

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**VÝVOJ SPEKTROFLUORIMETRICKÉ METODY PRO DETEKCI
NUKLEÁRNÍ KONDENZACE A FRAGMENTACE V BUŇKÁCH**

Disertační práce

Autor Práce: Mgr. Pavlína Majtnerová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2021

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

**DEVELOPMENT OF A SPECTROFLUOROMETRIC METHOD
FOR DETECTION OF NUCLEAR CONDENSATION
AND FRAGMENTATION IN CELLS**

Doctoral Thesis

Author: Mgr. Pavlína Majtnerová

Supervisor: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2021

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 29.6.2021

Mgr. Pavlína Majtnerová

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu disertační práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D., za jeho odbornou pomoc, vstřícnost a oporu nejen při zpracovávání disertační práce, ale i během celého doktorského studia. Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegům a zároveň dobrým přátelům – Čendovi, Filipovi, Jirkovi, Janče, Káje a Ivaně nejen za jejich rady a připomínky, ale také za četné kávové dýchánky, které mě držely (a drží) v relativně normálním psychickém rozpoložení. Poděkování patří také mým přátelům a blízké rodině, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia. Velké poděkování patří mému příteli Jirkovi, který trpělivě snášel moje nálady během sepisování této práce. Děkuji vám všem!

ANOTACE

Disertační práce se zaměřuje na popis apoptózy a na přehled bioanalytických metod, které se využívají při její detekci a hodnocení. V rámci disertační práce jsme s využitím sondy Hoechst 33258 vyvinuli spektrofluorimetrickou metodu pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace. Pomocí této metody jsme popsali vliv modelových toxinů na proces nukleární kondenzace *in vitro*. Následně jsme výsledky získané novou metodou porovnali s výstupy dalších metod určených k detekci apoptózy, tj. detekce aktivity kaspáz, JNK a PARP aktivace, a metody TUNEL a DNA žebřík. V závěrečné části práce jsme naměřené výsledky shrnuli, diskutovali a porovnali s literaturou. Nově vyvinutá metoda využívající Hoechst 33258 je plně porovnatelná s metodou TUNEL a má navíc řadu výhod (např. rychlost, kvantifikace, nízká cena). Další velkou výhodou je možnost analyzovat velké množství vzorků najednou.

KLÍČOVÁ SLOVA

Apoptóza, detekce apoptózy, nukleární kondenzace, Hoechst, DNA fragmentace.

ANNOTATION

This doctoral thesis focuses on explaining the process of apoptosis and on an overview and description of bioanalytical methods used in its evaluation and detection. In the experimental part of this thesis, we developed the spectrofluorometric method Hoechst 33258 for the detection of nuclear condensation with subsequent evaluation. Using this method, we detected the effect of selected toxins on the process of nuclear condensation *in vitro*.

Subsequently, we compared the results obtained by the new method with the outputs of other methods designed to detect apoptosis, ie detection of caspase activity, JNK and PARP activation, and TUNEL and DNA ladder methods.

In the final part of the work, we discussed the results and compared them with the literature. Newly developed method using the Hoechst 33258 probe is fully comparable with TUNEL method. Moreover, our method has a number of advantages (e.g. speed, quantification, low cost) over the TUNEL assay. Another great advantage is the ability to analyze a large number of samples at once.

KEYWORDS

Apoptosis, Apoptosis Detection, nuclear condensation, Hoechst, DNA fragmentation.

OBSAH

1. ÚVOD	14
2. TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Apoptóza	15
2.1.1 Vnitřní cesta aktivace apoptózy	16
2.1.1.1 Proteiny Bcl-2 rodiny.....	18
2.1.2 Vnější cesta aktivace apoptózy.....	19
2.1.3 Efektorová fáze apoptózy	20
2.1.3.1 Efektorové kaspázy a další proteiny	20
2.1.3.2 Kondenzace jádra a chromatinu	21
2.1.3.3 DNA fragmentace	23
2.2 Detekce apoptózy	24
2.2.1 Analýza morfologie buněk.....	25
2.2.1.1 Průtoková cytometrie	25
2.2.1.2 Světelná mikroskopie s fázovým kontrastem	27
2.2.1.3 Fluorescenční mikroskopie	27
2.2.1.4 Elektronová mikroskopie.....	29
2.2.2 Detekce DNA zlomů a DNA fragmentace	30
2.2.2.1 TUNEL.....	30
2.2.2.2 DNA žebřík	32
2.2.2.3 Kometová metoda.....	35
2.2.3 Detekce biochemických změn při apoptóze	37
2.2.3.1 Stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz	37
2.2.3.2 Stanovení glutathionu	38
2.2.4 Detekce a analýza proteinů při apoptóze.....	39
2.2.4.1 2D elektroforéza	40
2.2.4.2 <i>Western Blotting</i> a kapilární imunoelktroforéza.....	40
3. CÍLE PRÁCE	44
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
4.1 Seznam použitých chemikálií	45
4.2 Příprava roztoků	46
4.3 Biologický materiál	48
4.4 Přístroje a laboratorní vybavení	48
4.5 Buněčné linie	50
4.5.1 Kultivace buněk HepG2	50
4.5.2 Kultivace buněk HK-2	50
4.5.3 Kultivace buněk A549	51
4.5.4 Kultivace buněk SH-SY5Y	51
4.5.5 Autentizace buněčných linií	51
4.5.6 Detekce mykoplazmat v buněčných liniích	52
4.6 Spektrofluorimetrická detekce nukleární kondenzace a fragmentace	52
4.6.1 Optimalizace Hoechst 33258 metody (H33258)	52
4.6.2 Finální postup H33258 metody a její aplikace	53
4.7 WST-1 test	54

4.8 Stanovení koncentrace glutathionu	54
4.9 Detekce aktivity kaspáz	55
4.10 Analýza proteinové exprese	55
4.10.1 Příprava proteinového lyzátu buněk	55
4.10.2 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové	55
4.10.3 Kapilární imunoelktroforéza	56
4.11 Metoda TUNEL	57
4.12 DNA žebřík	57
4.13 Statistické zpracování experimentálních dat	58
5. VÝSLEDKY	59
5.1 Optimalizace práce s buněčnými liniemi	59
5.1.1 Optimalizace denzity HepG2 buněk	59
5.1.2 Optimalizace denzity HK-2 buněk	60
5.2 Vývoj spektrofluorimetrické metody pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace	61
5.2.1 Optimalizace postupu spektrofluorimetrické metody	61
5.2.1.1 Testování vlivu složení roztoku	62
5.2.1.2 Testování vlivu míchání vzorku	63
5.2.1.3 Optimalizace doby inkubace buněk se sondou H33258	64
5.2.1.4 Optimalizace koncentrace sondy H33258	65
5.2.1.5 Testování citlivosti H33258 metody	66
5.2.2 Finální postup spektrofluorimetrické H33258 metody	67
5.2.3 Zhodnocení výstupů H33258 metody u buněk	67
5.3 Srovnání H33258 metody s dalšími metodami	70
5.3.1 WST-1 test	70
5.3.2 Stanovení koncentrace glutathionu	72
5.3.3 Detekce aktivity kaspáz	73
5.3.4 Analýza proteinové exprese	74
5.3.5 Metoda TUNEL	75
5.3.6 DNA žebřík	77
5.3.7 Vyhodnocení výstupů metod detekujících proapoptické děje	77
6. DISKUSE	79
7. ZÁVĚR	87
8. SEZNAM LITERATURY	88
9. PŘÍLOHY	99
9.1 Originální data k výsledkové části práce	99
9.2 Seznam publikovaných prací	107

SEZNAM OBRÁZKŮ, GRAFŮ A TABULEK

- Obrázek 1:** Změny morfologie buňky během apoptózy. (str. 16)
- Obrázek 2:** Vnitřní a vnější cesta aktivace apoptózy. (str. 17)
- Obrázek 3:** Proteiny Bcl-2 rodiny. (str. 18)
- Obrázek 4:** Kondenzace chromatinu. (str. 22)
- Obrázek 5:** Štěpení DNA při apoptóze. (str. 24)
- Obrázek 6:** Detekce aktivace kaspáz prostřednictvím FLICA. (str. 26)
- Obrázek 7:** Detekce mitochondriálního membránového potenciálu (HK-2 buňky). (str. 29)
- Obrázek 8:** Snímky apoptotických buněk z elektronového mikroskopu. (str. 30)
- Obrázek 9:** Strategie značení dUTPs v rámci metody TUNEL. (str. 32)
- Obrázek 10:** DNA žebřík. (str. 34)
- Obrázek 11:** Vzhled jádra buňky po detekci Kometovou metodou. (str. 35)
- Obrázek 12:** Jádra buněk po elektroforéze a vizualizaci (A549 buňky). (str. 36)
- Obrázek 13:** Detekce celulárních dehydrogenáz pomocí XTT a WST. (str. 38)
- Obrázek 14:** Reakce monochlorobimanu a glutathionu. (str. 39)
- Obrázek 15:** Přístroj Wes. (str. 41)
- Obrázek 16:** Princip metody *Simple Western*. (str. 42)
- Obrázek 17:** Proteinová exprese PARP-1 (metoda *Simple Western*). (str. 43)
- Obrázek 18:** Detekce DNA zlomů pomocí metody TUNEL. (str. 76)
- Obrázek 19:** Detekce DNA žebříku u buněk exponovaných cisplatině. (str. 77)

- Graf 1:** Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HepG2 buňky). **(str. 59)**
- Graf 2:** Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HK-2 buňky). **(str. 60)**
- Graf 3:** Optimalizace H33258 metody – výměna média (HepG2 buňky). **(str. 62)**
- Graf 4:** Optimalizace H33258 metody – vliv míchání vzorku (HepG2 buňky). **(str. 63)**
- Graf 5:** Optimalizace H33258 metody – změna intenzity fluorescence H33258 v čase (HepG2 buňky). **(str. 64)**
- Graf 6:** Intenzita fluorescence H33258 v čase 0-5 min (HepG2 buňky). **(str. 65)**
- Graf 7:** Optimalizace koncentrace sondy H33258 (HepG2 buňky). **(str. 65)**
- Graf 8:** Testování odezvy H33258 metody (HepG2 buňky). **(str. 66)**
- Graf 9:** Testování odezvy H33258 metody (HK-2 buňky). **(str. 67)**
- Graf 10:** Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HepG2 buňky). **(str. 68)**
- Graf 11:** Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HK-2 buňky). **(str. 68)**
- Graf 12:** Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (A549 a SH-SY5Y buňky). **(str. 70)**
- Graf 13:** Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HepG2 buňky). **(str. 71)**
- Graf 14:** Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HK-2 buňky). **(str. 71)**
- Graf 15:** Stanovení koncentrace glutathionu (HepG2 buňky). **(str. 72)**
- Graf 16:** Stanovení koncentrace glutathionu (HK-2 buňky). **(str. 72)**
- Graf 17:** Aktivita kaspáz (HepG2 buňky). **(str. 73)**
- Graf 18:** Aktivita kaspáz (HK-2 buňky). **(str. 74)**
-
- Tabulka 1:** Příprava roztoků pro detekci proteinů dle Bradfordové. **(str. 56)**
- Tabulka 2:** Exprese proteinů PARP a JNK u buněk exponovaných cisplatině. **(str. 75)**
- Tabulka 3:** Porovnání H33258 metody s ostatními metodami. **(str. 78)**

SEZNAM ZKRATEK

ACN1	induktor apoptotické kondenzace chromatinu
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
BAD	<i>BCL-2 Antagonist of Cell Death</i>
BAK	<i>BCL-2 Antagonist/Killer</i>
BAX	<i>BCL-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BH	<i>BCL-2 Homology</i>
BIM	<i>BCL-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>
BIK	<i>BCL-2-Interacting Killer</i>
BMF	<i>BCL-2-Modifying Factor</i>
BrdU	bromodeoxyuridin
CAD	kaspázou aktivovaná DNáza
CAM	kamptotecin
CBT-Cys(SEt)	2-kyanobenzothiazol s cysteinem chráněným disulfidem
CisPt	cisplatina
CTRL	kontrola
DAPI	(4',6-diamidin-2-fenylindol)
DFF	DNA fragmentační faktor
DFF40	40 kDa podjednotka DNA fragmentačního faktoru
DFF45	45 kDa podjednotka DNA fragmentačního faktoru
DIABLO	<i>Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low pI</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DTT	dithiotreitol
dUTPs	deoxyuridinfosfáty
DV	deionizovaná voda
EdU	5'-ethinyl-2-deoxyuridin
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
FACS	třídění buněk na základě fluorescence
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain</i>
FasL	<i>Fas Ligand</i>
FasR	<i>Fas Receptor</i>

FC	průtoková cytometrie
FLICA	fluorochromem značené inhibitory kaspáz
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GSH	glutathion
GSSG	glutathion disulfid
H33258	Hoechst 33258
H33342	Hoechst 33342
HRK	<i>Activator of Apoptosis Harakiri</i>
ICAD	inhibitor kaspázou aktivované DNázy
JC	5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl karbokyanin jodid
JNKs	c-Jun N-terminální kinázy
MCB	monochlorobiman
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)
NPs	nanočástice
PARP-1	poly(ADP-ribóza)polymeráza 1
PI	propidiumjodid
PMAIP1	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate Induced Protein 1</i>
PUMA	<i>p53-Upregulated Modulator of Apoptosis</i>
RCD	programovaná buněčná smrt
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	pokožová teplota
SCGE	gelová elektroforéza jednotlivých buněk
SDS-PAGE	elektroforéza v denaturujících podmínkách dodecylsírany sodného
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SMAc	<i>Second Mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
STA	staurosporin
tBID	<i>BH3 Interacting-Domain Death Agonist</i>
TdT	terminální deoxynukleotidyltransferáza
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TMRM	tetrametylrhodaminmethylester

TRAIL	<i>Tumour necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand receptors</i>
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan
TUNEL	<i>Terminal DeoxynUcleotidyl Transferase Nick-End Labeling</i>
WB	<i>Western Blotting</i>
WST	4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanil

1. Úvod

Buněčná smrt může být popsána jako soubor procesů, které vedou k nevratné degeneraci buněčných funkcí, ztrátě buněčné integrity a ke smrti buňky. Buněčná smrt může být fyziologickým jevem, např. v souvislosti s vývojem jedince, nebo s udržením homeostázy organismu. Může tak být regulováno množství buněk v organismu, např. v mozku, kde je regulován počet neuronů. Typy buněčných smrtí můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií – programovaná a neprogramovaná buněčná smrt.

Hlavní část této práce se věnuje apoptóze. Apoptóza patří do skupiny regulovaných buněčných smrtí, do níž dále patří např. také nekroptóza, pyroptóza nebo ferroptóza. Proces apoptózy je spojen s řadou morfologických a biochemických změn v buňce, které lze využít k její detekci. Jednou z těchto změn je také nukleární kondenzace a fragmentace. Kondenzace a fragmentace jádra buněk je dnes analyzována především kvalitativně pomocí mikroskopických metod. Vyvinutí nové, kvantitativní spektrofluorimetrické metody pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace *in vitro*, což je jedním z hlavních cílů této disertační práce, by tedy mohlo pomoci doplnit spektrum metod, jež jsou pro detekci apoptotických změn v buňkách široce uplatněny.

2. Teoretická část

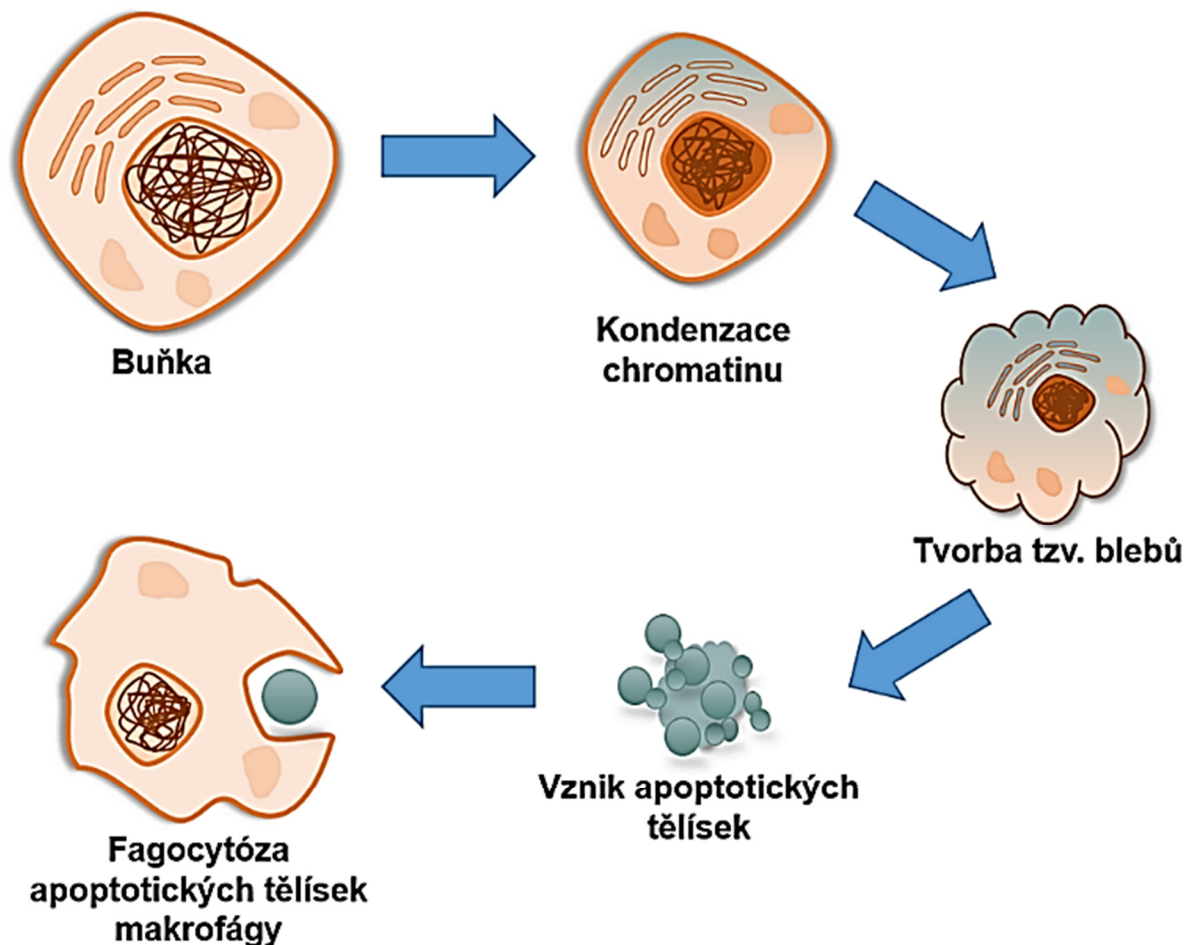
2.1 Apoptóza

Apoptóza je forma programované buněčné smrti (RCD), která je výsledkem aktivace jednoho, nebo více signálů a může být farmakologicky, nebo geneticky modulována (Galluzzi et al., 2018). Termín apoptóza byl poprvé použit již v roce 1972 ve studii kolektivu dr. Kerr, kde byla popsána jako komplexní proces zodpovědný za odstranění poškozených buněk ze živého organismu (Kerr et al., 1972). Jedná se o aktivní fyziologický proces, který slouží k udržení homeostázy organismu a zároveň jako obranný mechanismus buňky (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2018).

Apoptóza může být spuštěna fyziologickými i patologickými procesy (Elmore, 2007) a hraje tedy důležitou roli při genezi patologických i fyziologických procesů. Problémem může být snížená (Wong, 2011) i zvýšená schopnost apoptózy (Mattson, 2000). Snížená schopnost apoptózy může způsobit vznik maligních transformací, nebo autoimunitních chorob. Zvýšená schopnost apoptózy podporuje vznik ischemických stavů a neurodegeneračních procesů (Czabotar et al., 2014). Proces apoptózy je spojen s řadou morfologických a biochemických změn v buňce, které můžeme využít k její detekci (Majtnerova and Rousar, 2018).

Mezi morfologické změny patří degradace cytoskeletu, změna tvaru cytoplazmatické membrány a tvorba tzv. „blebů“. Bleby pozorujeme u adherentních buněk nejprve v časně fázi apoptózy, kdy dochází k uvolnění buněk z povrchu a od sebe navzájem, a také v pozdní fázi apoptózy, kdy dochází k vystavení fosfatidylserinu na vnější stranu plazmatické membrány buněk (Janson et al., 2008). Následuje zhutnění a sraštění jádra (= pyknóza) a rozpad jádra na malé fragmenty (= karyorexe) spojený s DNA fragmentací (Su et al., 2015).

Karyorexe se objevuje během pozdní fáze apoptózy. Jádro je zde fragmentováno a chromatin je nepravidelně distribuován v cytoplazmě. Karyorexe je následována tvorbou apoptotických tělísek (Takada et al., 2020). Apoptotická tělíška jsou fagocyticky odstraněna bez vzniku zánětu, což je jedna z odlišností apoptózy ve srovnání s nekrotózou (Elmore et al., 2016). Jako signál pro fagocytozující makrofágy slouží právě expozice fosfatidylserinu na vnější buněčnou membránu. Makrofágy pak mají za úkol eliminaci dané buňky či jejích zbytků. Některé tyto děje jsou schématicky znázorněny na následujícím obrázku (obrázek 1).



Obrázek 1: Změny morfologie buňky během apoptózy. Upraveno dle (Abou-Ghali and Stiban, 2015).

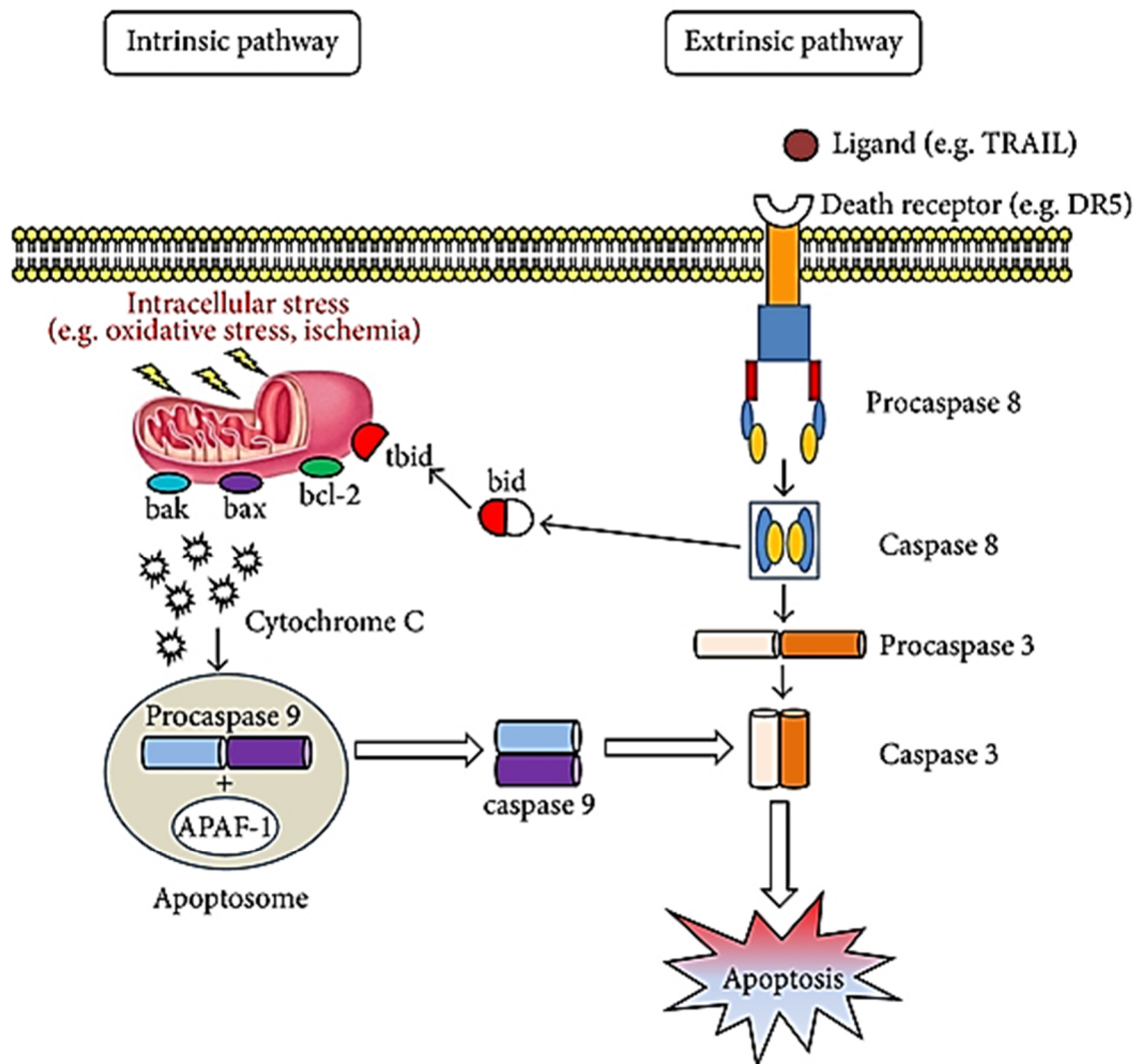
Proces apoptózy můžeme rozdělit do dvou hlavních fází, na fázi iniciační a fázi efektorovou. Fáze iniciační je specifická pro jednotlivé typy aktivace apoptózy, fáze efektorová je však pro všechny stejná. Cestami aktivace apoptózy jsou cesty vnitřní a vnější (obrázek 2).

2.1.1 Vnitřní cesta aktivace apoptózy

Vnitřní cesta aktivace apoptózy je aktivována stimulem, který přichází zevnitř vlastní buňky. Mezi nejčastější stimuly patří genetické poškození, hypoxie, nebo oxidační stres (Su et al., 2015). Hlavní roli hrají mitochondrie, proto někdy bývá tato cesta nazývána jako mitochondriemi zprostředkovaná buněčná smrt (Loreto et al., 2014b).

Klíčovou roli v iniciační fázi vnitřní cesty aktivace apoptózy hrají proteiny *B-Cell Lymphoma 2* (BCL-2) rodiny, které mají proapoptotické, nebo antiapoptotické funkce

(Tsujiimoto, 1998). Některé z těchto proteinů jsou schopné vytvářet póry ve vnější mitochondriální membráně a tím ji permeabilizovat (viz kapitola 2.1.1.1).



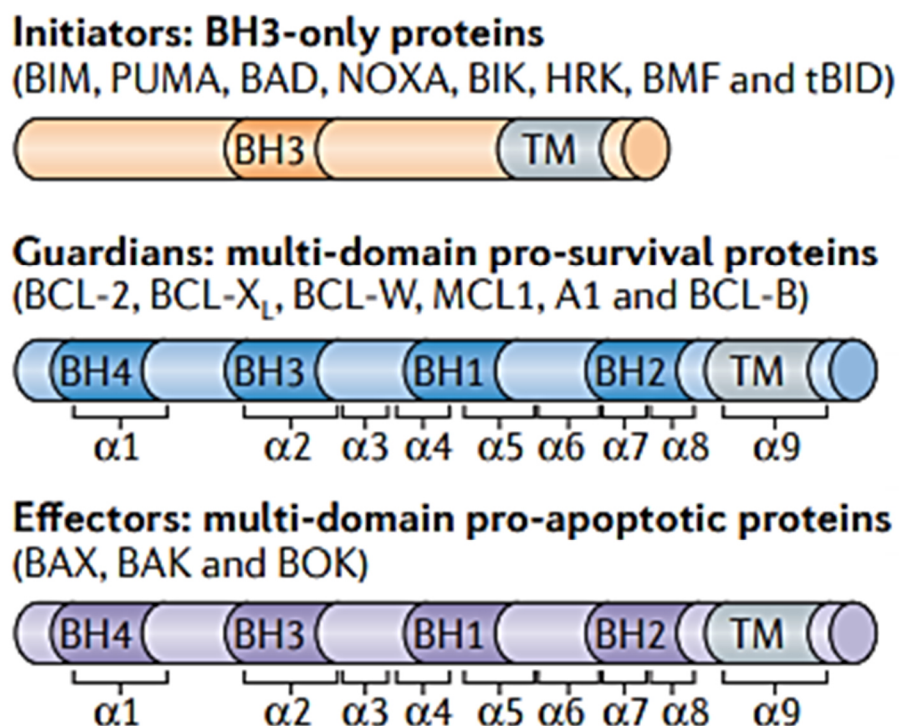
Obrázek 2: Vnitřní a vnější cesta aktivace apoptózy. (Loreto et al., 2014a).

Po permeabilizaci membrány dochází k uvolňování cytochromu C z mezimembránového prostoru do cytosolu. Uvolňuje se velké množství Ca^{2+} z endoplazmatického retikula, prohlubuje se tak permeabilizace mitochondriální membrány a dochází ke ztrátě mitochondriálního elektrochemického potenciálu. Z mitochondrií se do cytosolu uvolňuje tzv. *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases Protein* (SMAc), nazývaný také jako protein *Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low pI* (DIABLO). Ten se váže na antiapoptotické proteiny v cytosolu a dochází tak k uvolnění kaspáz a jejich aktivaci. Transport většiny cytochromu C do cytosolu znamená, že buněčnou smrt již nelze zvrátit. Cytochrom C

se následně váže na *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (APAF-1) a dochází k vazbě s prokaspázou 9. Tento komplex nazýváme apoptozom a jeho funkcí je plná aktivace kaspázy 9, která následně aktivuje kaspázu 3, jež je nezbytná pro aktivaci efektorové části apoptotického procesu (Loreto et al., 2014b).

2.1.1.1 Proteiny Bcl-2 rodiny

Proteiny Bcl-2 rodiny můžeme rozdělit do 3 základních podskupin podle tzv. *BCL-2 homology* (BH) 1-4 domén, které obsahují (obrázek 3). Společnou vlastností pro proteiny Bcl-2 rodiny je schopnost vytvářet homodimery a heterodimery se svými vazebnými partnery. Heterodimerizace mezi antiapoptotickými a proapoptotickými členy této proteinové rodiny je nedílnou součástí apoptotického procesu, kdy dochází k vzájemné inhibici aktivity (Tsujimoto, 1998).



Obrázek 3: Proteiny Bcl-2 rodiny. (Czabotar et al., 2014).

V iniciační fázi apoptotického procesu hrají klíčovou roli proteiny obsahující pouze BH3 doménu, a proto tyto proteiny bývají nazývány jako tzv. *BH3-only*. Patří sem proapoptotické proteiny *BCL-2 Interacting Mediator of Cell Death* (BIM), *p53-Upregulated Modulator of Apoptosis* (PUMA), *BCL-2 Antagonist of Cell Death* (BAD), *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate Induced Protein 1* (PMAIP1), více známý jako

NOXA, *BCL-2-Interacting Killer* (BIK), *BH3 Interacting-Domain Death Agonist* (tBID), *BCL-2-Modifying Factor* (BMF) a *Activator of Apoptosis Harakiri* (HRK), jehož funkce je nejlépe charakterizována v nervovém systému (Czabotar et al., 2014; Kaya-Aksoy et al., 2019).

Mezi další proteiny Bcl-2 rodiny obsahující domény BH1-4 patří např. protein BCL-2 a proapoptické efektorové proteiny *BCL-2-Associated X Protein* (BAX) a *BCL-2 Antagonist/Killer* (BAK) (Czabotar et al., 2014). Za fyziologických podmínek, BAX cykluje mezi vnější mitochondriální membránou a cytosolem. BAK je lokalizován také ve vnější mitochondriální membráně, kde je zakotvený v lipidové dvojvrstvě pomocí své hydrofobní C-koncové alfa smyčky v interakci s napětově řízeným aniontovým kanálem 2 (Karch et al., 2013).

Tyto výše uvedené proteiny Bcl-2 rodiny jsou nedílnou součástí apoptotického procesu. I když se jedná o skupiny funkčně a strukturálně odlišných proteinů, dochází mezi nimi k interakcím. Po apoptotickém stimulu, kdy je buňka vystavena stresu, dojde ke stimulaci proteinů obsahujících pouze BH3 doménu. BAX a BAK začnou formovat oligomery, které jsou schopny vytvářet póry v intracelulárních membránách, v tomto případě ve vnější mitochondriální membráně. Dojde k uvolnění cytochromu C, který se váže na APAF-1 a dochází k vazbě s prokaspázou 9 a její aktivaci. Aktivovaná kaspáza 9 následně aktivuje efektorové kaspázy (Czabotar et al., 2014).

Ztráta mitochondriálního membránového potenciálu je antagonizována antiapoptotickými proteiny BID, BIM, PUMA a NOXA. Tyto proteiny se nachází ve vnější membráně mitochondrií a v membráně endoplazmatického retikula a inhibují oligomerizaci BAX a BAK fyzickou interakcí s jejich mitochondriální zásobou. Proteiny BCL-2 a BCL-X_L potom inhibují únik cytochromu C do cytosolu (Loreto et al., 2014b).

2.1.2 Vnější cesta aktivace apoptózy

Vnější dráha aktivace apoptózy, neboli také receptory zprostředkovaná buněčná smrt (Loreto et al., 2014b), je aktivována prostřednictvím vazby ligandů buněk imunitního systému (T-lymfocyty CD8+, NK, buňky) na receptory cílové buňky (obrázek 2). Tyto ligandy buněk imunitního systému nazýváme ligandy smrti a patří mezi ně Fas ligand (FasL), TNF α nebo *Tumour necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand receptors* (TRAIL). Receptory cílových buněk se nacházejí na buněčné membráně, nazýváme je receptory smrti a patří mezi ně např.

Fas Receptor (FasR), TNFR1, DR4 nebo DR5. Součástí těchto receptorů jsou tzv. domény smrti, které jsou orientovány do intracelulární části buněčné membrány, např. doména smrti FasR se nazývá *Fas-Associated Death Domain* (FADD). Funkcí domén smrti je vazba na prokaspázy 8 nebo 10 a vznik komplexu *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), kde dochází k autokatalytické aktivaci kaspáz 8 či 10. DISC poté aktivuje kaspázy 3, 6 a 7 a dochází tak ke spuštění efektorové dráhy apoptózy, nebo štěpí protein BID na tBID a tím aktivuje vnitřní apoptotickou dráhu (Su et al., 2015).

2.1.3 Efektorová fáze apoptózy

Efektorová fáze apoptózy je spuštěna ireverzibilní aktivací efektorových kaspáz 3, 6 a 7. Dochází k reorganizaci a štěpení proteinů cytoskeletu, jako jsou např. aktin, myosin a gelsolin (Henry et al., 2013; Ndozangue-Touriguine et al., 2008). Následně dochází ke kondenzaci jádra a chromatinu (pyknóza), k fragmentaci DNA a rozpadu jádra na malé fragmenty (karyorexe). Následně se vytvoří apoptotická tělíska, která jsou fagocytována.

2.1.3.1 Efektorové kaspázy a další proteiny

Důležitou roli během apoptózy hrají kaspázy, jejichž aktivace se využívá k detekci apoptotického procesu (Gilliams-Francis et al., 2003). Kaspázy jsou cysteinové proteázy, které štěpí substráty v místě kyseliny asparagové. Jejich neaktivní formy, prokaspázy, patří mezi zymogeny, které jsou složeny z N-terminální prodomény a ze dvou dalších podjednotek, tj. p20 (= 20 kDa) a p10 (= 10 kDa). Můžeme je rozdělit do tří skupin: zánětlivé, iniciační a efektorové kaspázy, z nichž u lidí se účastní apoptotického procesu skupina iniciačních (2, 8, 9, 10) a efektorových (3, 6 a 7) kaspáz (Lavrik et al., 2005; McIlwain et al., 2013).

Kaspáza 3 štěpí celou řadu substrátů v buňce, např., induktor apoptotické kondenzace chromatinu, DNA fragmentační faktor (DFF), nebo poly(ADP-ribózu) polymerázu 1 (PARP-1). Tato kaspáza hraje také klíčovou roli při apoptóze v embryonálních nervových buňkách (Gilliams-Francis et al., 2003).

PARP-1 patří do skupiny polymeráz, které jsou DNA dependentní a nesou negativně nabitě zbytky ADP-ribózy na buněčný NAD⁺. Nejstudovanější protein z této skupiny je nukleární enzym PARP-1 (= 118 kDa), jehož aktivátorem je vznik DNA

zlomů. Tento protein se účastní reparačních dějů v DNA (Gilliams-Francis et al., 2003). V průběhu apoptózy je PARP-1 štěpen pomocí kaspázy 3, která je translokována do jádra. Vznikají fragmenty o velikostech 89 kDa a 24 kDa (Chaitanya et al., 2010). Fragmentaci PARP-1 jsou inhibovány reparační mechanismy v buňce. Detekce těchto fragmentů se využívá jako marker apoptózy.

Další z mnoha skupin proteinů, které se účastní apoptotického procesu, je skupina c-JUN terminálních kináz (JNKs). V lidském organismu se vyskytují 3 různé izoformy JNK1-3, z nichž JNK3 je exprimována pouze v mozku, srdci nebo varlatech. Signalizace JNKs je poměrně složitá. JNKs mají celou řadu substrátů (např. proteiny p53 nebo p73) a jsou tak schopny aktivovat nebo inhibovat proces apoptózy (Grynberg et al., 2017). Tyto enzymy mohou fosforylovat např. proteiny Bcl-2 rodiny a zprostředkovat tak apoptotický proces (Lei and Davis, 2003). Úroveň exprese fosforylovaných JNKs může být využita jako doplňující marker při detekci apoptózy.

2.1.3.2 Kondenzace jádra a chromatinu

Kondenzace jádra a jaderné DNA, neboli pyknóza, je ireverzibilní proces, který je běžně spojován s apoptózou, ale i nekrotózou (Hou et al., 2016). S procesem apoptózy je spojována tzv. nukleolytická pyknóza, kdy dochází ke kondenzaci chromatinu do velkých shluků, které mohou být následně součástí vytvořených apoptotických tělísek (Gotzmann et al., 2000; Hou et al., 2016).

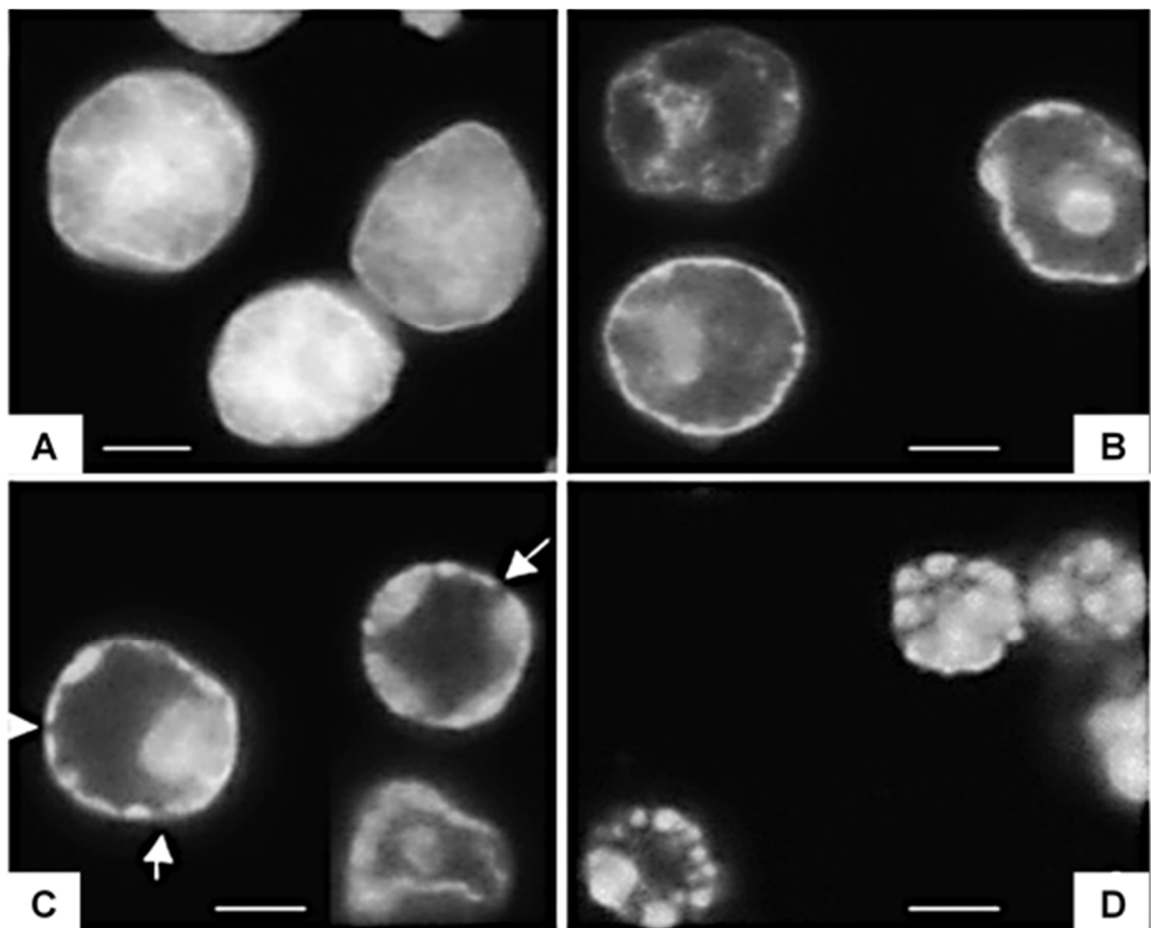
O apoptotické kondenzaci chromatinu zatím není příliš známo. Důležitou roli hraje *Apoptosis Inducing Factor* (AIF), který je během apoptotického procesu uvolňován z mitochondrií, a může způsobovat kondenzaci chromatinu do tvaru prstence po okrajích jádra. Když je AIF depletován, rozpad jádra probíhá fyziologicky, nebo je dokonce potencován pomocí DFF. V buňkách, které nemají funkční systém DFF, umlčení genu pro AIF způsobí hyperkondenzaci chromatinu (Tone et al., 2007).

Dalším faktorem, který je schopen indukovat apoptotickou kondenzaci chromatinu *in vitro*, je induktor apoptotické kondenzace chromatinu (ACN1). Jeho přesná role však není úplně jasná, vzhledem k přetrvávající kondenzaci chromatinu i po depleci, nebo umlčení tohoto genu *in vitro* a *in vivo* (Joselin et al., 2006; Tone et al., 2007). ACN1 je exprimován v různých izoformách, které jsou generovány alternativními sestřihy. Během apoptózy je ACN1 štěpen aktivovanou kaspázou 3 a zprostředkovává apoptotickou kondenzaci chromatinu *in vitro* (Joselin et al., 2006;

Sahara et al., 1999; Wang et al., 2014). ACN1 je také součástí proteinového komplexu *Apoptosis and Splicing-Associated Protein*, který se účastní sestřihu mRNA.

ACN1 by se tedy mohl účastnit jak apoptózy, tak zpracování pre-mRNA. ACN1 je navíc lokalizován v interchromatinových granulech v jádře, které slouží jako úložiště pro proteiny podílející se na sestřihu mRNA (Joselin et al., 2006). Štěpení ACN1 je ale možné detekovat i ve spojení s jinými ději v buňce spojenými s aktivací kaspáz, jako např. při erytropoéze (Zermati et al., 2001).

Ve své studii dr. Tone et al. (2007) rozdělili apoptotickou kondenzaci jádra do 3, resp. 4 fází (obrázek 4): 0 - nekondenzované jádro; 1 - kruhová kondenzace; 2 - řetězková kondenzace; 3 - nukleární kolaps a rozpad jádra.



Obrázek 4: Kondenzace chromatinu. A) Fáze 0 – nekondenzované jádro; B) Fáze 1 - kruhová kondenzace; C) Fáze 3 – řetězková kondenzace; D) Fáze 4 – nukleární kolaps (Tone et al. 2007).

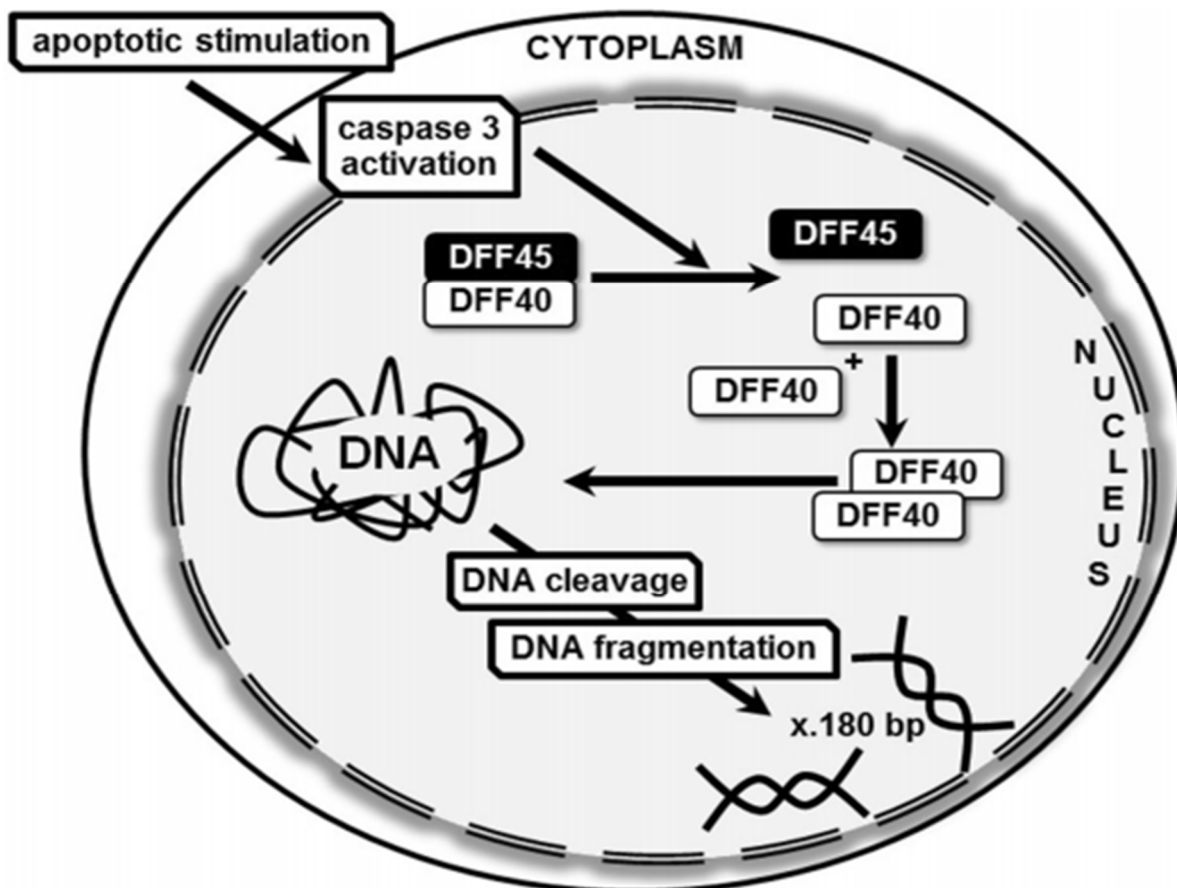
Kruhová kondenzace jádra je charakteristická kondenzací chromatinu po obvodu jaderné obálky. Tento druh kondenzace nevyžaduje aktivitu DNázy. Další

stupeň kondenzace chromatinu je řetízková kondenzace, která již aktivitu DNázy vyžaduje. Kondenzovaný chromatin je pozorovatelný po obvodu jádra. Od kruhové fáze kondenzace ho můžeme odlišit tím, že jsou po obvodu viditelné mezery. Poslední fází jaderné kondenzace je již nukleární kolaps a rozpad jádra. Pro přechod do této fáze je nutná přítomnost ATP. Dochází také k postupnému přibližování centromer, tzn. ke kondenzaci chromatinu (Tone et al., 2007).

2.1.3.3 DNA fragmentace

Klíčovou roli při kondenzaci chromatinu a štěpení DNA hraje DFF, který je tvořen ze dvou podjednotek – z katalytické podjednotky o velikost 40 kDa (DFF40) a regulační podjednotky o velikosti 45 kDa (DFF45). DFF45 slouží jako chaperon pro DFF40, a proto ho za běžných podmínek inhibuje. DFF bývá označován také jako komplex kaspázou aktivované DNázy (CAD) a inhibitoru CAD (ICAD). Tato terminologie CAD/ICAD je však užívána především ve spojitosti s myšmi (Widlak et al., 2000).

Při apoptóze je pomocí kaspázy 3 aktivován DFF40 odštěpením DFF45 podjednotky. DFF40 poté degraduje chromozomální DNA v jádře a způsobuje kondenzaci chromatinu (Elmore, 2007). DFF40 nasedá na dvoušroubovici DNA v internukleozomálních oblastech s preferencí na oblasti bohaté na adenin a thymin a dochází ke štěpení DNA na fragmenty o velikosti cca 180 bp (obrázek 5).



Obrázek 5: Štěpení DNA při apoptóze. DFF40 – katalytická podjednotka DNA fragmentačního faktoru o velikost 40 kDa; DFF45 – regulační podjednotka DNA fragmentačního faktoru o velikosti 45 kDa.

2.2 Detekce apoptózy

Apoptóza zahrnuje řadu morfologických a biochemických změn v buňce, které mohou být využity pro její detekci. Mezi nejčastěji používané metody pro analýzu morfologie buněk patří mikroskopické metody (např. světelná, fluorescenční a elektronová), další často používanou metodou je průtoková cytometrie. K detekci DNA zlomů a DNA fragmentace se používají metody jako TUNEL, DNA žebřík a Kometová metoda.

Jako doplňkové testy pro studium apoptózy můžeme využít i testy, které se využívají např. k charakterizaci stavu buněk. K detekci biochemických změn v buňkách se používají testy ke stanovení funkce intracelulárních dehydrogenáz nebo detekce glutathionu. Stejně významnou roli hraje analýza proteinové exprese, především tedy *Western Blotting* a 2D elektroforéza.

2.2.1 Analýza morfologie buněk

Pro detekci a vizualizaci morfologických změn v buňce během apoptotického procesu se používá např. průtoková cytometrie a řada mikroskopických technik. Mezi nejčastěji používané řadíme např. světelnou mikroskopii s fázovým kontrastem, fluorescenční mikroskopii nebo elektronovu mikroskopii.

2.2.1.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FC) je často využívanou metodou, která umožňuje analýzu jednotlivých buněk. Nachází uplatnění v mnoha oborech jako např. v imunologii nebo molekulární biologii.

Součástí průtokového cytometru je laserový paprsek, kterým prochází jednotlivé buňky. Základními veličinami analyzovanými pomocí FC jsou rozptyl světla a intenzita fluorescence. Rozptyl světla je zaznamenáván detektorem ve dvou směrech proti ose laserového paprsku: v úhlu 20° - *Forward Scatter* (FSC) a v úhlu 90° - *Side Scatter* (SSC). FSC se používá především pro rozlišení živých a mrtvých buněk, SSC na rozlišení granulózních a ngranulózních buněk. Speciálním typem průtokové cytometrie je tzv. třídění buněk na základě fluorescence (FACS), které umožňuje třídít buňky do jednotlivých nádob podle rozptylu světla a fluorescence. Roztříděné buňky je poté možné použít k dalším analýzám.

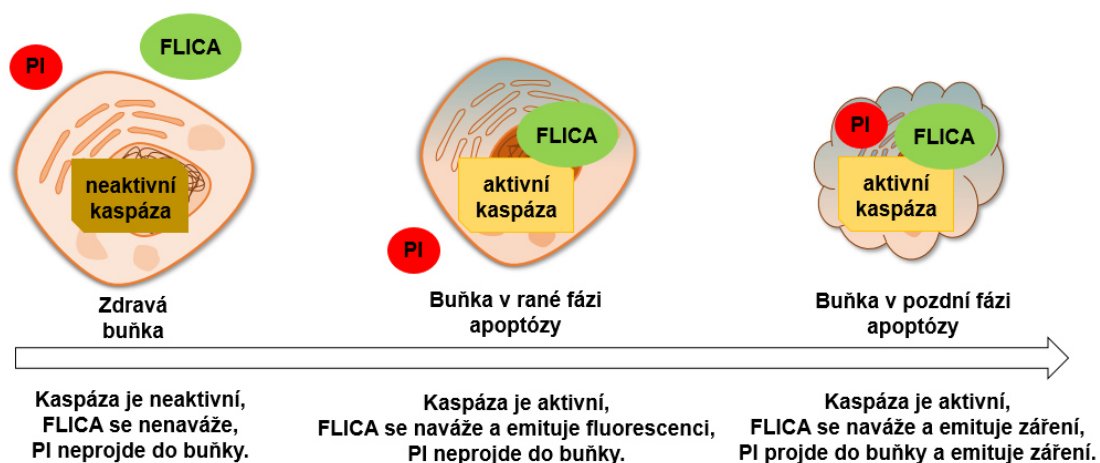
K fluorescenčnímu značení pro analýzu pomocí FC může být využita transfekce se značením buněk pomocí fluorescenčních proteinů, fluorescenční barvení určité buněčné struktury, či užití specificky značených protilátek (McKinnon, 2018). Průtoková cytometrie je často používanou metodou i ve spojení s detekcí apoptotického procesu. Mezi markery apoptózy často detekované pomocí průtokové cytometrie patří ztráta mitochondriálního membránového potenciálu (MMP), vystavení fosfatidylserinu na vnější buněčnou membránu, aktivace kaspáz, kondenzace chromatinu a štěpení DNA, nebo také exprese fluorescenčně značených proteinů.

K detekci ztráty MMP se využívá např. tetrametylrhodamin metylester perchlorát (TMRM). TMRM je lipofilní kationická oranžová fluorescenční sonda, která je schopna vstupovat do živých buněk, kde se za fyziologických podmínek hromadí v negativně nabitým matrix mitochondrií. V případě ztráty MMP se sonda TMRM uvolňuje z poškozených mitochondrií a je volně rozptýlena v cytoplazmě. Tím

dochází ke snížení intenzity fluorescence, kterou jsme schopni detekovat (Wlodkowic et al., 2009).

Stejně jako u fluorescenčního mikroskopu je pomocí průtokové cytometrie možné detekovat vystavení fosfatidylserinu na vnější buněčnou membránu fluorescenčně značeným Annexinem V, obzvláště v kombinaci s barvením propidiumjodidem (PI) k rozlišení nekrotických buněk od apoptotických (Fakai et al., 2019; McKinnon, 2018).

K detekci aktivace kaspáz pomocí průtokové cytometrie se klasicky využívá užití specifického fluorescenčního substrátu konkrétní analyzované kaspázy. Po aktivaci kaspázy dojde ke štěpení fluorescenčního substrátu a emitovanou fluorescencí detekujeme pomocí FC (McKinnon, 2018). Další možností detekce kaspáz pomocí FC je použití fluorochromem značených inhibitorů kaspáz (FLICA) (obrázek 6).



Obrázek 6: Detekce aktivace kaspáz prostřednictvím FLICA. FLICA - fluorochromem značené inhibitory kaspáz; PI – propidiumjodid.

FLICA jsou ligandy s vysokou afinitou k aktivnímu centru konkrétní kaspázy. Fluorescenční značka umožňuje detekci komplexu FLICA-kaspáza uvnitř živých buněk. Toto značení může být použito spolu s barvením s PI k rozlišení jednotlivých fází apoptózy, kdy PI je pozitivní u již mrtvých, nebo hodně poškozených (Darzynkiewicz et al., 2011).

Průtoková cytometrie se dále využívá k detekci DNA zlomů. DNA zlomy jsou obarveny pomocí fluorescenční barvy, jejíž fluorescenci detekujeme. K posouzení stavu jádra a DNA buněk se využívá fluorescenční barvení pomocí barvy Hoechst 33342 (Al-Katib et al., 2020; Schmid et al., 2007). Změny v permeabilitě membrány

během apoptózy umožní vstup většího množství barviva Hoechst 33342 (H33342) do poškozených buněk, než do buněk zdravých a detekujeme tak větší intenzitu fluorescence. Zároveň může být detekována snížená hodnota FSC a zvýšená hodnota SSC (Schmid et al., 2007).

Dalším používaným stanovením k detekci apoptózy je detekce sub-G1 buněčné populace, resp. buněk s oligonukleozomálními fragmenty DNA vzniklými během apoptotické DNA fragmentace. Buňky jsou nejprve permeabilizovány např. ethanolem. DNA fragmenty unikají z buňky, snižuje se tak obsah DNA v buňce a intenzita fluorescenčního značení klesá (Plesca et al., 2008).

2.2.1.2 Světelná mikroskopie s fázovým kontrastem

Světelná mikroskopie s fázovým kontrastem patří mezi základní techniky mikroskopie. Tento typ mikroskopie je založen na různém indexu lomu v různých částech vzorku, kdy dochází k fázovému posunu světelné vlny, který je pouhým okem neviditelný. Fázový mikroskop převede tyto fázové posuny na změny v intenzitě světla, kterou jsme schopni pozorovat. Můžeme tak pozorovat nezabarvené objekty v buňce, jako jsou např. jádro, které během apoptózy ztrácí svou integritu (Henry et al., 2013), nebo tvorbu blebů buněčné membrány (Janson et al., 2008).

2.2.1.3 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop je v současné době již běžným a nepostradatelným přístrojem pro hodnocení buněčného stavu. Při fluorescenční mikroskopii se využívají tzv. fluorofory, což jsou látky schopné fluorescence. Nejdříve dochází k ozáření fluoroforu zářením o určité vlnové délce, které elektrony excituje. Návrat elektronů na původní energetickou hladinu je doprovázen emisí fotonů o specifické vlnové délce, kterou jsme schopni detekovat.

Fluorescenční mikroskopie se používá k vizualizaci nejen buněčných organel, ale také k detekci velkého množství buněčných parametrů, jako jsou např. vystavení fosfatidylserinu na vnější buněčnou membránu, detekce MMP, produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo detekce DNA fragmentace.

Pro vizualizaci buněčných jader můžeme použít různá barvení. Mezi nejznámější fluorescenční barviva patří barvy skupiny Hoechst, DAPI, propidiumjodid a ethidiumbromid.

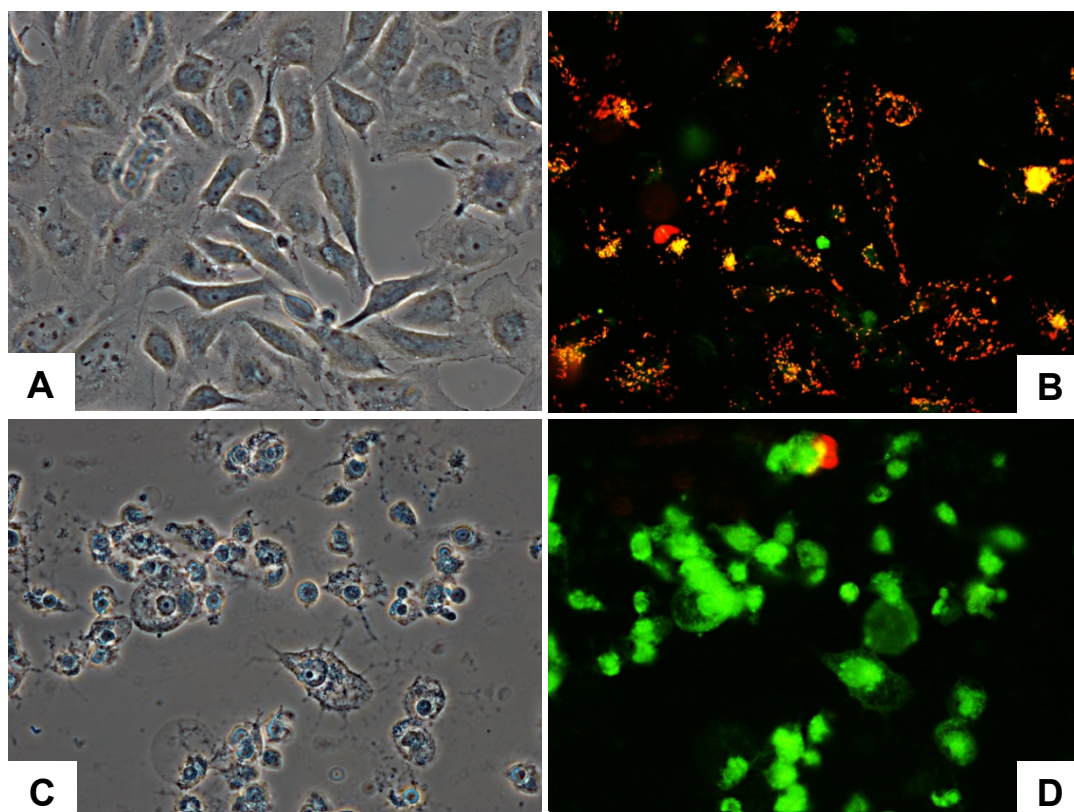
Modrá fluorescenční barviva Hoechst jsou strukturálně bisbenzimidiny, které nesou název podle německé firmy, která je vyvinula v druhé polovině 19. století. Tato barviva se váží do malého žlábků DNA s preferencí na místa bohatá na adenin a thymin. Do této skupiny fluoroforů patří barviva Hoechst 33258, 33342 a 34580 (Bucevicius et al., 2018). K barvení jader pro fluorescenční mikroskopii se nejčastěji používá barvivo Hoechst 33258, jehož excitační maximum je 352 nm a emisní maximum při 461 nm (Ki et al., 2016).

4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI) je modrá fluorescenční barva, která se stejně jako barviva Hoechst využívá k barvení jader. Excitační maximum DAPI je 359 nm a emisní maximum 461 nm. Stejně jako barviva Hoechst se váže i DAPI do oblasti malého žlábků DNA do regionů bohatých na adenin a thymin (Chazotte, 2014).

Pro barvení jader lze použít také propidiumjodid a ethidiumbromid. Obě barviva mají červenou barvu a absorbují v UV oblasti (Corliss and White, 1981). Patří mezi vysoce toxická interkalační barviva, která nejsou prostupná intaktní buněčnou membránou.

Fluorescenčním mikroskopem můžeme také pozorovat vystavení fosfatidylserinu na vnější membránu buněk, které je také důležitým markerem apoptózy. Často se používá barvení fluorescenčně značným Annexinem V, který se v přítomnosti Ca^{2+} iontů naváže na fosfatidylserin a umožňuje tak jeho detekci. Annexin V je však schopen se vázat i na buňky nekrotické, proto bývá tato metoda ještě doplněna barvením pomocí propidiumjodidu (Baskic et al., 2006; Corliss and White, 1981).

K detekci MMP se využívají např. fluorescenční sondy 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazol-karbokyaninjodidy (JC). Jedná se o lipofilní kationické sondy, které snadno prostupují do buněk, kde se hromadí v mitochondriích. V případě mitochondriálního poškození dochází ke změně membránového potenciálu a tím ke změně formy sondy, a tedy i ke změně emitovaného fluorescenčního záření, které pozorujeme (Sivandzade et al., 2019) (obrázek 7).



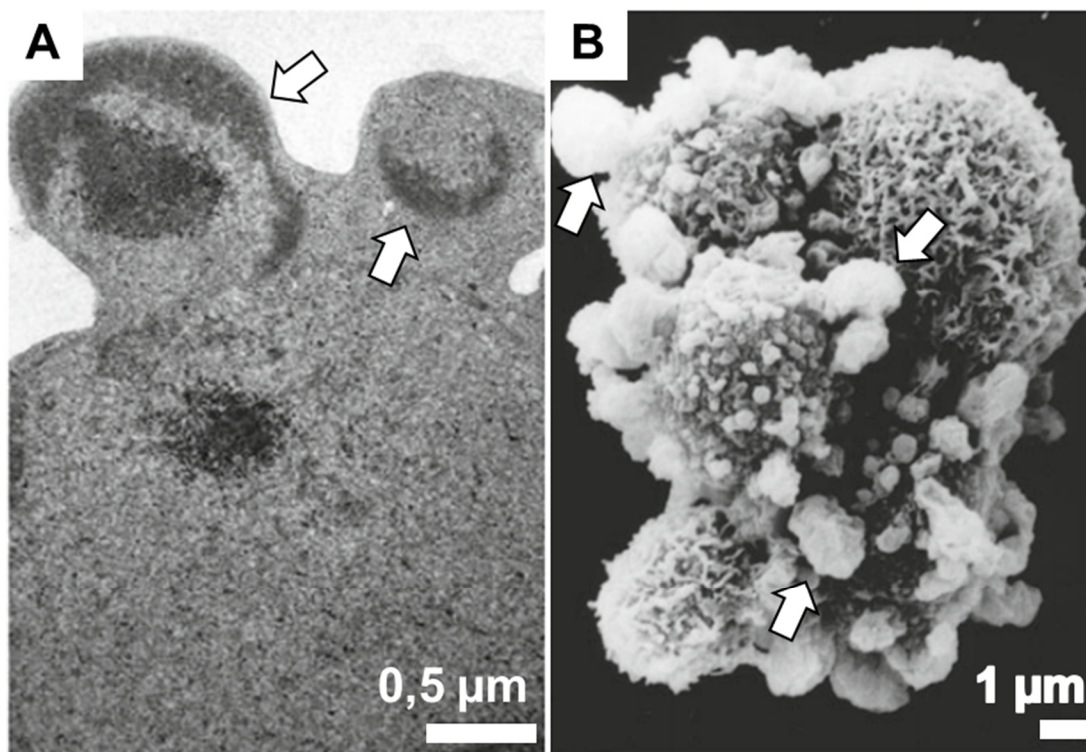
Obrázek 7: Detekce mitochondriálního membránového potenciálu (HK-2 buňky). A, B) Kontrolní buňky. C, D) Buňky ovlivněné 500 μM *tert*-butylhydroperoxidem po 24 h. A, C) Fázový kontrast. B, D) Fluorescence JC-1 (EX/EM=485/535 (595) nm). Zvětšení 200x.

Detekce pomocí fluorescenční mikroskopie je dále součástí metod využívaných k vizualizaci DNA zlomů. Mezi tyto metody patří metody TUNEL a Kometová metoda, které jsou detailně popsány v dalších kapitolách.

2.2.1.4 Elektronová mikroskopie

Základem elektronové mikroskopie je proud elektronů ve vakuu. Mezi často používané techniky elektronové mikroskopie patří skenovací elektronová mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie (Burattini and Falcieri, 2013) (obrázek 8). Elektronová mikroskopie však nepatří mezi rutinní techniky. Je náročná na vybavení, dále je nezbytná přítomnost zkušeného operátora.

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) detekuje elektrony vyražené z analyzovaného preparátu po dopadu proudu elektronů ze zdroje. Vyražené elektrony postupují k detektoru, kde je signál převeden na obraz. SEM se používá ke zobrazení detailní morfologie apoptotické buňky, např. k zobrazení blebů (obr. 5A) nebo zploštění buněk (Janson et al., 2008).



Obrázek 8: Snímky apoptotických buněk pomocí elektronové mikroskopie. A) Apoptotické buňky U937 (TEM), B) Apoptotické kmenové buňky CD34. Šipky ukazují na membránové bleby (Burattini and Falcieri 2013).

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) detekuje od preparátu odražené elektrony, které se po interakci s preparátem neodchýlí od hlavního elektronového svazku zdroje. Pomocí TEM může být vizualizována např. kondenzace a degradace jádra nebo tvorba blebů a cytoplazmatických apoptotických tělísek (obrázek 7B) (Tassell et al., 2000).

2.2.2 Detekce DNA zlomů a DNA fragmentace

Dalším markerem apoptózy, jenž je možné detekovat, je přítomnost DNA zlomů a fragmentace DNA. K jejich průkazu jsou často využívány metody TUNEL a elektroforetické metody DNA žebřík a Kometová metoda.

2.2.2.1 TUNEL

TUNEL (= *Terminal deoxynucleotidyl transferase Nick-End Labeling*) je metoda, která se využívá k detekci zlomů v DNA. Jedná se o poměrně rychlou metodu, která se dá využít při detekci DNA zlomů pomocí fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie. Metoda TUNEL se používá i v imunohistochemii. V tomto

případě je však nutné si uvědomit, že nakládání s tkání a její fixace mohou výrazně ovlivnit výsledky této metody (Huerta et al., 2007).

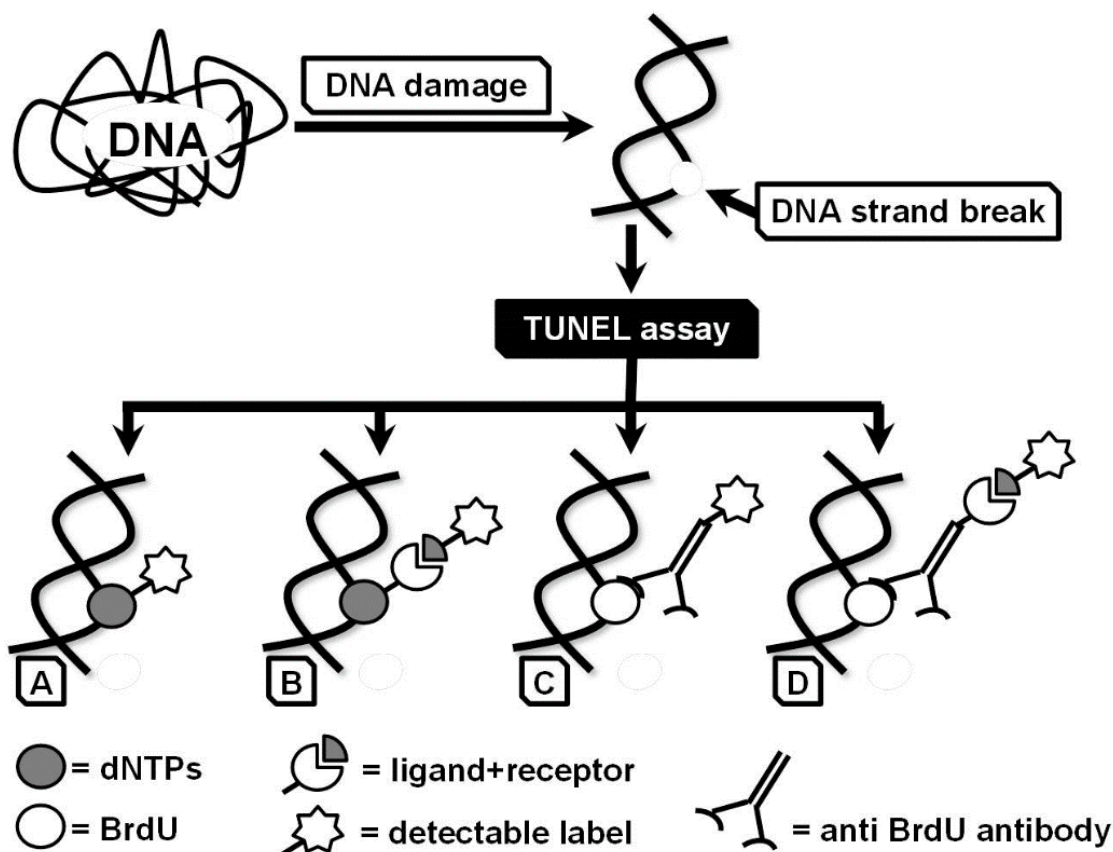
Hlavní roli hraje enzym endonukleáza, terminální deoxynukleotidyltransferáza (TdT), která katalyzuje vazbu značených deoxyuridinofosfátů (dUTPs) na hydroxylovou skupinu DNA v místě DNA zlomu. Značené dUTPs jsou následně detekovány (Kyrylkova et al., 2012a).

V rámci metody TUNEL se ke značení dUTPs používají nejčastěji dvě strategie - přímé barvení dUTPs, nebo barvení pomocí thymidinových analogů bromdeoxyuridinu (BrdU) a 5'-ethinyl-2-deoxyuridinu (EdU) (obrázek 9). Takto označené dUTPs, resp. DNA, můžeme analyzovat pomocí fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie (Kyrylkova et al., 2012b).

Speciálním případem značení DNA zlomů je inkorporace EdU. Ethinylová skupina EdU je kovalentně konjugována na fluorescenční azid a tato tzv. *click* reakce je katalyzována mědí (Chehrehasa et al., 2009). Fluorescenční azid je navíc poměrně malý. K tomuto druhu značení tedy není oproti technice značení BrdU třeba rozrušení helikální struktury DNA. Dále pak v systému EdU nepoužíváme protilátky, jak je tomu ve strategii značení pomocí BrdU (Buck et al., 2008).

Postup analýzy metodou TUNEL zahrnuje fixaci buněk a jejich následnou permeabilizaci. Permeabilizace je klíčovým krokem TUNEL reakce, protože umožňuje průnik jednotlivých složek reakční směsi do jádra buňky. Pro fixování buněk se v souvislosti s metodou TUNEL používá paraformaldehyd v koncentraci 4 % (Kim et al., 2018; Pulkkanen et al., 2000), protože zachovává uspořádání buněk a její struktury.

Dalším krokem je permeabilizace buněk pomocí Tritonu X-100. Pro tyto účely se používá v koncentracích 0,1-0,2 % (Kim et al., 2018; Pulkkanen et al., 2000). Následuje vazba značených dUTPs (BrdU) na volné -OH skupiny v místě zlomu DNA a vizualizace. Metoda TUNEL není metoda specifická pouze pro detekci apoptotické DNA fragmentace, ale detekuje i DNA fragmentaci vzniklou jinými příčinami, např. při nekróze, nebo reparativních procesech (Ansari et al., 1993; Kanoh et al., 1999). Proto je nutné pro potvrzení apoptotické DNA fragmentace doplnit výsledky vhodnými dalšími mikroskopickými analýzami, nebo i elektroforetickými analýzami, jako jsou metoda detekce DNA žebříku nebo Kometová metoda.



Obrázek 9: Strategie značení dUTPs v rámci metody TUNEL. Možnosti A) a B) zobrazují techniky přímého značení dUTPs a možnosti C) a D) zobrazují techniky nepřímého značení zlomů pomocí BrdU. A) Přímé značení dUTPs detekovatelnou značkou, B) navázání receptoru na dUTPs. Tento receptor interaguje s fluorescenčně značeným ligandem umožňujícím detekci. C) BrdU interaguje se značenou anti-BrdU protilátkou, D) BrdU interaguje s anti-BrdU protilátkou, která je značena receptorem. Tento receptor interaguje se značeným ligandem, který umožňuje následnou detekci BrdU, resp. DNA zlomů.

2.2.2.2 DNA žebřík

Metoda detekce DNA žebříku se využívá k detekci apoptózy již od roku 1976, kdy Skalka a kol. (1976) prokázali štěpení DNA chromatinu v lymfoidní tkáni *in vivo*. Později, Wyllie (1980) ve své studii prokázal internukleozomální štěpení DNA v thymocytech.

Detekce DNA žebříku využívá internukleozomálního štěpení DNA na fragmenty o násobcích velikosti 180 párů bazí. Takto vzniklé fragmenty po elektroforetickém dělení na agarózovém gelu připomínají žebřík, který je využíván k detekci apoptózy.

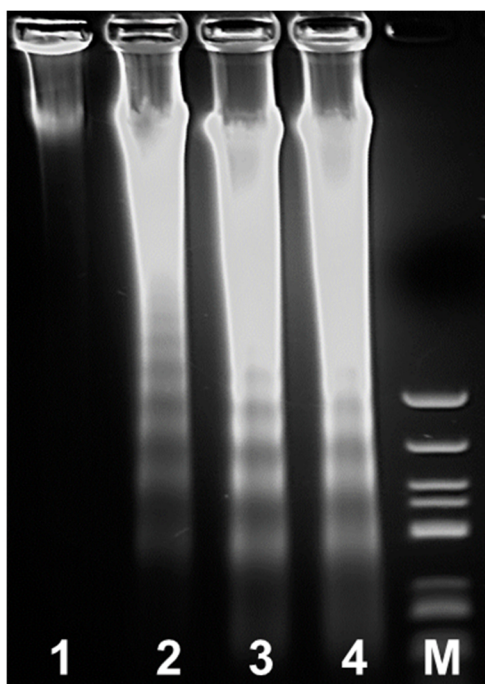
Metodika spočívá nejdříve ve sklizení inkubovaných buněk, poté následuje lyzační krok, kdy jsou buňky lyzovány různými mechanickými, nebo chemickými technikami. Savčí buňky nemají buněčnou stěnu ale pouze plazmatickou membránu,

není zde tedy třeba v případě detekce DNA žebříku využívat mechanické lyzační techniky. Pro lyzi savčích buněk jsou nejčastěji používány lyzační pufrы, které jsou založeny na mechanismu lyze buněk prostřednictvím osmotických jevů. Používá se celá řada lyzačních pufrů, nejčastěji však tyto roztoky obsahují jako hlavní složky tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) a etylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) (Barani et al., 2019).

Po lyzi buněk, kdy je buněčný obsah včetně DNA uvolněn do extracelulárního prostředí, je nezbytné provést izolaci DNA. Izolace DNA se provádí běžnými metodami, které jsou používány pro izolaci genomové DNA, např. fenol-chloroformová extrakce s následným srážením octanem amonným nebo isopropylalkoholem. Často se pro izolaci fragmentované DNA využívají také komerční kity (Kijima et al., 2019). Použití kitu pro izolaci DNA je rychlejší a přesnější, nicméně nevýhodou je vyšší pořizovací cena.

Někdy bývá po izolaci DNA zařazen krok čištění DNA RNázou (Chen et al., 2019b). Po přečištění a izolaci DNA je provedena horizontální elektroforéza v agarózovém gelu. Agaróza je polysacharid, který ve své 3D struktuře obsahuje kanálky a póry, jimiž se biomolekuly mohou pohybovat. Tato 3D struktura agarózy je udržována pomocí vodíkových můstků, které se dají snadno odstranit zahřátím, kdy agaróza ztekutí (Zucca et al., 2016). Agarózový gel je používán v širokém rozmezí koncentrací, pro lepší zaostření menších DNA fragmentů je vhodné použít vyšší koncentraci agarózy v gelu, a to až do 2 % (Kijima et al., 2019; Saadat et al., 2015; Suman et al., 2012).

Aplikované napětí při elektroforéze by mělo být zvoleno tak, aby nedocházelo k velkému nárůstu teploty v elektroforetickém systému. Při vyšších teplotách může docházet k rozpadu menších fragmentů DNA a tím ke ztrátě DNA. Nejčastěji je voleno napětí mezi 2-15 V/cm (Gong et al., 1994; Pariente et al., 2016; Takaki et al., 2014). K vizualizaci DNA je i přes své mutagenní vlastnosti nejčastěji používán ethidiumbromid, který se přidává do agarózového gelu během jeho přípravy (Kijima et al., 2019). Alternativou k ethidiumbromidu je např. SYBR-Safe, který není toxický (Saadat et al., 2015). Vizualizace je následně provedena v závislosti na zvoleném barvení DNA, v případě ethidiumbromidu se využívá detekce pomocí UV transiluminátoru. V případě, že je DNA apoptoticky fragmentována, je pozorován charakteristický DNA žebřík. Pokud DNA fragmentována není, v agarózovém gelu se nedělí a zůstává na čele gelu (obrázek 10).



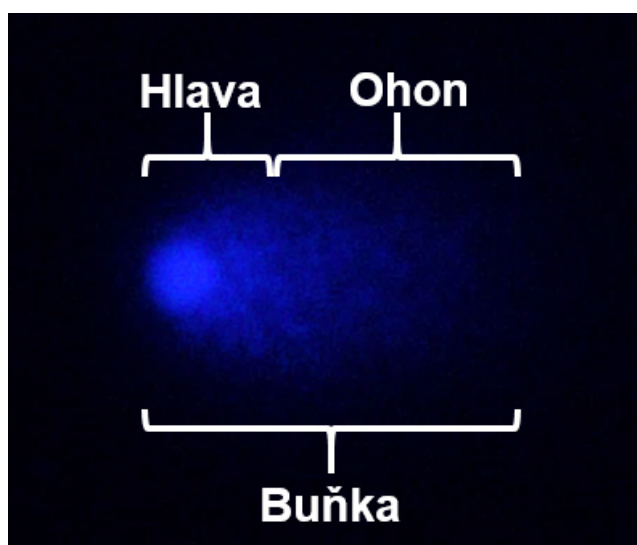
Obrázek 10: DNA žebřík. HepG2 buňky ovlivněné cisplatinou (CisPt) po 24 h. 1) Kontrolní DNA; 2) 25 μM CisPt; 3) 50 μM CisPt; 4) 75 μM CisPt; M) – Marker molekulové velikosti (páry bazí).

Detekce DNA žebříku je poměrně rychlá a levná metoda, která nepotřebuje speciální laboratorní vybavení. Tato metoda není vhodná pro vzorky s malým počtem buněk, sensitivita metody se pohybuje řádově pro 10^6 buněk, v závislosti na zvolené metodice izolace fragmentované DNA (Herrmann et al., 1994; Samarghandian and Shabestari, 2013). Naopak je tedy velmi vhodnou metodou pro detekci apoptotické DNA fragmentace u vzorků s dostatečným počtem buněk, např. u savčích buněčných linií nebo u tkáňových vzorků.

Fragmentace DNA se může také objevovat při nekróze, kdy lze po elektroforetickém dělení pozorovat tzv. *smear pattern*. Klíčové je při detekci DNA fragmentace také načasování. Internukleozomální fragmentaci DNA lze detekovat až v pozdějších fázích apoptózy. Pokud tedy v experimentu fragmentaci nedetekujeme, nemusí to znamenat, že buňka neprochází apoptózou (Elmore, 2007). Aby bylo možné vyhodnotit, zda se jedná skutečně o apoptotickou DNA fragmentaci, je nutné doplnit tuto metodu o další analýzy založené na jiném principu.

2.2.2.3 Kometová metoda

Další velmi často využívanou mikroeletroforetickou metodou pro stanovení míry poškození DNA je Kometová metoda, neboli gelová elektroforéza jednotlivých buněk (SCGE). Kometová metoda nese název podle charakteristického tvaru poškozené DNA, který po provedení elektroforézy připomíná kometu (obrázek 11). Kometa je složena z hlavy a ohonu, kdy jedna kometa představuje jednu buňku. Hlava komety obsahuje nefragmentovanou DNA, zatímco ohon komety je tvořen především DNA fragmentovanou. Velikost ohonu odpovídá míře DNA poškození.



Obrázek 11: Vzhled jádra buňky po detekci Kometovou metodou. Barvení Hoechst 33258.

Touto metodou detekujeme DNA zlomy, které vznikají přerušením fosfodiesterové vazby mezi dvěma deoxynukleotidy. Tyto zlomy mohou vznikat na jednom vlákně DNA jako jednořetězcové zlomy, nebo na obou vláknech DNA jako zlomy dvouřetězcové.

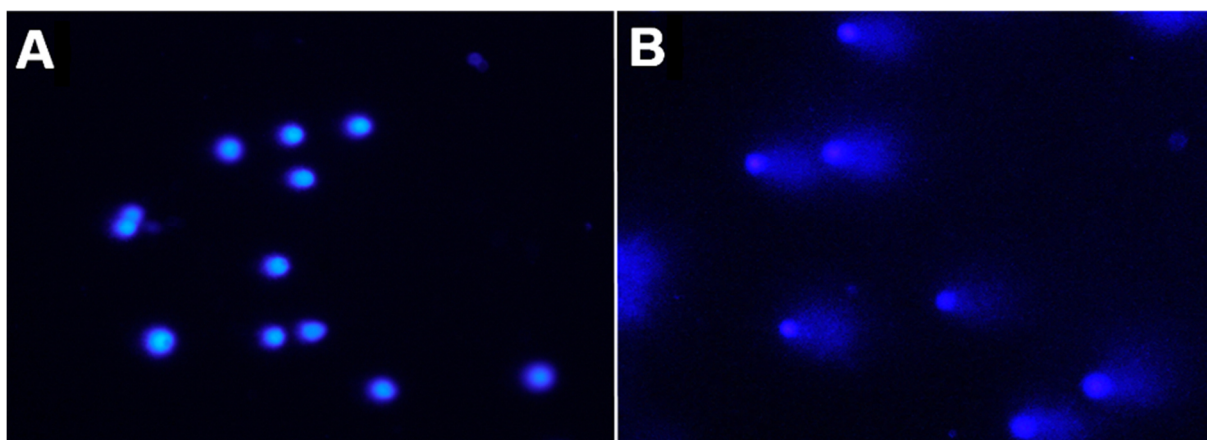
Kometovou metodu dělíme na dva základní typy – neutrální (Olive et al., 1993) a alkalickou (Singh et al., 1988). Neutrální SCGE je využívána k detekci především jednořetězcových zlomů, naproti tomu alkalická verze se používá k detekci zlomů dvouřetězcových.

Prvním krokem analýzy DNA pomocí Kometové metody je příprava mikroskopických sklíček. Mikroskopická sklíčka jsou nejprve potažena standardní agarózou a na ní je aplikována vrstva vysokotuhnoucí agarózy. Na takto připravená sklíčka jsou nanášeny buňky resuspendované v nízkotuhnoucí agaróze, která slouží pro fixaci buněk a zároveň jako gel pro následné elektroforetické dělení. Při přípravě

těchto sklíčků je důležité dávat pozor na to, abychom nanášeli stejný objem agarózy o definované koncentraci. V případě nerovnoměrně koncentrovaného nebo ztuhlého gelu, dochází k ovlivnění stanovení. Takto připravená sklíčka jsou dostupná i komerčně. Jejich velká výhoda je rovnoměrná vrstva agarózy a tudíž větší reproducibilita experimentů.

Po fixaci jsou buňky lyzovány. U alkalické verze metody následuje rozplétání DNA v alkalickém pufru, kdy dochází k rozplétání nadšroubovicového vinutí a tak i k detekci dvouřetězcových zlomů DNA. Základem lyzačního pufru je TRIS o vysokém pH (~10), EDTA a NaCl. Jako další složky pufru se používají Triton X-100 nebo dimethylsulfoxid (Mastaloudis et al., 2004; Rousset et al., 2000).

Následuje elektroforéza v alkalickém (neutrálním) prostředí, promytí, barvení DNA a vizualizace. K barvení DNA se používají běžně dostupné barvy pro barvení jader, jako jsou barviva Hoechst, DAPI, propidiumjodid nebo ethidiumbromid. Jádra nepoškozených a poškozených buněk po elektroforéze a barvení Hoechst 33258 jsou znázorněna na obrázku 12. Výsledné komety mohou být hodnoceny vizuálně nebo softwarově.



Obrázek 12: Jádra buněk po elektroforéze a vizualizaci (A549 buňky). A) Kontrolní nepoškozené buňky, B) 500 µM *tert*-butylhydroperoxid, 30 min. Barvení Hoechst 33258. Zvětšení 400x.

2.2.3 Detekce biochemických změn při apoptóze

2.2.3.1 Stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz

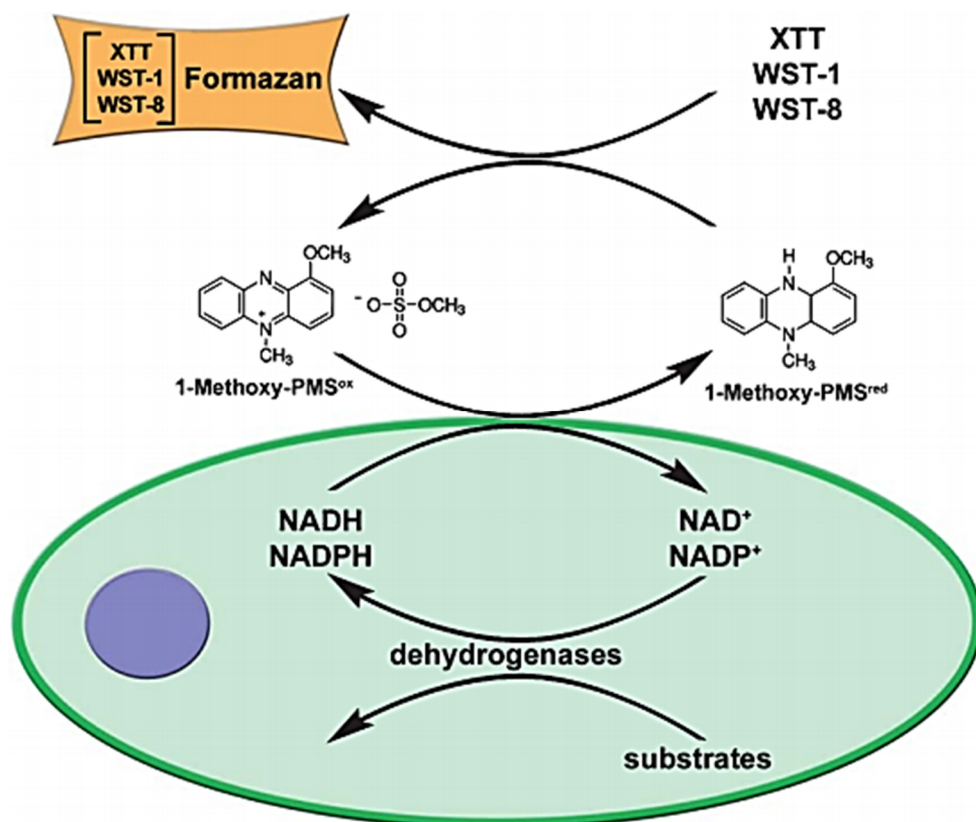
Aktivací apoptózy dochází mimo jiné také k poškození mitochondrií. Tato poškození můžeme odhalit stanovením aktivity mitochondriálních dehydrogenáz, které se využívají k detekci cytotoxicity obecně, ale i ve spojení s apoptózou. Tato skupina kolorimetrických testů využívá schopnosti mitochondriálních dehydrogenáz redukovat tetrazoliové soli na barevné produkty. Patří sem testy MTT, XTT a skupina testů využívající ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WST).

Sloučenina MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) je tetrazoliová sůl, která tvoří žlutý vodný roztok. Pomocí mitochondriálních dehydrogenáz je přeměněn na ve vodě nerozpustný formazan, který má fialovou barvu. Detekce je spektrofotometrická při 570 nm. Nevýhodou tohoto stanovení je vznik ve vodě nerozpustného formazanu, jehož precipitáty musí být před detekcí rozpuštěny (Yin et al., 2013).

Stanovení XTT využívá další tetrazoliovou sůl 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-karboxanilid. Původně má světle žlutou barvu a jeho redukovaný, ve vodě rozpustný produkt je oranžový a absorbuje při 475 nm (Yin et al., 2013) (obrázek 13).

Často používaná bývá také skupina WST činidel. Tuto skupinu odlišuje od MTT vznik ve vodě rozpustných formazanů, což zvyšuje senzitivitu stanovení (Yin et al., 2013). Vzhledem ke svému negativnímu náboji nejsou tato činidla schopná vstupovat do buněk (Lutter et al., 2017). WST-1 tvoří po redukcí formazan oranžové barvy, který absorbuje při 440 nm. V případě WST-8 vzniká také oranžový formazan absorbující při 450 nm (Chamchoy et al., 2019) (obrázek 13).

Dalším činidlem využívaným při detekci aktivity celulórních dehydrogenáz je modrý nefluorescenční resazurin (Alamar Blue). Resazurin je dehydrogenázami redukován na růžový fluorescenční resorufin (EX/EM=572/585 nm), který detekujeme (O'Brien et al., 2000; Tian et al., 2021).



Obrázek 13: Detekce celulárních dehydrogenáz pomocí XTT a WST. Methoxy-PMS^{OX/RED} - 1-metoxy-5-metyl-fenaziniummetylsulfát (Lutter et al., 2017).

2.2.3.2 Stanovení glutathionu

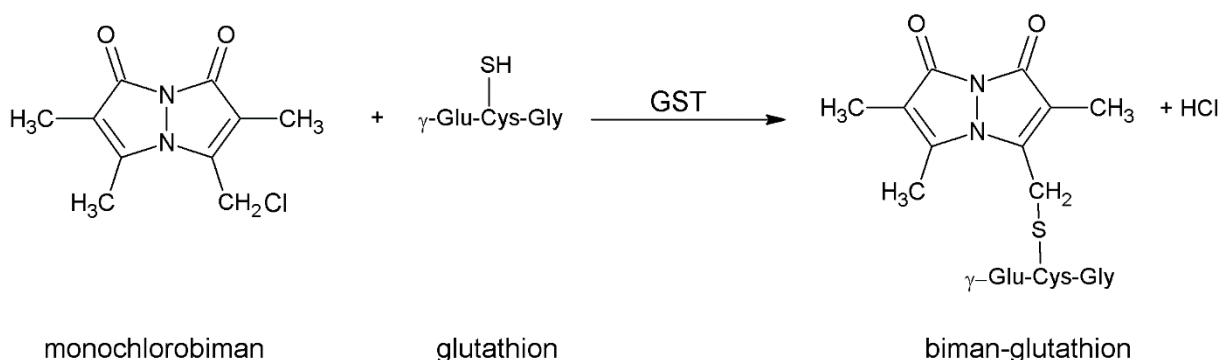
Glutathion (GSH) je tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin), který v buňce slouží jako silný antioxidant. Zajišťuje tak ochranu buněk proti oxidačnímu stresu a podílí se na udržení homeostázy. GSH reaguje s reaktivními formami kyslíku prostřednictvím glutathionperoxidáz a glutathion-S-transferáz a udržuje tak intracelulární redoxní prostředí. Koncentrace GSH v savčích buňkách je poměrně vysoká (mM) a je tedy nejvíce zastoupeným neproteinovým thiolem v buňkách (Circu and Aw, 2008; Zhou et al., 2018).

Glutathion se vyskytuje ve dvou formách – v redukované formě (GSH) a oxidované formě (GSSG). Redukovaná forma tvoří většinu GSH v buňkách. Při apoptotickém procesu dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) a následnému vyčerpávání GSH. Snížení hladiny GSH může tedy indikovat apoptotický proces (Circu and Aw, 2008).

K detekci GSH se nejčastěji používají metody založené na spektrofoto- a spektrofluorimetrické detekci. GSH může být derivatizován např.

pomocí *o*-ftalaldehydu, kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové, nebo monochlorobimanu (Capek et al., 2017).

Monochlorobiman (MCB) je velmi specifická, nefluorescenční permeabilní sonda. Uvnitř buňky reaguje s GSH a prostřednictvím reakce katalyzované glutathion-S-transferázou vytváří fluorescenční komplex biman-GSH, který detekujeme (Machado and Soares, 2012) (obrázek 14).



Obrázek 14: Reakce monochlorobimanu a glutathionu. GST – glutathion-S-transferáza.

Fluorescenční sondu 3-oxo-3H-fenoxazin-7-ylthiofen-2-karboxylát lze také využít k detekci GSH v buňkách. Tato sonda je selektivní a lze ji využít při detekci GSH nejen v živých buňkách, ale i v buněčných lyzátech (Zhou et al., 2018).

Pro detekci GSH *in vitro*, lze dále použít sondu CBT-Cys(SEt), což je 2-kyanobenzothiazolový zbytek s cysteinem chráněným disulfidem. Po redukci GSH za fyziologických podmínek dojde ke kondenzaci CBT-Cys(SEt) a tvoří se nanokroužky, které zvyšují absorpci UV záření při 380 nm (Yuan et al., 2013).

2.2.4 Detekce a analýza proteinů při apoptóze

Změny exprese proteinů můžeme detekovat pomocí klasických metod jako jsou 2D elektroforéza, nebo *Western Blotting* (WB). Mezi další analyzované proteiny během apoptózy patří kaspázy a cytochrom C.

Jak již bylo řečeno, důležitou roli v apoptotickém procesu hrají kaspázy. Detekce kaspáz může být založena na několika principech. Prvním základním způsobem detekce je detekce neaktivních prokaspáz i aktivních kaspáz prostřednictvím WB. Další možností je interakce aktivované kaspázy se specifickou značenou protilátkou a její následná spektrofotometrická nebo mikroskopická detekce,

případně detekce průtokovou cytometrií. Často se také využívá detekce fluorimetricky značeného substrátu, nebo značeného inhibitoru dané kaspázy.

Cytochrom C je dalším významným proteinem, jehož uvolňování do cytosolu slouží jako marker apoptózy. Můžeme ho detekovat např. mikroskopicky, prostřednictvím WB, nebo pomocí průtokové cytometrie (Campos et al., 2006). Vzorek je inkubován nejdříve s primární protilátkou proti cytochromu C, a poté se značenou sekundární protilátkou. Jako značení se používají fluorescenční barviva např. z rodiny AlexaFluor (Campos et al., 2006).

2.2.4.1 2D elektroforéza

Rozdíly mezi zastoupením proteinů v různých proteomech lze analyzovat prostřednictvím 2D elektroforézy. Jak naznačuje název, elektroforéza je složena ze dvou metod – izoelektrické fokusace a elektroforézy. Proteiny jsou nejdříve rozděleny podle svého izoelektrického bodu a následně i podle své velikosti. 2D elektroforéza je vhodným nástrojem např. pro analýzu fosforylace proteinů, které se běžnou SDS-PAGE špatně rozpoznávají. Fosfátová skupina posune náboj proteinu k zápornějším hodnotám a posune se tak i jeho izoelektrický bod. Například protein BCL-2 může být posttranslačně fosforylován a tato fosforylace je nezbytná pro jeho plnou antiapoptotickou funkci (Ruvolo et al., 2001).

2.2.4.2 Western Blotting a kapilární imunoelektroforéza

WB je dnes již klasická metoda používaná k analýze exprese proteinů. Proteiny jsou nejprve rozděleny pomocí polyakrylamidové elektroforézy v denaturujících podmínkách dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) a následně přeneseny pomocí elektrického proudu na membránu, kde jsou detekovány.

SDS-PAGE je základní metodou v proteomice a je nedílnou součástí metodiky WB. Při SDS-PAGE jsou proteiny denaturovány pomocí SDS a β -merkaptoetanolu, kdy SDS protein denaturuje a zároveň obalí negativním nábojem a β -merkaptoetanol naštěpí disulfidické můstky. Tyto proteiny, které si udrží primární strukturu a jsou obaleny negativním nábojem, jsou elektroforeticky rozděleny na základě své velikosti. Pokud bychom chtěli zachovat nativní strukturu proteinů, místo SDS-PAGE lze použít elektroforézu v nendenaturujících podmínkách, kdy se proteiny dělí podle svého přirozeného náboje.

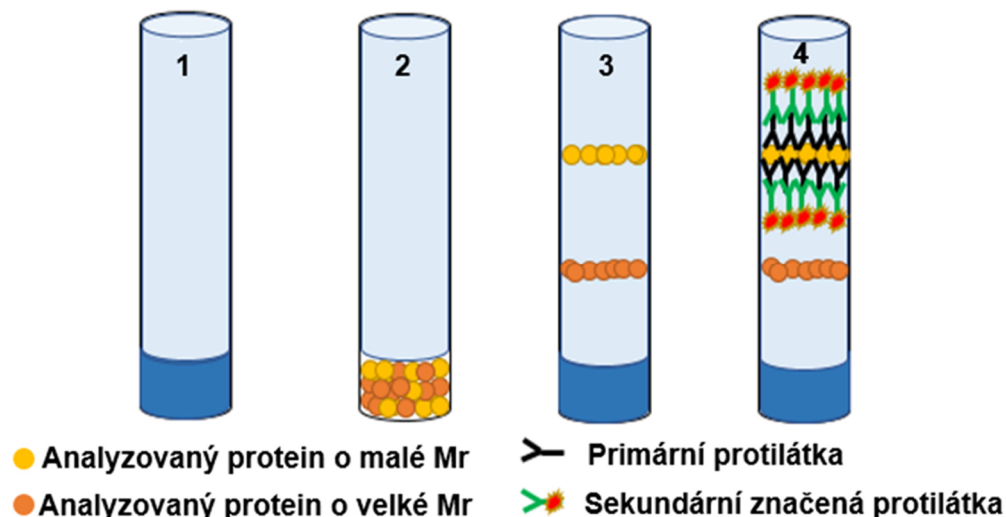
Základním materiálem, který využíváme při SDS-PAGE, je buněčný proteinový lyzát. Po elektroforetickém dělení lyzátu proteinů v polyakrylamidovém gelu jsou proteiny přeneseny pomocí elektrického proudu na membránu. Používají se membrány polyvinylidenfluoridové, nebo nitrocelulosové. Následuje detekce přenesených proteinů. Používá se systém primární/sekundární protilátka. Sekundární protilátka je značena např. enzymaticky, nebo fluorescenčně. V naší laboratoři nejčastěji používáme sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou, která oxiduje přidaný luminol a detekujeme chemiluminescenci.

Metoda *Western Blotting* je dnes již také automatizována a může probíhat ve speciálních přístrojích v kapilárách. Automatizovaný přístroj se nazývá Wes a využívá kapilární imunoelektroforézu (obrázek 15).



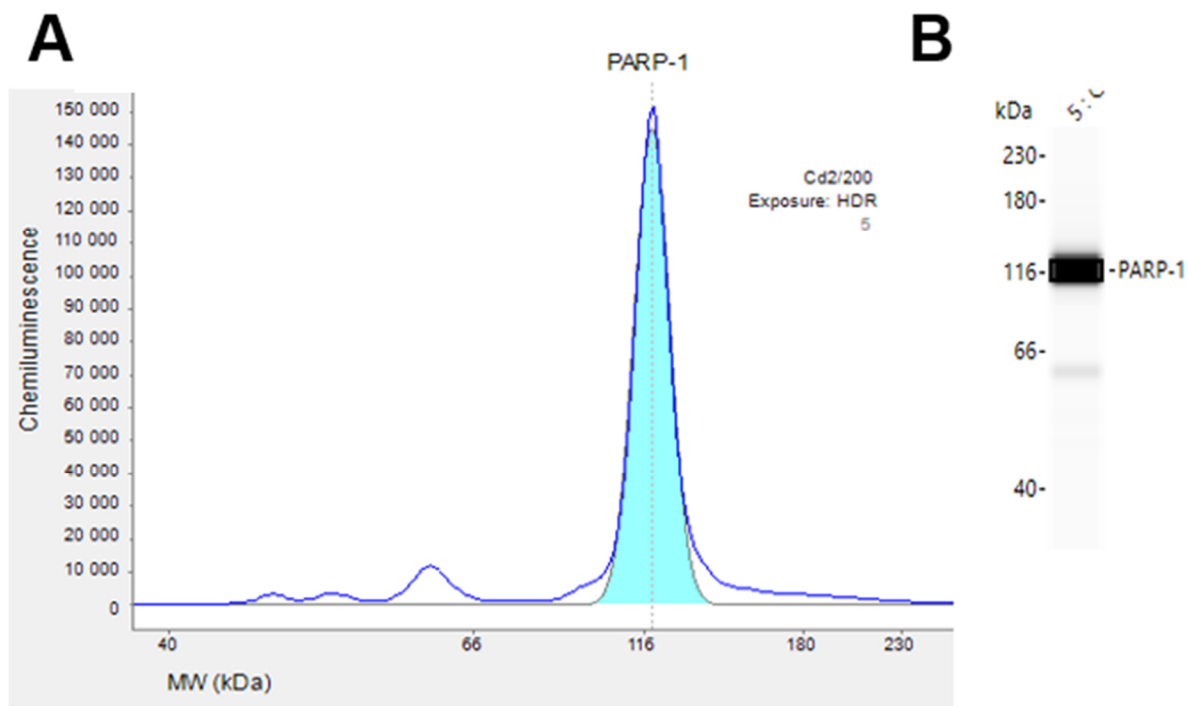
Obrázek 15: Přístroj Wes.

Příprava vzorků pro metodu *Simple Western* je podobná jako při klasickém uspořádání WB, kdy využíváme jako základní materiál proteinový lyzát. Jeho spotřeba je však výrazně nižší oproti klasickému uspořádání WB. Vzorky jsou denaturovány pomocí dithiotreitolu (DTT) a následně jsou pipetovány do mikrotitrační destičky, ze které jsou vzorky a potřebné reagentie automaticky nasávány přístrojem (obrázek 16).



Obrázek 16: Princip metody *Simple Western*. 1) Naplnění kapiláry matricí – tmavě modrá - zaostřovací, světle modrá - separační. 2) Nasátí vzorku proteinů na začátek kapiláry. 3) Proteiny jsou separovány podle molekulové hmotnosti a imobilizovány. 4) Interakce vzorku s primární neznačenou a sekundární značenou protilátkou.

Do kapiláry jsou nejdříve nasáty reagenty, které tvoří matici pro dělení proteinů, a poté vzorek. Matrice je tvořena zaostřovací a separační složkou, podobně jako u klasické SDS-PAGE. Proteiny ve vzorku jsou obaleny detergentem (DTT), mají tedy záporný náboj a pohybují se kapilárou. Následně jsou v ní imobilizovány, označeny primárními protilátkami a poté sekundárními značenými protilátkami. Nakonec je provedena chemiluminescenční detekce. Výsledkem je graf závislosti chemiluminescence na molekulové hmotnosti a proužkové zobrazení (obrázek 17). *Simple Western* nám poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace a je citlivější než klasický WB. Spotřeba vzorku je podstatně menší (~ 3 μL) a analýza je v porovnání s klasickým uspořádáním WB časově méně náročná.



Obrázek 17: Proteinová exprese PARP-1 (metoda *Simple Western*). A) Graf závislosti míry chemiluminescence na molekulové hmotnosti detekovaného proteinu; B) Proužkové zobrazení výsledků.

3. Cíle práce

- 1) Vyvinout spektrofluorimetrickou metodu využívající sondu Hoechst 33258 pro rutinní detekci nukleární kondenzace a fragmentace v buňkách.
- 2) Využít induktory apoptózy (cisplatina, kamptotecin, staurosporin) k detekci nukleární kondenzace a fragmentace.
- 3) Komparovat metodu využívající sondu Hoechst 33258 s dalšími metodami detekujícími apoptózu.

4. Experimentální část

4.1 Seznam použitých chemikálií

Anti- β -aktin protilátky (Sigma-Aldrich, USA)

Anti-JNKs protilátky (Promega, USA)

Anti-PARP-1 protilátky (Cell signaling, USA),

Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, USA)

Cisplatina, CisPt ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$; Mr = 300,1 g/mol; Sigma Aldrich, USA)

Deionizovaná voda ($G < 0,1 \mu\text{S}$)

DNA marker 100 bp (ThermoFisher Scientific, USA)

EDTA (Mr = 292,24 g/mol; Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 10x, DPBS 10x (Sigma-Aldrich, USA)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose, DMEM (Sigma Aldrich, USA)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1) (Sigma Aldrich, USA)

Ethanol, EtOH ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OH}$; Mr = 46,07 g/mol; Merck KGaA, SRN)

Ethidium bromid (20 mg/mL; Top-Bio a.s., Česká republika)

Fetální bovinní sérum, FBS (Gibco, USA)

HEPES pufr (Gibco, USA)

Hoechst 33258 ($\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{Cl}_3\text{N}_6\text{O}_6$; Mr = 623,96 g/mol; Sigma Aldrich, USA)

Chlorid kademnatý (CdCl_2 ; Mr = 183,3 g/mol; Sigma Aldrich, USA)

Insulin/transferin/seleničitan sodný, ITS (Sigma-Aldrich, USA)

Kamptotecin, CAM (Mr = 348,35 g/mol; Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina fosforečná (H_3PO_4 ; 85 %, Penta a.s., Česká republika).

L-glutamin (Gibco, USA)

Minimální esenciální médium, MEM (Sigma-Aldrich, USA)

Monochlorobiman ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$; Mr = 226,7 g/mol; Sigma Aldrich, USA)

MS-SAFE inhibitor proteáz a fosfatáz (Sigma-Aldrich, USA)

Nanočástice TiO_2 P25 (Sigma-Aldrich, USA)

Neesenciální aminokyseliny, NAA (Gibco, USA)

Penicilin/streptomycin, P/S (Gibco, USA)

Pyruvát sodný, PYR (Gibco, USA)

Rekombinantní epidermální růstový faktor, EGF (Gibco, USA)

RIPA pufr (Sigma-Aldrich, USA)

Staurosporin, STA (Mr = 466,53 g/mol; Sigma-Aldrich, USA)

Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)
WST-1 (Roche, Německo)

Soupravy a sady

Souprava pro izolaci DNA z tkání (Generi Biotech s.r.o., Česká republika)
Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor 488 Imaging Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA)
ApoTarget™ Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit (Invitrogen, USA)
ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay 7 (Promega, USA)
12-230 kDa Jess or Wes Separation Module (Biotechne, USA)

4.2 Příprava roztoků

Pracovní roztok DPBS (1x): koncentrovaný roztok DPBS (10x) jsme ředili v poměru 1:9, tedy např. jsme pipetovali 1 mL pufru DPBS do 9 mL deionizované vody (DV).

Zásobní roztok Hoechst 33258 (c = 40 µg/mL): do 960 µL H₂O jsme napipetovali 40 µL Hoechst 33258 (c = 1 mg/mL).

Zásobní roztok HCl (c = 1 M): K 9,05 mL deionizované vody jsme napipetovali 950 µL 32% kyseliny chlorovodíkové. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok MS-SAFE inhibitorů proteáz a fosfatáz (10X): Do vialky jsme přidali 2 mL RIPA pufru. Roztok jsme ihned rozpipetovali po 30 µL a uchovávali při -20 °C.

Pracovní RIPA lyzační roztok: Přidali jsme 10 µL zásobního roztoku MS-SAFE inhibitorů proteáz a fosfatáz do 390 µL RIPA pufru.

Fixační roztok formaldehydu (12%) – 1 mL fixačního roztoku jsme připravili smícháním 342 µL formaldehydu (35%) s 658 µL DPBS (1x).

Činidlo dle Bradfordové – Navážili jsme 50 g Brilliant Blue G-250 a rozpustili v 25 mL ethanolu (95%) a 50 mL H₃PO₄ (85%). Roztok jsme následně doplnili

demineralizovanou vodou do 500 mL a 2x přefiltrovali přes hustý filtr (póry 2,7 µm; Whatman, UK). Připravený roztok jsme skladovali v temnu při 4 °C.

Roztok Triton X-100 (0,2%) – 2 mL roztoku jsme získali smícháním 5 µL Triton X-100 s 1995 µL DPBS (1x).

Zásobní roztok BSA (c = 10 mg/mL) - V 1 mL deionizované vody jsme rozpustili 10 mg BSA.

Roztok BSA (3%) – V 1 mL DV jsme rozpustili 30 mg BSA.

Zásobní roztok CdCl₂ (c = 20 mM) – 0,0183 g CdCl₂ jsme rozpustili v 5 mL DV. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok cisplatiny (c = 1 mM) – 0,0015 g cisplatiny jsme rozpustili v 5 mL DV. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok staurosporinu (c = 10 mM) – 0,04665 g staurosporinu jsme rozpustili v 10 mL DV. Roztok jsme skladovali v mrazáku při -20 °C.

Zásobní roztok kamptotecinu (c = 10 mM) – 0,34835 g kamptotecinu jsme rozpustili v 10 mL DV. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok TiO₂ P25 (10 mg/mL) – 0,1 g TiO₂ P25 jsme vždy před použitím resuspendovali v 9,9 mL destilované vody.

Zásobní roztok NaOH (c = 0,1 M) – 0,04 g NaOH jsme rozpustili v 10 mL DV. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok EDTA (c = 2 mM) – 0,1461 g EDTA jsme rozpustili ve 100 mL DV. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

4.3 Biologický materiál

Buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu, HepG2 (ATCC HB-8065, USA)

Imortalizovaná buněčná linie proximálních tubulů, HK-2 (ATCC CRL-2190, USA)

Buněčná linie lidského adenokarcinomu, A549 (ATCC CCL-185, USA)

Buněčná linie lidského neuroblastomu, SH-SY5Y (ATCC CRL-2266, USA)

4.4 Přístroje a laboratorní vybavení

Přístroje

Destičkový spektrofoto- a spektrofluorimetr Spark (Tecan, AUT)

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

Mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, JAP)

Odstředivka 35 R (Hettich, SRN)

Odstředivka Mikro 20 R (Hettich, SRN)

pH-metr pH 720 (InoLab, Německo)

Pipety Finnpipette (ThermoFisher Scientific Inc., USA)

Počítáčka buněk Z2 (Beckman, USA)

Protein Simple Wes (Biotechne, USA)

Termostatovaná míchačka (Biosan, LOT)

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

Váhy 440-35N a analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

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

Výrobník ledu (EVERmed, ITA)

Pomůcky:

Centrifugační zkušavky, objem 15 mL (SPL/BioTech, KOR)

Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (ThermoFisher Scientific Inc., USA)

Magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)

Mikroskopická skla (SPL/BioTech, KOR)

Mikrotitrační destičky 6- a 96jamkové (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Mikrozkušavky, objem 1,5; 2,5 a 5 mL (Eppendorf, SRN)

Filtry (póry 2,7 µm; Whatman, UK)

Software:

Compass Software (Biotechne, USA)

Endnote X9 (Thomson, USA)

i-control 1.6 (Tecan, AUT)

Microsoft Office (Word 2016, Microsoft Office Excel 2016, Powerpoint)

Nikon NIS-Elements (Nikon, JPN)

OriginPro 9.0.0. (OriginLab, USA)

4.5 Buněčné linie

4.5.1 Kultivace buněk HepG2

Buněčnou linii HepG2 jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM s fenolovou červení a vysokým obsahem glukózy 4,5 g/L, které jsme obohatili 10% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1% neesenciálními aminokyselinami, 2 mM glutaminem, 10 mM HEPES, 50 µg/mL penicilinu, 50 µg/mL streptomycinu. Do kultivačních lahví jsme nasazovali vždy $0,51 \times 10^6$ buněk do 10 mL kultivačního média. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde jsme je kultivovali při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Každých 72 h jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do dosažení 60% konfluency a poté jsme je pasážovali. Denzitu buněk jsme počítali pomocí počítačky buněk Z2 (Beckman, USA).

Pro všechna spektrometrická měření, použitá v této práci (Hoechst 33258, WST-1 test, detekce koncentrace glutathionu, detekce aktivity kaspáz), jsme optimalizovali množství HepG2 buněk. Buňky jsme kultivovali v médiu DMEM s vysokým obsahem glukózy (4,5 g/L) a bez fenolové červeně v 96jamkových mikrotitračních destičkách v denzitách 5, 10, 15 a 20×10^3 buněk na jamku (bb/j). Po přisednutí buněk jsme vyměnili médium za čerstvé a inkubovali dalších 24 h. Následně jsme proměřili konfluenci a aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz pomocí WST-1 testu.

4.5.2 Kultivace buněk HK-2

Buněčnou linii HK-2 buněk jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM/F-12 (1:1), které jsme obohatili 5% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1 mM pyruvát, 50 µg/mL penicilinu, 50 µg/mL streptomycinu, 10 µg/mL inzulinu, 5,5 µg/mL transferinu, 5 ng/mL seleničitanu sodného a 5 ng/mL epidermálního růstového faktoru. Do kultivačních lahví jsme nasazovali $0,4 \times 10^6$ buněk do 10 mL kultivačního média. Buňky jsme kultivovali při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO₂. Každých 72 h jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do dosažení 70% konfluency a poté jsme je pasážovali. Denzitu buněk jsme počítali pomocí počítačky buněk Z2.

Pro všechna spektrometrická měření, použitá v této práci (Hoechst 33258, WST-1 test, detekce koncentrace glutathionu, detekce aktivity kaspáz), jsme museli

také optimalizovat množství HK-2 buněk nasazovaných v médiu DMEM/F12 bez fenolové červeně do 96jamkových mikrotitračních destiček. Testovali jsme 5, 10, 20 a 25×10^3 bb/j. Následně jsme proměřili konfluenci a aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz pomocí WST-1 testu.

4.5.3 Kultivace buněk A549

Buněčnou linii A549 jsme kultivovali v minimálním esenciálním médiu MEM s fenolovou červení, které bylo obohaceno 10% (v/v) fetálním bovinním sérem, 1 mM pyruvát, 50 $\mu\text{g/mL}$ penicilinu, 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycinu a 10 mM HEPES pufr. Do kultivačních lahví jsme nasazovali 1×10^5 buněk do 10 mL kultivačního média. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37 °C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 . Po třech dnech jsme vždy vyměnili kultivační médium. Buňky jsme kultivovali do dosažení konfluency 70-90 % a poté jsme pasážovali. Denzitu buněk jsme počítali pomocí počítačky buněk Z2. Pro spektrofluorimetrická měření jsme do 96jamkových mikrotitračních destiček nasazovali 10×10^3 bb/j dle předchozích optimalizací, které nebyly součástí této disertační práce.

4.5.4 Kultivace buněk SH-SY5Y

Buněčnou linii SH-SY5Y jsme kultivovali v kultivačním médiu DMEM/F-12 (1:1) s fenolovou červení, které jsme obohatili 15% (v/v) fetálním bovinním sérem, 2 mM glutaminem, 50 $\mu\text{g/mL}$ penicilinu, 50 $\mu\text{g/mL}$ streptomycinu a 1% neesenciálními aminokyselinami. Do kultivačních lahví jsme nasazovali $0,35 \times 10^6$ buněk do 10 mL kultivačního média. Buňky jsme umístili do inkubátoru, kde byly kultivovány při 37°C v atmosféře obsahující 5 % CO_2 . Každých 72 h jsme měnili kultivační médium za čerstvé. Buňky jsme kultivovali do doby, než konfluency dosáhla 70 %, a poté jsme buňky pasážovali. Denzitu buněk jsme počítali pomocí počítačky buněk Z2. Pro spektrofluorimetrická měření jsme do 96jamkových mikrotitračních destiček nasazovali 25×10^3 bb/j dle předchozích optimalizací, které nebyly součástí této disertační práce.

4.5.5 Autentizace buněčných linií

K autentizaci buněčných linií jsme použili analýzu krátkých tandemových repetitivních sekvencí (STR).

DNA, tzv. STR úseků. DNA buněk HepG2, HK-2, A549 a SH-SY5Y jsme izolovali pomocí soupravy pro izolaci DNA z tkání. Následná analýza STR úseků byla provedena v Generi Biotech, s.r.o. Pro autentizaci buněčných linií bylo analyzováno vždy sedmáct autozomálních polymorfizmů (CSF1PO, D2S1338, D16S539, D18S51, D13S317, D19S433, D21S11, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, Penta V, TPO, PPO v, PPO) a amelogenin. Úseky DNA byly amplifikovány a následně separovány kapilární elektroforézou. Výsledky analýzy byly poté porovnány s databázemi STR úseků a vyhodnoceny.

4.5.6 Detekce mykoplazmat v buněčných liniích

Detekce mykoplazmat je při práci s buněčnými liniemi často využívanou metodou. Přítomnost mykoplazmat může významně ovlivnit výsledky nejrůznějších analýz. Odebrali jsme 1 mL buněčných médií z kultivačních misek testovaných buněčných linií (HepG2, HK-2, A549, SH-SY5Y) a centrifugovali (200g, 5 min). Supernatant jsme následně uschovali v -80 °C do doby analýzy. Detekce mykoplazmat byla provedena v Generi Biotech, s.r.o. Principem stanovení je reakce intracelulárních mykoplazmových enzymů se substrátem a dochází tak ke konverzi ADP na ATP. Pomocí reakce s luciferázou je ze vzniklého ATP uvolněna luminiscence, jejíž hodnoty jsou následně vyhodnoceny.

4.6 Spektrofluorimetrická detekce nukleární kondenzace a fragmentace

4.6.1 Optimalizace Hoechst 33258 metody (H33258)

Při optimalizaci metody jsme použili buňky HepG2 a HK-2. HepG2 buňky jsme kultivovali v 96jamkových destičkách v denzitě 15×10^3 bb/j/100 μ L média, a HK-2 buňky v denzitě 15×10^3 bb/j/100 μ L média. Po přisednutí buněk jsme vyměnili médium za čerstvé s různými koncentracemi CisPt (0-100 μ M) a inkubovali 24 a 48 h. Na základě literatury jsme jako výchozí koncentraci sondy H33258 zvolili 2 μ g/mL. K buňkám jsme přidali 10 μ L H33258 roztoku (22 μ g/mL) a po 60 min inkubace (37 °C) měřili intenzitu fluorescence při EX/EM=352/461 nm (EX/EM šířka štěrbin 25/25 nm). Za těchto parametrů štěrbin bylo měření prováděno při všech dalších spektrofluorimetrických analýzách uvedených v této práci.

Pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace jsme dále také optimalizovali složení roztoku pro měření fluorescence. Pro tyto účely jsme využili buňky HepG2. Přidali jsme 10 μL H33258 (22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do 100 μL původního média pro HepG2 buňky tj. DMEM s vysokým obsahem glukózy (4,5 g/L). Testovali jsme výměnu média DMEM s vysokým obsahem glukózy za DPBS (1x), kdy jsme HepG2 buňky centrifugovali (5 min, 8000g, RT) a vyměnili 50-90 μL původního média DMEM s vysokou glukózou za stejný objem DPBS 1x. Poté jsme měřili konfluenci pomocí spektrofotometru Tecan Spark (AUT).

Dalším testovaným parametrem byl vliv míchání roztoku na výsledky detekce nukleární kondenzace a fragmentace. Ve všech předchozích měřeních jsme míchání neprováděli. HepG2 buňky jsme inkubovali s CisPt (0-100 μM) po dobu 24 h a centrifugovali (5 min, 8000g, RT). Následně jsme vyměnili 70 μL původního média DMEM za 70 μL DPBS 1x. Poté jsme přidali sondu H33258, inkubovali, a 30 s před měřením fluorescence (EX/EM = 352/461 nm) vzorky míchali, či je ponechali bez míchání.

Následně jsme testovali optimální dobu inkubace buněk se sondou H33258. Měření fluorescenčního signálu H33258 jsme prováděli v intervalu po 0,5 s do 10. minuty při EX/EM = 352/461 nm.

Dále jsme testovali koncentraci sondy H33258 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Zvolili jsme množství přidávané sondy H33258 tak, aby výsledné koncentrace v jamce byly: 0,1; 1; 2 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Roztok H33258 byl k HepG2 buňkám přidán o objemu 10 μL . Roztok jsme připravili vždy čerstvý před analýzou. Po inkubaci 5 min jsme měřili fluorescenci při EX/EM = 352/461 nm a výsledky vyhodnotili.

V rámci vývoje této metody jsme dále testovali její odezvu. Po inkubaci HepG2 a HK2 buněk s CisPt (0-100 μM) po 24 a 48 h, jsme do jednotlivých jamek destičky přidali H33258 o objemu 10 μL . Po inkubaci 5 min jsme měřili fluorescenci při EX/EM = 352/461 nm a vyhodnotili.

4.6.2 Finální postup H33258 metody a její aplikace

Na základě výsledků optimalizačních kroků jsme dále prováděli spektrofotometrická měření nukleární kondenzace a fragmentace s využitím sondy H33258 podle následujícího postupu. Buňky v 96jamkové destičce jsme po inkubaci s příslušnými toxiny centrifugovali (5 min, 8000g, RT), následně jsme vyměnili 70 μL

média za 70 μL DPBS (1x). Do každé jamky jsme nadávkovali 10 μL H33258 tak, aby výsledná koncentrace v jamce byla 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Buňky jsme inkubovali 5 min a měřili fluorescenci při EX/EM = 352/461 nm. Hodnocení výsledků jsme provedli právě v 5. minutě měření po odečtení slepých vzorků.

K dalším analýzám jsme kultivovali buňky v 96jamkových destičkách - HepG2 (15×10^3), HK-2 (20×10^3); A549 (10×10^3) a SH-SY5Y (25×10^3) bb/j/100 μL média bez fenolové červeně. Po přisednutí buněk jsme vyměnili médium za čerstvé médium s různými koncentracemi cisplatiny (CisPt; 0–100 μM), kamptotecinu (CAM; 0-5 μM), staurosporinu (STA; 0-100 μM), CdCl_2 (100 μM) a nanočástic TiO_2 P25 (NPs; 0-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a inkubovali 6, 24 a 48 h.

4.7 WST-1 test

Aktivitu mitochondriálních dehydrogenáz jsme stanovili pomocí WST-1 testu v 96jamkových mikrotitračních destičkách. Nejprve jsme provedli stanovení v rámci optimalizací denzit HepG2 a HK-2 buněk. Po inkubaci buněk jsme do jamek přidali 10 μL WST-1 a měřili absorbanci při 440 nm po 60 min na spektrofluorimetru Tecan Spark. Provedli jsme také analýzu konfluence buněk.

Dále jsme HepG2 a HK-2 buňky (15×10^3 a 20×10^3 bb/j) inkubovali 24 a 48 h s CisPt (0-100 μM). Po inkubaci buněk jsme přidali 10 μL WST-1 a detekovali absorbanci při 440 nm v čase 0 a 60 min. Buněčnou viabilitu jsme vyjádřili relativně jako průměr procent dehydrogenázové aktivity vztažená k aktivitě kontrolních buněk (= 100% \pm SD).

4.8 Stanovení koncentrace glutathionu

Intracelulární hladiny glutathionu jsme detekovali pomocí spektrofluorimetrické metody využívající monochlorobiman (MCB) (Capek et al., 2017). HepG2 a HK-2 buňky (15×10^3 a 20×10^3 bb/j) jsme inkubovali 24 a 48 h s CisPt (0-100 μM). Po uplynutí inkubace jsme napipetovali 20 μL sondy MCB ($c = 40 \mu\text{M}$). Fluorescence (EX/EM = 394/490 nm) byla detekována pomocí Tecan Spark při 37 °C. Množství glutathionu v buňkách jsme vyjádřili relativně jako procenta koncentrace glutathionu vztažená ke koncentraci glutathionu u kontrolních buněk (= 100% \pm SD).

4.9 Detekce aktivity kaspáz

Pro stanovení aktivity kaspáz jsme použili komerčně dostupnou sadu ApoONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay pro stanovení aktivity efektorových kaspáz 3 a 7. Principem metody je spektrofluorimetrická detekce fluorescenčního produktu, který vzniká reakcí rhodaminu 110 s kaspázami 3 a 7. HepG2 a HK-2 buňky (15×10^3 a 20×10^3 bb/j) jsme inkubovali s CisPt (0-100 μM) po 6, 24 a 48 h. Pro detekci aktivity kaspáz jsme nejprve připravili pracovní roztok substrátu a pufru v poměru 1:100. 100 μL tohoto roztoku jsme přidali k buňkám, promíchali a inkubovali 30 min, 37 °C. Následně jsme měřili fluorescenci pomocí Tecan Spark při EX/EM = 485/535 nm. Aktivitu kaspáz 3 a 7 jsme vyjádřili relativně jako procenta aktivity kaspáz vztažená k aktivitě kaspáz u kontrolních buněk (= 100 % \pm SD).

4.10 Analýza proteinové exprese

4.10.1 Příprava proteinového lyzátu buněk

Buňky pro analýzu exprese proteinů byly nasazeny v 6jamkové destičce v počtu závislém na použité buněčné linii: 5×10^5 HepG2 buněk nebo $1,7 \times 10^6$ HK-2. HepG2 a HK-2 buňky jsme inkubovali s CisPt (0-100 μM) po dobu 6, 24 a 48 h.

Buňky jsme lyzovali za použití komerčně dostupného RIPA pufru, do kterého jsme přidali pracovní roztok inhibitorů proteáz a fosfatáz MS-SAFE (1x). Z jamek jsme odsáli supernatant do příslušné mikrozkušavky a centrifugovali (5 min, 5000g, 4 °C). Buňky přisedlé v destičce jsme omyli 500 μL sterilním DPBS (1x), přepipetovali do stejné mikrozkušavky a opět centrifugovali (5 min, 5000g, 4 °C). K opláchnutým buňkám jsme přidali 390 μL RIPA pufru s 10 μL inhibitorů a přisedlé buňky proudem tekutiny odlepili od podkladu. Zpracované buňky jsme opět přepipetovali do výše zmíněných mikrozkušavek a promíchali na vortexu. Vzorky jsme vložili do ledničky a třepali 30 min. Po uplynutí 30 min jsme vzorky centrifugovali 16000g, 20 min, 4 °C. U supernatantu jsme poté změřili koncentraci proteinů.

4.10.2 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové

Ze zásobního roztoku BSA o koncentraci 10 mg/mL jsme připravili kalibrační řadu standardů o koncentracích v rozmezí 0-100 $\mu\text{g/mL}$. Vzorky buněčných lyzátů jsme naředili tak, aby jejich koncentrace byla v příslušném rozmezí koncentrací.

Příprava roztoků je znázorněna v tabulce 1. Do 96jamkové destičky jsme napipetovali 10 μL standardu nebo vzorku a 300 μL činidla dle Bradfordové a promíchali. Po 10 min inkubace jsme destičku znovu promíchali a na spektrofluorimetru Tecan Spark detekovali absorbanci při vlnové délce 595 nm. Stanovení jsme prováděli v triplicátech. Nakonec jsme koncentraci jednotlivých proteinových lyzátů vypočítali z rovnice získané z proměřených hodnot kalibračních roztoků.

Tabulka 1: Příprava roztoků pro detekci proteinů dle Bradfordové.

Koncentrace BSA	Příprava roztoku
10 mg/mL	Zásobní roztok BSA: 10 mg BSA v 1 mL DV
1 mg/mL	100 μL zás. roztoku BSA (10 mg/mL) + 900 μL DV
100 $\mu\text{g/mL}$	Prac. roztok BSA: 200 μL roztoku BSA (1 mg/mL) + 1800 μL DV
70 $\mu\text{g/mL}$	700 μL prac. roztoku BSA (100 $\mu\text{g/mL}$) + 300 μL DV
50 $\mu\text{g/mL}$	500 μL prac. roztoku BSA (100 $\mu\text{g/mL}$) + 500 μL DV
10 $\mu\text{g/mL}$	100 μL prac. roztoku BSA (100 $\mu\text{g/mL}$) + 900 μL DV

4.10.3 Kapilární imuno elektroforéza

Analýzu proteinové exprese pomocí kapilární imuno elektroforézy jsme prováděli na připravených buněčných lyzátech buněk HepG2 a HK-2, ve kterých byla předem změřena koncentrace proteinů dle Bradforda (viz kapitoly 4.10.1 a 4.10.2). Všechny práce s buněčnými lyzáty jsme prováděli na ledu. Pro naše analýzy jsme používali komerčně dostupný 12-230 kDa Wes Separation Module.

Kapilární imuno elektroforézu jsme prováděli přesně podle instrukcí od výrobce. Nejprve jsme si pomocí DV naředili vzorkový pufr (10x) na pracovní roztok (1x). Pomocí tohoto pracovního roztoku jsme si naředili jednotlivé buněčné lyzáty na výslednou koncentraci proteinů 0,4 mg/mL. K takto naředěným vzorkům jsme následně přimíchali Master Mix. Vzorky spolu s biotinylovaným markerem jsme inkubovali v termobloku předeřátém na 95 °C po dobu 5 min. Mezitím jsme si naředili primární protilátky pomocí roztoku na ředění protilátek. Použili jsme protilátky anti-PARP-1 (1:100; králičí), anti-JNKs (1:50; králičí) a anti- β -aktin (1:500; králičí).

Všechny připravené vzorky, primární protilátky, sekundární protilátky a další reagensie jsme napipetovali do destičky. Destičku jsme následně centrifugovali (2500g, 5 min) a vložili do přístroje. Po analýze jsme vyhodnotili výsledky pomocí software Compass. Expres proteinů byla normalizována pomocí β -aktinu. K rozlišení signálu od šumu musely být jednotlivé píky větší, nebo rovny chemiluminescenčnímu signálu 1000. Výsledky jsme vyjádřili jako poměr ploch píků stanovovaných proteinů ku ploše píku β -aktinu.

4.11 Metoda TUNEL

Barvení DNA zlomů pomocí metody TUNEL jsme spojili s barvením buněčných jader pomocí fluorescenční barvy H33258. HepG2 a HK-2 buňky jsme kultivovali v osmikomorových mikroskopických sklech v počtech 15×10^3 bb/j a 20×10^3 bb/j ve 200 μ L kultivačního média. Po 24 h (37 °C, 5 % CO₂) jsme buňky ovlivnili CisPt (0-100 μ M) po dobu 6, 24 a 48 h. Barvení TUNEL jsme provedli pomocí komerčně dostupné soupravy Click-iT™ TUNEL Alexa Fluor™ 488 Imaging Assay kit podle instrukcí výrobce. Buňky jsme zafixovali 15 min při 37 °C pomocí fixačního roztoku formaldehydu (12%), permeabilizovali roztokem Tritonu X-100 (0,2%, 15 min, 37 °C), omyli DPBS (1x) a inkubovali s reakční směsí TdT 10 min ve tmě při 37 °C. Po uplynutí inkubace jsme k buňkám přidali reakční směs TdT a inkubovali 1 h při 37 °C. Poté jsme buňky omyli pomocí 3% BSA a inkubovali s Click-IT reakční směsí 30 min, 37 °C. Po opláchnutí pomocí DPBS (1x) jsme obarvili buněčná jádra pomocí H33258 o výsledné koncentraci 2 μ g/mL (10 min, 37 °C). Vizualizaci jader a DNA zlomů jsme prováděli pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, JPN) za použití fluorescenčních filtrů pro DAPI (375/28 nm) a FITC (480/30 nm).

4.12 DNA žebřík

K detekci DNA fragmentace jsme kultivovali 5×10^5 HepG2 buněk a 1×10^6 HK-2 buněk v 6jamkových destičkách ve 2 mL kultivačního média 24 h, 37 °C, 5 % CO₂. Po přisednutí buněk jsme nahradili médium čerstvým kultivačním médiem s CisPt (0-100 μ M). Buňky jsme následně inkubovali 6, 24 a 48 h. Izolaci DNA jsme prováděli pomocí The ApoTarget™ Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit. Se získanými vzorky DNA jsme provedli elektroforézu v 1,5% agarózovém gelu se 4 μ L

ethidiumbromidu při napětí 5 V/cm. Jako marker jsme použili DNA marker 100 bp. Nakonec jsme vizualizovali DNA pomocí UV dokumentačního systému (Vilber Lourmat, Německo) při vlnové délce 254 nm.

4.13 Statistické zpracování experimentálních dat

Všechny studované parametry jsme měřili alespoň v dubletu, nejčastěji však v kvadrupletu. U každého stanovení jsme provedli alespoň dva nezávislé experimenty. Ke statistickému vyhodnocení experimentálních dat jsme použili software Origin 9.0.0 (OriginLab, USA). Po testování normality jsme provedli jednocestnou analýzu rozptylu (ANOVA) a post-test Tukey. Hladina významnosti $p=0.05$ (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$, vs. negativní kontrola).

5. Výsledky

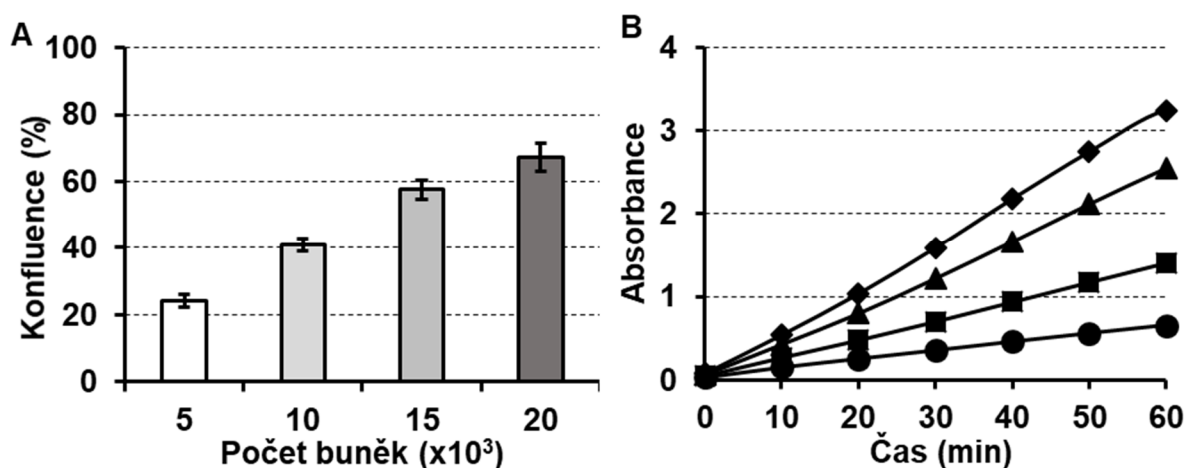
5.1 Optimalizace práce s buněčnými liniemi

Pro spektrometrická stanovení použitá v této práci (Hoechst 33258, WST-1, stanovení koncentrace glutathionu a detekce aktivity kaspáz) jsme používali především buněčné linie HepG2 a HK-2, u kterých jsme nejprve provedli potřebné optimalizace kultivačních podmínek.

5.1.1 Optimalizace denzity HepG2 buněk

Hepatomové lidské HepG2 buňky jsme nejdříve podrobili analýze STR úseků pro autentizaci buněčné linie a také byla testována přítomnost mykoplazmat. Z výsledků komerčních analýz vyplývá, že námi kultivované HepG2 buňky vykazují 100% shodu s referenčním standardem a opakovaně se neprokázala přítomnost mykoplazmat v buněčné linii.

U HepG2 buněk jsme optimalizovali nejprve množství buněk nasazovaných do 96jamkových destiček pro spektrometrická stanovení. Testovali jsme denzity 5, 10, 15 a 20×10^3 bb/j, kde jsme nejprve určili konfluenci buněk (graf 1A). Následně jsme k buňkám napipetovali WST-1 činidlo a detekovali absorbanci při 440 nm každých 10 min po dobu 60 min (graf 1B).



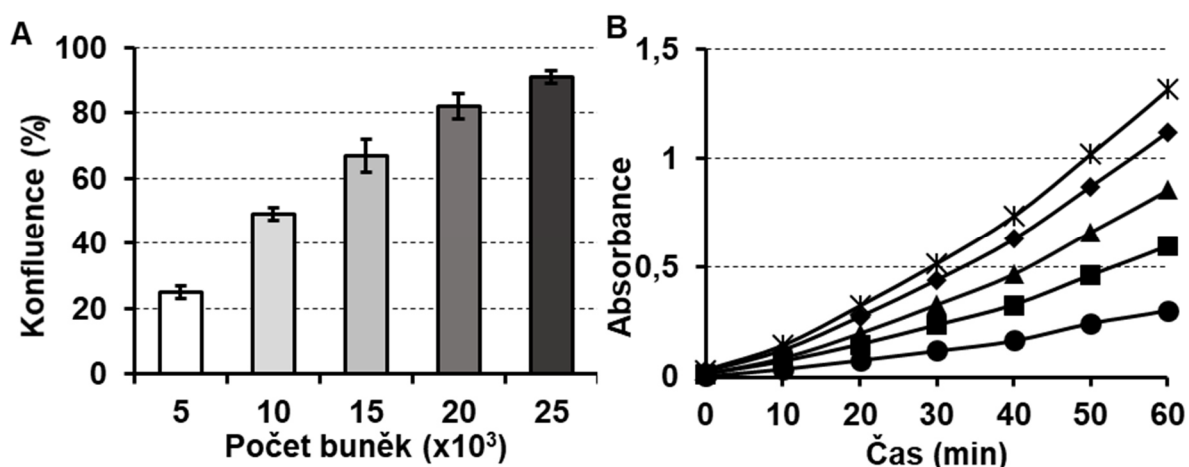
Graf 1: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HepG2 buňky). Inkubace 24 h. A) Konfluence; průměr ± SD (n=5). B) WST-1 test. Počet buněk: ● 5×10^3 ; ■ 10×10^3 ; ▲ 15×10^3 ; ◆ 20×10^3 . Absorbance (440 nm); průměr (n=5). (Originální data - Příloha 1)

Výsledky konfluence v grafu 1A ukazují, že optimálním počtem pro nasazování HepG2 buněk se jeví denzita 15×10^3 a 20×10^3 bb/j, kdy konfluence dosahuje alespoň 60 %. Výsledky detekce dehydrogenázové aktivity pomocí WST-1 testu ukázaly (graf 1B), že nárůst signálu je patrný u všech testovaných denzit buněk. U denzity 5×10^3 bb/j jsou absolutní hodnoty absorbance příliš nízké, a naopak u denzity 20×10^3 bb/j absorbance dosahuje již vysokých hodnot. Při možném následném použití WST-1 testu u delších inkubačních časových intervalů (např. 48 h) by se hodnoty absorbance pohybovaly již ≥ 3 a mohlo by docházet k metodickému ovlivnění naměřených dat. Z těchto výsledků tedy vyplývá, že optimální denzita HepG2 buněk, kterou jsme zvolili pro následná spektrometrická stanovení, byla u 96jamkových destiček 15×10^3 bb/j.

5.1.2 Optimalizace denzity HK-2 buněk

Další často používanou linií v naší práci byla buněčná linie HK-2 odvozená od buněk z lidských proximálních tubulů. U HK-2 buněk jsme také nejprve provedli analýzu STR úseků a otestovali je na přítomnost mykoplazmat. Z výsledků komerčních analýz vyplývá, že námi kultivované HK-2 buňky vykazují 100% shodu s referenčním standardem a opakovaně se neprokázala přítomnost mykoplazmat v buněčné linii.

U HK-2 buněk jsme optimalizovali počet buněk nasazovaných do 96jamkových destiček pro spektrometrická stanovení. Testovali jsme denzity 5 - 25×10^3 bb/j, kdy jsme nejdříve určili konfluenci (graf 2A). K buňkám jsme poté napipetovali WST-1 činidlo a detekovali absorbanci při 440 nm každých 10 min po dobu 60 min (graf 2B).



Graf 2: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HK-2 buňky). Inkubace 24 h. A) Konfluenci; průměr \pm SD (n=5). B) WST-1 test. Počet buněk: ● 5×10^3 ; ■ 10×10^3 ; ▲ 15×10^3 ; ◆ 20×10^3 ; ✱ 25×10^3 . Absorbance (440 nm); průměr (n=5). (Originální data - Příloha 2)

Výsledky konfluence v grafu 2A ukazují, že optimálním počtem pro kultivaci HK-2 buněk se jeví denzity 15×10^3 a 20×10^3 bb/j, kdy konfluence dosahuje 60-80 %. Detekce absorbance v rámci WST-1 testu (graf 2B) ukázala, že nárůst signálu absorbance odpovídající dehydrogenázové aktivitě buněk je podobný u většiny testovaných denzit mimo denzity 25×10^3 bb/j. Po porovnání absolutních hodnot absorbance jsme pro další testování vyloučili denzity 5, 10 a 15×10^3 bb/j, kdy jsou hodnoty změny absorbance po 60 min menší než 1. Na základě výsledků jsme jako optimální denzitu HK-2 buněk pro všechny následné spektrometrické analýzy prováděné v 96jamkových destičkách zvolili počet 20×10^3 bb/j.

5.2 Vývoj spektrofluorimetrické metody pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace

5.2.1 Optimalizace postupu spektrofluorimetrické metody

K vývoji nové spektrofluorimetrické metody schopné detekovat nukleární kondenzaci a fragmentaci jsme využili fluorescenční sondu Hoechst 33258 (= H33258); proto dále v textu pro zjednodušení uvádíme tuto nově zaváděnou metodu jako „H33258 metoda“. Sondu H33258 jsme k tomuto účelu vybrali na základě studia literatury, kde bylo opakovaně popsáno, že po navázání sondy H33258 na kondenzující buněčné jádro dochází ke zvýšení intenzity fluorescence (IF) v porovnání s mírou IF po navázání sondy H33258 na jádro buňky fyziologické, tj. bez zvýšené nukleární kondenzace či fragmentace (Musumeci et al., 2011; Shi et al., 2006; Zhang et al., 2007). K detekci IF sondy H33258 jsme na základě literatury zvolili vlnové délky EX/EM = 352/461 nm (Hadi et al., 2018; Ki et al., 2016; Wang et al., 2016). Protože jsme jako první měli za cíl využít nárůstu IF při spektrofluorimetrickém stanovení, museli jsme celý tento unikátní postup vyvinout a optimalizovat.

Celkově jsme optimalizovali několik parametrů metodického postupu, mezi které patřilo složení roztoku, ve kterém probíhá samotná detekce IF, a také vliv míchání roztoku po přidání H33258 na výsledky stanovení. Dále jsme testovali dobu inkubace buněk se sondou H33258 a optimalizovali také koncentraci této sondy. Nakonec jsme analyzovali citlivost vyvinuté metody při detekci indukované nukleární kondenzace a fragmentace u HepG2 a HK-2 buněk inkubovaných s CisPt.

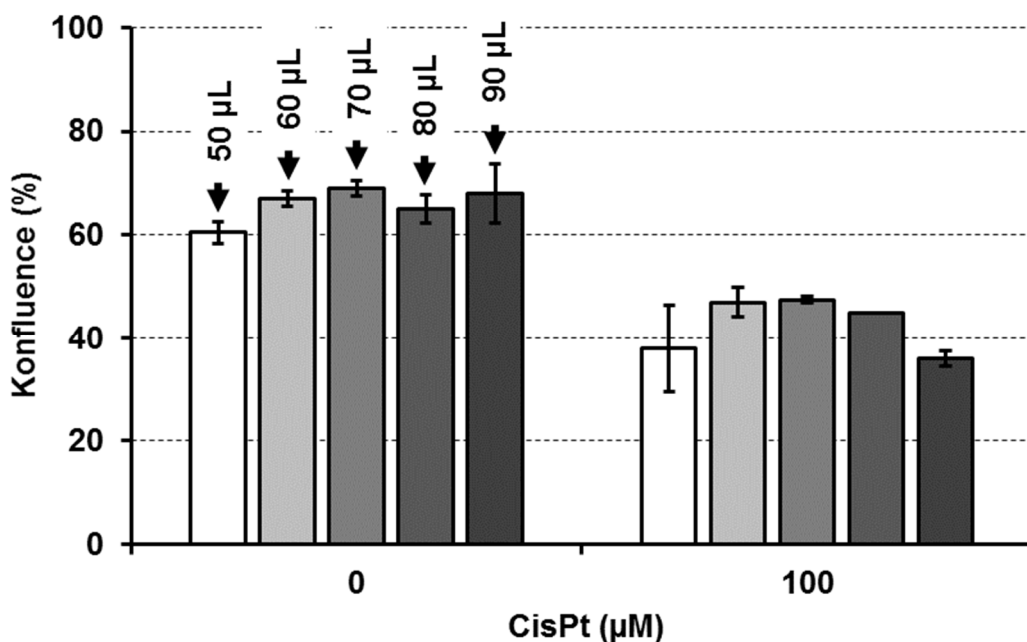
Pro účely prvotní optimalizace metody jsme zvolili buněčnou linii HepG2 inkubovanou s CisPt Pro počáteční testování jsme zvolili koncentraci 2 $\mu\text{g/mL}$ H33258

na základě studia literatury (Stokke and Steen, 1986; Zurek-Biesiada et al., 2014). K buňkám jsme vždy přidali 10 μL H33258 roztoku a po 60 min inkubace (37 °C) jsme měřili IF při EX/EM = 352/461 nm (šířka štěrbin 25/25 nm).

5.2.1.1 Testování vlivu složení roztoku

Prvním optimalizovaným parametrem bylo složení roztoku, ve kterém probíhá samotná detekce IF sondy H33258. HepG2 buňky jsou běžně kultivovány v médiu DMEM s vysokým obsahem glukózy (= 4,5 g/L), což je médium obsahující řadu sloučenin, které mohou zvyšovat pozadí fluorescenčního signálu. Proto jsme se rozhodli toto médium pro potřeby metody vyměnit za roztok pufru DPBS (1x).

V roztoku DPBS (1x) nebylo možné buňky přímo kultivovat, aby nedošlo k ovlivnění buněk, a tedy k ovlivnění výstupů experimentů. Proto jsme zvolili možnost výměny části objemu původního média DMEM za DPBS (1x) po předchozí centrifugaci (5 min, 8000g, RT). Objem odsávaného média z celkových 100 μL /jamka jsme nahradili stejným objemem DPBS (1x) a analyzovali konfluenci buněk (graf 3). Výsledky potvrdily, že s větším objemem vyměňovaného média je odsáváno také více buněk, a tím klesá konfluence. Po vyhodnocení hodnot konfluence a příslušných SD, jsme zvolili výměnu 70 μL média za 70 μL DPBS (1x) jako optimální.

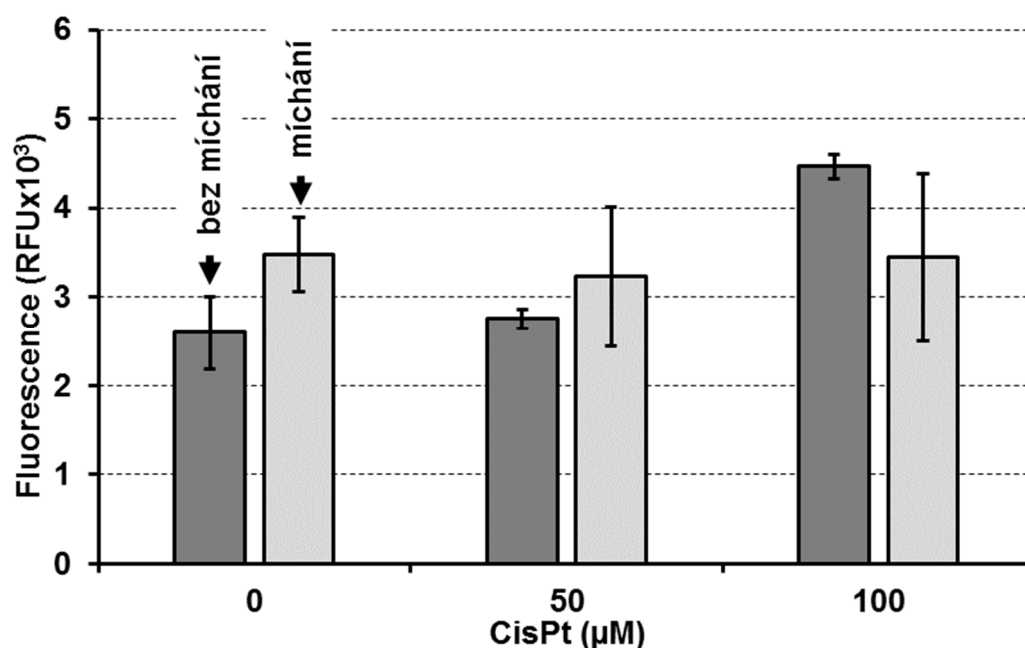


Graf 3: Optimalizace H33258 metody – výměna média (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0; 100 μM). Inkubace 24 h. Výměna 50-90 μL původního média za DPBS (1x). Konfluence. Průměr \pm SD (n=3). (Originální data – Příloha 3)

5.2.1.2 Testování vlivu míchání vzorku

Dalším analyzovaným parametrem v rámci vývoje spektrofluorimetrické H33258 metody bylo míchání roztoku, ve kterém probíhalo samotné měření IF. HepG2 buňky jsme inkubovali s CisPt (0-100 μM) po dobu 24 h. Následně jsme HepG2 buňky centrifugovali a vyměnili 70 μL původního média DMEM za 70 μL DPBS (1x). Poté jsme přidali sondu H33258, inkubovali sondu s buňkami 60 min, a před detekcí IF vzorek v spektrofluorimetru míchali po dobu 30 s, nebo ho nechali bez míchání (graf 4).

V případě použití míchání roztoku při analýze H33258 u HepG2 buněk jsme detekovali nižší hodnoty SD v porovnání s výsledky z experimentu, kdy jsme míchání prováděli. Zároveň jsme detekovali rozdíl IF při porovnání kontrolních buněk a buněk ovlivněných 100 μM CisPt, což při porovnání výsledků získaných u vzorků buněk po dobu 30 s míchaných patrně nebylo. Na základě těchto nálezů jsme se rozhodli ve výsledném postupu H33258 metody míchání neprovádět.

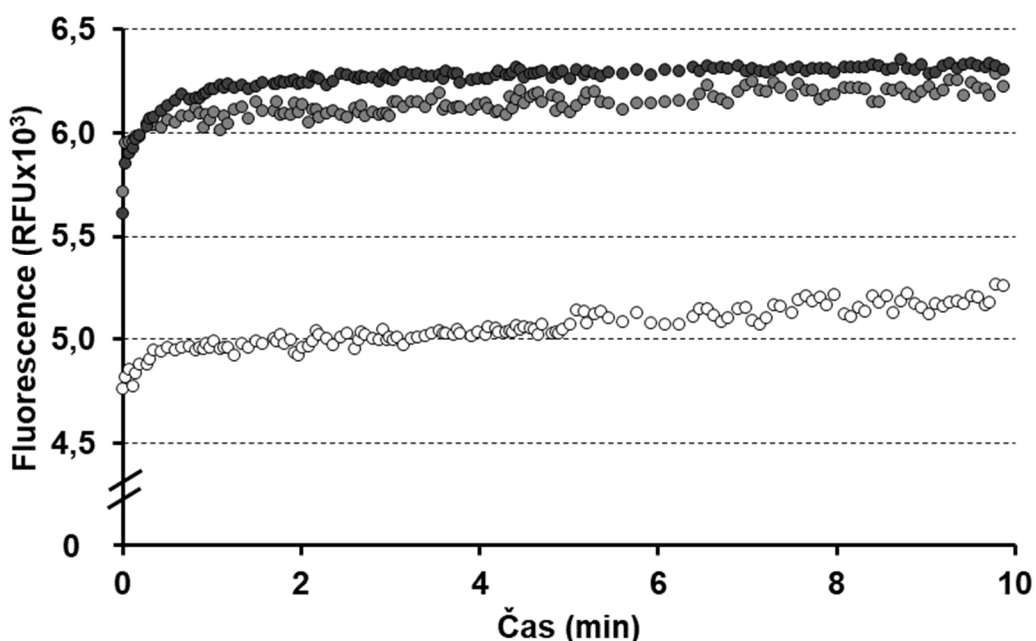


Graf 4: Optimalizace H33258 metody – vliv míchání vzorku (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm). Průměr \pm SD (n=4). (Originální data - příloha 4)

5.2.1.3 Optimalizace doby inkubace buněk se sondou H33258

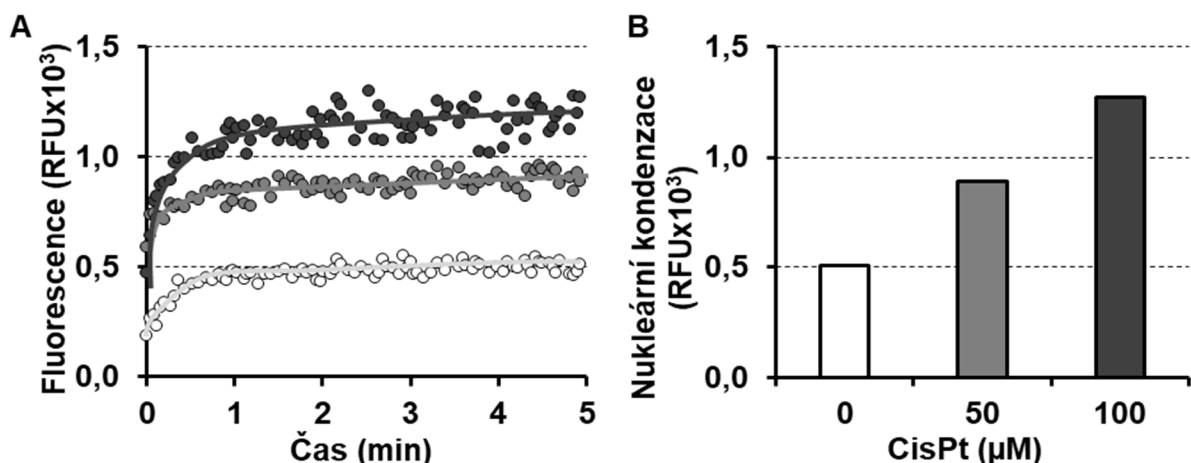
Pro stanovení optimální doby inkubace buněk se sondou H33258 jsme použili buňky HepG2 inkubované s CisPt (0-100 μM) po dobu 24 h. Dle výše uvedených zjištění z optimalizací metodického postupu jsme buňky centrifugovali, vyměnili 70 μL původního média DMEM za 70 μL DPBS (1x). Poté jsme do každé jamky přidali 10 μL H33258 o finální koncentraci 2 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{jamka}$ a detekovali IF při EX/EM = 352/461 nm.

Zjistili jsme, že IF se prudce zvyšuje během první minuty inkubace buněk s H33258 (graf 5). IF poté zůstává stabilní mezi 2. a 10. minutou. Z tohoto zjištění vyplývá, že pro účely spektrofluorimetrické metody H33258 lze použít k inkubaci H33258 s buňkami jakýkoliv časový interval mezi 2.-10. min. My jsme pro další analýzy vybrali inkubaci buněk s H33258 po dobu 5 min.



Graf 5: Optimalizace H33258 metody – změna intenzity fluorescence H33258 v čase (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0 μM – bílá; 50 μM – světle šedá; 100 μM – tmavě šedá). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm). (Originální data - Příloha 5)

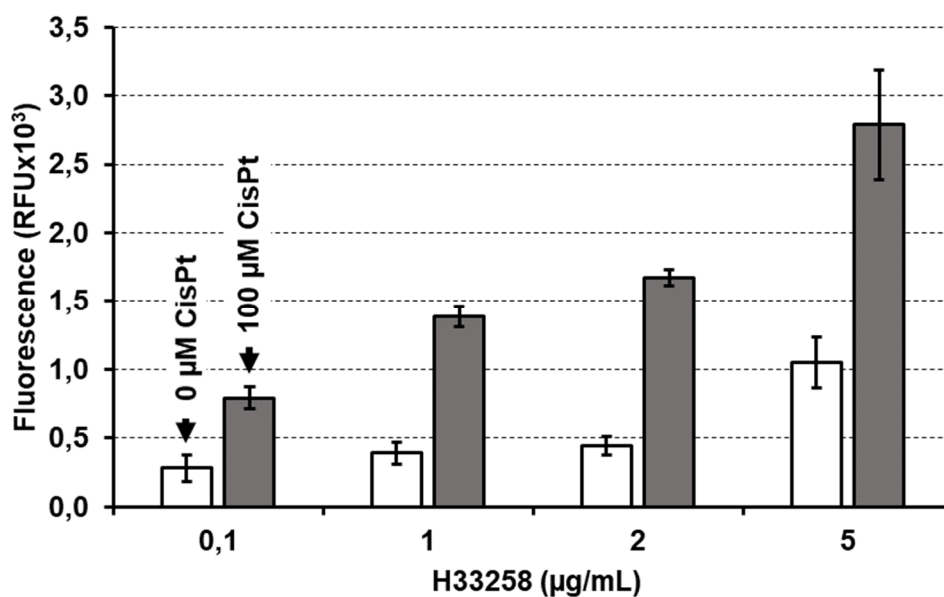
Když jsme měřili IF po dobu 5minutové inkubace sondy H33258 s buňkami, a následně odečetli od detekované IF hodnoty IF slepých vzorků (graf 6A), zjistili jsme, že nárůst IF koresponduje s narůstající koncentrací CisPt a také s očekávanou indukcí nukleární kondenzace a fragmentace u inkubovaných buněk. Intenzity fluorescence naměřené v rámci kinetických měření v páté minutě jsme tedy uvedli v grafu 6B již jako nukleární kondenzaci. Na základě těchto výsledků jsme ve všech dalších experimentech používali 5 min inkubace se sondou H33258 jako optimální.



Graf 6: Intenzita fluorescence H33258 v čase 0-5 min (HepG2 buňky). A) Měření IF po dobu 0-5 min po odečtení signálu pozadí; B) Vyhodnocení IF v 5. minutě. Cisplatina (CisPt; 0 μM – bílá; 50 μM – světle šedá; 100 μM – tmavě šedá). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm). (Originální data – Příloha 5)

5.2.1.4 Optimalizace koncentrace sondy H33258

Důležitým parametrem pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace v buňkách pomocí sondy H33258 by mohla být její koncentrace. Pro počáteční, výše uvedené experimenty jsme dle literatury zvolili koncentraci 2 μg/mL H33258 (Stokke and Steen, 1986; Zurek-Biesiada et al., 2014). Při optimalizaci koncentrace H33258 při vývoji metody jsme ale testovali rozmezí koncentrací 0,1-5 μg/mL H33258 (graf 7), a to u HepG2 buněk inkubovaných s/bez 100 μM CisPt po dobu 24 h.

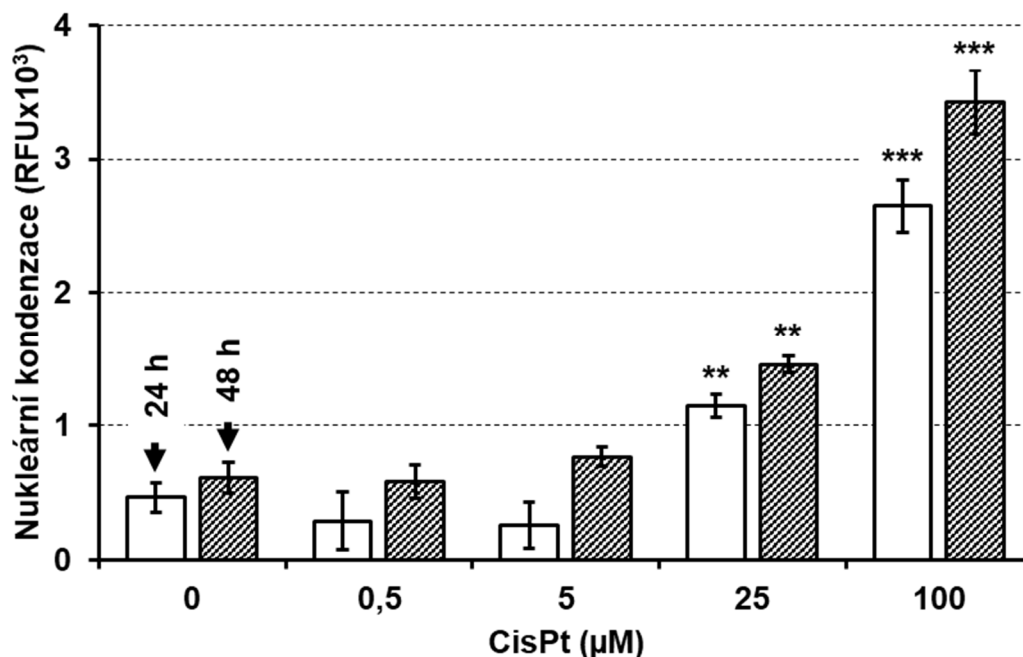


Graf 7: Optimalizace koncentrace sondy H33258 (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr ± SEM (n=4). (Originální data - Příloha 6)

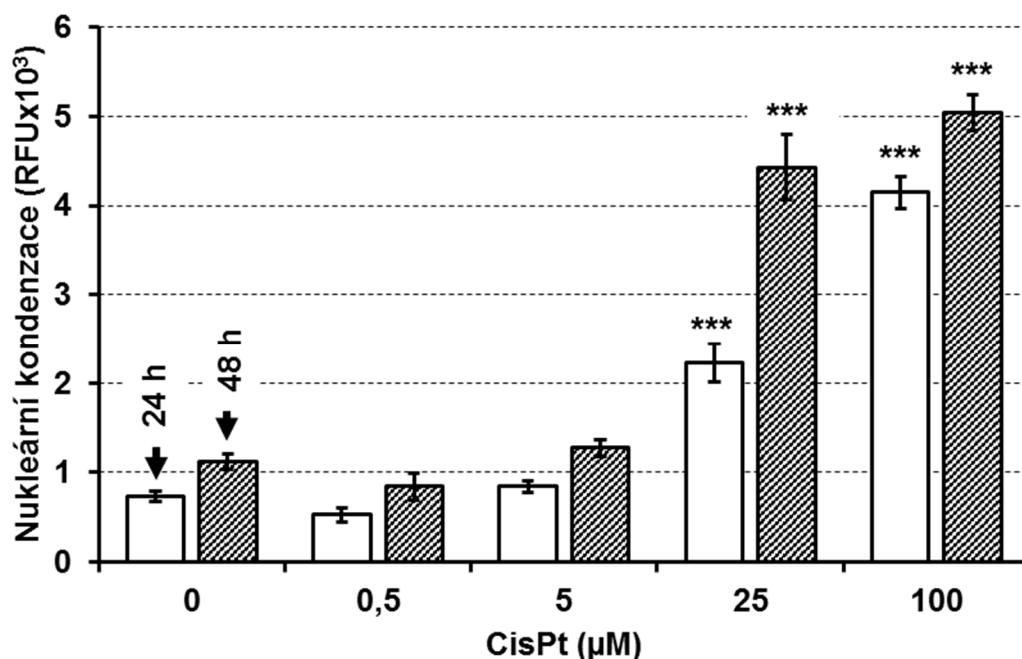
Jak je z grafu 7 patrné, nejvyšší hodnotu fluorescenčního signálu jsme zaznamenali u buněk s/bez CisPt inkubovaných s 5 µg/mL H33258. U koncentrace 0,1 µg/mL H33258 byl fluorescenční signál velmi nízký. Dostatečné zvýšení fluorescence jsme pozorovali u koncentrací 1 a 2 µg/mL H33258. Z výsledků vyplývá, že nejvyššího poměrného rozdílu mezi IF kontrolních buněk a buněk ovlivněných CisPt bylo dosaženo u koncentrace 2 µg/mL H33258. Z tohoto důvodu jsme pro další testování používali koncentraci 2 µg/mL H33258 jako optimální.

5.2.1.5 Testování citlivosti H33258 metody

V rámci vývoje H33258 metody jsme testovali její odezvu, a to u buněk inkubovaných s CisPt (0-100 µM) po dobu 24 a 48 h (HepG2 buňky = graf 8; HK-2 buňky = graf 9). Zvýšení intenzity fluorescence H33258 jsme pozorovali u obou buněčných linií inkubovaných s 25 a 100 µM CisPt po dobu 24 a 48 h. Úroveň nukleární kondenzace a fragmentace pozitivně korelovala se zvyšující se koncentrací CisPt a dobou inkubace.



Graf 8: Testování odezvy H33258 metody (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt 0-100 µM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr ± SEM (n=4); **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 7)



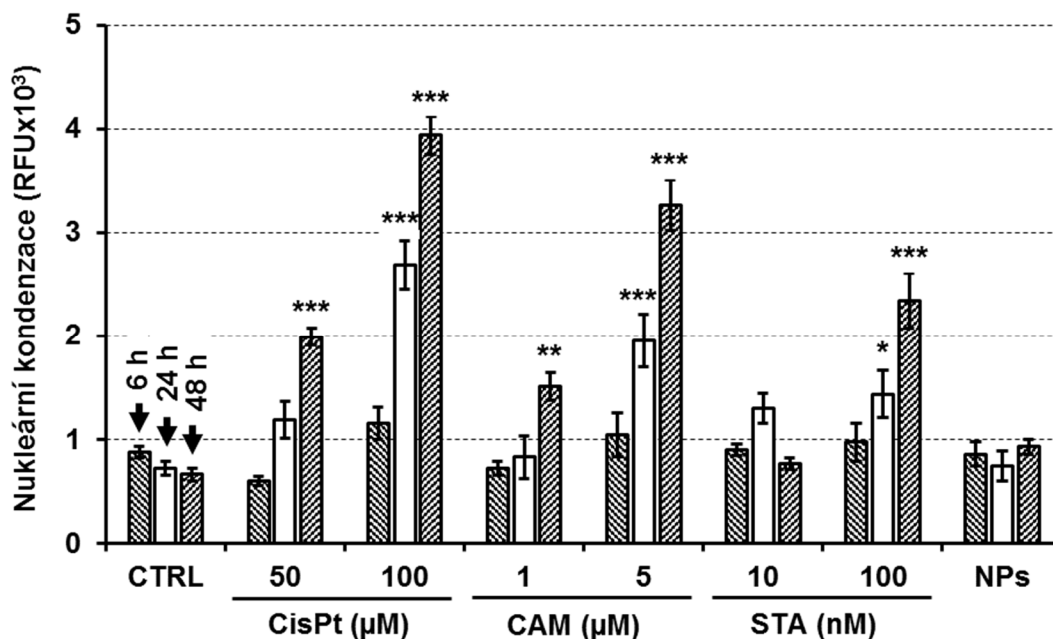
Graf 9: Testování odezvy H33258 metody (HK-2 buňky). Cisplatina (CisPt 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr ± SEM (n=4); ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data – Příloha 8)

5.2.2 Finální postup spektrofluorimetrické H33258 metody

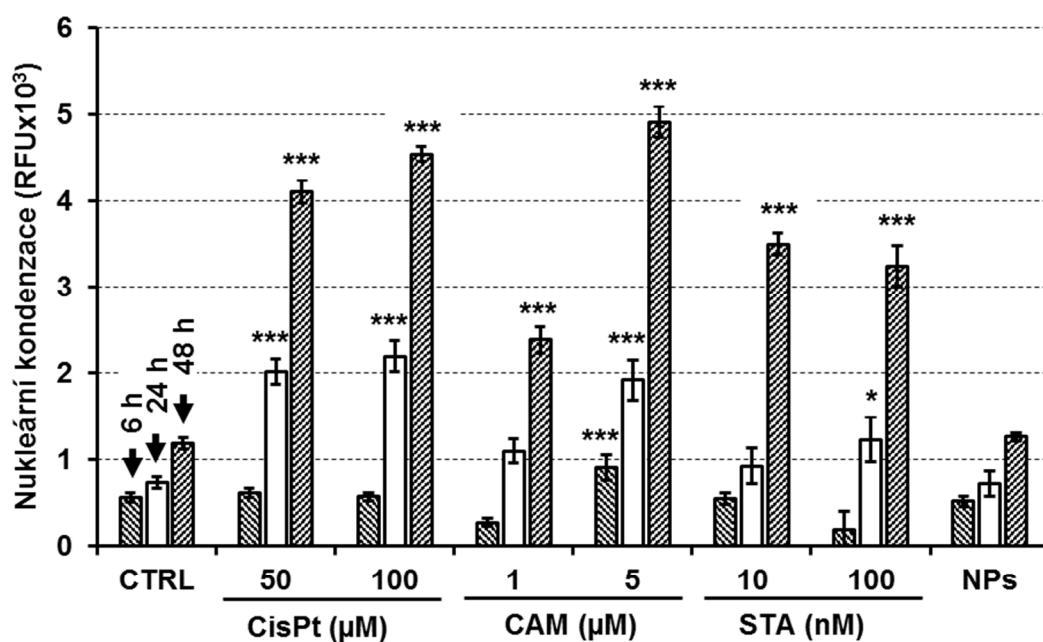
Na základě výsledků optimalizačních kroků jsme určili finální pracovní protokol pro kvantitativní spektrofluorimetrickou detekci nukleární kondenzace a fragmentace s využitím fluorescenční sondy H33258, nazvanou jako „H33258 metoda“. Buňky v 96jamkové destičce jsme po inkubaci s příslušnými toxiny centrifugovali (5 min, 8000g, RT), poté jsme vyměnili 70 μL média za DPBS (1x). Do každé jamky jsme přidali 10 μL H33258 (výsledná koncentrace v jamce = 2 μg/mL). Buňky jsme inkubovali 5 min a měřili fluorescenci při EX/EM = 352/461 nm. Hodnocení výsledků jsme provedli právě v 5. min analýzy po odečtení slepých vzorků.

5.2.3 Zhodnocení výstupů H33258 metody u buněk

V další části naší práce jsme využili vyvinutou H33258 metodu k detekci vlivu různých sloučenin na nukleární kondenzaci a fragmentaci. Buňky HepG2 a HK-2 jsme inkubovali 6-48 h s vybranými induktory apoptózy (cisplatina, kamptotecin a staurosporin) a také s nanočásticemi TiO₂ P25. Poté jsme detekovali změny nukleární kondenzace a fragmentace optimalizovanou H33258 metodou (HepG2 buňky = graf 10; HK-2 buňky = graf 11).



Graf 10: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HepG2 buňky). Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 0-100 μM), kamptotecin (CAM; 0-5 μM), staurosporin (STA; 0-100 nM), nanočástice TiO_2 P25 (NPs; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$; vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 9)

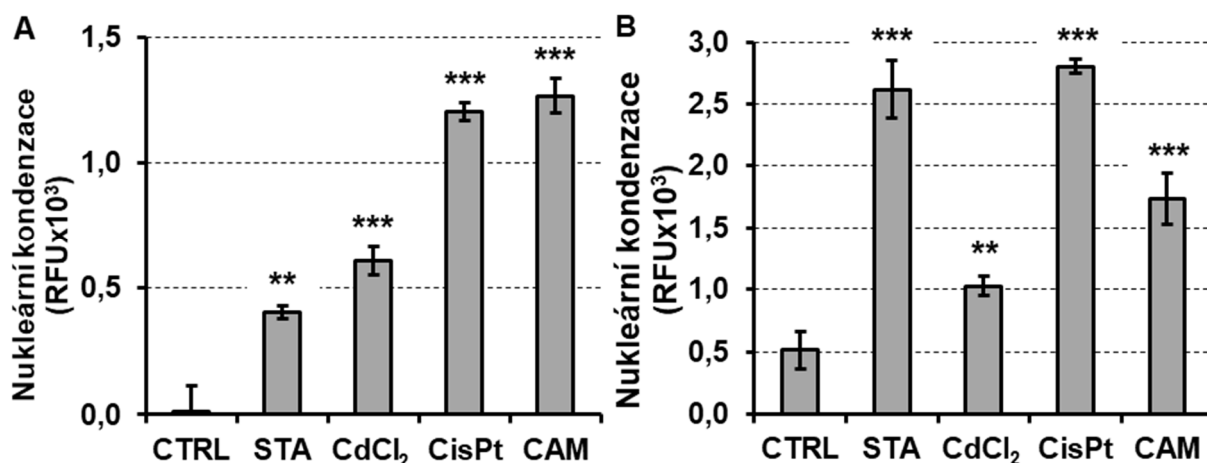


Graf 11: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HK-2 buňky). Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 0-100 μM), kamptotecin (CAM; 0-5 μM), staurosporin (STA; 0-100 nM), nanočástice TiO_2 P25 (NPs; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4); *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. (Originální data - Příloha 10)

Jak je z grafů 10 a 11 patrné, detekovali jsme zvýšenou nukleární kondenzaci a fragmentaci u všech testovaných látek kromě nanočástic TiO₂ P25, které nezpůsobily žádnou změnu napříč testovanými buněčnými liniemi a časovými intervaly. Po 6 h jsme detekovali zvýšení IF pouze u HK-2 buněk ovlivněných 5 μM CAM ($p < 0,001$). Po 24 h jsme signifikantní zvýšení fluorescence detekovali u HK-2 buněk ovlivněných většinou toxinů kromě 1 μM CAM ($p = 0,198$) a 10 nM STA ($p = 0,999$). U HepG2 buněk jsme našli zvýšení fluorescence u vyšších koncentrací všech testovaných induktorů apoptózy. U buněk HepG2 jsme po 24 h nenalezli zvýšení fluorescence H33258 u 1 μM CAM ($p = 0,935$), 10 nM STA ($p = 0,135$) a 50 μM CisPt ($p = 0,382$). Zvýšenou IF a tedy i zvýšenou úroveň nukleární kondenzace a fragmentace jsme v porovnání ke kontrolním buňkám detekovali po 48 h téměř u všech testovaných koncentrací toxinů u obou buněčných linií, kromě 10 nM STA inkubovaného s HepG2 buňkami po 48 h ($p = 0,999$). V porovnání s výsledky detekce nukleární kondenzace a fragmentace u HepG2 buněk po inkubaci s 10 nM STA po 24 h jsme v tomto případě detekovali snížení IF. Obecně lze tedy shrnout, že všechny testované induktory apoptózy indukovaly nukleární kondenzaci a fragmentaci po 24 h, a ta se zvyšovala i po 48 h inkubace. Dále jsme vždy detekovali větší úroveň nukleární kondenzace a fragmentace u vyšších koncentrací induktorů apoptózy v porovnání s koncentracemi nižšími. Nejvyšší hodnoty IF jsme naměřili u HepG2 i HK-2 buněk inkubovaných s 100 μM CisPt a 5 μM CAM po 48 h. Těmito výsledky jsme potvrdili, že jsme spektrofluorimetrickou H33258 metodou schopni detekovat zvyšující se úroveň nukleární kondenzace a fragmentace u všech testovaných induktorů apoptózy přímo úměrně koncentraci a době inkubace.

Pro potvrzení obecné použitelnosti H33258 metody jsme testovali změny nukleární kondenzace a fragmentace u dalších lidských buněčných linií, a to plicní A549 a neuronální SH-SY5Y. Obě buněčné linie jsme nejdříve podrobili analýze STR úseků pro autentizaci buněčné linie a také byly testovány na přítomnost mykoplazmat. Z výsledků komerčních analýz vyplývá, že námi kultivované A549 a SH-SY5Y buňky vykazují 100% shodu s referenčním standardem a opakovaně se neprokázala přítomnost mykoplazmat v buněčné linii.

Buňky A549 a SH-SY5Y jsme poté inkubovali s možnými induktory apoptózy, tj. CisPt, CAM, STA a navíc CdCl₂ po dobu 24 h. Poté jsme pomocí H33258 metody detekovali úroveň nukleární kondenzace a fragmentace (A549 buňky = graf 12A; SH-SY5Y buňky = graf 12B).



Graf 12: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (A549 a SH-SY5Y buňky). A) A549, B) SH-SY5Y. Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 100 μ M), kamptotecin (CAM; 5 μ M), staurosporin (STA; 100 nM), chlorid kademnatý (CdCl₂; 100 μ M). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4); **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky. (Originální data - Příloha 11)

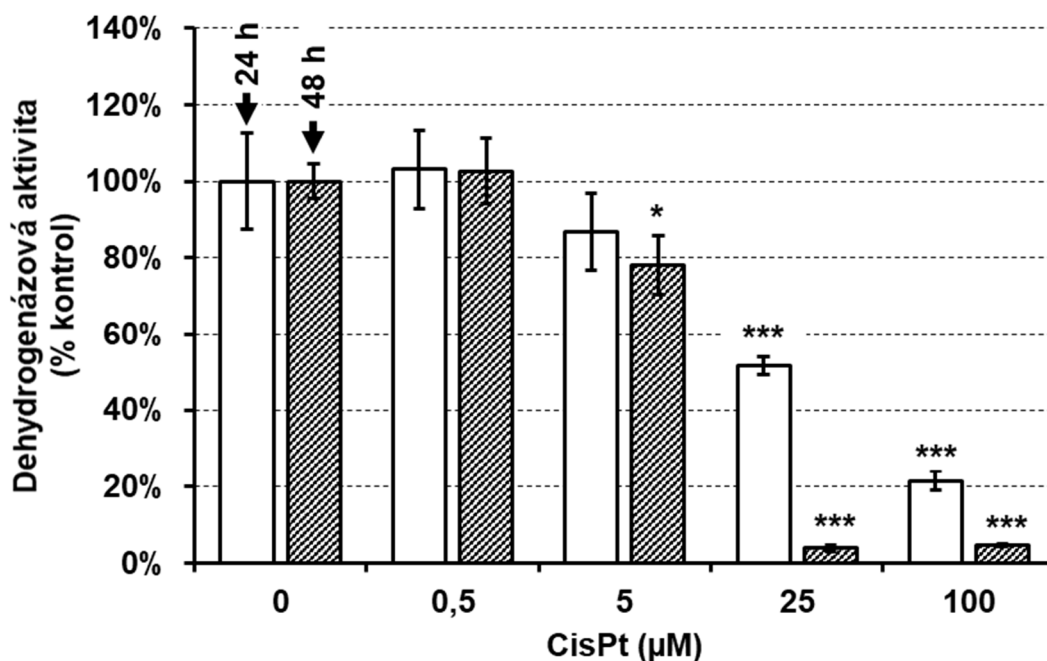
Jak je z grafu 12 patrné, u obou buněčných linií jsme prokázali zvýšení IF a tedy i zvýšenou míru nukleární kondenzace a fragmentace u všech testovaných toxinů po inkubaci 24 h.

5.3 Srovnání H33258 metody s dalšími metodami

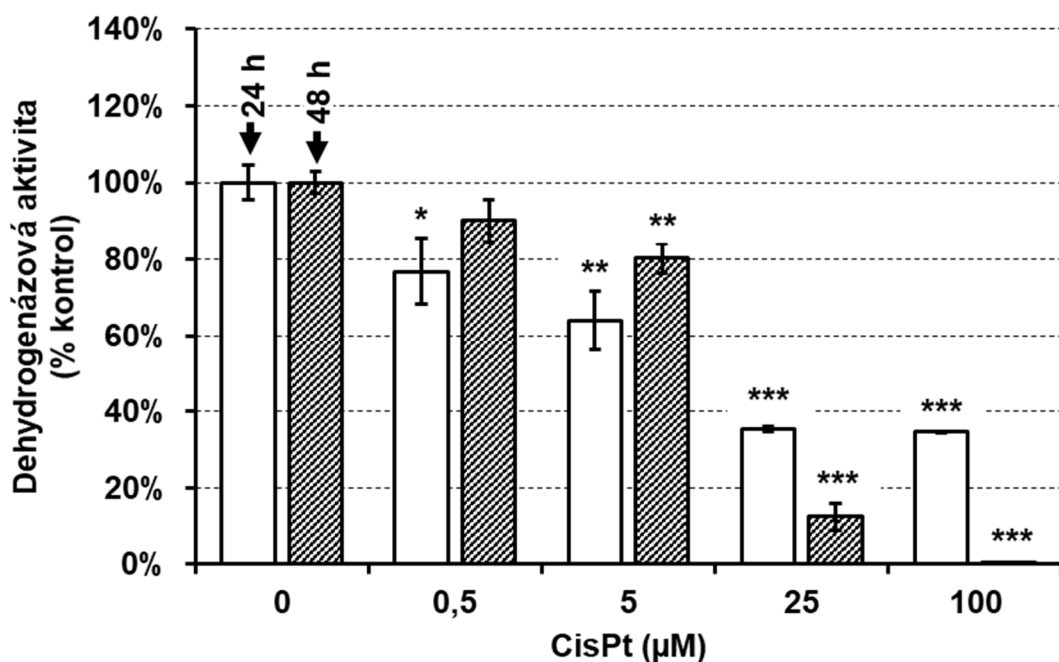
V další části naší práce jsme se u buněk inkubovaných s CisPt zaměřili na porovnání výsledků H33258 metody s dalšími metodami detekujícími buněčné poškození a markery apoptózy. Mezi použitá stanovení patřily: detekce intracelulárních dehydrogenáz (= WST-1 test), detekce koncentrace glutathionu, detekce aktivity kaspáz 3/7, analýza exprese proteinů PARP-1, jeho fragmentu a JNKs, a metody TUNEL a DNA žebřík.

5.3.1 WST-1 test

Pro charakterizaci poškození buněk jsme využili WST-1 test. Pomocí WST-1 testu jsme stanovili aktivitu intracelulárních dehydrogenáz HepG2 a HK-2 buněk ovlivněných CisPt (0-100 μ M) po 24 a 48 h. Dehydrogenázová aktivita byla u HepG2 buněk (graf 13) redukována již po inkubaci po 24 h s 25 a 100 μ M CisPt. Po inkubaci 48 h jsme našli sníženou dehydrogenázovou aktivitu již i u koncentrace 5 μ M CisPt. U HK-2 buněk (graf 14) jsme našli sníženou dehydrogenázovou aktivitu již po 24 h u všech testovaných koncentrací, která přetrvávala u většiny koncentrací i po 48 h.



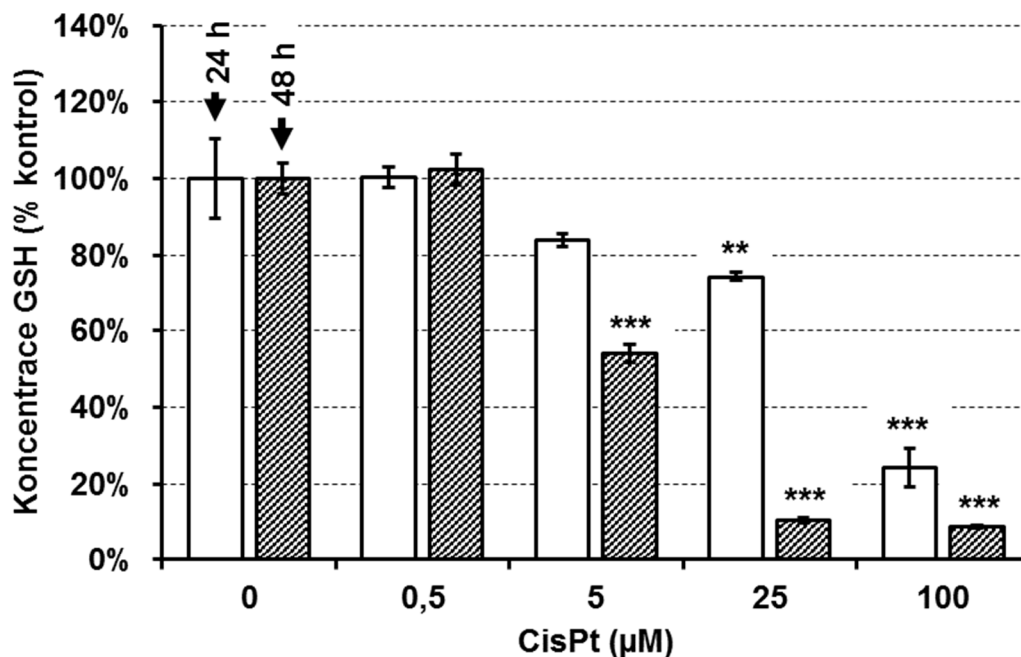
Graf 13: Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 µM). Inkubace 24 a 48 h. Absorbance (440 nm). Průměr ± SD (n=4); *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 12)



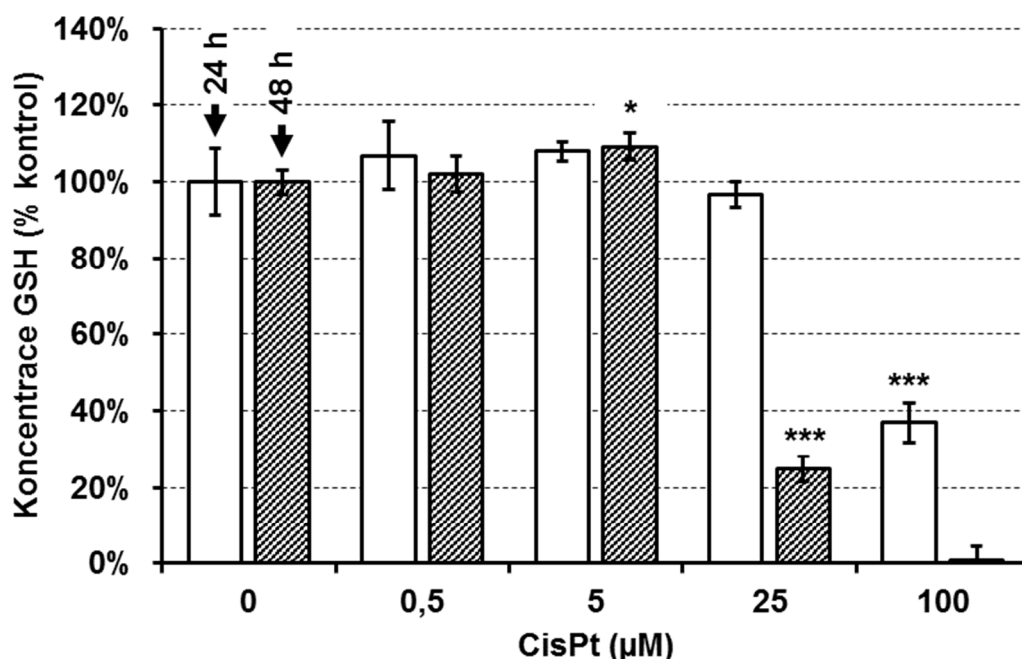
Graf 14: Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HK-2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 µM). Inkubace 24 a 48 h. Absorbance (440 nm). Průměr ± SD (n=4); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 13)

5.3.2 Stanovení koncentrace glutathionu

Intracelulární hladina glutathionu byla dalším testovaným parametrem v rámci charakterizace buněčného poškození. Koncentraci GSH jsme stanovili pomocí monochlorobimanu (Capek et al., 2017). HepG2 a HK-2 buňky jsme inkubovali s CisPt (0-100 μM) po dobu 24 a 48 h (HepG2 buňky = graf 15; HK-2 buňky = graf 16).



Graf 15: Stanovení koncentrace glutathionu (HepG2 buňky). Cisplatinu (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n=4); **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 14)

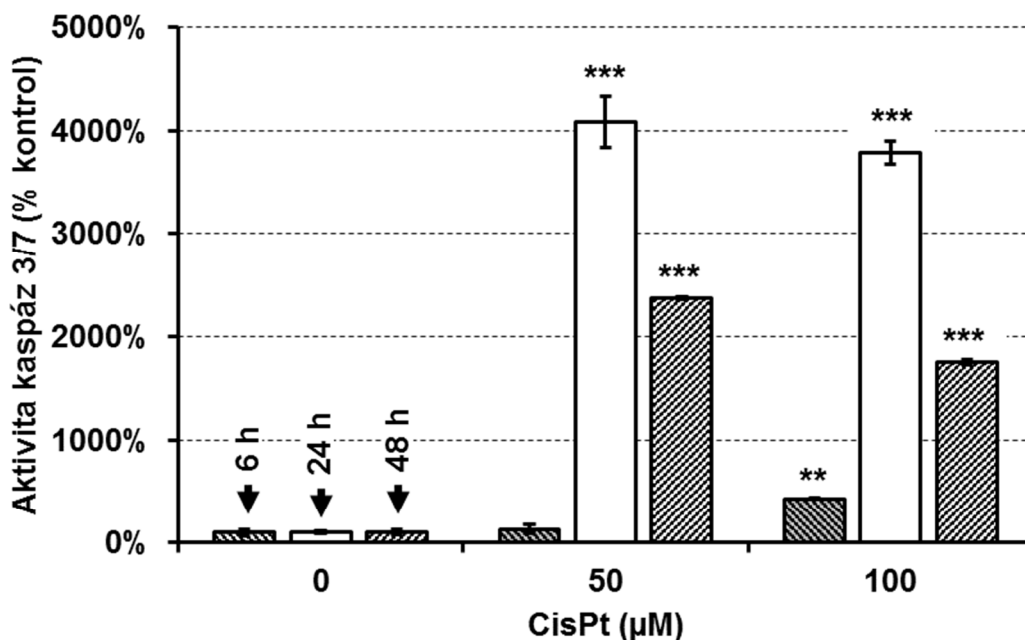


Graf 16: Stanovení koncentrace glutathionu (HK-2 buňky). Cisplatinu (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n=4); *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 15)

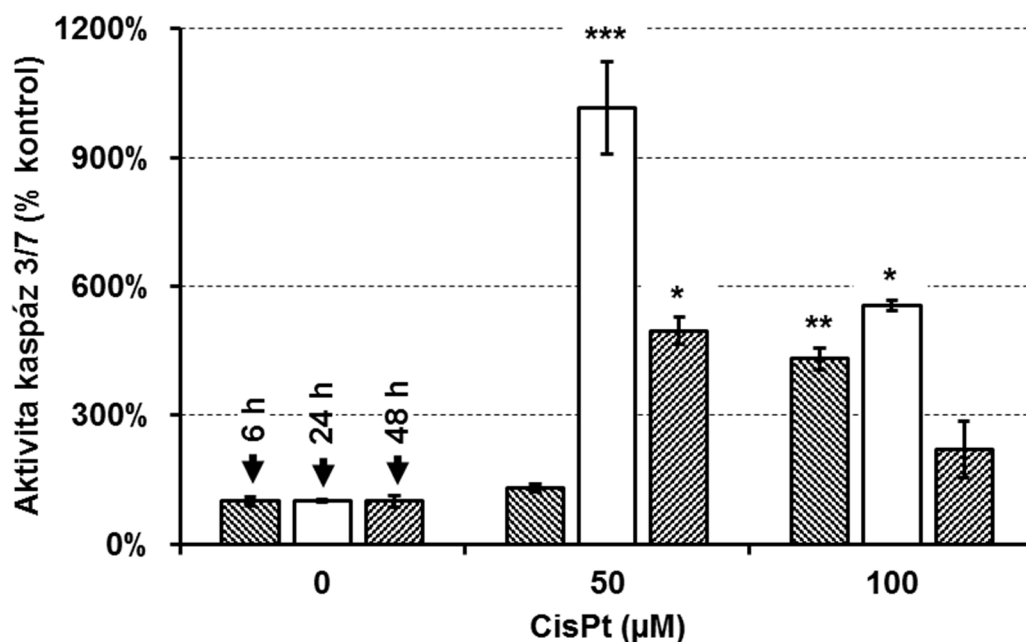
Hladiny glutathionu byly u HepG2 buněk (graf 15) sníženy oproti kontrole po inkubaci s 25 a 100 μM CisPt po dobu 24 h. Po 48 h jsme našli statisticky významně sníženou hladinu glutathionu již u koncentrace 5 μM CisPt. U HK-2 buněk (graf 16) jsme po inkubaci 24 h s CisPt našli signifikantní snížení hladiny glutathionu pouze u koncentrace 100 μM CisPt. Po 48 h došlo k malému zvýšení hladiny glutathionu u 5 μM CisPt, výrazné snížení jsme poté zaznamenali u koncentrací 25 a 100 μM .

5.3.3 Detekce aktivity kaspáz

Jako další metodu jsme u buněk inkubovaných s CisPt použili stanovení aktivity kaspáz 3 a 7, která předchází fragmentaci DNA. Aktivitu kaspáz 3 a 7 jsme testovali na buňkách HepG2 a HK-2 ovlivněných CisPt (0-100 μM) po dobu 6, 24 a 48 h (HepG2 buňky = graf 17; HK-2 buňky = graf 18). Aktivaci kaspáz 3 a 7 jsme detekovali již po 6 h inkubace se 100 μM CisPt u obou buněčných linií. Největší zvýšení aktivity jsme pozorovali po 24 h inkubaci s 50 μM CisPt. Po 48 h inkubace zůstala aktivita kaspáz statisticky významně zvýšená u HepG2 i HK-2 buněk, ačkoliv byla nižší než u předchozího 24h intervalu.



Graf 17: Aktivita kaspáz (HepG2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM=485/535). (Průměr \pm SD (n=2); **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 16)



Graf 18: Aktivita kaspáz (HK-2 buňky). Cisplatina (CisPt; 0-100 µM). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM=485/535 nm). Průměr ± SD (n=2); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, vs. kontrolní buňky v daném časovém intervalu. (Originální data - Příloha 17)

5.3.4 Analýza proteinové exprese

Expresi proteinů PARP-1, fragmentu PARP-1 (fPARP-1), pJNK1, pJNK2 a β -aktinu jsme analyzovali pomocí kapilární imunoelktroforézy (*Simple Western*). PARP-1 je během apoptózy štěpen kaspázou 3 na fPARP-1, přítomnost fPARP-1 je tedy spojena s potvrzením aktivace kaspázy 3.

Analýzu proteinové exprese jsme prováděli na lyzátech buněk HepG2 a HK-2, které jsme inkubovali s CisPt (0-100 µM) po 6, 24 a 48 h. Po lyzi buněk jsme stanovili koncentrace proteinů pomocí Bradfordova činidla. Pro analýzu pomocí metody *Simple Western* jsme proteinové lyzáty naředili tak, aby výsledná koncentrace proteinů ve vzorku byla 0,4 mg/mL. Analyzovali jsme expresi proteinů PARP-1, fPARP-1, JNKs a referenčního proteinu β -aktinu. Výsledky prezentované jako podíl k housekeepingové expresi proteinu (tj. plocha píku proteinu/plocha píku β -aktinu) jsou uvedeny v tabulce 2.

Pomocí metody *Simple Western* jsme analyzovali expresi proteinů PARP-1 a příslušného fPARP-1. Přítomnost fPARP-1 jsme detekovali u obou koncentrací CisPt po inkubaci 24 h u obou testovaných buněčných liniích. Přítomnost fPARP-1 přetrvávala u HepG2 buněk i po inkubaci 48 h.

Expresí fosforylovaných JNK1 a JNK2 také může korespondovat s probíhajícím apoptotickým procesem, a proto jsme se rozhodli analyzovat úroveň jejich exprese. Detekovali jsme zvýšení exprese pJNK1 u HepG2 buněk po inkubaci se všemi koncentracemi CisPt ve všech testovaných časových intervalech. U HK-2 buněk jsme detekovali zvýšení pJNK1 a pJNK2 především po inkubaci 24 h s CisPt.

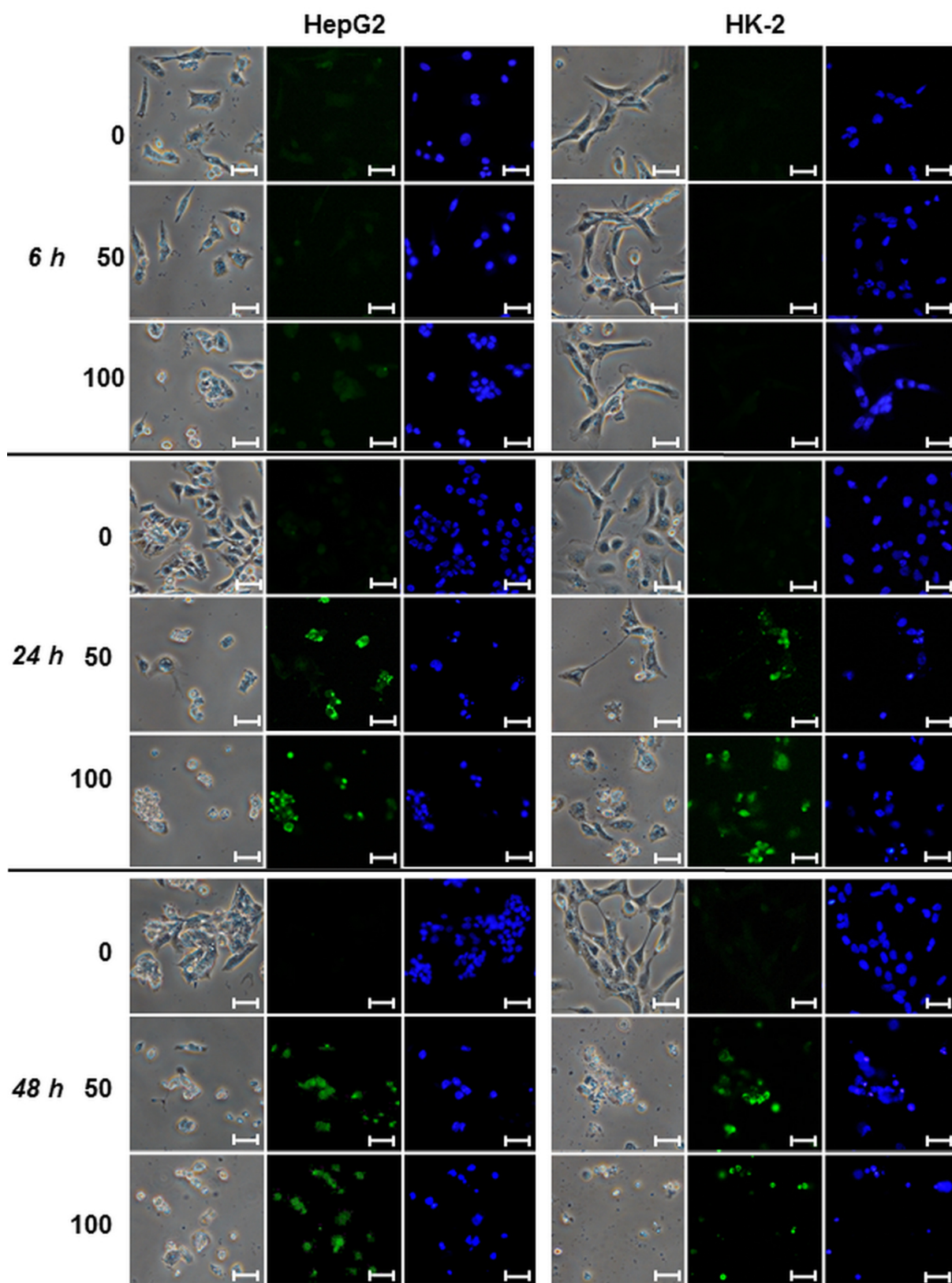
Tabulka 2: Expresí proteinů PARP a JNK u buněk exponovaných cisplatině. HepG2 a HK-2 buňky jsme inkubovali s cisplatinou (CisPt; 0-100 μM) po 6, 24 a 48 h. Výsledky jsou prezentovány jako podíl plochy píku zájmu ku ploše píku β -aktinu. fPARP-1 – fragment PARP-1 (89 kDa), pJNK – fosforylovaná JNK.

Čas	CisPt (μM)	HepG2				HK-2			
		PARP-1	fPARP-1	pJNK1	pJNK2	PARP-1	fPARP-1	pJNK1	pJNK2
6 h	0	2,3	0	0	0	0,4	0,1	0	0
	50	2,3	0	0,2	0,2	0,9	0,1	0	0
	100	1,8	0	0,4	0,3	0,7	0,5	0,1	0,1
24 h	0	1,9	0	0	0	1,6	0,1	0,1	0
	50	1,9	1,3	0,2	0,2	0,9	1,5	0,2	0,1
	100	2,7	2,0	0,7	0,6	0,8	1,5	0,3	0,2
48 h	0	3,0	0	0	0	0,9	0	0	0
	50	3,2	1,3	0,5	0	0,9	0,1	0	0
	100	3,2	1,0	1,2	1,0	0	0	0	0

5.3.5 Metoda TUNEL

K detekci DNA zlomů jsme použili metodu TUNEL. HepG2 a HK-2 buňky jsme inkubovali s CisPt po 6-48 h. Pro vizualizaci buněčných jader jsme použili fluorescenční barvení pomocí H33258. Výsledky jsou zobrazeny jako mikroskopické snímky v následujícím obrázku (obrázek 18).

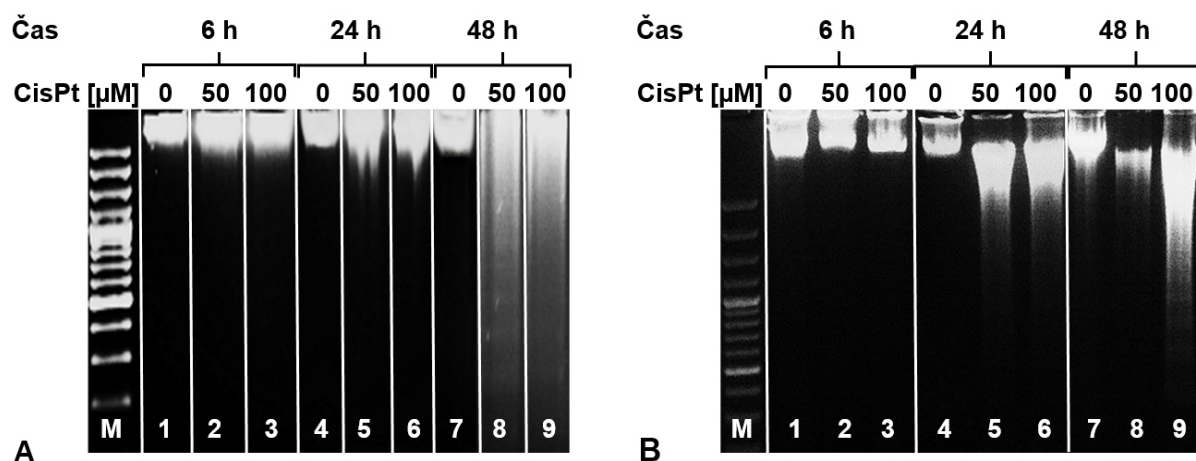
Po inkubaci 6 h jsme pozorovali slabou fluorescenci DNA zlomů u HepG2 buněk ovlivněných 100 μM CisPt. Po delších inkubačních časech (24 a 48 h) jsme detekovali intenzivní fluorescenci v místech DNA zlomů u obou buněčných liniích po inkubaci s 50 a 100 μM CisPt.



Obrázek 18: Detekce DNA zlomů pomocí metody TUNEL. Vlevo – HepG2; vpravo – HK-2. Buňky byly inkubovány 6, 24 a 48 h s různými koncentracemi cisplatin (CisPt; 0-100 μM). První sloupec- fázový kontrast, druhý sloupec - barvení TUNEL, třetí sloupec – barvení jader H33258. Zvětšení 200x.

5.3.6 DNA žebřík

Pro porovnání výsledků spektrofluorimetrické H33258 metody jsme použili také metodu DNA žebříku. Pomocí této metody jsme zjišťovali přítomnost internukleozomální DNA fragmentace. Testovali jsme přítomnost DNA fragmentace na buňkách HepG2 a HK-2 po inkubaci s CisPt (0-100 μ M) po 6, 24 a 48 h (obrázek 19).



Obrázek 19: Detekce DNA žebříku u buněk exponovaných cisplatině. A) HepG2 buňky; B) HK-2 buňky. Buňky byly inkubovány 6, 24 a 48 h s cisplatinou (CisPt; 0-100 μ M). 0- kontrolní buňky; 50 – 50 μ M cisPt; 100 – 100 μ M cisPt. Jako standard (M) jsme použili 100 bp marker Gene-Ruler.

Štěpení DNA v internukleozomálních oblastech se objevuje v pozdních fázích apoptotického procesu, což potvrzují naše výsledky. Pomocí metody detekce DNA žebříku jsme prokázali přítomnost fragmentované DNA u obou testovaných buněčných linií. U HepG2 buněk (obr. 19A) jsme DNA fragmentaci detekovali po 48 h inkubace s oběma testovanými koncentracemi CisPt. U HK-2 buněk (obrázek 19B) jsme DNA žebřík detekovali již po 24h inkubaci s CisPt.

5.3.7 Vyhodnocení výstupů metod detekujících proapoptické děje

Na závěr jsme porovnali výsledky detekce nukleární kondenzace a fragmentace v HepG2 a HK-2 buňkách H33258 metodou s dalšími metodami. Výsledky tohoto srovnání jsou zobrazeny v tabulce 3.

Prokázali jsme počáteční zvýšení aktivity kaspáz 3/7, které bylo následováno fragmentací PARP-1, vznikem DNA zlomů a fragmentací DNA. Na základě získaných

výsledků můžeme říci, že nově vyvinutá H33258 metoda pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace je porovnatelná s metodou TUNEL, která je standardně využívanou metodou pro detekci apoptózy.

Tabulka 3: Porovnání H33258 metody s ostatními metodami. – negativní; +/- slabě pozitivní; + pozitivní; ++ silně pozitivní. H33258 – Hoechst 33258, fPARP-1 - fragment PAPR-1 89 kDa.

		<i>H33258</i>	<i>Kaspázy</i>	<i>TUNEL</i>	<i>fPARP-1</i>	<i>DNA žebřík</i>
6 h	HepG2	+	+	+/-	-	-
	HK-2	-	++	-	+	-
24 h	HepG2	++	++	++	++	-
	HK-2	++	++	++	++	++
48 h	HepG2	++	++	++	++	++
	HK-2	++	-	++	-	++

6. Diskuse

Apoptóza je druhem programované buněčné smrti, a je proto středem zájmu mnohých vědeckých studií. Provází ji řada biochemických i morfologických změn v buňce, které se využívají k její detekci. Mezi hojně analyzované parametry buněk podstupujících apoptózu patří i kondenzace jádra a jeho fragmentace. Jádro buňky je možné pozorovat pomocí různých druhů mikroskopických technik, jako jsou např. světelná mikroskopie s fázovým kontrastem, elektronová mikroskopie (SEM i TEM) a samozřejmě především fluorescenční mikroskopie (Burattini and Falcieri, 2013; Henry et al., 2013). V literatuře nicméně zatím nebyla publikována metoda, která by umožňovala kvantitativní detekci nukleární kondenzace a fragmentace spektrofluorimetry *in vitro*. Vyvinout a evaluovat spektrofluorimetrickou metodu pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace si kladla za cíl tato disertační práce. Rozhodli jsme se k tomu využít fluorescenční sondu Hoechst 33258, která se běžně používá ve fluorescenční mikroskopii k vizualizaci jader, k detekci kondenzace a fragmentace jádra a k vizualizaci apoptotických tělísek (Chen et al., 2012; Kapoor et al., 2013; Qin et al., 2015; Soares et al., 2019). V naší práci jsme k vývoji nové spektrofluorimetrické metody pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace využili právě tuto sondu na vícero buněčných liniích.

I. Optimalizace denzity buněk HepG2 a HK-2

Při vývoji nové spektrofluorimetrické metody jsme v této práci využívali především HepG2 jaterní buněčnou linii a ledvinné buňky HK-2. HepG2 je buněčná linie lidského hepatocelulárního karcinomu (Aden et al., 1979) a HK-2 je imortalizovaná lidská buněčná linie ledvinných proximálních tubulů (Ryan et al., 1994). Obě tyto linie jsme nejprve podrobili analýze STR úseků pro jejich autentizaci a vyloučení vzájemné kontaminace, která může ovlivňovat výsledky analýz (Reid et al., 2012). Následně jsme buňky podrobili detekci přítomnosti mykoplazmálních enzymů. U obou buněčných linií jsme prokázali 100% shodu s referenční buněčnou linií HepG2 a HK-2 a vyloučili přítomnost mykoplazmální kontaminace.

V rámci zavedení nové spektrofluorimetrické H33258 metody detekující nukleární kondenzaci a fragmentaci u buněk kultivovaných v 96jamkové destičce jsme nejprve optimalizovali množství buněk. Množství nasazovaných buněk

do 96jamkových destiček se liší napříč buněčnými typy. Optimalizace počtu buněk jsme prováděli prostřednictvím určení konfluency a detekce aktivity intracelulárních dehydrogenáz. Buněčná konfluency patří mezi důležité parametry, které mohou zásadně ovlivnit expresi některých genů a následně výsledky buněčných stanovení (Belacel-Ouari et al., 2017; Wu et al., 2020). Úroveň aktivity intracelulárních dehydrogenáz nám poskytuje informace o celkové viabilitě buněk (Joo et al., 2019). Kritéria pro zvolení optimální denzity buněk byla: konfluency buněk alespoň 60 % a buněčná dehydrogenázová aktivita analyzovaná pomocí absorbance po inkubaci s WST-1 činidlem po dobu 1 h mezi hodnotami 1-3.

V naší práci jsme nejprve používali HepG2 buňky. Počet HepG2 buněk, které jsou nasazovány do 96jamkové destičky, se liší v rámci různých vědeckých studií. Například ve studii Sung a kol. (2003) nasazovali 5×10^3 bb/j k detekci růstu buněk pomocí MTT po inkubaci až 48 h. V práci Chandrasekaran a kol. (2010) testovali viabilitu pomocí MTT na HepG2 buňkách v denzitě 8×10^3 bb/j po inkubaci až 96 h. Buněčnou viabilitu pomocí MTT testovali také ve studii Szuster-Ciesielska a Kandeferszyszen (2005), kde nasazovali 40×10^3 bb/j a inkubovali 24 h, a dále ve studii Deng a kol. (2006), kde použili 60×10^3 bb/j po dobu 72 h. Thongkam a kol. (2017) použili 10×10^3 HepG2 bb/j k testu WST-1 po inkubaci až 24 h. Na základě těchto dat můžeme shrnout a potvrdit, že čím delší časový interval je testován, tím méně buněk je vhodné nasadit. Pro spektrometrické analýzy jsme v naší studii nasazovali do 96jamkových mikrotitračních destiček 15×10^3 HepG2 bb/j po inkubační časy 6-48 h. Tato denzita patří do rozmezí denzit nalezených v literatuře.

Počet HK-2 buněk, které jsou nasazovány do 96jamkových destiček pro spektrometrická stanovení, se v literatuře také liší. Ve studii Huang a kol. (2015) použili k detekci cytotoxicity pomocí MTT a resazurinu denzitu 4×10^3 bb/j, kdy se délka inkubace buněk s testovanými látkami pohybovala v rozmezí 4-72 h. V jiné studii Fu a kol. (2019) kultivovali v 96jamkových destičkách 5×10^3 bb/j a testovali buněčnou viabilitu pomocí WST-8 po inkubačních časech 12-24 h. Thongkam a kol. (2017) nasazovali ve své studii 10×10^3 bb/j a testovali cytotoxicitu po intervalu 24 h pomocí WST-1. K analýze buněčné adheze pomocí XTT po 30 min použili ve své studii Sarro a kol. (2020) 20×10^3 bb/j. Koncentrace glutathionu a buněčnou viabilitu jsme také analyzovali ve studii Handl a kol. (2020), kde jsme kultivovali 30×10^3 bb/j po inkubaci s testovanými sloučeninami až 24 h. V naší práci jsme vybrali dle naměřených výsledků denzitu HK-2 buněk 20×10^3 bb/j jako optimální pro inkubační intervaly 6-48 h.

Tato denzita je oproti většině denzit nalezených v literatuře vyšší. To může být způsobeno nastavením našeho optimalizačního experimentu, kdy jedním z parametrů byla absorbance mezi hodnotami 1 a 3. V diskutovaných studiích nejsou definovány podmínky optimalizace denzit buněk.

II. Vývoj spektrofluorimetrické metody pro detekci buněčné nukleární kondenzace a fragmentace

Po optimalizaci denzit buněk pro spektrometrické metody jsme přistoupili k samotnému vývoji H33258 metody. Je překvapivé, že využití sondy H33258 pro kvantitativní spektrofluorimetrickou detekci nukleární kondenzace a fragmentace dosud nebylo v literatuře popsáno.

K vývoji H33258 metody jsme nejprve používali pouze buňky HepG2 inkubované s CisPt po dobu 24 h. Buňky nasazené v médiu DMEM s vysokým obsahem glukózy jsme následně inkubovali s CisPt, jako induktorem nukleární kondenzace a fragmentace. Poté jsme po dalším zpracování analyzovaných vzorků (tj. centrifugaci, výměně média) přidali 10 μL sondy H33258 tak, aby bylo dosaženo finální koncentrace 2 $\mu\text{g/mL}$ H33258 v jamce.

Dalším krokem při vývoji H33258 metody bylo stanovení optimální doby inkubace buněk se sondou H33258. Toto zjištění bylo klíčové pro zrychlení celého postupu metody. V literatuře lze najít různé doby inkubace sondy H33258 s analyzovanými buňkami, ovšem jedná se o principiálně jiné metody, a to především o mikroskopickou fluorescenční vizualizaci jádra. Malatesta a kol. (2012) využili inkubace s H33258 (1 $\mu\text{g/mL}$) trvající 5 min. V další práci Wu a kol. (2013) inkubovali buňky s H33258 (5 $\mu\text{g/mL}$) po dobu 10 min. Ve studii Sun a kol. (2017) inkubovali buňky s H33258 (cca 4,2 $\mu\text{g/mL}$) po dobu 30 min. Park a kol. (2011) exponovali buňky sondě H33258 (5 $\mu\text{g/mL}$) po dobu 60 min. Ve spojení s FC, popisují ve studii Bogush a kol. (2020) inkubaci sondy H33258 (1,2 $\mu\text{g/mL}$) s buňkami po dobu 15 min. V práci Wu a kol. (2020) analyzovali jádra buněk pomocí FC dokonce ihned po přidání sondy H33258 (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Na základě námi naměřených výsledků a porovnání s literaturou je zřejmé, že námi zvolená inkubace sondy H33258 s buňkami po dobu 5 min patří k intervalům kratším, ale na základě našich naměřených dat pro měření IF plně dostačujícím díky tomu, že signál IF přechází do lineární fáze již před 5. minutou.

Co se týká podmínek použití dalších sond Hoechst (33342 a 34580) v ostatních pracích, doba inkubace buněk se sondami a použité koncentrace sond se liší dle metody. Ve spojení s FC se u sondy H33342 používá koncentrace např. 5 µg/mL po dobu 1 h (Bastos et al. 2005), nebo je možné tuto koncentraci sondy přidat 4 h před indukci apoptózy (Jiang et al. 2017). Ve spojení s mikroskopií se používají koncentrace v rozmezí 100 ng/mL – 5 µg/mL po inkubační čas až 4 h v závislosti na koncentraci (Crowley et. al 2016, Henry et al. 2013, Jiang et al. 2017). Hoechst 34580 se používá především ve spojení s fluorescenční mikroskopií, kde tuto sondu ve studii Abdollahi a kol. (2018) inkubovali s buňkami po dobu 1 h, a to v koncentraci cca 0,6 µg/mL. V další studii Hemion a kol. (2014) inkubovali Hoechst 34580 (1 µg/mL) s buňkami po dobu 30 min. Goto a kol. (2019) prováděli barvení jader pomocí Hoechst 34580 (5 µg/mL) po dobu 20 min.

V poslední fázi optimalizace H33258 metody jsme ověřovali, zda koncentrace 2 µg/mL H33258 vybraná na základě literárních zdrojů (Stokke and Steen, 1986; Zurek-Biesiada et al., 2014) je optimální pro kvantitativní detekci nukleární kondenzace a fragmentace spektrofluorimetry. Jak bylo výše uvedeno, pro fluorescenční mikroskopii se používají především koncentrace H33258 1-5 µg/mL (Cao et al., 2011; Hammond et al., 2004), ve spojení s průtokovou cytometrií jsou to koncentrace o něco nižší, a to v rozmezí 0,5-2 µg/mL (Beaton-Green and Wilkins, 2016; Bogush et al., 2020; Carlson et al., 1997). Vzhledem k těmto poznatkům jsme se v rámci spektrofluorimetrických měření rozhodli otestovat koncentrace v rozmezí 0,1-5 µg/mL. Naše výsledky potvrdily informace z literatury, že koncentrace H33258 2 µg/mL se jeví jako optimální pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace v buňkách i za našich podmínek.

Vlnové délky využívané pro detekci intenzity fluorescence sond Hoechst (33258, 33342 a 34580) se v literatuře nepatrně liší. Sonda Hoechst 33258 je excitována prostřednictvím UV záření (~360 nm) a emisní maximum se pohybuje v oblasti modrého světla (461 nm) (Bucevicius et al., 2018). Ve studii Hadi a kol. (2018) použili vlnové délky EX/EM = 352/461 nm, které jsme využili i v naší studii. Podobné vlnové délky využili také ve studii Wu a kol. (2013), kde zvolili EX/EM = 350/460 nm pro vizualizaci jader pomocí fluorescenčního mikroskopu. Ve studii Carlson a kol. (1997) využili H33258 v rámci průtokové cytometrie a využili EX/EM = 351 a 354 nm/400 a 450 nm.

Sonda H33342 je strukturou a tedy i svými spektrálními vlastnostmi podobná H33258, a proto je excitována UV zářením také. Emisní maximum se pohybuje mezi 460-490 nm (Atale et al., 2014; Bucevicius et al., 2018; Chazotte, 2011).

Sonda Hoechst 34580 má nepatrně posunuté emisní maximum k 490 nm, protože místo fenolové skupiny, kterou obsahují již zmíněné sondy H33258 a H33342, obsahuje dimethylamin (Bucevicius et al., 2018). Proto i ve studii Nogueira a kol. (2016) detekovali fluorescenci u Hoechst 34580 při EX/EM = 357/490 nm.

V další části naší práce jsme využili pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace kromě buněčné linie HepG2 také buněčnou linii HK-2. Na obou buněčných liniích jsme pro zjištění schopnosti metody zachytit nukleární kondenzaci a fragmentaci stanovili citlivost buněk na CisPt. Cisplatina je protinádorový lék, který je schopen indukovat apoptotickou DNA fragmentaci v buňkách (Yang et al., 2020; Zhang et al., 2009). CisPt interaguje s bázemi adeninem a guaninem obsaženým v DNA buňky a vytváří adukty, které inhibují replikaci a transkripci DNA (Tanida et al., 2012).

III. Aplikace nové H33258 metody

Pro testování, že H33258 metoda je využitelná pro detekci nukleární kondenzace a fragmentace, jsme inkubovali HepG2 a HK-2 buňky s induktory apoptózy, tj. cisplatinou, kamptotecinem a staurosporinem. Jako negativní kontrolu jsme využili nanočástice TiO₂ P25, které by nukleární kondenzaci a fragmentaci v buňkách neměly indukovat (Petkovic et al., 2011).

U CisPt jsme jsme zvýšení fluorescence pozorovali u obou buněčných linií u koncentrace 25 µM CisPt již po inkubační době 24 h. Naše výsledky získané při detekci odezvy buněk na CisPt jsou podobné jako výsledky ze studie Park et al. (2002), kde prokázali přítomnost nukleární fragmentace pomocí metody TUNEL po inkubaci LLC-PK1 buněk s 50 µM CisPt po dobu 12 a 24 h. Naše výsledky jsou dále podpořeny mnoha recentními studiemi Lin a kol. (2017), Chen a kol. (2019a) a Xue a kol. (2020). Studie Lin et al. (2017) prokázala fragmentaci DNA u rakovinných buněk močového měchýře ovlivněných 6,25 a 25 µM CisPt po dobu 24 h. Chin et al. (2019a) dále detekovali apoptózu pomocí průtokové cytometrie po inkubaci HK-2 buněk s 20 µM CisPt po dobu 48 h. Xue a kol. (2020) zjistili pomocí průtokové cytometrie, že buňky

karcinomu jazyka podstupují apoptózu po inkubaci s CisPt o koncentraci $\sim 17 \mu\text{M}$ po 24 h.

Kamptotecin působí jako inhibitor DNA topoizomerázy I a způsobuje vznik zlomů DNA a aktivaci proteinu p53 (Garcia et al., 2014; Pommier, 2006; Rath et al., 2009). Naše výsledky detekce nukleární kondenzace a fragmentace u buněk ovlivněných $5 \mu\text{M}$ CAM po dobu 6 h mohou být podpořeny studií autorů Rath et al. (2009), kteří pomocí metody TUNEL našli apoptotické jádro u thyroidních rakovinných buněk po inkubaci buněk s $5 \mu\text{M}$ CAM po dobu 8 h. V další studii zaměřené na studium CAM-indukované apoptózy autoři našli pomocí FC apoptotické změny v buňkách HepG2 ovlivněných $1 \mu\text{M}$ CAM po 24 h (Ji and Gao, 2008). Můžeme tedy říci, že námi vyvinutá spektrofluorimetrická H33258 metoda poskytuje obdobné výsledky jako jiné studie, které se zabývají apoptózou indukovanou CAM.

Abychom zjistili, zda staurosporin způsobuje nukleární kondenzaci a fragmentaci v buňkách, použili jsme koncentrace, které byly popsány jako dostatečné k indukci buněčné smrti (Ding et al., 2017; Gorman et al., 2000). Staurosporin je silným inhibitorem proteinkináz a je schopen indukovat fragmentaci DNA (Deshmukh and Johnson, 2000; Ding et al., 2017). Naše výsledky získané pomocí H33258 metody jsou ve shodě se studií Ding et al. (2017), kde detekovali pomocí metody TUNEL fragmentaci DNA u HepG2 buněk ovlivněných 10 nM STA po 24 h. V další studii Deshmuk a Johnson (2000) autoři popisují zvýšenou úroveň DNA fragmentace pomocí metody TUNEL u sympatických neuronů ovlivněných 100 nM STA po 24 h. Na základě tohoto porovnání s literaturou můžeme říci, že spektrofluorimetrická H33258 metoda poskytuje obdobné výsledky jako jiné studie zabývající se účinkem STA v buňkách.

Na základě výsledků detekce nukleární kondenzace a fragmentace u buněk HepG2 a HK-2 ovlivněných CisPt, CAM a STA jsme ukázali, že spektrofluorimetrická H33258 metoda je schopna detekovat různou míru nukleární kondenzace a fragmentace, a to v závislosti na koncentraci inuktoru i době inkubace.

Použitelnost H33258 metody jsme také otestovali na dvou dalších buněčných liniích, a to na buněčné linii lidského adenokarcinomu A549 (Giard et al., 1973) a na buněčné linii lidského neuroblastomu SH-SY5Y (Biedler et al., 1978). Na obou buněčných liniích jsme také otestovali induktory apoptózy (CisPt, CAM a STA) a navíc CdCl_2 . Kadmium patří do skupiny těžkých kovů, které jsou schopny indukovat produkci oxidačního stresu a způsobovat tak oxidační poškození DNA (Handl et al., 2019).

Naměřená úroveň nukleární kondenzace a fragmentace u buněk SH-SY5Y a A549 ovlivněných CisPt, STA a CAM po 24 h se shoduje s výsledky z experimentů na HepG2 a HK-2 buňkách. Výsledky u buněk SH-SY5Y a A549 inkubovaných s CdCl₂ jsou obdobné, kdy mohou být tyto výsledky potvrzeny studií Kim et al. (2005), kde detekovali nukleární kondenzaci a fragmentaci u SH-SY5Y buněk pomocí barvení sondou DAPI a metodou TUNEL již po inkubaci 12 h se 100 μM CdCl₂. Další studie potvrzující naše výsledky je Tan et al. (2017), kde detekovali signifikantně vyšší výskyt TUNEL-pozitivních H9-ECs buněk u koncentrací CdCl₂ 0,1-100 μM po 24 h.

IV. Komparace H33258 metody s dalšími metodami

Pro srovnání výsledků detekce nukleární kondenzace a fragmentace pomocí H33258 metody jsme využili další metody, jako jsou např. WST-1, stanovení glutathionu a stanovení exprese proapoptických proteinů, metoda TUNEL a DNA žebřík. Získané výsledky jsme následně porovnali s výsledky získané H33258 metodou.

K dalšímu hodnocení cytotoxicity CisPt jsme využili metody stanovení aktivity mitochondriálních dehydrogenáz WST-1 a stanovení GSH pomocí monochlorobimanu. Při apoptóze dochází prostřednictvím oxidačního poškození ke snížení viability buněk a k depleci GSH (Buzadžić et al., 2004; Merad-Boudia et al., 1998). Následně dochází k permeabilizaci mitochondriálních membrán a k uvolnění proapoptických faktorů (Wang and Huang, 2005).

U WST-1 testu jsme zaznamenali snížení viability u obou testovaných buněčných liniích HepG2 a HK-2 již po 24 h u koncentrace CisPt 5 μM. Podobné výsledky byly publikovány i v dalších studiích, kde k testování viability buněk použili také WST-1 test. Ve studii Satoh et al. (2003) detekovali u buněk myších proximálních tubulů snížení viability po inkubaci buněk s 20 μM CisPt po 24 h. Ve studii Ramer et al. (2018) testovali vliv CisPt na viabilitu buněk plicního karcinomu A549 a H358. U buněk A549 detekovali snížení buněčné viability po inkubaci buněk s 3 μM CisPt po 48 h. U buněk H358 detekovali snížení viability po inkubaci buněk s 10 μM CisPt také po dobu 48 h. Po inkubaci buněk s koncentracemi CisPt ≤1 μM nezaznamenali pomocí WST-1 testu žádnou cytotoxicitu.

U HK-2 buněk jsme po inkubaci 24 h s CisPt našli signifikantní snížení hladiny GSH pouze u koncentrace 100 μM, u HepG2 buněk navíc u koncentrace 25 μM. Po 48 h došlo u HK-2 buněk ke snížení hladiny GSH u koncentrací 25 a 100 μM CisPt, u HepG2 buněk již

u koncentrace 5 μM CisPt. V literatuře je popsáno, že 100 μM CisPt je schopna indukovat snížení hladiny GSH u HK-2 buněk již po 6 h inkubace (Handl et al., 2020). Naše výsledky získané z metod WST-1 a GSH potvrdily, že jsou schopny detekovat toxicitu CisPt dříve, než je tomu u H33258 metody.

Jako další metody, které jsme použili k porovnání s H33258 metodou, jsme zvolili detekci aktivace kaspáz 3/7 a stanovení exprese daných proteinů metodou *Simple Western*. Aktivaci kaspáz 3/7 jsme detekovali u obou buněčných linií již po 6hodinové inkubaci. Tyto výsledky popsal také Schweyer et al. (2004) u NCCIT buněk ovlivněných 50 μM CisPt. Přetrvávající aktivace kaspáz 3/7 byla popsána v řadě studií na buňkách UBOC1, HK-2 a SH-SY5Y po inkubaci s 5, 10 a 20 μM CisPt po dobu 24 h (Rathinam et al., 2015) a v HepG2 buňkách inkubovanými s 25 μM CisPt po dobu 12, 24 a 48 h (Yasuda et al., 2019).

Metodu *Simple Western* jsme využili k detekci změn exprese proteinů PARP-1, JNK1 a JNK2. Míra exprese PARP-1 ukazuje na možné poškození DNA, protože tento protein je štěpen pomocí kaspázy 3 na fragmenty o velikosti 24 a 89 kDa (Chaitanya et al., 2010; Chaudhuri and Nussenzweig, 2017). Vznik fragmentů PARP-1 (fPARP) se proto používá k detekci apoptózy (Kaufmann et al., 1993). Naše výsledky detekce exprese fPARP-1 po inkubaci buněk s 50 μM CisPt se shodují s výsledky studie (Ju et al., 2017), kde detekovali štěpení PARP-1 u HK-2 buněk ovlivněných 40 μM CisPt po dobu 24 h.

U buněk inkubovaných s CisPt byla popsána fosforylace JNKs (Hayakawa et al., 2003). V naší studii jsme u buněk HepG2 i HK-2 detekovali zvýšenou úroveň fosforylace JNK1 a JNK2 po inkubaci s CisPt (0-100 μM) ve všech testovaných časových intervalech. Podobné výsledky jsou publikovány ve studiích Brozovic et al. (2004) a Lee et al. (2020), kde detekovali zvýšenou expresi pJNK v HeLA buňkách inkubovaných s 50 a 100 μM CisPt po dobu 6 h, a v prasečích ledvinných buňkách inkubovaných s 25 μM CisPt po inkubační interval 24 h.

Metody TUNEL a DNA žebřík patří mezi často využívané metody pro detekci DNA zlomů a DNA fragmentace (Archana et al., 2013; Crowley et al., 2016; Majtnerová and Roušar, 2018; Wu et al., 2014; Yang et al., 2020) a rozhodli jsme se je tedy použít jako další metody k porovnání s H33258 metodou. Pomocí metody TUNEL jsme našli zlomy v DNA u obou buněčných linií HepG2 a HK-2 po inkubaci s CisPt po 24 h. Naše výsledky se shodují s literaturou, kdy ve studiích Yang et al. (2020) a Park et al. (2002) detekovali zlomy a fragmentaci DNA pomocí metody TUNEL u HK-2 a LLC-PK-1 buněk, které inkubovali s 50 μM CisPt po 24 h. Výsledky detekce DNA fragmentace pomocí DNA žebříku se shodují s výstupy studie Lau et al. (1999), kde detekovali DNA žebřík u LLC-PK-1 buněk ovlivněných 50 μM CisPt po 12-48 h.

7. Závěr

Vyvinuli jsme spektrofluorimetrickou metodu, která využívá fluorescenční sondu Hoechst 33258 k detekci nukleární kondenzace a fragmentace v intaktních buňkách. Naše výsledky ukázaly, že H33258 metoda je schopna detekovat nukleární změny u HepG2 a HK-2 buněk inkubovaných se třemi typickými induktory apoptózy, tj. cisplatinou, staurosporinem a kamptotecinem. Výsledky také ukázaly, že H33258 metodu lze využít i u detekce nukleárních změn u dalších buněčných linií, což naznačuje její možné obecné využití u adherentních buněčných linií.

Výsledky získané H33258 metodou jsme porovnali s metodami, které jsou používány k detekci apoptózy. Mezi tyto metody patří aktivace kaspáz 3/7, exprese proteinů JNKs a PARP-1, včetně vzniku fPARP-1, metoda TUNEL a DNA žebřík. Na základě porovnání těchto metod jsme vyhodnotili, že námi vyvinutá H33258 metoda poskytuje výsledky srovnatelné s detekcí kaspázové aktivity a DNA zlomů pomocí TUNEL. V porovnání s široce využívanou metodou TUNEL má nově vyvinutá H33258 metoda řadu výhod (např. rychlost, kvantifikace, nízká cena). Další velkou výhodou je možnost analyzovat velké množství vzorků najednou. Domníváme se tedy, že spektrofluorimetrická H33258 metoda by se mohla stát stanovením rutinně využívaným k detekci apoptózy.

8. Seznam literatury

1. Abou-Ghali, M., and Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci.* **2015** (22), 760-772.
2. Aden, D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., and Knowles B.B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature.* **1979** (282), 615-616.
3. Al-Katib, A.M., Ebrahim A.S., Kandouz M., Zaiem F., Raufi A., Ebrahim S., Mohamed A., Emara N., and Gabali A.M. Isolation and characterization of a CD34(+) sub-clone in B-cell lymphoma. *Oncotarget.* **2020** (11), 148-160.
4. Ansari, B., Coates P.J., Greenstein B.D., and Hall P.A. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol.* **1993** (170), 1-8.
5. Archana, M., Yogesh T.L., and Kumaraswamy K.L. Various methods available for detection of apoptotic cells--a review. *Indian J Cancer.* **2013** (50), 274-283.
6. Atale, N., Gupta S., Yadav U.C., and Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *J Microsc.* **2014** (255), 7-19.
7. Barani, M., Mirzaei M., Torkzadeh-Mahani M., and Adeli-sardou M. Evaluation of Carum-loaded Niosomes on Breast Cancer Cells: Physicochemical Properties, In Vitro Cytotoxicity, Flow Cytometric, DNA Fragmentation and Cell Migration Assay. *Sci Rep-Uk.* **2019** (9).
8. Baskic, D., Popovic S., Ristic P., and Arsenijevic N.N. Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int.* **2006** (30), 924-932.
9. Beaton-Green, L.A., and Wilkins R.C. Quantitation of Chromosome Damage by Imaging Flow Cytometry. *Methods Mol Biol.* **2016** (1389), 97-110.
10. Belacel-Ouari, M., Zhang L., Hubert F., Assaly R., Gerbier R., Jockers R., Dauphin F., Lechene P., Fischmeister R., Manoury B., and Leblais V. Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* **2017** (35), 118-128.
11. Biedler, J.L., Rofflertarlov S., Schachner M., and Freedman L.S. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* **1978** (38), 3751-3757.
12. Bogush, T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K., Kaliuzhny S.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Y., Davydov M.M., and Kosorukov V.S. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques.* **2020**.
13. Brozovic, A., Fritz G., Christmann M., Zisowsky J., Jaehde U., Osmak M., and Kaina B. Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and Fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance. *Int J Cancer.* **2004** (112), 974-985.
14. Bucevicius, J., Lukinavicius G., and Gerasimaite R. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and Beyond. *Chemosensors.* **2018** (6).
15. Buck, S.B., Bradford J., Gee K.R., Agnew B.J., Clarke S.T., and Salic A. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques.* **2008** (44), 927-929.

16. Burattini, S., and Falcieri E. Analysis of cell death by electron microscopy. *Methods Mol Biol.* **2013** (1004), 77-89.
17. Buzadžić, B., Korać A., Petrović V., and Korać B. Glutathion content, rate of apoptosis, and brown adipose tissue mass in rats exposed to different ambient temperatures. *Journal of Thermal Biology.* **2004** (29), 503-507.
18. Campos, C.B., Paim B.A., Cosso R.G., Castilho R.F., Rottenberg H., and Vercesi A.E. Method for monitoring of mitochondrial cytochrome c release during cell death: Immunodetection of cytochrome c by flow cytometry after selective permeabilization of the plasma membrane. *Cytometry A.* **2006** (69), 515-523.
19. Cao, M.R., Li Q., Liu Z.L., Liu H.H., Wang W., Liao X.L., Pan Y.L., and Jiang J.W. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2011** (10), 599-604.
20. Capek, J., Hauschke M., Bruckova L., and Rousar T. Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* **2017** (88), 40-45.
21. Carlson, C.R., Grallert B., Bernander R., Stokke T., and Boye E. Measurement of nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry. *Yeast.* **1997** (13), 1329-1335.
22. Circu, M.L., and Aw T.Y. Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res.* **2008** (42), 689-706.
23. Corliss, D.A., and White W.E. Fluorescence of Yeast Vially Stained with Ethidium-Bromide and Propidium Iodide. *J Histochem Cytochem.* **1981** (29), 45-48.
24. Crowley, L.C., Marfell B.J., and Waterhouse N.J. Detection of DNA Fragmentation in Apoptotic Cells by TUNEL. *Cold Spring Harbor protocols.* **2016** (2016).
25. Czabotar, P.E., Lessene G., Strasser A., and Adams J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2014** (15), 49-63.
26. Darzynkiewicz, Z., Pozarowski P., Lee B.W., and Johnson G.L. Fluorochrome-labeled inhibitors of caspases: convenient in vitro and in vivo markers of apoptotic cells for cytometric analysis. *Methods Mol Biol.* **2011** (682), 103-114.
27. Deng, X.K., Yin W., Li W.D., Yin F.Z., Lu X.Y., Zhang X.C., Hua Z.C., and Cai B.C. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism. *J Ethnopharmacol.* **2006** (106), 179-186.
28. Deshmukh, M., and Johnson E.M. Staurosporine-induced neuronal death: multiple mechanisms and methodological implications. *Cell Death Differ.* **2000** (7), 250-261.
29. Ding, Y.M., Wang B., Chen X.Y., Zhou Y., and Ge J.H. Staurosporine suppresses survival of HepG2 cancer cells through Omi/HtrA2-mediated inhibition of PI3K/Akt signaling pathway. *Tumor Biol.* **2017** (39).
30. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* **2007** (35), 495-516.
31. Elmore, S.A., Dixon D., Hailey J.R., Harada T., Herbert R.A., Maronpot R.R., Nolte T., Rehg J.E., Rittinghausen S., Rosol T.J., Satoh H., Vidal J.D., Willard-Mack C.L., and Creasy D.M. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol Pathol.* **2016** (44), 173-188.

32. Fakai, M.I., Abd Malek S.N., and Karsani S.A. Induction of apoptosis by chalepin through phosphatidylserine externalisations and DNA fragmentation in breast cancer cells (MCF7). *Life Sci.* **2019** (220), 186-193.
33. Fu, D.D., Senouthai S., Wang J.J., and You Y.W. FKN Facilitates HK-2 Cell EMT and Tubulointerstitial Lesions via the Wnt/beta-Catenin Pathway in a Murine Model of Lupus Nephritis. *Front Immunol.* **2019** (10).
34. Galluzzi, L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K.M., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., Garcia-Saez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jaattela M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., Lopez-Otin C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018** (25), 486-541.
35. Garcia, C.P., Videla Richardson G.A., Romorini L., Miriuka S.G., Sevlever G.E., and Scassa M.E. Topoisomerase I inhibitor, camptothecin, induces apoptogenic signaling in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **2014** (12), 400-414.
36. Giard, D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., and Parks W.P. In-Vitro Cultivation of Human Tumors - Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer I.* **1973** (51), 1417-1423.
37. Gilliams-Francis, K.L., Quaye A.A., and Naegele J.R. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp Neurol.* **2003** (184), 359-372.
38. Gong, J., Traganos F., and Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem.* **1994** (218), 314-319.
39. Gorman, A.M., Hirt U.A., Orrenius S., and Ceccatelli S. Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. *Neuroscience.* **2000** (96), 417-425.
40. Gotzmann, J., Meissner M., and Gerner C. The fate of the nuclear matrix-associated-region-binding protein SATB1 during apoptosis. *Cell Death Differ.* **2000** (7), 425-438.
41. Grynberg, K., Ma F.Y., and Nikolic-Paterson D.J. The JNK Signaling Pathway in Renal Fibrosis. *Front Physiol.* **2017** (8).
42. Hadi, L.M., Yaghini E., Stamati K., Loizidou M., and MacRobert A.J. Therapeutic enhancement of a cytotoxic agent using photochemical internalisation in 3D compressed collagen constructs of ovarian cancer. *Acta Biomater.* **2018** (81), 80-92.

43. Hammond, C.L., Madejczyk M.S., and Ballatori N. Activation of plasma membrane reduced glutathione transport in death receptor apoptosis of HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2004** (195), 12-22.
44. Handl, J., Capek J., Majtnerova P., Bacova J., and Rousar T. The Effect of Repeated Passaging on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds. *Physiol Res.* **2020** (69), 731-738.
45. Handl, J., Capek J., Majtnerova P., Petira F., Hauschke M., Rousarova E., and Rousar T. Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiol Res.* **2019** (68), 481-490.
46. Hayakawa, J., Depatie C., Ohmichi M., and Mercola D. The activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) by DNA-damaging agents serves to promote drug resistance via activating transcription factor 2 (ATF2)-dependent enhanced DNA repair. *J Biol Chem.* **2003** (278), 20582-20592.
47. Henry, C.M., Hollville E., and Martin S.J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods.* **2013** (61), 90-97.
48. Herrmann, M., Lorenz H.M., Voll R., Grunke M., Woith W., and Kalden J.R. A Rapid and Simple Method for the Isolation of Apoptotic DNA Fragments. *Nucleic Acids Res.* **1994** (22), 5506-5507.
49. Hou, L., Liu K., Li Y.H., Ma S., Ji X.M., and Liu L. Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *J Cell Sci.* **2016** (129), 3084-3090.
50. Huang, J.X., Kaeslin G., Ranall M.V., Blaskovich M.A., Becker B., Butler M.S., Little M.H., Lash L.H., and Cooper M.A. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect.* **2015** (3), e00148.
51. Huerta, S., Goulet E.J., Huerta-Yepez S., and Livingston E.H. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res.* **2007** (139), 143-156.
52. Chaitanya, G.V., Steven A.J., and Babu P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* **2010** (8).
53. Chamchoy, K., Pakotiprapha D., Pumirat P., Leartsakulpanich U., and Boonyuen U. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *Bmc Biochem.* **2019** (20).
54. Chandrasekaran, K., Swaminathan K., Chatterjee S., and Dey A. Apoptosis in HepG2 cells exposed to high glucose. *Toxicol In Vitro.* **2010** (24), 387-396.
55. Chaudhuri, A.R., and Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio.* **2017** (18), 610-621.
56. Chazotte, B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor protocols.* **2011** (2011), pdb prot5557.
57. Chazotte, B. Labeling nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harb Protoc.* **2014**.
58. Chehrehasa, F., Meedeniya A.C., Dwyer P., Abrahamsen G., and Mackay-Sim A. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods.* **2009** (177), 122-130.
59. Chen, G., Hu X., Zhang W., Xu N., Wang F.Q., Jia J., Zhang W.F., Sun Z.J., and Zhao Y.F. Mammalian target of rapamycin regulates isoliquirigenin-induced autophagic and apoptotic cell death in adenoid cystic carcinoma cells. *Apoptosis.* **2012** (17), 90-101.

60. Chen, X.L., Wei W., Li Y.Z., Huang J.B., and Ci X.X. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Chem Biol Interact.* **2019a** (308), 269-278.
61. Chen, Y.J., Kong L., Tung Z.Z., Zhang Y.M., Liu Y., Wang T.Y., and Liu Y.W. Hesperetin ameliorates diabetic nephropathy in rats by activating Nrf2/ARE/glyoxalase 1 pathway. *Biomed Pharmacother.* **2019b** (111), 1166-1175.
62. Janson, V., Behnam-Motlagh P., Henriksson R., Horstedt P., Engstrom K.G., and Grankvist K. Phase-contrast microscopy studies of early cisplatin-induced morphological changes of malignant mesothelioma cells and the correspondence to induced apoptosis. *Exp Lung Res.* **2008** (34), 49-67.
63. Ji, Y.B., and Gao S.Y. Arylamine N-acetyltransferases: a new inhibitor of apoptosis in HepG2 cells. *J Zhejiang Univ-Sc B.* **2008** (9), 701-706.
64. Joo, K.M., Kim S., Koo Y.J., Lee M., Lee S.H., Choi D., and Lim K.M. Development and validation of UPLC method for WST-1 cell viability assay and its application to MCTT HCE eye irritation test for colorful substances. *Toxicol In Vitro.* **2019** (60), 412-419.
65. Joselin, A.P., Schulze-Osthoff K., and Schwerk C. Loss of acinus inhibits oligonucleosomal DNA fragmentation but not chromatin condensation during apoptosis. *J Biol Chem.* **2006** (281), 12475-12484.
66. Ju, S.M., Jo Y.S., Jeon Y.M., Pae H.O., Kang D.G., Le H.S., Bae J.S., and Jeon B.H. Phosphorylation of eIF2 alpha suppresses cisplatin-induced p53 activation and apoptosis by attenuating oxidative stress via ATF4-mediated HO-1 expression in human renal proximal tubular cells. *Int J Mol Med.* **2017** (40), 1957-1964.
67. Kano, M., Takemura G., Misao J., Hayakawa Y., Aoyama T., Nishigaki K., Noda T., Fujiwara T., Fukuda K., Minatoguchi S., and Fujiwara H. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation.* **1999** (99), 2757-2764.
68. Kapoor, R., Rizvi F., and Kakkar P. Naringenin prevents high glucose-induced mitochondria-mediated apoptosis involving AIF, Endo-G and caspases. *Apoptosis.* **2013** (18), 9-27.
69. Karch, J., Kwong J.Q., Burr A.R., Sargent M.A., Elrod J.W., Peixoto P.M., Martinez-Caballero S., Osinska H., Cheng E.H.Y., Robbins J., Kinnally K.W., and Molkenstein J.D. Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *Elife.* **2013** (2).
70. Kaufmann, S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., and Poirier G.G. Specific Proteolytic Cleavage of Poly(Adp-Ribose) Polymerase - an Early Marker of Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* **1993** (53), 3976-3985.
71. Kaya-Aksoy, E., Cingoz A., Senbabaoglu F., Seker F., Sur-Erdem I., Kayabolen A., Lokumcu T., Sahin G.N., Karahuseyinoglu S., and Bagci-Onder T. The pro-apoptotic Bcl-2 family member Harakiri (HRK) induces cell death in glioblastoma multiforme. *Cell Death Discov.* **2019** (5), 64.
72. Kerr, J.F.R., Wyllie A.H., and Currie A.R. Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Brit J Cancer.* **1972** (26), 239-+.

73. Ki, S.H., Park J.K., Sung C., Lee C.B., Uhm H., Choi E.H., and Baik K.Y. Artificial vesicles as an animal cell model for the study of biological application of non-thermal plasma. *J Phys D Appl Phys.* **2016** (49).
74. Kijima, M., Yamagishi H., Hara Y., Kasai M., Takami Y., Takemura H., Miyanari Y., Shinkai Y., and Mizuta R. Histone H1 quantity determines the efficiency of chromatin condensation in both apoptotic and live cells. *Biochem Bioph Res Co.* **2019** (512), 202-207.
75. Kim, K., Shin E.A., Jung J.H., Park J.E., Kim D.S., Shim B.S., and Kim S.H. Ursolic Acid Induces Apoptosis in Colorectal Cancer Cells Partially via Upregulation of MicroRNA-4500 and Inhibition of JAK2/STAT3 Phosphorylation. *Int J Mol Sci.* **2018** (20).
76. Kim, S.D., Moon C.K., Eun S.Y., Ryu P.D., and Jo S.A. Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Bioph Res Co.* **2005** (328), 326-334.
77. Kyrylkova, K., Kyryachenko S., Leid M., and Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* **2012a** (887), 41-47.
78. Kyrylkova, K., Kyryachenko S., Leid M., and Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol.* **2012b** (887), 41-47.
79. Lau, A.H. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int.* **1999** (56), 1295-1298.
80. Lavrik, I.N., Golks A., and Krammer P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest.* **2005** (115), 2665-2672.
81. Lee, D., Lee S.R., Kang K.S., and Kim K.H. Benzyl salicylate from the stems and stem barks of *Cornus walteri* as a nephroprotective agent against cisplatin-induced apoptotic cell death in LLC-PK1 cells. *RSC Advances.* **2020** (10), 5777-5784.
82. Lei, K., and Davis R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *P Natl Acad Sci USA.* **2003** (100), 2432-2437.
83. Lin, J.F., Lin Y.C., Tsai T.F., Chen H.E., Chou K.Y., and Hwang T.I. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther.* **2017** (11), 1517-1533.
84. Loreto, C., La Rocca G., Anzalone R., Caltabiano R., Vespasiani G., Castorina S., Ralph D.J., Cellek S., Musumeci G., Giunta S., DjinoVIC R., Basic D., and Sansalone S. The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *Biomed Res Int.* **2014a** (2014), 616149.
85. Loreto, C., La Rocca G., Anzalone R., Caltabiano R., Vespasiani G., Castorina S., Ralph D.J., Cellek S., Musumeci G., Giunta S., DjinoVIC R., Basic D., and Sansalone S. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease. *Biomed Res Int.* **2014b** (2014).
86. Lutter, A.H., Scholka J., Richter H., and Anderer U. Applying XTT, WST-1, and WST-8 to human chondrocytes: A comparison of membrane-impermeable tetrazolium salts in 2D and 3D cultures. *Clin Hemorheol Micro.* **2017** (67), 327-342.
87. Machado, M.D., and Soares E.V. Assessment of cellular reduced glutathione content in *Pseudokirchneriella subcapitata* using monochlorobimane. *Journal of Applied Phycology.* **2012** (24), 1509-1516.
88. Majtnerova, P., and Rousar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep.* **2018** (45), 1469-1478.

89. Majtnerová, P., and Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*. **2018** (45), 1469-1478.
90. Malatesta, M., Giagnacovo M., Costanzo M., Conti B., Genta I., Dorati R., Galimberti V., Biggiogera M., and Zancanaro C. Diaminobenzidine photoconversion is a suitable tool for tracking the intracellular location of fluorescently labelled nanoparticles at transmission electron microscopy. *Eur J Histochem*. **2012** (56), 123-128.
91. Mastaloudis, A., Yu T.W., O'Donnell R.P., Frei B., Dashwood R.H., and Traber M.G. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med*. **2004** (36), 966-975.
92. Mattson, M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Bio*. **2000** (1), 120-129.
93. McIlwain, D.R., Berger T., and Mak T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Csh Perspect Biol*. **2013** (5).
94. McKinnon, K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. **2018** (120), 5 1 1-5 1 11.
95. Merad-Boudia, M., Nicole A., Santiard-Baron D., Saille C., and Ceballos-Picot I. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: Relevance to Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. **1998** (56), 645-655.
96. Musumeci, G., Loreto C., Carnazza M.L., and Martinez G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg Sport Tr A*. **2011** (19), 307-313.
97. Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin J., and Breard J. Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. **2008** (76), 11-18.
98. Nogueira, E., Cruz C.F., Loureiro A., Nogueira P., Freitas J., Moreira A., Carmo A.M., Gomes A.C., Preto A., and Cavaco-Paulo A. Assessment of liposome disruption to quantify drug delivery in vitro. *Biochim Biophys Acta*. **2016** (1858), 163-167.
99. O'Brien, J., Wilson I., Orton T., and Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. **2000** (267), 5421-5426.
100. Olive, P.L., Frazer G., and Banath J.P. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res*. **1993** (136), 130-136.
101. Pariente, R., Pariente J.A., Rodriguez A.B., and Espino J. Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *J Pineal Res*. **2016** (60), 55-64.
102. Park, J., Sutradhar B.C., Hong G., Choi S.H., and Kim G. Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Vet Anaesth Analg*. **2011** (38), 127-133.
103. Park, M.S., De Leon M., and Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*. **2002** (13), 858-865.
104. Petkovic, J., Zegura B., Stevanovic M., Drnovsek N., Uskokovic D., Novak S., and Filipic M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*. **2011** (5), 341-353.

105. Plesca, D., Mazumder S., and Almasan A. Chapter 6 DNA Damage Response and Apoptosis. **2008** (446), 107-122.
106. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. **2006** (6), 789-802.
107. Pulkkanen, K.J., Laukkanen M.O., Naarala J., and Yla-Herttuala S. False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis*. **2000** (5), 329-333.
108. Qin, G.Q., Zhao C.B., Zhang L.L., Liu H.Y., Quan Y.Y., Chai L.Y., Wu S.N., Wang X.P., and Chen T.S. Dihydroartemisinin induces apoptosis preferentially via a Bim-mediated intrinsic pathway in hepatocarcinoma cells. *Apoptosis*. **2015** (20), 1072-1086.
109. Ramer, R., Schmied T., Wagner C., Haustein M., and Hinz B. The antiangiogenic action of cisplatin on endothelial cells is mediated through the release of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 from lung cancer cells. *Oncotarget*. **2018** (9), 34038-34055.
110. Rath, G., Schneider C., Langlois B., Sartelet H., Morjani H., Btaouri H.E.L., Dedieu S., and Martiny L. De novo ceramide synthesis is responsible for the anti-tumor properties of camptothecin and doxorubicin in follicular thyroid carcinoma. *Int J Biochem Cell B*. **2009** (41), 1165-1172.
111. Rathinam, R., Ghosh S., Neumann W.L., and Jamesdaniel S. Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4. *Cell Death Discov*. **2015** (1).
112. Reid, T.M., Wilson K., Kraemer C., and Baird M. Use of short tandem repeat profiling for authentication of human cell lines. *Cancer Res*. **2012** (72).
113. Rousset, N., Kerninon E., Eleouet S., Le Neel T., Auget J.L., Vonarx V., Carre J., Lajat Y., and Patrice T. Use of alkaline Comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT. *J Photoch Photobio B*. **2000** (56), 118-131.
114. Ruvolo, P.P., Deng X., and May W.S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia*. **2001** (15), 515-522.
115. Ryan, M.J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S.M., Zager R.A., and Torokstorb B. Hk-2 - an immortalized Proximal Tubule Epithelial-Cell Line from Normal Adult Human Kidney. *Kidney Int*. **1994** (45), 48-57.
116. Saadat, Y.R., Saeidi N., Vahed S.Z., Barzegari A., and Barar J. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts*. **2015** (5), 25-28.
117. Sahara, S., Aoto M., Eguchi Y., Imamoto N., Yoneda Y., and Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. **1999** (401), 168-173.
118. Samarghandian, S., and Shabestari M.M. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranin in human prostate cancer cell line. *Indian J Urol*. **2013** (29), 177-183.
119. Sarro, E., Duran M., Rico A., Bou-Teen D., Fernandez-Majada V., Croatt A.J., Nath K.A., Salcedo M.T., Gundelach J.H., Batlle D., Bram R.J., and Meseguer A. Cyclophilins A and B oppositely regulate renal tubular epithelial cell phenotype. *J Mol Cell Biol*. **2020** (12), 499-514.
120. Satoh, M., Kashihara N., Fujimoto S., Horike H., Tokura T., Namikoshi T., Sasaki T., and Makino H. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. **2003** (305), 1183-1190.

121. Shi, M., Cai Q., Yao L., Mao Y., Ming Y., and Ouyang G. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. *Cell Biol Int.* **2006** (30), 221-226.
122. Schmid, I., Uittenbogaart C., and Jamieson B.D. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc.* **2007** (2), 187-190.
123. Schweyer, S., Soruri A., Meschter O., Heintze A., Zschunke F., Miosge N., Thelen P., Schlott T., Radzun H.J., and Fayyazi A. Cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Brit J Cancer.* **2004** (91), 589-598.
124. Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R., and Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* **1988** (175), 184-191.
125. Sivandzade, F., Bhalerao A., and Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *Bio-Protocol.* **2019** (9).
126. Skalka, M., Matyasova J., and Cejkova M. DNA in Chromatin of Irradiated Lymphoid-Tissues Degrades In vivo into Regular Fragments. *Febs Lett.* **1976** (72), 271-274.
127. Soares, J., Costa V.M., Gaspar H., Santos S., Bastos M.D., Carvalho F., and Capela J.P. Structure-cytotoxicity relationship profile of 13 synthetic cathinones in differentiated human SH-SY5Y neuronal cells. *Neurotoxicology.* **2019** (75), 158-173.
128. Stokke, T., and Steen H.B. Fluorescence-Spectra of Hoechst-33258 Bound to Chromatin. *Biochim Biophys Acta.* **1986** (868), 17-23.
129. Su, Z.Y., Yang Z.Z., Xu Y.Q., Chen Y.B., and Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer.* **2015** (14).
130. Suman, S., Pandey A., and Chandna S. An improved non-enzymatic "DNA ladder assay" for more sensitive and early detection of apoptosis. *Cytotechnology.* **2012** (64), 9-14.
131. Sun, Y.Q., Dai C.M., Zheng Y., Shi S.D., Hu H.Y., and Chen D.W. Binding effect of fluorescence labeled glycyrrhetic acid with GA receptors in hepatocellular carcinoma cells. *Life sciences.* **2017** (188), 186-191.
132. Sung, Y.K., Hwang S.Y., Farooq M., Kim J.C., and Kim M.K. Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling. *Exp Mol Med.* **2003** (35), 257-262.
133. Szuster-Ciesielska, A., and Kandefer-Szerszen M. Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacol Rep.* **2005** (57), 588-595.
134. Takada, S., Watanabe T., and Mizuta R. DNase gamma-dependent DNA fragmentation causes karyolysis in necrotic hepatocyte. *J Vet Med Sci.* **2020** (82), 23-26.
135. Takaki, K., Higuchi Y., Hashii M., Ogino C., and Shimizu N. Induction of apoptosis associated with chromosomal DNA fragmentation and caspase-3 activation in leukemia L1210 cells by TiO₂ nanoparticles. *J Biosci Bioeng.* **2014** (117), 129-133.
136. Tang, L., Su J., and Liang P. Modeling cadmium-induced endothelial toxicity using human pluripotent stem cell-derived endothelial cells. *Sci Rep-Uk.* **2017** (7), 14811.

137. Tanida, S., Mizoshita T., Ozeki K., Tsukamoto H., Kamiya T., Kataoka H., Sakamuro D., and Joh T. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int J Surg Oncol.* **2012** (2012), 862879.
138. Tassell, W., Slater M., Barden J.A., and Murphy C.R. Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. *Histochem J.* **2000** (32), 373-379.
139. Thongkam, W., Gerloff K., van Berlo D., Albrecht C., and Schins R.P.F. Oxidant generation, DNA damage and cytotoxicity by a panel of engineered nanomaterials in three different human epithelial cell lines. *Mutagenesis.* **2017** (32), 105-115.
140. Tian, L., Feng H., Dai Z., and Zhang R. Resorufin-based responsive probes for fluorescence and colorimetric analysis. *J Mater Chem B.* **2021** (9), 53-79.
141. Tone, S., Sugimoto K., Tanda K., Suda T., Uehira K., Kanouchi H., Samejima K., Minatogawa Y., and Earnshaw W.C. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp Cell Res.* **2007** (313), 3635-3644.
142. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells.* **1998** (3), 697-707.
143. Wang, F., Wendling K.S., Soprano K.J., and Soprano D.R. The SAP motif and C-terminal RS- and RD/E-rich region influences the sub-nuclear localization of Acinus isoforms. *J Cell Biochem.* **2014** (115), 2165-2174.
144. Wang, J., Wu W.Y., Huang H., Li W.Z., Chen H.Q., and Yin Y.Y. Biochanin A Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Damage of Dopaminergic Neurons Both In Vivo and In Vitro via Inhibition of Microglial Activation. *Neurotox Res.* **2016** (30), 486-498.
145. Wang, J.S., and Huang Y.H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol.* **2005** (95), 290-297.
146. Widlak, P., Li P., Wang X., and Garrard W.T. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem.* **2000** (275), 8226-8232.
147. Wlodkowic, D., Skommer J., and Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol.* **2009** (559), 19-32.
148. Wong, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Canc Res.* **2011** (30).
149. Wu, J., Tu D., Yuan L.Y., Yuan H., and Wen L.X. T-2 toxin exposure induces apoptosis in rat ovarian granulosa cells through oxidative stress. *Environ Toxicol Pharmacol.* **2013** (36), 493-500.
150. Wu, Y.H., Hu S.Q., Liu J., Cao H.C., Xu W., Li Y.J., and Li L.J. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice. *Int J Mol Med.* **2014** (33), 1498-1506.
151. Wu, Y.K., Tu Y.K., Yu J., and Cheng N.C. The Influence of Cell Culture Density on the Cytotoxicity of Adipose-Derived Stem Cells Induced by L-Ascorbic Acid-2-Phosphate. *Sci Rep-Uk.* **2020** (10), 104.
152. Wyllie, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* **1980** (284), 555-556.

153. Xue, D.F., Pan S.T., Huang G., and Qiu J.X. ROS enhances the cytotoxicity of cisplatin by inducing apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **2020** (122), 105732.
154. Yang, S.K., Han Y.C., He J.R., Yang M., Zhang W., Zhan M., Li A.M., Li L., Na S., Liu Y.T., Wu X.Q., Zhang Q., Wang J.W., and Zhang H. Mitochondria targeted peptide SS-31 prevent on cisplatin-induced acute kidney injury via regulating mitochondrial ROS-NLRP3 pathway. *Biomed Pharmacother.* **2020** (130), 110521.
155. Yasuda, M., Kishimoto S., Amano M., and Fukushima S. The Involvement of Pregnane X Receptor-regulated Pathways in the Antitumor Activity of Cisplatin. *Anticancer Res.* **2019** (39), 3601-3608.
156. Yin, L.M., Wei Y., Wang Y., Xu Y.D., and Yang Y.Q. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *Int J Med Sci.* **2013** (10), 68-72.
157. Yuan, Y., Zhang J., Wang M.J., Mei B., Guan Y.F., and Liang G.L. Detection of Glutathione in Vitro and in Cells by the Controlled Self-Assembly of Nanorings. *Anal Chem.* **2013** (85), 1280-1284.
158. Zermati, Y., Garrido C., Amsellem S., Fishelson S., Bouscary D., Valensi F., Varet B., Solary E., and Hermine O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* **2001** (193), 247-254.
159. Zhang, L.J., Li Z.Q., Yang Y.P., Li X.W., and Ji J.F. Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis via enhancing p53 protein nuclear export. *Mol Cell Biochem.* **2009** (327), 171-182.
160. Zhang, X.T., Song T.B., Du B.L., Li D.M., and Li X.M. Caspase-3 antisense oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in gamma-irradiated human leukemia HL-60 cells. *Apoptosis.* **2007** (12), 743-751.
161. Zhou, H., Tang J.B., Lv L.L., Sun N., Zhang J., Chen B.C., Mao J., Zhang W.F., Zhang J., and Zhou J. Intracellular endogenous glutathione detection and imaging by a simple and sensitive spectroscopic off-on probe. *Analyst.* **2018** (143), 2390-2396.
162. Zucca, P., Fernandez-Lafuente R., and Sanjust E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules.* **2016** (21).
163. Zurek-Biesiada, D., Waligorski P., and Dobrucki J.W. UV-induced spectral shift and protonation of DNA fluorescent dye Hoechst 33258. *J Fluoresc.* **2014** (24), 1791-1801.

9. Přílohy

9.1 Originální data k výsledkové části práce

Příloha 1A: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HepG2 buňky).

Graf 1A. A) Konfluence; průměr \pm SD (n=5). Inkubace 24 h. Absorbance (440 nm).

Počet buněk ($\times 10^3$)/ jamka	Konfluence (%)
5	24 \pm 2
10	41 \pm 2
15	60 \pm 3
20	67 \pm 4

Příloha 1B: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HepG2 buňky).

Graf 1B. B) WST-1; průměr (n=5). Inkubace 24 h. Absorbance (440 nm).

Počet buněk ($\times 10^3$)/ jamka	Absorbance						
	0	10	20	30	40	50	60
5	0,03	0,15	0,25	0,36	0,46	0,56	0,66
10	0,05	0,27	0,48	0,70	0,93	1,17	1,40
15	0,06	0,43	0,80	1,22	1,66	2,12	2,55
20	0,08	0,54	1,04	1,59	2,18	2,75	3,25

Příloha 2A: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HK-2 buňky).

Graf 2A. A) Konfluence; průměr \pm SD (n=5). Inkubace 24 h. Absorbance (440 nm).

Počet buněk ($\times 10^3$)/ jamka	Konfluence (%)
5	25 \pm 2
10	49 \pm 2
15	67 \pm 5
20	82 \pm 4
25	91 \pm 2

Příloha 2B: Optimalizace denzity buněk pro spektrometrická stanovení (HK-2 buňky). Graf 2B. B) WST-1; průměr (n=5). Inkubace 24 h. Absorbance (440 nm).

Počet buněk (x10 ³)/jamka	Absorbance						
	0	10	20	30	40	50	60
5	0,18	0,22	0,27	0,32	0,38	0,45	0,52
10	0,19	0,25	0,34	0,43	0,54	0,66	0,81
15	0,19	0,27	0,39	0,53	0,68	0,86	1,07
20	0,20	0,31	0,46	0,64	0,84	1,07	1,34
25	0,21	0,33	0,51	0,71	0,94	1,22	1,53

Příloha 3: Optimalizace H33258 metody – výměna média (HepG2 buňky). Graf 3. Cisplatina (CisPt; 0; 100 μM). Inkubace 24 h. Výměna 50-90 μL původního média za DPBS (1x). Konfluence. Průměr ± SD (n=3).

CisPt (μM)	Konfluence (%)				
	50 μL	60 μL	70 μL	80 μL	90 μL
0	61 ± 2	67 ± 1	69 ± 1	65 ± 3	68 ± 6
100	38 ± 8	47 ± 3	48 ± 1	45 ± 0	36 ± 1

Příloha 4: Optimalizace H33258 metody – vliv míchání vzorku (HepG2 buňky). Graf 4. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm). Průměr ± SD (n=4).

CisPt (μM)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)	
	bez míchání	míchání
0	2,60 ± 0,63	3,47 ± 1,38
50	2,75 ± 0,36	3,23 ± 0,19
100	4,47 ± 0,85	3,45 ± 1,33

Příloha 5: : Optimalizace H33258 metody – změna intenzity fluorescence H33258 v čase (HepG2 buňky). Grafy 5 a 6. Cisplatina (CisPt; 0-100 µM). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) po dobu 10 min.

Čas (min)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)		
	0 µM CisPt	50 µM CisPt	100 µM CisPt
0,00	4,76	5,71	5,61
0,51	4,96	6,06	6,13
0,99	4,96	6,06	6,21
1,50	4,99	6,15	6,22
1,97	4,92	6,10	6,23
2,45	5,01	6,09	6,28
3,00	5,01	6,08	6,26
3,55	5,04	6,19	6,28
4,06	5,02	6,14	6,26
4,46	5,05	6,21	6,31
5,01	5,07	6,10	6,26
5,60	5,08	6,11	6,28
6,24	5,07	6,15	6,30
6,47	5,14	6,19	6,30
6,63	5,11	6,17	6,31
6,79	5,10	6,14	6,31
6,99	5,15	6,23	6,30
7,14	5,07	6,21	6,30
7,30	5,17	6,24	6,30
7,50	5,13	6,18	6,30
7,66	5,20	6,20	6,30
7,82	5,20	6,16	6,31
7,97	5,22	6,19	6,29
8,17	5,11	6,22	6,32
8,33	5,13	6,21	6,32
8,49	5,18	6,15	6,32
8,64	5,12	6,20	6,31
8,80	5,22	6,18	6,31
8,96	5,15	6,20	6,33
9,12	5,17	6,19	6,29
9,27	5,18	6,25	6,33
9,43	5,17	6,18	6,33
9,59	5,20	6,22	6,32
9,71	5,17	6,18	6,33
9,87	5,26	6,23	6,30

Příloha 6: Optimalizace koncentrace sondy H33258 (HepG2 buňky). Graf 7. Cisplatina (CisPt 0-100 μM). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

H33258 ($\mu\text{g/mL}$)	Intenzita fluorescence (RFU $\times 10^3$)	
	0 μM CisPt	100 μM CisPt
0,1	0,28 \pm 10	0,79 \pm 0,08
1	0,39 \pm 0,08	1,39 \pm 0,07
2	0,44 \pm 0,07	1,67 \pm 0,06
5	1,05 \pm 0,19	2,79 \pm 0,40

Příloha 7: Testování odezvy H33258 metody (HepG2 buňky). Graf 8. Cisplatina (CisPt 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

CisPt (μM)	Intenzita fluorescence (RFU $\times 10^3$)	
	24 h	48 h
0	0,47 \pm 0,11	0,61 \pm 0,12
0,5	0,29 \pm 0,21	0,58 \pm 0,12
5	0,26 \pm 0,17	0,77 \pm 0,07
25	1,15 \pm 0,09	1,46 \pm 0,06
100	2,65 \pm 0,19	3,42 \pm 0,24

Příloha 8: Testování odezvy H33258 metody (HK-2 buňky). Graf 9. Cisplatina (CisPt 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

CisPt (μM)	Intenzita fluorescence (RFU $\times 10^3$)	
	24 h	48 h
0	0,73 \pm 0,106	1,11 \pm 0,09
0,5	0,53 \pm 0,0,08	0,84 \pm 0,15
5	0,84 \pm 0,07	1,28 \pm 0,09
25	2,22 \pm 0,22	4,43 \pm 0,36
100	4,14 \pm 0,18	5,04 \pm 0,20

Příloha 9: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HepG2 buňky). Graf 10. Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 0-100 μM), kamptotecin (CAM; 0-5 μM), staurosporin (STA; 0-100 nM), nanočástice TiO_2 P25 (NPs; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

Toxin (koncentrace)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)		
	6 h	24 h	48 h
CTRL (0 μM)	0,88 \pm 0,05	0,72 \pm 0,07	0,66 \pm 0,06
CisPt (50 μM)	0,59 \pm 0,04	1,19 \pm 0,18	1,99 \pm 0,09
CisPt (100 μM)	1,15 \pm 0,15	2,68 \pm 0,23	3,94 \pm 0,18
CAM (1 μM)	0,72 \pm 0,07	0,83 \pm 0,21	1,51 \pm 0,13
CAM (5 μM)	1,04 \pm 0,21	1,95 \pm 0,26	3,26 \pm 0,24
STA (10 nM)	0,89 \pm 0,06	1,30 \pm 0,15	0,76 \pm 0,05
STA (100 nM)	0,97 \pm 0,18	1,43 \pm 0,23	2,34 \pm 0,26
NPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,86 \pm 0,11	0,74 \pm 0,14	0,92 \pm 0,07

Příloha 10: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (HK-2 buňky). Graf 11. Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 0-100 μM), kamptotecin (CAM; 0-5 μM), staurosporin (STA; 0-100 nM), nanočástice TiO_2 P25 (NPs; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

Toxin (koncentrace)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)		
	6 h	24 h	48 h
CTRL (0 μM)	0,56 \pm 0,04	0,74 \pm 0,08	1,19 \pm 0,04
CisPt (50 μM)	0,62 \pm 0,04	2,01 \pm 0,06	4,11 \pm 0,07
CisPt (100 μM)	0,57 \pm 0,04	2,19 \pm 0,13	4,54 \pm 0,18
CAM (1 μM)	0,27 \pm 0,07	1,10 \pm 0,06	2,39 \pm 0,06
CAM (5 μM)	0,91 \pm 0,11	1,92 \pm 0,13	4,91 \pm 0,17
STA (10 nM)	0,55 \pm 0,04	0,93 \pm 0,17	3,50 \pm 0,23
STA (100 nM)	0,19 \pm 0,04	1,23 \pm 0,14	3,24 \pm 0,14
NPs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,52 \pm 0,09	0,72 \pm 0,05	1,26 \pm 0,05

Příloha 11A: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (A549 a SH-SY5Y buňky). Graf 12A. A) A549. Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 100 μ M), kamptotecin (CAM; 5 μ M), staurosporin (STA; 100 nM), chlorid kademnatý (CdCl₂; 100 μ M). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

Buňky A549	
Toxin (koncentrace)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)
CTRL (0 μ M)	0,01 \pm 0,10
STA (100 nM)	0,40 \pm 0,02
CdCl ₂ (100 μ M)	0,61 \pm 0,05
CisPt (100 μ M)	1,20 \pm 0,03
CAM (5 μ M)	1,27 \pm 0,07

Příloha 11B: Detekce nukleární kondenzace a fragmentace H33258 metodou (A549 a SH-SY5Y buňky). Graf 12B. B) SH-SY5Y. Kontrolní buňky (CTRL), cisplatina (CisPt; 100 μ M), kamptotecin (CAM; 5 μ M), staurosporin (STA; 100 nM), chlorid kademnatý (CdCl₂; 100 μ M). Inkubace 24 h. Detekce IF (EX/EM = 352/461 nm) v čase 5 min. Průměr \pm SEM (n=4).

Buňky SH-SY5Y	
Toxin (koncentrace)	Intenzita fluorescence (RFUx10 ³)
CTRL (0 μ M)	0,51 \pm 0,15
STA (100 nM)	2,62 \pm 0,23
CdCl ₂ (100 μ M)	1,02 \pm 0,08
CisPt (100 μ M)	2,80 \pm 0,06
CAM (5 μ M)	1,73 \pm 0,20

Příloha 12: Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HepG2 buňky). Graf 13. Cisplatina (CisPt; 0-100 μ M). Inkubace 24 a 48 h. Absorbance (440 nm). Průměr \pm SD (n=4).

CisPt (μ M)	Dehydrogenázová aktivita (% kontrol)	
	24 h	48 h
0	100 \pm 13	100 \pm 5
0,5	103 \pm 10	103 \pm 9
5	87 \pm 10	78 \pm 8
25	52 \pm 2	4 \pm 1
100	22 \pm 2	5 \pm 0

Příloha 13: Dehydrogenázová aktivita buněk – WST-1 test (HK-2 buňky). Graf 14. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Absorbance (440 nm). Průměr \pm SD (n=4).

CisPt (μM)	Dehydrogenázová aktivita (% kontrol)	
	24 h	48 h
0	100 \pm 9	100 \pm 3
0,5	77 \pm 3	90 \pm 6
5	64 \pm 12	80 \pm 4
25	35 \pm 0	12 \pm 4
100	35 \pm 0	0 \pm 1

Příloha 14: Stanovení koncentrace glutathionu (HepG2 buňky). Graf 15. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n=4).

CisPt (μM)	Koncentrace glutathionu (% kontrol)	
	24 h	48 h
0	100 \pm 10	100 \pm 4
0,5	100 \pm 3	102 \pm 4
5	84 \pm 2	54 \pm 2
25	74 \pm 1	11 \pm 1
100	24 \pm 5	9 \pm 0

Příloha 15: Stanovení koncentrace glutathionu (HK-2 buňky). Graf 16. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM = 394/490 nm). Průměr \pm SD (n=4).

CisPt (μM)	Koncentrace glutathionu (% kontrol)	
	24 h	48 h
0	100 \pm 9	100 \pm 3
0,5	107 \pm 9	102 \pm 5
5	108 \pm 3	109 \pm 3
25	97 \pm 3	25 \pm 3
100	37 \pm 5	1 \pm 4

Příloha 16: Aktivita kaspáz (HepG2 buňky). Graf 17. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM=485/535). Průměr \pm SD (n=2).

CisPt (μM)	Aktivita kaspáz 3/7 (% kontrol)		
	6 h	24 h	48 h
0	100 \pm 32	100 \pm 13	100 \pm 25
50	187 \pm 44	4083 \pm 249	2376 \pm 14
100	559 \pm 8	3786 \pm 117	1756 \pm 23

Příloha 17: Aktivita kaspáz (HK-2 buňky). Graf 18. Cisplatina (CisPt; 0-100 μM). Inkubace 6, 24 a 48 h. Detekce IF (EX/EM=485/535 nm). Průměr \pm SD (n=2).

CisPt (μM)	Aktivita kaspáz 3/7 (% kontrol)		
	6 h	24 h	48 h3
0	100 \pm 11	100 \pm 3	100 \pm 25
50	130 \pm 9	1016 \pm 107	497 \pm 32
100	431 \pm 26	557 \pm 12	220 \pm 67

9.2 Seznam publikovaných prací

Odborné články tematicky spojené s disertační prací v časopisech s IF

Příloha 18:

Majtnerová P., Čapek J., Petira F., Handl J., Roušar T. Quantitative Spectrofluorometric Assay Detecting Nuclear Condensation and Fragmentation in Intact Cells. *Scientific Reports*, 2021, 11 (11921). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91380-3>. (IF = 3,99)

Příloha 19:

Majtnerová P. a Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>. (IF = 1,889)

Další odborné články v časopisech s IF

Handl J., Čapek J., Majtnerová P., Báčová J., Roušar T. The effect of repeated passaging on the susceptibility of human proximal tubular HK-2 cells to toxic compounds. *Physiological Research*, 2020, 69. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934491>. (IF = 1,701)

Motola M., Čapek, J., Zazpe, R., Báčová, J., Hromádko, L. - Brůčková, L., Ng, S., Handl, J., Spatz, Z., Knotek, P., Baishya, K., Majtnerová, P., Příkryl, J., Sopha, H., Roušar, T., Macák, J. Thin TiO₂ Coatings by ALD Enhance the Cell Growth on TiO₂ Nanotubular and Flat Substrates. *ACS Applied BioMaterials*, 2020, 3 (9), 6447-6456. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00871>. (IF = **bude určeno**)

Handl J., Čapek J., Majtnerová P., Petira F., Hauschke M., Roušarová E., Roušar T. Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiological Research*, 2019; 68:481-490. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934121>. (IF = 1,701)

Práce vznikla za podpory projektu Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a při studiu jejich účinků na živé organismy (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007421).

Příloha 18 (str. 109-121):

Majtnerová P., Čapek J., Petira F., Handl J., Roušar T. Quantitative Spectrofluorometric Assay Detecting Nuclear Condensation and Fragmentation in Intact Cells. *Scientific Reports*, 2021, 11 (11921). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91380-3>. (**IF = 3,99**)