

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**CHARAKTERIZACE NUKLEÁRNÍ KONDENZACE  
A FRAGMENTACE U MODELOVÉHO POŠKOZENÍ BUNĚK**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Karolína Kynclová  
**VEDOUcí PRÁCE:** Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.  
**KONZULTANT:** Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2023

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

**CHARACTERIZATION OF NUCLEAR CONDENSATION  
AND FRAGMENTATION IN MODEL CELL DAMAGE**

DIPLOMA THESIS

**AUTHOR:** Bc. Karolína Kynclová  
**SUPERVISOR:** Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.  
**CONSULTANT:** Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2023

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Karolína Kynclová**  
Osobní číslo: **C21455**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Charakterizace nukleární kondenzace a fragmentace u modelového poškození buněk**  
Téma práce anglicky: **Characterization Of Nuclear Condensation And Fragmentation In Model Cell Damage**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

# Zásady pro vypracování

## Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerži zaměřenou na popis signálních drah a fází apoptózy, s důrazem na efektorovou fázi apoptózy a nukleární změny v buňce. Dále charakterizujte toxicitu vybraných látek *in vitro*. Studujte zejména mechanismy buněčného poškození po inkubaci buněk s cisplatinou, kamptotecinem a staurosporinem.
2. V rámci teoretické části dále popište metody využívané při studiu nukleární kondenzace a fragmentace, se zaměřením na moderní fluorescenční techniky. Uvedte přehled fluorescenčních sond využívaných k barvení buněčných jader. Popište také některé testy využívané ke stanovení metabolické aktivity buněk (např. stanovení dehydrogenázové aktivity, apod.) a uvedte některé suspenzní buněčné linie využívané pro *in vitro* experimenty.

## Experimentální část:

1. V rámci praktické části se zaměřte na sledování nukleární kondenzace a fragmentace, která bude indukována působením modelových toxinů (např. cisplatinou, staurosporinem, atd.) v suspenzních buňkách. Nejprve zhodnoťte stav buněk pomocí biochemických testů (WST-1 a MCB). Detekci nukleárních změn poté proveďte pomocí spektrofluorimetrické metody Hoechst 33258. Pro použití této metody při detekci nukleární kondenzace a fragmentace v suspenzních buňkách je třeba jednotlivé kroky stanovení optimalizovat (např. množství buněk, vliv míchání, apod.), což bude také náplní této diplomové práce.
2. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické databáze  
(*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem Charakterizace nukleární kondenzace a fragmentace u modelového poškození buněk 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3.5. 2023

Bc. Karolína Kynclová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí této diplomové práce Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. za odborné vedení práce, nesmírnou trpělivost, ochotu kdykoli poradit a vytvoření přátelského pracovního prostředí, které mi psaní práce velmi usnadnilo a zpříjemnilo. Dále bych také chtěla poděkovat doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za příležitost psaní diplomové práce ve výzkumné skupině buněčné biologie, Mgr. Lence Tiché za odpověď na každý dotaz, který jsem si po večerech vymyslela, a nakonec své rodině a přátelům za to, že se se mnou stále kamarádí.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá detekcí nukleárních změn, které se objevují v průběhu apoptotického procesu. Teoretická část se věnuje popisu mechanismu apoptotické buněčné smrti s důrazem na jaderné změny, dále jsou zde popsány fluorescenční metody a fluorescenční sondy používané k detekci těchto jaderných změn. V závěru se teoretická část zabývá suspenzními buněčnými liniemi.

Experimentální část je zaměřena na detekci nukleární kondenzace a fragmentace pomocí kvantitativní spektrofluorimetrické metody Hoechst 33258 a především na její optimalizaci pro suspenzní buňky. Pro optimalizaci jsme zvolili buněčnou linii Jurkat, kterou jsme inkubovali s induktory apoptózy – cisplatinou, kamptotecinem a staurosporinem. Ke zhodnocení cytotoxicity vybraných toxinů jsme nejprve použili testy pro stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz a intracelulární hladiny glutathionu. Následně jsme detekovali nukleární kondenzaci a fragmentaci metodou Hoechst 33258 a provedli optimalizaci parametrů měření pro suspenzní buňky. Výsledky jsou shrnuty a diskutovány v závěru práce.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Apoptóza, fluorescenční metody, detekce nukleární kondenzace a fragmentace, Hoechst 33258, suspenzní buněčné linie.



## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with the detection of nuclear changes that appear during the apoptotic process. The theoretical part is dedicated to description of the mechanism of apoptotic cell death with an emphasis on nuclear changes, and the fluorescence methods and fluorescent probes used to detect these nuclear changes are also described. Finally, the theoretical part deals with suspension cell lines.

The experimental part is focused on the detection of nuclear condensation and fragmentation using the quantitative spectrofluorimetric method Hoechst 33258 and especially on its optimization for suspension cells. For optimization, we chose the Jurkat cell line, which we incubated with apoptosis inducers – cisplatin, camptothecin and staurosporine. To evaluate the cytotoxicity of selected toxins, we first used tests to determine the activity of mitochondrial dehydrogenases and the intracellular level of glutathione. Subsequently, we detected nuclear condensation and fragmentation using the Hoechst 33258 method and optimized the measurement parameters for suspension cells. The results are summarized and discussed at the end of the thesis.

## **KEY WORDS**

Apoptosis, fluorescent methods, detection of nuclear condensation and fragmentation, Hoechst 33258, suspension cell lines.

# OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>12</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>13</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>15</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>16</b>
1.1 Buněčná smrt .....	16
1.1.1 Apoptóza a její mechanismus .....	17
1.1.1.1 Vnější dráha .....	18
1.1.1.2 Vnitřní dráha .....	19
1.1.1.3 Perforin-granzymová dráha .....	21
1.1.1.4 Efektorová fáze – mimojaderné změny .....	22
1.1.1.5 Efektorová fáze – jaderné změny.....	23
1.1.1.6 Kondenzace chromatinu a jádra.....	24
1.1.1.7 Fragmentace DNA .....	25
1.1.2 Induktory apoptózy .....	26
1.1.2.1 Cisplatina .....	26
1.1.2.2 Kamptotecin.....	28
1.1.2.3 Staurosporin .....	28
1.2 Fluorescenční detekce jaderných změn při apoptóze .....	29
1.2.1 Fluorescenční sondy pro značení nukleových kyselin.....	31
1.2.1.1 DAPI .....	33
1.2.1.2 SYTO .....	33
1.2.1.3 DRAQ5 .....	34
1.2.1.4 Hoechst .....	35
1.2.2 Fluorescenční metody .....	37
1.2.2.1 Fluorescenční mikroskopie .....	37
1.2.2.2 Průtoková cytometrie .....	39
1.2.2.3 Spektrofluorimetrie .....	40
1.3 Suspenzní buněčné linie.....	42
1.3.1 RAJI.....	42
1.3.2 HL-60.....	43
1.3.3 Jurkat.....	43
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>45</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>46</b>
3.1 Laboratorní pomůcky a přístroje, software.....	46
3.2 Seznam použitých chemikálií .....	46
3.3 Příprava roztoků.....	47
3.4 Biologický materiál.....	48
3.5 Kultivace buněk Jurkat .....	48
3.6 Spektrofluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu .....	48
3.7 Spektrofotometrické stanovení dehydrogenázové aktivity .....	49
3.8 Světelná a fluorescenční mikroskopie .....	49
3.9 Optimalizace detekce nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk .	50
3.10 Statistická analýza naměřených dat .....	51

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>52</b>
4.1	Spektrofluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu .....	52
4.2	Spektrofotometrické stanovení dehydrogenázové aktivity .....	53
4.3	Vizualizace buněk .....	53
4.4	Optimalizace detekce nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk .	56
4.4.1	Standardní metoda Hoechst 33258 .....	56
4.4.2	Testování vlivu míchání vzorku a směru detekce.....	57
4.4.3	Testování vlivu složení roztoku.....	58
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>67</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Shrnutí mechanismu apoptózy.....	18
<b>Obrázek 2:</b> Morfologické změny buňky při apoptóze.....	23
<b>Obrázek 3:</b> Stupně kondenzace chromatinu .....	25
<b>Obrázek 4:</b> Internukleozomální štěpení DNA.....	26
<b>Obrázek 5:</b> Vstup cisplatinu do buňky. ....	27
<b>Obrázek 6:</b> Strukturní vzorec kamptotecinu a staurosporinu .....	28
<b>Obrázek 7:</b> Výsledky testů sloužících k detekci fragmentace DNA .....	31
<b>Obrázek 8:</b> Strukturní vzorec sondy DAPI. ....	33
<b>Obrázek 9:</b> Strukturní vzorec DRAQ5. ....	35
<b>Obrázek 10:</b> Fluorescenční mikroskop.....	38
<b>Obrázek 11:</b> Průtokový cytometr .....	39
<b>Obrázek 12:</b> Spektrofluorimetr.....	41
<b>Obrázek 13:</b> Mikrofotografie buněk Jurkat inkubovaných s induktory apoptózy po 24 h ....	54
<b>Obrázek 14:</b> Mikrofotografie buněk Jurkat inkubovaných s induktory apoptózy po 48 h ....	55
<b>Graf 1:</b> Vliv vybraných induktorů apoptózy na koncentraci glutathionu buněk Jurkat .....	52
<b>Graf 2:</b> Vliv vybraných induktorů apoptózy na dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat....	53
<b>Graf 3:</b> Detekce nukleární kondenzace a fragmentace buněk Jurkat.....	56
<b>Graf 4:</b> Optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky – vliv míchání .....	57
<b>Graf 5:</b> Optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky – vliv směru detekce a složení roztoku .....	59
<b>Tabulka 1:</b> Proteiny uvolňované z mitochondrií v průběhu apoptózy a jejich funkce.....	21
<b>Tabulka 2:</b> Reaktivní skupiny některých fluorescenčních značek a tvořené vazby s proteiny .....	32
<b>Tabulka 3:</b> Strukturní vzorce, excitační a emisní maxima sond Hoechst. ....	37
<b>Tabulka 4:</b> Používané induktory apoptózy u suspenzních buněk. ....	44

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>Acinus</b>	<i>Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus</i>
<b>AIF</b>	<i>Apoptosis Inducing factor</i>
<b>APAF-1</b>	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BAD</b>	<i>Bcl-2 associated agonist of cell death</i>
<b>BAK</b>	<i>Bcl-2 antagonist or killer</i>
<b>BAX</b>	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>Bcl-xL</b>	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
<b>BH3-only</b>	skupina apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2
<b>BID</b>	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
<b>BIK</b>	<i>Bcl-2 interacting killer</i>
<b>BIM</b>	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
<b>BMF</b>	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
<b>BOK</b>	<i>Bcl-2 related ovarian killer</i>
<b>BrdU</b>	bromodeoxyuridin
<b>BrdUTP</b>	bromodeoxyuridintrifosfát
<b>CAD</b>	kaspázou aktivovaná DNÁza
<b>CDDP</b>	cisplatina
<b>CPT</b>	kamptotecin
<b>Ctr1</b>	<i>Copper transporter 1</i>
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenylindol
<b>DISC</b>	smrt indukující signální komplex
<b>dUTP</b>	deoxyuridintrifosfát
<b>DV</b>	deionizovaná voda
<b>EBV</b>	virus Epstein-Barrové
<b>Endo G</b>	endonukleáza G
<b>FADD</b>	Fas asociovaná doména smrti
<b>FasL</b>	Fas ligand
<b>FasR</b>	Fas receptor
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
<b>FPG</b>	formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza
<b>GSH</b>	glutathion
<b>HRK</b>	<i>Activator of apoptosis harakiri</i>
<b>HT58</b>	Hoechst 33258
<b>HtrA2</b>	<i>High temperature requirement protein A2</i>
<b>ICAD</b>	inhibitor kaspázou aktivované DNÁzy
<b>IF</b>	intenzita fluorescence
<b>IL-2</b>	interleukin-2
<b>LMPA</b>	nízkotající agaróza
<b>Mcl-1</b>	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i>
<b>Mdm2</b>	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
<b>NADH</b>	nikotinamidadenindinukleotid
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
<b>PARP-1</b>	poly (ADP-ribóza) polymeráza 1
<b>PE</b>	fosfatidylethanolamin
<b>PS</b>	fosfatidylserin
<b>PUMA</b>	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>

<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>SCGE</b>	gelová elektroforéza jednotlivých buněk
<b>Smac</b>	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
<b>STS</b>	staurosporin
<b>tBID</b>	<i>truncated BH3-interacting domain death agonist</i>
<b>TdT</b>	terminální deoxynukleotidyl transferáza
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>TUNEL</b>	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase nick-end labeling</i>
<b>VDAC 2</b>	<i>Voltage-Dependent Anion Channel 2</i>
<b>VdW síly</b>	Van der Waalsovy síly
<b>VMM</b>	vnější mitochondriální membrána
<b>WST</b>	ve vodě rozpustné tetrazoliové soli

## ÚVOD

Buněčná smrt je souhrnem dějů v buňce, které vedou k jejímu zániku. V minulosti se odborníci domnívali, že je buněčná smrt výsledkem jednoho ze dvou procesů – nekrózy a apoptózy. Postupem času bylo objeveno několik dalších typů buněčné smrti, jako je např. autofagie. Typy buněčné smrti můžeme rozdělit do dvou kategorií – programovaná buněčná smrt a neprogramovaná buněčná smrt.

Apoptóza je typem buněčné smrti programované. Apoptóza je složitý děj, který může být spuštěn signály pocházejícími jak z buňky samotné, tak z buněk okolních. V obou případech jsou výsledkem kaskádovitého procesu apoptózy morfologické a biochemické změny vedoucí až ke vzniku tzv. apoptotických tělísek. Mezi tyto změny patří mimo jiné kondenzace a fragmentace buněčného jádra, na jejichž detekci je založená kvantitativní spektrofluorimetrická metoda Hoechst 33258 vyvinutá v naší laboratoři. Metoda Hoechst 33258 byla využita k detekci jaderné fragmentace a kondenzace u adherentních buněk. Cílem této diplomové práce je aplikace, a především optimalizace této metody na buňky suspenzní.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Buněčná smrt

Konkrétní typy buněčné smrti dělíme do dvou kategorií, kterými jsou buněčná smrt programovaná a buněčná smrt neprogramovaná.

Apoptóza je typem programované buněčné smrti, což znamená, že jde o geneticky kódovaný proces autodestrukce buněk. Apoptóza je fyziologický děj probíhající za spotřeby ATP, který se vyskytuje během vývoje i stárnutí organismu. Během vývoje organismu dochází vlivem apoptózy buněk např. k tvorbě prstů, patra nebo střevní sliznice. Při zrání buněk imunitního systému zase zodpovídá za pozitivní a negativní selekci nezralých T lymfocytů a negativní selekci nezralých B lymfocytů (*Rehman et al, 2001*). U dospělého organismu pak slouží k udržení homeostázy buněčných populací ve tkáních. Nadměrná apoptóza je typická např. pro neurodegenerativní onemocnění a ischemické poškození, snížená je rysem malignit a autoimunitních onemocnění (*Rehman et al, 2001*). Funguje také jako obranný mechanismus při buněčném poškození. Zároveň buněčné poškození, které by fyziologicky aktivovalo apoptózu může aktivovat nekrózu a obráceně. To, který děj nastane, závisí na faktorech jako je fyziologické prostředí, vývojové stádium buněk, typ buněčné tkáně, povaha signálu buněčné smrti a intenzita stimulu (*Elmore, 2007; Zeiss, 2003*). Apoptóza je také klíčovou součástí mechanismu nádorové suprese. Na bázi její indukce je založeno několik léčiv, jako je např. Venetoclax. Jedná se o selektivní inhibitor *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) proteinů, který byl schválen FDA pro léčbu pacientů trpících akutní myeloidní leukémií a některými dalšími hematologickými malignitami, u kterých není možná léčba chemoterapií (*Carneiro et al, 2020*).

Dalším příkladem programované buněčné smrti je autofagie neboli sebezpořádání (z řeckého *autóphagos*). Jedná se o proces vedoucí k degradaci molekul i organel buňky pomocí lysozomálních enzymů. Využití produktů této degradace buňkám napomáhá k jejich přežívání za nepříznivých podmínek. Dále také umožňuje degradaci poškozeného vnitrobuněčného materiálu (*Glick et al, 2010*). I když je autofagie obecně chápána jako mechanismus sloužící k přežití buňky, může vyvolat i její smrt. Pravděpodobný mechanismus autofagické buněčné smrti spočívá v tom, že pokud stres buňky za nepříznivých podmínek přetrvává, podstupuje apoptózu. Pokud je apoptóza blokována (mutací, inhibítorem nebo virem), buňka může pokračovat v autofagii, dokud nedojde k buněčné smrti sebedestrukci (*Lockshin, 2016*).

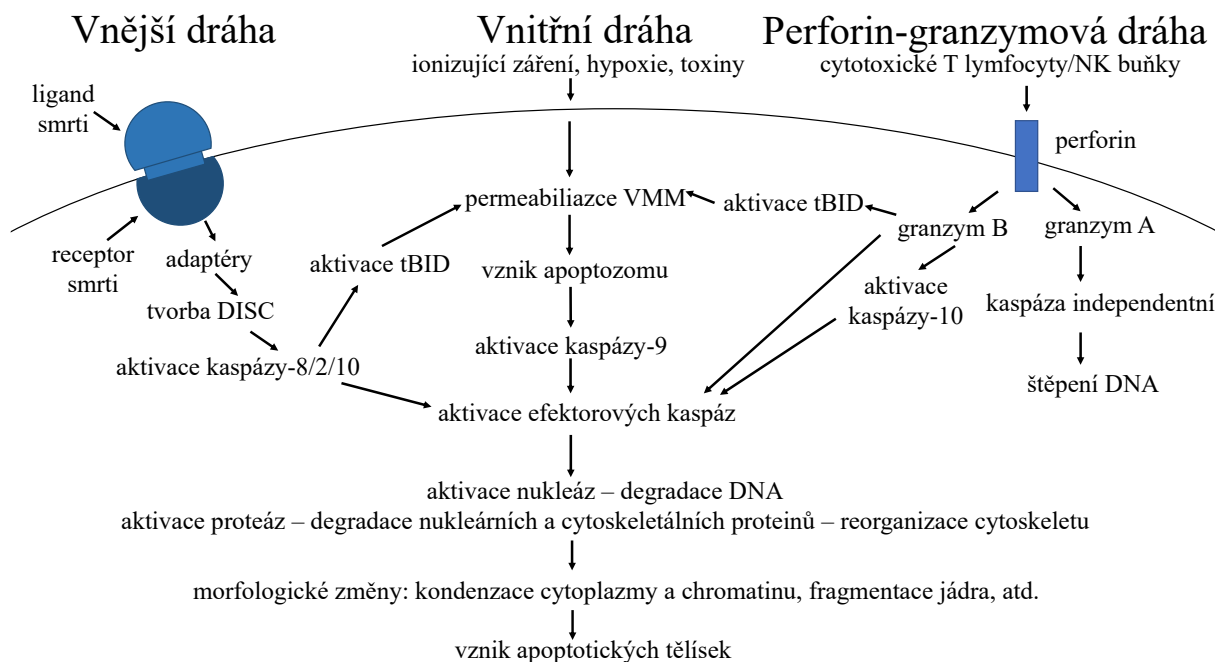


Typem neprogramované buněčné smrti je nekróza, ke které dochází v důsledku působení vnějších faktorů, jako je infekce nebo trauma. Jde o nekontrolovaný proces bez spotřeby ATP, kdy je postižena větší skupina buněk. Při nekróze dochází k bobtnání buňky a buněčných organel, následné buněčné lyzi a rozlití intracelulárního obsahu do okolní tkáně vedoucí k jejímu zánětu (*Festjens et al, 2006*). Mechanismus zánětlivé reakce je založen na sekreci prozánětlivých cytokinů makrofágy a zároveň samotnými nekrotickými buňkami (*Berghe et al, 2006*).

### 1.1.1 Apoptóza a její mechanismus

Regulace apoptózy byla objevena u *Caenorhabditis elegans*, tedy háďátka obecného. Jde o modelový organismus pro studium buněčné biologie. Jednou z oblastí, která byla pomocí tohoto modelového systému zkoumána a vedla k udělení Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu, je právě apoptóza. Během vývoje apoptóze podléhá až 131 z 1090 buněk *C. elegans*.

Proces apoptózy můžeme rozdělit do dvou fází na tzv. iniciační a efektorovu. V průběhu iniciační fáze apoptózy dochází k aktivaci centrálního molekulárního apoptotického aparátu pomocí proapoptotických podnětů (*Saraste et al, 2000*). Dle dosavadních výzkumů existují dvě hlavní iniciační apoptotické dráhy: vnější (dráha receptoru smrti) a vnitřní (mitochondriální). Obě dráhy jsou navzájem propojeny a mohou se vzájemně ovlivňovat (*Elmore, 2007*). Další apoptotickou dráhou je perforin-granzymová dráha, při které dochází k indukci apoptózy prostřednictvím granzymu A nebo granzymu B. Následná efektorová fáze, tedy fáze výkonná má pak pro všechny cesty iniciace (kromě dráhy granzymu A) stejný průběh. Dráha granzymu A aktivuje apoptózu nezávislou na kaspázách prostřednictvím jednořetězcových zlomů DNA (*Singh et al, 2022*). Nakonec vznikají apoptotická tělíska, která jsou degradována fagocyty (*Elmore, 2007*). Zjednodušený mechanismus apoptózy je znázorněn na obrázku 1.



**Obrázek 1: Shrnutí mechanismu apoptózy.** DISC – smrt indukující signální komplex, tBID – *truncated BH3-interacting domain death agonist*, VMM – vnější mitochondriální membrána (upraveno dle Palai et al, 2014).

### 1.1.1.1 Vnější dráha

Jak již název napovídá, vnější dráha apoptózy je řízena signály zvenčí, které vznikají v případě poškození dané buňky. Takovým poškozením může být nádorový zvrát či napadení buňky mikroorganismy (Yanumula et al, 2022). Kaskádovitý průběh vnější iniciační dráhy apoptózy začíná vazbou ligandu na příslušný transmembránový receptor smrti patřící do rodiny *Tumor necrosis factor* (TNF) receptorů. Mezi nejznámější patří Fas receptor (FasR, CD95R) a příslušný Fas ligand (FasL, CD95L) exprimovaný na povrchu imunitních buněk (Yanumula et al, 2022). Tyto receptory pak na intracelulárním povrchu obsahují asi 80 aminokyselin dlouhou doménu smrti. Po vazbě trimerního ligandu dochází k trimerizaci receptoru, což umožní interakci domény smrti s doménou smrti dalších proapoptotických proteinů, jako je Fas asociovaná doména smrti (FADD; *Fas-associated death domain*). FADD obsahuje i další doménu, doménu efektoru smrti, prostřednictvím jejíž dimerizace pak váže prokaspázu-8, 2 nebo 10, čímž se tvoří smrt indukující signální komplex (DISC; *Death-inducing signaling complex*). To vede k autokatalytické aktivaci příslušné kaspázy (Redza-Dutordoir et al, 2016). Tyto aktivované iniciační kaspázy dále proteolyticky aktivují efektorové kaspázy-3, 6 a 7, ale také proapoptotický protein *BH3-interacting domain death agonist* (BID), za vzniku proteinu *truncated* BID (tBID), který poté funguje jako mitochondriální transmembránový

protein zodpovědný za uvolňování cytochromu C z mezimembránového prostoru mitochondrie do buněčné cytoplazmy (Singh et al, 2022; Gross et al, 1999). Permeabilizace vnější mitochondriální membrány pomocí aktivovaného tBID je krok společný jak pro vnější, tak pro vnitřní iniciační dráhu apoptózy.

### 1.1.1.2 Vnitřní dráha

Vnitřní dráha je naproti tomu spuštěna signály vycházejícími z buňky samotné. Stimulem pro aktivaci může být poškození DNA, ale také např. nedostatek růstových faktorů, hormonů či cytokinů, které fyziologicky apoptózu inhibují (Singh et al, 2022). Tyto signály vedou k aktivaci *BH3-only* proteinů, mezi které patří BID, *Bcl-2-like protein 11* (BIM), *Bcl-2 associated agonist of cell death* (BAD), *Bcl-2 interacting killer* (BIK), *Bcl-2 modifying factor* (BMF), *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1* (Noxa), *P53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) a *Activator of apoptosis harakiri* (HRK). Jedná se o proapoptotické proteiny z rodiny Bcl-2, se kterým sdílí podobnost pouze v krátké BH3 aminokyselinové sekvenci (9-16 aminokyselin) – odtud název *BH3-only* (Huang et al, 2000). Právě BH3 doména je zodpovědná za interakci těchto proteinů s dalšími apoptotickými proteiny. Určujícím faktorem pro vznik, či potlačení apoptózy je vzájemný poměr apoptotických a antiapoptotických proteinů také z Bcl-2 rodiny. Antiapoptotická skupina Bcl-2 proteinů BH1-4 (Bcl-2; Bcl-xL, *B-cell lymphoma extra large*; Mcl-1, *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1*) aktivitu *BH3-only* proteinů potlačuje (Lomonosova et al, 2008).

Své proapoptotické funkce pak *BH3-only* proteiny (BID, BIM, PUMA) vykonávají prostřednictvím proapoptotických proteinů BH1–3, jako jsou *Bcl-2 associated X protein* (BAX), *Bcl-2 antagonist or killer* (BAK) a *Bcl-2 related ovarian killer* (BOK). BAX se fyziologicky vyskytuje jako monomerní cytosolický protein, který po apoptotickém signálu mění svou konformaci a translokuje do mitochondriální membrány. BAK je pak již v neaktivní formě vázán na vnější mitochondriální membránu. Aktivaci BAK fyziologicky inhibuje *Voltage-Dependent Anion Channel 2* (VDAC 2) (Danial, 2007).

Existují dva možné mechanismy aktivace proapoptotických BH1-3 proteinů. Podle tzv. přímého modelu proapoptotické *BH3-only* proteiny přímo interagují a indukují konformační změny v BAK a BAX. Podle nepřímého modelu se antiapoptotické proteiny za normálních okolností vážou na BAK a BAX a brání jejich aktivaci. V reakci na apoptotický signál se pak proteiny *BH3-only* vážou na antiapoptotické proteiny, což způsobuje jejich uvolnění

a aktivaci BAX a BAK (Ola et al, 2011). BOK je exprimován převážně v reprodukčních tkáních. Jeho funkce je však stále do značné míry nejasná (Shalaby et al, 2020).

Dalším klíčovým proteinem pro vnitřní dráhu apoptózy je protein p53. Proapoptotická aktivita p53 je fyziologicky regulována řadou protein-proteinových interakcí, z nichž centrální roli hraje interakce s onkogenním proteinem *Mouse double minute 2 homolog* (Mdm2). Vazba p53 na Mdm2 blokuje transkripční aktivitu p53. V případě buněčného stresu nebo poškození DNA je p53 aktivován fosforylací a snižuje se afinita jeho vazby k Mdm2. Po aktivaci se váže na specifické DNA sekvence a způsobuje transkripci genů, které vyvolávají zástavu buněčného cyklu v G1 a méně v G2 fázi. Pokud je nemožné důsledky buněčného stresu zvrátit, indukuje p53 apoptózu. Mechanismus jeho proapoptotického působení však funguje i nezávisle na transkripci. P53 se chová jako *BH3-only* protein. V případě buněčného stresu je translokován na vnější mitochondriální membránu, kde interaguje s proapoptotickými i antiapoptotickými členy Bcl-2 rodiny proteinů – s Bcl-xL a Bcl-2 a inhibuje jejich antiapoptotické vlastnosti. Zároveň však působí i přímo na BAX a aktivuje ho (Bharatham et al, 2011). Další navržený mechanismus jeho působení naznačuje, že je v buňkách fyziologicky p53 vázán do neaktivního komplexu s cytosolovým Bcl-xL. V reakci na stres jaderný p53 nejprve transaktivuje svůj cílový gen Puma. Ve druhém kroku pak Puma uvolní p53 z komplexu s Bcl-xL tvorbou komplexu Puma-Bcl-xL. P53 je pak volný k aktivaci monomerního Bax v cytosolu (Wei et al, 2021).

V případě aktivace BAX a BAK dochází k jejich oligomerizaci a tvorbě pórů ve vnější mitochondriální membráně, a tedy k její permeabilizaci a ztrátě transmembránového potenciálu. Díky tomu se z mezimembránového prostoru začnou uvolňovat 2 skupiny proapoptotických proteinů do cytosolu. Součástí první skupiny je cytochrom C, který aktivuje kaspáza-dependentní vnitřní dráhu apoptózy. Dále *Second mitochondria-derived activator of caspase* (Smac), alternativně nazývaný jako *Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI* (DIABLO) a serinová proteáza *High temperature requirement protein A2* (HtrA2). Tyto proteiny působí jako antagonisté inhibitorů apoptózy a tím ji nepřímo podporují. HtrA2 se po uvolnění z mitochondrií také translokuje do jádra, což vede k aktivaci transkripčního faktoru p73, který zvyšuje expresi několika proapoptotických genů včetně BAX a BAK (Prokhorova et al, 2015). Cytochrom C tvoří komplex s *Apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1) a prokaspázou-9 a za přítomnosti ATP se tak tvoří apoptozom. To vede k autoaktivaci kaspázy-9, která pak aktivuje efektorové kaspázy-3, 6 a 7 (Redza-Dutordoir et al, 2016). Druhou skupinu tvoří proteiny uvolňované v pozdních fázích apoptózy – *Apoptosis Inducing factor* (AIF), endonukleáza G (Endo G; *Endonuclease G*) a kaspázou aktivovaná

DNáza (CAD/DFF-40; *Caspase-Activated DNase*). AIF se přesouvá do jádra a způsobuje kaspáza-independentní fragmentaci DNA na vysokomolekulární fragmenty a 1. stupeň kondenzace chromatinu. Endonukleáza G se v jádře podílí jak na tvorbě vysokomolekulárních fragmentů, tak na tvorbě oligonukleozomálních fragmentů (*Redza-Dutordoir et al, 2016*). Dále je kaspázou-3 aktivován CAD a způsobuje další fragmentaci DNA a pokročilejší kondenzaci chromatinu (stupeň 2) (*Elmore, 2007; Widlak et al, 2005*).

**Tabulka 1: Proteiny uvolňované z mitochondrií v průběhu apoptózy a jejich funkce.**  
*Redza-Dutordoir et al, 2016; Elmore, 2007; Widlak et al, 2005; Prokhorova et al, 2015.*

Protein	Funkce
AIF	vysokomolekulární fragmentace DNA, 1. stupeň kondenzace chromatinu
APAF-1	tvorba apoptozomu
CAD/DFF-40	fragmentace DNA, 2. stupeň kondenzace chromatinu
cytochrom C	tvorba apoptozomu
Endo G	fragmentace DNA
HtrA2	antagonista inhibitorů apoptózy, aktivace p73
kaspáza-3, -6, -7	efektorové kaspázy
kaspáza-9	aktivace kaspázy-3, -6, -7
prokaspáza-9	tvorba apoptozomu, autoaktivace na kaspázu-9
p73	zvyšuje expresi genů pro BAK a BAX
Smac/DIABLO	antagonista inhibitorů apoptózy

### 1.1.1.3 Perforin-granzymová dráha

Perforin-granzymová dráha je v podstatě alternativní vnější dráhou aktivace apoptózy zprostředkovanou cytotoxickými T lymfocyty a *natural killer* (NK) buňkami. Po rozeznání transformované či infikované buňky vylévají svá cytotoxická granula, která mimo jiné obsahují právě perforin a granzymy. Perforin je schopen polymerovat a tvořit póry v membráně cílové buňky. V cytotoxických granulích ho normálně v neaktivní formě udržuje protein endoplazmatického retikula kalretikulin, který váže  $Ca^{2+}$  ionty. Jeho aktivace je tedy závislá právě na přítomnosti  $Ca^{2+}$  iontů, které aktivují jeho globulární formu za vzniku perforinu schopného inkorporace do buněčné membrány. Mechanismus této přeměny je založen na vazbě monomerů perforinu prostřednictvím  $Ca^{2+}$  dependentní C2 domény a jejich oligomerizaci za vzniku transmembránových pórů (*House et al, 2017*). Póry tvořené perforinem narušují buněčnou membránu a umožňují volný průtok iontů a polypeptidů. V důsledku toho je narušena homeostáza, čímž nepřímo indukuje aktivaci proapoptotických drah (*Osińska et al,*

2014). Zároveň tak umožňuje vstup granzymů do buňky. Relativní rezistence NK buněk a cytotoxických T lymfocytů na perforinem zprostředkovanou lyzi buňky je zajištěna katepsinem B – lysozomální proteázou, která se vyskytuje i v cytotoxických granulích. Katepsin B se po degranulaci uvolňuje na membránu efektorové buňky, kde inaktivuje perforin, který poté difunduje zpět do efektorové buňky (Trapani et al, 2002).

Granzym A aktivuje kaspáza-independentní dráhu apoptózy tím, že štěpí komplex proteinů SET, které normálně inhibují gen pro NM23-H1. To vede k aktivaci NM23-H1 DNázy, která pak nevratně poškozuje strukturu DNA (Elmore, 2007).

Granzym B je serinová proteáza, která štěpí proteiny v místech lokalizace aspartátových zbytků. Je schopen aktivace kaspázy-10 a může štěpit faktory jako je inhibitor CAD (ICAD/DFP-45; *Inhibitor of Caspase Activated DNase*). S vnitřní dráhou apoptózy se prolíná specifickým štěpením BID na tBID a indukcí uvolnění cytochromu C z mitochondrií. Může také přímo indukovat efektorovou fázi apoptózy, a to aktivací kaspázy-3 (Elmore, 2007).

#### 1.1.1.4 Efektorová fáze – mimojaderné změny

Iniciační fáze následně přechází ve fázi efektorovu. V této fázi probíhají typické morfologické a biochemické změny, které buňku připravují na následnou eliminaci fagocyty. Těmi jsou zejména smrštění buňky, následný *blebbing* membrány a tvorba apoptotických tělísek. Schéma těchto dějů je ukázáno na obrázku 2. K dosažení takových morfologických změn provádějí apoptotické buňky kromě jaderné kondenzace a fragmentace také výraznou reorganizaci cytoskeletu (mikrotubulů, mikrofilament a intermediárních filament) (Cheng et al, 2010). Po vstupu buňky do efektorové fáze apoptózy dochází k odtržení buňky od extracelulární matrix (u adherentních buněk) a reorganizaci fokálních adhezí, čímž se buňka zakulatí. Toho je mimo jiné dosaženo kaspáza-dependentním štěpením kinázy fokálních adhezí pp125 (FAK pp125; *Focal adhesion kinase pp125*).

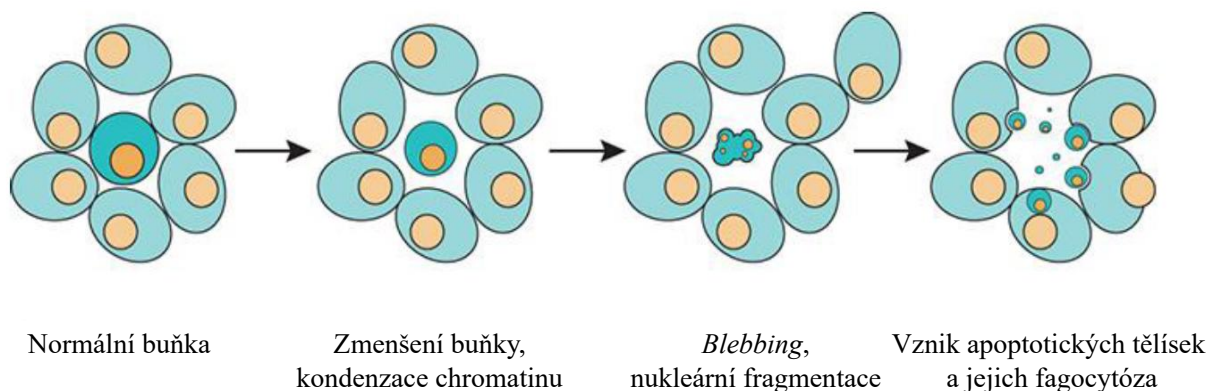
Intermediární filamenta se dělí do 5 tříd. Na počátku efektorové fáze jsou keratiny 1. a 3. typu štěpeny kaspázami-3, 6 a 7, zatímco keratiny 2. typu jsou vůči proteolýze zprostředkované kaspázami odolné. Po rozštěpení se v cytoplazmě hromadí jejich fragmenty a tvoří velké agregáty. Štěpení keratinu K18 1. typu kaspázou je důležité pro udržení integrity membrány během apoptózy (Doncel et al, 2016). V této fázi dochází také k rozpadu mikrotubulů.

*Blebbing* membrány poté začíná kontrakcí aktinových filament závislou na myosinu II. Nakonec dojde k rozložení aktinového cytoskeletu kaspázami a vznikají apoptotická tělíška

obsahující buněčné organely (Mills *et al*, 1999). Všechny děje jsou z velké části závislé na štěpení efektorovými kaspázami-3, 6 a 7. Např. fosforylace lehkého řetězce myosinu, která je potřeba ke kontrakci aktinových filament, je důsledkem štěpení kinázy *Rho-associated protein kinase I* (ROCK I) kaspázou-3 (Ndozangue-Touriguine *et al*, 2008).

Nakonec jsou apoptotická tělíška rozpoznávána fagocyty a fagocytována. Tento proces je umožněn změnami ve složení plazmatické membrány apoptotické buňky, které slouží jako *eat me* signál. Mezi nejznámější signální molekuly patří fosfatidylserin (PS). Fosfatidylserin se fyziologicky nachází společně s fosfatidylethanolaminem (PE) primárně na vnitřní straně fosfolipidové dvojvrstvy, sfingomyelin a fosfatidylcholin na straně vnější. Za jejich lokalizaci mohou enzymy flipázy – ATP-dependentní aminofosfolipidové translokázy, které PS a PE transportují na cytoplazmatickou stranu membrány. V průběhu apoptotického procesu však dochází ke změně asymetrické distribuce fosfolipidů a PS je translokován na vnější stranu plazmatické membrány. Za to jsou zodpovědné kaspázou-3 a 7 aktivované skramblázy, konkrétně Xkr8 skrambláza, která nesespecificky a obousměrně transportuje fosfolipidy a tím narušuje jejich rovnovážné asymetrické rozmístění (Mariño *et al*, 2013). Zároveň dochází ke kaspáza-dependentní inhibici flipázy (Segawa *et al*, 2014). Další molekuly, které se objevují na vnější straně plazmatické membrány v průběhu apoptózy, jsou např. anexin I a kalretikulin (Erwig *et al*, 2008).

Tyto povrchové změny pak mohou buď přímo interagovat s receptory na povrchu fagocytů, nebo vázat sérové proteiny (opsoniny), které slouží jako spojnice mezi fagocylem a apoptotickým tělíškem (Erwig *et al*, 2008).



**Obrázek 2: Morfologické změny buňky při apoptóze (upraveno dle Arduengo, 2013).**

### 1.1.1.5 Efektorová fáze – jaderné změny

Efektorová fáze apoptózy je dále charakteristická morfologickými změnami jádra, kterými jsou jeho kondenzace a fragmentace spojené s biochemickými změnami – fragmentací

DNA (Robertson *et al*, 2000). Tyto děje slouží především k usnadnění odstranění apoptotické buňky fagocyty a k prevenci začlenění DNA apoptotické buňky do sousedních buněk (Susin *et al*, 2000).

Počátek dějů, které vedou k nukleární fragmentaci je závislý na narušení jaderného obalu a jaderné laminy. Jak již bylo zmíněno, kaspázou-3 štěpená kináza ROCK I vede ke kontrakci aktin-myosinových filament, která jsou na jednom konci vázána k jádru. Již tento proces má za následek narušení jaderného obalu (Croft *et al*, 2005). Dalším proteinem podílejícím se na zachování integrity struktury jádra je protein *Nuclear mitotic apparatus* (NuMA). Protein NuMA je štěpen kaspázou-3 a 6 (Robertson *et al*, 2000). Dále je aktivací kaspázy-9 zvyšována permeabilita jaderných pórů, což umožňuje cytoplazmatickým kaspázám dosáhnout jejich jaderných substrátů (Faleiro *et al*, 2000).

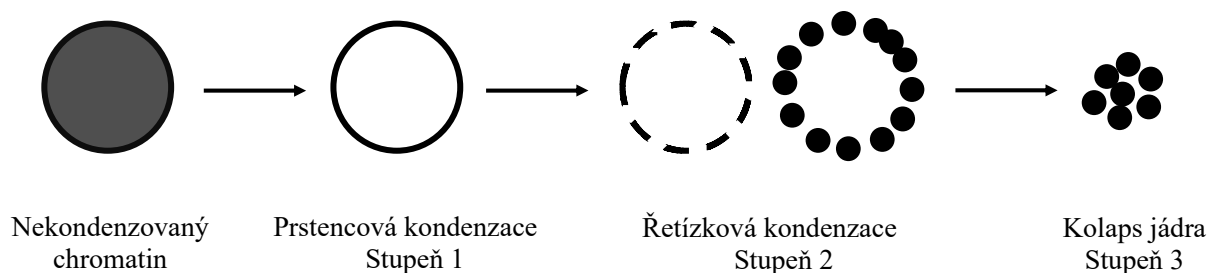
Jaderná lamina se skládá z intermediárních filament typu V – laminů. Ty jsou pak specificky štěpeny kaspázou-3 a 6 (Doncel *et al*, 2016). Prvním identifikovaným substrátem pro kaspázy byla poly (ADP-ribóza) polymeráza (PARP; *Poly (ADP-ribose) polymerase*). Ta se společně s DNA-dependentní protein kinázou (DNA-PK; *DNA-dependent protein kinase*) podílí na opravě poškozené DNA. Kaspáza-3 tyto enzymy inaktivuje, čímž zabráňuje jejich protichůdnému působení, tedy opravě DNA.

#### 1.1.1.6 Kondenzace chromatinu a jádra

Řada proteinů jaderného obalu, včetně laminů, je spojena s chromatinem. Díky tomu spouští jejich štěpení změny v konformaci chromatinu, což umožňuje přístup faktorům, které moduluji jeho kondenzaci a degradaci (Prokhorova *et al*, 2015). Pro apoptotické změny předcházející destrukci chromatinu hrají důležitou roli i modifikace histonů – fosforylace histonů H2A, H2B, H3 a H4 a defosforylace H1. Nejvíce studovanou modifikací histonů je fosforylace H2B katalyzovaná mitogenem aktivovanými proteinkinázami (MAPK; *Mitogen-activated protein kinase*) mechanismem kaspáza-independentním a kinázami Mst1 nebo PKC- $\delta$  mechanismem kaspáza-dependentním (Prokhorova *et al*, 2015).

Proces kondenzace chromatinu lze rozdělit do 3 stupňů. Stupeň 1 – prstencová kondenzace je charakteristická spojitým prstencem kondenzovaného chromatinu na vnitřní straně jaderného obalu. Ve fázi 2 – řetízkové kondenzaci jsou v prstenci viditelné diskontinuity, které následně nabývají korálkovitého vzhledu. Během této fáze začíná pyknóza jádra. Ve 3. fázi kondenzace chromatinu – fázi jaderného kolapsu se jádro rozděluje na jednotlivé fragmenty a tvoří se konečná apoptotická tělíška. Tato fáze je závislá na ATP (Toné *et al*, 2007).





**Obrázek 3: Stupně kondenzace chromatinu** (*upraveno dle Toné et al, 2007*).

### 1.1.1.7 Fragmentace DNA

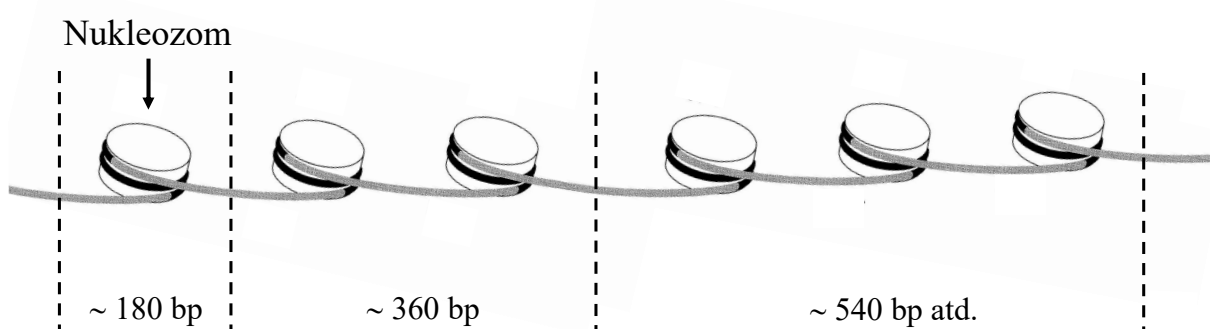
Alespoň dvě paralelní a redundantní dráhy vedou ke kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA. Jedna z těchto drah je kaspáza dependentní a účastní se jí endonukleáza CAD/DFF-40, která v přítomnosti hořčnatých iontů štěpí DNA preferenčně v A-T bohatých oblastech. Kaspáza-3 nebo kaspáza-7 se na aktivaci této dráhy podílí štěpením svého substrátu ICAD/DFF-45. Za normálních okolností se endonukleáza CAD/DFF-40 nachází ve stabilním, neaktivním komplexu s ICAD. V apoptotické buňce je ICAD štěpen zejména kaspázou-3 na tři fragmenty a CAD se tak z komplexu uvolňuje a aktivuje. Jeho vazba na dvouvláknovou DNA a endonukleázová aktivita je závislá na interakci s histonem H1 (*Ninios et al, 2010*). Buněčná lokalizace tohoto komplexu se v literatuře liší. Ve studii Samejima et al (2000) ukazují, že mají ICAD i CAD na svém C-konci aminokyseliny, které fungují jako signál pro jadernou lokalizaci a komplex se tak i v intaktních buňkách nachází v jádře.

Tato dráha vede k fragmentaci DNA na oligonukleozomální fragmenty a pokročilé kondenzaci chromatinu (2. stupeň kondenzace). Druhá dráha je na kaspáze nezávislá. Zahrnuje translokaci AIF z mitochondrie do jádra a vede k fragmentaci DNA na fragmenty o velikosti ~50 kb a kondenzaci chromatinu na jadernou periferii (stupeň 1). Vzhledem k tomu, že AIF nemá endonukleázovou aktivitu, jeho funkce v jádře je s největší pravděpodobností závislá na interakci s jinými proteiny (*Prokhorova et al, 2015*).

Na vzniku těchto fragmentů se podílí také topoizomeráza II (*Solovyan et al, 2002*). Zároveň je z mitochondrie nezávisle na kaspázách uvolňována endonukleáza G. Oproti CAD není tato endonukleáza specifická pro dvouvláknovou DNA – štěpí i jednovláknovou DNA a RNA. Dále také oproti CAD, která generuje výhradně dvouřetězcové zlomy, generuje Endo G jednořetězcové zlomy preferenčně na 5' koncích guaninu. Působení Endo G pak vede k fragmentaci DNA jak na fragmenty o větší molekulové hmotnosti, tak na oligonukleozomální fragmenty. Jejím kofaktorem jsou hořčnaté ionty a její činnost je závislá na DNáze 1 a exonukleázách (*Widlak et al, 2005*). Obě dráhy na sebe navazují. AIF-indukovaná jaderná

apoptóza (stadium I) obvykle předchází dráze indukované CAD (stadium II) a fragmentace DNA na fragmenty o velikosti ~50 kb předchází internukleozomálnímu štěpení DNA (fragmenty o velikosti ~180 bp a násobky – vznik tzv. DNA žebříku). Kromě toho mohou obě dráhy působit na sobě nezávisle (Widlak et al, 2005).

Dalším proteinem štěpeným kaspázou-3 je protein *Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus* (acinus). Obecně se v literatuře objevuje fakt, že je tento protein schopen indukovat kondenzaci chromatinu. Studie A. P. Joselina et al (2006) však ukazuje, že buňky, které acinus neobsahují, nevykazují inhibici kondenzace chromatinu, pouze inhibici DNA fragmentace, což naznačuje jeho úlohu při fragmentaci DNA.



**Obrázek 4: Internukleozomální štěpení DNA (upraveno dle Widlak et al, 2005).**

### 1.1.2 Induktory apoptózy

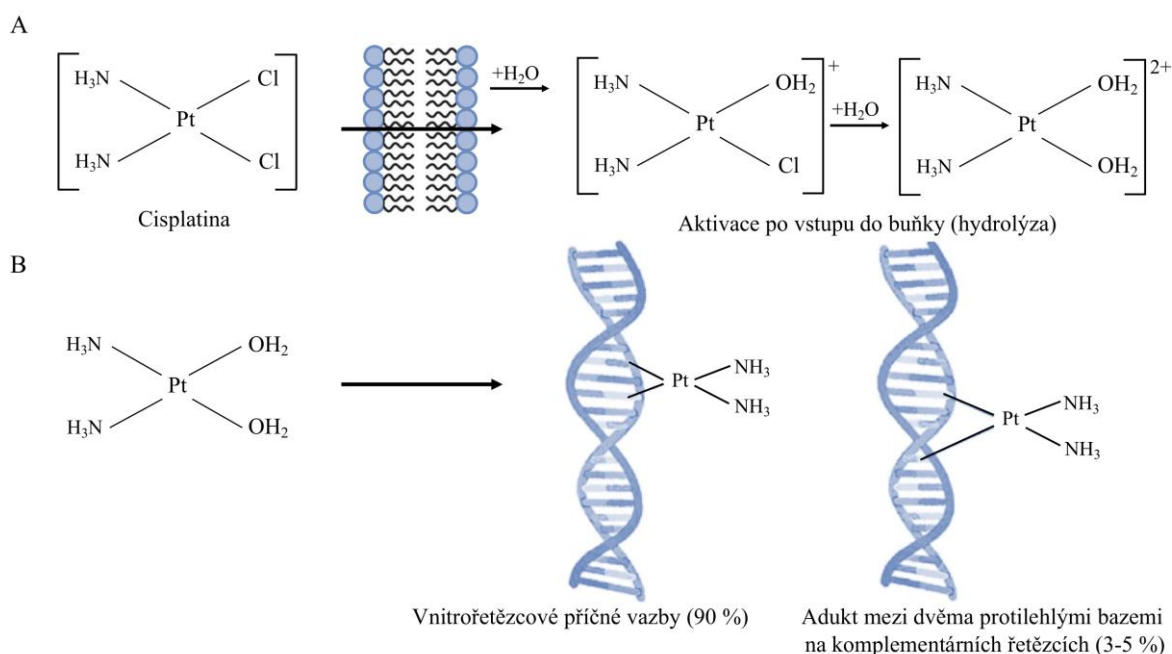
Induktory apoptózy lze dělit na chemické, biologické a fyzikální. Do fyzikálních induktorů řadíme různé typy záření, do biologických pak virové infekce. Mezi chemické induktory apoptózy patří široká škála syntetických i přírodních látek. Některé z těchto látek inhibují aktivitu antiapoptotických molekul, zatímco jiné naopak mohou aktivovat proapoptotické proteiny (Billard, 2014). Mezi laboratorně často využívané chemické induktory apoptózy patří např. cisplatina, kamptotecin a staurosporin.

#### 1.1.2.1 Cisplatina

Cisplatina (CDDP) neboli cis-diammin-dichloroplatinatý komplex je platinová koordinační sloučenina. Dva chloridy na CDDP tvoří odstupující skupiny umožňující platinovému iontu vytvářet vazby s DNA bázemi. Při pokojové teplotě se jedná o bílý, žlutý až žlutooranžový krystalický prášek. Poprvé byla syntetizována a strukturně popsána již v 19. století, ale její cytostatické účinky byly objeveny až mnohem později. V roce 1965 Rosenberg et al zjistili, že jisté produkty vznikající v elektrickém poli mají cytostatické účinky na bakterii *Escherichia*

*coli*. Následně se ukázalo, že se jedná o produkty elektrolýzy platinových elektrod – CDDP a její analog tetrachlorplatinu (Rosenberg *et al*, 1965). To vyvolalo velký zájem o možné použití CDDP jakožto chemoterapeutika. Významnou překážkou v použití CDDP je ale její nefrotoxicita, bezpečnější je použití jejího analoga – karboplatiny. Příčinou nefrotoxicity je tvorba konjugátu s glutathionem a následná tvorba reaktivního thiolu, který je nefrotoxický (Manohar *et al*, 2018).

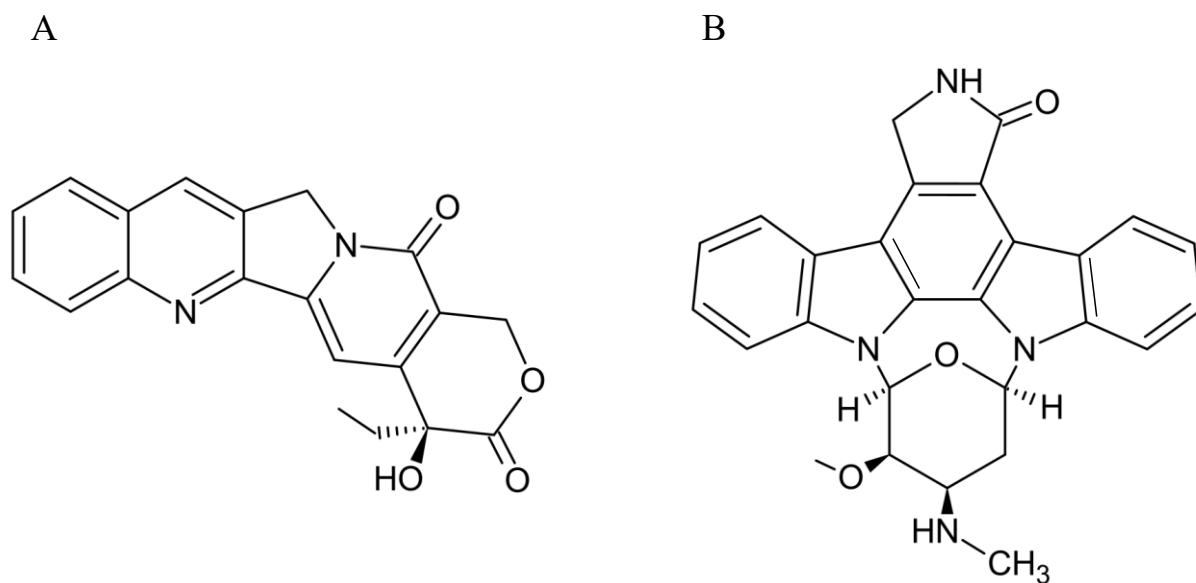
Průnik CDDP do buňky, její následná aktivace a vazba na DNA je znázorněna na obrázku 5. CDDP se do buňky dostává především přes transportéry mědi *Copper transporter 1* (Ctr1). Po vstupu do buňky je aktivována – atomy chloru odstupují výměnou za molekuly vody, čímž vzniká kladně nabitý elektrofil s vysokou afinitou k N7 dusíkům purinových bází (především guaninu) DNA a thiolovým skupinám proteinů (Dasari *et al*, 2014). To vede k tvorbě aduktů s DNA, které brání replikaci DNA a způsobují zástavu buněčného cyklu. CDDP je také schopna generovat reaktivní formy kyslíku. Jak poškození DNA, tak oxidační stres mohou vyvolat apoptózu. Dále se CDDP díky svému kladnému náboji hromadí v mitochondriích, které jsou nabitě záporně. To způsobuje uvolnění AIF a cytochromu C, aktivaci kaspázy-9 a následnou apoptózu. CDDP může vyvolat i vnější cestu aktivace apoptózy produkcí TNF  $\alpha$  (Manohar *et al*, 2018).



**Obrázek 5: Vstup cisplatinu do buňky.** A – aktivace cisplatinu po vstupu do buňky, B – vazba na DNA (upraveno dle Law *et al*, 2021).

### 1.1.2.2 Kamptotecin

Kamptotecin (CPT) je cytotoxický rostlinný alkaloid, který byl poprvé izolován z kůry čínské stromu *Camptotheca acuminata* před více než 60 lety. Některé jeho deriváty se používají jako protirakovinné léčivo především při léčbě nádorů žaludku, tlustého střeva a močového měchýře (Morris et al, 1996). Mechanismus účinku těchto alkaloidů je založený na inhibici topoizomerázy I v S fázi buněčného cyklu. Hlavní funkcí topoizomerázy I je regulace nadšroubovicového vinutí DNA při její replikaci. Jinými slovy, topoizomeráza I uvolňuje utažení vlákna DNA za replikační vidlicí, ve které ji naopak enzym helikáza rozmotává. Toho je schopna docílit štěpením jednoho vlákna DNA, rozmotáním otcůk DNA a opětovným připojením štěpeného vlákna (Li et al, 2017). CPT se váže na komplex topoizomerázy I a DNA a zabraňuje opětovnému spojování vláken DNA, což vede ke vzniku jednořetězcových zlomů a následné p53 dependentní apoptóze (Li et al, 2000). Strukturální vzorec kamptotecinu je zobrazen na obrázku 6A.



**Obrázek 6: Strukturální vzorec kamptotecinu a staurosporinu.** A – kamptotecin, B – staurosporin

### 1.1.2.3 Staurosporin

Alkaloid staurosporin (STS), jehož strukturální vzorec je uveden na obrázku 6B, byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces staurosporeus* v Japonsku v roce 1977, přesná struktura byla však určena až v roce 1994 (Omura et al, 1977; Funato et al, 1994). Mezi prospěšné biologické aktivity STS patří antifungální účinky, inhibice agregace krevních destiček a antihypertenzní vlastnosti (Omura et al, 2018).

Deset let po objevu STS bylo prokázáno, že je také velmi účinný, avšak nespecifický inhibitor proteinkináz, zejména tyrosinkináz. Toho je dosaženo vysokou afinitou STS k vazebnému místu pro ATP na proteinkináze, což znemožňuje vazbu ATP (*Cartuche et al, 2019*). Použití cytotoxického účinku staurosporinu na léčbu rakoviny je však limitováno jeho toxicitou pro okolní buňky. Projevem je pak především hyperglykémie s acidózou, plicní dysfunkce, hypotenze, průjem a zvracení. Přestože některé novější průzkumy ukazují, že je tato negativní vlastnost řešitelná např. začleněním STS do lipozomů, které se pak přednostně akumulují v buňkách nádoru a také sleziny, je stále využíván zejména ve výzkumu jakožto induktor apoptózy (*Mukthavaram et al, 2013*). Mechanismus apoptózy indukované STS stále není úplně popsán. STS mění potenciál vnější mitochondriální membrány a zvyšuje tak její permeabilitu, čímž aktivuje vnitřní dráhu apoptózy. Zhang et al ve studii (2004) dokázali, že inhibice kaspáz ani nadměrná exprese antiapoptotického Bcl-2 apoptózu navozenou působením STS neinhibuje. Z toho vyplývá, že existuje i další, kaspáza independentní cesta navození apoptózy STS. Studie Mannse et al (2011) zase ukazuje, že lze aktivovat modifikovanou vnitřní cestu apoptózy, která aktivuje kaspázu-9 nezávisle na tvorbě apoptozomu.

## 1.2 Fluorescenční detekce jaderných změn při apoptóze

Fluorescence společně s fosforescencí představují jev zvaný luminiscence. Prakticky se jedná o spontánní emisi elektromagnetického záření atomem či molekulou vyvolanou předchozí absorpcí energie, který vzniká jako přebytek záření látky nad úroveň jejího tepelného záření (Nepraš et al, 1983). Excitačním zdrojem může být chemická reakce, elektrický proud, tepelná energie a v případě fotoluminiscence jím je opět elektromagnetické záření. Fluorescenční detekce je jednou z nejčastějších metod detekce jaderných změn, které vznikají v průběhu apoptotického procesu. K těmto změnám patří DNA fragmentace a nukleární kondenzace a fragmentace. K detekci fragmentace DNA se využívají 3 rutinní testy – Kometová metoda, DNA žebřík a metoda TUNEL.

Kometová metoda, též známá jako gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE; *single cell gel electrophoresis assay*) je metoda používaná pro detekci poškození DNA v jedné buňce (*Majtnerová et al, 2018*). Kometovou metodu lze aplikovat jak na eukaryotické, tak na prokaryotické buňky. Používá se především k testování genotoxicity. Principem testu je elektroforetická separace jednovláknových a dvouvláknových fragmentů DNA, které k anodě migrují rychleji než DNA neporušená. Výsledný obrazec pak připomíná kometu, zobrazenou

na obrázku 7A, přičemž neporušená DNA zůstává v hlavě komety a DNA fragmenty tvoří její ocas.

Před samotným testem se suspenze buněk smíchá s nízkotající agarózou (LMPA; *Low melting point agarose*). Ta je na rozdíl od běžně používané agarózy při teplotě 37° C ještě tekutá. Tato směs je následně umístěna na mikroskopické sklíčko potažené agarózou s normální teplotou tání, přikryta krycím sklíčkem a uložena v chladu tak, aby LMPA s buňkami ztuhla. Podložní sklíčka jsou poté umístěna do lyzačního pufru. Složení lyzačního pufru není v laboratořích jednotné, převážně obsahuje vysokou koncentraci soli a různé detergenty. Sůl v lyzačním pufru umožňuje odstranění buněčné membrány, proteinů, cytoplazmy a nukleoplazmy. Dále se provádí samotná elektroforéza ve stejnosměrném elektrickém poli. Nakonec je DNA barvena a detekována ve fluorescenčním mikroskopu (*Shukla, 2018*).

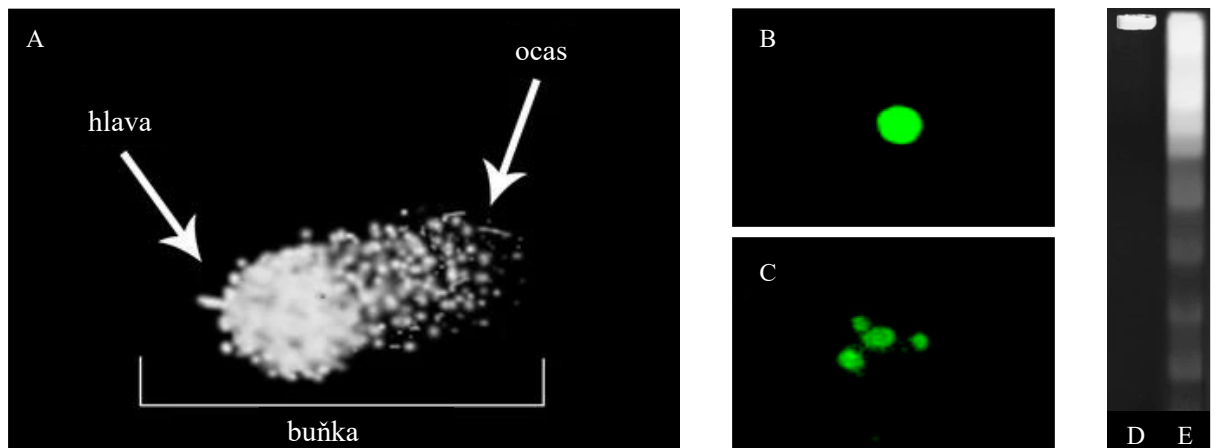
Tento test je možné použít pro detekci jednořetězcových DNA zlomů za alkalických podmínek a dvouřetězcových DNA zlomů za neutrálních podmínek (*Fields et al, 2016*). V alkalickém prostředí o pH 10 a výše se narušují vodíkové můstky mezi páry bazí DNA, což umožňuje oddělení obou řetězců DNA. Pokud se na DNA nacházejí jednořetězcové zlomy, dojde k jejich uvolnění v podobě jednovláknových fragmentů, které je následně možné detekovat. Neutrální pH je vhodné pro detekci dvouřetězcových zlomů (*Majtnerová et al, 2018*). Pomocí modifikované Kometové metody v alkalickém prostředí lze zároveň detekovat oxidativní poškození DNA buněk. K této detekci se využívá enzym formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza (FPG). FPG je DNA reparační enzym, který generuje DNA zlomy v místech oxidovaných purinových bazí tzv. FPG místech (*Azqueta et al, 2013*).

Další metodou, která je využívána k detekci fragmentace DNA je metoda DNA žebříku. Metoda DNA žebříku využívá přítomnosti fragmentů DNA, jejichž délka je rovna násobkům 180 párů bazí vznikajících v důsledku internukleozomální fragmentace DNA v průběhu apoptózy. Po lyzi buněk je fragmentovaná genomová DNA izolována a štěpí se kontaminující RNA. Následně jsou fragmenty DNA elektroforeticky separovány na agarózovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. DNA migruje k anodě, přičemž nejkratší fragmenty migrují v gelu nejdále. Nakonec jsou fragmenty DNA barveny a vizualizovány. K barvení se nejčastěji používá interkalující fluorescenční sonda – ethidium bromid (*Majtnerová et al, 2018*). Výsledek testu je zobrazen na obrázku 7D, 7E.

*Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling* (TUNEL) metoda využívá enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy (TdT; *Terminal deoxynucleotidyle transferase*), která rozpoznává místa zlomů v řetězci DNA a katalyzuje připojení značeného deoxyuridintrifosfátu (dUTP) na volný -OH konec těchto zlomů. V procesu jsou buňky

fixovány, permeabilizovány a následně do nich proniká TdT spolu s dUTPs, které jsou přímo fluorescenčně či enzymaticky značeny a vizualizovány. Alternativou je značení nepřímé, které využívá inkorporaci bromodeoxyuridintrifosfátů (BrdUTPs), které jsou pak značeny protilátkou anti-BrdUTP (Majtnerová et al, 2018).

DNA fragmentace však není charakteristická pouze pro apoptózu. Fragменты DNA, i když nepravidelné, vznikají i při nekróze. Použitím těchto technik tedy nelze rozpoznat apoptózu od nekrózy (Banfalvi, 2017).



**Obrázek 7: Výsledky testů sloužících k detekci fragmentace DNA.** A – Kometová metoda; B - TUNEL metoda, výsledek indikující buněčnou smrt; C - TUNEL metoda, apoptotická tělíska; D - DNA žebřík, kontrolní buňky; E - DNA žebřík, buňky po vystavení induktoru apoptózy (upraveno dle Majtnerová et al, 2018; Moore et al, 2021).

Další často používanou možností je detekce kondenzace chromatinu a jádra a jaderné fragmentace. K tomuto účelu jsou opět často využívány fluorescenční techniky, především fluorescenční mikroskopie. K fluorescenčnímu stanovení apoptózy lze také využít průtoková cytometrie nebo spektrofluorimetrie. Ke značení jader se používají fluorescenční sondy, které se specificky vážou na DNA a umožňují tak její vizualizaci (Banfalvi, 2017). Mezi takové sondy patří např. sondy Hoechst, konkrétně Hoechst 33258, 33342 a 34580 a sonda DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol).


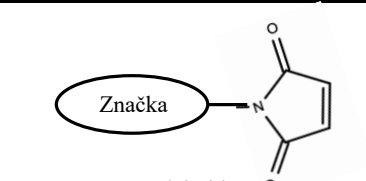
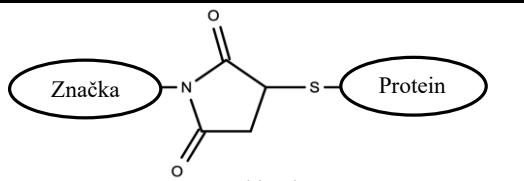
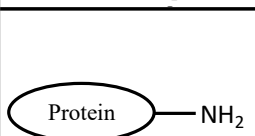
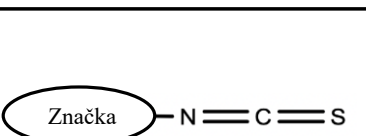
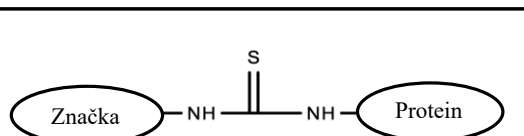
### 1.2.1 Fluorescenční sondy pro značení nukleových kyselin

Dnes jsou fluorescenční techniky využívány pro analýzu nejrůznějších biomolekul v buňce i mimo ni. Fluoreskující látky obsahují konjugované dvojně vazby. Molekuly, které fluoreskují přirozeně se nazývají vnitřní (vlastní) fluorochromy. Fluoreskovat mohou redukované formy koenzymů NADH, NADPH a flaviny (fluorescence v modro-zelené části

spektra), hemoglobin (fluorescence ve žluto-červené části spektra), ale také proteiny, jejichž hlavními fluorochromy jsou aromatické aminokyseliny (fluorescence v UV oblasti) (Koenig *et al*, 1994). Mnohem větší analytický význam však mají vnější (nevlastní) fluorochromy, které se ke studovanému vzorku přidávají. Pokud se mezi takovým fluorochromem a analyzovanou látkou tvoří kovalentní vazba, jedná se o fluorescenční značku. Fluorescenční značky se používají především ke značení proteinů, ve kterých se pomocí reaktivní skupiny kovalentně vážou převážně na jejich aminové a thiolové funkční skupiny, jak ukazuje tabulka 2 (Holmes *et al*, 2001). Mezi významné fluorescenční značky patří např. deriváty fluoresceinu, fluoresceinisothiokyanát, fluoresceinmaleimid a tetrametylrhodaminisothiokyanát. V případě vazby nekovalentní hovoříme o fluorescenčních sondách. Fluorescenční sondy po vazbě často výrazně mění svůj kvantový výtěžek, případně i spektrální vlastnosti.

Na fluorescenční sondy vhodné pro detekci nukleových kyselin je s ohledem na jejich použití v živých buňkách kladeno více požadavků. Musí dobře prostupovat buněčnou membránou, tedy být lipofilní, mít vysokou afinitu a specifitu pro cílovou sekvenci nukleové kyseliny, nízkou cytotoxicitu a vysoký poměr signálu k pozadí. Vzhledem k tomu, že moderní přístroje nedosahují dostatečné citlivosti k detekci signálu jedné molekuly fluorescenční sondy vázané na jedinečnou sekvenci DNA nebo RNA, cílová sekvence musí být přítomna ve větším počtu kopií. Pro jadernou DNA jsou vhodnou cílovou strukturou například repetitivní sekvence DNA (Boutorine *et al*, 2013). Nespecifické vazby na dvouvláknovou DNA lze docílit použitím interkalačních sond, které se vmezerí mezi páry sousedních bazí v DNA. Interkalační sondy však neprostupují buněčnou membránou intaktních buněk (Haugland, 2010).

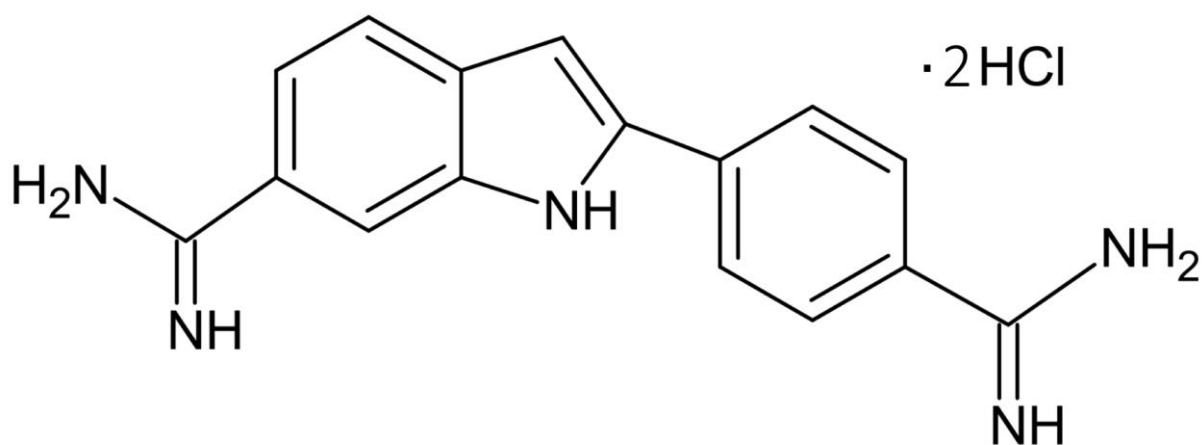
**Tabulka 2: Reaktivní skupiny některých fluorescenčních značek a tvořené vazby s proteiny (upraveno dle Holmes *et al*, 2001).**

Funkční skupina proteinu	Reaktivní skupina fluorescenční značky	Utvořená vazba
 Thiolová skupina	 Maleimid	 Thioether
 Aminová skupina	 Isothiokyanát	 Thiomočovina



### 1.2.1.1 DAPI

Prvním příkladem fluorescenční sondy pro detekci nukleových kyselin v buňkách je sonda DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol). Jedná se o lipofilní sondu, která se specificky váže do A-T bohatých oblastí malého žlábků DNA. Konkrétně jsou k vazbě třeba alespoň 4 po sobě jdoucí A-T/T-A sekvence (Banerjee et al, 2008). Po této vazbě intenzita fluorescence vzroste asi dvacetkrát. Vazba je možná i na G-C sekvence DNA, u nichž se předpokládá interkalační mechanismus vazby, či vazba do velkého žlábků (Jansen et al, 1993). V případě této vazby se však intenzita fluorescence nezvyšuje (Banerjee et al, 2008). Možná je i vazba na páry A-U bází v RNA, mezi které také interkaluje (Taniouss et al, 1992). Vlnová délka excitačního maxima je 364 nm, emisního maxima 454 nm – jde tedy o sondy emitující záření v modré části spektra. Vlnová délka emisního maxima při vazbě DAPI na RNA je pak okolo 500 nm a intenzita záření je jen asi 20 % v porovnání s vazbou na DNA (Kapuscinski, 1990). DAPI prostupuje membránou intaktních buněk hůře, je proto preferenčně používána u buněk fixovaných (Wallberg et al, 2016; Chazotte, 2011).



**Obrázek 8: Strukturní vzorec sondy DAPI.**

### 1.2.1.2 SYTO

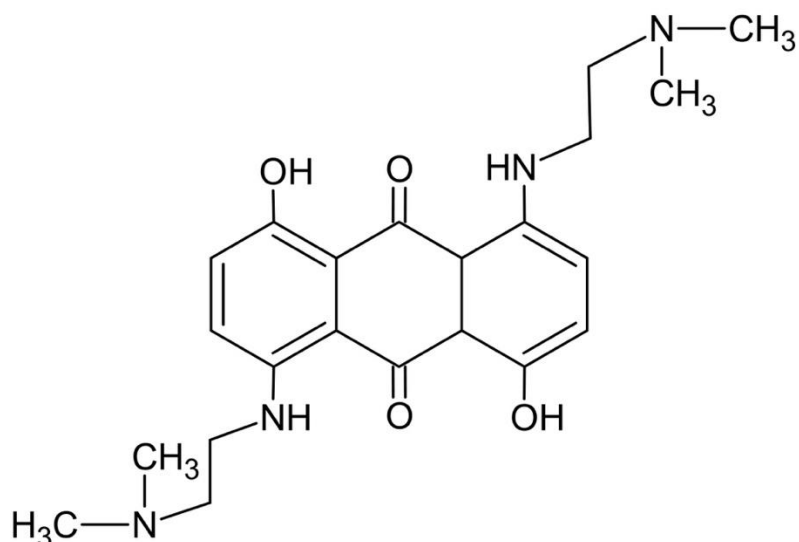
SYTO sondy patří do skupiny asymetrických cyaninů. Jedná se o rodinu téměř 40 zelených, modrých, oranžových a červených fluorescenčních sond. Jejich excitační maxima se pohybují od 419 nm až po 654 nm (Tárnok, 2008). Jsou schopny vazby na DNA i RNA eukaryotických buněk i většiny gram pozitivních a gram negativních bakterií. Liší se mezi sebou schopností prostupovat cytoplazmatickou membránou intaktních buněk, excitačními

a emisními spektry, afinitou vazby k DNA a RNA i mírou zesílení intenzity fluorescence po vazbě na nukleovou kyselinu. Obecně jsou však charakterizovány téměř nulovou fluorescencí, pokud vázány nejsou, což zajišťuje vysoký poměr signálu k pozadí.

Jak již bylo řečeno, sondy se vážou jak k DNA, tak k RNA. Většinou je intenzita fluorescence srovnatelná. Výjimkou je SYTO12 a SYTO14, jejichž fluorescence je intenzivnější v komplexu s RNA a SYTO16, která fluoreskuje silněji při vazbě k DNA. Vyplývá, že eukaryotické buňky barvené SYTO sondami vykazují kromě fluorescence jádra i difúzní fluorescenci cytoplazmy. Mohou také barvit mitochondrie (*Haugland, 2010*). Interakce cyaninových barviv s DNA je komplexní, ovlivněná elektrostatickými, Van der Waalsovými, hydrofobními a sterickými interakcemi. Sondy SYTO jsou více hydrofóbní, než jiná cyaninová barviva. Vážou se k DNA hlavně na základě jejich kladného náboje, primárně do malého žlábků (*Eischeid, 2011*). V literatuře jsou nejvíce zmiňovány sondy SYTO-13 a SYTO-16.

### 1.2.1.3 DRAQ5

Další DNA specifickou sondou je sonda *Deep red fluorescent anthraquinone 5* (DRAQ5). Jedná se o syntetický anthrachinon s vysokou afinitou k DNA schopný procházet cytoplazmatickou membránou intaktních buněk. DNA váže dvěma způsoby. Stejně jako předchozí sondy se váže na malý žlábek DNA, avšak při koncentracích nad 0,5  $\mu\text{M}$  působí jako interkalátor (*Wang et al, 2016*). Excitační maximum DRAQ5 je 647 nm a nachází se tedy v červené části spektra. Jak napovídá název, po vazbě k DNA emituje tmavě červené až infračervené záření. Vazba k DNA je spojena s posunem emisního spektra k vyšším vlnovým délkám, avšak ke zvýšení intenzity fluorescence po vazbě nedochází (*Smith et al 2000*).



**Obrázek 9: Strukturní vzorec DRAQ5.**

#### 1.2.1.4 Hoechst

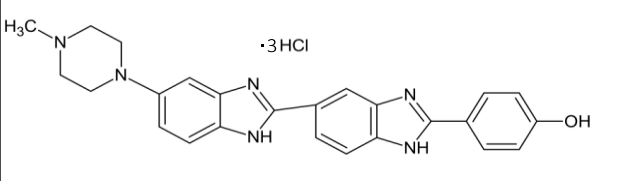
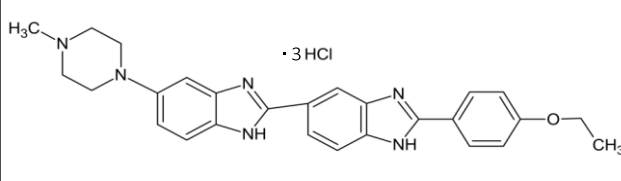
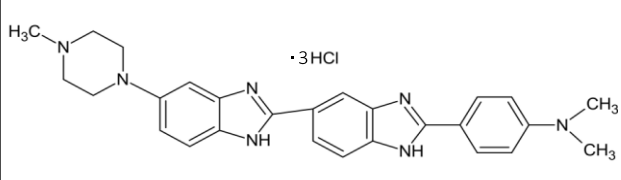
Dalším příkladem fluorescenčních sond pro značení nukleových kyselin jsou sondy Hoechst – Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580. Tyto sondy byly vyvinuty zaniklou německou společností Hoechst AG na počátku 70. let 20. století. Jedná se o strukturně podobné sondy na bázi lipofilních bisbenzimidů, které jsou využívány především pro fluorescenční mikroskopii. Stejně jako sonda DAPI se specificky váží do malého žlábků DNA, konkrétně na A-T bohaté oblasti. Pro vazbu jsou třeba minimálně 4 za sebou jdoucí páry A-T bazí. Po vazbě pak jejich fluorescence zesílí asi třicetkrát a dojde k mírnému posunu emisních maxim, což zajišťuje dostatečně vysoký poměr signálu k pozadí (*Camargo et al, 2004*). Hoechst sondy jsou schopné penetrovat buněčné membrány a používají se proto zejména k barvení jader živých buněk. Hoechst 33342 jimi pak prochází nejsnázeji z důvodu přítomnosti lipofilní ethylové skupiny (*Majumdar et al, 2020*).

Jsou využívány především ke studiu změn jaderné morfologie u apoptózy a buněčného cyklu. Sondy při vazbě na apoptotické buňky zvyšují intenzitu fluorescence, jak bylo dokázáno v některých studiích (*Majtnerová et al, 2021; Zhang et al, 2007*). To může být způsobeno změnou v konformaci DNA, sníženou funkcí transmembránových proteinů, které normálně za spotřeby ATP přenášejí látky ven z buňky, nebo změnou permeability plazmatické membrány při apoptóze. Podle studie Ormeroda et al (1993) je příčinou pravděpodobně změna permeability plazmatické membrány. Zajímavou oblastí použití je identifikace kmenových buněk, u kterých dochází k preferenčnímu efluxu sond Hoechst díky aktivitě *ATP binding cassette* (ABC) transporterů. To se projeví snížením intenzity fluorescence. Fluorescence

Hoechst 33342 a 33258 je zhášena 5-bromo-2'-deoxyuridinem (BrdU), čehož může být také využito při studiu buněčného dělení (*Haugland, 2010*). BrdU je pyrimidinový analog, u něhož dochází k interkalaci do místa thymidinu v nově vznikající DNA u dělících se buněk (*Taupin, 2007*). Hoechst sondy se pak do takovéto DNA stále vážou, avšak k fluorescenci již nedochází. Excitační maximum mají tyto sondy v UV oblasti, Hoechst 34580 však může být excitován i viditelným zářením (*Selph K. E., 2021*). Emisní maximum je pak 465 nm pro Hoechst 33258 a 33342 a 440 nm pro Hoechst 34580, nacházející se v modré části viditelného spektra (*Selph, 2021; Haugland, 2010*). Hoechst 34580 je ze sond Hoechst používán nejméně.

Hoechst 33258 (HT58) je z Hoechst sond nejhydrofilnější. Jeho excitační maximum je při 355 nm, emisní pak při 465 nm. Vazba do malého žlábků DNA je zprostředkována vodíkovými vazbami, Van der Waalsovými silami (VdW) a hydrofobními interakcemi. VdW síly jsou v malém žlábků mnohem silnější, protože sonda dosedá těsně do drážky, oproti širšímu velkému žlábků (*Haq et al, 1997*). Důvodem jeho selektivní vazby na A-T baze malého žlábků jsou 2-amino skupiny guaninu, které neumožňují správné umístění dvou po sobě jdoucích bisbenzimidových jader. Substituce guaninu za inosin pak vazbu do malého žlábků obnovuje (*Bailly et al, 1993*). Při vyšších koncentracích sondy (poměr koncentrací sondy/fosforečnanu > 0,05) dochází k její nespecifické vazbě na DNA. To má za následek zhášení modré fluorescence a vznik slabě zeleně fluoreskujícího komplexu (emisní maximum 480 nm). Tuto nespecifickou vazbu inhibuje ethanol (*Stokke et al, 1985*). Mezi G-C sekvenční DNA při vyšších koncentracích stejně jako DAPI nejspíše interkaluje, projevujíc se opět mnohem nižší intenzitou fluorescence (*Bailly et al, 1993*).

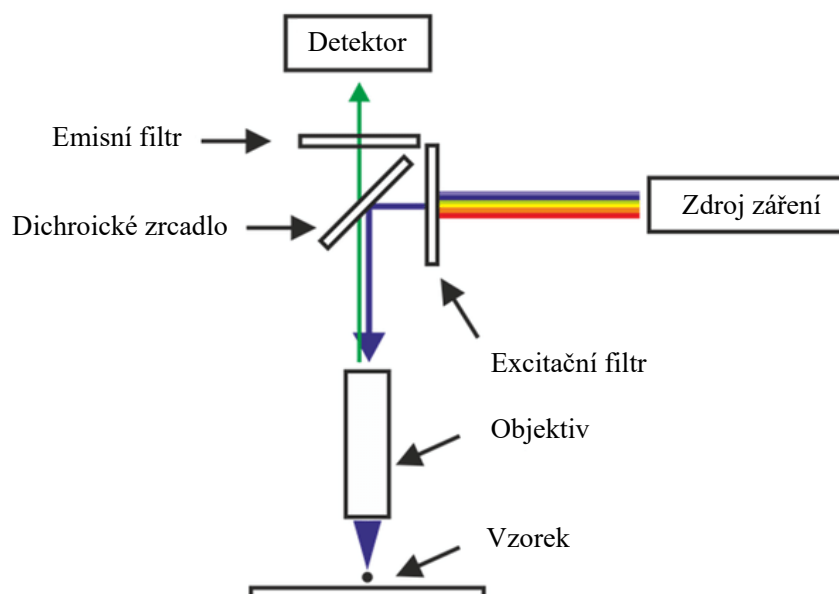
**Tabulka 3: Strukturní vzorce, excitační a emisní maxima sond Hoechst (dle Szczurek et al, 2014; Yamamoto et al, 2019).**

Název	Strukturní vzorec	$\lambda(\text{ex,max})$	$\lambda(\text{em,max})$
Hoechst 33258		355 nm	465 nm
Hoechst 33342		355 nm	465 nm
Hoechst 34580		392 nm	437 nm

## 1.2.2 Fluorescenční metody

### 1.2.2.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je modifikace běžné světelné mikroskopie, která využívá fluorescence ke značení buněčných organel či jednotlivých molekul. Záření, jehož zdrojem je nejčastěji rtuťová výbojka, nejprve prochází excitačním filtrem. Ten propouští pouze světlo té vlnové délky, která je třeba k excitaci přidaného fluorochromu. Světlo o krátké vlnové délce je následně pod úhlem  $90^\circ$  odraženo pomocí dichroického zrcadla do objektivu a ke vzorku. Vzorek se zářením excituje a emituje světlo vyšší vlnové délky, které prochází objektivem a zpět na dichroické zrcadlo, kterým je propouštěno k detektoru. Filtry a dichroické zrcadlo jsou často zapojeny společně do tzv. filtrační kostky. Výsledný signál je pozorován okulárem a zaznamenáván pomocí CCD kamery. Toto uspořádání je charakteristické pro epifluorescenční mikroskopy, které jsou základem komplexnějších fluorescenčních mikroskopů, jako jsou konfokální fluorescenční mikroskopy (Bihonegn, 2018).



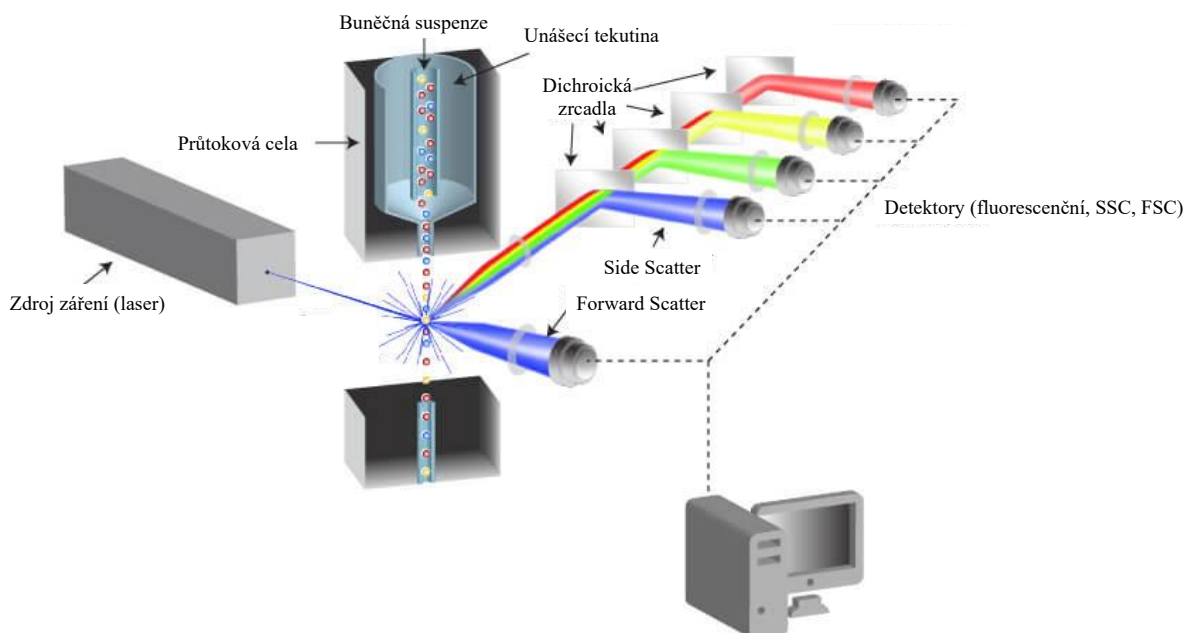
**Obrázek 10: Fluorescenční mikroskop** (upraveno dle Majtner, 2015).

Použitím různých filtrů pro různé fluorochromy vzniká výsledný signál, který nám umožňuje značení více buněčných složek a následné složení jednotlivých signálů do vícebarevného obrazu, na kterém je patrná jejich distribuce a množství v buňce. Takovéto uspořádání má za následek vznik světlého vysoce kontrastního signálu na temném pozadí.

Ke značení DNA při fluorescenční mikroskopii jsou hojně používané sondy Hoechst a DAPI emitující záření modré barvy. Żurek-Biesiada et al však ve své studii zjistili, že i po vystavení relativně malému množství UV záření dochází nejen k jejich očekávanému fotovybělení a tedy snížení modré fluorescence, ale také k průvodní emisi zeleného záření o emisním maximu 520 nm excitovaného zářením modrým. Buňky, které předtím nebyly vystaveny UV záření vykazovaly pouze zanedbatelnou zelenou emisi. Probíhající chemická změna zodpovědná za tento posun excitačních a emisních maxim k vyšším vlnovým délkám je protonace. Konkrétně u sond DAPI a HT58 se po hodině modrá fluorescence obnovila na úroveň asi 50 % výchozí hodnoty, zatímco zelená fluorescence o 50 % klesla. Je tedy možné, že mezi původním barvivem a fotoproduktem dochází k Försterově rezonančnímu přenosu energie (FRETu). Tato neočekávaná emise zeleného světla může být příčinou vzniku falešně pozitivního výsledku při použití jiných zeleně emitujících sond ve stejném experimentu (Żurek-Biesiada et al, 2013).

### 1.2.2.2 Průtoková cytometrie

Základním principem průtokové cytometrie je detekce světelného signálu, který vzniká po ozáření jednotlivých buněk či partikulí ze suspenze světelným zdrojem. Principem vzniku tohoto signálu je rozptyl světla pocházejícího ze zdroje, či excitace fluorochromů přidávaných do vzorku a následná fluorescence. Průchod právě jedné částice přes bod měření je zajištěn hydrodynamickou fokusací. Zdrojem monochromatického záření je nejčastěji laser, přičemž přístroj obvykle obsahuje laserů více, což umožňuje excitaci více fluorochromů o různých excitačních maximech. Za vzorkem je pak umístěn detektor přímého rozptylu (*forward scatter*), který sbírá paprsky v úhlech rozptylu blízkých směru laserového paprsku a měří tak velikost procházejících částic. V pravém úhlu k excitačnímu paprsku je zaznamenáváno světlo rozptýlené, tzv. boční rozptyl (*side scatter*) a světlo vyzářené, tedy fluorescence. Intenzita paprsků dopadajících na detektor bočního rozptylu udává granularitu procházejících částic. Série filtrů a dichroických zrcadel pak rozděluje emitované záření podle vlnové délky a propouští ho na příslušné detektory fluorescence (*Drescher et al, 2021*). Díky tomu je v jeden okamžik umožněno měření desítek vlastností buněk charakterizovaných desítkami fluorochromů (*Park et al, 2020*). Výsledkem počítačového zpracování je dvouparametrový dot-plot – scattergram.



**Obrázek 11: Průtokový cytometr (upraveno dle Cell Signaling Technology).**

Přidávaným fluorochromem může být jedna ze sond Hoechst, které barví jádra živých buněk. Lze ji tak použít k rozpoznání intaktních, apoptotických a fixovaných buněk. Toho je

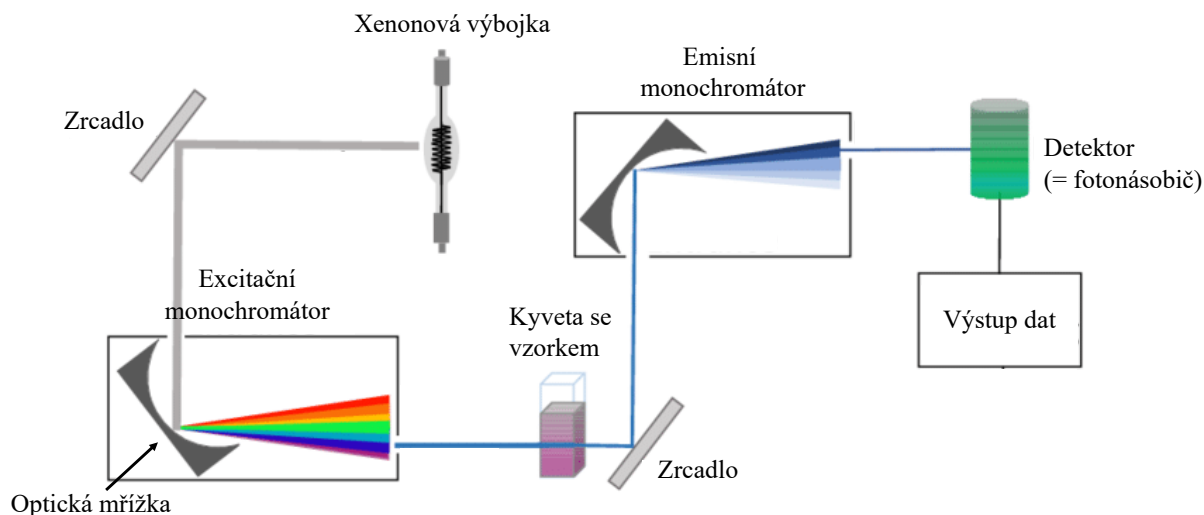
možné docílit přidáním druhé sondy, která barví pouze jádra fixovaných buněk a porovnáním intenzity signálů při dvou vlnových délkách pro každou buňku (*Belloc et al, 1994*). Nevýhodou použití sond Hoechst pro průtokovou cytometrii je jejich excitace v UV pásmu. Průtokové cytometry obvykle obsahují fialovou laserovou diodu, která emituje záření o vyšších vlnových délkách než záření potřebné k optimální excitaci sond Hoechst. UV lasery, které by byly k optimální excitaci třeba však běžnou součástí průtokového cytometru nebývají (*Telford, 2010*). Apoptotické buňky mohou být také pro průtokovou cytometrii označeny Annexinem V, který má vysokou afinitu k fosfatidylserinu nebo může být použita v kombinaci s TUNEL metodou.

### 1.2.2.3 Spektrofluorimetrie

Většina spektrofluorimetrů dokáže měřit jak excitační, tak emisní spektrum daného fluorochromu reprezentované intenzitou emitovaného záření pro každou měřenou vlnovou délku. Ideální přístroj by měl obsahovat světelný zdroj schopný vysílat elektromagnetické záření o stejné intenzitě při všech vlnových délkách, monochromátor propouštějící stejné množství záření při všech vlnových délkách a detektor schopný detekovat záření o všech vlnových délkách. V praxi však těchto vlastností dosáhnout nelze (*Lakowicz et al, 2017*).

Nejčastějším zdrojem záření je vysokotlaková xenonová výbojka. Ta je schopná udržovat vysokou konstantní intenzitu emitovaného záření od 250 nm do 700 nm (kromě oblastí kolem 450 nm). Používají se také laserové diody emitující monochromatické záření, které lze snadno fokusovat. K rozložení polychromatického záření na téměř monochromatické se používají monochromátory obsahující difrakční mřížku. Přístroj obsahuje jak excitační, tak emisní monochromátor. Ke korekci jejich neideálního chování se používají současně s barevnými filtry. Ty zajišťují vyšší senzitivitu stanovení odstraněním nežádoucích vlnových délek z excitačního paprsku. Záření z excitačního monochromátoru pak prochází květou se vzorkem, jehož fluorescence je po průchodu emisním monochromátorem detekována fotonásobiči, přičemž oba monochromátory umožňují automatické skenování vlnové délky. Přístroj obsahuje také odnímatelný polarizátor používaný pro měření fluorescenční anizotropie.





**Obrázek 12: Spektrofluorimetr** (upraveno dle Gomes et al, 2019).

Dnešní spektrofluorimetry jsou častěji navrhovány ke stanovení více vzorků při jednom měření, čehož se hojně využívá při testování buněk. Vícevzorkové uspořádání je umožněno použitím mikrotitračních destiček namísto kyvet. Vzhledem k tomuto uspořádání není možné měření vzorků z pravého úhlu a optika přístroje se tak od předchozího upořádání liší. Zdrojem záření je xenonová výbojka. Součástí je také dichroické zrcadlo, které propouští excitační záření a odráží fluorescenci k optice detektoru (Lakowicz et al, 2017).

Spektrofluorimetr můžeme například využít ke stanovení glutathionu v buňce a k určení mitochondriálního poškození. Tyto testy charakterizují viabilitu buněk a slouží jako ukazatel cytotoxicity. Můžeme je tedy využít jako doplňující testy při studiu apoptózy.

Glutathion je hlavní buněčný antioxidant. Během apoptotického procesu vznikají reaktivní formy kyslíku (ROS), což má za následek vyčerpání redukované formy glutathionu (GSH) v buňce. Snížení hladiny GSH tedy může indikovat probíhající apoptózu. Ke stanovení GSH se využívá nefluorescenční sonda monochlorobiman (Čapek et al, 2017). Sonda snadno vstupuje do buněk za vzniku fluorescenčního aduktu GSH-monochlorobimanu, který lze měřit fluorimetricky. Tato reakce je katalyzována enzymem glutathion-S-transferázou (Kamencic et al, 2000).

K určení mitochondriálního poškození, ke kterému v průběhu apoptotického procesu dochází, využíváme stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz. Skupinou takových testů jsou testy využívající ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WST; *water soluble tetrazolium salt*). Principem těchto testů je redukce tetrazoliové soli v přítomnosti dehydrogenázami redukováného NAD(P)H za vzniku ve vodě rozpustného formazanu, který je následně spektrofotometricky stanoven. Absorbance formazanu je úměrná koncentraci NAD(P)H.

Tyto soli jsou negativně nabitě a nemohou tak prostupovat buněčnou membránou – reakce je umožněna díky přítomnosti elektronového mediátoru 1-methoxy-5-methylfenazium methylosulfátu (*Chamchoy et al, 2019*). V případě WST-1 vzniká formazan tmavě žluté barvy, který absorbuje při 440 nm (*Xie et al, 2018*). WST-8 pak formazan oranžové barvy absorbující při 450 nm (*Chamchoy et al, 2019*).

### 1.3 Suspenzní buněčné linie

Buněčné linie jsou buněčné kultury pocházející z mnohobuněčných organismů, které mají neomezenou životaschopnost a schopnost dělení, pokud k tomu mají vhodné podmínky. Tyto vlastnosti jsou způsobeny mutacemi, které se vyskytují přirozeně u nádorových buněk, nebo jsou buňky transformovány uměle. První izolovanou nádorovou linií byly lidské epiteliální buňky izolované Henriette Lacks (HeLa buňky) z karcinomu děložního čípku v roce 1951. Od té doby způsobily buněčné linie revoluci ve výzkumu testování metabolismu léků, cytotoxicity, studia funkce genů a syntéze biologických sloučenin (*Kaur et al, 2012*). Vzhledem ke genetickým mutacím však nemusí vždy spolehlivě odrážet vlastnosti primárních buněk ze stejných tkání. Suspenzní buněčné linie jsou nejčastěji odvozeny od leukemických buněk a buněk lymfomů. Rostou v pohybuujícím se tekutém živném médiu, ve kterém se volně vznášejí jednotlivě či ve shlucích. Jejich růst je omezen koncentrací buněk v médiu.

#### 1.3.1 RAJI

První kontinuální lidské hematopoetické buněčné linie byly izolovány Robertem Pulvertaftem v roce 1963 v Nigérii. Jmenovitě se jednalo o sérii buněčných linií od více než 100 domorodých pacientů s Burkittovým lymfomem. Nejznámější z nich je buněčná linie Raji pojmenovaná stejně jako buněčná linie HeLa po pacientovi, jemuž byly buňky odebrány (*Drexler et al, 2010*). Konkrétně šlo o jedenáctiletého chlapce, kterému byly buňky odebrány z levé maxilly. Buňky Raji vděčí za svůj dělicí potenciál viru Epstein-Barrové (EBV). Každá buňka v průměru obsahuje 50-60 ekvivalentů genomu EBV (*Takakuwa et al, 2004*). Buňky mají povrchové receptory pro Fc fragmenty IgG protilátek a C3b a C3d složky komplementu, čehož lze využít při stanovení cirkulujících imunokomplexů v séru (*Theofilopoulos et al, 1974*).

### 1.3.2 HL-60

HL-60 je myelocytární buněčná linie, která byla izolována z periferní krve třicetileté ženy trpící akutní promyelocytární leukémií. Po  $\leq 60$ . pasážování asi 5 % buněk spontánně diferencuje na granulocyty. Tato diferenciaci může být také stimulována, a to pomocí dimethylsulfoxidu, kyseliny máselné, N,N-dimethylformamidu, triethylenglykolu nebo kyseliny retinové. Výsledné buňky jsou schopné chemotaxe, fagocytózy a produkce superoxidů. Diferenciaci buněk HL-60 je však poněkud neúplná a defektní. Většina kultur sestává převážně z metamyelocytů a neutrofilních tyčů spíše než z plně diferencovaných neutrofilních segmentů. Kromě toho buňky postrádají laktoferin a alkalickou fosfatázu, což značí nepřítomnost sekundárních granulí (*Collins, 1987; Koeffler et al, 1980*). Při jejich expozici forbolovým esterům se pak diferencují v nedělicí se buňky podobné makrofágům. Po indukci jejich diferenciaci buňky již neproliferují, čehož by bylo možné využít při léčbě myeloidních leukémií. Bohužel většina leukemických buněk v přítomnosti těchto induktorů nediferencuje (*Collins, 1987*).

### 1.3.3 Jurkat

Buněčná linie Jurkat byla izolována v roce 1977 z periferní krve čtrnáctiletého chlapce trpícího akutní lymfoblastickou leukémií (*Gioia et al, 2018*). Na počátku 80. let se výzkumem buněčných kultur T lymfocytů zabýval Arthur Weiss. K udržení lidských T buněk v kultuře potřeboval Weiss zdroj růstových faktorů. Řešení tohoto problému mu poskytli Steven Gillis a James Watson, kteří zjistili, že buňky Jurkat produkují po stimulaci fytohemaglutininem velké množství interleukinu-2 (IL-2). Následně Weiss tuto buněčnou linii získal, avšak byla silně kontaminována mykoplazmaty. Proces léčby této infekce dal vzniknout klonu Jurkat E6-1, který se stal standardně používanou buněčnou linií Jurkat. Další studie ukázaly, že maximální produkce IL-2 je dosaženo dvojím stimulem a to protilátkami proti CD3 současně s forbolovými estery (*Abraham et al, 2004*). Nejčastěji jsou tyto buňky využívány ke studiu leukémií vycházejících z T lymfocytů a infekce HIV virem. Od původní buněčné linie je dnes odvozeno několik dalších subklonů. Např. ošetřením Jurkat buněk Fas protilátkou vznikl subklon s nízkou rezistencí vůči Fas indukované apoptóze, subklon A3 (*Juo et al, 1999*).

Buňky Jurkat mají kulovitý tvar a tendenci se shlukovat. K jejich kultivaci se nejčastěji používá kultivační médium Roswell Park Memorial Institute 1640 obohacené o 10% fetální bovinní sérum a 1% penicilin/streptomycin. Inkubace probíhá při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO<sub>2</sub> (*Kwasny et al, 2011*).

Koncentrace a inkubační časy induktorů apoptózy používaných při studiu apoptózy u suspenzních buněčných linií jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tabulka 4: Používané induktory apoptózy u suspenzních buněk** (*Johnson et al, 1997; Guchelaar et al, 1998; Sancho-Martínez et al, 2011; Ullal et al, 2010; Matsura et al, 2002, Ikeda et al, 2003; Tacka et al, 2004; Beltrán et al, 2000*).

<b>Induktor apoptózy</b>	<b>Cisplatina</b>	<b>Kamptotecin</b>	<b>Staurosporin</b>
<b>Koncentrace</b>	5-50 $\mu\text{M}$	$>0,1 \mu\text{M}$	10 nM-10 $\mu\text{M}$
<b>Inkubační čas</b>	4-16 hod	1-6 hod	1-6 hod

## 2 CÍLE PRÁCE

1. Zhodnotit stav suspenzní buněčné linie Jurkat po inkubaci s různými koncentracemi cisplatin, kamptotecinu a staurosporinu pomocí rutinních biochemických testů (MCB a WST-1).
2. Detekovat nukleární kondenzaci a fragmentaci buněk Jurkat ovlivněných stejnými koncentracemi daných toxinů pomocí zavedené kvantitativní spektrofluorimetrické metody využívající sondu Hoechst 33258.
3. Optimalizovat tuto zavedenou metodu pro suspenzní buněčnou linii Jurkat (např. vliv míchání, výměny média, apod.).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Laboratorní pomůcky a přístroje, software

- 96jamkové mikrotitrační destičky (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Analytické váhy (Mettler Toledo, CHE)
- Automatické jednonálové a vícekanálové pipety (Eppendorf, DEU)
- Centrifuga (Hettich, DEU)
- CO<sub>2</sub> inkubátor (PHCbi, JPN)
- Mikroskop Eclipse Ts2R (Nikon; JPN)
- Mraznička (-20 °C; Liebherr, DEU)
- Plastový spotřební materiál (Eppendorf, DEU)
- Spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, AUT)
- Stolní počítač (Hewlett-Packard, USA)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (4 °C, -20 °C; Liebherr, DEU)
- Vortex (Heidolph, DEU)

#### Software

- Microsoft Office – Excel (Microsoft, USA)
- Microsoft Office – Word (Microsoft, USA)
- Nikon NIS-Elements (Nikon, JPN)
- OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)
- Tecan SPARKCONTROL (Tecan, AUT)

### 3.2 Seznam použitých chemikálií

- *Cell proliferation reagent* (WST-1; Roche, DEU)
- Cisplatina (CDDP; Cl<sub>2</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Pt; Mr = 300,1 g/mol; Merck, USA)
- Deionizovaná voda
- Fetální bovinní sérum (Gibco, USA)
- Fosfátový pufr (DPBS 10x; Gibco, USA)
- Hoechst 33258 (HT58; C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>; Mr = 623,96 g/mol; Merck, USA)
- Kamptotecin (CPT; C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; Mr = 348,35 g/mol; Merck, USA)
- L-glutamin (Gibco, USA)

- Monochlorobiman, (MCB;  $C_{10}H_{11}ClN_2O_2$ ;  $M_r = 226,7$  g/mol; Merck, USA)
- Neesenciální aminokyseliny (Gibco, USA)
- Penicilin (Gibco, USA)
- Pyruvát sodný (Gibco, USA)
- *Roswell Park Memorial Institute 1640* medium (RPMI 1640; Merck, USA)
- Staurosporin, (STS;  $C_{28}H_{26}N_4O_3$ ;  $M_r = 466,53$  g/mol; Merck, USA)
- Streptomycin (Gibco, USA)

### 3.3 Příprava roztoků

**Pracovní roztok DPBS 1x** byl připraven ředěním koncentrovaného zásobního roztoku DPBS 10x v poměru 1:9 deionizovanou vodou. Pracovní roztok byl skladován v chladničce při 4 °C.

**Pracovní roztok HT58 (c = 22 µg/mL)** byl připraven ředěním zásobního roztoku HT58 (c = 1 mg/mL). K 978 µL DPBS 1x jsme napipetovali 22 µL zásobního roztoku HT58. Pracovní roztok HT58 byl vždy připraven ve tmě a ihned použit.

**Pracovní roztok monochlorobimanu (c = 240 µM)** byl připraven přidáním 30 µL zásobního roztoku MCB k 1220 µL DPBS 1x. Pracovní roztok MCB byl vždy připravoven ve tmě a ihned použit.

**Zásobní roztok cisplatinu (c = 10 mM)** byl připraven rozpuštěním 0,015 g CDDP v 5 mL DV. Roztok byl skladován v chladničce při 4 °C.

**Zásobní roztok kamptotecinu (c = 10 mM)** byl připraven rozpuštěním 0,017 g CPT v 5 mL DV. Roztok byl skladován v chladničce při 4 °C.

**Zásobní roztok monochlorobimanu (c = 10 mM)** byl připraven rozpuštěním 0,0113 g MCB v 5 mL dimethylsulfoxidu. Roztok jsme skladovali v mrazničce při -20 °C.

**Zásobní roztok staurosporinu (c = 10 mM)** byl připraven rozpuštěním 0,023 g STS v 5 mL DV. Roztok byl skladován v mrazničce při -20 °C.

### 3.4 Biologický materiál

V práci byla použita suspenzní buněčná linie lidských nádorových T-lymfocytů – **Jurkat** (American Type Culture Collection, USA).

### 3.5 Kultivace buněk Jurkat

Buněčnou linii Jurkat jsme kultivovali v základním kultivačním médiu RPMI 1640 s fenolovou červení. Do tohoto média jsme přidali 10% (v/v) fetální bovinní sérum, 1 mM pyruvát, 2 mM L-glutamin, 50 µg/mL penicilin, 50 µg/mL streptomycin a 1 % (v/v) neesenciální aminokyseliny. Do kultivačních nádob jsme do 10 mL kultivačního média nasazovali vždy 300 tisíc buněk. Samotná kultivace buněk probíhala v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Pro experimenty jsme buňky kultivovali v 96jamkových mikrotitračních destičkách v kultivačním médiu RPMI 1640, které fenolovou červeně neobsahovalo. Počet buněk v jamce byl závislý na použité metodě. Pro detekci dehydrogenázové aktivity a koncentrace glutathionu jsme nasazovali 20x10<sup>3</sup> buněk na jamku, pro detekci jaderných změn v buňkách 40x10<sup>3</sup> buněk na jamku. Pro vizualizaci buněk mikroskopicky jsme nasazovali také 20x10<sup>3</sup> buněk na jamku.

Pro experimenty jsme k 90 µL buněčné suspenze o příslušné denzitě přidali vždy 10 µL toxinu a před měřením inkubovali po dobu 24 a 48 h. Výsledná koncentrace toxinů v jamce byla 10, 100 a 1000 nM pro CPT; 5, 25 a 50 µM pro CDDP a 10 nM, 50 nM a 100 nM pro STS. Koncentrace přidávaného toxinu byla vždy 10x vyšší než námi požadovaná výsledná koncentrace toxinu v dané jamce.

### 3.6 Spektrofluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Po 24 a 48 h kultivace buněk Jurkat s toxiny CPT (10-1000 nM), CDDP (5-50 µM) a STS (10-100 nM) jsme nejprve provedli testy k charakterizaci biochemického stavu buněk. Prvním z těchto testů bylo stanovení koncentrace redukované formy glutathionu (GSH) pomocí nefluorescenční sondy monochlorobimanu (MCB). Tato sonda snadno vstupuje do buněk a po vazbě na GSH vzniká fluorescenční adukt GSH-monochlorobiman, který lze následně fluorimetricky stanovit (*Čapek et al, 2017*).

Do každé jamky jsme ve tmě pipetovali 20 µL pracovního roztoku MCB (c = 240 µM) vytemperovaného na 37 °C. Výsledná koncentrace sondy v jamce byla 40 µM. Následně jsme měřili intenzitu fluorescence ( $\lambda_{ex/em} = 394/490$  nm) po dobu 10 min. K měření byl použit



spektrofluorimetr Spark od společnosti Tecan (Rakousko). Množství GSH v buňkách jsme vyjádřili jako průměr procent koncentrace GSH vztažených ke koncentraci GSH kontrolních buněk ( $= 100 \% \pm SD$ ).

### 3.7 Spektrofotometrické stanovení dehydrogenázové aktivity

Následně jsme stanovovali mitochondriální dehydrogenázovou aktivitu pomocí WST-1 testu. Test je založen na spektrofotometrickém stanovení ve vodě rozpustného formazanu, který vzniká po redukcí tetrazoliové soli WST-1. Tuto reakci katalyzují mitochondriální dehydrogenázy. Do každé jamky jsme pipetovali 10  $\mu$ L komerčně dodávaného WST-1 činidla vytemperovaného na 37 °C. Následné měření absorbance jsme prováděli v čase 0 a 60 min při  $\lambda = 440$  nm. K měření byl použit spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko). Aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz jsme vyjádřili jako rozdíl naměřené absorbance v čase 60 min a absorbance v čase 0 min. Tuto změnu absorbance jsme vyjádřili jako průměr procent dehydrogenázové aktivity buněk inkubovaných s toxiny vztažených k dehydrogenázové aktivitě buněk kontrolních ( $= 100 \% \pm SD$ ).

### 3.8 Světelná a fluorescenční mikroskopie

Stav buněk jsme následně hodnotili pomocí světelné mikroskopie s fázovým kontrastem a pomocí fluorescenční mikroskopie za použití fluorescenční sondy HT58. Tato sonda se váže do A-T bohatých oblastí malého žlábků DNA (*Camargo et. al, 2004*).

Buňky byly kultivovány v 96jamkové mikrotitrační destičce (denzita  $20 \times 10^3$  buněk na jamku) s danými toxiny, přičemž jsme použili pouze jejich nejvyšší koncentrace (1000 nM CPT; 50  $\mu$ M CDDP; 100 nM STS). Buňky jsme kultivovali po dobu 24 a 48 h. K barvení jádra jsme následně použili sondu HT58 jejíž výsledná koncentrace v jamce byla 2  $\mu$ g/mL. Po 10 min inkubace jsme buňky promyli DPBS 1x. Buňky a buněčné jádro jsme pozorovali pomocí mikroskopu Nikon Eclipse Ts2R při zvětšení 200x za použití fluorescenčního filtru DAPI (375/28 nm).

### 3.9 Optimalizace detekce nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk

Po mikroskopické vizualizaci jader buněk Jurkat jsme sondu HT58 dále využili ke kvantitativní spektrofluorimetrické detekci nukleární kondenzace a fragmentace. Za tímto účelem jsme použili buněčnou linii Jurkat kultivovanou v 96jamkových mikrotitračních destičkách o denzitě  $40 \times 10^3$  buněk na jamku. Tato denzita byla zvolena na základě předchozích zkušeností z naší laboratoře. Buňky Jurkat jsme inkubovali s vybranými toxiny CPT (10, 100, 1000 nM), CDDP (5, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) a STS (10, 50, 100 nM).

Prvotní parametry měření jsme volili dle předchozí optimalizace této metody pro adherentní buněčné linie (*Majtnerová et al, 2021*). Po 24 a 48 h inkubace buněk s příslušnými toxiny jsme vyměnili 70  $\mu\text{L}$  kultivačního média RPMI 1640 za stejný objem DPBS 1x. Těsně před výměnou média bylo třeba buňky centrifugovat po dobu 5 min při 4800 rpm a 4 °C. Následně jsme k buňkám přidali 10  $\mu\text{L}$  pracovního roztoku sondy HT58 ( $c = 22 \mu\text{g/mL}$ ) vytemperovaného na 37 °C. Výsledná koncentrace sondy v jamce tak byla 2  $\mu\text{g/mL}$ . Buňky jsme se sondou HT58 inkubovali po dobu 5 min při 37 °C a poté měřili intenzitu fluorescence při  $\lambda_{\text{ex/em}} = 352/461 \text{ nm}$  s využitím spodní detekce pomocí spektrofluorimetru Spark společnosti Tecan (Rakousko). Na základě výsledků tohoto měření jsme pro další optimalizace metody buňky inkubovali s toxiny pouze po dobu 48 h.

V rámci optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky jsme testovali vliv tří různých parametrů na výsledky detekce. Nejprve jsme testovali vliv míchání vzorkem. Za tímto účelem jsme dodrželi postup původní metody HT58, ale v závěru doby inkubace se sondou jsme vzorky po dobu 45 s míchali. Následně jsme detekovali intenzitu fluorescence při  $\lambda_{\text{ex/em}} = 352/461 \text{ nm}$  a výsledky porovnali s výsledky předchozího měření buněk inkubovaných s toxiny po dobu 48 h.

K testování vlivu použitého směru detekce na výsledky metody HT58 jsme následně k detekci intenzity fluorescence míchaných vzorků využili horní detekci. Výsledky měření jsme porovnali se vzorky z předchozího kroku, tj. míchanými vzorky, u nichž byla použita spodní detekce.

Nakonec jsme testovali vliv složení roztoku. Buňky jsme proto po 48 h inkubace s CDDP (5, 25, 50  $\mu\text{M}$ ) ponechali v původním médiu RPMI 1640 bez fenolové červeně, přidali 10  $\mu\text{L}$  pracovního roztoku sondy HT58 ( $c = 22 \mu\text{g/mL}$ ) vytemperovaného na 37 °C, inkubovali po dobu 5 min při 37 °C a měřili intenzitu fluorescence při  $\lambda_{\text{ex/em}} = 352/461 \text{ nm}$ . K měření jsme opět použili vzorky nemíchané i míchané, u míchaných vzorků využili spodní i horní detekci.

Výsledky měření jsme porovnali s příslušnými výsledky měření intenzit fluorescence vzorků v médiu DPBS 1x z předchozích kroků optimalizace.

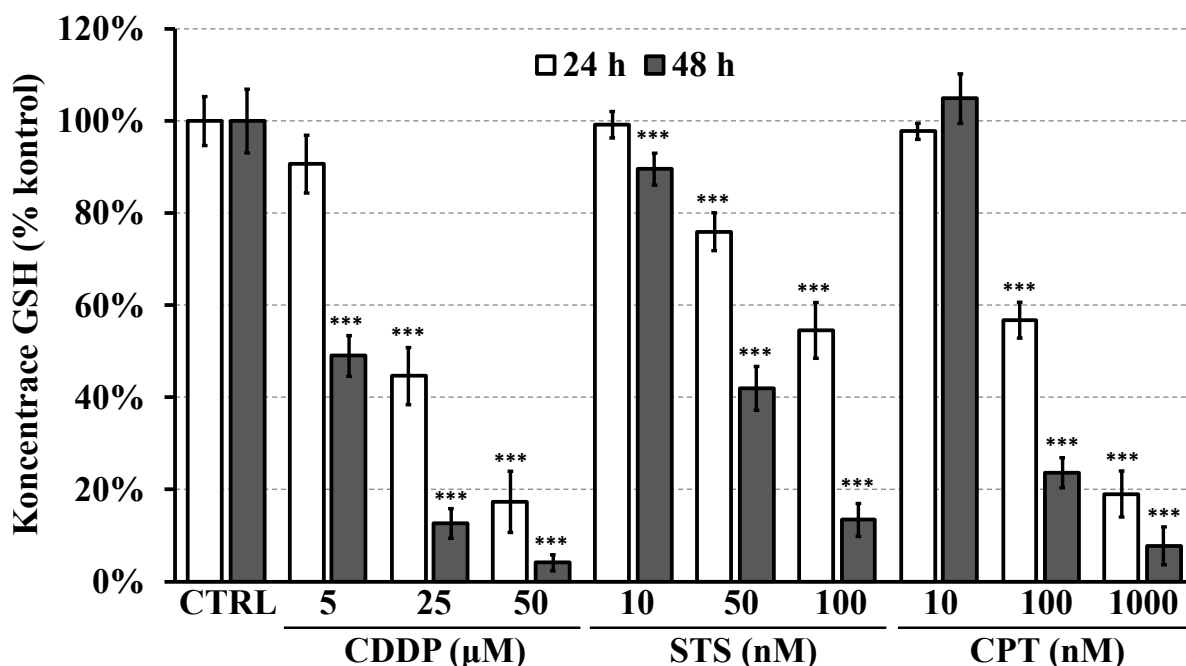
### **3.10 Statistická analýza naměřených dat**

U všech experimentů jsme provedli alespoň dvě nezávislá měření. Studované parametry jsme měřili v rámci jedné analýzy vždy v tripletu. Po testování normality byla provedena jednorozměrná analýza rozptylu (ANOVA) s využitím Bonferroniho post-testu a s hladinou významnosti  $p=0,05$  (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ , vs. *negativní kontrola*). Ke statistickému vyhodnocení experimentálních dat jsme použili software Origin 9.0.0.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Spektrofluorimetrické stanovení koncentrace glutathionu

Působením vybraných toxinů dochází k buněčnému poškození, které je možné částečně charakterizovat detekcí změn intracelulární koncentrace glutathionu. K detekci koncentrace GSH jsme použili sondu MCB. U buněčné linie Jurkat jsme nejprve sledovali vliv různých koncentrací CDDP (5–50  $\mu\text{M}$ ), CPT (10–1000 nM) a STS (1–100 nM) v časových intervalech 24 a 48 h (graf 1).

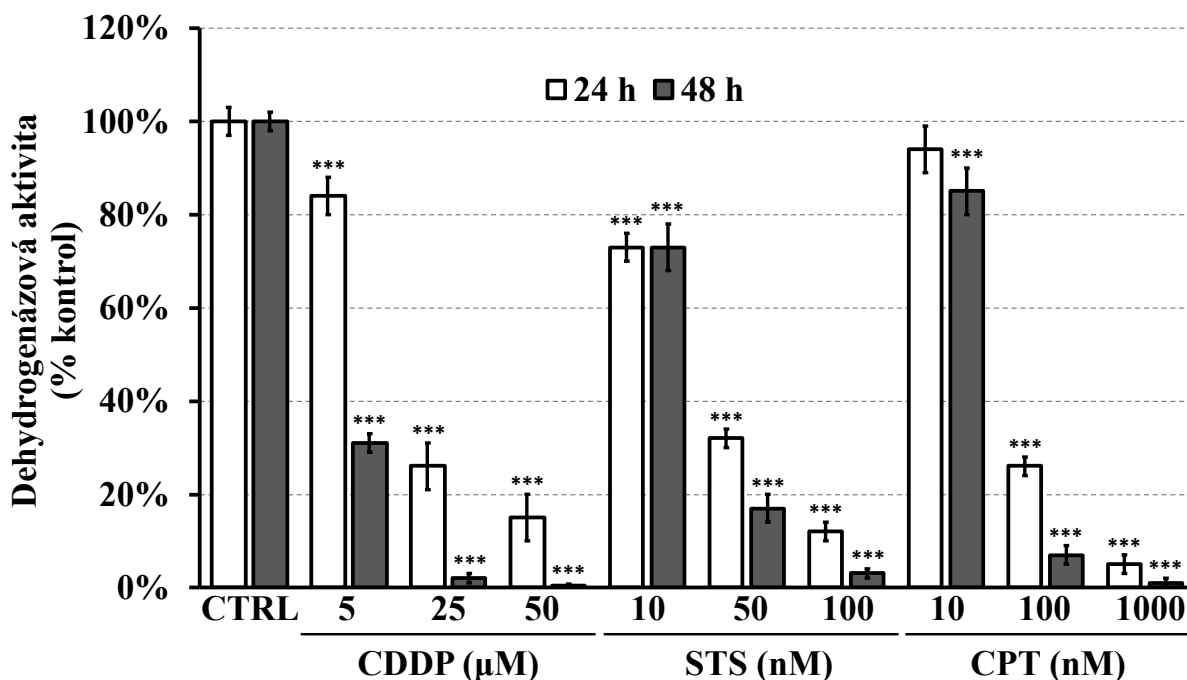


**Graf 1: Vliv vybraných induktorů apoptózy na koncentraci glutathionu buněk Jurkat.** Inkubace 24 a 48 h. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina; 5–50  $\mu\text{M}$ ); STS (staurosporin; 10–100 nM); CPT (kamptotecin; 10–1000 nM). Detekce intenzity fluorescence ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 394/490$  nm) za použití sondy MCB. Intracelulární koncentrace glutathionu vyjádřena jako % kontrolních buněk (=100 %). Průměr  $\pm$  SD ( $n=4-9$ ; \*\*\*,  $p<0,001$ , vs. negativní kontroly v daném časovém intervalu).

Po 24 h inkubace detekujeme statisticky významné snížení GSH vždy pouze u dvou vyšších koncentrací daného toxinu, tj. CDDP (25–50  $\mu\text{M}$ ,  $p<0,001$ ), STS (50–100 nM,  $p<0,001$ ) a CPT (100–1000 nM,  $p<0,001$ ). Po 48 h inkubace je již koncentrace GSH výrazně snížena u všech koncentrací toxinů, mimo 10 nM CPT, kde je koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami naopak zvýšena. K nejvýznamnějšímu poklesu koncentrace GSH došlo po 48 h inkubace buněk s 50  $\mu\text{M}$  CDDP a to o 96 % ( $p<0,001$ ) ve vztahu ke kontrolním buňkám.

## 4.2 Spektrofotometrické stanovení dehydrogenázové aktivity

Buněčné poškození můžeme také částečně charakterizovat detekcí změn aktivity mitochondriálních dehydrogenáz. V našem experimentu jsme za tímto účelem použili metodu WST-1. K testování jsme použili buňky Jurkat ovlivněné 5-50  $\mu\text{M}$  CDDP, 10-1000 nM CPT a 10-100 nM STS. Buňky byly kultivovány s toxiny po dobu 24 a 48 h (graf 2).



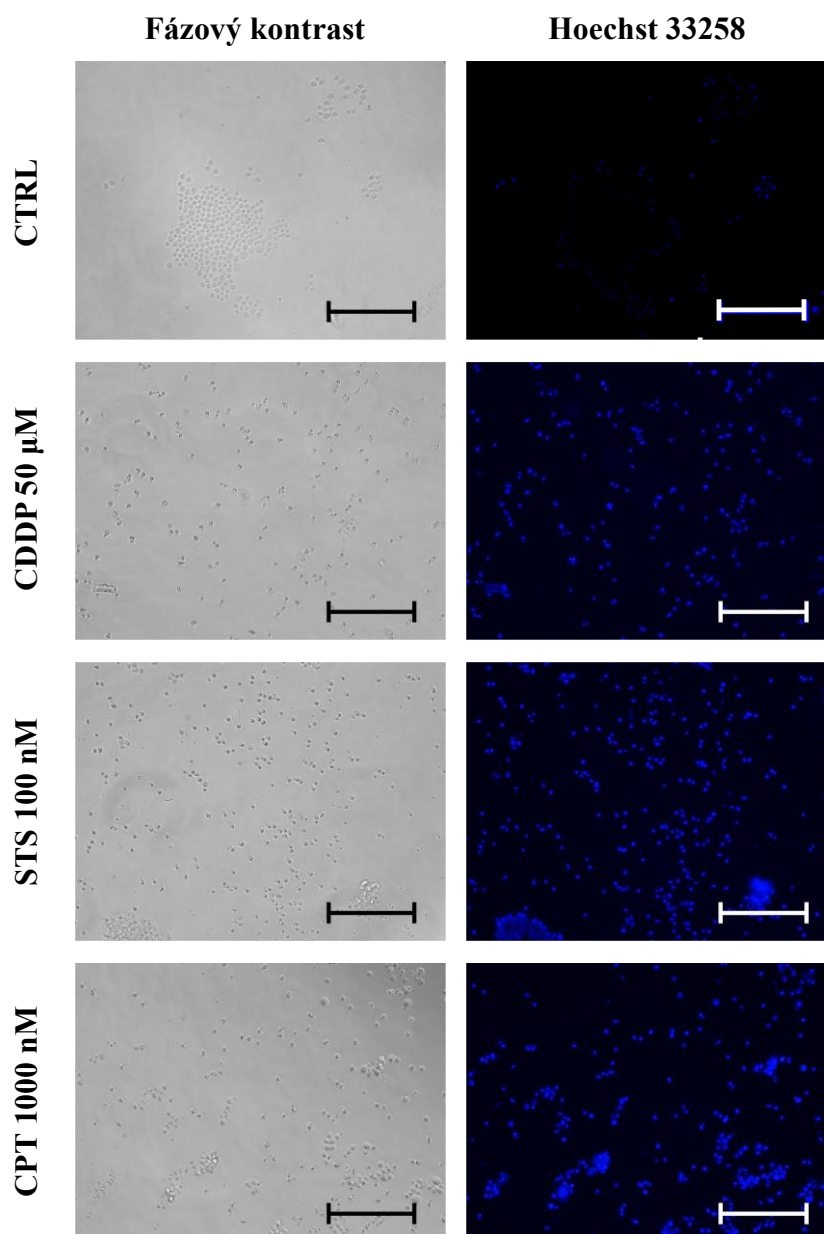
**Graf 2: Vliv vybraných induktorů apoptózy na dehydrogenázovou aktivitu buněk Jurkat.** Inkubace 24 a 48 h. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina; 5-50  $\mu\text{M}$ ); STS (staurosporin; 10-100 nM); CPT (kamptotecin; 10-1000 nM). Detekce absorbance (440 nm) za použití WST-1 tetrazoliové soli. Dehydrogenázová aktivita vyjádřena jako % kontrolních buněk (=100 %). Průměr  $\pm$  SD ( $n=4-9$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ , vs. negativní kontroly v daném časovém intervalu).

Po 24 h inkubace byla dehydrogenázová aktivita buněk Jurkat statisticky významně snížena při použití všech koncentrací CDDP i STS ( $p < 0,001$ ), v případě CPT pouze u koncentrací 100 a 1000 nM ( $p < 0,001$ ). Po 48 h inkubace pak došlo ke snížení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz při použití všech koncentrací testovaných toxinů ( $p < 0,001$ ). K nejvýraznějšímu poklesu došlo stejně jako u předchozího biochemického testu u buněk ovlivňovaných 50  $\mu\text{M}$  CDDP po dobu 48 h, a to o více než 99 % ve vztahu ke kontrolním buňkám.

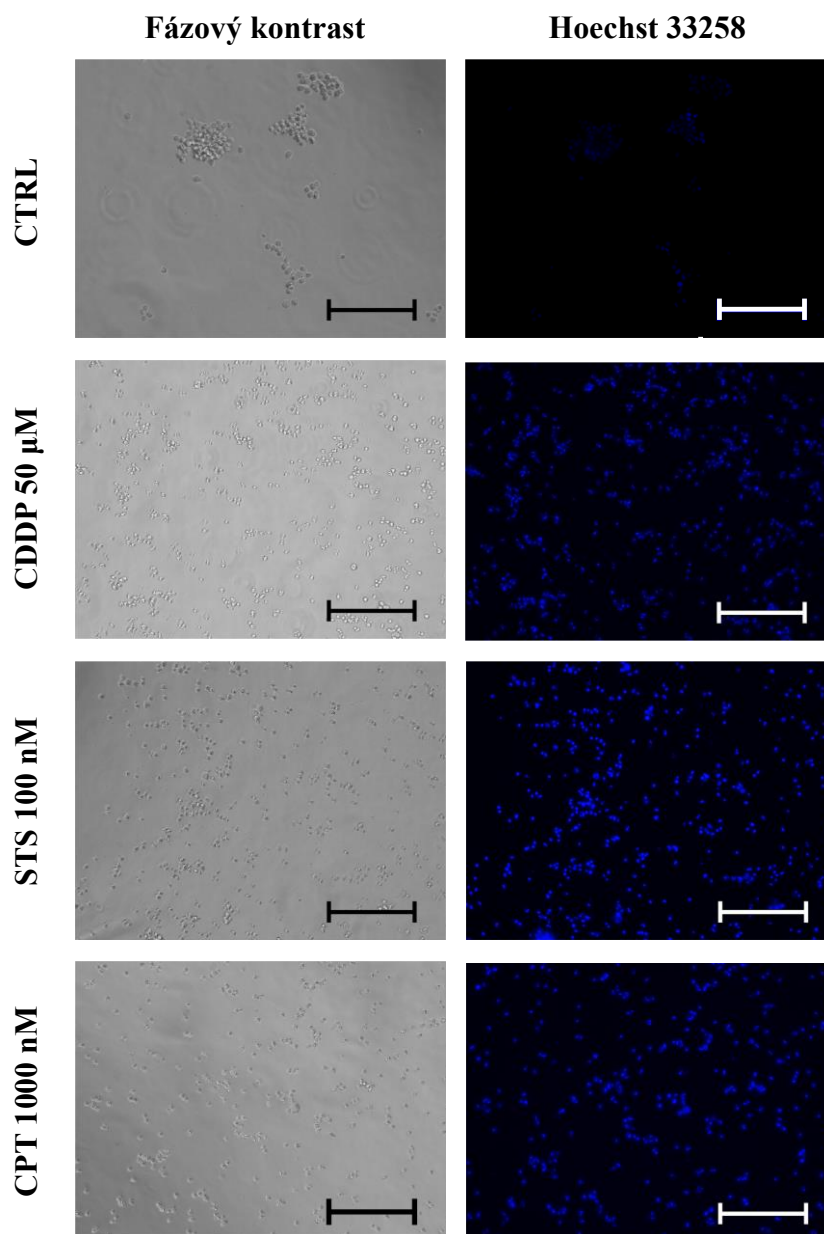
## 4.3 Vizualizace buněk

Pro vizualizaci buněk a jejich jader jsme použili buňky Jurkat inkubované s 50  $\mu\text{M}$  CDDP, 100 nM STS a 1000 nM CPT po dobu 24 h (obrázek 13) a 48 h (obrázek 14). Pro

posouzení morfologických změn buněk jsme využili metody fázového kontrastu a fluorescenční mikroskopie. K fluorescenčnímu značení jader jsme využili sondu HT58, která při vazbě na kondenzovaná a fragmentovaná jádra (tj. i jádra apoptotických buněk) zvyšuje intenzitu emitovaného fluorescenčního záření.



**Obrázek 13: Mikrofotografie buněk Jurkat inkubovaných s induktory apoptózy po 24 h.** První sloupec: fázový kontrast; druhý sloupec: barvení jader sondou HT58. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina); STS (staurosporin); CPT (kamptotecin). Zvětšení 200x, měřítko 100 μm.



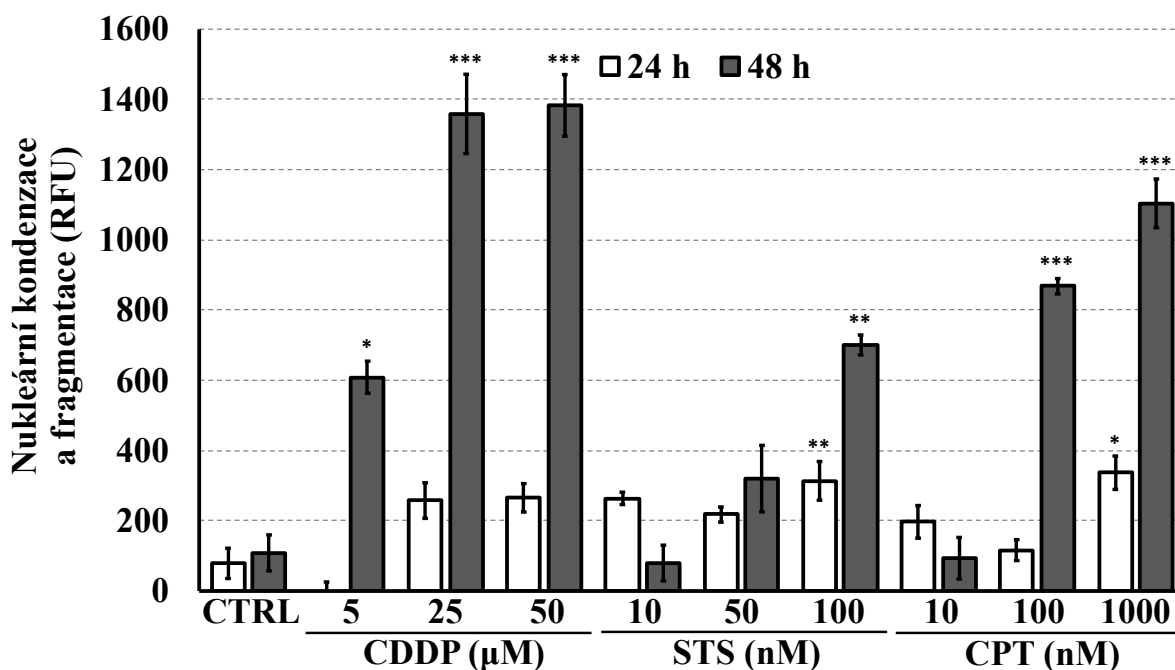
**Obrázek 14: Mikrofotografie buněk Jurkat inkubovaných s induktory apoptózy po 48 h.** První sloupec: fázový kontrast; druhý sloupec: barvení jader sondou HT58. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina); STS (staurosporin); CPT (kamptotecin). Zvětšení 200x, měřítko 100 μm.

U kontrolních buněk jsou na obrázcích 13 i 14 patrné shluky buněk kulovitého tvaru, což je charakteristické pro buněčnou linii Jurkat. Při použití sondy HT58 můžeme u kontrolních buněk pozorovat velmi slabou fluorescenci. Buňky ovlivněné toxiny již ve shlucích nejsou a ztrácejí svůj charakteristický kulovitý tvar. Můžeme pozorovat také kondenzaci jádra a vysokou intenzitu fluorescence při inkubaci se všemi toxiny u obou časových intervalů. Tyto výsledky korelují s výsledky předchozích biochemických testů a s tvrzením, že u kondenzovaných a fragmentovaných jader dochází ke zvýšení intenzity emitovaného fluorescenčního záření sondy HT58.

## 4.4 Optimalizace detekce nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk

### 4.4.1 Standardní metoda Hoechst 33258

K detekci nukleární kondenzace a fragmentace buněk Jurkat ovlivněných různými koncentracemi toxinů (CDDP, 5-50  $\mu\text{M}$ ; CPT, 10-1000 nM a STS, 10-100 nM) v časových intervalech 24 a 48 h jsme použili sondu HT58. Prvotní parametry detekce jsme volili na základě předchozí optimalizované metody založené na sondě HT58 pro adherentní buněčné linie v naší laboratoři (Majtnerová *et al.*, 2021). Po výměně původního kultivačního média za DPBS 1x a 5 min inkubaci se sondou HT58 jsme nejprve k měření využili spodní detekci, přičemž jsme s roztokem po přidání sondy nemíchali (graf 3).



**Graf 3: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace buněk Jurkat.** Inkubace 24 a 48 h. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina; 5-50  $\mu\text{M}$ ); STS (staurosporin; 10-100 nM); CPT (kamptotecin; 10-1000 nM). Detekce intenzity fluorescence ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 352/461$  nm) za použití standardní metody HT58. Detekce v čase 5 min. Nukleární kondenzace a fragmentace vyjádřena v absolutních číslech naměřené intenzity fluorescence. Průměr  $\pm$  SEM (n=3-6; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; vs. negativní kontroly v daném časovém intervalu).

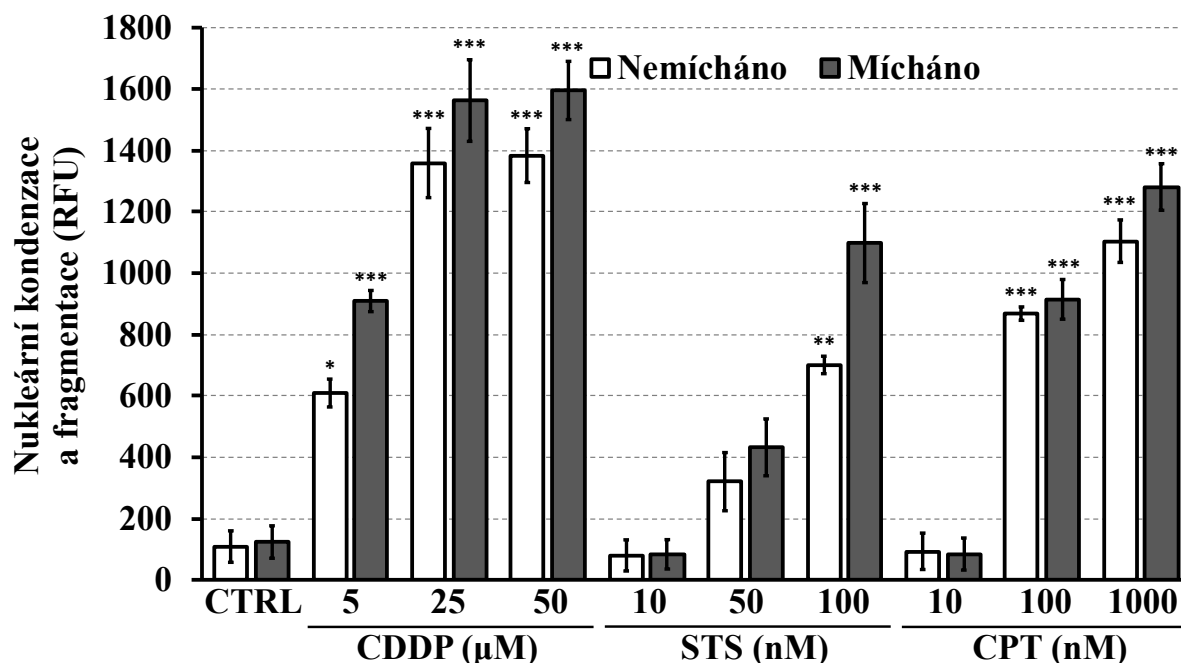
Po 24 h inkubace jsme detekovali statisticky významné zvýšení intenzity fluorescence pouze u 100 nM STS ( $p = 0,008$ ) a 1000 nM C ( $p = 0,015$ ). S rostoucí koncentrací toxinů nedocházelo ke kontinuálnímu zvyšování intenzity emitované fluorescence.



Po 48 h inkubace jsme již detekovali statisticky významné zvýšení intenzity fluorescence u všech použitých koncentrací CDDP (5  $\mu\text{M}$ ,  $p=0,011$ ; 25  $\mu\text{M}$ ,  $p<0,001$ ; 50  $\mu\text{M}$ ,  $p<0,001$ ), nejvyšší použité koncentrace STS ( $p=0,001$ ) a u 100 nM ( $p<0,001$ ) a 1000 nM CPT ( $p<0,001$ ). Intenzita fluorescence sondy HT58 se zvyšující koncentrací jednotlivých toxinů kontinuálně rostla, přičemž nejvíce signifikantní nárůst intenzit fluorescence jsme detekovali při použití CDDP, a to zejména u koncentrací 25 a 50  $\mu\text{M}$ . Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli dále buňky s toxiny inkubovat po dobu 48 h.

#### 4.4.2 Testování vlivu míchání vzorku a směru detekce

Prvním optimalizovaným parametrem v rámci metody HT58 bylo míchání. V závěru inkubace buněk se sondou HT58 jsme roztok zamíchali po dobu 45 s. Výsledky jsme porovnali s výsledky předchozího měření po 48 h inkubace (graf 4).



**Graf 4: Optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky – vliv míchání.** Inkubace buněk Jurkat po dobu 48 h. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina; 5-50  $\mu\text{M}$ ); STS (staurosporin; 10-100 nM); CPT (kamptotecin; 10-1000 nM). Detekce intenzity fluorescence ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 352/461$  nm) za použití modifikované metody HT58. Detekce v čase 5 min. Nukleární kondenzace a fragmentace vyjádřena v absolutních číslech naměřené intenzity fluorescence. Průměr  $\pm$  SEM ( $n=3-6$ ; \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ , \*\*\*,  $p<0,001$ ; vs. negativní kontroly v daném časovém intervalu).

Po 48 h inkubace buněk s toxiny jsme u míchaných vzorků zaznamenali signifikantní nárůst intenzit fluorescence u všech použitých koncentrací CDDP, 100 nM STS a 100 nM

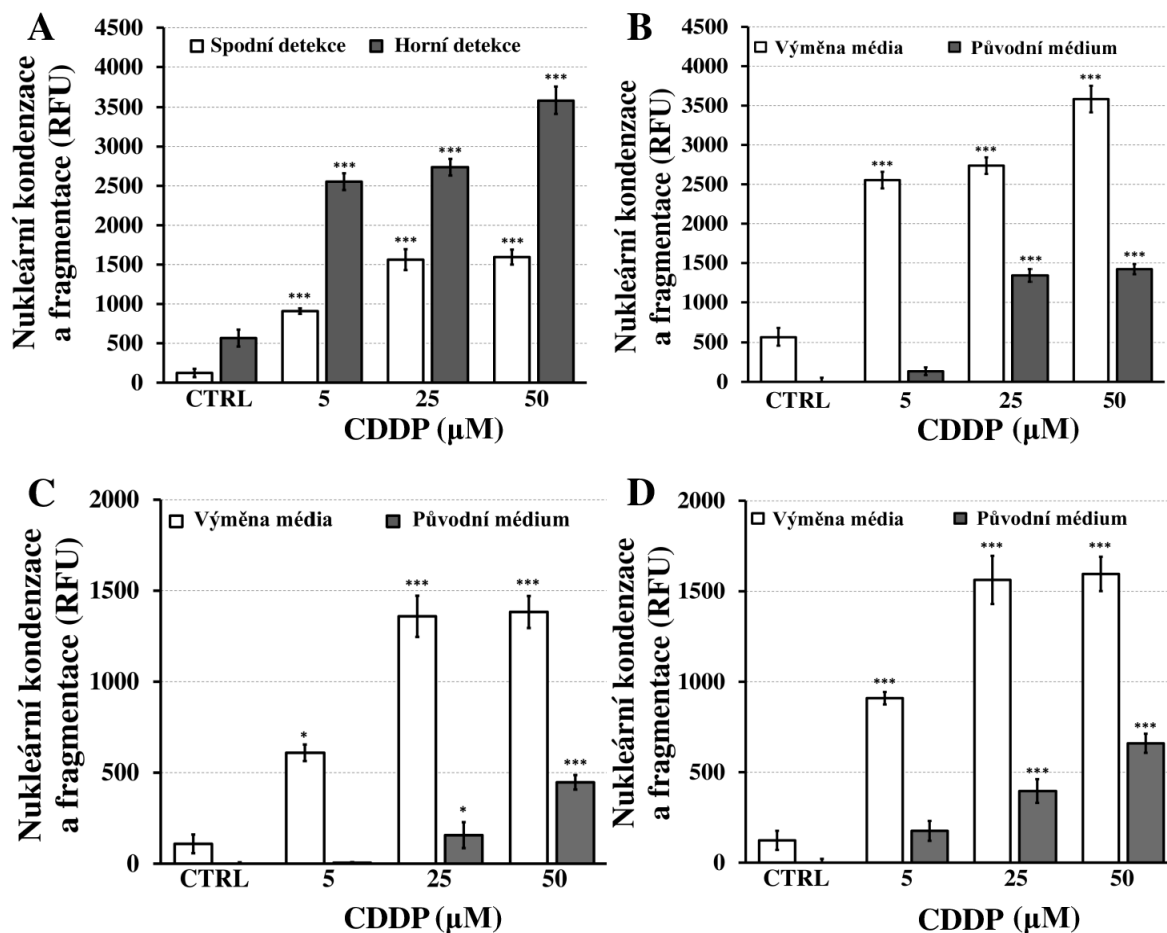
a 1000 nM CPT. V porovnání s nemíchanými vzorky jsme u vzorků míchaných obecně naměřili vyšší intenzity fluorescence (výjimku tvoří 10 nM CPT). Hodnoty SEM jsou pak u míchaných i nemíchaných vzorků také srovnatelné (výjimkou je 100 nM STS).

Pokračovali jsme testováním vlivu směru detekce. Buňky jsme opět inkubovali po dobu 48 h s toxiny – vzhledem ke stejnému trendu výsledků měření se všemi toxiny jsme v tomto případě využili pouze 5-50  $\mu$ M CDDP, jejíž intenzita fluorescence byla napříč všemi zkoumanými parametry měření nejvyšší. Před samotným měřením jsme buňkami opět po dobu 45 s míchali a k měření intenzity fluorescence jsme využili horní detekci. Výsledky měření jsme porovnali s příslušnými výsledky předchozího měření (s výsledky vzorků, kterými bylo mícháno a využili jsme u nich spodní detekci) (graf 5A).

Po 48 h inkubace buněk Jurkat s CDDP detekujeme statisticky významné zvýšení intenzity fluorescence u všech použitých koncentrací CDDP jak v případě horní, tak v případě spodní detekce ( $p < 0,001$ ). Naměřená intenzita fluorescence při použití horní detekce je však v porovnání se spodní detekcí více než dvojnásobná téměř u všech použitých koncentrací toxinu. Hodnoty SEM jsou pro obě měření srovnatelné.

#### **4.4.3 Testování vlivu složení roztoku**

V posledním kroku jsme testovali vliv složení roztoku na detekci. Po 48 h inkubace buněk Jurkat s 5-50  $\mu$ M CDDP jsme buňky tentokrát ponechali v původním kultivačním médiu RPMI 1640 a sledovali tak jeho vliv na měření. Intenzitu fluorescence jsme měřili za využití všech dosud testovaných parametrů, tj. roztoky nemíchané s využitím spodní detekce, míchané s využitím spodní detekce a míchané s využitím horní detekce. Výsledky jsme opět porovnali s příslušnými výsledky vzorků, jejichž kultivační médium jsme nahradili DPBS 1x (graf 5B, 5C a 5D).



**Graf 5: Optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky – vliv směru detekce a složení roztoku.** A - vliv směru detekce; B - vliv výměny média, míchaný vzorek, horní detekce; C – vliv výměny média, nemíchaný vzorek, spodní detekce; D – vliv výměny média; míchaný vzorek, spodní detekce. Inkubace buněk Jurkat po dobu 48 h. CTRL (kontrolní buňky); CDDP (cisplatina; 5-50 μM). Detekce intenzity fluorescence ( $\lambda_{ex/em} = 352/461$  nm) za použití modifikované metody HT58. Detekce v čase 5 min. Nukleární kondenzace a fragmentace vyjádřena v absolutních číslech naměřené intenzity fluorescence. Průměr  $\pm$  SEM (n=3-6; \*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ; vs. negativní kontroly v daném časovém intervalu).

Naměřená intenzita fluorescence buněk v původním kultivačním médiu byla u všech použitých parametrů měření mnohonásobně nižší než u buněk po výměně média. Se zvyšující koncentrací CDDP se tento rozdíl v naměřených intenzitách fluorescence snižoval. Statisticky významné zvýšení intenzity fluorescence jsme u buněk v původním médiu detekovali pouze po inkubaci s 25 ( $p=0,039$ ,  $p < 0,001$ ) a 50 μM CDDP ( $p < 0,001$ ). Z výsledku je patrné, že je detekce v původním médiu méně citlivá.

## 5 DISKUZE

Apoptóza je jedním z typů programované buněčné smrti. Nadměrná či snížená aktivace procesu apoptózy je rysem mnoha patologických stavů a schopnost její modulace má velký léčebný potenciál. Výzkum apoptózy se tak stal cílem mnoha vědeckých studií a zájem o její výzkum se stále zvyšuje (*Elmore, 2007*).

Během apoptózy dochází k řadě morfologických a biochemických změn, které je možné využít k její detekci. K těmto změnám patří mimo jiné nukleární kondenzace a fragmentace. K detekci těchto jaderných změn je hojně využívána fluorescenční mikroskopie. Ke značení jader jsou používány fluorescenční sondy, které se vážou na DNA, a jádro je tak možné vizualizovat. Takovou sondou je např. sonda Hoechst 33258 (HT58) vyvinutá německou společností Hoechst AG na počátku 70. let 20. století. Sonda HT58 zvyšuje intenzitu své fluorescence při vazbě na A-T páry bazí kondenzovaných a fragmentovaných jader buněk. Příčina zvýšení intenzity fluorescence (IF) sondy HT58 je nejasná – v literatuře je nejčastěji popisována možnost vlivu změny konformace DNA, snížené funkce transmembránových proteinů a změny permeability plazmatické membrány při apoptóze (*Ormerod et al, 1993*).

Fluorescenční sondu HT58 využívá i metoda HT58 vyvinutá v naší laboratoři, která umožňuje kvantitativní spektrofluorimetrickou detekci nukleární kondenzace a fragmentace (*Majtnerová et al, 2021*). Cílem této diplomové práce bylo zavedenou metodu HT58 optimalizovat pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk.

Pro optimalizaci metody HT58 jsme zvolili suspenzní buněčnou linii Jurkat. Jedná se o buněčnou linii lymfoblastomu odvozenou z lidských T-lymfocytů, která je hojně využívána pro výzkum apoptózy (*Scarlett et al, 2000; Penna et al, 2012; Qiu et al, 2020; Mallya et al, 2021*). K indukci apoptózy u buněk Jurkat jsme v naší studii použili kamptotecin (CPT), cisplatinu (CDDP) a staurosporin (STS). CPT je cytotoxický rostlinný alkaloid, jehož deriváty se využívají jako protirakovinné léčivo. Mechanismus účinku CPT je založen na inhibici topoizomerázy I v S fázi buněčného cyklu (*Li et al, 2017*). CDDP je jedním z nejpoužívanějších chemoterapeutik. Po vstupu do buňky vzniká kladně nabitý elektrofil, který se váže na N7 dusík purinových bazí DNA, což brání replikaci DNA a vede k zástavě buněčného cyklu (*Dasari et al, 2014*). STS je nespecifický inhibitor proteinkináz, který byl poprvé izolován z bakterie *Streptomyces staurosporeus* v Japonsku v roce 1977. Použití jeho cytotoxického účinku na léčbu rakoviny je však limitováno jeho toxicitou pro okolní fyziologické buňky (*Cartuche et al, 2019*).

Koncentrace toxinů pro naši práci jsme volili dle literatury tak, aby byla námi zvolená koncentrace dostatečná k indukci apoptózy u suspenzních buněk. CPT jsme použili v koncentraci 10, 100 a 1000 nM (*Johnson et al, 1997*); CDDP 5, 25 a 50  $\mu\text{M}$  (*Tacka et al, 2004; Ikeda et al, 2003*) a STS 10, 50 a 100 nM (*Beltrán et al, 2000; Ullal et al, 2010*). Buňky byly inkubovány s toxiny v 96jamkových mikrotitračních destičkách, denzitu buněk jsme volili na základě zkušeností z naší laboratoře a v závislosti na použité metodě.

Prvním testem, který jsme zvolili pro detekci biochemických změn v buňce vlivem zvolených toxinů byla fluorimetrická metoda stanovení intracelulární koncentrace GSH pomocí sondy MCB. Během apoptotického procesu vznikají reaktivní formy kyslíku, což má za následek vyčerpání hlavního buněčného antioxidantu GSH. Dochází také k poškození mitochondrií, které jsme následně detekovali pomocí WST-1 testu. Metoda WST-1 je spektrofotometrická metoda sloužící ke stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz. Denzitu buněk jsme volili na základě zkušeností z naší laboratoře, a to  $20 \times 10^3$  buněk Jurkat na jamku, buňky jsme s toxiny inkubovali po dobu 24 a 48 h.

Po 24 h inkubace buněk s toxiny jsme detekovali významné snížení hladiny GSH při použití 25  $\mu\text{M}$  ( $45 \pm 6$  % koncentrace GSH kontrolních buněk) a 50  $\mu\text{M}$  CDDP ( $17 \pm 7$  % koncentrace GSH kontrolních buněk). Velmi podobného výsledku dosáhli ve studii Čapek et al (2017) při 24 h inkubace proximálních tubulárních epitelových buněk HK-2 s 30  $\mu\text{M}$  (64 % koncentrace GSH kontrolních buněk) a 50  $\mu\text{M}$  CDDP (15 % koncentrace GSH kontrolních buněk). Ke stanovení použili také MCB sondu. Dále jsme detekovali významnou depleci hladiny GSH u buněk inkubovaných po dobu 24 h s 100 a 1000 nM CPT, 50 a 100 nM STS. Kim et al ve své studii (2007) kolorimetricky stanovili účinek 100 nM STS na intracelulární koncentraci GSH v buňkách SH-SY5Y. K signifikantnímu snížení hladiny GSH došlo již po 12 h inkubac s toxinem.

Po 48 h inkubace s toxiny jsme již zaznamenali signifikantní snížení hladiny GSH u všech testovaných koncentrací mimo 10 nM CPT, kde je hladina GSH zvýšena. Tento výsledek může být způsoben přechodným zvýšením hladiny GSH v reakci na zvýšení hladiny ROS. K podobným výsledkům došli ve studii Lauricella et al (2001), kteří využili 50 nM CPT (inkubace 48 h) ke zkoumání jeho účinku na oxidativní stres Saos-2 buněk, přičemž po 48 h inkubace nedetekovali významnou změnu intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami. Použili však také 100 nM CPT – po inkubaci také nedetekovali signifikantní změnu hladiny GSH v buňce. Tento výsledek s naší prací již nekoreluje. Příčinou odlišného výsledku může být použití jiných buněk. Suspenzní buněčné linie ve své studii využili Kumar et al (2015). Konkrétně se jednalo o 3 linie buněk akutní promyeloidní leukémie

(HL-60, NB4 a KG-1a), které inkubovali po dobu 48 h s různými koncentracemi CDDP a následně spektrofotometricky stanovili hladinu GSH. V této studii depleci GSH detekovali také po inkubaci s 5  $\mu\text{M}$  CDDP, signifikantní depleci GSH až při použití 20  $\mu\text{M}$  CDDP ( $p < 0,05$ ).

Výsledky WST-1 testu odhalily kontinuální signifikantní pokles mitochondriální aktivity dehydrogenáz po 24 h i 48 h inkubace se všemi koncentracemi toxinů v závislosti na délce inkubace a koncentraci toxinu. Výjimkou byly pouze buňky inkubované po dobu 24 h s 10 nM CPT, kde k signifikantní redukci aktivity dehydrogenáz nedošlo. Podobné výsledky jsou popsány i v dalších studiích. Například ve studii Ding et al (2017) zkoumali vliv STS na buňky hepatocelulárního karcinomu HepG2. Po 24 h inkubace s 10 nM a 50 nM STS detekovali signifikantní pokles dehydrogenázové aktivity (cca 75 %, 40 % aktivity kontrolních buněk,  $p < 0,01$ ). K detekci dehydrogenázové aktivity však nepoužili WST-1 test, nýbrž test MTT. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) test je založen na stejném principu, jako WST-1 test. Oproti WST-1 testu vzniká působením mitochondriálních dehydrogenáz ve vodě nerozpustný formazan (*Ghasemi et al, 2021*). Zare-Mirakabadi et al (2012) ve své studii zkoumali vliv CPT na nejznámější buněčnou linii HeLa. Při koncentraci 0,003  $\mu\text{g/mL}$  (cca 8,6 nM) CPT nedetekovali po 48 h inkubace signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity. Při použití 0,05  $\mu\text{g/mL}$  (cca 143,5 nM) CPT již signifikantní snížení detekovali. K detekci využili také test MTT. WST-1 test použili ke studiu účinků CDDP na buněčnou linii lidského neuroblastomu Kelly Serinan et al (2018). Po 48 h inkubace buněk s 20  $\mu\text{M}$  CDDP detekovali 50% pokles dehydrogenázové aktivity buněk. V naší práci jsme po 48 h inkubace buněk Jurkat s 25  $\mu\text{M}$  CDDP detekovali výraznější snížení dehydrogenázové aktivity, a to o 98 % ve srovnání s aktivitou kontrolních buněk. Příčinou odlišných výsledků mohlo být použití jiné buněčné linie.

K posouzení morfologických změn buněk Jurkat jsme následně použili světelnou mikroskopii s fázovým kontrastem, k posouzení morfologických změn jádra pak fluorescenční mikroskopii za použití sondy HT58. Buňky byly ovlivněny 50  $\mu\text{M}$  CDDP, 1000 nM CPT a 100 nM STS a inkubovány po dobu 24 a 48 h. Densita buněk byla opět  $20 \times 10^3$  buněk na jamku.

Po inkubaci buněk se všemi toxiny u obou časových intervalů jsme pozorovali ztrátu charakteristické morfologie buněk Jurkat – buňky zmenšily svůj objem, ztratily charakteristický kulovitý tvar a netvořily shluky. Při vizualizaci jádra metodou fluorescenční mikroskopie a u buněk inkubovaných s toxiny zaznamenali zvýšení intenzity fluorescence sondy HT58 v porovnání s buňkami kontrolními v obou časových intervalech, což může být

známkou apoptotického procesu. Potvrdili jsme tedy, že jsou námi zvolené toxiny vhodné k indukci nukleární kondenzace u buněk Jurkat.

Posledním krokem byla samotná optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky. Buňky Jurkat kultivované v médiu RPMI 1640 jsme následně inkubovali v 96jamkových mikrotitračních destičkách v denzitě  $40 \times 10^3$  buněk na jamku s induktory apoptózy – 5-50  $\mu\text{M}$  CDDP, 10-100 nM STS a 10-1000 nM CPT. Pro inkubaci buněk jsme zvolili stejný časový interval jako u MCB a WST-1 testu, tedy 24 a 48 h. K prvotnímu měření jsme použili původní parametry metody HT58, tj. část původního kultivačního média RPMI 1640 jsme vyměnili za DPBS 1x (mikrotitrační destičku jsme před výměnou centrifugovali, abychom suspenzní buňky dostali na dno destičky a neodsáli je tak spolu s médiem), přidali jsme 10  $\mu\text{L}$  sondy HT58 tak, abychom dosáhli finální koncentrace 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HT58 v jamce a po 5min inkubaci se sondou HT58 detekovali nukleární kondenzaci a fragmentaci charakterizovanou zvýšením IF ve vztahu ke kontrolním buňkám. K měření jsme využili spodní detekci a s buňkami nemíchali (Majtnerová et al, 2021).

Po 24 h inkubace buněk nevykazovala IF kontinuální nárůst závislý na koncentraci námi použitých toxinů. U CDDP jsme detekovali mírný nárůst IF u 25 a 50  $\mu\text{M}$  CDDP, přičemž IF byla u obou koncentrací srovnatelná. Mírné zvýšení IF jsme detekovali také u 10 a 50 nM STS, výraznější nárůst pak u 100 nM STS. Po inkubaci s CPT jsme detekovali mírné zvýšení u 10 nM CPT, naopak u 100 nM jsme zvýšení IF nedetekovali. Výraznější nárůst jsme detekovali u 1000 nM CPT. Po 48 h inkubace jsme již detekovali signifikantní nárůst IF u všech koncentrací CDDP, 50 a 100 nM STS a 100 a 1000 nM CPT. Naše výsledky jsou podobné mnohým studiím, ale v literatuře byly také nalezeny studie, které se svými výsledky liší.

Bennukul et al (2014) nukleární kondenzaci detekovali pomocí fluorescenční mikroskopie a sondy DAPI u buněk HepG2 po 48 h inkubace s 20  $\mu\text{M}$  CDDP. Studie Ishibashi et al (1998) prokázala nukleární kondenzaci stejnou metodou u buněk HeLa po 48 h inkubace již s 0,5  $\mu\text{M}$  CDDP. Tyto výsledky potvrzují naše výsledky, kdy jsme u buněk Jurkat detekovali signifikantní zvýšení IF po 48 h inkubace již s 5  $\mu\text{M}$  CDDP.

Amstad et al (2001) ve své studii pomocí fluorescenční mikroskopie a sondy Hoechst 33342 zaznamenali nukleární kondenzaci u buněk Jurkat již po 3 h inkubaci s 1  $\mu\text{M}$  STS. Podobně ve studii Johnson et al (2000) detekovali nukleární kondenzaci a fragmentaci pomocí fluorescenční mikroskopie a sondy Hoechst 33358 u buněk Jurkat po 3 h inkubaci s 500 nM STS. Časový interval inkubace buněk Jurkat se STS byl v těchto studiích (Amstad et al, 2001; Johnson et al, 2000) 8x, resp. 16x nižší, zároveň však koncentrace toxinu byla alespoň 5x vyšší

než v této práci. Ke komparaci s metodou HT58 bychom tedy museli použít kratší časový interval inkubace s toxiny.

Metodou využívanou k detekci DNA fragmentace je metoda TUNEL. Metoda TUNEL využívá enzymu terminální deoxynukleotidyl transferázy, který rozpoznává místa zlomů v řetězci DNA a katalyzuje připojení značeného deoxyuridintrifosfátu na volný -OH konec těchto zlomů (*Majtnerová et al, 2018*). Lin et al (2017) ve své studii detekovali fragmentaci DNA pomocí metody TUNEL u buněk 5637 a T24 (buňky karcinomu močového měchýře) po 24 h inkubace s 6,25-100  $\mu\text{M}$  CDDP. Výsledky studie Baek et al (2003) byly obdobné – fragmentaci DNA detekovali pomocí metody TUNEL u buněk králičích renálních tubulárních epitelii po 18 h inkubace s 50  $\mu\text{M}$  CDDP. Tyto výsledky korelují s výsledky našeho experimentu. Naproti tomu Liu et al (2008) detekovali DNA fragmentaci pomocí metody TUNEL u lidských buněk bronchiálního epitelu BEAS-2B již po 4 h inkubace s 500 nM CPT, Johnson et al (1997) a Henery et al (2008) ve svých studiích detekovali DNA fragmentaci pomocí metody TUNEL u buněk Jurkat již po 3 h inkubace s 1000 nM CPT. V našem experimentu jsme nukleární kondenzaci a fragmentaci po 24 h inkubace buněk s 100 nM CPT nedetekovali, ovšem s 1000 nM CPT jsme již fragmentaci detekovali. Odlišný byl i výsledek Jirsové et al (2006), kteří naopak nedetekovali DNA fragmentaci metodou TUNEL u Schwannových buněk po 24 h inkubace s 25  $\mu\text{M}$  CDDP. TUNEL pozitivní buňky detekovali až po 48 h inkubace buněk s toxinem. Kometová metoda v jejich studii však odhalila nukleární kondenzaci již po 24 h inkubace s 1,5  $\mu\text{M}$  CDDP.

Výsledky výše diskutovaných studií využívajících metodu TUNEL jsou rozdílné, avšak nejednoznačně z nich vyplývá srovnatelná citlivost původní metody HT58 při detekci nukleární kondenzace a fragmentace u buněk Jurkat s metodou TUNEL a s metodou fluorescenční mikroskopie. Kometová metoda se zdá být citlivější. Parametrů, na kterých citlivost metody závisí je však mnoho, od různé citlivosti různých buněk (imortalizované vs. nádorové atd.) až po rozdílný pracovní postup mezi laboratořemi. Pro detailnější komparaci metody HT58 s ostatními metodami by bylo zapotřebí použít kratší časový interval inkubace s toxiny a buňky ovlivnit vyššími koncentracemi CPT a především STS.

Pro optimalizaci metody jsme se následně rozhodli buňky s toxiny inkubovat po dobu 48 h, kdy jsme při použití původních parametrů metody HT58 detekovali kontinuální nárůst IF u všech testovaných toxinů.

V rámci optimalizace metody HT58 jsme nejprve testovali vliv míchání roztoku. Buňky Jurkat jsou suspenzní buňky tvořící charakteristické shluky. Míchání buněk Jurkat je tedy žádoucí, protože jím lze docílit rovnoměrné distribuce buněk v médiu. Buňky jsme tedy těsně



před uplynutím inkubační doby se sondou HT58 po dobu 45 s míchali. Ostatní parametry jsme ponechali stejné jako u původní metody HT58.

Výsledky optimalizace odhalily vyšší IF než u standardní metody HT58 u všech použitých toxinů, mimo 10 nM CPT. IF kontinuálně rostla v závislosti na koncentraci jednotlivých toxinů, avšak ani tato optimalizace nedetekovala zvýšení IF u 10 nM STS a 10 nM CPT ve srovnání s kontrolními buňkami. Nejvyšší IF jsme naměřili při použití CDDP, obzvláště pak 25 a 50  $\mu\text{M}$  CDDP, a proto jsme se rozhodli v následujících optimalizačních krocích využít již pouze CDDP.

Dalším krokem naší diplomové práce byla optimalizace směru detekce. Dle internetových stránek firmy Berthold Technologies vyrábějící laboratorní přístroje je horní detekce senzitivnější než detekce spodní. Příčinou této vyšší senzitivity je rozptýl a zeslabení intenzity procházejícího světelného paprsku plastovým dnem destičky při užití spodní detekce (*Berthold Technologies GmbH & Co. KG., 2021*). Toto však neplatí pro adherentní buňky, u kterých je užití spodní detekce žádoucí.

K měření jsme využili parametry předešlého kroku optimalizace, tedy jsme buňky opět míchali a k samotnému měření využili horní detekci.

Naměřená IF byla při použití 5  $\mu\text{M}$  CDDP téměř trojnásobná ve srovnání s výsledky měření buněk míchaných s využitím detekce spodní. Při použití 25 a 50  $\mu\text{M}$  CDDP byla pak naměřená IF cca dvojnásobná v porovnání se spodní detekcí. Zároveň jsme však v tomto optimalizačním kroku nedetekovali vyšší rozdíl v signálu buněk ovlivněných 5  $\mu\text{M}$  CDDP ve vztahu k buňkám kontrolním. Výsledky tohoto kroku optimalizace potvrdily vyšší senzitivitu horní detekce.

Nakonec jsme testovali vliv složení roztoku resp. vliv původního kultivačního média RPMI 1640 na detekci nukleární kondenzace a fragmentace. Kultivační média obsahují řadu sloučenin, které mohou interferovat s poměrem fluorescenčního signálu k pozadí. Za tímto účelem jsme opakovali všechny optimalizační kroky, ale buňky jsme ponechali v původním kultivačním médiu.

Sonda HT58 u buněk v původním kultivačním médiu vykazovala až osmkrát nižší IF než u buněk v médiu DPBS 1x. IF u kontrolních buněk byla až pod mezí detekce, téměř nedetekovatelný byl také signál nemíchaných buněk ovlivněných 5  $\mu\text{M}$  CDDP měřený s využitím spodní detekce. V ostatních případech bylo však možné detekovat zvýšení IF při použití všech koncentrací CDDP. IF rostla kontinuálně s koncentrací CDDP. Zjistili jsme tedy, že je možné nukleární kondenzaci a fragmentaci detekovat i v původním kultivačním médiu.

## 6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla optimalizace zavedené metody HT58 pro suspenzní buňky. Metoda HT58 je kvantitativní spektrofluorimetrická metoda detekující nukleární kondenzaci a fragmentaci za použití zmíněné fluorescenční sondy HT58. K optimalizaci jsme využili suspenzní buněčnou linii Jurkat, kterou jsme inkubovali ve dvou časových intervalech s modelovými toxickými látkami – cisplatinou, kamptotecinem a staurosporinem.

Pro charakterizaci buněčné viability po 24 a 48 h inkubace se zvolenými toxiny jsme nejprve stanovili změnu intracelulární koncentrace glutathionu metodou MCB a změnu aktivity mitochondriálních dehydrogenáz metodou WST-1. Následně jsme po inkubaci buněk se stejnými toxiny detekovali nukleární kondenzaci a fragmentaci původní metodou HT58. Výsledky WST-1 a MCB testu korelovaly s výsledky metody HT58. U buněk, u kterých jsme detekovali snížení koncentrace glutathionu a aktivity dehydrogenáz jsme téměř vždy detekovali také nukleární kondenzaci a fragmentaci. Nejvýraznější změny IF ve vztahu ke kontrolním buňkám jsme detekovali při použití cisplatiny.

Dalším krokem byla samotná optimalizace metody HT58 pro suspenzní buňky. Za účelem optimalizace jsme testovali řadu parametrů, mimo jiné jimi byly vliv směru detekce a vliv míchání. Z výsledků optimalizace bylo patrné, že nejvyšší intenzitu fluorescence vykazovala sonda HT58 u buněk, kterým jsme před měřením vyměnili kultivační médium za DPBS 1x, po dobu 45 jimi míchali a použili u nich horní detekci. Metoda HT58 v této podobě byla pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace u suspenzních buněk v našem uspořádání nejvhodnější. Poměr mezi intenzitou fluorescence u buněk inkubovaných s toxiny a buněk kontrolních byl však u všech použitých parametrů srovnatelný. Závěrem lze říci, že nukleární kondenzaci a fragmentaci bylo možné u suspenzní buněčné linie Jurkat detekovat jak při použití původní metody HT58 pro adherentní buňky, tak po optimalizaci všech testovaných parametrů detekce.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- Abraham, R. a Weiss, A.: Jurkat T cells and development of the T-cell receptor paradigm. *Nature reviews. Immunology*, 4, 301-308. 2004. doi: 10.1038/nri1330.
- Amstad, P., Yu, G. B., Johnson, G. A., Lee, B., Dhawan, S. K. a Phelps, D. J.: Detection of Caspase Activation In Situ by Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors. *BioTechniques*, 31(3), 608–616. 2001. doi: 10.2144/01313pf01.
- Arduengo, M.: Detecting Apoptosis. *Promega connections*. 2013.
- Azqueta, A., Arbillaga, L., De Cerain, A. L. a Collins, A.: Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis*, 28(3), 271-277. 2013. doi: 10.1093/mutage/get002.
- Baek, S. Y., Kwon, C. H., Kim, J. N., Woo, J. H., Jung, J. H. a Kim, Y. J.: Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 142(3), 178–186. 2003. doi: 10.1016/S0022-2143(03)00111-2.
- Bailly, C., Colson, P., Hénichart, J. P. a Houssier, C.: The Different Binding Modes of Hoechst 33258 to DNA Studied by Electric Linear Dichroism. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3705–3709. 1993. doi: 10.1093/nar/21.16.3705.
- Banerjee, D. a Pal, S. K.: Dynamics in the DNA recognition by DAPI: exploration of the various binding modes. *The journal of physical chemistry B*, 112(3), 1016–1021. 2008. doi: 10.1021/jp077090f.
- Banfalvi, G.: Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 22(2), 306–323. 2017. doi: 10.1007/s10495-016-1333-3.
- Belloc, F., Dumain, P., Boisseau, M. R., Jalloustre, C., Reiffers, J., Bernard, P. a Lacombe, F.: A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry*, 17(1), 59–65. 1994. doi: 10.1002/cyto.990170108.
- Beltrán, B., Mathur, A., Duchon, M. R., Erusalimsky, J. D. a Moncada, S.: The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14602–14607. 2000. doi: 10.1073/pnas.97.26.14602.
- Bennukul, K., Numkliang, S. a Leardkamolkarn, V.: Melatonin attenuates cisplatin-induced HepG2 cell death via the regulation of mTOR and ERCC1 expressions. *World Journal of Hepatology*, 6(4), 230-242. 2014. doi: 10.4254/wjh.v6.i4.230.
- Berghe, T. V., Kalai, M., Denecker, G., Meeus, A., Saelens, X., Vandenabeele, P.: Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not. *Cellular Signalling*, 18(3), 328-335. 2006. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.003.
- Bharatham, N., Chi, SW. a Yoon, H. S.: Molecular basis of Bcl-X(L)-p53 interaction: insights from molecular dynamics simulations. *PloS One*, 6(10). 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0026014.
- Bihonegn, T.: Fluorescence Microscope: A Review Article. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*, 44, 18-25. 2018.
- Billard, C.: Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 5(2), 309–325. 2014. doi: 10.18632/oncotarget.1480.

- Boutorine, A. S., Novopashina, D. S., Krasheninina, O. A., Nozeret, K., Venyaminova, A. G.: Fluorescent Probes for Nucleic Acid Visualization in Fixed and Live Cells. *Molecules*, 18(12), 15357-15397. 2013. doi: 10.3390/molecules181215357.
- Bucevičius, J., Lukinavičius, G., Gerasimaitė, R.: The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors*, 6(2), 18. 2018. doi: 10.3390/chemosensors6020018.
- Camargo, F. D., Ramos, C. A., Goodell, M. A.: Handbook of Stem Cells, 329-336. Academic Press. 2004. doi: 10.1016/B978-012436643-5/50121-8.
- Carneiro, B. A. a El-Deiry, W. S.: Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(7), 395–417. 2020. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- Cartuche, L., Sifaoui, I., Cruz, D., Reyes-Batlle, M., López-Arencibia, A., Javier Fernández, J., Díaz-Marrero, A. R., Piñero, J. E. a Lorenzo-Morales, J.: Staurosporine from *Streptomyces sanyensis* activates Programmed Cell Death in *Acanthamoeba* via the mitochondrial pathway and presents low in vitro cytotoxicity levels in a macrophage cell line. *Scientific Reports*, 9(1), 11651. 2019. doi: 10.1038/s41598-019-48261-7.
- Collins, S. J.: The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood*, 70(5), 1233–1244. 1987. doi: 10.1182/blood.V70.5.1233.1233.
- Croft, D. R., Coleman, M. L., Shuixing, L., Robertson, D., Sullivan, T., Stewart, C. L., Olson, M. F.: Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *The journal of cell biology*, 168(2), 245–255. 2005. doi: 10.1083/jcb.200409049.
- Čapek, J., Hauschke, M., Brůčková, L. a Roušar, T.: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 88(1), 40–45. 2017. doi: 10.1016/j.vascn.2017.06.001.
- D'Alimonte, I., Ballerini, P., Nargi, E., Buccella, S., Giuliani, P., Di Iorio, P., Caciagli, F. a Ciccarelli, R.: Staurosporine-induced apoptosis in astrocytes is prevented by A1 adenosine receptor activation. *Neuroscience Letters*, 418(1), 66–71. 2007. doi: 10.1016/j.neulet.2007.02.061.
- Danial, N. N.: BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), 7254–7263. 2007. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1598.
- Dasari, S. a Tchounwou, P. B.: Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378. 2014. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- Ding, Y., Wang, B., Chen, X., Zhou, Y. a Ge, J.: Staurosporine suppresses survival of HepG2 cancer cells through Omi/HtrA2-mediated inhibition of PI3K/Akt signaling pathway. *Tumor Biology*, 39(3). 2017. doi: 10.1177/1010428317694317.
- Doncel, J., Cruz-Ojeda, P., Ávila, M., Villanueva, M., de Laveria, I., de la Mata, M., Álvarez Córdoba, M., Luzón Hidalgo, R. Suárez-Rivero, J., Cotán, D. a Sánchez-Alcázar, J.: Cytoskeleton Rearrangements during the Execution Phase of Apoptosis. Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease. *IntechOpen*. 2016. doi: 10.5772/66865.
- Doonan, F. a Cotter, T. G.: Morphological assessment of apoptosis. *Methods*, 44(3), 200–204. 2008. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.11.006.

- Drescher, H., Weiskirchen, S. a Weiskirchen, R.: Flow cytometry: A blessing and a curse. *Biomedicines*, 9(11). 2021. doi: 10.3390/biomedicines9111613.
- Drexler, H. G. a Macleod, R. A. F.: History of leukemia-lymphoma cell lines: History of leukemia-lymphoma cell lines. *Human Cell*, 23(3), 75–82. 2010. doi: 10.1111/j.1749-0774.2010.00087.x
- Eischeid, A. C.: SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Research Notes*, 4(1). 2011. doi: 10.1186/1756-0500-4-263.
- Elmore, S.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495-516. 2007. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Erwig, LP. a Henson, P.: Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ*, 15, 243–250. 2008. doi: 10.1038/sj.cdd.4402184.
- Faleiro, L. a Lazebnik, Y.: Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *The journal of cell biology*, 151(5), 951–959. 2000. doi: 10.1083/jcb.151.5.951.
- Festjens, N., Berghe, T. V., Vandenaabee, P.: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9-10), 1371-1387. 2006. doi: 10.1016/j.bbabi.2006.06.014.
- Fields, D. a Khetrapal, A.: What is the Comet Assay? *News-medical.net*. 2016.
- Funato, N., Takayanagi, H., Konda, Y., Toda, Y., Harigaya, Y., Omura, S.: Absolute configuration of staurosporine by X-ray analysis. *Tetrahedron Lett*, 35(8), 1251–1254. 1994. doi: 10.1016/0040-4039(94)88036-0.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. a Kempson, I. M.: The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). 2021. doi: 10.3390/ijms222312827.
- Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R. a Su, A. I.: A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, 19(1). 2018. doi: 10.1186/s12864-018-4718-6.
- Glick, D., Barth, S. a Macleod, K. F.: Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12. 2010. doi: 10.1002/path.2697.
- Gomes, A., Lunardi, C., Rocha, F. a Patience, G.: Experimental Methods in Chemical Engineering: Fluorescence Emission Spectroscopy. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(8). 2019. doi: 10.1002/cjce.23506.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Korsmeyer, S.J.: Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome *c* Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death. *Cell Biology and Metabolism*, 274(2), 1156-1163. 1999. doi: 10.1074/jbc.274.2.1156.
- Guchelaar, H. J., Vermes, I., Koopmans, R. P., Reutelingsperger, C. P. a Haanen, C.: Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 42(1), 77–83. 1998. doi: 10.1007/s002800050788.
- Haq, I., Ladbury, J. E., Chowdhry, B. Z., Jenkins, T. C. a Chaires, J. B.: Specific Binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)2 Duplex: Calorimetric and Spectroscopic Studies. *Journal of Molecular Biology*, 271(2), 244–257. 1997. doi: 10.1006/jmbi.1997.1170.

- Haugland, R. P.: *The Handbook: A Guide to Fluorescent and Labeling Technologies*. 316-320. *Invitrogen*. 2010.
- Henery, S., George, T. C., Hall, B. J., Basiji, D., Ortyrn, W. E. a Morrissey, P. J.: Quantitative image based apoptotic index measurement using multispectral imaging flow cytometry: a comparison with standard photometric methods. *Apoptosis*, *13*(8), 1054–1063. 2008. doi: 10.1007/s10495-008-0227-4.
- Holmes, K. L. a Lantz, L. M.: Protein Labeling with Fluorescent Probes. *METHODS IN CELL BIOLOGY*, *63*. *Academic Press*. 2001. doi: 10.1016/s0091-679x(01)63013-9.
- House, I. G., House, C. M., Brennan, A. J., Gilan, O., Dawson, M. A., Whisstock, J. C., Law, R. H. P., Trapani, J. A. a Voskoboinik, I.: Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation. *EMBO Reports*, *18*(10), 1775–1785. 2017. doi: 10.15252/embr.201744351.
- Huang, D. C. a Strasser, A.: BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, *103*(6), 839–842. 2000. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00187-2.
- Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U. a Boonyuen, U.: Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*, *20*(1), 4. 2019. doi: 10.1186/s12858-019-0108-1.
- Chazotte B.: Labeling nuclear DNA using DAPI. *Cold Spring Harbor protocols*, *1*. 2011. doi: 10.1101/pdb.prot5556.
- Cheng, J. P. X. a Lane, J. D.: Organelle dynamics and membrane trafficking in apoptosis and autophagy. *Histology and histopathology*, *25*(11), 1457–1472. 2010. doi: 10.14670/HH-25.1457.
- Ikeda, R., Furukawa, T., Mitsuo, R., Noguchi, T., Kitazono, M., Okumura, H., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Che, X., Uchimiya, H., Nakajima, Y., Ren, X., Oiso, S., Inoue, I., Yamada, K. a Akiyama, S.: Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *301*(2), 358–363. 2003. doi: 10.1016/s0006-291x(02)03034-6.
- Ishibashi, T. a Lippard, S. J.: Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(8), 4219–4223. 1998. doi: 10.1073/pnas.95.8.4219.
- Jansen, K., Norden, B. a Kubista, M.: Sequence dependence of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA interactions. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(23). 1993. doi: 10.1021/ja00076a009.
- Jirsová, K., Mandys, V., Gispén, W. H. a Bär, P. R.: Cisplatin-induced apoptosis in cultures of human Schwann cells. *Neuroscience Letters*, *392*(1–2), 22–26. 2006. doi: https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.08.068.
- Johnson, N., Ng, T. T. a Parkin, J. M.: Camptothecin causes cell cycle perturbations within T-lymphoblastoid cells followed by dose dependent induction of apoptosis. *Leukemia Research*, *21*(10), 961–972. 1997. doi: 10.1016/s0145-2126(97)00077-5.
- Johnson, V. L., Ko, S. C. W., Holmstrom, T. H., Eriksson, J. G. a Chow, S. C.: Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *Journal of Cell Science*, *113*(17), 2941–2953. 2000. doi: 10.1242/jcs.113.17.2941.

- Joselin, A. P., Schulze-Osthoff, K. a Schwerk, C.: Loss of Acinus inhibits oligonucleosomal DNA fragmentation but not chromatin condensation during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12475–12484. 2006. doi: 10.1074/jbc.M509859200.
- Juo, P., Woo, M. S., Kuo, C. J., Signorelli, P., Biemann, H. P., Hannun, Y. A. a Blenis, J.: FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12), 797–804. 1999.
- Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P. G. A Juurlink, B. H.: Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*, 286(1), 35–37. 2000. doi: 10.1006/abio.2000.4765.
- Kapuscinski, J.: Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 38(9), 1323–1329. 1990. doi: 10.1177/38.9.1696951.
- Kaur, G. a Dufour, J. M.: Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*, 2(1), 1–5. 2012. doi: 10.4161/spmg.19885.
- Kim, S. Y., Yune, T. Y., Han, C. Z., Kim, Y. H., Chung, J. H., Markelonis, G. J. a Oh, T. K.: Mitochondrial isocitrate dehydrogenase protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 85(1), 139–152. 2007. doi: 10.1002/jnr.21106.
- Koeffler, H. P., Golde, D. W.: Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review. *Blood*, 56(3), 344–349. 1980. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V56.3.344.344>.
- Koenig, K. a Schneckenburger, H.: Laser-induced autofluorescence for medical diagnosis. *J Fluoresc*, 4, 17–40. 1994. doi: 10.1007/BF01876650.
- Kumar, S. a Tchounwou, P. B.: Molecular mechanisms of cisplatin cytotoxicity in acute promyelocytic leukemia cells. *Oncotarget*, 6(38), 40734–40746. 2015. doi: 10.18632/oncotarget.5754.
- Kwasny, D., Kiilerich-Pedersen, K., Moresco, Dimaki, M., Rozlosnik, N. a Svendsen, W. E.: Microfluidic device to study cell transmigration under physiological shear stress conditions. *Biomed Microdevices* 13, 899–907. 2011. doi: 10.1007/s10544-011-9559-x.
- Lakowicz, J. R. a Masters, B. R.: Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2). 2017. doi: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- Lauricella, M., Calvaruso, G., Carabillò, M., D’Anneo, A., Giuliano, M., Emanuele, S., Vento, R. a Tesoriere, G.: pRb suppresses camptothecin-induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Letters*, 499(1–2), 191–197. 2001. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02553-4.
- Law, ZJ., Xin Hui, K., Lim, P., Goh, B. H., Ming, L. C., Lee, WL. a Goh, H.: Extracellular Vesicle-Mediated Chemoresistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. 2021. doi: 10.3389/fmolb.2021.629888.
- Li, F., Jiang, T., Li, Q. a Ling, X.: Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? *American Journal of Cancer Research*, 7(12), 2350–2394. 2017.

- Li, G., Bush, J. A. a Ho, V. C.: P53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *The Journal of Investigative Dermatology*, 114(3), 514–519. 2000. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00867.x.
- Lin, J., Lin, Y., Tsai, T., Chen, H., Chou, K. a Hwang, T. S.: Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Design Development and Therapy*, 11, 1517–1533. 2017. doi: 10.2147/DDDT.S126464.
- Liu, X., Togo, S., Al-Mugotir, M., Kim, H., Fang, Q., Kobayashi, T., Wang, X., Mao, L., Bitterman, P. B. a Rennard, S. I.: NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respiratory Research*, 9(1). 2008. doi: 10.1186/1465-9921-9-66.
- Lockshin, R. A.: Programmed cell death 50 (and beyond). *Cell Death and Differentiation*, 23(1), 10–17. 2016. doi: 0.1038/cdd.2015.126.
- Lomonosova, E., Chinnadurai, G.: BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27. 2008. doi: 10.1038/onc.2009.39.
- Majtner, T.: Texture-Based Image Description in Fluorescence Microscopy. 2015.
- Majtnerová, P. a Roušar, T.: An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1469–1478. 2018. doi: 10.1007/s11033-018-4258-9.
- Majtnerová, P., Čapek, J., Petira, F., Handl, J. a Roušar, T.: Quantitative spectrofluorometric assay detecting nuclear condensation and fragmentation in intact cells. *Scientific reports*, 11(1), 11921. 2021. doi: 10.1038/s41598-021-97792-5.
- Majumdar, S., Guha, T., Barman, F., Kundu, R.: A Basic Method for Hoechst (33258) Staining of Nuclei from Whole Root Tissues of *Oryza sativa*. *National Academy Science Letters*, 43. 2020. doi: 10.1007/s40009-019-00865-3.
- Mallya, R. a Bhitre, M. J.: Cytotoxic Activity and Initiation of Apoptosis via Intrinsic Pathway in Jurkat Cells by Leaf Extract of *Zanthoxylum rhetsa* DC. *Nutrition and Cancer*, 73(9), 1768–1779. 2021. doi: 10.1080/01635581.2020.1808231.
- Manns, J., Daubrawa, M., Driessen, S., Paasch, F., Hoffmann, N., Löffler, A., Lauber, K., Dieterle, A., Alers, S., Iftner, T., Schulze-Osthoff, K., Stork, B. a Wesselborg, S.: Triggering of a novel intrinsic apoptosis pathway by the kinase inhibitor staurosporine: activation of caspase-9 in the absence of Apaf-1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(9), 3250–3261. 2011. doi: 10.1096/fj.10-177527.
- Manohar, S. a Leung, N.: Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology*, 31(1), 15–25. 2018. doi: 10.1007/s40620-017-0392-z.
- Mariño, G. a Kroemer, G.: Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res* 23, 1247–1248. 2013. doi: 10.1038/cr.2013.115.
- Matsura, T., Serinkan, B. F., Jiang, J. a Kagan, V. E.: Phosphatidylserine peroxidation/externalization during staurosporine-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Letters*, 524(1–3), 25–30. 2002. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02990-3.
- Mills, J. C., Stone, N. L. a Pittman, R. N.: Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase. *The journal of cell biology*, 146(4), 703–708. 1999. doi: 10.1083/jcb.146.4.703



- Moore, C. I., Savenka, A. V. a Basnakian, A. G.: TUNEL Assay: A Powerful Tool for Kidney Injury Evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 412. 2021. doi: 10.3390/ijms22010412.
- Morris, E. J., a Geller, H. M.: Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *The Journal of Cell Biology*, 134(3), 757–770. 1996. doi: 10.1083/jcb.134.3.757.
- Mukthavaram, R., Jiang, P., Saklecha, R., Simberg, D., Bharati, I. S., Nomura, N., Chao, Y., Pastorino, S., Pingle, S. C., Fogal, V., Wrasidlo, W., Makale, M. a Kesari, S.: High-efficiency liposomal encapsulation of a tyrosine kinase inhibitor leads to improved in vivo toxicity and tumor response profile. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 3991–4006. 2013. doi: 10.2147/IJN.S51949.
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J. a Bréard, J.: Cytoskeleton and apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 76(1), 11-18. 2008. doi: 10.1016/j.bcp.2008.03.016.
- Nepraš, M. a TITZ, M.: Základy teorie elektronových spekter. *Nakladatelství technické literatury*. 1983, 122 – 138.
- Ninios, Y. P., Sekeri-Pataryas, K. E. a Sourlingas, T. G.: Histone H1 subtype preferences of DFF40 and possible nuclear localization of DFF40/45 in normal and trichostatin A-treated NB4 leukemic cells. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(2), 128–138. 2010. doi: 10.1007/s10495-009-0418-7.
- Ola, M.S., Nawaz, M. a Ahsan, H.: Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 351, 41–58. 2011. doi: 10.1007/s11010-010-0709-x.
- Omura, S., Asami, Y. a Crump, A.: Staurosporine: new lease of life for parent compound of today's novel and highly successful anti-cancer drugs. *The Journal of Antibiotics*, 71(8), 688–701. 2018. doi: 10.1038/s41429-018-0029-z.
- Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. a Masuma, R.: A new alkaloid AM-2282 of Streptomyces origin taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot*, 30(4), 275–282. 1977. doi: 10.7164/antibiotics.30.275.
- Ormerod, M. G., Sun, X. M., Snowden, R. T., Davies, R., Fearnhead, H. a Cohen, G. M.: Increased Membrane Permeability of Apoptotic Thymocytes: A Flow Cytometric Study. *Cytometry*, 14(6), 595–602. 1993. doi: 10.1002/cyto.990140603.
- Osińska, I., Popko, K. a Demkow, U.: Perforin: an important player in immune response. *Central-European journal of immunology*, 39(1), 109–115. 2014. doi: 10.5114/ceji.2014.42135.
- Overview of flow cytometry. *Cell Signaling Technology*. Dostupné z: <https://www.cellsignal.com/applications/flow-cytometry/flow-cytometry-overview>.
- Palai, T. a Mishra, S.: Caspases: An Apoptosis Mediator. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2(1). 2014. doi: 10.5455/javar.2015.b52.
- Park, L. M., Lannigan, J. a Jaimes, M. C.: Forty-color full spectrum flow cytometry panel for deep immunophenotyping of major cell subsets in human peripheral blood. *Cytometry, Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 97(10), 1044–1051. 2020. doi: 10.1002/cyto.a.24213

- Penna, F., Pin, F., Costamagna, D., Reffo, P., Baccino, F. M., Bonelli, G. a Costelli, P.: Caspase 2 Activation and ER Stress Drive Rapid Jurkat Cell Apoptosis by Clofibrate. *PLOS ONE*, 7(9). 2012. doi: 10.1371/journal.pone.00045327
- Prokhorova, E. A., Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Zhivotovsky, B. a Lavrik, I. N.: Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(23), 4593–4612. 2015. doi: 10.1007/s00018-015-2031-y.
- Qiu, Y., Li, A., Lee, J., Lee, J. M., Lee, E., Cho, N. a Yoo, H. J.: Inhibition of Jurkat T Cell Proliferation by Active Components of Rumex japonicus Roots Via Induced Mitochondrial Damage and Apoptosis Promotion. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 1885-1895. 2020. doi: 10.4014/jmb.2007.07018. doi: 10.4014/jmb.2007.07018.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A.: Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992. 2016. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012.
- Renehan, A. G., Booth, C., a Potten, C. S.: What is apoptosis, and why is it important?. *BMJ*, 322(7301), 1536–1538. 2001. doi: 10.1136/bmj.322.7301.1536.
- Robertson, J. D., Orrenius, S. a Zhivotovsky, B.: Review: nuclear events in apoptosis. *Journal of Structural Biology*, 129(2–3), 346–358. 2000. doi: 10.1006/jsbi.2000.4254.
- Rosenberg, B., Vancamp, L. a Krigas, T.: INHIBITION OF CELL DIVISION IN ESCHERICHIA COLI BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature*, 205, 698–699. 1965. doi: 10.1038/205698a0.
- Samejima, K. a Earnshaw, W. C.: Differential localization of ICAD-L and ICAD-S in cells due to removal of a C-terminal NLS from ICAD-L by alternative splicing. *Experimental Cell Research*, 255(2), 314–320. 2000. doi: 10.1006/excr.2000.4801.
- Sancho-Martínez, S. M., Piedrafita, F. J., Cannata-Andía, J. B., López-Novoa, J. M. a López-Hernández, F. J.: Necrotic concentrations of cisplatin activate the apoptotic machinery but inhibit effector caspases and interfere with the execution of apoptosis. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 122(1), 73–85. 2011. doi: 10.1093/toxsci/kfr098.
- Saraste, A. a Pulkki, K.: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537. 2000. doi: 10.1016/s0008-6363(99)00384-3.
- Scarlett, J. L., Sheard, P. W., Hughes, G., Ledgerwood, E. C., Ku, H. H. a Murphy, M. P.: Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Letters*, 475(3), 267–272. 2000. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01681-1.
- Segawa, K., Suzuki, J., a Nagata, S.: Flippases and scramblases in the plasma membrane. *Cell cycle*, 13(19), 2990–2991. 2014. doi: 10.4161/15384101.2014.962865.
- Selph, K. E.: Enumeration of marine microbial organisms by flow cytometry using near-UV excitation of Hoechst 34580-stained DNA. *Limnology and oceanography, methods*, 19(10), 692–701. 2021. doi: 10.1128/aem.65.1.45-52.1999. doi: 10.1002/lom3.10454.
- Serinan, E., Altun, Z., Aktaş, S., Çeçen, E. a Olgun, N.: Comparison of Cisplatin with Lipoplatin in Terms of Ototoxicity. *Journal of International Advanced Otology*, 14(2), 211–215. 2018. doi: 10.5152/iao.2018.4097.
- Shalaby, R., Flores-Romero, H. a García-Sáez, A. J.: The Mysteries around the BCL-2 Family Member BOK. *Biomolecules*, 10(12). 2020. doi: 10.3390/biom10121638.

- Shukla, R. K.: An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8(1). 2018. doi: 10.1186/s41935-017-0035-5.
- Singh, V., Khurana, A., Navik, U., Allawadhi, P., Bharani, K.K. a Weiskirchen, R.: Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting Thereof for Cancer Therapeutics. *Sci*, 4(2). 2022. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
- Smith, P. J., Blunt, N., Wiltshire, M., Hoy, T., Teesdale-Spittle, P., Craven, M. R., Watson, J. V., Amos, W. B., Errington, R. J., & Patterson, L. H.: Characteristics of a novel deep red/infrared fluorescent cell-permeant DNA probe, DRAQ5, in intact human cells analyzed by flow cytometry, confocal and multiphoton microscopy. *Cytometry*, 40(4), 280–291. 2000. doi: 10.1002/1097-0320(20000801)40:4<280::aid-cyto4>3.0.co;2-7.
- Solovyan, V. T., Bezvenyuk, Z. A., Salminen, A., Austin, C. A. a Courtney, M. J.: The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21458–21467. 2002. doi: 10.1074/jbc.M110621200.
- Stokke, T. a Steen, H. B.: Multiple binding modes for Hoechst 33258 to DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 33(4), 333–338. 1985. doi: 10.1177/33.4.2579998.
- Susin, S. A., Dugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Prévost, M. C., Brothers, G., Mak, T. W., Penninger, J., Earnshaw, W. C. a Kroemer, G.: Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), 571–580. 2000. doi: 10.1084/jem.192.4.571.
- Szczurek, A. T., Prakash, K., Lee, H.-K., Zurek-Biesiada, D. J., Best, G., Hagmann, M., Dobrucki, J. W., Cremer, C. a Birk, U.: Single molecule localization microscopy of the distribution of chromatin using Hoechst and DAPI fluorescent probes. *Nucleus*, 5(4), 331–340. 2014. doi: 10.4161/nucl.29564.
- Tacka, K. A., Dabrowiak, J. C., Goodisman, J., Penefsky, H. S. a Souid, A.: Effects of Cisplatin on Mitochondrial Function in Jurkat Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 17(8), 1102–1111. 2004. doi: 10.1021/tx0499564.
- Takakuwa, T., Luo, W. J., Ham, M. F., Sakane-Ishikawa, F., Wada, N. a Aozasa, K.: Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *The American Journal of Pathology*, 164(3), 967–974. 2004. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63184-7.
- Tanious, F. A., Veal, J. M., Buczak, H., Ratmeyer, L. S. a Wilson, W. D.: DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31(12), 3103–3112. 1992. doi: 10.1021/bi00127a010.
- Tárnok, A.: SYTO dyes and histoproteins—Myriad of applications. *Cytometry Part A*, 73(6), 477–479. 2008. doi: 10.1002/cyto.a.20588.
- Taupin, P.: BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53(1), 198–214. 2007. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.
- Telford W. G.: Stem cell side population analysis and sorting using DyeCycle violet. *Current protocols in cytometry*, 9(30). 2010. doi: 10.1002/0471142956.cy0930s51.

- Theofilopoulos, A. N., Wilson, C. B., Bokisch, V. A. a Dixon, F. J.: Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. Use of Raji cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera. *The Journal of Experimental Medicine*, 140(5), 1230–1244. 1974. doi: 10.1084/jem.140.5.1230.
- Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y. a Earnshaw, W. C.: Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Experimental Cell Research*, 313(16), 3635–3644. 2007. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.06.018.
- Trapani, J. A. a Smyth, M. J.: Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews. Immunology*, 2(10), 735–747. 2002. doi: 10.1038/nri911.
- Ullal, A. J. a Pisetsky, D. S.: The release of microparticles by Jurkat leukemia T cells treated with staurosporine and related kinase inhibitors to induce apoptosis. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 15(5), 586–596. 2010. doi: 10.1007/s10495-010-0470-3.
- Wallberg, F., Tenev, T. a Meier, P.: Analysis of apoptosis and necroptosis by fluorescence-activated cell sorting. *Cold Spring Harbor protocols*, 2016(4). 2016. doi: 10.1101/pdb.prot087387.
- Wang, Y., Sischka, A., Walhorn, V., Tönsing, K. a Anselmetti, D.: Nanomechanics of fluorescent DNA dyes on DNA investigated by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 111(8), 1604–1611. 2016. doi: 10.1016/j.bpj.2016.08.042.
- Wei, H., Qu, L., Dai, S., Li, Y., Wang, H., Feng, Y., Chen, X., Jiang, L., Guo, M., Li, J., Chen, Z., Chen, L., Zhang, Y. a Chen, Y.: Structural insight into the molecular mechanism of p53-mediated mitochondrial apoptosis. *Nat Commun* 12. 2021. doi: 10.1038/s41467-021-22655-6.
- What are the benefits of top reading vs bottom reading? *Berthold Technologies GmbH Co.KG*. 2021. Dostupné z: <https://www.berthold.com/en/bioanalytic/knowledge/magazine/top-vs-bottom-reading/>.
- Widlak, P. a Garrard, W. T.: Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *Journal of Cellular Biochemistry*, 94(6), 1078–1087. 2005. doi: 10.1002/jcb.20409.
- Yamamoto, T., Yatsushiro, S., Hashimoto, M., Kajimoto, K., Ido, Y. Abe, K., Sofue, Y., Nogami, T., Hayashi, T., Nagatomi, K., Minakawa, N., Oka, H., Mita, T., Kataoka, M.: Development of a highly sensitive, quantitative, and rapid detection system for Plasmodium falciparum-infected red blood cells using a fluorescent blue-ray optical system. *Biosensors and Bioelectronics*, 132, 375-381. 2019. doi: 10.1016/j.bios.2019.02.064.
- Yanumula, A., Cusick, J.K.: *Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis*. StatPearls Publishing 2022.
- Zare-Mirakabadi, A., Sarzaem, A., Moradhaseli, S., Sayad, A. a Negahdary, M.: Necrotic Effect versus Apoptotic Nature of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells. *Iran J Cancer Prev.*,5(3), 109-116. 2012.
- Zeiss, C. J.: The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, 40, 481-495. 2003.
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K. a Hersey, P.: Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(2), 187–197. 2004. doi: 10.3892/ijmm.13.4.565.

Zhang, X. T., Song, T. B., Du, B. L., Li, D. M. a Li, X. M.: Caspase-3 antisense oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in  $\gamma$ -irradiated human leukemia HL-60 cells. *Apoptosis* 12, 743–751. 2007. doi: 10.1007/s10495-006-0018-8.

Zurek-Biesiada, D., Kędracka-Krok, S. a Dobrucki, J. W.: UV-activated conversion of Hoechst 33258, DAPI, and Vybrant DyeCycle fluorescent dyes into blue-excited, green-emitting protonated forms. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 83(5), 441–451. 2013. doi: 10.1002/cyto.a.22260.