

Abstrakt

Možnosti průtokové cytometrie v analýze reakce buněk na genotoxický stres

Průtoková cytometrie je moderní metoda analýzy imunofenotypu a funkčních charakteristik buněk. Je to technika kvantitativní analýzy jedné buňky, která k detekci využívá optických vlastností buněk unášených v proudu nosné kapaliny stanovených paprskem laseru. Analýza a rozlišení buněk je založena na jejich velikosti, granularitě, a zdali buňka nese fluorescenční molekulu ve formě konjugované protilátky, nebo fluorescenčního barviva. Buňky mohou být značeny fluorescenčními barvivy, inkubovány s fluorogeními substráty, označeny fluorochromy konjugovanými protilátkami specifickými k molekulám na povrchu nebo uvnitř buňky. Průtokové cytometry jsou multiparametrické, zaznamenávají několik měření z jedné buňky. Z tohoto důvodu jsme schopni identifikovat homogenní subpopulaci v heterogenní populaci buněk.

Buňky vystaveny působení genotoxických agens reagují kvantitativně a kvalitativně v závislosti na absorbované dávce a buněčném typu. S cílem vypořádat se s poškozením buněčné DNA dojde k aktivaci dočasné zástavy buněčné cyklu a mechanismů odpovědi na poškození DNA, jež poskytnou nezbytný čas k její účinné opravě. Za situace kdy tyto mechanismy selžou, nebo poškození DNA je neopravitelné, dojde k buněčné smrti apoptózou, nebo je indukovaná stresem indukovaná předčasná senescence. Ze všech typů poškození DNA představují dvouvláknové zlomy DNA (DSB) nejvíce nebezpečnou formu. V molekulární odpovědi na vznik DSB dojde k rychlé fosforylaci serinu 139 v C-terminální oblasti molekuly H2AX aktivitou proteinkinas z rodiny fosfatidylinositol-3 kinas (PI3K) zahrnující ataxia telangiectasia mutated (ATM), ATR (ATM a Rad3-related protein) a DNA-dependentní protein kinasu (DNA-PK). Histon H2AX fosforylovaný na serinu 139 je označován jako γ H2AX, jeho tvorba dosahuje maxima přibližně 1 hodinu od vzniku DSB a je jedním z nejčasnějších dějů v odpovědi na poškození DNA.

Cílem naší práce bylo kvantifikovat DSB *in vivo* a *in vitro*, změny buněčného cyklu, apoptózu a senescenci indukovanou genotoxickými agens použitím vybraných metod průtokové cytometrie. Jako genotoxická agens jsme použili ionizující záření, cisplatinu, mitoxantron a vanadocen dichlorid. Studie byla prováděná s použitím rozdílných prototypů buněk: potkaní a lidské lymfocyty, mesenchymální kmenové buňky, leukemické buněčné linie HL-60 a MOLT-4.

Imunofluorescenční analýza γ H2AX představuje spolehlivou a citlivou metodu pro kvantitativní stanovení DSB DNA. Naše výsledky ukazují, že kvantifikace vzniku γ H2AX v potkaních lymfocytech periferní krve 1 hodinu od ozáření tvoří časný screeningový biodozimetrický nástroj pro stanovení obdržené dávky celotělového nebo hrudního ozáření. Tato metoda může pomoci lékařům k odhadu organismem obdržené dávky záření a na základě výsledků tak poskytnout ozářeným osobám odpovídající typ lékařské intervence s cílem zlepšit výsledek léčby každého jednotlivce. Vzestup tvorby γ H2AX v potkaních lymfocytech periferní krve byl 24 hodin od celotělového a hrudního ozáření potkanů doprovázen dávkově závislou leukopenií a lymfopenií.

Mesenchymální kmenové buňky reagují na ionizující záření stresem indukovanou senescencí bez indukce apoptózy, a to ani po vysokých dávkách gama záření. V krátkém čase po ozáření se v mesenchymálních kmenových buňkách tvoří ohniska γ H2AX indukovaná DSB. Většina DSB je reparovaná během 24 hodin, kdy zároveň vymizí nejvíce ohnisek γ H2AX. Bylo zjištěno, že fosforylace H2AX je závislá na ATM kinase. Inhibice ATM pomocí KU55933 zcela potlačila vznik ohnisek γ H2AX. Analýzou buněčného cyklu jsme zjistili, že v odpovědi na gama ozáření došlo k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Pozorovali jsme vzestup β -galaktosidasy spojené se senescencí za použití fluorogenního substrátu a cytochemie.

Naše výsledky ukázaly cytotoxický efekt vanadocen dichloridu na leukemické buňky a bohužel také na lidské lymfocyty periferní krve. Vanadocen dichlorid indukuje apoptózu u leukemických buněk, avšak indukce apoptózy je nižší než po působení cisplatinu. Pozorovali jsme lineární dávkově závislý vztah mezi dávkou vanadocen dichloridu a fosforylací H2AX v leukemických buňkách HL-60 1 hodinu od přidání vanadocen dichloridu. Data naznačují, že cytotoxický efekt vanadocen dichloridu na leukemické buňky může být částečně zprostředkován tvorbou DSB.