

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Hradci Králové

**INDUKCE APOPTÓZY  
U HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK**

PharmDr. DORIS VOKURKOVÁ

DISERTAČNÍ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ 2007

**Název práce: Indukce apoptózy u hematopoetických buněk**

Autor: PharmDr.Doris Vokurková

Pracoviště autora: Ústav klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Hradec Králové

Školitel: RNDr.Ctirad Andrýs, PhD.

Disertační práce byla vypracována v samostatné vědecké přípravě na Ústavu klinické imunologie a alergologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Hradec Králové a s podporou následujících výzkumných úkolů: GAČR č. 202/01/0016 a 202/04/0598, projektu MSM0021620820 a projektu MO OBUKHK205001.

Datum dokončení: prosinec 2006.

## Poděkování:

Ráda bych poděkovala řadě kolegů a spolupracovníků za pomoc při vzniku této práce. Především prof. J. Vávrové, CSc. za neocenitelnou pomoc v oblasti radiobiologie a mnohé další přínosné rady. Bez její všestranné podpory by tato práce nevznikla. Dále děkuji doc. MUDr. M. Řezáčové, PhD. za zpracovávání naměřených výsledků a skvělou spolupráci. Mé poděkování patří rovněž RNDr. J. Šinkorovi, CSc. za spoustu cenných poznatků při cytometrických analýzách. A v neposlední řadě chci poděkovat ing. A. Nevrtalovi za jeho obětavost a trpělivost při konečném sepisování této práce.

## Obsah:

1. ÚVOD.....	5
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY .....	6
2.1. INDUKCE APOPTÓZY VYVOLANÁ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM .....	8
2.2. FLOW-CYTOMETRICKÁ DETEKCE APOPTÓZY .....	9
2.3. LEUKEMICKÉ LINIE.....	11
2.4. KMENOVÁ BUŇKA KRVETVORBY .....	12
2.5. LYMFOCYTY IZOLOVANÉ Z PERIFERNÍ KRVE.....	13
3. MATERIÁL A METODIKA .....	18
3.1. ZDROJ BUNĚK.....	18
3.1.1. <i>Leukemické linie</i> .....	18
3.1.2. <i>Zdroj lidských progenitorových buněk</i> .....	18
3.1.3. <i>Periferní lymfocyty</i> .....	19
3.2. OZAŘOVÁNÍ .....	19
3.3. METODY NA STANOVENÍ APOPTÓZY .....	20
3.3.1. <i>APO 2.7</i> .....	20
3.3.2. <i>Flow-cytometrické stanovení apoptózy pomocí APOPTESTU</i> .....	20
3.3.3. <i>Flow-cytometrická analýza obsahu DNA a analýza buněčného cyklu</i> .....	20
3.3.4. <i>Čtyřbarevné značení pro průtokovou cytometrii</i> .....	21
3.3.5. <i>Statistické hodnocení výsledků</i> .....	22
4. VÝSLEDKY .....	23
4.1. INDUKCE APOPTÓZY U LEUKEMICKÝCH LINIÍ .....	23
4.2. KMENOVÉ BUŇKY KRVETVORBY.....	31
4.3. INDUKCE APOPTÓZY U LYMFOCYTŮ OZÁŘENÝCH IN VITRO .....	34
4.4. INDUKCE APOPTÓZY U LYMFOCYTŮ PO OZÁŘENÍ IN VIVO .....	46
5. DISKUSE .....	52
6. ZÁVĚR.....	65
7. LITERATURA .....	68
8. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK.....	74

## 1. ÚVOD

---

Krevní buňky pocházejí z malého počtu pluripotentních kmenových buněk přítomných v kostní dřeni. Proces je kontrolován řadou cytokinů, které vazbou na receptory buněk modifikují proliferaci, diferenciaci a dospívání těchto buněk. Mezi tyto cytokiny patří, IL-1, IL-6, IL-11, IL-3, EPO, hematologické růstové faktory (CSF), SCF (známý také jako c kit ligand), Flt3L, TGF- $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , a další jako např. interferony a insulin-like růstové faktory. Ukazuje se, že úloha růstových faktorů v hematopoéze je spojena s regulací přežití jednotlivých buněk.

V současné době je obecně přijímáno (Cowling a Dexter 1994), že hematopoetické buňky podléhají apoptické smrti v důsledku nedostatku růstových faktorů. Ukazuje se, že buněčná smrt je jeden z normálních fyziologických procesů kontrolující homeostázu hematopoetického systému.

Schopnost růstových faktorů potlačit apoptózu není spojena pouze s normálními nebo leukemickými liniemi, ale je to mechanismus působící i na normální populaci časných progenitorů. Vedle nedostatku růstových faktorů je apoptóza vyvolána v mnoha hematopoetických buňkách po expozici vysokými dávkami cytostatických látek, případně ionizujícím zářením. Mnoho protinádorových látek působí přes proces iniciace apoptózy. Proces karcinogenéze pravděpodobně závisí na selektivní kritické charakterizaci procesu apoptózy, která dovolila přežití buněk pozměněných mutagenním poškozením DNA.

Cílem předkládané disertační práce bylo studovat indukci apoptózy vyvolanou ionizujícím zářením jednak u modelových leukemických linií HL-60 (lidská promyelocytární leukémie) a MOLT-4 (lidská T-lymfocytární leukémie), hematopoetických kmenových buněk a dále u lidských lymfocytů izolovaných z periferní krve zdravých dárců ozářených in vitro. Indukce apoptózy, resp. pokles počtu NK buněk v subpopulaci živých (Annexin V negativních) CD3-/CD8+ buňkách, se ukázal jako časný indikátor dávky záření. Práce vznikla na základě řešení grantů GAČR č. 202/01/0016 a 202/04/0598, projektu MSM0021620820 a projektu MO OBUKHK205001.

## 2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

---

Expozice relativně vysokými dávkami záření vedou k radiačnímu poškození, především potlačením funkcí kostní dřeně, imunitního systému, gastrointestinálního traktu a poškození dalších tkání, jako např. plic. V případě radiačních havárií obvykle dochází k nehomogennímu ozáření, nebo částečnému ozáření s extrémní dávkou na kůži.

Diagnóza musí být provedena rychle a léčebná strategie navržena s ohledem na akutní radiační syndrom i prevenci pozdních následků. Z tohoto důvodu je třeba, na základě nejnovějších poznatků buněčné a molekulární biologie, relativně rychle diagnostikovat obdrženou dávku záření, a na jejím základě vybrat vhodnou léčebnou strategii.

Je třeba se poměrně rychle rozhodnout, zda budou k léčbě využity hematopoetické růstové faktory, které jsou známé posledních 15 let, anebo nový pokrok v biologii kmenových buněk krvetvorby (KBK), čímž je expanze kmenových buněk krvetvorby ex vivo a jejich následná transplantace.

Celotělové ozáření osob ionizujícím zářením v dávkách nižších než 10 Gy vede především k poškození kmenových buněk krvetvorby a rozvoji dřeňového syndromu nemoci z ozáření. Podíváme-li se do historie, první radiační nehoda, kde došlo k léčbě ozářených transplantací alogenní kostní dřeně, byla nehoda ve Vinče v Jugoslávii. Při této nehodě bylo během několika minut ozářeno 6 osob v dávkovém rozmezí 207-436 cGy. Profesor Mathé et al. (1959) podal ozářeným na vrcholu úbytku granulocytů v periferní krvi (27. až 36. den po ozáření) kostní dřeň v množství  $10 \times 10^9$  buněk. K jejímu léčebnému efektu je těžké se vyjádřit, protože byla podána poměrně pozdě a dávky záření byly, z dnešního pohledu, nízké.

Druhou velkou radiační nehodou, kde bylo použito transplantace alogenní kostní dřeně, byla havárie Černobylského jaderného reaktoru v roce 1986. Výběr ozářených k transplantaci byl proveden podle následujících kritérií (Baranov et al. 1987): 1/ obdržená dávka celotělového ozáření byla větší než 600 cGy, 2/ nebylo diagnostikováno ireverzibilní toxické poškození jiných orgánů, 3/ byl nalezen alespoň částečně HLA shodný dárce. Pro 13 ozářených

byl nalezen vhodný dárce kostní dřeně (5 - HLA identický, 8 - shoda nejméně v jednom haplotypu). Pouze dva transplantovaní žili déle než 3 roky po nehodě. Pět transplantovaných zemřelo brzy po transplantaci v důsledku rozsáhlých popálenin, tři zemřeli na intersticiální pneumonii, dva na GvHR (reakce štěpu proti hostiteli) a jeden na akutní selhání ledvin a akutní respirační onemocnění (ARDS). U obou dlouhodobě přežívajících štěp kostní dřeně působil jen dočasně, v pozdějším období byly přítomny pouze buňky příjemce. Tento fakt dokládá, že reziduální kmenové buňky krvetvorby nebyly zcela zničeny a v pozdějším období došlo k obnově endogenní hematopoézy. Přestože transplantace nebyla zcela nezbytná, zabránila dlouhému období neutropenie a infekce (Bishop 1997).

Není zcela jasné, proč byla léčba transplantací buněk kostní dřeně (BKD) u ozářených v Černobyli tak málo úspěšná. Pravděpodobně bylo podceněno radiační poškození dalších životně důležitých orgánů. Tuto domněnku podporuje fakt, že smrt byla ve většině případů spojena s akutním radiačním poškozením, pouze u dvou zemřelých byla prokázána GVHR. Dalším problémem je nalezení vhodného dárce. Neshoda v hlavních HLA antigenech přináší velké riziko akutní a chronické GvHR. Nevýhodou byla i relativně dlouhá doba, kdy byla kostní dřeň transplantována (6-16 dní) po ozáření. V případě časnější transplantace by bylo možno zkrátit období absolutní neutropenie a redukovat riziko infekce.

Zatím poslední vážný případ letálně ozářených se stal v roce 1999 v japonské Tokai Muře, kde pracovníci soukromého závodu na zpracování uranu byli ozářeni, když nedodržením pracovního postupu spustili neřízenou řetězovou reakci. Celkem bylo nadlimitními hodnotami ozářeno 19 pracovníků a 5 civilních obyvatel. U tří zaměstnanců byl zaznamenán rozvoj akutní nemoci z ozáření. Jeden pacient ozářený dávkou  $\gamma$ -neutronového záření 3 Gy byl úspěšně vyléčen použitím růstových faktorů. Druhému pacientovi ozářenému dávkou 18 Gy byly podány růstové faktory i krvetvorné progenitory izolované z periferní krve HLA identické sestry a přes dočasnou obnovu krvetvorby zemřel 83. den po ozáření na srdeční selhání. U třetího pacienta ozářeného dávkou 8-10 Gy byla funkce krvetvorby obnovena také aplikací růstových faktorů a alogenní transplantací kmenových buněk přítomných v pupečnickové

krvi. Ukázalo se, že výsledná obnova imunitního systému byla nedostatečná, přestože počty T buněčných subpopulací se zvyšovaly, odpověď na mitogeny a alogenní smíšená leukocytární reakce byla nedostatečná. 120. den po nehodě byla výrazně snížena také endogenní produkce imunoglobulinů. Ozářený zemřel 210. den po ozáření v důsledku infekčních komplikací a následném respiračním selhání (Nagayama et al. 2002).

Z výše uvedeného vyplývá, že významné pokroky v hematologii vedou v současnosti k efektivní léčbě dřeňové formy akutní nemoci z ozáření, leč ozáření dávkami nad 10 Gy umírají buď na následné komplikace, anebo na dosud neléčitelné formy ANO (akutní nemoc z ozáření).

Při řadě radiačních nehod nejsou v důsledku ozáření zničeny všechny kmenové buňky krvetvorby, protože nedošlo k rovnoměrnému ozáření organismu a část kostní dřeně nebyla ozářena tak vysokou dávkou záření, aby byly zničeny všechny kmenové buňky krvetvorby v kostní dřeni. Výsledky radiobiologických experimentů i klinické zkušenosti z několika radiačních nehod ukazují, že terapie pomocí hematopoetických růstových faktorů (HRF) stimuluje kmenové buňky krvetvorby a zkracuje období aplázie. Včasné podání HRF po nehodě je nutné vzhledem ke zkrácení období neutropenie, kdy jsou ozáření velmi citliví k infekčním onemocněním (Thierry et al. 1995). Získané poznatky vedou k předpokladu, že HRF jsou přínosem pro léčbu dřeňového syndromu nemoci z ozáření a nepředstavují pro ozářeného prakticky žádné riziko. Jejich podávání by však mělo být omezeno na ozářené, kdy se na základě diagnostiky předpokládá vývoj středního nebo těžkého poškození kostní dřeně.

## 2.1. INDUKCE APOPTÓZY VYVOLANÁ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

Ionizující záření indukuje apoptózu u buněk hematopoetického systému tzv. **vnitřní** neboli **mitochondriální** cestou, která je indukována extracelulárními podněty způsobujícími především poškození DNA. Ionizující záření poškozuje buňky především přes vznik tzv. dvojíých zlomů DNA (DSB), které reprezentují nejvíce letální formu poškození. Tyto leze vedou ke vzniku řady různých proteinů zahrnujících např. na DNA závislé protein-kinasy, ATM či rad 3-related protein kinasu (ATR). Výsledkem aktivace této dráhy je inhibice



buněčného cyklu v  $G_1$  případně  $G_2$  fázi a reparace poškození nebo indukce apoptózy v případě, že je poškození nereparovatelné.

Po aktivaci ATM kinasy jsou dalšími cíly p53, Mdm2, Chk1, Chk2, Brca1, Nbs1 a cAbl. ATM je odpovědná za rychlou fosforylaci těchto cílů a jejich důsledkem je blok buněk buď v  $G_1$  či  $G_2$  fázi buněčného cyklu (Khanna a Jackson 2001). Zásadními proteiny jsou CHK1 a CHK2 proteinkinasy, jejichž fosforylace ATM kinasou vede k inhibici funkce fosfatů cdc25a a cdc25c odpovědných za průchod přes  $G_1/S$  a  $G_2/M$  klíčové body a za pokračování buněčného dělení. Jednou z nejvíce prozkoumaných cest navazujících na poškození DNA je fosforylace a vzestup proteinu p53, ke které dochází ve vazbě na aktivaci již výše zmíněných kinas (ATM, ATR). Protein p53 působí vlastně jako transkripční faktor, jenž po vazbě na specifické sekvence DNA aktivuje transkripci dalších genů, které zprostředkují účinky proteinu p53 na inhibici buněčného dělení či aktivaci procesu apoptózy. Za potenciální efektorovou molekulu inhibice buněčného cyklu se považuje protein p21<sup>Cip1</sup>, známý též jako WAF 1. WAF 1 je inhibitor cyklin-dependentních kinas, jež fosforylují a tím inaktivují retinoblastoma protein-RB. Funkce RB proteinu potom spočívá v negativní regulaci exprese transkripčního faktoru E2F, jenž je nezbytný pro aktivaci transkripce genů specifických pro S-fázi.

Není-li reparace efektivní, či poškození příliš velké, pak přes fosforylaci proteinu p53 jsou aktivovány pro-apoptičtí členové rodiny Bcl-2 (Bax, Bad, Bim a Bid). Pro a proti apoptičtí členové rodiny Bcl-2 se setkávají na povrchu mitochondrií a regulují uvolnění cytochromu c. Jestliže dojde k převaze proapoptických členů, cytochrom c se uvolní z mitochondrií a vytvoří komplex s Apaf-1 a prokaspázou 9 (apoptosom). Apoptosom aktivuje prokaspázu 3 a aktivní kaspáza 3 je zodpovědná za vlastní apoptický proces (Vávrová et al.2003).

## 2.2. FLOW-CYTOMETRICKÁ DETEKCE APOPTÓZY

Charakteristickým rysem časně fáze apoptózy je zachování funkce plazmatické membrány (zahrnující membránový transport) během iniciální fáze tohoto typu buněčné smrti. Dalším znakem apoptózy je mobilizace intracelulárního kalcia a aktivace transglutaminázy, která reaguje

s cytoplazmatickými proteiny. Dochází ke ztrátě mikrotubulů a ztráta asymetrie fosfolipidů na plazmatické membráně vede k expozici fosfatidylserinu na vnější straně povrchu a dalším změnám na plazmatické membráně, způsobující, že buňky se stávají cílem fagocytózy. Jedním za základních testů pro stanovení časné apoptózy je stanovení Annexinu V, který detekuje již výše zmíněný fosfatidylserin (Koopman et al 1994). V pozdní fázi apoptózy je pak propustná buněčná membrána a jádro buňky se barví propidium jodidem (PI). Pozdně apoptické buňky pak jsou pozitivní jak na Annexin V tak na PI.

Na fosforylaci p53 v jádře navazují změny na mitochondriích, kde dochází při převaze proapoptických členů rodiny bcl-2 k významnému snížení mitochondriálního transmembránového potenciálu. Dochází k uvolnění cytochromu c z mitochondrií a později jsou aktivovány kaspázy, kde především kaspáza 3 štěpí řadu dalších cílů (např. lamin B). K detekci apoptózy lze použít stanovení mitochondriálního membránového antigenu APO 2.7. Metoda po permeabilizaci buněk digitoninem detekuje časnou fázi apoptózy, zatímco v pozdní fázi, kdy je buněčná membrána propustná, je možno použít metodu bez permeabilizace (Mareková et al. 2003).

Apoptózu můžeme charakterizovat jako řadu morfologicky definovaných fází, které zahrnují buněčné sraštění, tvorbu výčnělků na plazmatické membráně (označované jako „blebs“), jadernou fragmentaci, tvorbu apoptických tělísek a následně buněčnou desintegraci. Většina morfologických metod je založena na vizualizaci produktů intranukleosomálního štěpení DNA. Procentuální zastoupení buněk s morfologickými znaky apoptózy je možno počítat na cytopinových preparátech barvených Gimsovým barvivem ( Kravtsov et al.1999).

Výše popsané morfologické změny mohou být srovnávány se změnami rozptylu světelného signálu ve flow cytometru. Analýza rozptylu světla dává informaci o velikosti a struktuře buňky. Zatímco intenzita světelného rozptylu ve „forward“ (FS) předním směru dobře koreluje s velikostí buněk, intenzita světelného rozptylu měřená v pravém úhlu „side“ směru (SS) dobře koreluje s granularitou. Během apoptózy se ukazuje zmenšení rozptylu ve směru FS, které však na rozdíl od nekrózy není paralelně spojeno s poklesem SS (Vávrová et al. 2003).

Jedním z časných dějů při apoptóze je aktivace endonukleáz, které preferenčně štěpí DNA v internukleosomální (spojovací) sekci. Toto štěpení vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství DNA v buňce a z tohoto důvodu vznik tzv. "sub-G<sub>1</sub> píku", který tvoří apoptické buňky (Mareková et al. 2000).

### 2.3. LEUKEMICKÉ LINIE

Apoptóza je také zásadním mechanismem pro funkci imunitního systému. V případě, že thymocyty poznají poškozené nebo infikované buňky, zabíjí tyto buňky sekrecí proteinů, které iniciují u těchto buněk apoptickou kaskádu. Cytotoxické T-lymfocyty mají na svém povrchu CD95L a mohou takto aktivovat vlastní destrukční program přes CD95 receptory (vnější cesta indukce apoptózy). T lymfocyty exprimují CD95R i CD95L, a tak mohou "spáchat sebevraždu" nebo zabít jiný T-lymfocyt. Thymocyty patří k buňkám citlivým k indukci apoptózy ionizujícím zářením či chemoterapií. Abychom mohli studovat indukci apoptózy po účinku ionizujícího záření na hematopoetických buňkách, pracovali jsme s modelovými leukemickými liniemi. Ukazuje se, že pro indukci apoptózy je významná přítomnost wild typu proteinu p53. Takovéto buňky jsou velmi citlivé k účinku ionizujícího záření. Jedním z modelů používaným v naší práci, byly buňky MOLT-4 lidské T lymfocytární leukémie, které jsou velmi citlivé k účinkům ionizujícího záření podobně jako buňky HSB-2 pre T lymfomové linie a ve vlastní práci jsme prokázali, že mají wild typ proteinu p53 (Szkanderová et al. 2003). Některé další T lymfomové linie CEM a JURKAT jsou podstatně radiorezistentnější, apoptóza je patrná až po blok v G<sub>2</sub> fázi a tyto buňky buď nemají nebo mají mutován protein p53 (Aldridge a Radford 1998, Syljuasen a McBride 1999).

Druhou modelovou linií, kterou jsme ve svých experimentech použili, je linie HL-60. Buňkám HL-60 lidské promyelocytární leukémie TP-53 schází. Mají normální či mírně zvýšenou expresi Bcl-2 a minimální expresi Bcl-XL (Terui et al. 1998). Apoptóza je po dávkách do 10 Gy pozorována, podobně jako u T-lymfomových linií bez TP53 či s jeho mutovanou formou, až po blok v G<sub>2</sub> fázi. Z našich (Vávrová et al. 2001, 2002) i jiných (Ning and Knox 1999, Aldridge and

Radford 1998) experimentů je zřejmé, že u buněk HL-60 dávky do 10 Gy vedou 16-24 hodin po ozáření k bloku v G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu. V této době se buňky nedělí a je jim poskytnut čas pro reparaci poškození. V případě, že je poškození irreparabilní, je iniciována apoptóza. Práce na buněčných liniích ukazují, že celkový čas, který mají buňky k dispozici při reparaci poškození DNA před potenciálním vstupem do apoptózy, je kritickým determinantem radiosenzitivity těchto buněk. Zatímco rychle se dělící radiosenzitivní linie HSB-2 může vstoupit do apoptózy z různých bodů buněčného cyklu, méně radiosenzitivní linie vykazují různě dlouhý blok v některé z fází buněčného cyklu a k iniciaci apoptózy dochází až po akumulaci buněk v této fázi. Například buňky HL-60 mají velmi dlouhý blok v G<sub>2</sub> fázi, což dobře koreluje s jejich relativní radiorezistencí. Buňky bez funkčního TP53 genu jsou po poškození DNA přednostně uvězněny v G<sub>2</sub> fázi.

## 2.4. KMENOVÁ BUŇKA KRVETVORBY

Kmenové a progenitorové buňky odpovědné za obnovu krvetvorby exprimují CD34 antigen, 115-kD glycoprotein. Tento antigen je exprimován u člověka na povrchu 1% až 3% buněk kostní dřeně a přibližně na 0,5% buněk izolovaných z periferní krve po mobilizaci. Plně diferencované hematopoetické buňky jsou CD34<sup>-</sup>. Buňky popisované jako CFU-Mix, CFU-blast, morfologicky podobné lymfocytům exprimují vysoké množství CD34 antigenu (Krause et al. 1996, Sutherland et al. 1989, Terstappen et al. 1991).

Pro pluripotentní krvetvornou buňku byl některými autory vymezen panel znaků CD34<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>, Thy-1<sup>+</sup> (Baum 92, Crain 93, Udomsadi 92). Pro takovou subpopulaci buněk je charakteristická přítomnost v kostní dřeni, především v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu, dále pak nízká exprese amfotropních receptorů, možnost citlivě reagovat na cytokiny, eventuálně dalšími charakteristiky. Landsdorp a spol. v roce 1992 prokázali, že velmi nezralé prekurzory krvetvorby vycházejí z frakce CD34<sup>+</sup>/CD45RA<sup>low</sup>/CD71<sup>low</sup>/Thy-1<sup>+</sup>.

CD133 antigen je glycoprotein s molekulovou vahou 120 kD. Antigen je selektivně exprimován na části CD34<sup>+</sup> hematopoetických kmenových buňkách získaných z lidských fetálních jater, kostní dřeně a periferní krve a byl poprvé popsán v roce 1997 (Yin et al. 1997). Všechny nezadané CD34<sup>+</sup> buňky, a

většina CD34<sup>+</sup> buněk zadaných granulocyto/ monocytárním směrem jsou pozitivní na CD133 antigen. CD133 protilátky jsou alternativou k CD34 protilátkám při selekci kmenových buněk před jejich transplantací. Schopnost expandovat ex vivo byla popsána pouze pro subpopulaci CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>.

Jedním z modelů, jak ověřit, zda sledovaná subpopulace buněk je schopna vlastní sebeobnovy, je zjistit in vivo tuto její schopnost. Na modelu NOD-SCID (nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency disease) myši je možné sledovat dlouhodobě xenoštěp těchto buněk. De Winter a spol. (1998) popsali, že CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> buňky jsou také schopny repopulovat NOD/SCID myši.

V naší práci studující indukci apoptózy u kmenových buněk jsme užívali CD133<sup>+</sup> populaci izolovanou z periferní krve zdravých dárců po stimulaci G-CSF. Přestože prakticky 100% CD133<sup>+</sup> buněk izolovaných z periferní krve zdravých dárců je v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu, jsou tyto buňky velmi radiosensitivní. Po in vitro ozáření dávkou 2,5 Gy umírá do 3. dne po ozáření 80% apoptózou (Vávrová et al. 2002)

## 2.5. Lymfocyty izolované z periferní krve

Lymfocyty patří k nejcitlivějším buňkám k účinku ionizujícího záření v periferní krvi. Již za 24 hodin je pozorován pokles počtu lymfocytů s maximem 72 hodin po ozáření.

Ozáření lymfocytů vede ke zlomům DNA a vzniku chromosomových a chromatidových aberací. Chromosomy jsou nejlépe pozorovatelné při vlastní mitóze, kdy je chromosomální DNA velmi kondenzována. Takovéto chromosomy jsou po obarvení dobře viditelné. K nejčastějším aberacím patří dicentriky a ringy. Jejich hodnocení je součástí metody užívané ke stanovení obdržené dávky záření, která patří k tzv. zlatému standardu biologické dozimetrie již mnoho let. Metoda je založena na stimulaci lymfocytů z periferní krve fytohemaglutininem, kdy se lymfocyty uvedou do mitózy a mikroskopicky je pak možno sledovat počet dicentrických aberací v jednotlivých jádrech buněk. Jsou vypracovány křivky závislosti počtu dicentriků na dávce pro různé energie fotonů i neutronů. Z výsledků lze vypočítat nejen obdrženou dávku, ale také vyhodnotit rovnoměrnost ozáření. Většina chromosomálních aberací je

neslučitelná s dalším životem buňky, obvykle buňka zahyne při pokusu o dělení. Metoda je velmi citlivá, specifická a je vhodná i pro stanovení malých dávek záření. Obecně akceptovatelnou dávkou, které je touto metodou možno měřit je 0,25 Gy, je však třeba počítat alespoň 1000 buněk (Blakely 2002). Metoda má některé svoje limity. Je, především po vyšších dávkách, těžké nalézt tak velké množství buněk v mitóze, protože dochází k oddálení mitózy (blok v některé fázi buněčného cyklu jako reakce na poškození buňky), interfázové smrti lymfocytů a jejich depleci. Dalším limit této metody je čas, kdy jsou získány výsledky, neboť inkubace lymfocytů s mitogeny trvá nejméně 48 hodin.

K havárii na jaderné elektrárně v Černobylu došlo 26.4. 1986. Vzhledem k tomu, že většina ozářených obdržela dávky vedoucí ke dřeňové formě nemoci z ozáření, byl velmi dobře popsán průběh změn v periferní krvi. Odhad poškození, provedený především na základě stanovení chromosomálních aberací na stimulovaných lymfocytech odebraných z periferní krve, dobře koreloval s průběhem onemocnění a poklesem neutrofilních granulocytů v pozdějším období po ozáření.

K maximálnímu poklesu počtu lymfocytů v periferní krvi dochází 3. den po ozáření. Dávka 1 Gy vedla k menšímu poklesu počtu lymfocytů než dávka 3 Gy. Zatímco po dávce 1 Gy byly od 30. dne hodnoty absolutního počtu lymfocytů na výchozích hodnotách, po ozáření 3 Gy pokles přetrvával až do 60. dne po ozáření (Cervený et al. 1999). Je třeba si však uvědomit, že individuální počty lymfocytů v periferní krvi u zdravých osob jsou mezi  $1,5-3 \times 10^9/l$  a pro lepší odhad obdržené dávky by bylo vhodné znát počty lymfocytů v období před ozářením. Pak by bylo možné využít pravidlo, že pokles počtu lymfocytů 1.den po ozáření na 50% znamená, že osoba byla ozářena významnou dávkou záření. V případě, že se jedná o kombinované poškození, použití počtu lymfocytů jako diagnostického ukazatele je nevěrohodné.

Reciproké translokace zachovávají v buňce prakticky všechny geny ve funkčním stavu, a tak se buňky mohou dále dělit. Takovéto aberace lze nalézt v lidských lymfocytech ozářených osob ještě dlouho po ozáření (Kozubek 2000). Translokační analýza je metoda pro možnou retrospektivní biologickou dozimetrii, kdy je důležité stanovit obdrženou dávku záření mnoho let po

expozici. Citlivost této metody je však limitována možností detekce expozic záření ve vztahu k pozadí, neboť i jiné faktory zvyšují frekvenci translokací. Ideální je stanovení translokací před a po expozici ionizujícím záření. Je třeba si uvědomit, že např. věk jedince 50 let vede ke zdvojnásobení translokací. Moore et al. (1997) sledovali frekvenci translokací 6-10 let po expozici likvidátorů havárie v Černobylu, kteří byli dle dozimetrických údajů ozáření dávkou 0,25 Gy a na základě cytogenetické analýzy byla dávka stanovena 0,09 Gy. Frekvence translokací se u likvidátorů v Černobylu zvýšila na 1,12% (K- 0,66%, nekuřáci a neozáření, věk 38 let). U kuřáků cigaret po deseti letech se počet translokací zvýšil na 0,89 % a u kuřáků papiros na 1,4 %. Ze studie vyplývá, že ozáření dávkou 0,09 Gy mělo z hlediska vzestupu translokací větší efekt než kouření cigaret a menší efekt než kouření papiros.

V biologické dozimetrii mohou být využity některé další metody jako např. řetězová polymerázová reakce (PCR), kdy touto metodou mohou být analyzovány mutace DNA na lidských lymfocytech. PCR technologie umožňuje detekovat přítomnost mutací v relativně malých množstvích. Prasanna et al. (2002) popsali metodu in situ PCR ke kvantifikaci mutací mitochondriální DNA na interfázových lymfocytech. Popsali specifickou delecí, akumulující se v DNA mitochondrií, která byla dávkově závislá v rozmezí 0,5 – 2 Gy. Vzestup této delecce s věkem znamená, že se jedná o trvalou změnu, která by mohla být využita jako bioindikátor v retrospektivních studiích.

Louagie et al. (1999) popsali změny v počtu jednotlivých subpopulací lymfocytů u pacientek s karcinomem děložního hrdla a endometria léčených frakcionovaným ozářením. Celková obdržená dávka 50 Gy s denní dávkou 2 Gy 25 MV X záření za použití lineárního urychlovače, byla přepočítána na ekvivalent celotělové dávky. Nejrychlejší pokles byl zjištěn u B-lymfocytů. Po ekvivalentu celotělové dávky 1,5 Gy došlo k poklesu na 10% výchozích hodnot. Byly sledovány dvě subpopulace T lymfocytů, CD4<sup>+</sup> (helper T lymfocyty) a CD8<sup>+</sup> (supresorové/cytotoxické T lymfocyty), jejichž pokles byl pomalejší a po ekvivalentu celotělové dávky 2,5 Gy klesl jejich počet na 20%. NK-buňky byly charakteristické pomalým poklesem, avšak v konci terapie jejich pokles dosáhl také 20% výchozích hodnot.

Po *in vitro*  $\gamma$ -ozáření periferní krevní lymfocyty umírají apoptózou a jak jsme již výše uvedli, apoptické buňky je možno detekovat podle exprese Annexinu V (Hertveldt et al. 1997, Louagie et al 1998a). Výhodou použití této metody je, že může být použita v kombinaci s imunofenotypickými znaky a můžeme potom stanovit senzitivitu jednotlivých subpopulací lymfocytů k účinku ionizujícího záření. Philippé et al. (1997) ozařovali periferní lymfocyty *in vitro* dávkou 2 Gy a za 24 h detekovali apoptózu 24 h po ozáření pomocí vazby Annexinu V. Dokázali, že B lymfocyty jsou mnohem radiosenzitivnější než T lymfocyty.

NK cells představují kolem 15% cirkulujících lymfocytů a většina z nich se charakterizuje fenotypem CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> buněk. Mohou se rozdělit ve dvě subpopulace na základě povrchové density CD56 – CD56<sup>high</sup> and CD56<sup>low</sup>. Zatímco CD56<sup>high</sup> NK buňky (10%) jsou méně cytotoxické a mají vyšší schopnost produkce cytokinů, CD56<sup>low</sup> NK buňky (90%) mají vyšší cytotoxicitu (Cooper et al. 2001). Ban a Cologne (1992) popsali subpopulaci CD56<sup>+</sup> méně sensitivní než CD3<sup>+</sup> buňky. Je jasné, že populace CD56<sup>+</sup> buněk zahrnuje různé subpopulace s různými funkcemi v organismu. Po 48 h inkubaci PBMC ozářených dávkami 2-10 Gy, byl pozorován pokles v CD16<sup>+</sup> NK buňkách ve srovnání s CD3<sup>+</sup> buňkami (Rana et al. 1990).

Cornelissen et al. (2002a) porovnávali typ interfázové smrti po indukci nízkými a vysokými dávkami nízko LET  $\gamma$ -paprsky a vysoko LET urychlených neutronů (5.5 MeV). Lymfocyty z periferní krve byly ozářeny *in vitro* dávkami záření 5 a 20 Gy. Podle morfologických kritérií, rozdělili buňky na živé, časně apoptické, pozdně apoptické a onkotické (často popisované jako nekrotické). Zjistili, že dávka 5 Gy indukuje apoptózu do 24 hodin jak po  $\gamma$ -záření (22.6  $\pm$  3.3 %), tak po neutronovém (19.7  $\pm$  4.2 %) záření. Dávka 20 Gy neutronovým zářením způsobuje apoptózu (24.3  $\pm$  4.5 %) 24 hodin po ozáření, zatímco po stejné dávce  $\gamma$ -záření podíl apoptotických (16%) k nekrotickým (47%) buňkám byl 1:3. 48 hodin po ozáření neutronovým zářením došlo k významnému nárůstu apoptotických buněk u obou dávek – 5 a 20 Gy.

Mechanismus indukce apoptózy lymfocytů z periferní krve po *in vitro*  $\gamma$ -záření dávkou 5 Gy byl také studován Louagie et al. (1999b). 24 hodin po ozáření pozorovali expresi fosfatidylserinu na buněčném povrchu a pokles



mitochondriálního membránového potenciálu. Na druhé straně, nedetekovali uvolnění cytochromu c z vnitřního mitochondriálního prostoru do cytosolu a pouze slabou aktivaci kaspázy 3.

Cílem této poslední části práce bylo srovnat in vitro i in vivo radiosenzitivitu T lymfocytů a jejich subpopulací a dále pak radiosenzitivitu NK buněk. Výsledky získané při ozáření in vitro jsme srovnávali s výsledky získanými od pacientů frakcionovaně ozářených na oblast břicha.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

---

### 3.1. ZDROJ BUNĚK

#### 3.1.1. *Leukemické linie*

Linie buněk lidské T lymfocytární leukémie byla získána z Americké sbírky buněčných kultur (University Blvd. Manassas USA) a buňky HL-60 lidské promyelocytární linie byly získány z Evropské sbírky buněčných kultur (Porton Down, Salisbury, UK). Buňky byly kultivovány v Iscově modifikaci Dulbeccova media (Sigma) s 20% fetálního telecího séra (Gibco), 2 mM glutaminu (Sigma), 100 UI/ml penicilinu (Sigma) a 0,1 mg/ml streptomycinu (Sigma). Inkubace buněk probíhala v inkubátoru při 37°C a kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Kultury byly pasážovány každé dva až tři dny a ředěny do konečné koncentrace 2x10<sup>5</sup> buněk/ml. Buňky byly počítány v hemocytometru a integrita buněčné membrány sledována pomocí trypanové modři. Byly použity buňky pasážované maximálně dvacetkrát.

#### 3.1.2. *Zdroj lidských progenitorových buněk*

##### 3.1.2.1. Mobilizace

CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> buňky byly získány z periferní krve šesti zdravých dárců po mobilizaci subkutánní aplikací G-CSF (Neupogen, Roche, Basel, Švýcarsko) v dávce 5 µg/kg/den po dobu tří dnů. Čtvrtý den po aplikaci byl proveden sběr buněk leukaferézou. Leukaferéza byla provedena použitím kontinuálního krevního separátoru COBE Spectra (Lakewood, CO, USA) s následujícími parametry: Zpracovaný objem krve: 10 000 - 12 000 ml (průměr 11 000 ml) na proceduru: průtoková rychlost: 60-70 ml/min. Použili jsme originální COBE MNC verzi 5.1 softwarového programu .

##### 3.1.2.2. Separace CD133<sup>+</sup> buněk a jejich expanze ex vivo

CD133<sup>+</sup> buňky byly separovány z čerstvých periferních krevních buněk (izolovaných na separátoru) pomocí MiniMACS purifikačního systému (izolační kit byl dodán firmou Miltenyi Biotech GmbH Německo). CD133<sup>+</sup> buňky byly

přímo značeny použitím CD133 MicroBeads. Čistota CD133<sup>+</sup> hematopoetických progenitorových buněk (HPB) byla stanovena pomocí flow-cytometrické analýzy.

CD133<sup>+</sup> HPB byly kultivovány v koncentraci  $1 \times 10^4$  buněk/ml v Iscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma) obsahujícího 10% fetálního hovězího séra, 100 U/ml penicilinu, 100 U/ml streptomycinu, 2 mM/ml L-glutaminu, 50 ng/ml hSCF (Sigma), 20 ng/ml hIL-3, 50 ng/ml hIL-11 (Sigma) anebo 50 ng/ml FLT-3L (Genzyme) . Všechny kultury byly kultivovány v 5% CO<sub>2</sub> a 5% O<sub>2</sub> při 37°C. 7. den kultivace bylo vyměněno medium. HPB po expanzi byly analyzovány flow cytometricky za 7 a 14 dní po začátku kultivace a proliferační potenciál byl sledován použitím klonogenní zkoušky.

### **3.1.3. Periferní lymfocyty**

Mononukleární buňky periferní krve byly izolovány z heparinizované krve dárců centrifugací na Histopaque-1077 (Sigma) podle instrukcí výrobce. Po dvojnásobným promytím studeným fosfátovým pufrům (PBS) byly buňky resuspendovány v Iscově modifikaci Dulbeccova média (Sigma) obohaceném 20% fetálního hovězího séra (Gibco), 2 mM glutaminu (Sigma), 100 U/ml penicilínu (Sigma) a 0,1 mg/ml streptomycinu (Sigma) na koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/ml. Buněčné suspenze byly uchovávány v inkubátoru při 37°C a v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub> do počátku ozáření (max. 2-3 hodiny).

## **3.2. OZAŘOVÁNÍ**

Exponenciálně rostoucí linie buněk MOLT-4 a HL-60 byly suspendovány v kompletním mediu v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml. 10 ml suspenze bylo ozářeno v 25 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvíčkách (Nunc) při pokojové teplotě použitím <sup>60</sup>Co jako zdroje  $\gamma$ -záření s dávkovým příkonem 0,5- 0,4 Gy/min, dávkami 0.2-20 Gy, ze vzdálenosti 1 m od zdroje, při pokojové teplotě. Ihned po ozáření byly lahvíčky přeneseny do inkubátoru a inkubovány při 37°C a kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. V určených intervalech byla odpovídající část suspence odebrána a použita k analýze. Počet buněk a jejich životnost byla stanovena pomocí trypanové modři.

PBMC ( $5 \times 10^5$ /ml) v 10 ml suspenzích byly v 25 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvíčkách (Nunc) ozářeny při pokojové teplotě použitím <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -záření s

dávkovým příkonem 0,4 Gy/min ze vzdálenosti 1 m od zdroje pro dávky 2-7 Gy, pro dávky 10 a 20 Gy s dávkovým příkonem 1,5Gy/min ze vzdálenosti 0,5 m od zdroje. Ihned po ozáření byly lahvičky umístěny do inkubátoru s 37° C a 5% CO<sub>2</sub> a buněčné suspenze byly v různých časových intervalech po ozáření odebírány k analýzám.

### **3.3. METODY NA STANOVENÍ APOPTÓZY**

#### **3.3.1.APO 2.7**

Antigen APO2.7 (někdy nazývaný antigen 7A6), který je rozeznáván klonem 2.7A6A3, je 38 kDa protein lokalizovaný na mitochondriální membráně, jehož exprese je omezená na buňky zadané do apoptózy. Vzhledem k intracelulární lokalizaci tohoto antigenu je užívána metoda jednak bez permeabilizace a jednak s permeabilizací buněčné membrány. Jako vhodné permeabilizační agens je používán digitonin. Buňky byly dvakrát promyty PBS obsahujícím 5% fetálního telecího séra (FCS). Následně bylo  $1 \times 10^5$  buněk resuspendováno v 0,5 ml PBS s 5% FCS a inkubováno s myší monoklonální protilátkou APO2.7 konjugovanou phycoerytrinem (Immunotech). Pro permeabilizaci buněk byl připraven zásobní roztok digitoninu (Sigma): 25 mg/ml digitoninu bylo rozpuštěno v PBS zahřátím na 100°C. Buňky byly permeabilizovány inkubací ve 100 µl roztoku digitoninu v PBS o koncentraci 100 µg/ml po dobu 20 minut na ledu. Po inkubaci byly buňky promyty a barveny protilátkou APO2.7 po dobu 30 minut při 4°C a analyzovány na flow –cytometru EpicsXL Coulter.

#### **3.3.2.Flow-cytometrické stanovení apoptózy pomocí APOTESTU**

Promytá buněčná suspenze byla resuspendována ve vazebném pufru a značena Annexinem V konjugovaným fluorescein isothiocyanátem (Annexin V-FITC) a propidium iodidem (PI) z Apoptest kitu (Dako) podle instrukcí výrobce.

#### **3.3.3.Flow-cytometrická analýza obsahu DNA a analýza buněčného cyklu**

Jedním z časných dějů při apoptóze je aktivace endonukleáz, které preferenčně štěpí DNA v internukleosomální (spojovací) sekci. Toto štěpení

vede ke vzniku fragmentů s nízkou molekulární hmotností, které opouštějí buňku. Výsledkem je redukce celkového množství DNA v buňce a z tohoto důvodu vznik tzv. "sub-G<sub>1</sub> píku", který tvoří apoptické buňky. Přibližně 5x10<sup>5</sup> buněk v buněčné suspenzi bylo dvakrát promyto ledovým fosfátovým pufrém (PBS), fixováno v 70% etanolu (minimálně 30 minut při 4°C). Po centrifugaci (200 G, 10 minut, 4°C) a odstranění etanolu byly buňky promyty ledově chladným PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml fosfátovém pufru (192 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 8 ml 0,1 M kyseliny citrónové, pH 7,8) a inkubovány 5 minut při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. Nakonec byly buňky barveny v 0,5 ml Vindelova roztoku: 1ml 1M TRIS (pH 8), 1mg RNAáza, 100 µl TRITON, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodid a destilovaná voda do 100 ml, (Vindelov 1977) a inkubovány v termostatu 1 hodinu při 37°C. Nakonec byla provedena flow-cytometrická analýza na flow cytometru EpicsXL Coulter (Hialeah, FL, USA). V každém vzorku bylo analyzováno minimálně 10 000 buněk. Takto získané výsledky byly zpracovány pomocí programu Multicycle AV (Phoenix Flow System, San Diego, USA) a stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu a v apoptóze.

#### **3.3.4. Čtyřbarevné značení pro průtokovou cytometrii**

Buňky byly promyty ledovým želatinovým pufrém (WSB, fosfátový pufr s 0,2% želatinou a 0,1% NaN<sub>3</sub>) a uloženy na ledu během dalšího zpracování k zamezení dalšího rozvoje apoptického procesu. Pro sledování hlavních lymfocytárních subpopulací jsme použili dvoubarevné povrchové značení s monoklonálními protilátkami konjugovanými s R-phycoerytrinem (RPE) nebo allophycocyaninem (APC). Použili jsme panel antiCD3/RP (klon UCHT1, Immunotech), anti-CD4/APC (klon MT310, Dako) and anti-CD8/APC (klon DK25, Dako). Po 15min inkubaci a promytí 2ml WSB jsme buněčnou suspenzi označili Annexinem V konjugovaným fluorescein isothiokyanatem (A-FITC) a propidium jodidem z Apoptest kit (Dako) podle firemních instrukcí. Průtoková cytometrie byla provedena na čtyřbarevném průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson, BD) vybaveným 15mW argonovým laserem (488nm, 15mW) a červeným diodovým laserem (635nm, 25mW). Elektronická kompenzace překryvu emisních spekter byla provedena s použitím

jednobarevného značení vzorku bez a s PI, které emituje světlo do obou kanálů FL2 a FL3. Analýza byla provedena na 50 000 nasbíraných buněk a data byla hodnocena pomocí analytického softwaru CellQuest (BD). Velmi malé objekty včetně buněčné drti a většina neadherentních monocytů byla vyloučena z analýzy standardním postupem použitím regionu "lymphogate" ve forward and side scatteru (FSC a SSC). Lymphogate byl opatrně nastaven tak, aby zahrnul i menší buňky v pozdní fázi apoptózy analyzované populace.

### ***3.3.5. Statistické hodnocení výsledků***

Na obrázcích jsou znázorněny výběrové průměry hodnot souborů s příslušnými výběrovými směrodatnými odchylkami. V experimentech na buněčných liniích hodnoty představují obvykle výběrový průměr s příslušnou směrodatnou odchylkou ze tří nezávislých experimentů. Významnost rozdílů mezi jednotlivými soubory byla stanovena dvouvýběrovým t-testem v rámci tabulkového procesoru Excel 97 od firmy Microsoft. Homogenita rozptylů byla vždy stanovena F-testem a v závislosti na výsledku F-testu byla hypotéza o shodě či neshodě středních hodnot porovnávaných výběrů hodnocena pomocí Studentova t-testu pro nezávislé uspořádání pokusů a to variantou pro shodné či rozdílné rozptyly.

## 4. VÝSLEDKY

---

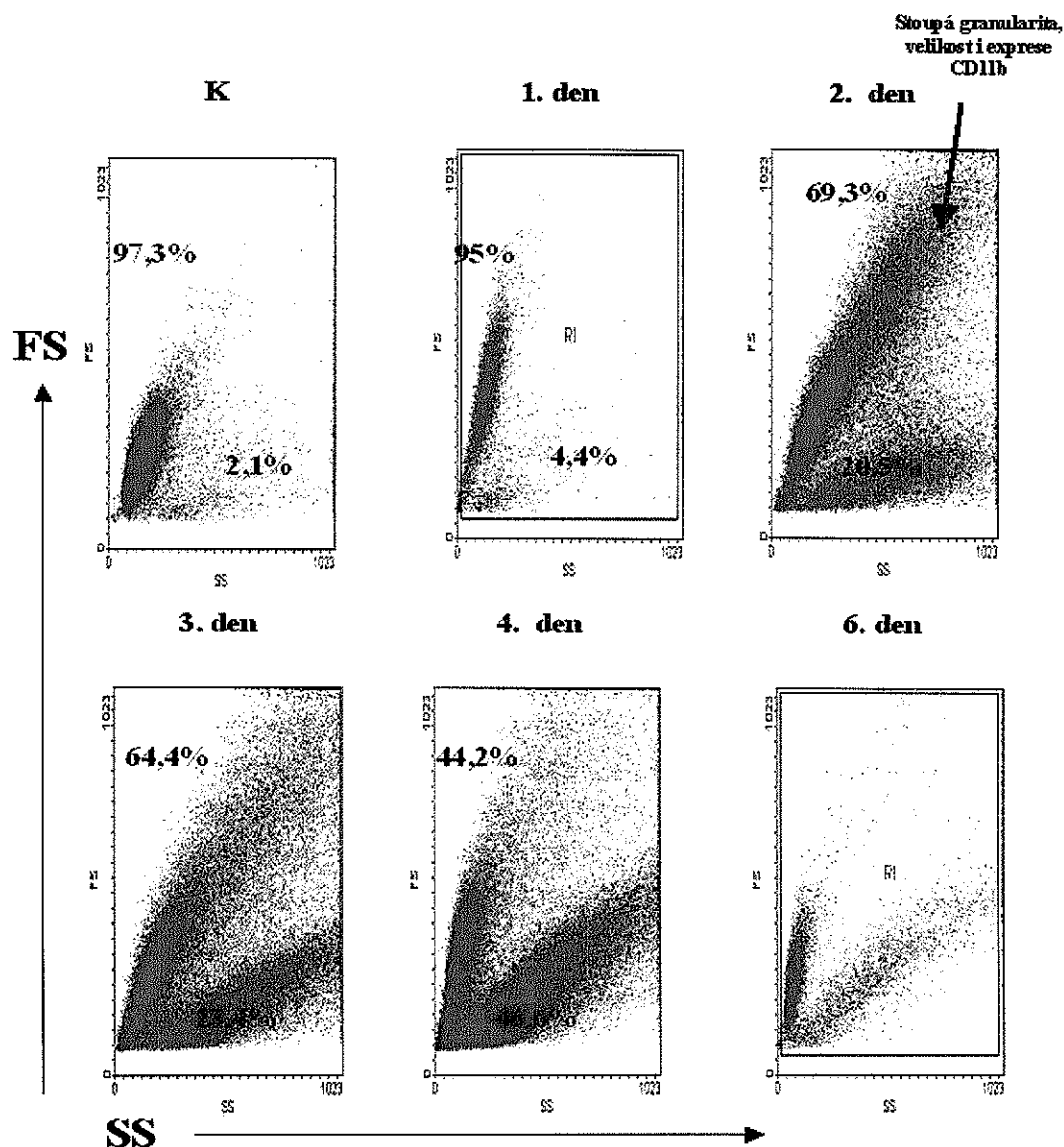
### 4.1. INDUKCE APOPTÓZY U LEUKEMICKÝCH LINÍÍ

Flow-cytometricky hodnocená analýza rozptylu světla dává informaci o velikosti a struktuře buňky. Zatímco intenzita světelného rozptylu v předním "forward" (FS) směru dobře koreluje s velikostí buněk, intenzita světelného rozptylu měřená v pravém úhlu "side" směru (SS) dobře koreluje s granularitou. Na obrázku č. 1 jsou znázorněny změny FS a SS u buněk HL-60 po ozáření dávkou  $\gamma$ -záření 6 Gy. Z obrázku je patrné, že buňky HL-60 jsou z velké většiny (97,3 %) buňky s malým FS i SS. 2 dny po ozáření dávkou 6 Gy dochází k výraznému vzestupu buněk s vysokým SS i FS. Tyto buňky exprimovaly antigen CD11b. Na obrázku č. 2 je znázorněna exprese antigenu CD11b. Dále byl patrný vzestup buněk s malým FS a větším SS, tyto buňky byly APO2.7 pozitivní a představují buňky zadané do apoptózy. Počet buněk s malým FS a větším SS se zvyšoval až do 4. dne po ozáření, kdy byla patrna také největší exprese APO2.7, jak u nepermeabilizovaných, tak u permeabilizovaných buněk. 6. den po ozáření počet apoptických buněk klesal. Během apoptózy se ukazuje zmenšení rozptylu ve směru FS, které však na rozdíl od nekrózy není paralelně spojeno s poklesem SS. Na obrázku č.3 je znázorněn SS a FS u neovlivněných buněk HL-60 a je ukázáno, že u kontrolních, neovlivněných buněk pouze malé procento buněk je APO2.7 pozitivních.

48 hodin po ozáření dávkou 6 Gy jsme pozorovali vzestup buněk s vysokým SS, ukazující na vzestup granularity buněk. Buňky s vysokým SS se dělily do dvou subpopulací s nízkým a vysokým FS. Buňky s vysokým SS i FS byly pozitivní na CD11b, svědčící o zvýšené diferenciaci buněk po ozáření. Tyto buňky byly negativní na APO2.7. Druhá subpopulace buněk s vysokým SS a nízkým FS byla negativní na CD11b a pozitivní na APO2.7. Buňky s nízkým SS i FS (shodným s kontrolní neozářenou skupinou) byly živé, neapoptické a nebyly pozitivní ani na APO2.7 ani CD11b (obr.č. 4).

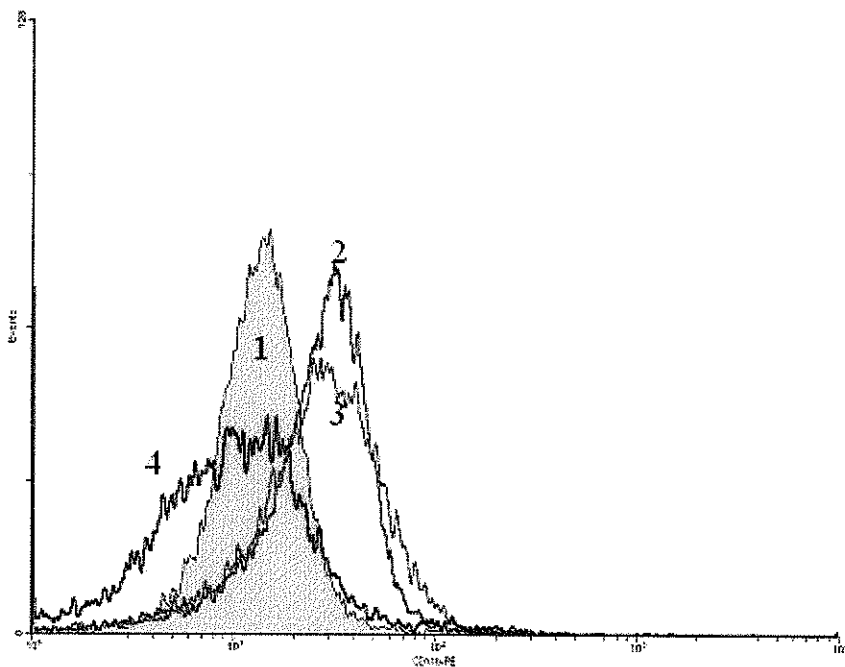
Indukci apoptózy je možné hodnotit také podle sub-G<sub>1</sub> vrcholu (rozštěpením jádra vznikají fragmenty s nízkou molekulární hmotností, které

opouštějí buňku a výsledkem je redukce DNA v jádře). Na obrázku č.5 jsou znázorněny změny v jednotlivých fázích buněčného cyklu u buněk HL-60 po ozáření dávkou 6 Gy. Za 6 hodin po ozáření touto vysokou subletální dávkou jsou buňky akumulovány v S fázi buněčného cyklu, za 24 hodin po ozáření je většina buněk uvězněna v G<sub>2</sub> fázi a za 48 a 72 hodin po ozáření je patrna masivní apoptóza ( sub-G<sub>1</sub> vrchol). 7. den po ozáření obnovily přežívající buňky mitotický cyklus a nebyla již patrna apoptóza.

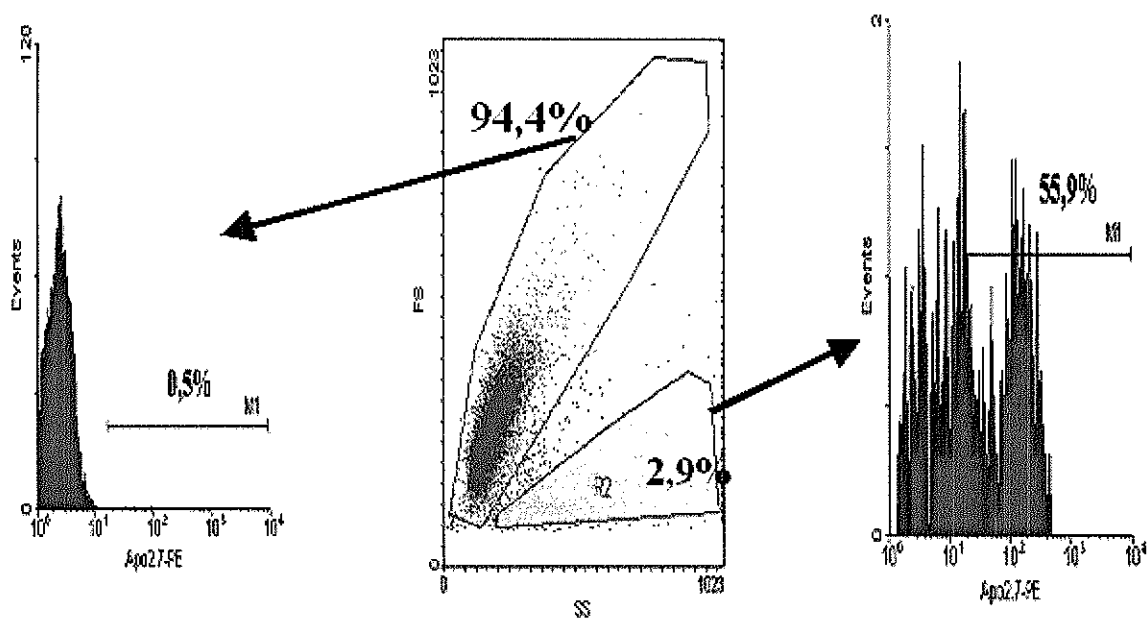


Obr.č.1. Změny FS (velikost) a SS (granularita) 1.-6. den po ozáření buněk HL-60 dávkou 6 Gy



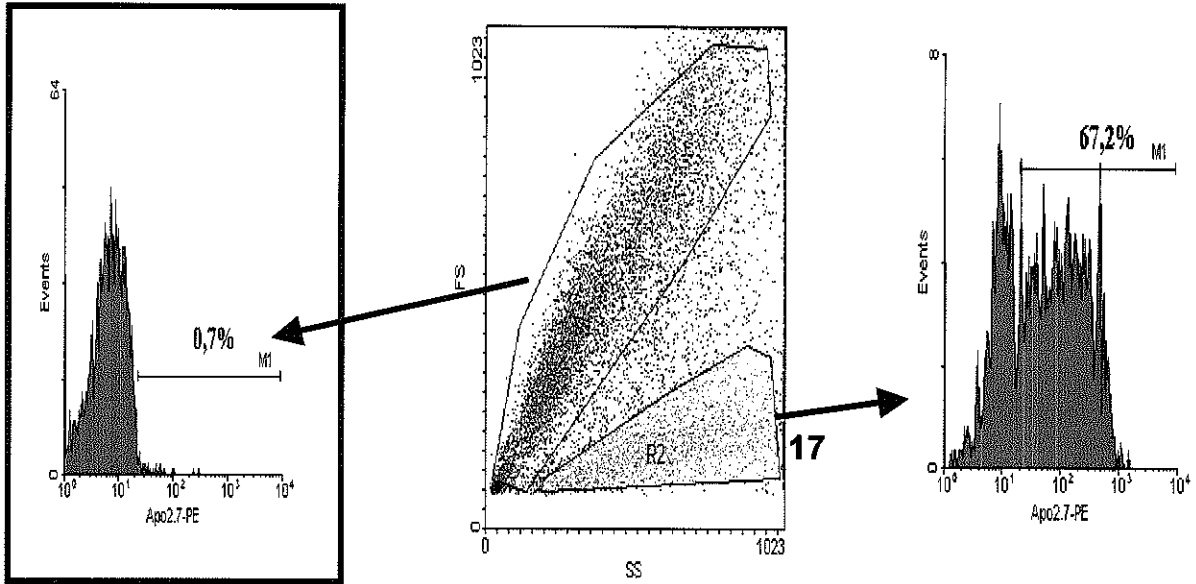


Obr.č.2 Časová závislost exprese CD11b po inkubaci buněk ozářených dávkou 6 Gy. Z obrázku je patrný vzestup exprese za 24 (2-červená křivka) a 48h (3-zelená křivka) po ozáření. Za 96h jsou již hodnoty zpět (4-modrá křivka) na úrovni neozařených buněk (1)

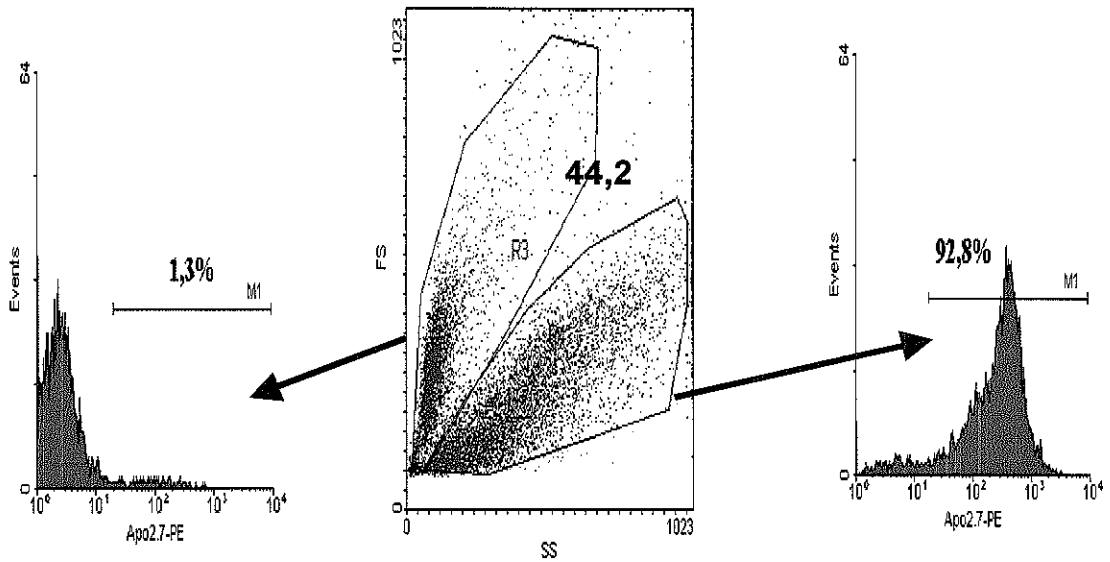


Obr.č.3. Exprese Apo2.7 u nepermeabilizovaných neovlivněných buněk HL-60.

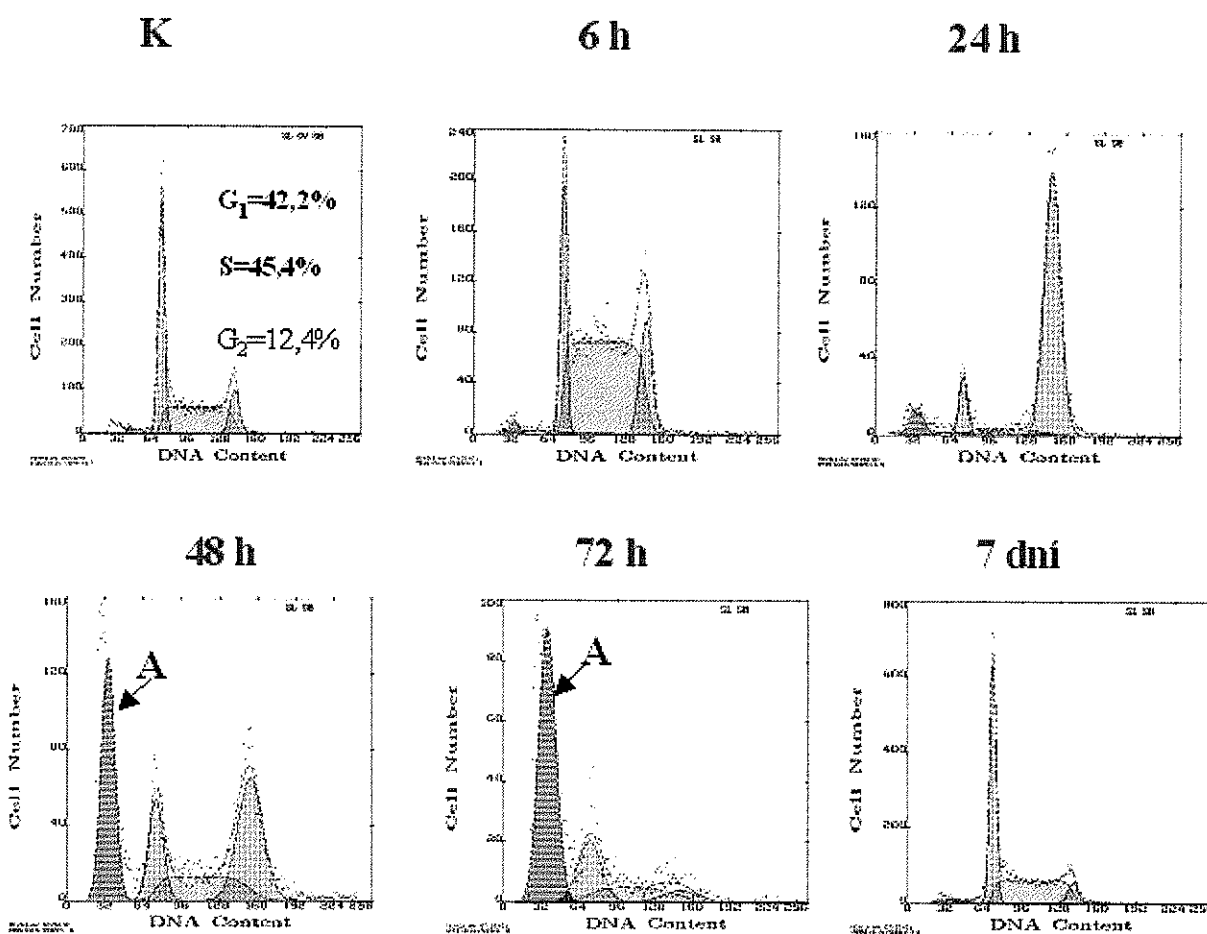
**48 hodin po ozáření**



**96 hodin po ozáření 6 Gy**



Obr.č.4: Vliv ionizujícího záření 6 Gy na změny SS, FS a exprese APO2.7 (bez permeabilizace) u buněk HL-60.



Obr. č. 5: Vliv ionizujícího záření 6 Gy na změny zastoupení buněk buněčném cyklu a indukci apoptózy hodnocené podle subG<sub>1</sub> vrcholu u buněk HL-60.

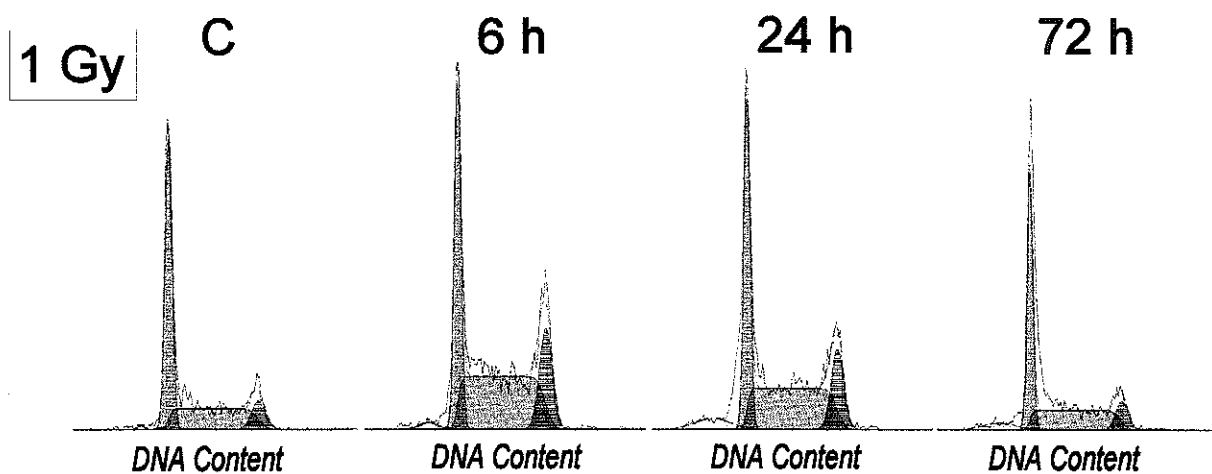
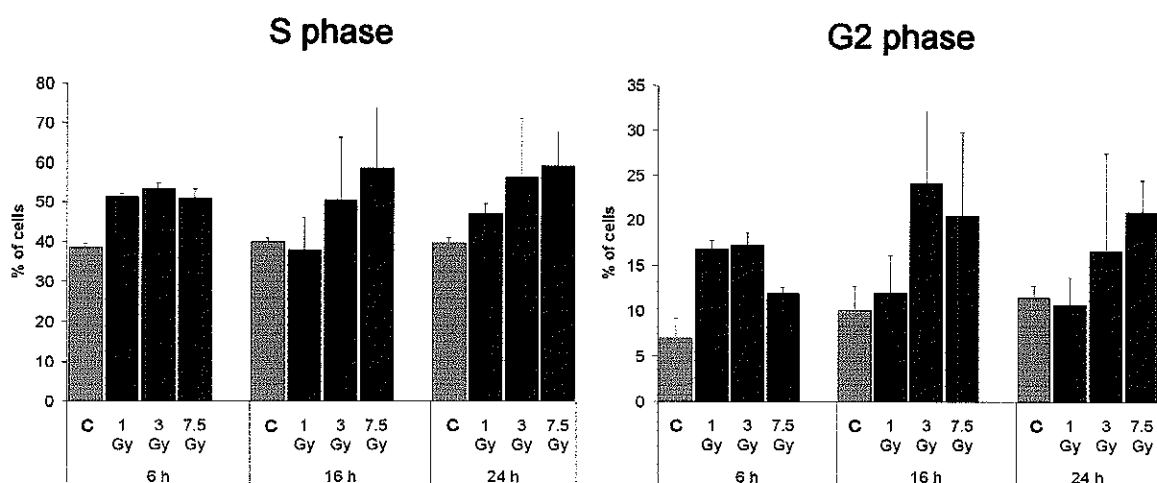
V druhé části naší práce jsme jako modelovou linii používali buňky MOLT-4. Buňky jsou více diferencované než buňky HL-60, jsou odvozeny od T lymfocytů (prakticky všechny exprimují znak CD7) a také jsou p53 pozitivní. Na obrázku č. 6 jsou znázorněny výsledky sledující změny u buněk MOLT-4 v zastoupení buněk v buněčném cyklu 6 hodin po ozáření dávkami 1-7,5 Gy. Z obrázku č.6 je patrné, že po všech uvedených dávkách dochází k poklesu počtu buněk v G<sub>1</sub> fázi. Po dávkách 1-5 Gy se buňky akumulují především v S fázi, apoptóza stanovená pomocí subG<sub>1</sub> vrcholu je v tomto časovém intervalu velmi malá. Po dávkách do 5 Gy nebyla u těchto buněk do 6 hodin po

ozáření patrna apoptóza. Po nejvyšší dávce 7,5 Gy je již 11% buněk apoptických a vzestup počtu buněk v S fázi není příliš patrný.

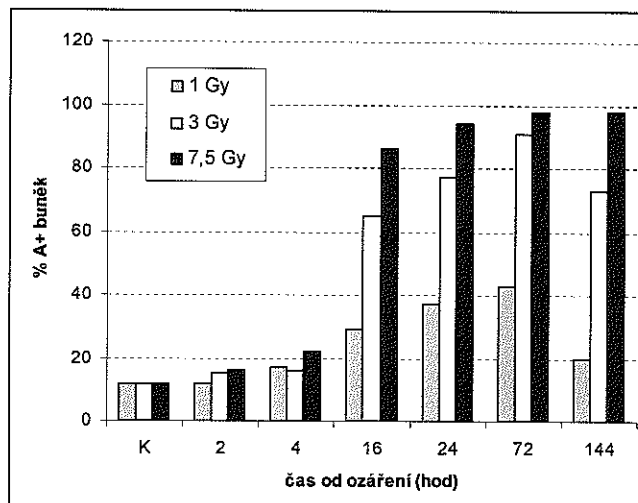
Na obrázku č. 7 jsou znázorněny změny exprese Annexinu V a PI. Pomocí této metody lze intaktní buňky AnnexinV/ propidium jodid<sup>-</sup> (A<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) odlišit od časně apoptických (A<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) a také od buněk v pozdní (A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) fázi apoptózy. Celkový podíl takto detekovaných apoptických buněk přitom jeví dávkovou závislost. Dávky 1 a 3 Gy jsou pro buňky MOLT-4 dávky subletální, proto v nejdelším sledovaném intervalu (6 dní) již lze sledovat pokles apoptické subpopulace u nižších dávek (1 a 3 Gy), zatímco buňky ozářené dávkou 7,5 Gy jsou všechny mrtvé.

Na obrázku č. 7b je reprezentativní záznam z flow-cytometru po ozáření dávkou 3 Gy. Z obrázku 7b je patrné, že prakticky chybí populace A<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> buněk, označovaná obvykle jako časně apoptické buňky. Buňky jsou buď živé (A<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) nebo A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>. Podle intenzity exprese PI je možno rozdělit na A<sup>+</sup>/PI<sup>low</sup> (časně apoptické) a A<sup>+</sup>/PI<sup>high</sup> (pozděně apoptické). Čtvercem označené buňky je možno považovat za časně apoptické a za 2, 4, 16 a 24 h po ozáření je v této časně apoptické fázi 3,8; 6,4; 12,8 a 18,1 % buněk a celkově apoptických buněk je 11,4; 14,7; 63,5 a 76,2%. Dávka není absolutně letální, stále je patrná část živých buněk. 72 h po ozáření je 92 % buněk apoptických a 8% živých. 144 hodin po ozáření již počet apoptických buněk klesal.

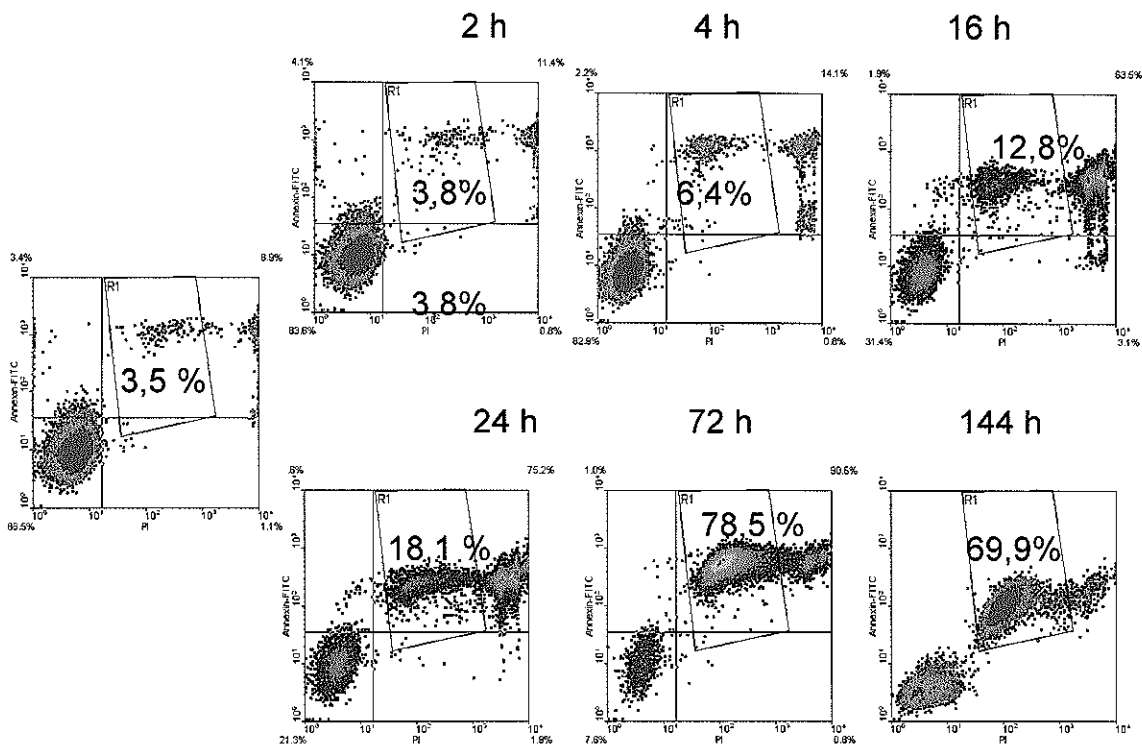
Na obrázku č. 8 je hodnocena indukce apoptózy u buněk MOLT-4 24 hodin po ozáření. Z obrázku je patrna lineární dávková závislost uvedeného markeru v rozmezí 0,2 až 3 Gy. APO2.7 byl stanoven u buněk bez permeabilizace. Z obrázku č. 7 je zřejmé, že 24 hodin po ozáření mají apoptické buňky propustnou buněčnou membránu (pozitivita na PI) a není třeba permeabilizace pro stanovení APO2.7 (antigen je exprimován na mitochondriální membráně). Jak APO2.7, tak Annexin, hodnoceny za 24 h po ozáření jsou u buněk MOLT-4 dobrými (dávkově závislými) ukazateli obdržené dávky záření.



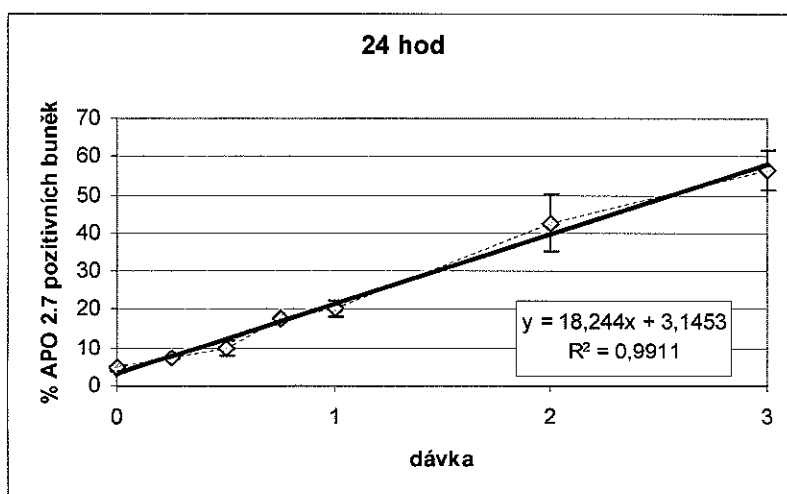
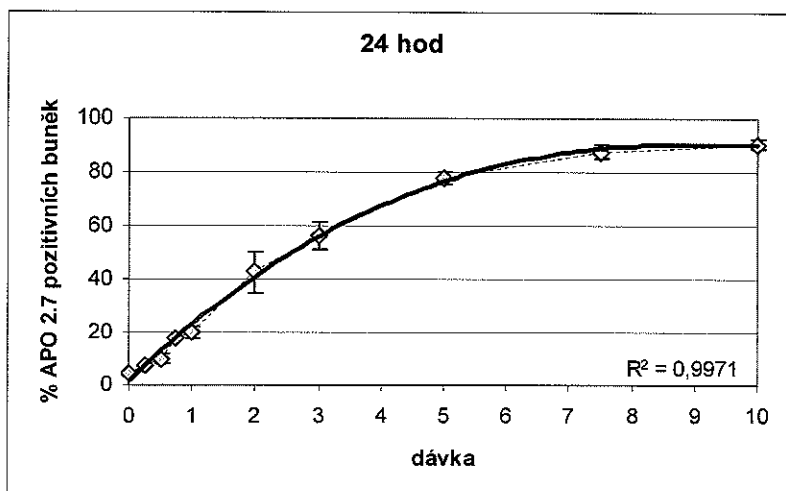
Obr. č. 6: Vliv ionizujícího záření na změny zastoupení buněk v buněčném cyklu 6 hodin po ozáření buněk MOLT-4 dávkami 1-7,5 Gy.



Obr.č. 7a: Indukce apoptózy u buněk MOLT-4 v průběhu 6ti dní po dávkách 1 až 7,5 Gy pomocí APOPTESTU (A/PI).



Obr.č. 7b: Reprezentativní záznam indukce apoptózy u buněk MOLT-4 v průběhu 6ti dní po dávce 3 Gy pomocí APOPTESTU (A/PI). Ve čtvercích jsou označeny buňky časně apoptické A<sup>+</sup>/PI<sup>low</sup>.

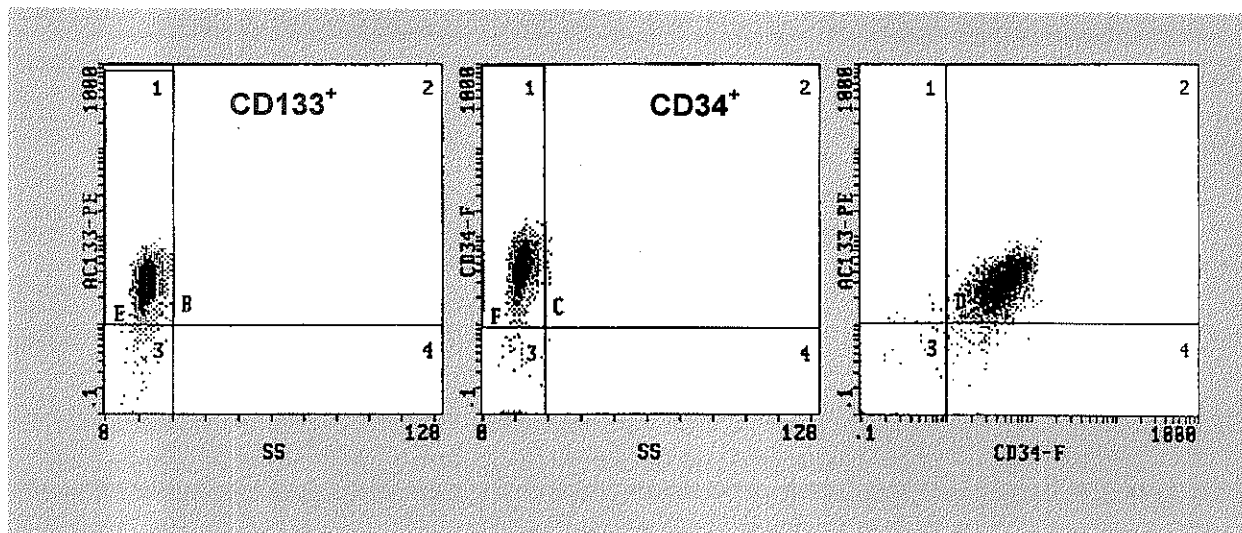


Obr.č.8: Indukce apoptózy u buněk MOLT-4 sledovaná 24 h po ozáření podle exprese APO2.7.

## 4.2. KMENOVÉ BUŇKY KRVETVORBY

V další části naší práce jsme studovali vliv ionizujícího záření na kmenové buňky krvetvorby izolované z periferní krve zdravých dárců po mobilizaci G-CSF. Periferní krevní progenitorové buňky (PKB) byly izolovány na separátoru COBE Spectra od zdravých dárců 4. den po mobilizaci G-CSF (5

ug/kg/den po dobu 3 dní). PKB obsahovaly 0,5-1% CD133<sup>+</sup> buněk, které byly dále izolovány imunomagnetickou separací.

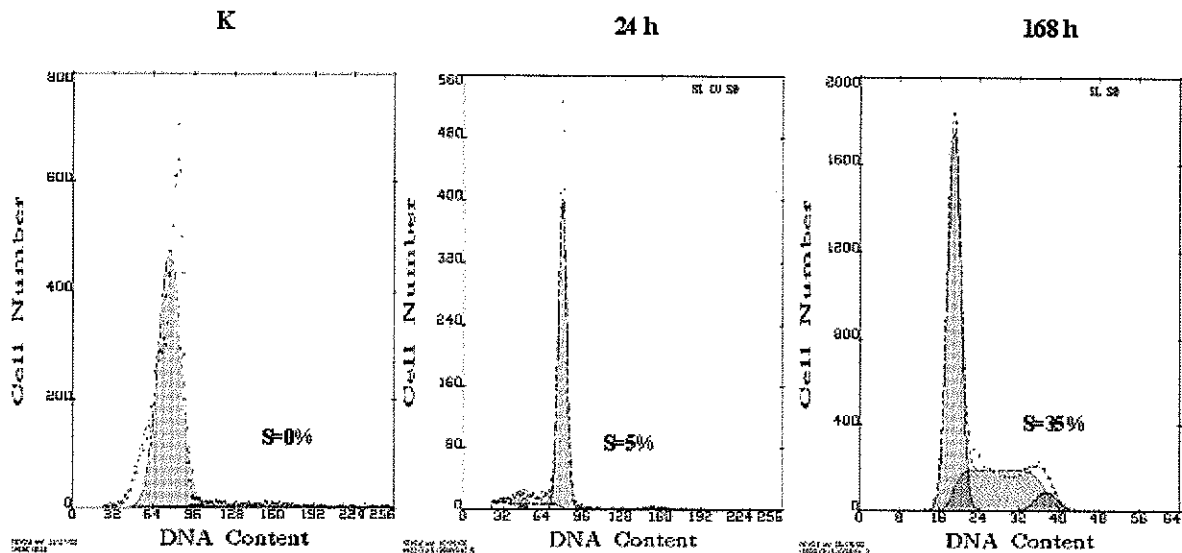


Obr.č.9: Flow-cytometrický záznam čistoty kmenových buněk izolovaných z periferní krve zdravých dárců po mobilizaci G-CSF. Buňky byly izolovány separací na separátoru COBE a dále imunomagnetickou selekcí pomocí imunomagnetických partikulí izolující CD133 pozitivní buňky. Z obrázku je patrné, že takto izolované buňky jsou z 80% CD133+/CD34+ a jsou to buňky s malým SS.

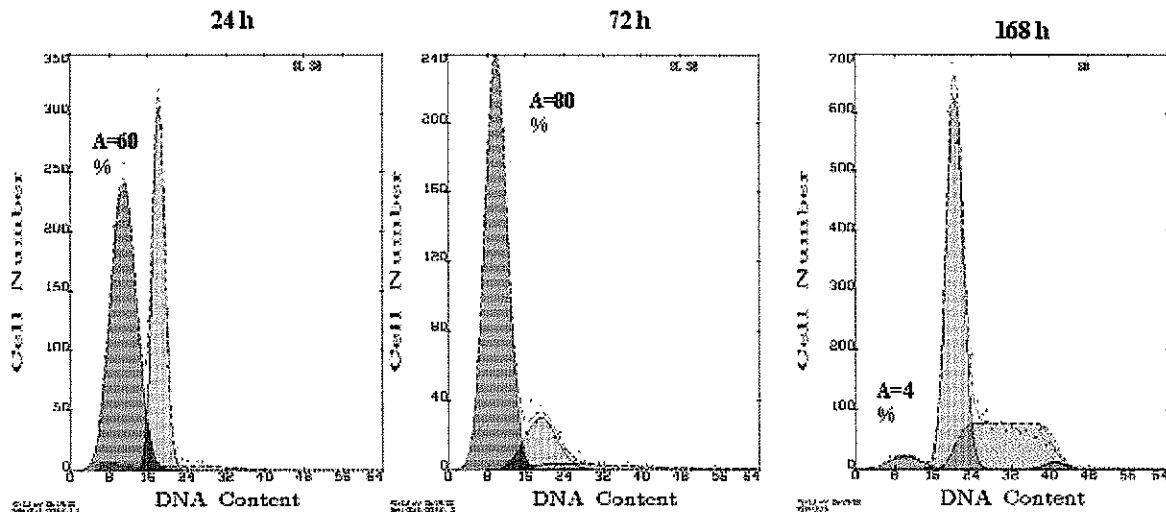
Z čerstvých PKB použitím MiniMACS purifikačního systému byly izolovány CD133<sup>+</sup> buňky. Čistota jednotlivých frakcí byla sledována flow cytometrickou analýzou použitím antiCD34 a antiCD133 monoklonálních protilátek. Exprese CD133<sup>+</sup> a CD34<sup>+</sup> je znázorněna na obrázku č. 9. Buňky izolované imunomagnetickou separací byly ze 78% CD133<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> a ze 77,8% CD34<sup>+</sup>/CD33<sup>-</sup>. CD133<sup>+</sup> buňky byly expandovány ex vivo ( $1 \times 10^4$  cell/ml) v Iscově modifikovaném Dulbeccově mediu obsahujícím 10% fetálního hovězího séra, 100U/ml penicilinu, 100U/ml streptomycinu, 2 mM/ml L-glutaminu, 50 ng/ml hSCF a 20 ng/ml hIL-3 a buď v přítomnosti 50 ng/ml hIL-11 nebo 50 ng/ml FLT3L. Výsledkem expanze byl vzestup počtu jaderných buněk, jak za 7, tak za 14 dní po začátku kultivace. 14. den vzrostl počet jaderných buněk u skupiny stimulované kombinací SCF+IL3+FLT3L 120x. Za 14 dní od začátku expanze bylo 86% CD33<sup>+</sup> a 39 % CD15<sup>+</sup>. Z výsledků je zřejmé, že za 14 dní po



začátku kultivace s kombinací SCF+IL3+FLT3L nedošlo ke ztrátě absolutního počtu CD34<sup>+</sup> ani CD133<sup>+</sup> buněk, ale byl patrný statisticky významný vzestup progenitorů neutrofilních granulocytů CD33<sup>+</sup> a CD15<sup>+</sup>.



Obr. č 10a: Průběh buněčného cyklu u buněk CD133<sup>+</sup> po expanzi *ex vivo* v přítomnosti cytokinů IL-3 + SCF + FLT3-L. Buňky izolované imunomagnetickou separací jsou prakticky všechny v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu. Za 168 h po začátku expanze je 35% buněk



Obr.č.10b: Průběh buněčného cyklu a indukce apoptózy u buněk CD133<sup>+</sup> ozářených *in vitro* 2,5 Gy a expandovaných *ex vivo* v přítomnosti cytokinů IL-3 + SCF + FLT3-L. Z obrázku je patrné, že 24 h po ozáření je 60% buněk apoptických, maximum apoptózy bylo 72 h po ozáření (80%).

Z obrázku č.10a je patrné, že po vyplavení kmenových buněk do periferní krve pomocí mobilizace G-CSF a jejich separaci, nejprve na separátoru Cobe a dále mini MACS systémem, jsou prakticky všechny buňky v klidové  $G_0/G_1$  fázi. Za 24 hodin po začátku expanze se objevilo 5% buněk v S fázi a 7. den po začátku expanze bylo již 35 % buněk v S fázi, což značí, že buňky proliferovaly. 24 hodin po in vitro ozáření buněk dávkou 2,5 Gy bylo 60% buněk se subdiploidní DNA, což představuje buňky apoptické a 72 hodin po ozáření bylo apoptických 80%. Pod vlivem kombinace cytokinů SCF+IL-3+FLT3L přežívajících 20 % buněk vstoupilo do buněčného cyklu a podobně jako u neozářené skupiny 7. den po ozáření bylo 35 % buněk v S fázi buněčného cyklu (obr.č.10b). Výsledky ukazují, že je možné vhodnou kombinací cytokinů u části buněk zabránit indukci apoptózy KBK vyvolané ionizujícím zářením a indukovat vstup těchto buněk do buněčného cyklu.

#### **4.3. INDUKCE APOPTÓZY U LYMFOCYTŮ OZÁŘENÝCH IN VITRO**

V poslední části naší práce jsme sledovali indukci apoptózy u lymfocytů izolovaných z periferní krve jednak zdravých dárců ozářených in vitro a dále od pacientů ozařovaných frakcionovaně na oblast břicha. Na obrázku č. 11 je znázorněna multiparametrová analýza apoptózy v subpopulacích lymfocytů. V protokolu naší studie je možné rozeznat několik fází apoptózy a nekrózy na základě vazby s Annexinem V a propidium jodidem. Pozitivita buněk a charakteristika světelného rozptylu umožňuje analýzu lymfocytárních subpopulací v každém vzorku, jak je ukázáno na obr.11. Lymfocytární gate v dvouparametrovém dot-plot histogramu FCS-SSC (R1 na obr.11A) vyloučí buněčnou drť, většinu erytrocytů a neadherentní monocyty z analýzy. Dvouparametrový dot-plot histogramu Annexinu V proti propidium jodidu v lymfogatu (obr.11B) znázorňuje průběh apoptózy v pozorovaných buněčných populacích a umožňuje definovat i konečné stádium buněčné smrti.

Intaktní buněčná populace je charakterizovaná nejnižším fluorescenčním signálem jak pro Annexin V-FITC (FL1), tak pro propidium jodid (FL3), tj. populace  $A^{-}PI^{-}$ . Následují buňky v nejčasnějším stádiu apoptózy, které slabě váží Annexin V a neváží propidium jodid ( $A^{low}PI^{-}$ ). Střední fáze apoptózy je definována silnou expresí fosfatidylserinu a negativní vazbou na propidium

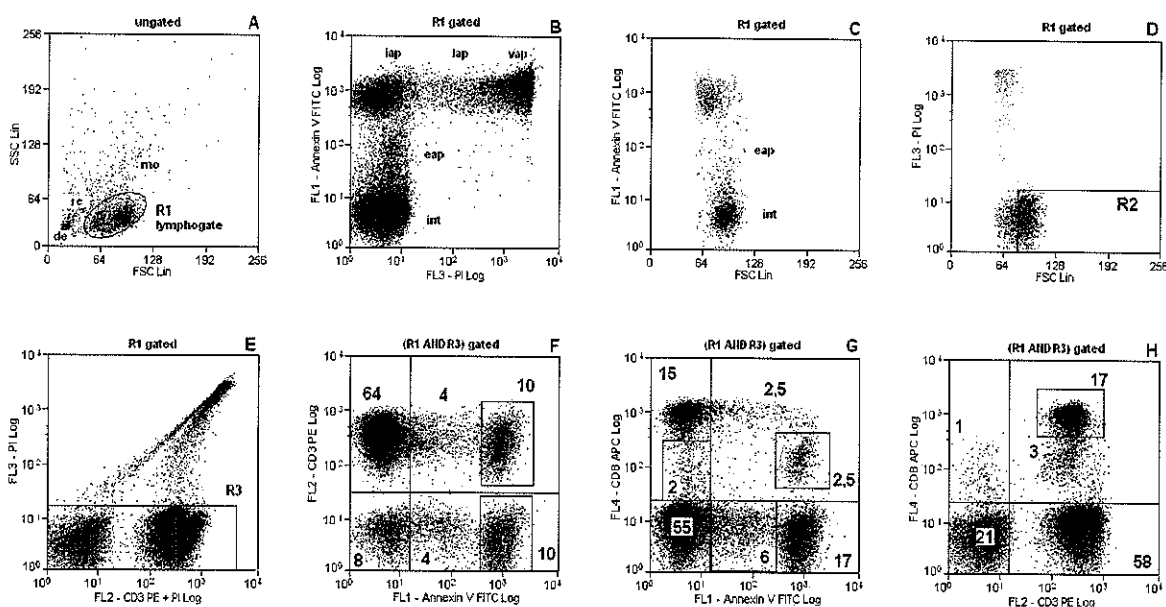
jodid ( $A^{\text{high}}PI^-$ ). V pozdní fázi apoptózy se stávají buňky propidium jodid pozitivní a jsou buď pozdně apoptické nebo velmi pozdně apoptické s expresí  $A^{\text{high}}P^{\text{low}}$  a  $A^{\text{high}}PI^{\text{high}}$ . Dvouparametrový dot-plot histogram ukazující velikost buněk proti fluorescenci buď AnnexinV-FITC (FL1, obr.11C) nebo PI (FL3, obr.11D) dokazuje zmenšení buněčného objemu, ke kterému dochází ve stádiu časné apoptózy (obr.11C). Toto není tak triviální nález, neboť díky tomuto gatování pro větší  $PI^-$  buňky (R2 na obr.11D) je možné odděleně analyzovat četnost a fenotyp intaktních lymfocytů slabě kontaminovaných buňkami v nejčasnějším stádiu apoptózy bez použití Annexin V-FITC, což při rozsáhlých experimentech ušetří čas a peníze a umožňuje použít další fluorescenční kanál pro imunofenotypizaci. Jak se dá očekávat, všechny buňky v konečném stádiu apoptózy ( $PI^{\text{high}}$ ) jsou menší než intaktní lymfocyty (obr.11D).

PI emituje světlo do obou kanálů FL2 a FL3 (obr.11E) a dvojitá imunofenotypizace povrchových znaků se tak stává nemožná pro  $PI^+$  buňky při použití našeho protokolu pro vícebarevné značení na průtokovém cytometru FACSCalibur. Pokud jsou pozitivní buňky v kanálu FL3 vyloučeny z analýzy (R3 v obr.11E), mohou se definovat lymfocytární subsety podle povrchové exprese dvou vybraných znaků a vyjádřit jejich relativní zastoupení v intaktní, časné a střední apoptické populaci, jak je ukázáno na obr.11F-H. Jak je ukázáno na obr.1B, velmi malý počet  $PI^+$  buněk nevázájících na sebe žádné nebo velmi malé množství Annexinu V, byly přítomny ve všech sledovaných vzorcích, což je ve shodě s již dříve publikovanými daty dokazujícími, že apoptóza je převažujícím mechanismem buněčné smrti po ozáření  $\gamma$ -zářením.

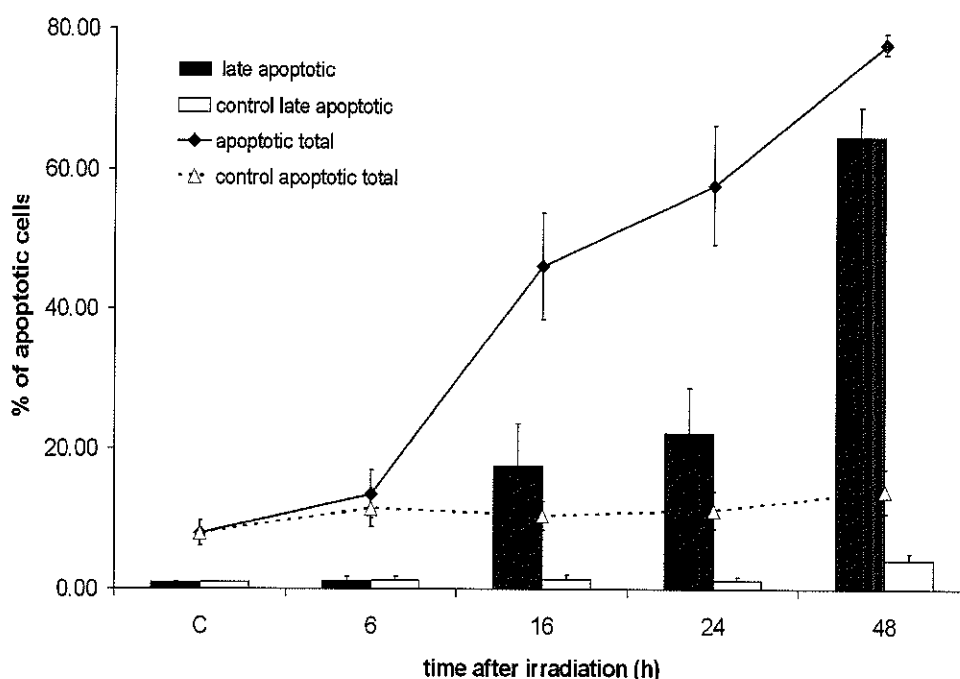
Annexin V a vazba monoklonální protilátky potvrzuje u CD8 ( a CD4, data zde nejsou ukázána) snížení denzity exprese v průběhu apoptického procesu, jak je popsáno Philippé et al. (1997). V rozporu s jejich daty jsme nepozorovali skoro žádný pokles vazebné kapacity protilátky k CD3 v nejčasnějších fázích apoptózy ( srovnej obr.1F a G, také patrné na obr.11H).

Lymfocyty z periferní krve kultivované in vitro a značené dvěma protilátkami, Annexinem V a propidium jodidem, představují poměrně složitý komplex. Kromě toho, krátkodobá životnost vybraného apoptického subsetu záleží na trvání jeho existence a na velikosti celé předchozí populace, která se mění s časem. Proto tedy analýza lymfocytárních subsetů v různých stádiích

apoptózy není jednoduchá a experimentální data musí být opatrně interpretována.

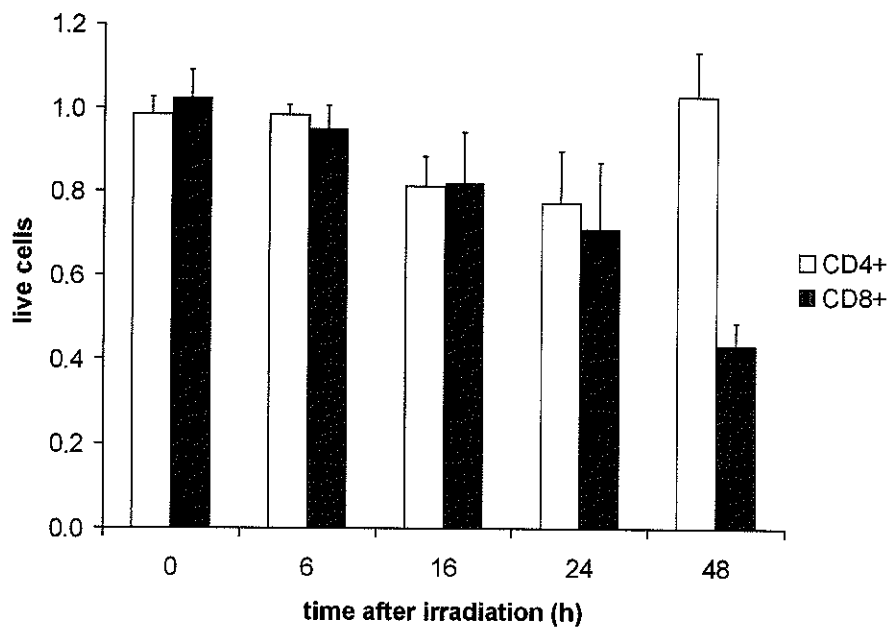


Obr.č.11: Víceparametrová flow cytometrická analýza *in vitro* ozářených (20Gy) a následně kultivovaných (16h) lidských mononukleárních buněk značených monoklonální protilátkou anti-CD3/PE a anti-CD8/APC a obarvených Apoptestem™. Lymphogate (R1 v A) byl nastaven tak, aby zahrnoval všechny lymfocyty a vyloučil debris (de), většinu erytrocytů (er) a neadherentní monocyty (mo) z analýzy. Fluorescence Annexin-V/FITC versus PI (dot plot B) ukazuje rozlišení, jak intaktních (int) a časně apoptických (eap), tak i buněk ve střední (iap), pozdní (lap) a velmi pozdní fázi (vap) apoptózy. Velikost (FSC) versus Annexin V/FITC a PI je ukázána v C a D, PI-negativní buňky (R3 v E) jsou znázorněny jako černé tečky, zatímco PI-positivní (buňky vně R3 v E) jsou šedivé. Propidium iodid emituje do obou FL2 a FL3 kanálů (E) a dvojitě pozitivní povrchová imunofenotypizace tak může být hodnocena pouze v PI-negativní populaci (R3) na FACSCaliburu. V gated propidium negativních buněk (logický gate R1 AND R3) se analyzují procenta lymfocytárních subsetů a denzita exprese povrchových znaků v intaktní, časně a střední fázi apoptózy, jak je znázorněno ve F, G a H, kde jsou relativní hodnoty jednotlivých lymfocytárních subpopulací rozlišitelné na základě povrchového fenotypu a vazby Annexinu. V A, C a D je ukázáno 2 000 buněk, B, E, F, G a H obsahují všechny buňky v logickém gate definovaném na začátku obrázku



Obr.12: Relativní zastoupení všech apoptických buněk ( $A^+$ , čárový graf) a buňky v pozdní nebo ve velmi pozdní fázi apoptózy ( $A^+PI^+$ , sloupce) ozářených 7Gy (plná čára a sloupce) a neozářené kontroly (přerušovaná čára, prázdné sloupce) lymfoidních buněk v různých časových intervalech *in vitro* kultivace. Jsou udány průměrné hodnoty ze čtyř měření  $\pm$  SD.

Obr.12 ukazuje, že po 6h kultivaci, ozářené buňky nebyly odlišitelné od kontrol co se týče procesu apoptózy. Jak ozářený vzorek, tak neozářená kontrola obsahují méně jak 10%  $A^+$  buněk. Mimo to, časně apoptické buňky ( $A^+PI$ ) silně převažují nad pozdně apoptickými. O 10h později byl již jasný rozdíl mezi ozářenými a neozářenými vzorky. Procento apoptických buněk v kontrolách se během kultivace slabě zvyšuje a dosahuje maxima 10%. Vždy převažují buňky časně apoptické. Mohutná apoptóza spojená s povrchovou expresí fosfatidylserinu a ztrátou membránové integrity se vyskytuje u ozářených vzorků po 16 a 24h trvající kultivaci. Kolem poloviny buněk v lymfogatu váže Annexin V a velikost časného a pozdně apoptického subsetu je skoro stejně velká. Na druhé straně většina všech buněk byla apoptická a pozdně apoptická populace silně převažovala dva dny po ozáření.



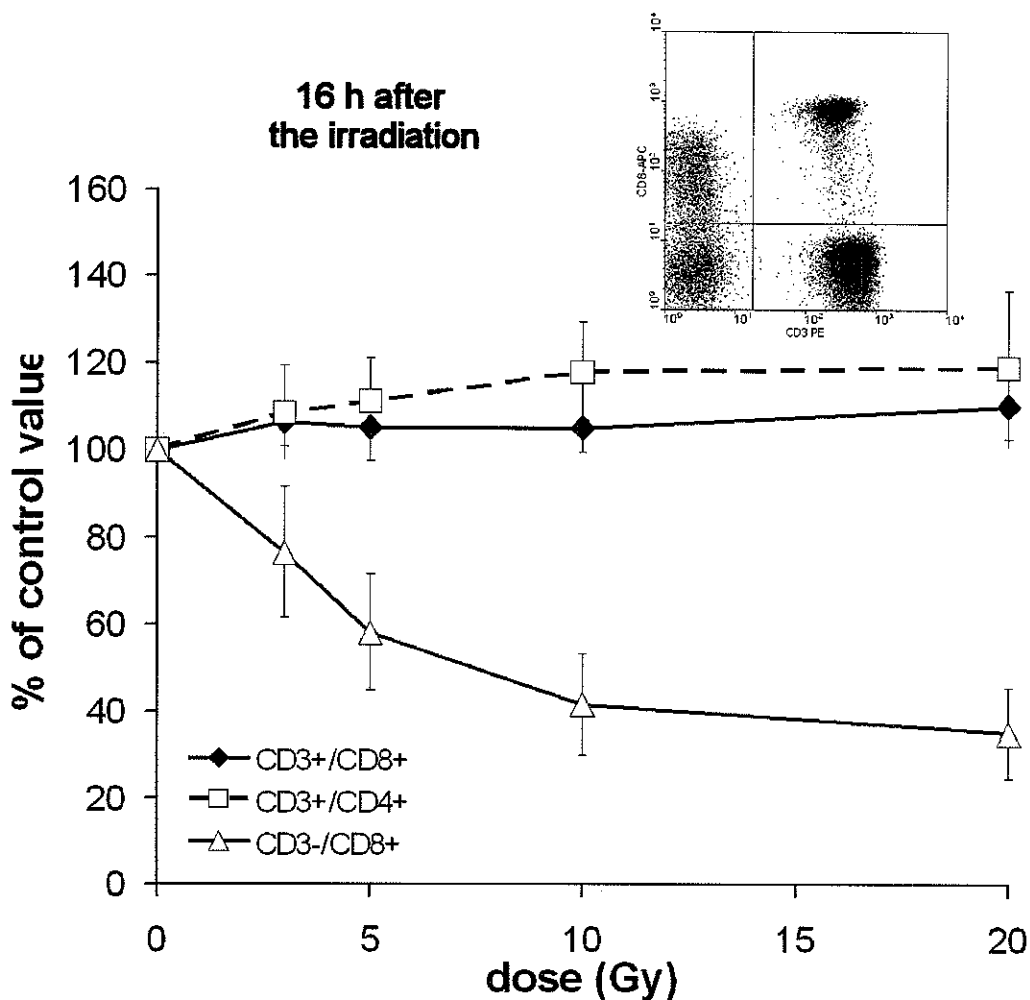
Obr.13: Srovnání radiorezistence CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (prázdné sloupce) a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (plné sloupce) lymfoidních buněk. Buňky byly ozářeny 7Gy a kultivovány v uvedených intervalech. Podíl intaktních (A<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) buněk s definovaným povrchovým fenotypem u ozářených a neozářených vzorků byl vypočten u všech intervalů inkubace. Průměrná hodnota je získána ze čtyř měření ± SD

Obr 13. srovnává radiorezistenci CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> a CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> lymfocytárních subsetů ve stejném experimentu. V intaktním buněčném kompartmentu (Ann<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>), byl vypočten podíl každého ze subsetů – ozářeného 7 Gy a neozářeného, a vypočtené hodnoty se porovnávali v jednotlivých časových intervalech.

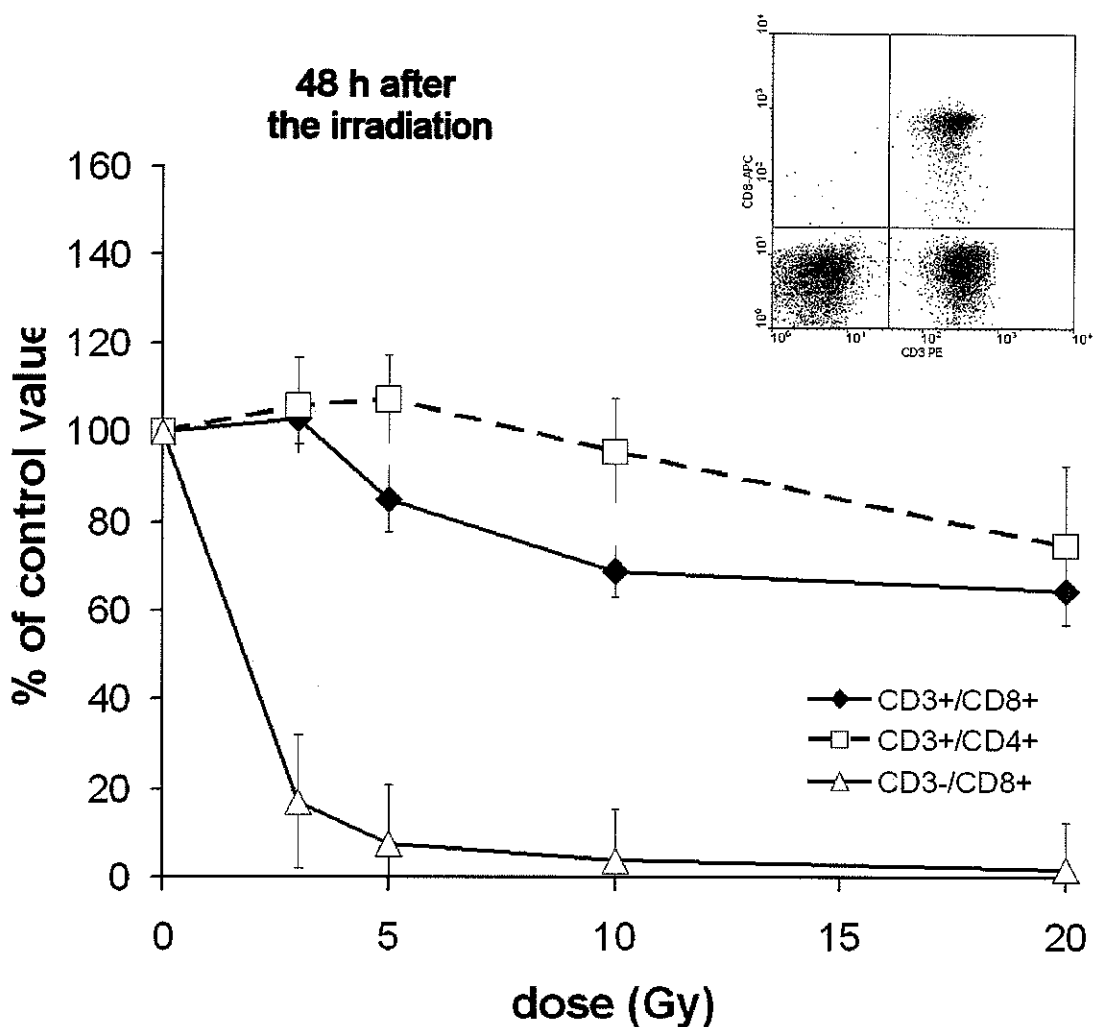
Tento výpočet by vybrán k normalizaci relativních hodnot dvou vybraných lymfocytárních subsetů u individuálních dárců a k eliminaci možných rozdílů v senzitivitě lymfocytárních subsetů k in vitro kultivaci. Pokud jde o radiorezistenci, není pozorován signifikantní rozdíl mezi CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> a CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> během prvního dne kultivace. Naproti tomu, po 48hodinové kultivaci přítomnost radiorezistentního CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> subsetu může být vysvětlením větší velikosti CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> buněk v ozářených kulturách.

Analýza buněčného fenotypu v A<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> kompartmentu neposkytuje v závislosti na velikosti dávky signifikantní rozdíly v počtu buněk vybraného fenotypu. Buňky jako takové představují pouze přechodnou apoptickou populaci s dosud neznámou dobou existence a jejich množství záleží na

postupně se snižujícím počtu intaktních buněk. Analýza pouze A<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> buněk nemůže reprezentovat spolehlivý biodozimetrický parametr při použitých experimentálních podmínkách. Na základě těchto výsledků popisujících časovou závislost na rozvoji apoptózy lymfocytů ozářených 7 Gy a přežití subsetu CD4/CD8, byly vybrány pro další studium dávkové závislosti intervaly 16 a 48h kultivace.



Obr. 14: Dávková závislost vybraných lymfocytárních subsetů po 16h kultivace *in vitro*. Počet intaktních CD3+CD4+ T buněk (prázdné čtverečky), CD3+CD8+ T buněk (černé kosočtverce) a CD3-CD8+ NK buněk (prázdné trojúhelníky) v ozářených vzorcích byl vydělen relativním počtem buněk v neozařených kontrolách, vypočtené hodnoty byly převedeny na procenta a vyneseny do grafu proti velikostem radiačních dávek. Průměrné hodnoty jsou získány ze 6 vzorků  $\pm$  SD. Vložený obrázek v pravém horním rohu ukazuje typický dvoupřímý dot-plot histogram exprese CD3 proti CD8 v A<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> populaci vzorku ozářeném 5Gy po 16h kultivaci.



Obr. 15: Dávková závislost vybraných lymfocytárních subsetů po 48h kultivaci in vitro. Počet intaktních CD3+CD4+ T buněk (prázdné čtverečky), CD3+CD8+ T buněk (černé kosočtverce) a CD3-CD8+ NK buněk (prázdné trojúhelníky) v ozářených vzorcích byl vydělen relativním počtem buněk v neozařených kontrolách, vypočtené hodnoty byly převedeny na procenta a vyneseny do grafu proti velikostem radičních dávek. Průměrné hodnoty jsou získány ze 6 vzorků ± SD. Vložený obrázek v pravém horním rohu ukazuje typický dvouparametrový dot-plot exprese CD3 versus CD8 v A<sup>PI</sup> populaci vzorku ozářeném 5G 48h kultivace.

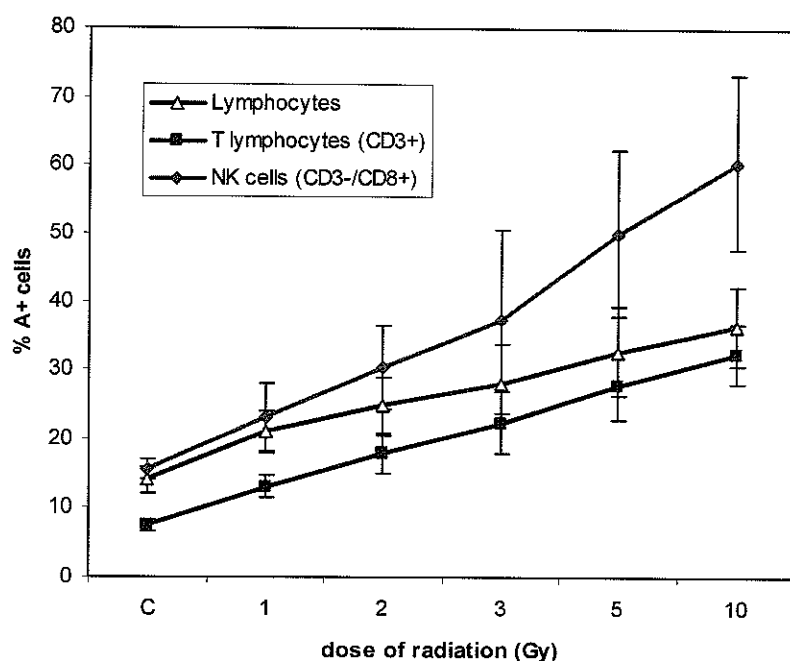
Jak je ukázáno na obr.11, víceparametrová flow cytometrická analýza nabízí několik možností, jak studovat indukci apoptózy v ozářených lymfocytech. V biodozimetrické části naší práce jsme pokračovali v analýze intaktních (A<sup>PI</sup>) buněk ve snaze identifikovat lymfocytární subsety nebo povrchové znaky, které by byly využitelné jako biomarkery obdržené dávky.



Mononukleární buňky izolované od 6 dárců byly analyzovány z hlediska přežívající lymfoidní populace s povrchovou fenotypizací CD3 proti CD8 a CD3 proti CD4. Proporcionální změny intaktních lymfocytů označených CD3+CD4+ (pomocné a regulační T lymfocyty), CD3+CD8+ (cytotoxické T lymfocyty) a CD3-CD8+ (subset NK buněk) na velikosti dávky záření po 16h kultivaci jsou ukázány na obr.14, po 48h kultivaci na obr.15. V každém ozářeném vzorku mononukleárních buněk byl relativní počet intaktních buněk (API) s vybraným povrchovým fenotypem dělen počtem jejich neozářeného protějšku. Získaná data eliminují rozdíly mezi dárci v relativních hodnotách sledované lymfocytární populace a kvantifikují vzestup apoptózy v ozářených vzorcích proti spontánní apoptóze neozářených vzorků.

Se zvyšující se dávkou byl pozorován trend k vyššímu přežití CD4+ buněk v rámci CD3+ populace 16 a 48h po ozáření. Statistická analýza však nedokázala signifikantní rozdíl mezi dvěma hlavními T buněčnými subsety. Naproti tomu, čísla NK buněk exprimující CD8 na svém povrchu (CD3-CD8+ lymfocytární populace) ukazují jednoznačnou závislost relativního poklesu CD8+NK na radiční dávce.

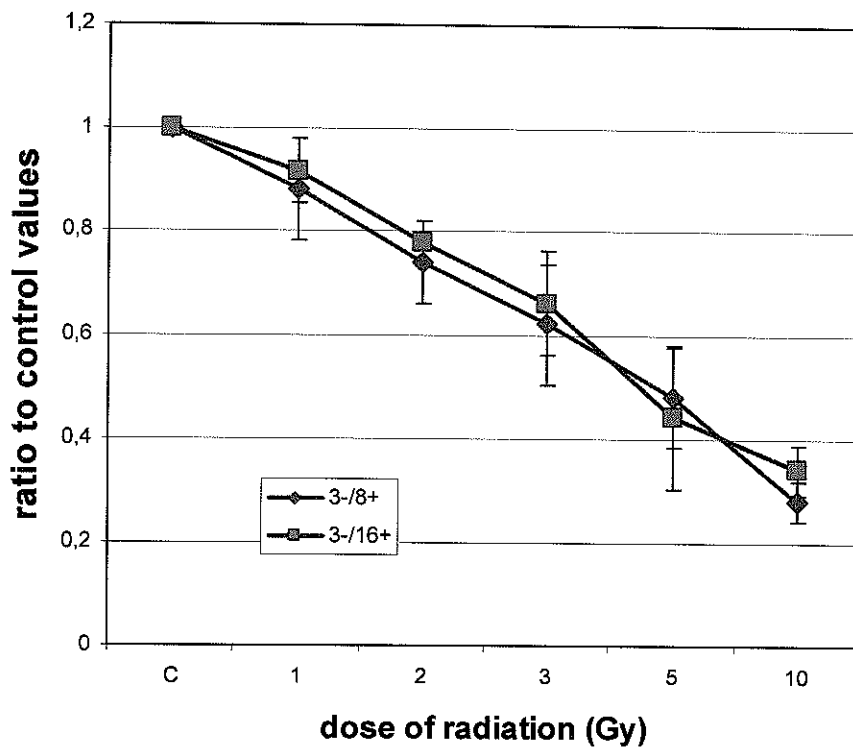
Dvoupřímé dot-plot histogramy vložené do obr.14 a 15 reprezentují typický profil CD3 proti CD8 intaktní (API) lymfocytární populace ve vzorcích ozářených 5Gy a kultivovaných 16 a 48h. Vyšší radiční dávky a prodloužená kultivace mění tento profil silnou redukcí nebo úplným chyběním CD3-CD8+ buněk a profily ozářených buněk mohou být tak opticky identifikovány. Srovnání grafů na obr.14 a 15 naznačuje, že velikost CD3-CD8+ NK buněčné populace v kultivovaných vzorcích by se mohla využít jako významný biodozimetrický marker v obdržené dávkové expozici. Stručně by se dalo říct, že 16h kultivace in vitro může být diskriminátorem mezi subletální a letální obdrženou dávkou záření (pokles pod 50% indikuje dávku nad 5Gy), zatímco dvoudenní kultivace informuje o expozici nízkými dávkami (pod 3Gy).



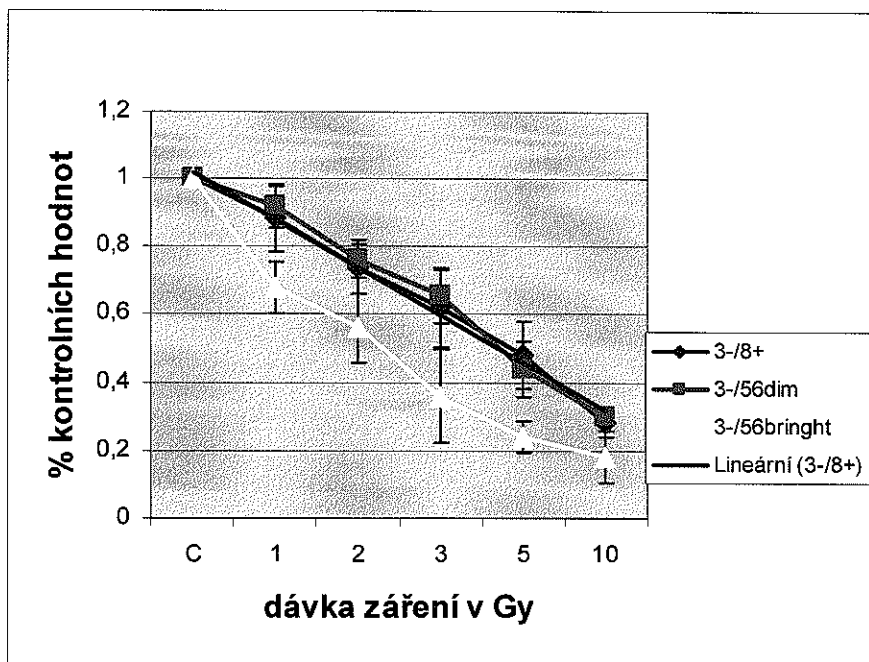
Obr.č.16: Srovnání dávkové závislosti exprese Annexinu V u všech lymfocytů, T lymfocytů (CD3+) a NK buněk (CD3-/CD8+) 16 hodin po ozáření dávkami 1-10 Gy.

Z obrázku č. 16 je patrné, že největší indukci apoptózy jsme pozorovali u NK buněk, tudíž, že tyto buňky jsou k ozáření citlivější než T-lymfocyty. V případě, že jsme sledovali jako indikátor dávky záření pokles počtu NK buněk v gatu živých buněk 16 hodin po ozáření, získali jsme stejné výsledky se sledováním znaků CD3-/CD8+ nebo CD3-/CD16+ (obr. č.17a). Z obrázku je patrný dávkově závislý pokles počtu NK buněk v rozmezí 1-10 Gy.

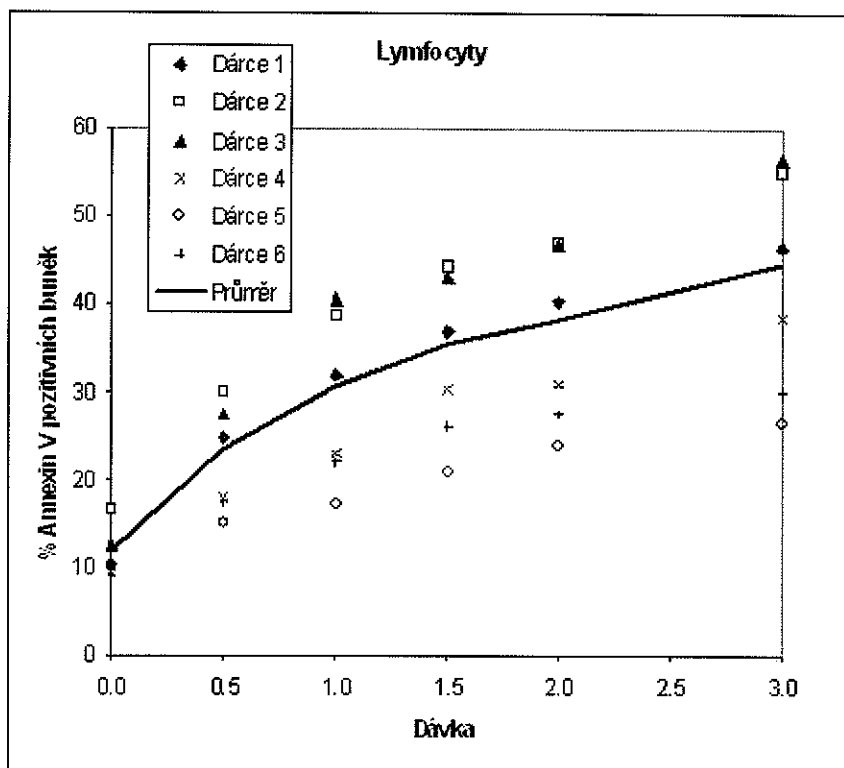
Vzhledem k tomu, že za 16 hodin po ozáření dávkami do 3 Gy byl patrný pouze malý pokles relativního zastoupení NK buněk v populaci živých A<sup>-</sup> lymfocytech, v dalších experimentech jsme toto zastoupení sledovali za 48 hodin po ozáření. Zatímco v indukci apoptózy u lymfocytů, T-lymfocytů i NK buněk byly velké individuální rozdíly, prakticky lineární odpověď na malé dávky záření jsme získali při hodnocení relativního poklesu počtu NK buněk v subpopulaci A<sup>-</sup> buněk. Z hlediska in vitro experimentů tento ukazatel velmi dobře (lineárně) hodnotí obdrženou dávku záření v rozmezí 0,5-2 Gy (obr.č.17b).



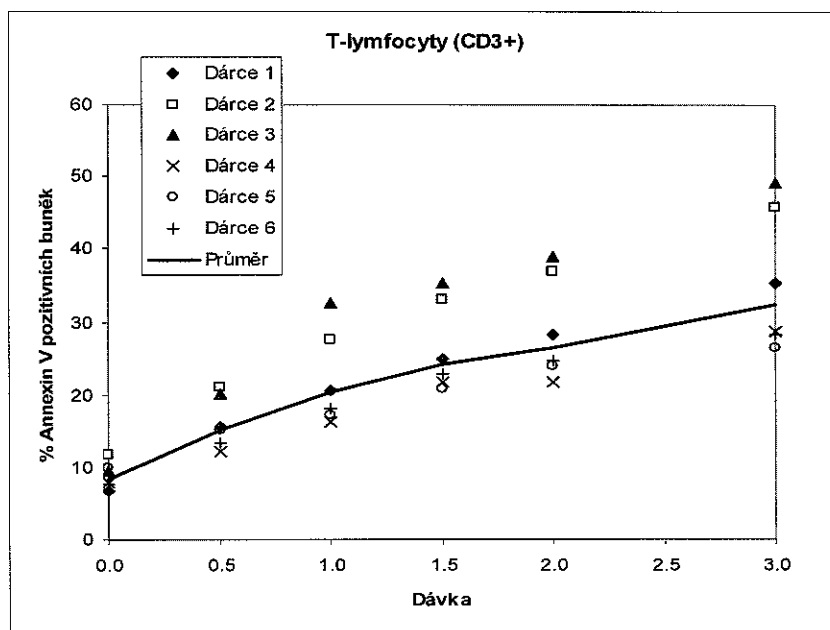
Obr.č.17a: Pokles počtu NK buněk (v populaci A<sup>-</sup>buněk) 16 hodin po ozáření stoupajícími dávkami 1-10 Gy. Srovnání subpopulace CD3-/CD8<sup>+</sup> a CD3-/CD16<sup>+</sup>



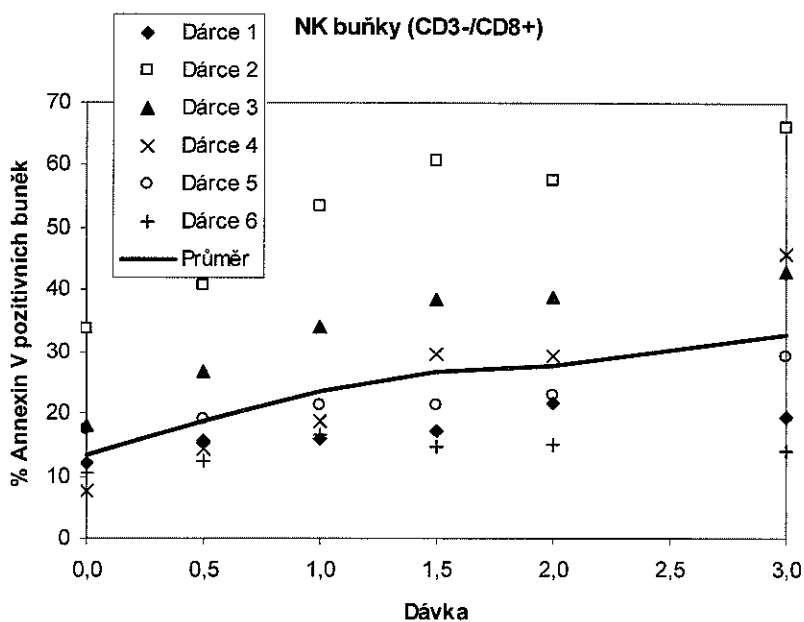
Obr.č.17b: Pokles počtu NK buněk (v populaci A<sup>-</sup>buněk) 16 hodin po ozáření stoupajícími dávkami 1-10 Gy. Srovnání subpopulací CD3-/CD56<sup>high</sup> a CD3-/CD56<sup>low</sup>



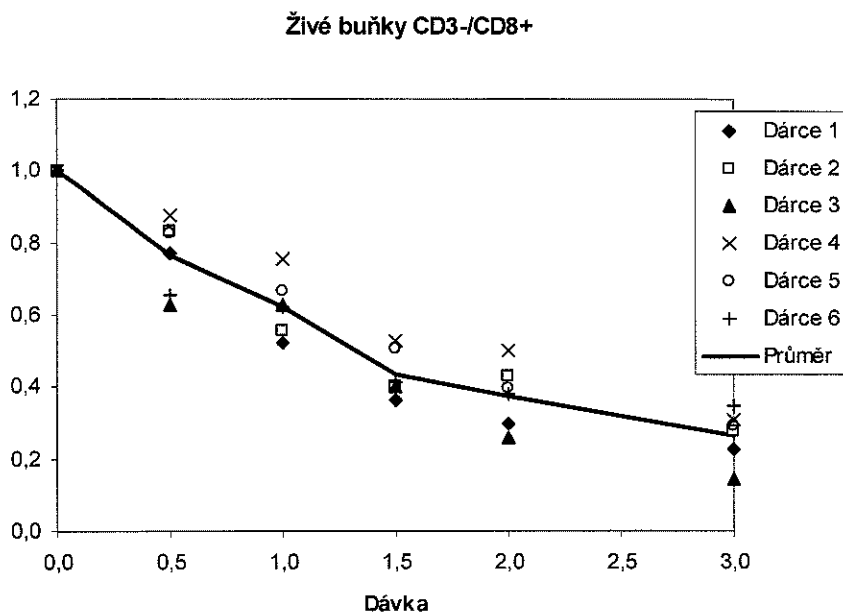
Obr.č.18 : Indukce apoptózy lidských lymfocytů 48 h po in vitro ozáření dávkou 0,5-3 Gy.



Obr.č.19 : Indukce apoptózy lidských T-lymfocytů 48 h po in vitro ozáření dávkou 0,5-3 Gy.



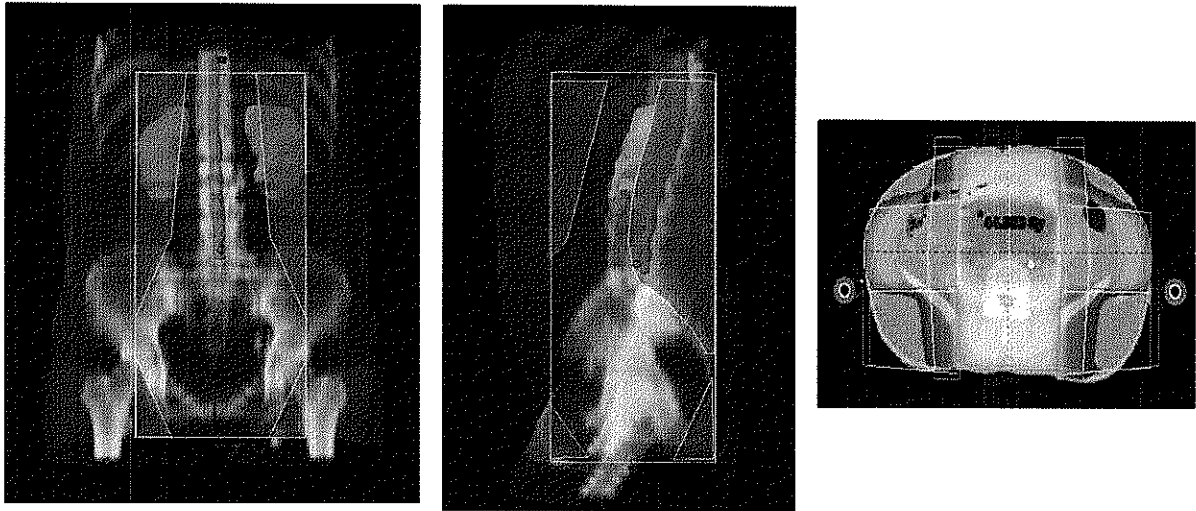
Obr. č.20.: Indukce apoptózy lidských NK buněk 48 h po in vitro ozáření dávkou 0,5-3 Gy



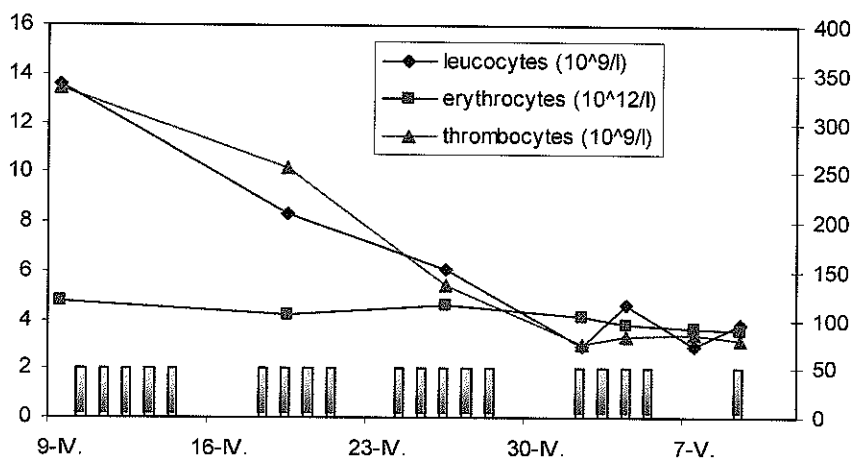
Obr.č.21.: Pokles počtu NK buněk (CD3-/CD8+) v populaci A<sup>+</sup> buněk 48 hodin po ozáření stoupajícími dávkami 0,5-3 Gy.

#### 4.4. INDUKCE APOPTÓZY U LYMFOCYTŮ PO OZÁŘENÍ IN VIVO

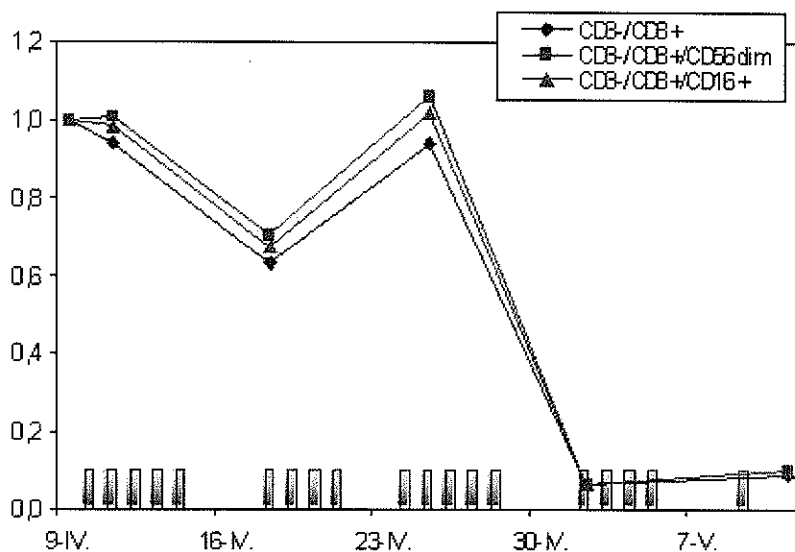
V další části naší práce jsme sledovali výše uvedené ukazatele u pacientky J. ozařované na oblast břicha frakcionovaně (2 Gy/frakci) do celkové dávky 38 Gy. Na obrázku č.22 je znázorněno ozařovací pole. Pacientka J. byla ozařována pro karcinom cervix uteri na lineárním urychlovači fotony s energií 6 MV. Původně plánovaná dávka 44 Gy byla vzhledem ke zdravotním komplikacím pacientky redukována na 38 Gy. Na obrázku č. 23 je znázorněn pokles krevních elementů se stoupající kumulativní dávkou záření. Po celou sledovanou dobu nebyly pozorovány změny počtu erytrocytů. Po 7. frakci (14 Gy) došlo k výraznému poklesu především leukocytů. Po 12. frakci (24 Gy) klesly leukocyty i trombocyty na třetinu výchozích hodnot a na této hodnotě se držely až do konce ozařování. Relativní zastoupení NK buněk v gatů Annexin V negativních buněk nám poskytlo méně informací než při jejich studiu in vitro. Hluboký pokles byl patrný až po 12. frakci (24 Gy) (obr.č.24). Při studiu A<sup>+</sup> buněk jsou zajímavé již výchozí hodnoty NK buněk (obr.č.26, 27). Zatímco počty A<sup>+</sup> buněk u lymfocytů před ozáření se pohybují okolo 10%, v případě NK buněk je apoptických 30%, resp 40% po inkubaci 24 hodin. Počet A<sup>+</sup> NK buněk pravděpodobně souvisí s nádorovým onemocněním. Počet A<sup>+</sup> lymfocytů se zvyšoval se stoupající kumulativní dávkou až na 25% po 30 Gy. Vzestup až na 65% jsme však pozorovali při inkubaci lymfocytů 24 hodin v termostatu při 37°C. 2 dny po poslední frakci už A<sup>+</sup> lymfocyty nebyly přítomny. Jiná situace byla u NK buněk. Zde došlo také v jejich vzestupu až na 60% po 12ti Gy. 24 h inkubace v termostatu pozitivitu na A ještě prohloubila a prakticky celé sledované období byly NK buňky z 80% Annexin V pozitivní.



*Obr.č. 22. Ozařovací pole pacientky J. Celkově byla ozářena dávkou 38 Gy (původní plán byl 44 Gy).*

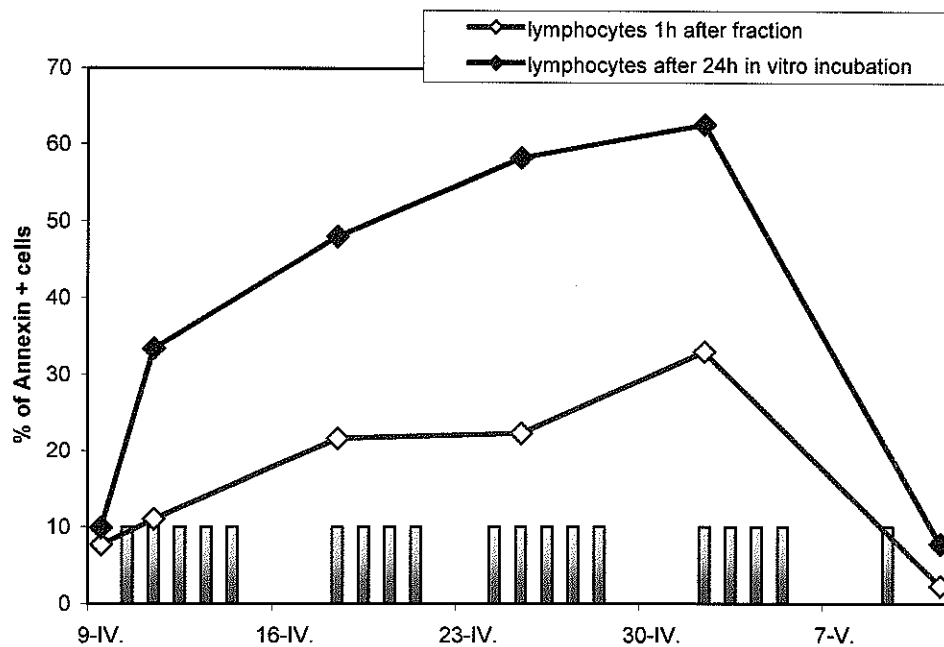


Obr.č.23: Změny krevních elementů v časové závislosti u pacientky J. (sloupečky představují vždy dávku záření 2 Gy)

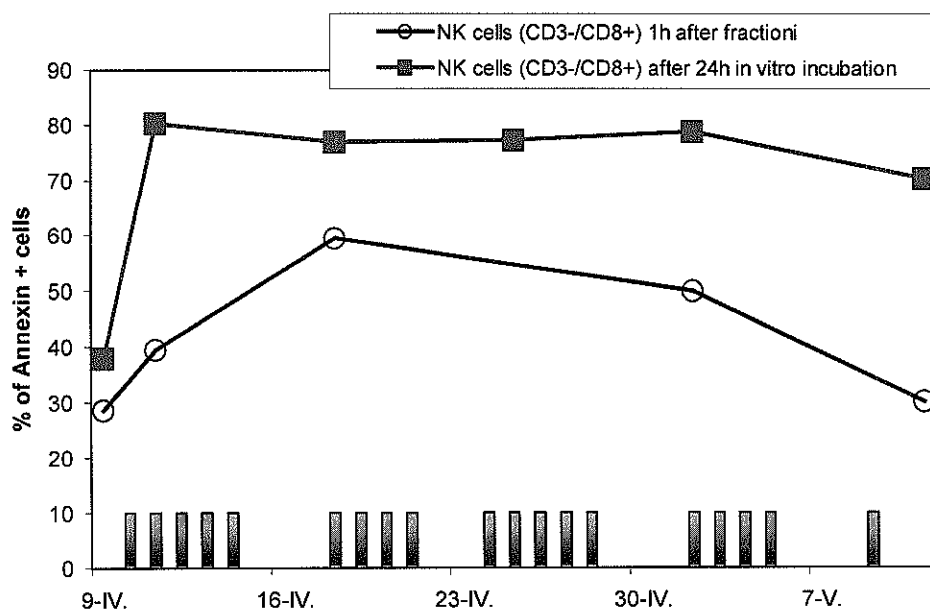


Obr.č.24: Změny počtu NK buněk v závislosti na čase u pacientky J. (sloupečky představují vždy dávku záření 2 Gy).





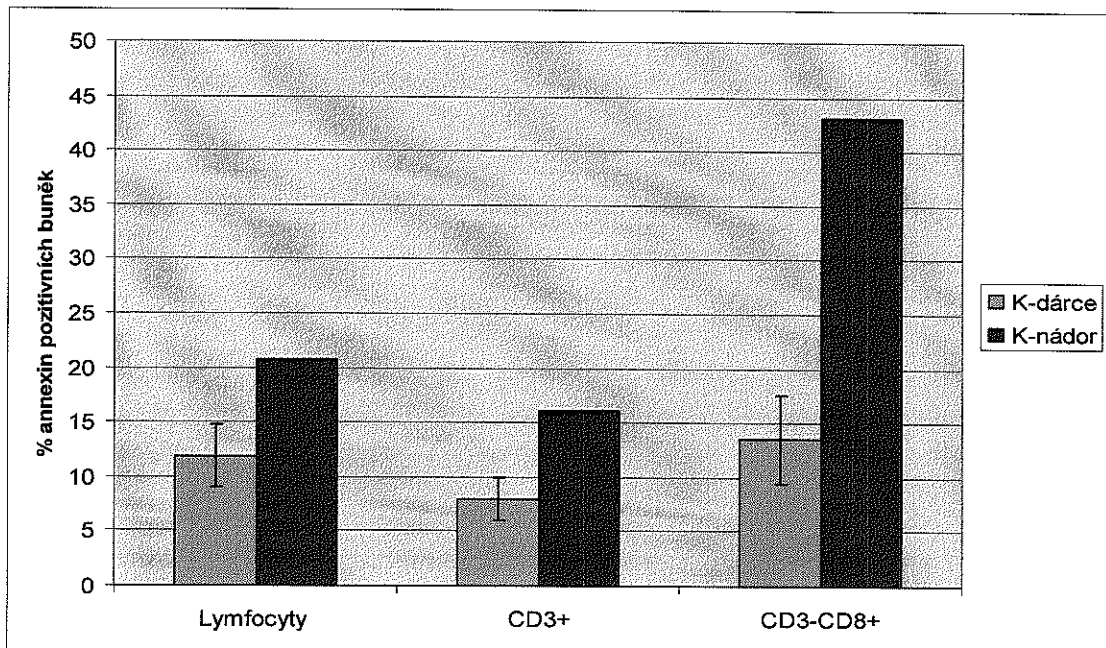
Obr.č. 25 : Vzestup počtu  $A^+$  lymfocytů po frakcionovaném ozáření pacientky J. 1 hodinu po ozáření (světle modrá křivka) a po 24 h in vitro inkubaci v termostatu (tmavě modrá křivka)



Obr.č.26: Vzestup počtu  $A^+$  NK buněk po frakcionovaném ozáření pacientky J. 1 hodinu po ozáření (tmavě fialová křivka) a po 24 h in vitro inkubaci v termostatu (světle fialová křivka)

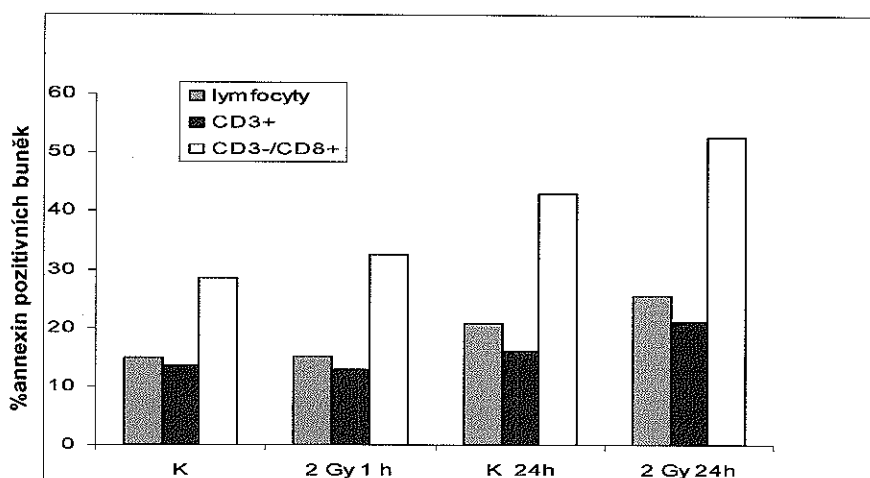
Počet NK buněk jsme sledovali u 4 nádorových pacientek před ozáření a po ozáření jednou frakcí fotonového záření (2 Gy) na relativně malou oblast břicha. Z obrázku č. 27 je zřejmé, že po ozáření u nádorových pacientů je zvýšen především počet apoptických NK buněk (Annexin V pozitivních buněk) ve srovnání se zdravými dárci krve.

Na obrázku č.28 jsou zaznamenány výsledky 4 pacientek s karcinomem endometria a čípku děložního ozařovaných na oblast břicha tzv. box technikou. Z obrázku je patrné, že parciální ozáření 2 Gy vede k mírnému (nesignifikantnímu) vzestupu Annexin pozitivních NK buněk především po 24 h inkubaci in vitro.

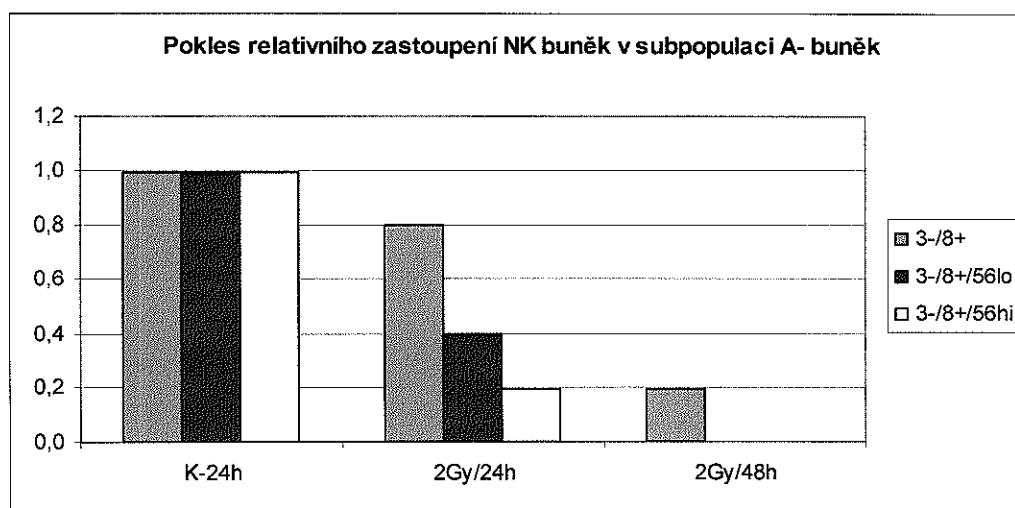


*Obr.č.27: Srovnání % apoptických buněk u zdravých dárců a pacientek s nádorem endometria. Z obrázku je patrný nejvyšší vzestup indukce apoptózy u NK buněk pacientů s nádory ve srovnání se zdravými dárci krve. Vzestup apoptózy u lymfocytů i T lymfocytů byl méně patrný.*

Při studiu relativního zastoupení NK buněk v subpopulaci A<sup>-</sup> buněk jsme u pacientky po celotělovém ozáření pozorovali významný pokles, především až v delším intervalu (48 h po in vitro inkubaci).



Obr.č. 28: Indukce apoptózy lymfocytů a NK buněk u pacientek s nádory endometria před a po ozáření malé oblasti břicha (box) 2 Gy. Z obrázků je patrné, že dávka 2 Gy na relativně malou oblast břicha vede k vzestupu počtu apoptických NK buněk. U lymfocytů i T lymfocytů je vzestup po ozáření nevýrazný. Odpověď na ozáření je velmi nehomogenní.



Obr.č. 29: Pokles relativního zastoupení NK buněk (CD3-/CD8+) a jejich subpopulací CD56<sup>low</sup> a CD56<sup>high</sup> po in vivo celotělovém ozáření pacientky dávkou 2 Gy. Z obrázků je patrné, že celotělová dávka 2 Gy vede k poklesu počtu NK buněk za 24 a především za 48 h po ozáření. Populace CD56<sup>high</sup> se zdá být citlivější než populace CD56<sup>low</sup>.

## 5. DISKUSE

---

Rychlé stanovení obdržené dávky záření pomocí biologické dozimetrie má zásadní význam pro výběr nejefektivnější terapie ozářených osob při radiačních nehodách. V naší práci jsme jako modelu pro studium dávkové závislosti jednotlivých ukazatelů použili modelové leukemické linie HL-60 a MOLT-4. Ke konečnému hodnocení obdržené dávky byly experimenty provedeny na lidských lymfocytech od zdravých dárců krve ozářených in vitro a dále pak ozářených in vivo v průběhu radioterapie pacientů s nádory.

Jak buňky leukemických linií HL-60 a MOLT-4, tak kmenové buňky krvetvorby jsou schopny po ozáření stoupající dávkou záření tvořit kolonie na polotekuté vrstvě metylcelulózy. Z křivek závislosti vytvořeného počtu kolonií na obdržené dávce je počítána hodnota  $D_0$  (dávka záření, po které přežívá 37% buněk). V našich vlastních pracech (Vávrová et al 2002, 2004) se ukázalo, že buňky lidské leukemické linie HL-60 jsou radiorezistentnější ( $D_0=2,2$  Gy) než kmenové buňky krvetvorby CD133<sup>+</sup> izolované z periferní krve zdravých dárců po mobilizaci, kdy pro CFU-GM bylo  $D_0 = 1,08$  Gy a pro BFU-E 0,95 Gy. Nejcitlivější k účinku ionizujícího záření byla linie lidské T lymfocytární leukémie MOLT-4, u které jsme hodnotu  $D_0$  stanovili 0,87 Gy (Vávrová et al. 2004). Zatímco leukemické linie jsou buňky rychle se dělící (s časem zdvojení 24 hodin), kde v S fázi je přítomno 40-45% buněk, kmenové buňky krvetvorby (CD133<sup>+</sup>) vyplavené do periferní krve po mobilizaci G-CSF jsou prakticky všechny v  $G_0$  fázi. V naší práci došlo v přítomnosti kombinace cytokinů SCF+IL3+FLT3L k jejich expanzi. U neozářených CD133<sup>+</sup> buněk v přítomnosti SCF+IL3+FLT3L za 14 dní jejich počet stoupl 120x (Vávrová et al. 2002).

Sledovali jsme průběh buněčného cyklu neozářených i ozářených buněk. V den separace byly prakticky všechny buňky vyplavené do periferní krve v  $G_0/G_1$  fázi buněčného cyklu. Pod vlivem cytokinů buňky proliferovaly, za 24 hodin bylo v S fázi 5% buněk a za 168 hodin 35% buněk. Jiná byla situace u ozářených buněk. Za 25 hodin po ozáření jsme prokázali 60% buněk se subdiploidní DNA, což podle našich výsledků na modelové linii HL-60 ukazuje buňky zadané do apoptózy. Počet apoptických buněk se zvýšil na 80% 72

hodin po ozáření. Za 72 hodin po záření z 20% buněk, které byly v této době většinou ještě v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu, bylo 5% v S fázi. Za 7 dní byly prakticky všech apoptické buňky eliminovány z kultury a buněčný cyklus byl v této době srovnatelný s neozářenými buňkami. Kmenové buňky krvetvorby tedy vstupovaly do apoptózy přímo z G<sub>0</sub> fáze buněčného cyklu.

Buňky modelové linie HL-60 – lidské promyelocytární leukémie – jsou z hlediska diferenciací buňky nezralé. Buňky byly CD34 a CD133 negativní (0,6; 0,7 %). 93% buněk HL-60 exprimovalo antigen CD15, 84% antigen CD33 a 82% buněk bylo CD15+/CD33+ (Mareková et al. 2000). Na rozdíl od kmenových buněk krvetvorby reagují buňky HL-60 na dávky záření do 10 Gy akumulací v G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu, kde reparují svoje poškození, což je také důsledkem jejich relativní radiorezistence ve srovnání s buňkami kmenovými, či s buněčnými liniemi MOLT-4. Zjistili jsme, že u linie HL-60 mohou být navozeny dva typy apoptické smrti, premitotická a postmitotická apoptóza. Ty se liší časem po ozáření, ve kterém se apoptóza objevuje, a dále pak specificitou buněčného cyklu. Dávky vyšší než 20 Gy vedou k rychlé DNA fragmentaci, objevující se již 4-6 hodin po ozáření. Buňky byly asynchronní a ukazuje se, že vstupují do apoptózy ze stejné fáze buněčného cyklu, ve které byly ozářeny. Tento typ smrti je klasifikován jako interfázová smrt nebo premitotická apoptóza. V kontrastu s tímto typem, po dávkách nižších než 10 Gy, byla smrt buněk spojená s DNA fragmentací patrna až po akumulaci buněk v G<sub>2</sub> fázi. 16-24 hodin po ozáření došlo k synchronizaci buněk v G<sub>2</sub> fázi buněčného cyklu a vznikl blok buněk v této fázi. Maximální indukce apoptózy byla pozorována za 48-72 hodin po ozáření. Tento fenomén může být klasifikován jako pozdní apoptóza nebo také postmitotická apoptóza, neboť nové buňky hynou paralelně s buněčným růstem (Mareková et al. 2003). Podobné výsledky na linii lidských monoblastických leukemických buněk U937 popsali Shinomiya et al. (2000).

Výsledky studia časové závislosti navození apoptózy ionizujícím zářením u buněk MOLT-4 ukazuje širokou rozdílnost v čase indukce a uskutečnění zářením navozené smrti buněk. Smrt nastává především oddálenou apoptózou a postmitotickou apoptózou. Výsledky naší práce ukázaly, že po dávkách do 5 Gy se apoptóza neobjevuje prvních 6 hodin po ozáření. Buňky se akumulují především v S fázi a méně v G<sub>2</sub> fázi. Po dávce 3 Gy bylo za 16 hodin 24%

buněk apoptických (sledováno podle subG<sub>1</sub> vrcholu), resp. 28% podle positivity na APO2.7 bez permeabilizace. Za 24 hodin po ozáření dávkou 3 Gy bylo APO2.7 pozitivních téměř 60% buněk. Stanovení apoptózy podle subG<sub>1</sub> vrcholu detekuje pouze časnou fázi apoptózy a z našich výsledků je zřejmé, že v této fázi apoptózy za 24 hodin po ozáření dávkou 3 Gy bylo pouze 35% buněk. V případě ozáření buněk vyšší dávkou záření 7,5 Gy se časná apoptóza objevovala již za 6 hodin po ozáření. Za 12 hodin bylo časně apoptických buněk 29% (subG<sub>1</sub> vrchol) avšak za 16 hodin bylo již celkem 55% apoptických buněk (APO2.7 bez permeabilizace). Za 24 hodin již byla většina buněk pozitivních na APO2.7 bez permeabilizace, což znamená, že v tuto dobu měly již buňky propustnou buněčnou membránu. Pouze 24 % buněk MOLT-4 po ozáření dávkou 4 Gy umírá apoptózou bez aberentního buněčného dělení (Endlich et al. 2000). Velká část buněk umírá až po aberentním dělení 18-30 hodin po ozáření. Proces končí vznikem apoptických tělísek a ke kolapsu buněk dochází za 36-60 hodin po ozáření dávkou 4 Gy (Endlich et al. 2000). Použijeme-li k hodnocení apoptózy u buněk MOLT-4 Apoptest, vidíme, že na rozdíl od krevních lymfocytů, u těchto leukemických buněk chybí populace A<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> buněk, které jsou označovány jako časně apoptické buňky. Je však možné odlišit buňky s nižší a vyšší expresí PI. Z časové závislosti exprese Annexinu V vyplývá, že maximum apoptických buněk je po dávce 3 Gy za 72 hodin po ozáření, za 6 dní již u této vysoké subletální dávky počet apoptických buněk klesá. Dávka 7,5 Gy je dávkou absolutně letální, již za 24 h jsou prakticky všechny buňky Annexin V pozitivní. Jak vyplývá z přiložených výsledků, indukce apoptózy měřená za 16, případně 24 hodin pomocí APO2.7 nebo Annexinu V, je u této buněčné linie dobrým ukazatelem obdržené dávky v rozmezí 0,2-5 Gy. Naopak při sledování subG<sub>1</sub> vrcholu vidíme po ozáření konstantní 20-30% populaci časně apoptických buněk (Szkanderová et al. 2003), které se velmi rychle rozpadají a flow-cytometrická analýza je již dále hodnotí jako nekrotické buňky.

Z hlediska molekulárních mechanismů si je třeba uvědomit, že buňky HL-60 jsou buňky bez funkčního TP-53 genu, což je gen regulující především indukci apoptózy z G<sub>1</sub> fáze. Zajímavé experimenty ve vazbě na protein p53 u IL-3 závislých buněk popsal Palacios et al. (2000). Buňky kostní dřeně od p53

–nulových myší byly 100 x rezistentnější k inhibitorům syntézy DNA jako je 5-fluoro-uracil, metotrexát a hydroxyurea, než buňky od stejných myší s funkčním wild-p53. V kontrastu s tímto pozorováním je odpověď těchto p53-0 myší na DNA-poškozující látky jako je ionizující záření, cisplatina nebo bleomycin, které byly na p53 nezávislé. Konstatovali, že p53-0, IL-3 závislé buňky mají prodlevu mezi DNA poškozením a indukcí apoptózy po ovlivnění nízkými dávkami DNA poškozujícími látkami (ionizující záření). Práce dokázala, že klonogenita IL-3 závislých buněk není po poškození DNA kontrolována TP53, což ukazuje, že pro tyto buňky existuje ještě alternativní cesta indukce apoptózy. Ukazují, že význam p53 je u těchto buněk krátkodobý, vedoucí buňky do apoptózy brzy po DNA poškozujícím stimulu. Protein p53 je důležitý pro indukci apoptózy u thymocytů v odpovědi na DNA poškození (Clark et al. 1993). Výsledky naší práce (Szkanderová et al. 2003) i práce dalších autorů (Nakano et al. 1999, Nakano et al. 2001) dokazují, že akumulace p53 časově předchází typickým apoptickým změnám, mezi které patří jaderná morfologie, fragmentace DNA (subG<sub>1</sub> vrchol) a štěpení laminu B.

Na druhé straně práce Gutiérrez et al.(2000), prokázala, že u wild-typu p53, IL3 závislých buněk kostní dřeně dochází po ozáření k vzestupu exprese CD95 (Fas) receptoru. Indukce Fas vede buňky do apoptózy po ozáření přes cestu závislou na p53. IL-3 kontroluje stupeň Fas exprese indukovanou přes p53. Drouet et al. (1999) popsali za 10 hodin po in vitro ozáření CD34<sup>+</sup> buněk koexpresi Fas/Fas-L. V naší práci jsme dokázali, že in vitro ozářené buňky CD133<sup>+</sup> izolovaných z periferní krve zdravých dárců po mobilizaci, vede za 24 hodin po ozáření dávkou 2,5 Gy, 80 % těchto buněk do apoptózy. Avšak, v přítomnosti kombinace cytokinů SCF+IL3+FLT3L, přežívajících 20% buněk je schopno se dále dělit a 7. den po ozáření je 35% buněk v S fázi buněčného cyklu. Za 14. dní se počet jaderných buněk při expanzi ex vivo buněk ozářených dávkou 2,5 Gy zvětšil 4,5x a počet CFU-GM 2x. Drouet et al. (1999) prokázali, že jsou –li buňky CD34<sup>+</sup> in vitro ozářeny dávkou 2,5-6 Gy a dále inkubovány v mediu bez přítomnosti cytokinů, 97% buněk podlehnou za 24 hodin apoptóze a za 48 hodin kompletně ztratí svoji funkčnost.

Naše výsledky prokázaly, že buňky MOLT-4 obsahují pouze wild formu p53 (Szkanderová et al. 2003). V případě, že ionizujícím zářením aktivovaná

apoptóza je navozena především přes tumor-supresorový protein p53, musí záření zvyšovat expresi proteinu p21. Je známo (Ljungman 2000), že tento protein je inhibitor  $G_1$  cyklin-dependentních kinas. Přes tento protein jsou buňky uvězněny na hranici  $G_1/S$  fáze. Za 6 hodin po ozáření dávkami 1-5 Gy byl patrný pokles počtu buněk v  $G_1$  fázi a naopak vzestup buněk v S fázi. V naší práci (Szkanderová et al. 2003) jsme prokázali vzestup p21 4-6 hodin po ozáření dávkou 7,5 Gy. Tomuto vzestupu předcházela vzestup p53 i vzestup fosforylované formy p53 na serinu 392. Nepřímo jsme tedy prokázali, že buňky mají funkční p53. Vztahem radiosenzitivity buněk MOLT-4 a množstvím p53 se zabývali Nakano a Shinohara (1999). Izolovali subklony těchto buněk s různou radiosenzitivitou. Subklon MOLT-4N1 je velmi radiosenzitivní ve srovnání s radiorezistentními MOLT-4N2. Neozářené MOLT-4N1 obsahovaly větší množství p53 a také větší množství TP53 mRNA než radiorezistentní MOLT-4N2. Ozáření vedlo k akumulaci p53 u obou linií, ale bylo větší u MOLT-4N1. V další práci (Nakano et al. 2001) se autoři zabývali otázkou, zda hlavní cesta, kterou je indukována apoptóza u buněk MOLT-4 ionizujícím zářením, je cesta přes protein p53. Vytvořili od MOLT-4 odvozený klon buněk s transfekovanou myší mutovanou p53 cDNA. Mutovaný p53 způsobil inhibici funkce wild typu p53. Ukázalo se, že po ozáření byl protein p21 zvýšen pouze u MOLT-4 buněk a nikoliv u buněk transfekovaného klonu. Dávka X-záření 1,8 Gy vedla za 24 hodin po ozáření u buněk MOLT-4 k 80% indukci apoptózy, zatímco u transfekovaných buněk byla apoptóza minimální. Výsledky ukázaly, že ionizujícím zářením indukovaná apoptóza u buněk MOLT-4 je zcela závislá na p53.

Mnoho buněčných typů, zejména buňky hematopoetického původu jdou do apoptózy rychle, za několik hodin po expozici vysokými dávkami cytostatických látek a ionizujícího záření. To je příklad časně apoptózy, ke které dochází během stejné fáze buněčného cyklu, ve které byly buňky poškozeny, tj. před mitózou. Např. časná apoptóza HL-60 buněk (buňky bez funkčního TP53 genu) ovlivněných dávkou 20 Gy ionizujícího záření se objevuje za 4-6 hodin po ozáření. Při definici apoptózy, která se objevuje ze stejné fáze buněčného cyklu, ve které byly buňky exponovány, můžeme použít termín homo-fázová apoptóza. Interfázová smrt je termín, který je používán v



radiobiologii pro smrt před prvním dělením a může být synonymem pro homofázovou apoptózu.

V kontrastu k interfázové apoptóze, termín post-mitotická apoptóza je termín navržený k definici apoptózy během buněčného cyklu, následované po fázi buněčného cyklu, kdy byly buňky ovlivněny. Post-mitotická apoptóza reprezentuje oddálenou apoptózu, která se obvykle objevuje, jsou-li buňky exponovány relativně nízkými dávkami cytostatických látek či ionizujícího záření a tyto jsou pak z media odstraněny (Mareková et al. 2000), nebo po ozáření nízkými dávkami záření (Vávrová et al. 2001). Post-mitotická apoptóza může být synonymem pro radiobiology označovanou reprodukční buněčnou smrt, jestliže smrt byla vyvolána apoptózou. Je velmi pravděpodobné, že post-mitotická apoptóza je výsledek poškození některých genů, které jsou nutné pro buněčné přežití a projevuje se nedostatek funkčních produktů těchto genů nutných k průchodu buněk buněčným cyklem. Takže vlastně původně subletální poškození je v konečné verzi převedeno na poškození letální během dalšího kola DNA replikace a mitózy. Dále některé další typy poškození se mohou objevit, jsou-li buňky uvězněny v některé fázi buněčného cyklu, ale produkce RNA a proteinová syntéza pokračuje. Takovéto buňky mohou pak zemřít oběma typy smrti jak apoptózou, tak nekrózou, nebo mohou být pozorovány velmi netypické změny, které nejsou klíčové pro morfologické a biochemické znaky apoptózy.

Pro detekci apoptózy byly využity rozdílné metody: 1/ morfologické stanovení apoptózy Giemza-Romanovski barvených preparátů, 2/ stanovení subG<sub>1</sub> DNA obsahu a 3/ stanovení obsahu mitochondriálního membránového proteinu pomocí specifické monoklonální protilátky APO2.7, 4/ stanovení Annexinu V v kombinaci s propidium jodidem a 5/ štěpení laminu B. Za 6 hodin po ozáření vysokou letální dávkou 7,5 Gy je detekována časná fáze apoptózy, část buněk je pozitivní na APO2.7 pouze po permeabilizaci buněk, detekovali jsme buňky v subG<sub>1</sub> fázi buněčného cyklu a také jsme prokázali 46 kDa štěpy laminu B jak v jádře, tak i v cytosolu. U buněk HL-60 jsme za 6 hodin po dávce 20 Gy popsali významné procento apoptózy (morfologická metoda 49 %, subG<sub>1</sub>DNA 32,4% a 32,7 % APO2.7 s permeabilizací) (Mareková et al., 2003). V tomto časovém intervalu měly buňky nepropustnou buněčnou

membránu (nebarvily se trypanovou modří), proto bylo nutné při stanovení APO2.7 buňky permeabilizovat, nepermeabilizované buňky se APO2.7 nebarvily. V experimentech na buňkách MOLT-4 12 hodin po ozáření byla ještě část buněk časně apoptických (s uzavřenou buněčnou membránou), u kterých byla pozitivita na APO2.7 detekována až po permeabilizaci. Např. po dávce 7,5 Gy bylo s permeabilizací pozitivních 50% a bez permeabilizace 30% (data nejsou uvedena). 24 hodin po ozáření se 80% buněk MOLT-4 ozářených dávkou 7,5 Gy a 60% buněk ozářených 3 a 5 Gy barvilo trypanovou modří (data nejsou uvedena).

Ke stanovení dávky záření na základě indukce apoptózy u buněk MOLT-4 jsme vybrali časový interval 16 a 24 hodin. Prokázali jsme, že za 16 hodin je množství APO2.7 pozitivních buněk (nepermeabilizováno) závislé na obdržené dávce záření v rozmezí 0,2-5 Gy.

V oblasti nízkých dávek záření (do 1 Gy) jsme se soustředili na změny v expresi proteinu p53. Lidský nádorově-supresorový protein p53 je 393 aminokyselin obsahující fosfoprotein, jehož množství se zvyšuje v odpovědi buňky na látky působící DNA poškození genů regulujících průchod buněk buněčným cyklem. Vzestup p53 je způsoben především zabráněním jeho degradace (Chehab et al. 1999). Degradace p53 je působena přes Mdm2 protein, který se váže na p53 a exportuje jej z jádra buňky.

Při aktivaci jednotlivých kináz ionizujícím zářením a následné fosforylaci určitých cílů na p53 je důležitý vedle typu DNA poškozující látky, také typ buněk. Zdá se, že buňky T lymfocytární leukémie MOLT-4 reagují na ionizující záření vedle obecně přijímané stimulace ATM a ART kinázy také stimulací jiných kináz (např. kasein-kinázy či SAPK/JNK kinázy) vedoucí k fosforylaci p53 na jiných residuích např. serinu 37 či serinu 392. Je pravděpodobné, že různé genomové stresory stimulují signál k fosforylaci p53 zvýšením aktivity různých kombinací kináz. Ukazuje se také, že buňky jsou schopné pouze limitovaného počtu dělení a stárnutí buněk je spojeno s fosforylací p53 na serinu 15 treoninu 18 a serinu 376 (Webley et al. 2000). V naší práci se však ukázalo, že vzestup fosforylace na serinu 392 je lineárně závislý na dávce záření 3 hodiny po ozáření dávkami 0,2-1 Gy. Vzhledem k velkému významu proteinu p53 v reakci na genomové stresory se domníváme, že je významné zjištění jeho fosforylace

na serinu 392 u buněk MOLT-4. Důležité je také, že tato fosforylovaná forma p53 se objevuje brzy po ozáření malými (0,2 Gy) dávkami záření. Z hlediska využití této změny jako dávkového indikátoru je důležité, že vzestup přetrvává 6 hodin po ozáření.

V kontrastu s imortalizovanými, intenzivně proliferujícími buněčnými liniemi (t.j. MOLT-4, HL-60), periferní krevní lymfocyty, podobně jako již výše zmíněné kmenové buňky krvetvorby, jsou buňky v  $G_0$  fázi buněčného cyklu, označované jako „spící buňky“. To nám dává dvě možnosti jak studovat indukci apoptózy in vitro: můžeme studovat indukci apoptózy přímo z  $G_0$  fáze, anebo můžeme buňky stimulovat mitogeny, např. T-lymfocyty fytohemaglutininem, a apoptóza pak může být stanovena u proliferujících buněk. Vzhledem k tomu, že se snažíme nalézt indikátor dávky záření, který by nám stanovil dávku záření do 24 h po ozáření, studovali jsme indukci apoptózy na spících lymfocytech.

V prvním přiblížení jsme ozářili lidské mononukleární buňky izolované z periferní krve (PBMC) vysokou letální dávkou 7 Gy a studovali jsme dynamiku indukce apoptózy v časové závislosti. Nalezli jsme, že apoptóza v takovéto kultuře je pomalejší než u rychle se dělící buněčné linie MOLT-4. 40% buněk je v S fázi buněčného cyklu a za 24 h byly všechny tyto buňky po ozáření dávkou 7.5 Gy, pozdně apoptické, tj. APO2.7 pozitivní bez permeabilizace a  $A^+/PI^+$ . Z hlediska hodnocení periferních lymfocytů se jako nejvýhodnější metoda pro sledování časně a pozdní apoptózy jeví stanovení Annexinu V a propidium jodidu. Výhodou metody je možnost detekovat tyto látky bez permeabilizace, což by nám znesnadňovalo současně sledovat také CD znaky jednotlivých buněčných subpopulací. Pro jednoduché studium buněk je významné sledovat také SS/FS, neboť apoptické buňky zvyšují svoji granularitu a zmenšují velikost.

V jednodenní kultuře PBMC ozářené dávkou 7 Gy na rozdíl od buněk MOLT-4 (všechny pozdně apoptické) bylo 60% buněk apoptických ( $A^+$ ), avšak polovina buněk byla časně apoptických ( $PI^+$ ). Za 48 hodin po ozáření bylo prakticky 80% takto ozářených buněk pozdně apoptických. V tomto čase by mohla být nalezena minoritní subpopulace živých, periferních krevních lymfocytů, která by byla radiorezistentní. 48 h po ozáření 7 Gy jsme našli statisticky významný rozdíl mezi přežitím  $CD4^+$  a  $CD8^+$  subpopulací.

Předpokládáme, že existuje radiorezistentní CD4<sup>+</sup> subpopulace, která je patrná v čase, kdy prakticky největší množství radiosenzitivních lymfocytů je A<sup>+</sup> a tímto není detekovatelné v kompartmentu živých (A<sup>-</sup>) buněk. K podobným výsledkům dospěl Wilkins et al. (2002). Studovali indukci apoptózy 48 h po *in vitro* ozáření PBMC dávkou 0,1-2 Gy a popsali zvýšení poměru CD4/CD8 v populaci přežívajících buněk. Přežití CD8<sup>+</sup> lymfocytů je závislé také na kultivačních podmínkách a zdá se, že přítomnost CD4<sup>+</sup> buněk má pro CD8<sup>+</sup> lymfocyty ochranný efekt.

Na základě studia apoptózy u letálně (7 Gy) ozářených PBMC jsme k dalšímu studiu vybrali dva intervaly. Kratší (16 h) kultivace reprezentovala relativně rychlý biodozimetrický údaj. 48 h kultivace mohla odhalit existenci radiorezistentní lymfoidní subpopulace, která by mohla být použita jako indikátor dávky záření u malých dávek (Wilkins et al. 2002). Základním mechanismem buněčné smrti lymfocytů je apoptóza. U neozářených i ozářených vzorků byla patrna indukce apoptózy charakterizovaná A<sup>low</sup>PI<sup>-</sup>, A<sup>high</sup>PI<sup>-</sup>, A<sup>hi</sup>PI<sup>low</sup>, A<sup>hi</sup>PI<sup>high</sup> stavy a velmi zásadně převažovala nad přítomností nekrotických buněk A<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> nebo A<sup>low</sup>PI<sup>+</sup>. U lymfocytů  $\gamma$ -záření indukuje apoptózu ve shodě s našimi dříve publikovanými výsledky u buněk lidské promyelocytární leukémie HL-60, kde i velmi vysoké dávky  $\gamma$ -záření (20-100Gy) nevedly k nekróze buněk, ale indukovaly rychlou interfázovou apoptózu (Vávrová et al. 2001). Cornelissen et al. (2002b) srovnávali výsledky flow cytometrie a výsledky analýzy elektronové mikroskopie po ozáření lidských lymfocytů dávkou 5Gy, kde také pozorovali především smrt lymfocytů apoptózou. U lymfocytů ozářených dávkou 20 Gy pomocí elektronové mikroskopie autoři popsali převahu nekrotické smrti lymfocytů (Cornelissen et al. 2002a) na rozdíl od našich výsledků, kde jsme pozorovali apoptózu. Zvolili jsme proto jiný přístup a srovnávali jsme cilivost lymfocytárních subpopulací pomocí imunofenotypizace intaktních A<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> lymfocytů, reprezentujících populaci buněk dočasně přežívající, která není ovlivněna typem smrti (apoptóza versus nekróza). Většina ostatních autorů studovala především populace apoptické (Seki et al. 1995, Loaugie et al. 1998b). Apoptóza je dynamický proces a přítomnost jednotlivých apoptických populací je přechodná.

Naše výsledky ukázaly, že relativní velikost populací buněk časně a středně apoptických se s časem významně nemění. Jsou to buňky krátce žijící a apoptické buňky se akumulují v pozdní (A<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) fázi, jejíž počet stoupá v dávkové závislosti. Za 48 hodin po ozáření je populace intaktních buněk po dávkách 5-10 Gy relativně malá, je však dobrým ukazatelem dávky u lymfocytů ozářených malými dávkami do 3 Gy.

Prokázali jsme ve shodě s Philippé et al. (1997) pokles vazebné kapacity protilátek u buněk časně a středně apoptických, který byl provázen zmenšením buněk (pokles FSC parametru). Je zajímavé, že pokles byl patrný u CD4 a CD8 buněk, na rozdíl od CD3+, kde se ukazuje, že přestože dochází k jejich zmenšení není redukována denzita CD3+ na jejich povrchu.

Z hlediska radiobiologického, studium jednotlivých subpopulací T lymfocytů (CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>) nepřineslo upřesnění odhadu obdržené dávky ve srovnání s CD3+ buňkami. Tyto výsledky mají rozumné vysvětlení, neboť oba fenotypy buněk zahrnují řadu diferenciačních stavů těchto dvou hlavních T lymfocytů, tj. naivní, aktivované, efektorové, regulační a paměťové buňky, které mohou být různě citlivé na ozáření. CD4+ T lymfocyty se zdají být radiorezistentnější v oblasti námi sledovaných dávek (3-20 Gy) než buňky CD8+. Populace CD8+ buněk obsahuje dvě odlišné lymfoidní subpopulace. CD3-/CD8+ představují subpopulaci NK buněk (Cooper et al., 2001) zatímco CD3+/CD8+ subpopulace obsahuje cytotoxické a supresorové buňky.

Z hlediska biodozimetrického je velmi zajímavá analýza NK buněk (CD3-/CD8+). Ve srovnání s ostatními lymfoidními populacemi reprezentují NK buňky relativně uniformní subpopulaci vhodnou k odhadu dávky ozářeného. Z časového hlediska byl velmi zajímavý jejich pokles na 50% 16 hodin po ozáření 5 Gy, avšak za 48 hodin v subpopulaci Annexin negativních buněk prakticky chyběly. Je zřejmé, že jejich pokles 16 hodin po ozáření může být dobrým indikátorem obdržené dávky v oblasti vysokých dávek záření, zatímco u malých dávek (do 3 Gy) má větší vypovídací hodnotu sledovat pokles za 48 hodin. NK buňky mohou být rozděleny na několik subpopulací, jednak podle density znaku CD56, tj. CD56<sup>high</sup> a CD56<sup>low</sup> a dále podle exprese znaku CD16. Při srovnání radiosensitivity CD56<sup>high</sup> a CD56<sup>low</sup> je subpopulace CD56<sup>high</sup> významně citlivější k účinkům ionizujícího záření než subpopulace CD56<sup>low</sup>.

Subpopulace CD56<sup>high</sup> je však velmi malá a z biodozimetrického hlediska nepoužitelná. Při studiu poklesu NK buněk označených CD3-/CD8<sup>+</sup> anebo CD3-/CD16<sup>+</sup> jsme v obou případech pozorovali shodné výsledky z hlediska jejich poklesu po in vitro ozáření.

Na radiosenzitivitu NK buněk není v literatuře jednotný názor. Philippé et al. (1997) popsali, že po ozáření dávkou 2 Gy jsou NK buňky (CD56<sup>+</sup>) méně citlivé než ostatní populace lymfocytů. Z naší studie na druhé straně vyplývá, že počet CD8<sup>+</sup> NK buněk klesá v A<sup>-</sup> subpopulaci po ozáření in vitro mnohem rychleji než počet T buněk. Pilotní studie z naší laboratoře v in vivo experimentech na laboratorních zvířatech naznačují, že pokles CD8<sup>+</sup> NK buněk z cirkulace je následován nahrazením takovéto populace buněk později. Je tedy zřejmý rozdíl mezi situací in vitro a in vivo.

Pro studium změn NK buněk po ozáření jsme studovali jejich změny u nádorových pacientů po parciálním ozáření na oblast břicha. Již před ozářením (po 24 h inkubaci in vitro v médiu) jsme pozorovali vysoké hodnoty Annexin pozitivních, tedy apoptických NK buněk, které mohou být spojeny s jejich protinádorovou cytotoxickou aktivitou. Nádorové mikroprostředí může ovlivnit funkční potenciál buněk imunitního systému, které se akumulují v místě růstu nádoru či jeho metastáz. Schopnost lidských nádorů indukovat apoptózu v aktivovaných lymfocytech a NK buňkách při 24 h inkubaci in vitro s nádorovými buňkami byla prokázána (Taga et al. 1999). Saito et al. (1999) popsali vyšší spontánní ex vivo apoptózu periferních krevních mononukleárů u pacientů s nádory hlavy a krku. Apoptóza byla významně vyšší než u zdravých dárců jak v čase 0, tak po 24 hodinové inkubaci těchto buněk v médiu. Spontánní apoptóza byla zvýšena u T lymfocytů (CD3<sup>+</sup>), NK buněk (CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>) i u B lymfocytů (CD19<sup>+</sup>). Také Bauernhofer et al. (2003) popsali, že NK buňky (CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>) v cirkulaci u nádorových pacientů mají nízkou NK aktivitu a podléhají spontánní apoptóze. Autoři studovali možný vztah mezi apoptózou a poškozenou NK aktivitou u NK buněk izolovaných z periferní krve pacientů s nádory hlavy a krku a nádory prsu. NK aktivitu testovali proti buňkám K562 a sledovali uvolnění Cr<sup>51</sup>. Poměr CD56<sup>low</sup>/CD56<sup>high</sup> NK buněk byl odlišný pro nádorové pacienty a kontroly. Největší procento spontánní apoptózy CD56<sup>low</sup> buněk měly (46%) pacientky s nádory prsu oproti zdravým dárcům (18%). Je

tedy zřejmé, že především tyto buňky byly cílem spontánní apoptózy na rozdíl od CD56<sup>high</sup>. Prokázali, že CD56<sup>low</sup> NK buňky jsou cílem pro spontánní apoptózu, která vede ke snížené hladině NK aktivity. CD56<sup>high</sup> jsou buňky relativně rezistentní k indukci spontánní apoptózy proti nádorům. Z našich výsledků (Vokurková et al. 2006) vyplynulo, že CD56<sup>high</sup> NK buňky jsou vysoce radiosenzitivní subpopulací, avšak představují pouze velmi minoritní subpopulaci NK buněk. Také u námi sledované pacientky ozářené celotělově 2 Gy jsme 1 h po ozáření a dále při 24 h inkubaci in vitro pozorovali vyšší pokles CD56<sup>high</sup> než CD56<sup>low</sup>.

Také Jewett et al. (2006) popsali sníženou expresi CD16 receptorů a ztrátu funkce NK buněk u pacientů s orálními nádory. Taga et al. (1999) prokázali, že lymfokiny aktivované NK buňky (LAK) po kontaktu s nádorovými buňkami rychle umírají apoptózou. Jewett et al. (2006) popsali, že za sníženou aktivitu NK buněk a snížení jejich počtu u pacientů s nádory krku je zodpovědný faktor NFkappaB způsobující vzestup sekrece IL-6, který se může podílet na inaktivaci a smrti NK buněk.

Celotělové ozáření myši malými dávkami záření (do 2 Gy) stimulovalo protinádorovou aktivitu NK buněk především sekrecí interferonu  $\gamma$  (Nowosielska et al. 2006). V našich experimentech byl po ozáření relativně malého objemu oblasti břicha (box technika) patrný, po jedné dávce záření 2 Gy, mírný vzestup Annexin pozitivních NK buněk. V případě ozáření velkého objemu břicha (pacientka J.) po dvou frakcích (4 Gy) došlo k vzestupu apoptických NK buněk ze 40% na - 80% (24 h inkubace in vitro). V průběhu dalšího ozařování hodnoty A<sup>+</sup> NK buněk byly na konstantní (80%) úrovni. U pacientky s hematologickým onemocněním, ozařované celotělově dávkou 2 Gy, docházelo k poklesu NK buněk s maximem po 48 h inkubaci in vitro. Při parciálním ozáření pacientek (box technika) došlo k relativně malému poklesu počtu NK buněk v subpopulaci A<sup>-</sup> buněk. Situace je však komplikována reakcí buněk imunitního systému na samotné nádorové onemocnění. Při frakcionovaném ozáření jsme výrazný pokles počtu NK buněk v živé subpopulaci pozorovali až po relativně vysokých dávkách. Je tedy zřejmé, že v in vivo modelu nejlepší odpověď jsme našli po celotělovém ozáření a při 48 h kultivaci buněk in vitro. Po malých dávkách

záření jsme pozorovali největší pokles NK buněk v pokusech in vitro právě po 48 h inkubaci.



## 6. ZÁVĚR

---

Prokázali jsme, že všechny námi sledované buňky hematologického systému hynou po  $\gamma$ -záření apoptózou. Ke studiu jsme použili buňky imortalizovaných nádorových linií HL-60 a MOLT-4. Apoptózu jsme sledovali pomocí stanovení subG<sub>1</sub> vrcholu detekujícím buňky s nízkým obsahem DNA. Dále jsme ke sledování apoptózy použili stanovení mitochondriálního membránového antigenu APO2.7, který je možno detekovat buď s permeabilizací nebo bez ní (pozdní fáze apoptózy). Metoda, která nám umožňuje sledovat indukci apoptózy spolu s expresí CD znaků, je stanovení exprese fosfatidylserinu na buněčné membráně pomocí Annexinu V. Použije-li se Annexin v kombinaci s PI, můžeme rozlišit buňky v jednotlivých fázích apoptózy.

Buňky HL-60 (lidské promyelocytární linie) jsou buňky relativně málo diferencované, 93% exprimovalo znak CD15 a 84% znak CD33 a 2% znak CD11b. Buňky HL-60 jsou buňky bez funkčního proteinu p53 a apoptóza je u nich indukována až do bloku v G<sub>2</sub> fázi. V důsledku bloku v G<sub>2</sub> fázi mají buňky čas reparovat svoje poškození a zvýšit tak svoji radiorezistenci. Ozařování s malým dávkovým příkonem (převážně v G<sub>2</sub> fázi) má pro ně významný šetřící efekt. Po dávkách do 10 Gy je u těchto buněk indukována tzv. oddálená apoptóza. Buňky přechodně zvyšují expresi diferenciačního antigenu CD11b. Buňky umírají apoptózou i po dávkách kolem 100 Gy. Apoptóza je rychlá, buňky umírají z fáze cyklu, ve které byly ozářeny.

Druhou modelovou linií byly buňky T lymfocytární leukémie MOLT-4. Tyto buňky exprimují v 90% znak CD7 a v 50% znaky CD1, CD4 a CD5. Dokázali jsme, že buňky MOLT-4 mají wild typ proteinu p53 a jsou velmi radiosenzitivní. Za 6 hodin po ozáření dávkami 1-5 Gy klesá počet buněk v G<sub>1</sub> fázi a naopak stoupá jejich počet v S a G<sub>2</sub> fázi. **Za 16 hodin po ozáření jsme prokázali dávkovou závislost vzestupu indukce apoptózy od 0,2 do 5 Gy měřením exprese mitochondriálního membránového antigenu APO2.7 bez permeabilizace.** Z časového hlediska (sledováním exprese Annexinu V) jsme pozorovali po dávkách 1-7,5 Gy maximum apoptózy za 72 hodin po ozáření.

Pro studium indukce apoptózy u lidských lymfocytů jsme sledovali expresi Annexinu V a propidium jodidu ve vazbě na CD znaky jednotlivých subpopulací lymfocytů. Na základě studia apoptózy u letálně (7 Gy) ozářených PBMC jsme pro další studium vybrali dva intervaly. Kratší interval (16 hodin) reprezentoval rychlý biodozimetrický údaj a po dávce 7 Gy byla většina PBMC časně apoptických ( $A^+PI^-$ ). 48 h kultivace se ukázala důležitá z hlediska stanovení malých dávek záření. Z hlediska dávkové závislosti v rozmezí 1-10 Gy jsme pozorovali dávkově závislý vzestup  $A^+$  PBMC. Prokázali jsme, že relativní velikost populace  $A^+PI^-$  se s časem významně nemění, jsou to buňky krátce žijící a apoptické buňky se akumulují v pozdní  $A^+PI^+$  fázi, kde jejich počet stoupá v dávkové závislosti. Studium jednotlivých subpopulací T lymfocytů ( $CD4+$  a  $CD8+$ ) nepřineslo upřesnění odhadu obdržené dávky ve srovnání s  $CD3+$  buňkami. Tyto výsledky mají rozumné vysvětlení, neboť oba fenotypy buněk zahrnují řadu diferenciačních stavů těchto dvou hlavních T lymfocytů, tj. naivní, aktivované, efektorové, regulační a paměťové buňky, které mohou být různě citlivé na ozáření.  $CD4+$  T lymfocyty jsou méně citlivé k ozáření v oblasti námi sledovaných dávek (3-20 Gy) než buňky  $CD8+$ .

V naší studii jsme se rozhodli srovnávat citlivost lymfocytárních populací pomocí imunofenotypizace v intaktních  $A^-PI^-$  lymfocytech. Z hlediska biodozimetrického je velmi zajímavá analýza NK buněk ( $CD3^-/CD8^+$ ). Ve srovnání s ostatními lymfoidními populacemi reprezentují NK buňky relativně uniformní subpopulaci vhodnou k odhadu dávky ozářeného. **V subpopulaci  $A^-PI^-$  buněk jsme prokázali v rozmezí 1-10 Gy dávkovou závislost poklesu počtu NK buněk 16 hodin po ozáření, což představuje dobrý indikátor obdržené dávky v oblasti vysokých dávek záření. U malých dávek (do 2 Gy) jsme dávkovou závislost poklesu počtu  $CD3^-/CD8^+$  buněk prokázali za 48 hodin.** NK buňky mohou být rozděleny na dvě subpopulace, podle density znaku  $CD56$ , tj.  $CD56^{high}$  a  $CD56^{low}$ . Při srovnání radiosensitivit  $CD56^{high}$  a  $CD56^{low}$  je subpopulace  $CD56^{high}$  významně citlivější k účinkům ionizujícího záření než subpopulace  $CD56^{low}$ .

Studium NK buněk při ozáření in vivo pacientů s nádory je komplikováno faktem, že NK buňky reagují zvýšenou apoptózou na přítomnost nádorových buněk a procento apoptických buněk je již před ozářením významně vyšší než

u zdravých dárců. U pacientů ozářených in vivo jsme krev odebírali vždy 1 h po ozáření a následně in vitro kultivovali 24 resp. 48 hodin. V případě ozáření pacientek s karcinomy endometria a čípku děložního technikou box (relativně malý objem oblasti břicha) došlo při 24 h inkubaci k relativně malému poklesu počtu NK buněk. Po celotělovém ozáření pacientky s hematologickou malignitou (2 Gy) jsme prokázali výrazný pokles NK buněk především 48 h po ozáření, což je v souladu s experimenty in vitro. Je tedy zřejmé, že doba inkubace po ozáření má zásadní význam pro průkaz poklesu NK buněk po malých dávkách záření.

V případě ozáření osoby neznámou dávkou ionizujícího záření je nutné odebrat periferní krev nejpozději do 6 hodin po ozáření, kdy ještě in vivo nejsou postižené buňky fagocytovány. Po vyseparování lymfocytů se provede značení buněk Annexinem a koktejlem monoklonálních protilátek na detekci subsetu NK buněk (anti-CD3, anti-CD8). Vzorek se ihned změří a relativní hodnota buněk CD3-/CD8+ poslouží jako výchozí hodnota (na způsob neozářené kontroly) této subpopulace. Vyseparované lymfocyty se potom nadále inkubují in vitro a provede se časová závislost (24 a 48h) indukce apoptózy na základě sledování relativního poklesu subpopulace NK buněk charakterizovaných povrchovým značením CD3-/CD8+. Porovnáním poklesu této subpopulace v různých časových intervalech by bylo možné usoudit na velikost obdržené dávky. Samozřejmě, stále platí metoda zlatého standardu, kterou je počítání chromozomálních aberací lymfocytů ozářené osoby a sledování poklesu počtu lymfocytů v periferní krvi.

## 7. LITERATURA

---

1. Aldridge, D.R., Radford, I.R.: Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res.* 58, 1998, s.2817-2824.
2. Andreeff, M., Jiang, S., Zhang, X., Konopleva, M., Estrov, Z., Snell, V.E., Xie, Z., Okcu, M.F.: Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia* 13, 1999, s.1881-1892.
3. Bakkenist, C.J., Kastan, M.B.: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003, 421, s. 486-488
4. Ban, S, Cologne, J.B.: X-ray induction of micronuclei in human lymphocyte subpopulations differentiated by immunoperoxidase staining. *Radiat Res* 131: 60-65, 1992.
5. Baranov, A., Gale, R.P., Guskova, A.: Bone marrow transplantation after the Chernobyl nuclear accident. *N.Engl.J.Med.* 321, 1987, s.205-212.
6. Bauernhofer, T., Kuss, I., Henderson, B., Baum, A.S., Whiteside, T.L.: Preferential apoptosis of CD56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur.J.Immunol.* 33, 2003, s.119-124.
7. Baum, C.M., Weissman, I.L., Tsukamoto, A.S., Buckle, A.M.: Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc.Nat. Acad. Sci. USA* 89, 1992, s. 2804-2808.
8. Bishop, M. R.: Potential use of hematopoietic stem cells after radiation injury. *Stem Cells* 15, 1997, (suppl. 2), s.305-310.
9. Blakely, W. F.: Nucleic acid molecular biomarkers for diagnostic biodosimetry applications: Use of the fluorogenic 5-nuclease polymerase chain reaction assay. *Military medicine* 167, (Suppl 1), 2002, s.16-18.
10. Blakely, W.F.: Overview of low-level radiation exposure assessment: Biodosimetry. *Military medicine* 167, (Suppl 1), 2002, s.20-24.
11. Cerveny, T.J., MacVittie, T.J., Zouny, R.W.: Acute radiation syndrome. In: *Medical consequence of nuclear warfare.* (Walker R.I. and T.J.Cerveny editors). Defense Nuclear Agency Alexandria, Virginia, 1999, s.15-36).
12. Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., Halazonetis, T.D.: Phosphorylation of ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *PNAS* 9, 1999, 13777-13782.
13. Clark, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J. et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362, 1993, s.849-852.

14. Cornelissen, M., Thierens, H., De Ridder, L.: Interphase death in human peripheral blood lymphocytes after moderate and high doses of low and high LET radiation: An electron microscopy approach. *Anticancer Res* 22, 241-246, 2002a.
15. Cornelissen, M., Philippé, J., De Sitter, S., De Ridder, L.: Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes. An electron microscopic evaluation. *Apoptosis* 7: 41-47, 2002b
16. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, A.M.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640, 2001.
17. Cowling, G.J., Dexter, T.M.: Apoptosis in the haemopoietic system. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.* 345, 1994, s.257-263.
18. Crain, W., Kay, R., Culter, R.B., et al.: Expression of Thy-1 on human hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 177, 1993, s.1331-1342.
19. De Wynter, E.A., Buck, D., Hart, C. et al.: CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NON/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16, 1998, s.387-396.
20. Drouet, M., Mathieu, J., Grenier, N., Multon, E., Sotto, J., Herodin, F.G.:The reduction of in vitro radiation-induced Fas-related apoptosis in CD34+ progenitor cells by SCF, FLT3 ligand, TPO, and IL-3 in combination resulted in CD34+ cell proliferation and differentiation. *Stem Cells* 17, 1999, s.273-285.
21. Endlich, B., Radford, I.R., Forrester, H.B., Dewey, W.C.: Computerized video time-lapse microscopy studies of ionizing radiation-induced rapid-interphase and mitosis-related apoptosis in lymphoid cells. *Radiat.Res* 153,2000, s.36-48.
22. Gutierrez del Arroyo, A., Gil-Lamagniere, C., Lazaro, I., deMarco, M.C., Layunta, I., Silva, A. : Involvement of p53 and interleukin 3 in the up-regulation of CD95 (APO-1/Fas) by X-ray irradiation. *Oncogene*, 19, 2000, s.3647-3655.
23. Hertveld, K., Philippé, J., Thierens, H. et al: Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int.J.Radiat.Res.* 71, 1997, s. 429-433.
24. Khanna, K.K., Jackson, S.P.: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27, 2001, s.247-254.
25. Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T., Van Oers, M.H.: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420, 1994.
26. Kozubek, S.: Účinky záření na subcelulární systémy a na buňku In: *Principy a praxe radiační ochrany.* (ed.V.Klener) 2000, Azin CZ Praha (s.153-168).

27. Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., May, W.S.: CD34-Structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87,1996, s.1-5.
28. Kravtsov, V.D., Daniel, T.O., Koury, M.J.: Comparative analysis of different methodological approaches to the in vitro study of drug-induced apoptosis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1327-39.
29. Lansdorp, P.M., Dragowska, W.: Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. *J. Exp. Med.* 177, 1992, s. 1501-1509.
30. Louagie, H., Cornelissen, M., Philippé, J., Vral, V., Thiersen, H., De Ridder, L.: Flow cytometric scoring of apoptosis compared to elektron microscopy in irradiated lymphocytes. *Cell Biol Int* 22: 277-283, 1998a
31. Louagie, H., Philippé, J., Vral, V., Cornelissen, M., Thiersen, H., De Ridder, L.: Induction of micromuclei and apoptosis in natural killer cells compared to T lymphocytes after  $\gamma$  irradiation. *Int.J.Radiation Biol* 73: 179 -185, 1998b.
32. Louagie, H., Van Eijkeren, M., Philippé, J., Thiersen, H., De Ridder, L.: Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 75: 767-771, 1999a.
33. Louagie, H., Schotte, P., Vral, V., Cornelissen, M., Thiersen, H., Beyaert, R., De Ridder, L., Philippé, J.: Apoptosis induced by irradiation in peripheral blood mononuclear cells is not mediated by cytochrome-C release and only partially involves caspase-3-like proteases. *Cell Biol Int* 23: 611-617, 1999b.
34. Lungman, M.: Dial 9-1-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2, 2000, 208-225.
35. Mareková, M., Vávrová, J., Vokurková, D.: Ethanol induced apoptosis in human HL-60 cells. *Gen.Physiol.-Biophys.* 2000; 19: 181-194.
36. Mareková, M., Vávrová, J., Vokurková, D.: Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma irradiated HL-60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *General Physiology and Biophysics* 2003, vol 22,s.191-200.
37. Mathe, G., Jammet, H., Pendic, B.: Transfusions et greffes de moelle osseuse homologue chez des humains irradiés a haute dause accidentellement. *Rev. Francaise Etudes Clin.Biol.* 4, 1959, s.226-235.
38. Moore, D.H., Tukey, J.D., Jones, I.M. et al.: A study of the effects of exposure on cleanup workers at the Chernobyl nuclear reactor accident using multiple end points. *Radiat. Res.* 148, 1997, s.463-475.
39. Nagayama, H., Ooi, J., Tomonari, A. et all.: Severe immune dysfunction after lethal neutron irradiation in a JCO nuclearm facility accident victim. *Int.J.Hematol.* 76, 2002, 157-164.
40. Nakano, H., Kohara, M., Shinohara, K.: Evaluation of the relative contribution of p53-mediated pathway in X-ray-induced apoptosis in human

leukemic MOLT-4 cells by transfection with a mutant p53 gene at different expression levels. *Cell Tissue Res.* 2001; 306: 101-106.

41. Nakano, H., Shinohara, K.: Correlation between unirradiated cell TP53 protein levels and radiosensitivity in MOLT-4 clls. *Radiat. Res.* 151, 1999, s. 686-693.
42. Ning, S., Knox, S. J.: G<sub>2</sub>/M –phase arrest and death by apoptosis of HL-60 cells irradiated with exponentially decreasing low-dose-rate gamma radiation. *Radiat.Res.* 151, 1999, s.659-669.
43. Novosielska, E.M., Wrembel-Wargocka, J., Cheda, A., Janiak, M.: Modulation of anti-tumour mechanisms of NK cells and macrofages after fractionated low-dose exposure to X-rays. In: Abstract book, European Radiatiion Research 2006, 22.-25.8.2006, Kyiv, Ukraine, p.216.
44. Palacios, C., Gitierrez del A.A., Silva, A., Cillins, M.K.: The role of p53 in death of IL-3-dependent cells in response to cytotoxic drugs. *Oncogene* 19, 2000, s.3556-3559.
45. Philippé, J., Louagie, H., Thierens, H., Vral, A., Cornelissen, M., De Ridder, L.: Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* 29, 242-249, 1997.
46. Prasanna,P.G.S.: Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Military Medicine* 167, (Suppl 1), s.10-12.
47. Rana, A.R., Vitale, M.,Mazzoti, G., Manzoli, L., Para, S.: Radiosensitivity of human natural killer cells: binding and cytotoxic activities of natural killer cell subsets. *Radiat Res* 124, 96-102, 1990.
48. Saito, T., Kuss, I., Dworacki, G., Gooding, W., Johnson, J.T. ,Whiteside, T. L.: Spontaneous ex vivo apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.*: 5, 1999, s.1263-1273.
49. Seiki, H., Iwai, K., Kanegane, H., Konno, A., Ohta, K., Zachce, A., Taniguchi, N., Miyawsaqki, T.: Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocyte subpopulations. *Cell Immunol* 163, 30-36, 1995.
50. Shinomiya N., Kuno Y., Yamamoto F., Fukasawa M., Okumura A., Uefuji M., Rokutanda M. (2000): Different mechanisms between premitotic apoptosis and postmitotic apoptosis in X-irradiated U937 cells. *Int.J.Radiation Oncology Biol.Phys.* 47, 767-777
51. Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., et al.: Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initialing long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 74, 1989, s.1563-1570.
52. Syljuasen, R.G., McBride, W.H.: Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in Jurkat T cells. *Radiat.Res.* 152, 1999, s.328-331.

53. Szkanderová, S., Vávrová, J., Řezáčová, M., Vokurková, D., Pavlová, Š., Šmardová, J., Stulík, J. : Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukemia cell line MOLT-4. *Folia Biol (Prague)* 49: 191-196, 2003.
54. Taga, K., Zamauchi, A., Bloom, E. T.: Target cell-induced apoptosis in IL-2-activated human natural killer cells. *Leuk. Lymphoma* 32, 1999, s.451-458.
55. Terstappen, L.W.M., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. M., Loken, M. R.: Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single non lineage-committed CD34+CD38 - progenitor cells. *Blood* 77, 1991, s.1218-1222.
56. Terui, Z., Furukawa, Y., Kikuchi, J., Iwase, S., Hatake, K., Miura, Y.: Bcl-x is a regulatory factor of apoptosis and differentiation in megakaryocytic lineage cells. *Exp.Hematol.* 26, 1998, s.236-244.
57. Thierry, D., Gourmelon, P., Parmentier, C., Nénot, J. C.: Haematopoietic growth factors in the treatment of therapeutic and accidental irradiation-induced bone marrow aplasia. *Int.J.Radiat.Biol.* 67, 1995, s.103-117.
58. Udomsakdi, C., Lansdorp, P.M., Hogge, D.E., Reid, D.S., Eaves, A.C., Eaves, C.J.: Characterization of primitive hematopoietic cells in normal human peripheral blood. *Blood.* 1992 Nov 15;80(10):2513-21.
59. Vávrová, J., Mareková, M., Vokurková, D.: Radiation-induced apoptosis and cell cycle pro-gression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplasma* 48, 2001, s. 26-33.
60. Vávrová, J., Vokurková, D., Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Antiapoptotic cytokine Il-3+SCF+FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133+/CD34+ progenitor cells. *Folia biol. (Praha)* 48, 2002, s.51-57.
61. Vávrová, J., Mareková, M., Vokurková, D.: Dvě hlavní cesty indukce apoptózy u savčích buněk. *Rad. Onkol.* 2003, vol 3, s.1-9.
62. Vávrová, J., Mareková, M., Vokurková, D., Psutka, J.: Cell cycle alteration and response to low-dose-rate gamma radiation in leukemic cell lines. *Physiol.Res.* 2004, 53, s.335-342.
63. Vindelov, L.: Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol.* 1977 Aug 10;24(3):227-42.
64. Vokurková, D., Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, J.: CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biodosimetric marker in vitro. *Physiol Res.* 2006;55(6):689-98.
65. Webley, K., Bond, J.A., Jones, Ch.J.: Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2000, 2803-2808.



66. Wilkins, R.C, Kutzner, B.C, Truong, M., Mclean, J.R.N.: The effect of the ratio of CD4+ to CD8+ T cells on radiation-induced apoptosis in human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Biol* 78, 681-688, 2002.
67. Yin, A., Miraglia, S., Zanjani, D., Almeida-Porada, G.: AC 133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 1997, s. 5002-5012.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK

---

### Původní práce

1. Vávrová, J., Filip, S., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Vaňásek, J., Jebavý, L.: Ex vivo expansion CD34+/AC133+ - selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in high-risk breast cancer patients receiving intensive chemotherapy. *Hematol. Cell Ther.*, 1999, 41 (3), 105-112.
2. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Dose dependent biological effects of Idarubicin in HL-60 cells: Alterations of the cell-cycle and apoptosis. *Acta Medica (H.Králové)*, 43(2), 2000, 69-73.
3. Filip, S., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Vaňásek, J.: Myeloid differentiation and maturation of SCF+IL-3+IL-11 expanded AC133+/CD34+ cells selected from high-risk breast cancer patients. *Neoplasma*, 2000; 47(2): 73-80.
4. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Ethanol induced apoptosis in human HL-60 cells. *General Physiol. Biophys.*, 2000; 19(2): s. 181-194.
5. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Cerman, J.: Light-induced photoactivation of hypericin inhibits cellular growth in pituitary adenoma cell line AtT20/D16v-F2 (hypericin inhibits cellular growth of AtT20/D16v-F2). *Acta Med.*, 2001; 44(1): 7-13.
6. Szkanderová, S., Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J. Změna exprese p53 a p21 u buněčné linie MOLT-4 po účinku ionizujícího záření. *Acta Radiobiologica*, 2001, vol. 1, č. 1, s. 82-84.
7. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Neoplasma*, 2001; 48(1): 26-33.
8. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S. Ionizing radiation-induced apoptosis and degradation of the nuclear matrix in hematopoietic cells. In *Biophysics of the Genome and Its Interactions*. Masaryk University Brno, 2002, s. 86-91.
9. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Antiapoptotic cytokine IL-3 + SCF + FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133+/CD34+ progenitor cells. *Folia Biol.*, 2002; 48: 51-57.
10. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Monitoring of premitotic and postmitotic apoptosis in gamma-irradiated HL60 cells by the mitochondrial membrane protein-specific monoclonal antibody APO2.7. *General Physiol. Biophysics*, 2003; 22(2): 191-200.

11. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Pšutka, J.: Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest by all-trans retinoic acid in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Physiol. Research*, 2003; 52(5): 599-606.
12. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Szkanderová, S., Pšutka, J.: Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2003; 42(3): 193-199.
13. Szkanderová, S., Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Pavlová, Š., Šmardová, J., Stulík, J.: Gamma Irradiation Results in Phosphorylation of p53 at Serine-392 in human T-lymphocyte Leukemia cell line MOLT-4. *Folia Biol.*, 2003; 49(5): 191-196.
14. Mareková, M., Čáp, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Cerman, J.: Effect of therapeutic doses of ionising radiation on the somatomammotroph pituitary cell line, GH3. *Endocrine J.*, 2003; 50(5): 621-628.
15. Řezáčová, M., Cerman, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Čáp, J.: Terapeutické dávky ionizujícího záření indukují apoptózu u nádorových endokrinně aktivních hypofyzárních buněčných linií. *Radiační onkologie* 2003, 1. vyd., Hradec Králové, 2003; s.101-104.
16. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Dvě hlavní cesty indukce apoptózy u savčích buněk. *Radiační onkologie*, 2003; 3(1): 1-9.
17. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**: Ionizující záření a smrtící liganda TRAIL-dvě rozdílné cesty indukce apoptózy u leukemických buněčných linií. *Radiační onkologie* 2003, 1. vyd., Hradec Králové. 2003; s. 46-52.
18. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Pšutka, J.: G<sub>2</sub>/M arrest and death by apoptosis of leukemic cells irradiated with low-dose rate gamma radiation. Ed.: Kozubek, S., In: *Biophysics of the Genome and Its Interaction*, 1. vyd., Brno. 2003, s. 82-86.
19. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Pšutka, J.: Cell cycle alteration, apoptosis and response of leukemic cell lines to gamma radiation with high- and low-dose rate. *Physiol. Res.*, 2004; 53: 335-342.
20. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Österreicher, J., Vilasová, Z.: Degradace Cdc25A fosfatasy v odpovědi na poškození buněk ionizujícím zářením. *Radiační onkologie*, 1. vyd., Hradec Králové, KORT, 2004; s. 86-89. ISBN: 80-239-2107-X.
21. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Österreicher, J., Vilasová, Z.: Degradation of Cdc25A phosphatase in response to damage of HL-60 cells by ionizing radiation. *Molecular Radiation Biol./Oncol.*, 1. vyd., Stuttgart, Druckerei Jauch GmbH, 2004; s. 26. ISBN: 3-9808819-1-1.
22. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Tichý, A., Knížek, J., Pšutka, J.: The importance of abrogation of G(2)-phase arrest in combined effect of TRAIL and ionizing radiation. *Acta Biochim.Pol.* 52, (4) 2005, 889-896.

23. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Zášková, D.: Effect of valproic acid and antiapoptotic cytokines on differentiation and apoptosis induction of human leukemia cells. *Gen Physiol Biophys.* 2006 Mar;25(1):65-79.
24. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, J.: CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biosimetric marker in vitro. *Physiol Res.* 2006;55(6):689-98.
25. Zášková D., Řezáčová M., Vávrová J., **Vokurková D.**, Tichý A.: Effect of valproic acid a histone deacetylase inhibitor, on cell death and molecular changes caused by low-dose irradiation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006, přijato k tisku

### Abstrakta

1. Filip, S., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Vaňásek, J.: Ex vivo expansion selected autologous peripheral blood progenitor cells (PBPC) in breast cancer patients. *Abstrakt. Bone Marrow Transplantation*, 1999; 23(Suppl. 1): S26.
2. Filip, S., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Vaňásek, J.: Ex vivo expansion of progenitor cells after intensive chemotherapy in breast cancer. *Bone Marrow Transplantation*, 1999; 23(Suppl. 3): S32.
3. Filip, S., Vávrová, J., Bláha, M., **Vokurková, D.**, Vaňásek, J.: Ex vivo expansion and maturation of AC133 selected autologous peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. *Abstrakt. Exp. Hematol.*, 1999; 27(7,Suppl. 1): 115.
4. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Filip, S., Jebavý, L., Mareková, M.: Influence of FLT3L on ex vivo expansion and maturation of peripheral blood AC133+/CD34+ haematopoietic cells. - Berger, J.: *Cells.* - 1.vyd. - České Budějovice: Kopp, 1999; 141.
5. Mareková, M., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Cerman, J.: Comparison of methods for apoptosis detection in HL-60 cells. *Abstrakt. (The fourth scientific Conference of the Charles University Faculty of Medicine and University Hospital, 8.12.1999, Hradec Králové). Acta Med (H.Králové),* 2000; 43(2): 50. ISSN 1211-4286.
6. Vaňásek, J., Filip, S., Vávrová, J., Bláha, B., **Vokurková, D.**: Ex vivo expansion and maturation of ac133+ selected autologous peripheral blood progenitor cells in breast cancer patients. *Abstrakt. (The fourth scientific Conference of the Charles University Faculty of Medicine and University Hospital, 8.12.1999, Hradec Králové). Acta Med (H.Králové),* 2000; 43(2): 59. ISSN 1211-4286.
7. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60. *Acta Medica (Hradec Králové),* 2000; 43(4): 168.

8. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Urbánková, J.: Idarubicin-induced apoptosis in HL-60 cells: Relationship between apoptosis and time dependence of apoptosis on idarubicin dose. *Cells II*, České Budějovice, 2000; s. 126. ISBN 80-7232-120-X.
9. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.** Modulation of radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP-53 deficient human leukemia cell line HL-60 by all-trans retinoid acid (ATRA). In: Conference abstracts, Jáchymov, XXIII - Days of Radiation Protection, 2000, nestr.
10. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.** TP53 Independent cell death after irradiation: relationship to cell cycle control. In: Workshop on Higher-Order Structure of Cell Nuclei and Genetic Effects of Rradiation 2000, s. 31.
11. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Cerman, J.: Hypericin inhibits cellular growth of AtT20/D16v-F2. *Acta Med.*, 2001; 44(2): 57.
12. Mareková, M., Cerman, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Čáp, J. Vliv ionizujícího záření na kotrikotrofní hypofyzární buněčnou linii AtT20/D16v-F2. *DMEV*, 2001, ročník 4, suplementum 3.
13. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S. Indukce apoptické smrti hematopoetických buněk vyvolaná ionizujícím zářením. *Acta Radiobiologica*, 2001, vol. 1, č. 1, s. 89-91
14. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Mareková, M.: Závislost indukce apoptózy u lidské promyelocytární leukemické linie HL-60 na dávce záření 60CO. Abstrakt (17. sjezd ČSAKI a SSAKI, Liberec). *Alergie*, 2001; 3(1): 83.
15. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S. Ionizing radiation as apoptosis inducer for hematopoietic cell lines. In NATO HFMP TG006 Final Meeting Agenda and Abstracts, Hradec Králové, 2001.
16. Szkanderová, S., Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J. The p53 phosphorylation at serine - 392 and activation of apoptosis promoting proteins by irradiation of Molt - 4 cells by gamma rays. In NATO HFMP TG006 Final Meeting Agenda and Abstracts, Hradec Králové, 2001.
17. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková, M.: Detection of pre-mitotic and post-mitotic apoptosis with gamma irradiation as model inductor of cell death. In Sborník abstrakt. Analytická cytometrie I. Brno: Biofyzikální ústav AV ČR, 2001; červen: 10-12.
18. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Urbánková, J.: Modulation of apoptosis induced by ionizing radiation in human leukemia cells HL-60 by all-trans-retinoic acid. Dresden, 31st Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), 1.- 5. 9. 2001. /POSTER/. ISBN 3-00-007790-1.
19. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Urbánková, J.: Early and delayed apoptosis in gamma irradiated TP53-deficient HL-60 Cells.

Dresden, 31st Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), 1.- 5. 9. 2001. /POSTER/. ISBN 3-00-007790-1.

20. Szkanderová, S., Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: The p53 phosphorylation at serine-392 and activation of apoptosis-promoting proteins by irradiation of Molt-4 cells by gamma rays. Dresden , 31st Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology (ESRB), 1. - 5. 9. 2001. /POSTER/. ISBN 3-00-007790-1.
21. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Ionizing radiation-induced apoptosis and degradation of the nuclear matrix in hematopoietic cells. Ed.: Kozubek, S., Kozubek, M., In: Biophysics Genome Interactions, 1. vyd., 2001; 86-91. ISBN: 80-210-2853-X.
22. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: Caffeine-increased radiosensitivity is dependent on a loss of G<sub>2</sub>/M arrest in human promyelocyte HL-60 cell line. *Radiother. Oncol.*, 2002; 64(Suppl.1): 307.
23. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: Loss of G<sub>2</sub>/M arrest correlates with induction of second wave of apoptosis and radiosensitization in TP53 missing HL-60 cell line. Ed.: Bodis, S., Rodemann, P., In: *Molecular Radiation Biol./Oncol.*, 1. vyd., 2002; 3: 82. ISBN: 3-00-008919-5.
24. Mareková, M., Cerman, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Čáp, J. Vliv terapeutických dávek ionizujícího záření na nádorové endokrinně aktivní hypofyzární buněčné linie. In Sjezd České a Slovenské neurochirurgické společnosti s mezinárodní účastí. Hradec Králové : Neurochirurgická klinika - Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2002, s. M1-M2.
25. Vávrová, J., Szkanderová, S., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: Biodosimetry in radiation exposure assesment. IIV. Days of radiation protection, 1. vyd., 2002; 176. ISBN: 80-01-02651-5.
26. Mareková, M., Cerman, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Čáp, J.: Vliv terapeutických dávek ionizujícího záření na nádorové endokrinně aktivní hypofyzární buněčné linie. In Sjezd české a slovenské neurochirurgické společnosti s mezinárodní účastí. Hradec Králové: Neurochirurgická klinika- Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2002, s.M1-M2.
27. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Mareková, M. Premitotická a postmitotická apoptóza indukovaná  $\gamma$ -zářením u buněk lidské promyelocytární leukemie HL-60. In IV. Dny průtokové cytometrie. 2002, s. 21.
28. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Correlation of HL-60 cell line sensitivity to low-dose-rate irradiation with G<sub>2</sub>/M-phase block and death by apoptosis. *Radiother. Oncol.*, 2002; 64(Suppl.1): 307.
29. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: G<sub>2</sub>/M arrest and death by apoptosis of TP53 missing HL-60 cells irradiated with low-dose rate gamma

- radiation. Ed.: Bodis, S., Rodemann, P., In: *Molecular Radiation Biol./Oncol.*, 1. vyd., 2002; 3: 83. ISBN: 3-00-008919-5.
30. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Řezáčová, M., Filip, S., Bláha, M.: Antiapoptotic cytokine IL-3+SCF+FLT3L influence on proliferation and differentiation of AC133+/CD34+ progenitor cells. Ed.: Mokřý, J., Duspivová, D., In: *Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochemistry*, 1. vyd., Hradec Králové, 2003; s. 70.
  31. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and ionizing radiation on induction of leukemia cells apoptosis. Ed.: Mokřý, J., Duspivová, D., In: *Progress in Basic, Applied and Diagnostic Histochem.*, 1. vyd., Hradec Králové, 2003; s. 56.
  32. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Řezáčová, M., Szkanderová, S., Pšutka, J.: Indukce druhé vlny apoptózy vyvolaná kofeinem u buněk HL-60 ozářených s nízkým dávkovým příkonem. *Analytická cytometrie II*, 1. vyd., Brno. 2003; 68.
  33. Vávrová, J., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Řezáčová, M. Využití molekulárních mechanismů vedoucích k indukci apoptózy u T-lymfocytů v biodozimetrii. Symposium teoretické a aplikované biofyziky, České Budějovice 2003.
  34. Vávrová, J., Mareková-Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Pšutka, J. Cell cycle alteration, apoptosis and response to low-dose-rate gamma radiation in leukemic cell lines. In: *Second workshop on biophysics of the genome*, Hlohovec 2003, s. 47.
  35. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Synergic effect of TRAIL and ionizing radiation in HL-60 cells - Effect of small doses. In: *Molecular Radiation Biol./Oncol.*, 1. vyd., Stuttgart, Druckerei Jauch GmbH, 2004; s. 33. ISBN: 3-9808819-1-1.
  36. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Immunophenotypic analysis of lymphocyte apoptosis upon gamma irradiation in vitro. *Physiol. Res.*, 2004; 53: 58P.
  37. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Subset NK buněk jako biodozimetrický indikátor. VI. Dny průtokové cytometrie, Praha, 3.-4.4.2006
  38. Řezáčová M., Vávrová J., **Vokurková D.**, Lukášová E., Tichý A.: Accumulation gamma H2AX and 53BP1 but not of P95/NBS1 in the site of DSB of gamma irradiated MOLT-4 leukemia cells. Joint meeting in radiation biology and radioecology. 25.-28.4. 2006, Marstrand (Sweden).
  39. Vávrová J., **Vokurková D.**, Řezáčová, M., Bláha M., Jebavý L., Filip S.: Antiapoptotic cytokines IL-3+SCF+FLT3-L influence on proliferation of gamma irradiated CD133+/CD34+ progenitor cells. Joint meeting in radiation biology and radioecology. 25.-28.4. 2006, Marstrand (Sweden).

40. Řezáčová M., Vávrová J., Zášková D., Lukášová E., **Vokurková D.** Cytotoxický a cytostatický efekt kyseliny valproové, inhibitoru histondeacetylasy. Seminář firmy Biotech, Praha 19.4.2006.
41. Zášková, D., Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Tichý, A.: Upregulation and phosphorylation of p53 and its related proteins after treatment with valproic acid in MOLT-4. Cell signaling world 2006 , Luxembourg

#### Sborníky konferencí

1. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Österreicher, J.: Apoptosis in human HL-60 cells induced by ethanol. Sborník Cells - 1.vyd. - České Budějovice: Nakl. KOPP, 1999; 92.
2. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Filip, S., Jebavý, L., Mareková, M.: Význam FLT3L při vlastní obnově a diferenciaci primitivních hematopoetických buněk in vitro. (XII. Český a Slovenský hematologický a transfuziologický sjezd s mezin. účastí. Olomouc, 1.-4.9.1999). Sborník abstrakt. Vyd. Univerzita Palackého, Olomouc 1999, s.177.
3. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.** Ovlivnění apoptózy buněk lidské leukemické linie-60 indukované ionizujícím zářením pomocí all-trans-retinové kyseliny. In Sborník příspěvků III. ročník onkologického sympózia. Hradec Králové : Klinika onkologie a radioterapie, 2001, s. 68-71.
4. Mareková, M., Cerman J., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, ČÁP J. Induction of apoptosis by ionizing radiation in corticotroph pituitary cell line AtT-20/D16v-F2. In VI. vědecká konference Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Programy a souhrny. Hradec Králové: UK - LFHK, 2002.
5. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Combined effect of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and ionizing radiation on induction of leukemia cells apoptosis. J. Molecular Histol., 2004; 35(2): 198.
6. Řezáčová, M., Cerman, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Čáp, J.: Terapeutické dávky ionizujícího záření indukují apoptózu u nádorových endokrinně aktivních hypofyzárních buněčných linií. In: Sborník Radiační onkologie: Sborník příspěvků - IV. ročník onkologického sympózia - Hradecké dny 2003. Hradec Králové: Klinika onkologie a radioterapie, FN, 2004; s. 101-104. ISBN 80-238-9604-0.
7. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Synergický efekt TRAIL a ionizující záření u buněk HL-60. Radiační onkologie 2004, 1. vyd., Hradec Králové, KORT, 2004; 135-139. ISBN: 80-239-2107-X.
8. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Řezáčová, M., Bláha, M., Filip, S.: Antiapoptotic cytokine IL-3 + SCF + FLT3L influence on proliferation and differentiation of AC133+/CD34+ progenitor cells. J. Mol. Hist. 2004, 35(2), s. 203.



9. Zášková, D., Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Tichý, A.: Phosphorylation of p53 in MOLT-4 leukemia cells after treatment with valproic acid. *J. Applied Biomed.*, 2005; 3(Suppl.1): 50-51.
10. Řezáčová, M., Čáp, J., **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Cerman, J.: Radiosensitivity of GH3 cells: Effects of somatostatin. *European Journal of Endocrinology* 152, Supl 1, 2005
11. Vávrová J., Řezáčová M., **Vokurková, D.**, Zášková D., Tichý, A., Janovská, S., Österreicher, J.: Potentiation of small dose radiation-induced cell killing by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Proceedings of the European Radiation Research (2005)*, Leicester, Great Britain, september 5-8 2005, p.205
12. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Zášková, D., Tichý, A., Janovská, S., Österreicher, J.: Enhanced radiation-induced cell killing of human T lymphocyte leukemia cells (MOLT-4) by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Mol. Radiation Biol. Oncol.*, 1. vyd., Ermantigen: Tubigen Univ., 2005; 56. ISBN: 3-9808819-2-X.
13. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, J.: Využití vícebarevné průtokové cytometrie při analýze apoptózy lymfocytů. *Sborník abstraktů "Analytická cytometrie III"*, ed. Hana Šimková. 2005; ISBN 80-239-5155-6.
14. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Natural killer subsets as biodosimetric indicators. *Sborník abstraktů 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology and 16th European Congress of Immunology*. Paříž 6. - 9.2006
15. 15. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková D.**, Odrážka, K., Lukášová, E., Šinkora, J., Österreicher, J.: Increase in gamma H2AX and decrease in NK cell characterise response of human lymphocytes to low LET irradiation. *European Radiation Research - Abstract book, 2006* s. /p./ 215

#### *Učební texty*

1. Vávrová, J., Stulík, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Indukce apoptózy protinádorovými látkami a ionizujícím zářením. *Učební texty VLA JEP v Hradci Králové*. 2002; svazek 333, 44 s.. ISBN 80-85109-23-9.

#### *Přednášky*

1. Vávrová, J., Filip, S., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Jebavý, L.: The effect of stem cell factor, interleukin 3, and FLT-3 ligand on ex vivo expansion of in vitro irradiated AC133+/CD34+ cells. *11th International Congress of radiation research, Dublin, Ireland*. 18.-23.6.1999.
2. Vávrová, J., Filip, S., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Jebavý, L., Vaňásek, J.: The effect of stem cell factor (SCF interleukin 3 (IL-3) and FLT-3 ligand (FLT-3) on ex vivo expansion of vitro irradiated AC133+/CD34+ cells. *Poster*.

Eleventh International Congress of Radiation Research. Dublin, Ireland, 18.-23.7.1999.

3. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Österreicher, J.: Apoptosis in human HL-60 cells induced by ethanol. Poster. XV. Biologické dny. České Budějovice, 6.-8.9.1999
4. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Jebavý, L., Mareková, M.: Influence of FLT3L on ex vivo expansion and maturation of peripheral blood AC133+/CD34+ cells. CELLS, 15th Biological Days of Czechoslovak Biological Society, České Budějovice, 6.-8.8.1999.
5. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Filip, S., Jebavý, L., Mareková, M.: Význam FLT3L při vlastní obnově a diferenciaci primitivních (AC133+/CD34+) hematopoetických buněk in vitro. XII. Český a Slovenský hematologický a transfuziologický sjezd s mezinárodní účastí. Olomouc, 1.-4.9.1999.
6. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Filip, S., Jebavý, L., Mareková, M.: Influence of FLT3L on ex vivo expansion and maturation of peripheral blood AC133+/CD34+ haematopoietic cells. Poster. XV. Biologické dny. České Budějovice, 6.-8.9.1999.
7. Vávrová, J., Filip, S., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Vaňásek, J., Jebavý, L.: Ex vivo expansion of CD34+/CD133+ cells. International Symposium in Cooperation with ESO under the Auspice of MASCC. Praha, 24.-26.9.1999.
8. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Bláha, M., Filip, S., Jebavý, L.: Ex vivo expanze AC133+ hematopoetických buněk: Příspěvek k léčbě ozářených při radičních nehodách. XXII. Radiohygienické dny. Jáchymov, 16.-18.11.1999.
9. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Filip, S., Bláha, M., Jebavý, L.: AC133 - nový marker pro hematopoetické kmenové buňky. III. dny průtokové cytometrie, Praha, 10.-11.4.2000.
10. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Therapeutic induction of programmed cell death. Seminář "Buňky II/Cells II", České Budějovice, 5.-6.9.2000.
11. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Urbánková, J.: Idarubicin-induced apoptosis in HL-60 cells: relationship between apoptosis and time dependence of apoptosis on idarubicin dose. Seminář "Buňky II/Cells II", České Budějovice, 5.-6.9.2000.
12. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Mareková, M.: Závislost indukce apoptózy u lidské promyelocytární leukemické linie HL-60 na dávce záření <sup>60</sup>Co. 17. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů a 9. Sjezd českých a slovenských imunologů, Liberec, 25.-28.10.2000.
13. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Independent cell death after irradiation: relationship to cell cycle control. Workshop on Higher-Order

Structure of Cell Nuclei and Genetic Effects of Radiation. Valtice, 7.-8.11.2000.

14. Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**: Modulation of radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60 by all-trans retinoid acid (ATRA). XXIII. Days of radiation protection. Jáchymov, 28.11.-1.12.2000.
15. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková, M.: Detekce premitotické a postmitotické apoptózy s využitím  $\gamma$ -ozáření jako modelového induktoru buněčné smrti. Brno, Analytická cytometrie I, 3.- 5. 6. 2001.
16. Szkanderová, S., Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: Změna exprese p53 a p21 u buněčné linie Molt-4 po účinku ionizujícího záření. Hradec Králové, Dny Radiobiologické společnosti České lékařské společnosti JEP, 15. - 16. 6. 2001.
17. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Indukce apoptotické smrti hematopoetických buněk vyvolaná ionizujícím zářením. Hradec Králové, Dny Radiobiologické společnosti České lékařské společnosti JEP, 15. - 16. 6. 2001.
18. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Mareková, M., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Indukce apoptotické smrti primitivních hematopoetických buněk. XVI. Biologické dny. Olomouc, 5.-7.9.2001.
19. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Ionizing radiation - induced and degradation of the nuclear matrix in hematopoietic cells. Hlohovec , Conference Biophysics of the Genome and Its Interactions , 15. - 17. 10. 2001.
20. Szkanderová, S., Vávrová, J., Mareková, M., **Vokurková, D.**, Stulík, J.: The p53 phosphorylation at serine - 392 and activation of apoptosis promoting proteins by irradiation of Molt - 4 cells by gamma rays. Hradec Králové, NATO HFMP TG006 Final Meeting , 22. - 24. 10. 2001.
21. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Ionizing radiation as apoptosis inducer for hematopoietic cell lines. Hradec Králové, NATO HFMP TG006 Final Meeting, 22. - 24. 10. 2001.
22. Vávrová, J., Mareková, M., Szkanderová, S., **Vokurková, D.**, Stulík, J., Bláha, M., Jebavý, L., Filip, S.: Ionizující záření jako induktor apoptózy u hematopoetických buněk. Praha, SZÚ Praha. Apoptóza 2001, 27. 11. 2001.
23. Mareková, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**: Ovlivnění apoptózy buněk lidské leukemické linie HL-60 indukované ionizujícím zářením pomocí all-trans-retinové kyseliny. Hradec Králové, Radiační onkologie 2001.
24. **Vokurková, D.**, Vávrová, J., Mareková, M.: Premitotická a postmitotická apoptóza indukovaná  $\gamma$ -zářením u buněk lidské promyelocytární leukémie HL-60. IV. Dny průtokové cytometrie. Praha, 8.-9.4.2002.

25. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Mareková-Řezáčová, M., Szkanderová, S., Psutka, J.: Indukce druhé vlny apoptózy vyvolaná kofeinem u buněk HL-60 ozářených s nízkým dávkovým příkonem. Analytická cytometrie II - konference se zahraniční účastí. Brno, 11.-14.5.2003.
26. Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Řezáčová, M., Bláha, M., Filip, S.: Antiapoptotic cytokine IL-3+SCF+FTL3L influence on proliferation and differentiation of AC133+/CD34+ progenitor cells. Progress in basic, applied and diagnostic histochemistry. 40th Symposium of the Czech Society of Histo- and Cytochemistry with International Participation, Hradec Králové, 15.-19.9.2003.
27. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Souběžná analýza povrchových znaků a fosfatidylserinu při apoptóze lymfocytů vyvolané radiací. V. dny průtokové cytometrie. Praha, 19.-20.4.2004.
28. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Immunophenotypic analysis of lymphocyte apoptosis upon gamma irradiation in vitro. 15th Congress of Pathological and Clinical Physiology. Hradec Králové, 22.-23.9.2004.
29. Vávrová, J., Řezáčová, M., **Vokurková, D.**, Odrážka, K., Lukášová, E., Šinkora, J., Österreicher, J.: Increase in gamma H2AX and decrease in NK cell characterise response of human lymphocytes to low LET irradiation. European Radiation Research, 2006
30. Řezáčová, M., Vávrová, J., **Vokurková, D.**, Lukášová, E., Tichý, A.: Accumulation gamma H2AX and 53BP1 but not of P95/NBS1 in the site of DSB of gamma irradiated MOLT-4 leukemia cells. Joint meeting in radiation biology and radioecology, 2006
31. Vávrová, J., Řezáčová, M., Zášková, D., **Vokurková, D.**: Kombinovaný efekt ionizujícího záření a kyseliny valproové. 450. plenární zasedání ČLS JEP, 2006
32. Řezáčová, M., Vávrová, J., Zášková, D., Lukášová, E., **Vokurková, D.**: Cytotoxický a cytostatický efekt kyseliny valproové, inhibitoru histondeacetylasy. Seminář firmy Biotech, 2006
33. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Subset NK buněk jako biodozimetrický indikátor. VI. Dny průtokové cytometrie, Praha, 3.-4.4.2006
34. **Vokurková, D.**, Šinkora, J., Vávrová, J., Řezáčová, M.: Dávkově závislý pokles počtu NK buněk v periferní krvi po ozáření dávkami do 10 Gy. Seminář : Nové pohledy na účinek ionizujícího záření a cytostatických látek na molekulární úrovni, Hradec Králové, 7.12.2006