. 7-12.
85. Willingham M. C.: Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999, 47, p. 1101-1109.
86. Willis S. N., Chen L., Dewson G., Wei A. et al.: Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & Development*, 2005, 19, p. 1294-1305.
87. Wong R. S.: Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011, 30, p. 87.
88. Yousif L. F., Stewart K. M., Kelley S. O.: Targeting Mitochondria with Organelle-Specific Compounds: Strategies and Applications. *ChemBioChem*, 2009, 10, p. 1939-1950.
89. Zeiss C. J.: The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 2003, 40, p. 481-495.