

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



**Možnosti průtokové cytometrie v analýze reakce buněk na genotoxický stres**

**Radim Havelek**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program Lékařská chemie a biochemie**

**Hradec Králové**

**2012**

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Radim Havelek  
Ústav lékařské biochemie

Školitel: doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.  
Ústav lékařské biochemie

Oponenti: prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc.  
Fakulta vojenského zdravotnictví  
Univerzita obrany

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.  
Fakulta chemicko-technologická  
Univerzita Pardubice

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská chemie a biochemie  
26. 6. 2012 ve 14:30 v Zasedací místnosti děkanátu LF (1. patro), Šimkova 870, Hradec  
Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantů:  
MSM 0021620820  
GAČR 304/09/1568  
MO AČR MO0FVZ0000501 a OVUOFVZ200806

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty  
v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel.  
495 816 131).

doc. MUDr. Jaroslav Cerman, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

## Obsah:

<b>1. SOUHRN</b> .....	<b>2</b>
<b>2. SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>3. ÚVOD DO PROBLEMATIKY</b> .....	<b>4</b>
3.1. Histon H2AX.....	4
3.2. Zástava buněčného cyklu.....	5
3.3. Poškozením DNA indukovaná apoptóza.....	6
3.4. Stresem indukovaná předčasná senescence.....	6
3.5. Vanadocen dichlorid.....	6
<b>4. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>7</b>
<b>5. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>8</b>
5.1. Zvířata.....	8
5.2. Buněčné kultury a kultivační podmínky.....	8
5.3. Ozařování.....	9
5.4. Cytostatika a inhibitory.....	9
5.5. Průtoková cytometrie.....	9
5.5.1. Kvantifikace histonu $\gamma$ H2AX.....	9
5.5.2. Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA.....	10
5.5.3. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy asociované se senescencí.....	10
5.6. Imunocytochemie.....	10
5.7. Cytochemie.....	10
5.8. Statistická analýza.....	10
<b>6. VÝSLEDKY</b> .....	<b>11</b>
6.1. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 <i>in vivo</i> .....	11
6.1.1. Celotělové ozáření potkanů.....	11
6.1.2. Lokální ozáření oblasti hrudníku potkanů.....	12
6.2. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 <i>in vitro</i> .....	14
6.2.1. Vliv inhibice ATM kinasy na ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách periodontálního ligamenta.....	14
6.2.2. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na vznik $\gamma$ H2AX v buňkách lidské promyelocytární leukemie HL-60.....	15
6.3. Analýza buněčného cyklu po působení genotoxických agens.....	17
6.3.1. Vliv ionizujícího záření na buněčný cyklus.....	17
6.3.2. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na buněčný cyklus.....	18
6.4. Senescence po působení ionizujícího záření.....	19
<b>7. DISKUSE</b> .....	<b>20</b>
<b>8. ZÁVĚR</b> .....	<b>25</b>
<b>9. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>26</b>
<b>10. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ</b> .....	<b>30</b>

## 1. Souhrn

### Možnosti průtokové cytometrie v analýze reakce buněk na genotoxický stres

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

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

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

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

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

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

## 2. Summary

### Possibilities of flow cytometry in analysis of cellular response to genotoxic stress

Flow cytometry is a modern tool for interrogating the immunophenotype and functional characteristics of cells. It is a technique of quantitative single cell analysis that works by sensing optical properties of cells in a flow stream with laser beam. Analysis and differentiation of the cells is based on size, granularity, and whether the cell is carrying fluorescent molecules in the form of either conjugated antibodies or dyes. The cells may be stained with fluorescent dyes, incubated with fluorogenic substrate or labelled with fluorochrome-linked antibodies specific for molecules either on the surface or in the intracellular components of the cell. Flow cytometers are multiparameter, recording several measurements on each cell. Therefore, it is possible to identify a homogeneous subpopulation within a heterogeneous population of cells.

When cells are exposed to genotoxic agent, they respond quantitatively and qualitatively according to the absorbed dose and the cell type. To cope with the resulting damage to cellular DNA, the temporary cell-cycle checkpoints and DNA damage response mechanisms are activated to allow more time for effective repair. However, if these mechanisms fail or the damage is irreparable, then cell death via apoptosis or stress-induced premature senescence is induced. Among the different types of DNA damage, DNA double strand breaks (DSB) are the most detrimental type of DNA lesions. In molecular cell response to DSB, the conserved C-terminal tail of histone H2AX becomes rapidly phosphorylated at serine 139 by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-like kinases family, including ataxia telangiectasia mutated (ATM), ATR (ATM and Rad3-related protein), and DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). The serine 139 phosphorylated histone H2AX is denoted as  $\gamma$ H2AX, its creation peak approximately 1 hour after DSB formation and is one of the earliest known event involved in DNA damage response pathway.

The aim of our work was to quantify DSB *in vivo* and *in vitro*, cell cycle changes, apoptosis and senescence induced by genotoxic agents using selected flow cytometry methods. We used ionizing radiation, cisplatin, mitoxantrone and vanadocene dichloride as genotoxic agents. Experiments were performed using diverse prototype of cells: rat or human lymphocytes, mesenchymal stem cells, leukemia cell lines HL-60 and MOLT-4.

The immunofluorescence-based detection of  $\gamma$ H2AX is a reliable and sensitive method for quantitatively measuring DNA DSB. Our findings indicate that quantification of  $\gamma$ H2AX formation in rat peripheral blood lymphocytes 1 hour from irradiation make an early screening biological dosimeter for analyzing received dose of whole-body or thoracic radiation. This tool might help clinicians estimate received dose of radiation by organism and in consequence based on the results provide appropriate types of medical intervention to irradiated persons for optimal individual outcome. An increase in formation of  $\gamma$ H2AX in rat peripheral blood lymphocytes was accompanied by dose dependent leukopenia and lymphopenia 24 hours following whole-body and thoracic irradiation of rat.

Mesenchymal stem cells respond to ionizing radiation by stress-induced premature senescence without induction of apoptosis, even after high doses of gamma radiation. Quickly following irradiation DSB-induced  $\gamma$ H2AX foci are formed in mesenchymal stem cells. Majority of DSB lesions are repaired within 24 h when most  $\gamma$ H2AX foci have disappeared. The phosphorylation of H2AX was found to be ATM dependent. The inhibition of ATM by KU55933 completely abrogates the formation of  $\gamma$ H2AX foci. Using cell cycle analysis we found that mesenchymal stem cells are preferentially accumulated in the G2 phase of the cell cycle in response to gamma irradiation. We observed increase in senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity using fluorogenic substrate and cytochemistry.

Our findings showed cytotoxic effect of vanadocene dichloride on leukemia cells, but unfortunately on human peripheral blood lymphocytes as well. Vanadocene dichloride induces apoptosis in leukemia cells; the induction is, however, lower than that of cisplatin. A linear dose-response relationship between vanadocene dichloride dose and phosphorylation of H2AX in leukemia cells 1 hour after vanadocene dichloride treatment was observed. The data indicate that cytotoxic effect of vanadocene dichloride on leukemia cells can be particularly mediated by the formation of DSB.

### 3. Úvod do problematiky

Buňky vystaveny působení genotoxických agens fyzikální nebo chemické povahy (ionizující záření, cytostatika, reaktivní formy kyslíku a dusíku exogenního nebo endogenního původu) vykazují intenzivní poškození DNA charakterizované poškozením nukleových bází, intramolekulárním zesíťováním vláken DNA s jadernými bílkovinami, jedno a dvouřetězcovými zlomy DNA a další (Khanna et al. 2001). Typ a rozsah poškození genetické informace buňky závisí jak na druhu a délce působení genotoxického agens, tak na vnímavosti daného buněčného typu k jeho působení. Za nejzávažnější formu poškození jaderné DNA se považují dvojité (dvouvláknové) zlomy dvoušroubovice DNA (double strand breaks, DSB). Již jeden DSB může vyvolat buněčnou smrt, pokud není reparován. Ztráta kontinuity mezi fragmenty DNA a centromerou během mitózy může vyústit v delecii velké části genetické informace přenášené do dceřiných buněk. Pokud nejsou správně opraveny, DSB mohou způsobit změny v sekvenci DNA, chromosomální translokace, genetickou nestabilitu, eventuelně neoplastickou transformaci buňky. Není tedy překvapením, že buněčná odpověď na poškození DNA a především DSB představuje sofistikovaný soubor molekulárních reakcí vedoucích k detekci DSB (Jackson 2002).

Po detekci poškození DNA dojde k aktivaci proteinů z rodiny tzv. serin/threonin proteinkinasy příbuzných fosfatidylinositol-3 kinase (PI3K): ataxia-teleangiectasia mutated (ATM), ataxia-teleangiectasia a Rad3-related (ATR) a katalytické podjednotky DNA-závislé proteinkinasy (DNA-PKcs) (Shiloh et al. 2003). O tom, která kinasa bude přednostně aktivována, rozhodne typ poškození genomu, doba od vzniku poškození, druh a kvantum působícího genotoxického agens. Tyto kinasy dále aktivují složitou, do dnes stále ne zcela prozkoumanou síť efektorových molekul, které ve vzájemné interakci soustřeďují své aktivity v závislosti na typu upřednostněné signální dráhy ve směru: opravy poškozené DNA, zástavy buněčného cyklu, indukce senescence nebo apoptózy.

Práce se zaměřila na detekci dvouvláknových zlomů DNA, změn buněčného cyklu a apoptózy po působení genotoxických agens, zejména ionizujícího záření, cisplatinu a vanadocen dichloridu, pomocí vybraných metod průtokové cytometrie. Ke studiu byly použity různé modelové typy buněk, nádorové buněčné linie, mesenchymální kmenové buňky a lymfocyty izolované z periferní krve.

#### 3.1. Histon H2AX

Základní jednotka chromatinu je nukleosom. Každý nukleosom obsahuje oktamer histonů, jednu molekulu spojovacího histonu H1, která není součástí histonového oktameru, úsek DNA o průměrné délce 200 bp (146 nukleotidových párů je omotáno kolem jádra nukleosomu a průměrně 50 nukleotidových párů spojuje sousední jádra nukleosomů), který tvoří dvě otáčky (dva závity) kolem histonového oktameru. Histony jsou relativně malé proteiny, jejich molekulová hmotnost je mezi 11 kDa (H4) - 15 kDa (H3) s vysokým obsahem kladně nabitých bazických aminokyselin lysinu a argininu. Na základě poměrů argininu k lysinu, velikosti a náboje se rozlišuje 5 druhů histonů, H1, H2A, H2B, H3, H4. Obsah histonů je v buňce značný, kolem 60 milionů molekul od každého typu v jedné buňce a jejich celková hmotnost je přibližně stejná jako DNA samotné. Histonový oktamer je tvořen histonovým tetrametrem (H3)<sub>2</sub>-(H4)<sub>2</sub> a dvěma dimery H2A a H2B. Flexibilní (volné) N- a C- terminální konce histonů prodělávají četné posttranslační modifikace. Jedná se o fosforylaci, metylaci, acetylaci, ADP-ribosylaci, biotinylní, nebo nakonec degradační ubikvitinaci. Tyto modifikace způsobují přestavbu chromatinu a tak tvoří epigenetický regulační mechanismus, uplatňující se jak v normálních, tak patologických buněčných procesech. Epigenetické změny ovlivňují nejen selektivní proces řízení exprese genů nutných například pro buněčnou diferenciaci, ale i expresi genů nutných pro reparaci DNA (Ramakrishnan 1997, Řezáčová et al. 2011, Alberts et al. 1994).

Histon H2AX tvoří 2-25 % z celkového množství histonu H2A, množství záleží na typu organismu nebo typu studovaných buněk, např. v normálních lidských fibroblastech je to cca 10 %, 2 % v lymfocytech nebo buňkách HeLa. Podobně jako ostatní histonové proteiny obsahuje H2AX centrální globulární doménu a dva volné boční konce, tzv. N-terminální serinovou a C-terminální tyrosinovou část, obě představují místo pro posttranslační modifikace. Většina těchto modifikací se

děje na N-konci, významně i na C-konci a mají specifické funkce v metabolismu DNA a pro zpřístupnění poškozené DNA během její reparační (Pinto et al. 2010).

Vznik DSB různého původu během několika minut (s maximem ~ 30 až 60 minut) spouští v okolí zlomu fosforylaci histonu H2AX. Fosforylaci zejména zprostředkovává aktivovaná ATM proteinkinasa, a to na serinu 139, který je součástí SQ domény v C-terminální oblasti molekuly H2AX (Rogakou et al. 1998, Burma et al. 2001). V závislosti na induktoru DSB může fosforylaci zprostředkovávat také Rad3-related proteinkinasa (ATR) (Furuta et al. 2003) a DNA-závislá proteinkinasa (DNA-PK) (Park et al. 2003). Ionizujícím zářením indukované DSB vedou k fosforylaci H2AX zejména prostřednictvím ATM kinasy (Bekker-Jensen et al. 2006), po působení UV záření nebo replikačního stresu se naopak uplatňuje ATR kinasa (Zhou et al. 2000). DNA-PK je zodpovědná za fosforylaci H2AX během fragmentace DNA jakožto děje charakteristického pro průběh apoptózy, zatímco ATM kinasa se na tomto procesu v této fázi reakce buněk na genotoxický stres nepodílí (Mukherjee et al. 2006). Fosforylace histonu H2AX se šíří po sousedním chromatinu za vzniku ložisek, do kterých se rekrutuje celá řada proteinů souvisejících s reparačními a smrtími pochody (Rogakou et al. 1998). Mezi proteiny, které se kolokalizují s  $\gamma$ H2AX patří NBS1, 53BP1, MDC1, BRCA1, MRE11, Rad50, Rad 51, Tip 60, HDAC4 (Kinner et al. 2008). Úloha těchto proteinů v buněčné odpovědi na DSB se liší. Proteiny MRE11 Rad 50 a Nbs1 vytvářejí funkční komplex, který působí jako senzor pro detekci DSB a stabilizuje volné konce DNA. Histonacetyltransferasa Tip 60 a histonacetyltransferasa HDAC4 modulují acetylaci chromatinu a ovlivňují rozvolnění terciární struktury DNA. Proteiny 53BP1 a MDC1 působí jako adaptorové molekuly a zprostředkovávají interakce ostatních proteinů s poškozeným místem (Řezáčová et al. 2011).

Stanovení fosforylovaného histonu H2AX je možné využít jako indikátoru přítomnosti DSB v DNA buňky. Počet molekul fosforylovaného histonu H2AX odpovídá počtu DSB, jedná se tedy o znak, který nám poskytne obraz jak kvalitativní (přítomnost nebo nepřítomnost DSB), tak kvantitativní (rozsah DSB v genomu buňky). Amplifikace signálu, kdy vznik jednoho DSB vede k fosforylaci přibližně stovek až tisíců molekul H2AX, umožňuje velmi citlivě stanovit rozsah vzniku DSB v DNA eukaryotní buňky (Rothkamm et al. 2003). Ke vzniku DSB vyvolávajících tvorbu  $\gamma$ H2AX dochází také v průběhu apoptózy. Během apoptózy je fosforylace H2AX obvykle značně masivní, v jádře vykazující pan-nukleární charakteristiku (Solier et al. 2009).

### 3.2. Zástava buněčného cyklu

Savčí buňka disponuje různorodými mechanismy k udržení genetické integrity po působení genotoxických agens. Tyto mechanismy jsou často primárně závislé na dočasné zástavě buněčného cyklu v G1, S a G2/M kontrolních bodech. Zástava proliferace poskytne nezbytný čas k opravě poškozené DNA, zabrání přenesení poškozené genetické informace do buněk dceřiných, jež by mohlo mít za následek rozvoj nádorového bujení.

Buněčný cyklus je kontrolován především pomocí komplexu regulačních serin/threonin specifických proteinkinasy (cyklin-dependentní kinasy Cdk) a cyklinu. Cdk jsou enzymy kinasy, které fosforylují serin a threonin na jiných proteinech, a tím je zpravidla aktivují. Cdk jsou aktivní pouze v případě, když jsou navázány na určité cykliny za vytváření komplexu Cdk-cyklin (cyklin dependentní – cyklin závislé). Pro cykliny je charakteristické, že jsou druhově exprimovány v závislosti na fázi buněčného cyklu. Podílejí se na činnostech, které jsou rozhodující pro průběh resp. zástavu buněčného cyklu (Jeffrey et al. 1995).

V současnosti je popsáno několik mechanismů, které regulují aktivitu komplexu Cdk/cyklin v průběhu buněčného cyklu. Prvním mechanismem je regulace exprese, kdy například exprese cyklinu typu D je regulována přítomností, nebo absencí mitogenních růstových faktorů (Matsushima et al. 1991). Za druhé, v opaku k regulaci syntézy cyklinů, existuje aktivní regulace jejich degradace pomocí označení cyklinu ubiquitinem a následné degradace v proteasomu (Peters 1998). Cdk/cyklin komplex musí být aktivován Cdk – aktivační kinasou, která fosforyluje Thr zbytek na molekule Cdk (Fisher et al. 1994). Naopak některé aminokyselinové zbytky v molekule Cdk musí být defosforylovány. Tento proces je zajišťován jednak inhibicí určitých kinas (Wee1/Myt1) a aktivací fosfatů (známé jako Cdc25 A, B a C). Konečně, aktivita komplexu Cdk/cyklin je kontrolována dalšími protein-protein interakcemi mezi Cdk, komplexy Cdk/cyklin a

proteiny známými jako inhibitory cyklin/Cdk (CKIs) (Morgan 1995). CKIs se rozdělují na dvě skupiny, jedna skupina zahrnuje členy rodiny Cip/Kip: p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, a p57<sup>KIP2</sup>, jenž se jeví jako universální inhibitory aktivity komplexu Cdk/cyklin. Druhou skupinu tvoří inhibiční proteiny rodiny Ink4: p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, a p19<sup>INK4d</sup>. Tyto čtyři proteiny inhibují cyklin D asociované komplexy s Cdk4 a Cdk6. CKIs mohou být rovněž regulovány. Například p21<sup>WAF1/CIP1</sup> byl identifikován na podkladě toho, že protein p53 může indukovat jeho expresi (El-Deiry et al. 1993, Vávrová a Řezáčová, 2011). Z tohoto důvodu je dnes považován za jeden z efektorů p53 – zprostředkované zástavy buněčného cyklu po působení genotoxického agens (El-Deiry et al. 1994).

Centrálními komponentami důležitými pro zástavu buněčného cyklu po působení genotoxických agens jsou již zmíněné ATM a ATR proteinkinasy. K důležitým substrátům ATM a ATR proteinkinasy patří checkpoint kinasy. Checkpoint kinasy 1 a 2 (Chk1 a Chk2) jsou serin/threoninové kinasy fosforylované ATM a ATR proteinkinasy v odpovědi na genomové poškození. Jejich aktivace pomocí fosforylace vede k potlačení funkce fosfatas rodiny Cdc25.

### 3.3. Poškozením DNA indukovaná apoptóza

Poškozením jaderné DNA je přednostně aktivovaná vnitřní, neboli mitochondriální cesta apoptózy. Vnitřní cesta apoptózy je aktivovaná fosforylací proteinu p53 a vzestupem proapoptotických členů rodiny Bcl-2. Rodina proteinů Bcl-2 kontroluje permeabilitu mitochondriální membrány, bylo identifikováno více jak 20 členů a dělí se do tří skupin na základě funkčních a strukturních kritérií. Skupinu I představují antiapoptotické Bcl-2-like faktory přežití: Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva, Nrf3, a Bcl-B. Všeobecně obsahují 4 krátké BH domény: BH1-BH4, a většina obsahuje C-koncovou transmembránovou doménu, která je zaměřuje na cytoplasmatický povrch rozličných intracelulárních membrán včetně mitochondrií a endoplazmatického retikula. Skupina II zahrnuje proapoptotické Bax-like faktory smrti: Bax, Bak, a Bok/Mtd, které postrádají N-koncovou doménu BH4, ale obsahují ostatní BH domény. Skupinu III tvoří proapoptotické BH3-onlies, mají jen doménu BH3: Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, Puma, a Bcl-G (Cory et al. 2003). Proapoptotické a antiapoptotické proteiny rodiny Bcl-2 se setkávají na povrchu mitochondrií, kde regulují uvolnění cytochromu c. Cytochrom c spolu s Apaf-1 za aktivace prokaspasy-9 na kaspasu-9 vytváří komplex nazývaný apoptosom. Kaspasa-9 aktivuje exekuční kaspasy (především kaspasu-3) a dojde k vlastnímu apoptotickému procesu (Hill et al. 2004).

### 3.4. Stresem indukovaná předčasná senescence

Alternativním typem odpovědi některých druhů buněk na genotoxický stres je vstup do stavu stresem indukované předčasné senescence (SIPS). Buňky zůstávají živé, metabolicky aktivní po mnoho týdnů, nedělí se, dojde k permanentní a nevratné zástavě buněčného cyklu. Fenotyp senescentních buněk zahrnuje změny v morfologii buňky, buňky jsou větší, dojde k jejich tvarovému zploštění a vzrůstu granularity cytoplasmy. Dochází ke změnám ve struktuře chromatinu, následované změnami ve složení exprimovaných genů, buňky ztrácí schopnost reagovat na mitogenní stimuly, zvýší se biogeneze mitochondrií a lysozomů, vzroste exprese β-galaktosidasy (Dimri et al. 1995).

### 3.5. Vanadocen dichlorid

Vanadocen dichlorid (dichloro-bis(η<sup>5</sup>-2,4-cyklopentadien-1-yl) vanad je sloučenina ze skupiny metallocendihalogenidů skládající se ze dvou cyklopentadienových aromatických kruhů mezi nimiž je koordinován čtyřmocný (+IV) vanad pentahaptickou (η<sup>5</sup>-) vazbou. Vanadocen dichlorid je v dnešní době intenzivně studován pro své potenciální cytostatické a kancerostatické účinky.



#### 4. Cíle disertační práce

Cílem naší práce bylo prostudovat možnosti průtokové cytometrie v kvantifikaci buněčné odpovědi na genotoxický stres *in vivo* a *in vitro*. Detekovali jsme změny související s rozpoznáním poškození DNA a následnou buněčnou reakcí. Nejzávažnějším poškozením jaderné DNA buňky je vznik dvouvláknových zlomů DNA. Buňka se snaží poškození DNA reparovat dočasnou zástavou buněčného cyklu, je-li poškození nereparovatelné dochází k indukci apoptózy, nebo senescence.

Jednotlivé cíle byly stanoveny takto:

- Kvantifikovat změny v množství  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve 1 h od celotělového a lokálního ozáření potkanů v závislosti na dávce ionizujícího záření pro účely biologické dozimetrie.
- Objasnit rozdíly ve výskytu  $\gamma$ H2AX v populaci lymfocytů po celotělovém a lokálním ozáření, kinetiku reparace radiačního poškození podle vymizení  $\gamma$ H2AX a možnost odložené analýzy  $\gamma$ H2AX.
- Stanovit změny v počtu periferních lymfocytů 24 hodin od celotělového a lokálního ozáření potkanů ve vztahu k dávkám záření použitým při kvantifikaci  $\gamma$ H2AX.
- Prostudovat časovou a dávkovou závislost vzniku  $\gamma$ H2AX *in vitro* v mesenchymálních kmenových buňkách po působení ionizujícího záření samostatně, nebo v kombinaci s inhibicí ATM kinasy.
- Stanovit, jak expozice ionizujícímu záření ovlivňuje distribuci mesenchymálních kmenových buněk v buněčném cyklu v kontextu obdržené dávky a času od ozáření.
- Objasnit kinetiku rozvoje senescence pomocí kvantifikace aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí u mesenchymálních kmenových buněk po ozáření.
- Zhodnotit pomocí průtokové cytometrie, zda inhibice ATM kinasy během ozáření ovlivní distribuci mesenchymálních kmenových buněk v buněčném cyklu.
- Objasnit, zda potenciální protinádorová látka vanadocen dichlorid indukuje dávkově závislý vznik  $\gamma$ H2AX a apoptózu u leukemických buněk HL-60 v porovnání s klasickou cytostatickou látkou cisplatinou.
- Zjistit, jestli potenciální protinádorová látka vanadocen dichlorid účinněji indukuje apoptózu u maligně transformovaných T-lymfocytů linie MOLT-4, nebo u zdravých lidských lymfocytů izolovaných z periferní krve v kontrastu s působením cisplatinou.
- Stanovit velikost mitoxantronem indukované apoptózy u T-lymfocytární leukemické linie MOLT-4 za inhibice ATM kinasy a MEK1/2 kinas.

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Zvířata

V experimentech na zvířatech byly použity samice potkana kmene Wistar kvality SPF (specific pathogen-free), (Velaz, Česká republika), o hmotnosti 210 – 250 g. Potkani byli chováni v klimatizovaných místnostech s řízenou teplotou a vlhkostí vzduchu. Cykly světla a tmy se pravidelně střídaly vždy po 12 h. Standardní laboratorní dieta byla potkanům dostupná *ad libitum*. Veškeré pokusy prováděné na potkanech byly schváleny Komisí pro laboratorní zvířata FVZ UO v Hradci Králové. Každá experimentální skupina zahrnovala 6-9 zvířat.

### 5.2. Buněčné kultury a kultivační podmínky

Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 byly získány z evropské sbírky buněčných kultur (European collection of animal cell cultures, Velká Británie). Buňky HL-60 byly kultivovány v Iskově modifikaci Dulbeccova media, IMDM (Sigma-Aldrich, USA) s přidavkem 20 % fetálního telecího séra, 2 mM L-glutaminu, 100 UI/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (vše od Sigma-Aldrich, USA). Buňky byly kultivovány ve vlhčeném inkubátoru při 37° C a v kontrolované 5% CO<sub>2</sub> atmosféře. Pasážování buněk bylo prováděno pravidelně, vždy každé dva až tři dny ředěním na koncentraci 2 x 10<sup>5</sup> buněk/ml media. Buňky byly počítány v Türkově roztoku s použitím Bürkerovy komůrky (hemocytometru); integrita buněčné membrány byla sledována pomocí barvení trypanovou modří. Ve všech experimentech byly použity buňky, které prošly pasážemi maximálně dvacetkrát.

Potkaní lymfocyty použité v experimentech byly izolovány z periferní heparinizované krve pomocí přípravku Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, USA) přesně dle instrukcí návodu výrobce. Zbylé erythrocyty v peletě buněk byly lyzovány pomocí EasyLyse™ (Dako Cytomation, Německo) dle instrukcí návodu výrobce.

Mesenchymální kmenové buňky (MKB) byly izolovány z periodontálního ligamenta (KBPL) kolektivem Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové. Všechny kmenové buňky studované v rámci zde uváděných experimentů byly připraveny v požadovaném množství pracovníky Ústavu histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové dle standardních operačních postupů laboratoře tkáňových kultur ústavu.

KBPL byly izolovány z třetích molárů získaných od zdravých dárců (2 ženy a 1 muž, průměrný věk dárců byl 19 let). Třetí moláry byly extrahovány z ortodontických důvodů, nebo pro zdravotní problémy, které vyvolávaly pacientům. Extrahované periodontální ligamentum bylo ze zubu separováno, promyto PBS a pak podrobeno disociaci působením kolagenasy (Sevapharma, Česká republika) a dispasy (Invitrogen, USA) po dobu 70 min. Po následné centrifugaci (600 G, 5 min) byla získána peleta buněk.

Podle standardů Etické komise Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové dali dárce, případně jejich zákonní zástupci informovaný souhlas s odběrem biologického materiálu k experimentálnímu účelům.

KBPL byly kultivovány v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> při 37° C v mediu pro lidské mesenchymální kmenové buňky (Soukup et al. 2006) složeném z alfa-MEM (Invitrogen, USA) s nízkým 2% obsahem fetálního telecího séra (PAA, USA), s obsahem 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru (PeproTech, USA), 10 ng/ml platelet-derived growth factoru (PeproTech), kyseliny L-askorbové (Sigma-Aldrich, USA), 2% L-glutaminu (Invitrogen, USA), ATB penicilin/streptomycin (Invitrogen, USA) a gentamycin (Invitrogen, USA), dexamethason (Sigma-Aldrich, USA). KBPL byly nejprve kultivovány v primokultuře po dobu 5-7 dnů (KBZP 3-5 dnů) v kultivačních lahvích Cell<sup>+</sup> surface® (Sarstedt, USA). Neadherentní buňky a zbytky nedisociovaných tkání byly 24 h od inokulace buněk odmyty pomocí PBS. Po následné kultivaci byly v těchto lahvích selektovány malé kolonie kmenových buněk, pomocí roztoku trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) disociovány a již v homogenní suspenzi KB nasazeny do běžných kultivačních lahví (TPP, Švýcarsko nebo NUNC, Dánsko). Každá z následujících pasáží byla provedena při dosažení 70%

konfluence. V experimentech byly vždy použity jen časné pasáže (KBPL 3 - 6). Vždy každý čtvrtý den od ozáření bylo přidáno čerstvé kompletní kultivační medium.

### 5.3. Ozařování

Exponenciálně rostoucí buňky v suspenzi o koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk/ml, kultury adherentních subkonfluentních (konfluence 50 – 60 %) proliferujících buněk tvořících monolayer v denzitě 10 000 buněk/cm<sup>2</sup> byly v kultivačních lahvích, zkumavkách nebo Petriho miskách (TPP, Švýcarsko nebo Nunc, Dánsko) ozářeny při pokojové teplotě s použitím gama zářiče <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) dávkovým příkonem 1 Gy/min, ve vzdálenosti 1 m od zdroje. Po ozáření byly lahve s buňkami umístěny do inkubátoru při 37° C se zvýšeným 5% obsahem CO<sub>2</sub>. V různých časech od ozáření byly odebrány příslušné alikvotní části buněk v suspenzi, případně buňky uvolněny od kultivačního povrchu odstraněním media, dvojmocných iontů a působením proteas, trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, USA) nebo Accutase (směs proteolytických a kolagenolytických enzymů, PAA, Rakousko).

Samice potkana kmene Wistar byly ozářeny celotělově (0,5-10 Gy) nebo lokálně na oblast plic (5-30 Gy). K celotělovému ozáření byl použit kobaltový gama zářič - <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) s dávkovým příkonem 0,5-1 Gy/min ve vzdálenosti 1 m od zdroje. K provedení celotělového ozáření bylo použito kulatého boxu z plexiskla, kde můžeme ozařovat 10 zvířat najednou bez anestézie.

Lokálně ozařovaná zvířata byla ozařována v lehké anestézii i.m. (Narkamon 10 mg/kg a Rometar 1,2 mg/kg, Bioveta, Česká republika), upoutaná na prkénko (po jednom) z 0,5 m dávkovým příkonem 2,5-4 Gy/min pomocí <sup>60</sup>Co (Chirana, Česká Republika) gama zářiče. Lokální ozáření široké v průměru 3 cm bylo provedeno na hrudníku v oblasti plic. Ostatní partie těla zvířete byly kryty 10 cm silnou vrstvou olova, což zredukovalo dopadající dávku záření na zhruba 2-3 % dávky obdržené na hrudník bez krytí (Österreicher et al. 2004). S kontrolními zvířaty bylo zacházeno stejně, ale nebyly ozářeny.

### 5.4. Cytostatika a inhibitory

V experimentech s cytostatiky *in vitro* byly použity zásobní roztoky vanadocen dichloridu - (dichloro-bis(η<sup>5</sup>-2,4-cyklopentadien-1-yl) vanad, cisplatinu (Sigma Aldrich, USA), inhibitoru ATM kinasy KU55933 (Merck, Německo). Jako rozpouštědlo bylo použito příslušné kultivační médium (Sigma-Aldrich, USA) bez séra. Zásobní roztok inhibitoru KU55933 byl dodán již rozpuštěn v DMSO v koncentraci 10 mmol.l<sup>-1</sup>, ostatní agens bylo potřeba rozpustit. Zásobní roztoky cytostatik byly připraveny vždy čerstvé před jejich použitím v experimentech. Vanadocen dichlorid 2,5 mmol.l<sup>-1</sup> v mediu, cisplatinu 5 mmol.l<sup>-1</sup> v mediu. Vanadocen dichlorid byl získán od doc. Ing. Jaromíra Vinklárka, Ph.D., Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra obecné a anorganické chemie. Vanadocen dichlorid byl syntetizován ve farmaceutické kvalitě podle Wilkinson a Birmingham (Wilkinson et al.1954) a vyčištěn anaerobní extrakcí s dichlormethanem podle Soxhleta. Jeho čistota byla kontrolována elementární analýzou, IR, Ramanovou a EPR spektroskopií.

### 5.5. Průtoková cytometrie

#### 5.5.1. Kvantifikace histonu γH2AX

Ke specifickému průkazu přítomnosti dvouvláknových zlomů DNA (DSB) po působení genotoxických agens v jaderném genomu buňky jsme použili metodu stanovení fosforylované formy histonu H2AX na serinu 139 (γH2AX). Zkoumané buňky v suspenzi, adherentní buňky do suspenze převedené o počtu  $5 \times 10^5$  až  $1 \times 10^6$ , byly fixovány po dobu 15 minut na ledu 1% roztokem formaldehydu bez methanolu (Polysciences, USA) v PBS. Buňky byly dále permeabilizovány pomocí 70% etanolu. Histon γH2AX byl detekován pomocí monoklonální myší IgG<sub>1</sub> protilátky anti-fosfo-histon H2AX (pSer139)-FITC (Millipore, USA). DNA byla značena roztokem

propidium jodidu (PI). Přesný postup je detailně popsán v našich publikacích (Havelek et al. 2011a, 2011; Čmielová, Havelek et al. 2012).

### 5.5.2. Analýza buněčného cyklu podle obsahu DNA

Přibližně  $1 \times 10^6$  buněk v buněčné suspenzi, nebo do ní převedeno bylo dvakrát promyto PBS, fixováno a permeabilizováno v 70% ethanolu. Buňky byly dvakrát promyty PBS a suspendovány v 0,5 ml PBS a 0,5 ml fosfátového pufru (192 ml  $0,2 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  + 8 ml  $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$  kyseliny citrónové, pH=7,8) a inkubovány 5 min při pokojové teplotě pro extrakci nízkomolekulárních fragmentů DNA. V posledním kroku byly buňky značeny 0,5 ml Vindelova roztoku: 1ml 1 mol Tris, pH=8, 1 mg RNasy, 100  $\mu\text{l}$  Triton X-100, 60 mg NaCl, 5 mg propidium jodidu (Sigma-Aldrich, USA) a destilovaná voda do 100 ml (Vindelov 1977) v termostatu 1 hod při  $37^\circ \text{C}$  a po proběhlé inkubaci analyzovány na průtokovém cytometru. Pro každý vzorek bylo stanoveno procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, buněk proliferujících a/nebo buněk v sub-G1. Pokud procento buněk v sub-G1 bylo pod 0,5 %, analyzovali jsme jen procentuální zastoupení buněk v cyklu. Přesný postup je detailně popsán v našich publikacích (Čmielová, Havelek et al. 2012).

### 5.5.3. Stanovení aktivity $\beta$ -galaktosidasy asociované se senescencí

K detekci SA- $\beta$ -galaktosidasy jsme použili fluorogenní substrát 5-dodecanoylamino fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside ( $\text{C}_{12}\text{FDG}$ ) (Invitrogen, USA).  $\text{C}_{12}\text{FDG}$  je nefluorescenční prekurzor, který se po hydrolýze SA- $\beta$ -galaktosidasou mění na fluorofor  $\text{C}_{12}$ -fluorescein neschopný opustit kompartment zrodu. Intenzita fluorescence  $\text{C}_{12}$ -fluorescein byla kvantifikována na FL1 kanálu (530/540 nm) detektoru průtokového cytometru a aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy byla vyjádřena jako průměr intenzity fluorescence  $\text{C}_{12}$ -fluorescein. Data byla někdy zobrazena ve formě logaritmu intenzity fluorescence  $\text{C}_{12}$ -fluorescein (osa y) vs. *side scatter* SSC (osa x). Postup je podrobně popsán v publikacích (Čmielová, Havelek et al. 2012; Debacq-Chainiaux et al. 2009).

## 5.6. Imunocytochemie

Pomocí imunofluorescenční mikroskopie byla sledována lokalizace proteinu  $\gamma\text{H2AX}$  v buňce. Fotografie byly získány pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse (Nikon, Japonsko). Postup je podrobně popsán v naší publikaci (Havelek et al. 2011a, 2011b)

## 5.7. Cytochemie

Pro stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy byl použit Senescence bata-galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, USA) podle pokynů výrobce.

## 5.8. Statistická analýza

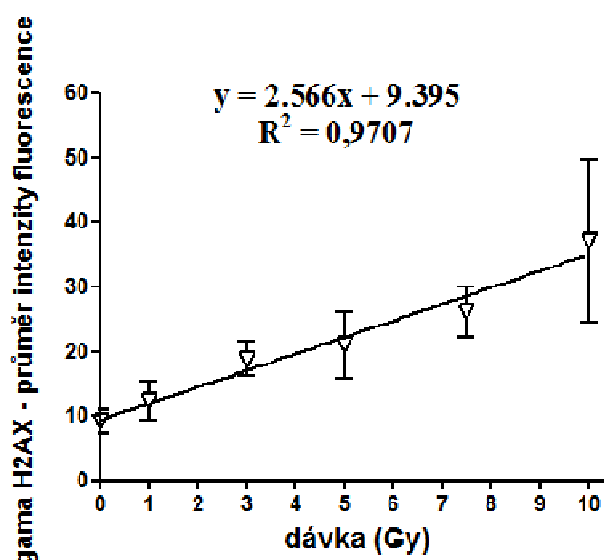
Výsledky byly hodnoceny v programech MS Excel 2003 (Microsoft, USA), GraphPad Prism 5 biostatistics (GraphPad Software, USA), NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical System, USA) nebo Statistica 7 (StatSoft, USA). Všechny statisticky hodnocené experimenty *in vitro* byly provedeny v  $n = 3$ , *in vivo* v  $n = 6-9$ , pokud není uvedeno jinak. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Rozdíl na hladině  $p \leq 0,05$  byl považován jako statisticky významný. Použité testy jsou uvedeny ve výsledkové části. V případě hodnocení mediánu, graf znázorňoval hodnotu mediánu  $\pm$  1. a 3. kvartil. Statistická analýza byla vždy provedena, případně konzultována Ing. Jiřím Knížkem, CSc. z Ústavu lékařské biofyziky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Reprezentativní histogramy průtokové cytometrie a reprezentativní mikroskopické obrázky nebyly statisticky hodnoceny.

## 6. Výsledky

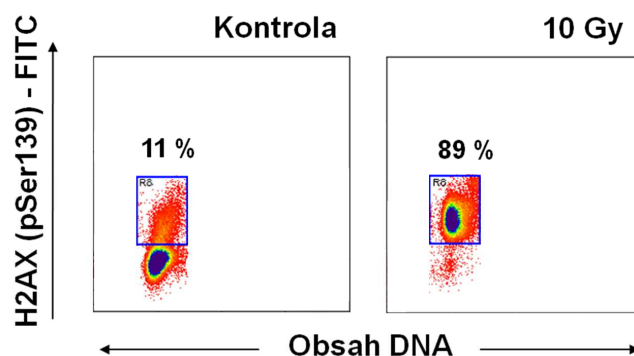
### 6.1. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 *in vivo*

#### 6.1.1. Celotělové ozáření potkanů

Jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů ( $n = 6-9$ ) dávkami v rozmezí 1-10 Gy jsme metodou průtokové cytometrie kvantifikovali lineární dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve potkana. Statisticky významný vzestup  $\gamma$ H2AX oproti kontrole byl pozorován po dávkách 3, 5, 7,5 a 10 Gy ( $p \leq 0,05$ ), t-test (obr. 1). Z histogramů průtokové cytometrie (kontrola a dávka 10 Gy) je po ozáření patrný vzestup intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (osa y) homogenně napříč celou lymfocytární populací (obr. 2). Vizuální detekci fosfoproteinu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 hodinu od celotělové ozáření jsme provedli pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Obrázky ukazují dávkově závislý vzestup histonu  $\gamma$ H2AX (zelená barva – emise FITC) vždy homogenně napříč všemi zobrazenými lymfocyty pro danou dávku gama záření (obr. 3).

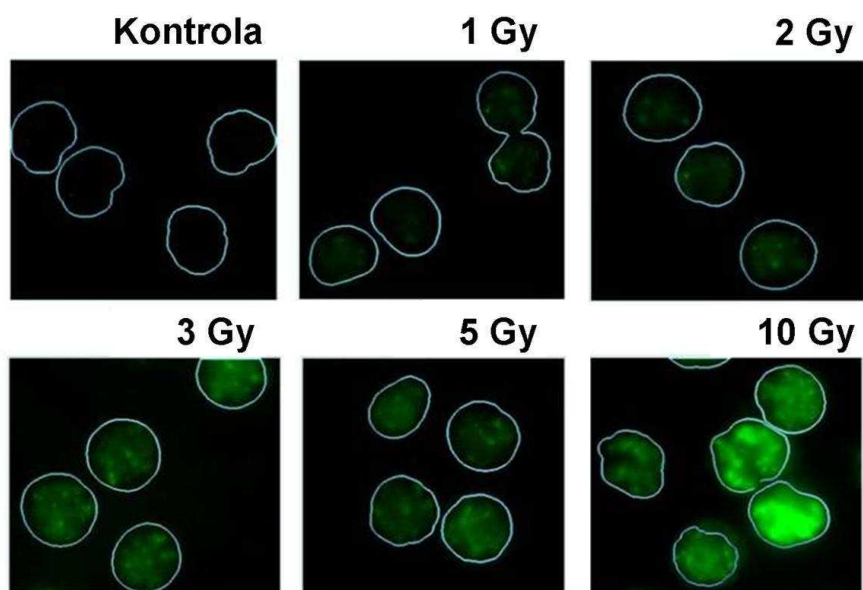


**Obr. 1.** Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana 1 h od celotělového ozáření *in vivo*. Lymfocyty byly izolovány z heparinované periferní krve kontrolních a ozářených (1-10 Gy) potkanů 1 h od ozáření. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření,  $n = 6-9$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka.



**Obr. 2.** Flow cytometrická detekce přítomnosti  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů 1 h od celotělového ozáření *in vivo*. Data z průtokové cytometrie jsou zobrazena jako dvourozměrné histogramy logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita

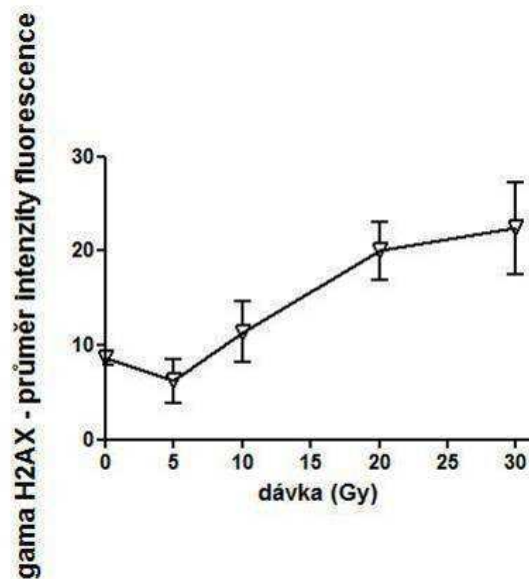
fluorescence propidium jodidu na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními histogramy z 6-9 nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.



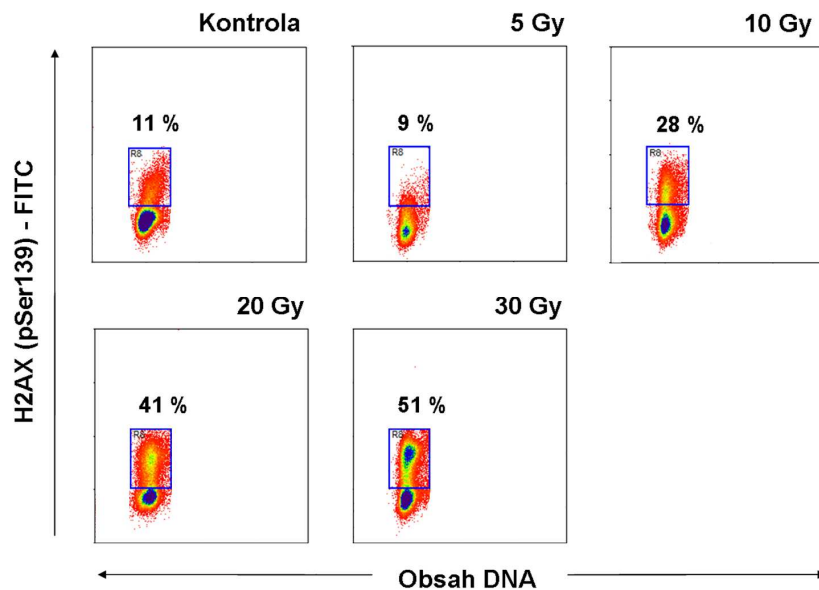
**Obr. 3. Mikroskopická vizualizace  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od celotělového ozáření *in vivo*.** Obrázek ukazuje reprezentativní projekci z kontrol a ozářených ( $n = 6-9$ ) vzorků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. Histon  $\gamma$ H2AX je značen FITC – zelená barva, bílá linie ohraničuje buněčná jádra.

### 6.1.2. Lokální ozáření oblasti hrudníku potkanů

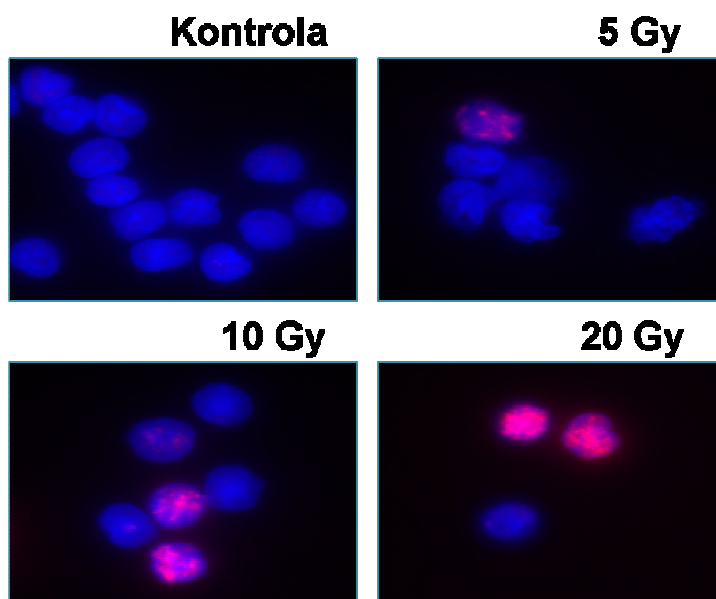
Jednu hodinu od ozáření hrudníku potkanů dávkami v rozmezí 5 – 30 Gy jsme pomocí průtokové cytometrie kvantifikovali vzestup imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC od dávky 10 Gy v lymfocytech periferní krve (obr. 4). Zvýšení bylo statisticky významné pro dávky 20 a 30 Gy (t-test;  $p \leq 0,05$ ). Histogramy průtokové cytometrie svědčí o vzestupu imunocytochemicky značeného histonu  $\gamma$ H2AX jen v části populace lymfocytů (obr.5), což je v kontrastu s výsledky získanými po celotělovém ozáření potkanů. Heterogenní výskyt  $\gamma$ H2AX v populaci lymfocytů 1 hodinu od ozáření hrudníku odráží stav, kdy ne všechny lymfocyty byly za daných experimentálních podmínek exponovány gama záření při průchodu krve ozařovanou oblastí (oblast hrudníku) *in vivo*. Naše skupiny po ozáření tedy ve finále vždy obsahovaly různý poměr lymfocytů neozařených –  $\gamma$ H2AX negativních a ozářených –  $\gamma$ H2AX pozitivních v závislosti na obdržené dávce gama záření. Stav, kdy velikost výskytu fosfoproteinu  $\gamma$ H2AX ve studovaných lymfocytech není napříč buněčnou populací stejná potvrdila i vizuální detekce  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Imunofluorescenční mikroskopie ukázala nižší vzestup histonu  $\gamma$ H2AX v porovnání s celotělovým ozářením, a to i přes skutečnost, že byly použity vyšší dávky gama záření. Navíc se zde potvrdilo, že ne ve všech jádrech (ani při dávce 20 Gy) lymfocytů se tvoří histon  $\gamma$ H2AX (obr. 6).



**Obr. 4.** Flow cytometrická kvantifikace imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo*. Lymfocyty byly izolovány z heparinizované periferní krve kontrolních a ozářených (5-30 Gy) potkanů 1 h od ozáření hrudníku. Graf ukazuje aritmetický průměr intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC v závislosti na dávce gama záření,  $n = 6$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. Vzestup imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC je statisticky významný oproti kontrole pro dávky 20 a 30 Gy ( $p \leq 0,05$ ), t-test.



**Obr. 5.** Flow cytometrická detekce přítomnosti  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo*. Data z průtokové cytometrie jsou zobrazena jako dvourozměrné histogramy logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními histogramy z 6 nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.



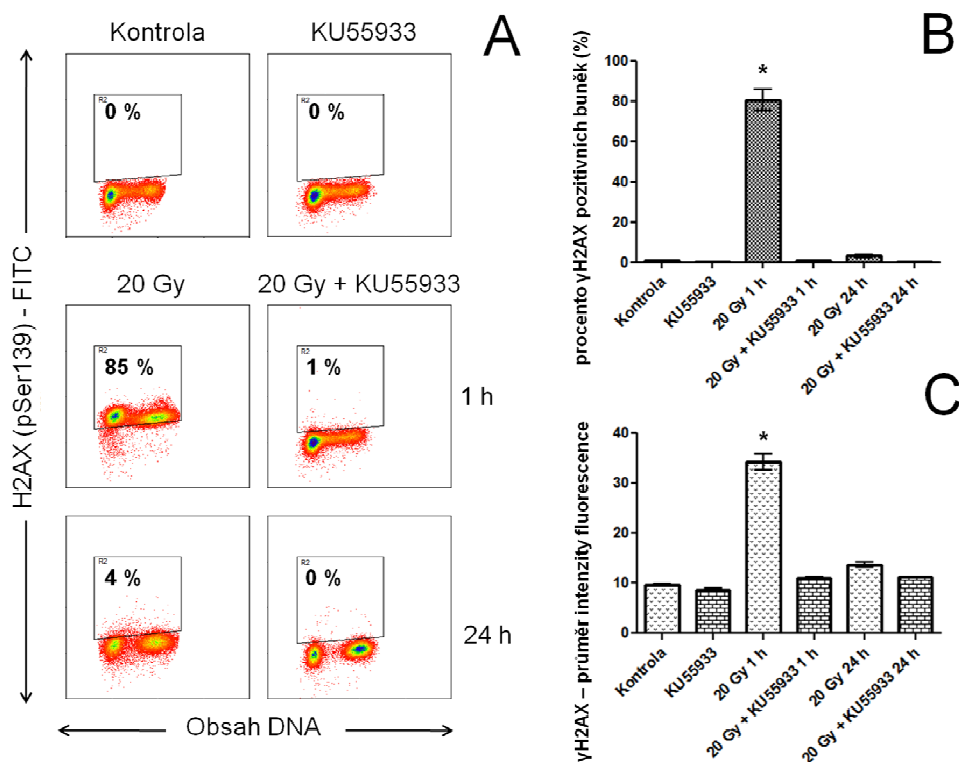
**Obr. 6. Mikroskopická vizualizace  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkana 1 h od lokálního ozáření *in vivo*.** Obrázek ukazuje reprezentativní projekci kontrol a ozářených ( $n = 6$ ) vzorků získaných pomocí fluorescenční mikroskopie. Histon  $\gamma$ H2AX je značen Cy3 – červená barva, jádra jsou označena modře DAPI, spojený obraz.

## 6.2. Fosforylace histonu H2AX na serinu 139 *in vitro*

### 6.2.1. Vliv inhibice ATM kinasy na ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu $\gamma$ H2AX v kmenových buňkách periodontálního ligamenta

Ke sledování dopadu inhibice ATM kinasy na fosforylaci histonu H2AX po působení ionizujícího záření jsme využili komerčně dostupného inhibitoru KU55933. KU55933 je vysoce účinný, selektivní kompetitivní inhibitor ATM kinasy. Při vlastním provedení experimentů jsme 1 hodinu před ozářením subkonfluentních MKB (buňky byly nasazeny 24 h předem v kompletním mediu bez inhibitoru) do kultivačního media přidali zásobní roztok KU55933 v DMSO v takovém množství, aby bylo dosaženo finální koncentrace v mediu  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Kontrolní buňky byly kultivovány v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  inhibitoru, bylo s nimi zacházeno shodně, avšak nebyly ozářeny. Inhibitor byl přítomný v mediu po celou dobu kultivace buněk a to jak buněk ozářených, tak neozářených. Samotné ozáření vedlo ke statisticky významné tvorbě  $\gamma$ H2AX 1 h od vystavení buněk dávce 20 Gy. Při inhibici ATM kinasy došlo u ozářených kmenových buněk periodontálního ligamenta (obr. 7) k signifikantnímu utlumení fosforylace histonu H2AX. Tento fakt potvrdili oba typy analýzy dat z průtokové cytometrie.



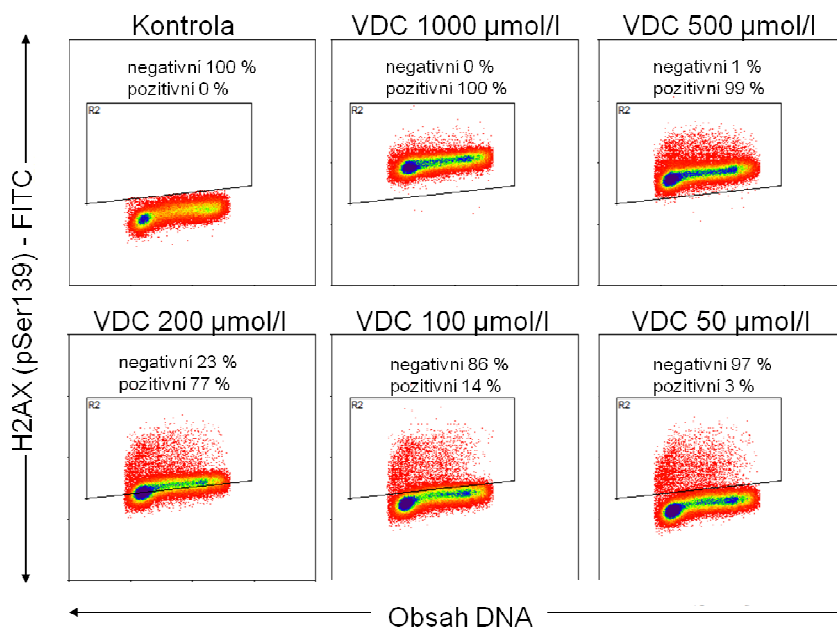


**Obr. 7. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX (A), procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk (B) a graf intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC (C) v kmenových buňkách periodontálního ligamenta 1 a 24 h od ozáření dávkou 20 Gy *in vitro*. Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu, kultivované v přítomnosti  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933, preinkubované po dobu 1 h před ozáření (20 Gy) s  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  KU55933 byly ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 24 h. **A.** Data jsou ve formě dvourozměrných histogramů logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří experimentů. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk. **B.** Sloupcový graf znázorňuje procento  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na obdržené dávce a čase od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. **C.** Sloupcový graf aritmetického průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC pro dávku 20 Gy a intervaly 1 a 24 h od ozáření,  $n = 3$ ,  $\pm$  směrodatná odchylka. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.**

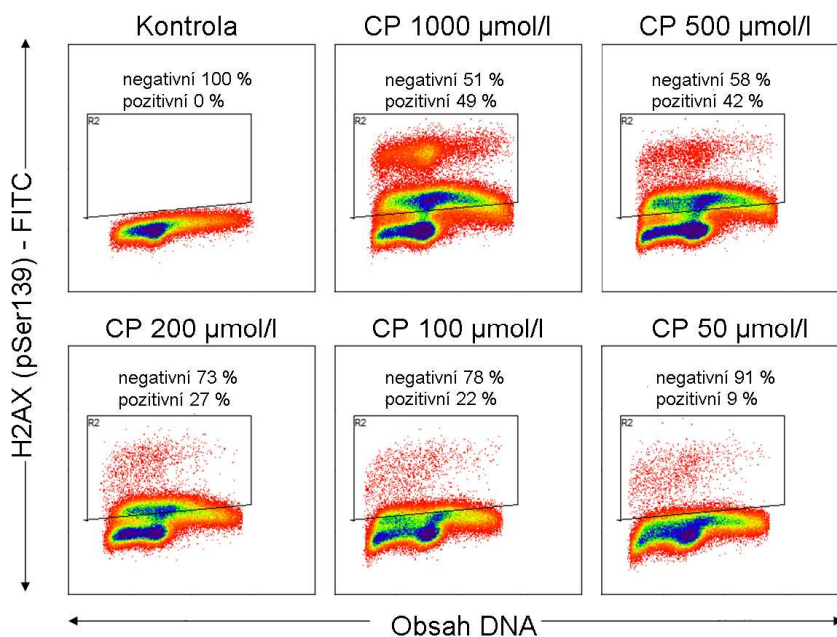
### 6.2.2. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na vznik $\gamma$ H2AX v buňkách lidské promyelocytární leukemie HL-60

Vanadocen dichlorid po svém jednohodinovém působení na buňky lidské promyelocytární leukemie HL-60 v koncentraci  $0-1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vyvolal tvorbu DSB detekovaných jako  $\gamma$ H2AX. Koncentrace  $1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$  indukovala tvorbu histonu  $\gamma$ H2AX v 100 % buněk HL-60, ve srovnání s kontrolou, kde bylo detekováno 0 % buněk obsahujících  $\gamma$ H2AX. Výskyt  $\gamma$ H2AX klesal úměrně s klesající dávkou vanadocen dichloridu a naopak (obr. 8).

Koncentrace cisplatiny  $1000 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vyvolala tvorbu  $\gamma$ H2AX u 49 % buněk. Největší vzestup  $\gamma$ H2AX byl pozorován primárně u buněk v S fázi, méně G1 fázi buněčného cyklu. Je nutné podotknout, že vzestup  $\gamma$ H2AX po působení cisplatiny není tak masivní, jako v případě vanadocen dichloridu (obr. 9).



**Obr. 8. HL-60. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX po 1 h inkubaci s vanadocen dichloridem *in vitro*.** Dvourozměrné histogramy logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními histogramy z tří nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.



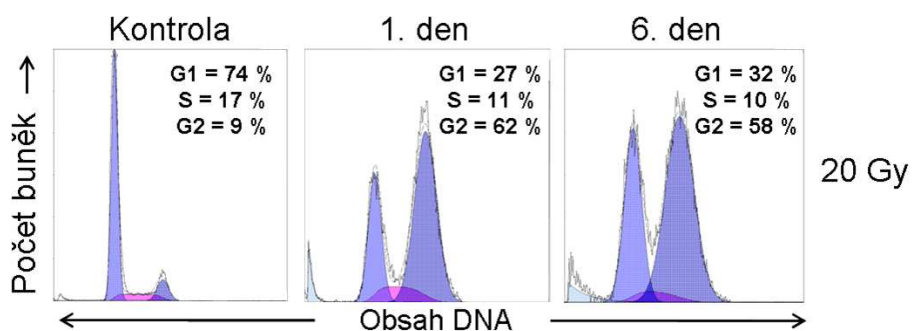
**Obr. 9. HL-60. Histogramy stanovení  $\gamma$ H2AX po 1 h inkubaci s cisplatinou *in vitro*.** Dvourozměrné histogramy logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x. Obrázek je tvořen reprezentativními histogramy z tří nezávisle analyzovaných vzorků pro každou skupinu. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $5 \times 10^4$  buněk.

## 6.3. Analýza buněčného cyklu po působení genotoxických agens

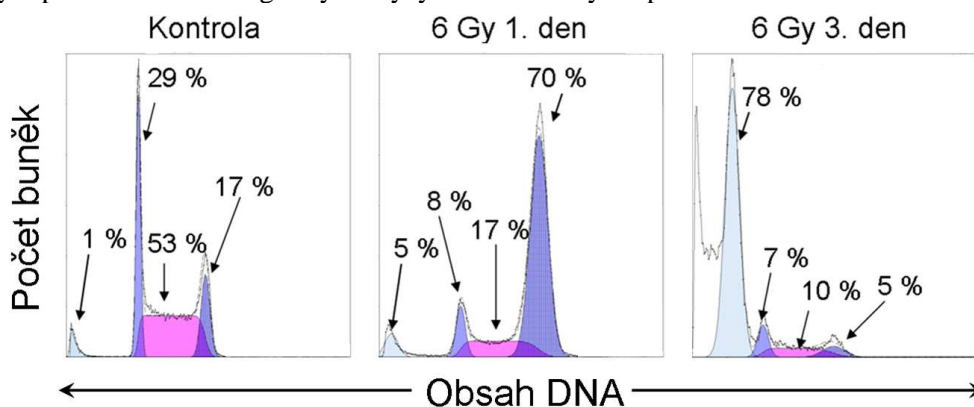
### 6.3.1. Vliv ionizujícího záření na buněčný cyklus

Expozice MKB periodontálního ligamenta gama záření v dávce 20 Gy vedla k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Akumulace MKB periodontálního ligamenta v G2 fázi buněčného cyklu přetrvala po ozáření 20 Gy až do konce pokusu (6. den od ozáření). V G2 fázi buněčného cyklu bylo u MKB periodontálního ligamenta 1. den 62 % a 6. den 58 % buněk (obr. 10).

Podobně jako u MKB, tak i u buněk lidské promyelocytární leukémie vedla expozice ionizujícímu záření v dávce 6 Gy první den od ozáření ke G2 bloku (70 % buněk v G2 fázi buněčného cyklu). Na rozdíl od kmenových buněk jsme u buněk HL-60 pozorovali indukci apoptózy. Apoptóza byla nejvyšší 3. den od ozáření. Zástava buněčného cyklu v G2 fázi nebyla 3. den od ozáření již detekována, neboť většina buněk zahynula apoptózou (obr. 11). Apoptotické buňky byly detekovány v sub-G1 peaku. Procento apoptotických buněk vzrůstalo v závislosti na čase od ozáření, 5 % 1. den a 78 % 3. den od ozáření.



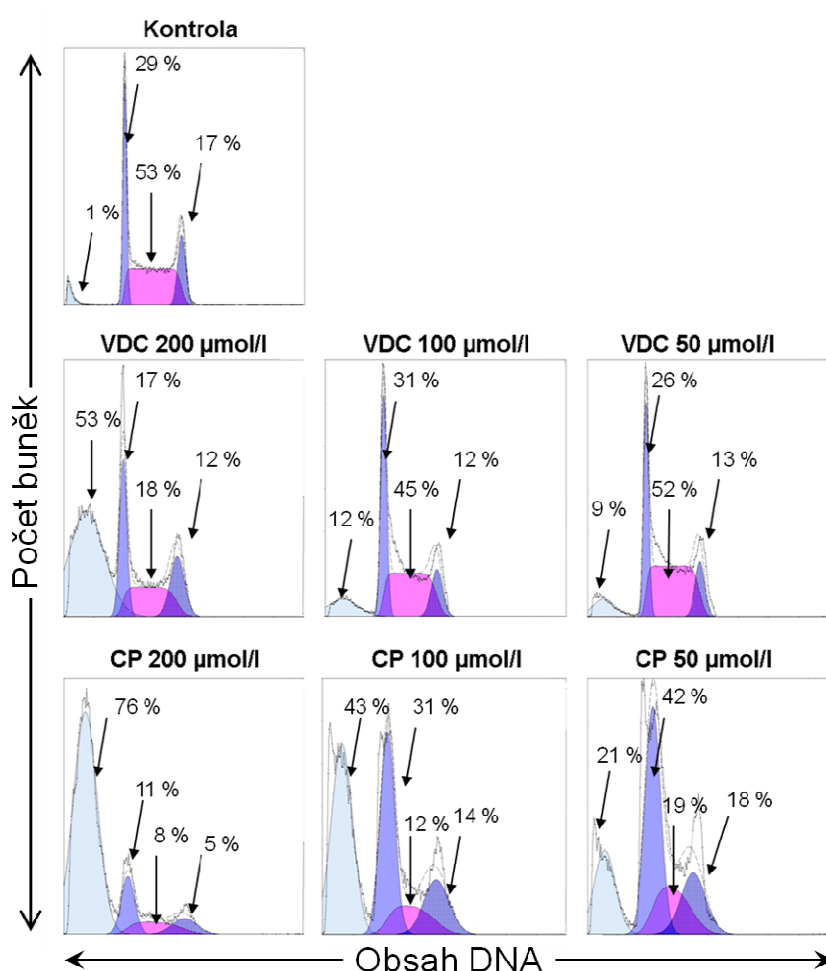
**Obr. 10. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Analýza buněčného cyklu 1. a 6. den od ozáření *in vitro*.** Kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu byly ozářeny 20 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 1 nebo 6 dnů. Zástava buněčného cyklu v G2 fázi přetrvala u nadpoloviční většiny buněk do šestého dne od ozáření. Procento sub-G1 < 0,5. Uvedeny reprezentativní histogramy analýzy buněčného cyklu podle obsahu DNA z  $1 \times 10^5$  buněk.



**Obr. 11. HL-60. Analýza buněčného cyklu 1. a 3. den od ozáření *in vitro*.** Buňky lidské promyelocytární leukémie HL-60 kultivované v kompletním mediu byly ozářeny dávkou 6 Gy a následně ponechány v kultuře po dobu 24 nebo 72 hodin. Čísla znázorňují procenta buněk pro jednotlivé fáze buněčného cyklu včetně sub-G1. První den od ozáření došlo k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu, třetí den od ozáření byl detekován apoptotický peak buněk sub-G1. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk.

### 6.3.2. Vliv vanadocen dichloridu a cisplatiny na buněčný cyklus

Hodinová expozice vanadocen dichloridu v koncentraci  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  se u buněk HL-60 o 16 hodin později projevila indukcí apoptózy nahromaděním 53 % buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu. Tento jev byl dávkově závislý, 12 % pro koncentraci  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a 9 % pro koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ , kontrola 1 %. Cisplatina vykazovala ve srovnání s vanadocen dichloridem ještě větší apoptotický efekt. Koncentrace  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  vedla k akumulaci 76 % buněk v sub-G1 fázi buněčného cyklu 16 hodin od hodinového ovlivnění. Tento jev byl i v případě cisplatiny dávkově závislý, 43 % pro koncentraci  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a 21 % pro koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . K akumulaci buněk v G1 fázi buněčného cyklu došlo po působení cisplatiny v koncentraci  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  - 42 % buněk v G1 fázi buněčného cyklu, kontrola 29 % buněk v G1 fázi buněčného cyklu (obr. 12).

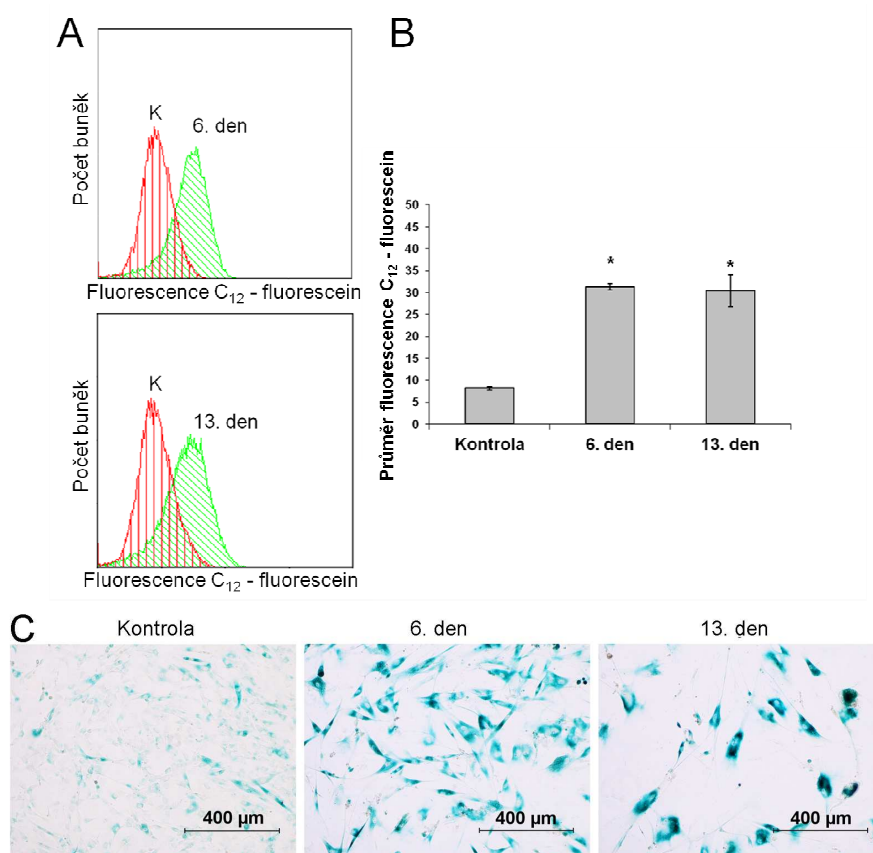


**Obr. 12. HL-60. Analýza buněčného cyklu 16 h po 1 h působení vanadocen dichloridu a cisplatiny *in vitro*.** Lidské buňky promyelocytární leukemie HL-60 byly po dobu 1 hodiny inkubovány s vanadocen dichloridem nebo cisplatinou v koncentraci 0 –  $200 \mu\text{mol.l}^{-1}$  a následně ponechány v kultuře v čerstvém mediu bez agens po dobu 16 hodin. Jedn hodinová inkubace buněk s cisplatinou a vanadocen dichloridem vedla k dávkově závislé apoptotické fragmentaci DNA. Uvedeny reprezentativní histogramy z  $1 \times 10^5$  buněk.

## 6.4. Senescence po působení ionizujícího záření

Vzhledem k tomu, že u mesenchymálních kmenových buněk jsme po ozáření vysokou dávkou 20 Gy neprokázali indukci apoptózy, předpokládali jsme, že je u těchto buněk po ozáření indukována senescence. Pro stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -galaktosidasy) jsme využili fluorogenní substrát 5-dodecanoylamino fluorescein di- $\beta$ -D-galactopyranoside ( $C_{12}$ FDG).  $C_{12}$ FDG je nefluorescenční lipofilní prekurzor, který se po hydrolýze SA- $\beta$ -galaktosidasou mění na fluorofor  $C_{12}$ -fluorescein neschopný opustit svůj kompartment zrodu. Kvantifikaci jsme provedli pomocí průtokové cytometrie. Druhou metodou analýzy byla mikroskopická detekce pomocí chromogenního substrátu.

U MKB periodontálního ligamenta došlo k vzestupu fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein za zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy. Z grafu je patrné, že aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy u kmenových buněk periodontálního ligamenta dosáhla svého vrcholu 6. den od ozáření. Vzestup byl statisticky významný ( $p \leq 0,05$ ) 6. a 13. den od ozáření. Výsledky byly potvrzeny vizuálně mikroskopickou detekcí (obr. 13).



**Obr. 13. Kmenové buňky periodontálního ligamenta. Stanovení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy po ozáření dávkou 20 Gy.**

**A.** Subkonfluentní lidské kmenové buňky periodontálního ligamenta kultivované v kompletním mediu byly ozářeny v kultivačních nádobách (75 cm<sup>2</sup>) a aktivita  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí byla kvantifikována pomocí průtokové cytometrie 6. a 13. den od ozáření. Data průtokové cytometrie jsou prezentována jako  $C_{12}$ -fluorescein fluorescence single-parametr overlay histogramey. Intenzita fluorescence kontroly (K) a ozářených vzorků je znázorněná abscisa a počet buněk je znázorněn ordináta. Jsou zobrazeny reprezentativní výsledky ze tří nezávislých experimentů.

**B.** Sloupcový graf reprezentuje aritmetický průměr intenzity fluorescence  $C_{12}$ -fluorescein kvantifikované v buňkách pomocí průtokové cytometrie v závislosti na čase od ozáření,  $\pm$  směrodatná odchylka,  $n = 3$  nezávislých experimentů. \* - statisticky významný rozdíl oproti kontrole ( $p \leq 0,05$ ), t-test.

C. Mikroskopická detekce SA- $\beta$ -galaktosidasy. Buňky byly ozářeny dávkou 20 Gy v komůrkách se sklíčky a pomocí chromogenního substrátu byla cytochemicky stanovena aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy v daných časových intervalech. Obrázek ukazuje reprezentativní snímek kontroly a ozářených vzorků získaných pomocí mikroskopie.

## 7. Diskuse

V naší práci jsme studovali vliv ionizujícího záření, cytostatických látek (cisplatina, mitoxantron) a nově syntetizované potenciálně cytostatické látky vanadocen dichloridu na buňky nádorové (HL-60, MOLT-4), na mesenchymální kmenové buňky izolované z různých tkání a na lymfocyty periferní krve.

Ke studiu těchto nox jsme používali metodu průtokové cytometrie, která je schopna určit nejen imunofenotyp, ale i další charakteristiky zkoumaných buněk. Průtoková cytometrie usnadňuje identifikaci odlišných buněčných typů, ale i rozdílných funkčních stavů buňky v heterogenní populaci včetně kvantitativní analýzy.

Zaměřili jsme se na kvantitativní stanovení hlavních dějů souvisejících s odpovědí buněk na poškození genomu buňky, stanovení DSB, zástavu buněčného cyklu během reparace poškození a v případě, že poškození není reparováno na stanovení indukce apoptózy a senescence.

V experimentech *in vivo* jsme kvantifikovali vznik DSB nepřímo prostřednictvím detekce  $\gamma$ H2AX v lymfocytech periferní krve po celotělovém a lokálním ozáření hrudníku potkanů.

Dnes není sporu, že expozice buněk gama záření *in vitro* vede k fosforylaci histonu H2AX na serinu 139 (Rogakou et al. 1998). Tato fosforylace je relativně brzy po ozáření (30-60 minut) dávkově (Vilasová et al. 2008, Andrievski et al. 2009), nebo lineárně dávkově závislá (Redon et al. 2009). Méně je známo o vzniku  $\gamma$ H2AX po ozáření *in vivo*.

Zjistili jsme, že jednu hodinu od celotělového ozáření ( $^{60}\text{Co}$  gama záření) potkanů stoupající dávkou 1-10 Gy dochází k lineárnímu dávkově závislému vzestupu  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů ozářených *in vivo*. Výsledky detekce histonu  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie v lymfocytech potkana 1 hodinu od celotělového ozáření nezávisle verifikovaly data z průtokové cytometrie. Naše výsledky stanovení  $\gamma$ H2AX v lymfocytech potkanů ozářených celotělově byly přijaty k publikaci v časopisu Acta Veterinaria v roce 2010, článek vyšel v roce 2011 (Havelek et al. 2011a). Ve stejném roce (2010) byl přijat a obratem publikován článek Christophu E. Redona a kolegů z Centra pro výzkum rakoviny, Národního institutu zdraví (USA), který popisuje imunofluorescenční kvantifikaci  $\gamma$ H2AX v lymfocytech periferní krve makaka rhesus (*Macaca mulatta*) po jeho celotělovém ozáření ( $^{60}\text{Co}$  gama záření) (Redon et al. 2010). Pravděpodobně s přihlédnutím k etickým aspektům experimentů na primátech a také omezenému počtu subjektů se autoři především zabývali časovou kinetikou vzniku a vymizení ložisek  $\gamma$ H2AX v lymfocytech ozářených *in vivo*. Ke studiu použili laser-scanning konfokální mikroskopie, kdy kvantifikovali průměrnou hodnotu ložisek  $\gamma$ H2AX na buňku, tzv. foci per cell-fpc (vyšetřeno 50–200 buněk,  $n = 6$ ). Maximální vzestup  $\gamma$ H2AX pozorovali 30 minut po *ex vivo* ozáření izolovaných lymfocytů, následně docházelo k poklesu, 2 dny od ozáření se množství  $\gamma$ H2AX pohybovalo na úrovni 3-5 % hodnot 30 minut po ozáření. Dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX foci v lymfocytech izolovaných z periferní krve stanovili mikroskopicky 7,2 h po ozáření *in vivo* v dávkovém rozmezí 1-3,5 Gy. Statisticky významné ( $p \leq 0,05$ , t-test) zvýšení počtu  $\gamma$ H2AX foci detekovali i v delším časovém období po ozáření (1., 2. a 4. den od ozáření) po vyšších dávkách záření v rozmezí 3,5-8,5 Gy. Je však potřeba dodat, že množství  $\gamma$ H2AX foci stanovených 4. den od ozáření již bylo relativně malé (do dvou fpc v průměru). Stejně jako v našem případě, detekce pomocí cytometrie a imunofluorescenční mikroskopie, vzestup  $\gamma$ H2AX analyzovaný pomocí konfokální mikroskopie byl homogenní napříč celou lymfocytární populací.

Při testování stability proteinu  $\gamma$ H2AX pro případ pozdější analýzy jsme jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů dávkami v rozpětí 1 až 10 Gy odebrali periferní krev. U první skupiny jsme lymfocyty izolovali neprodleně po odběru. U druhé skupiny byla krev odebrána jednu hodinu od celotělového ozáření a následně skladována po dobu 23 h na ledu při 4° C, a až po tomto skladování byly z této krve izolovány lymfocyty. U obou skupin jsme následně kvantifikovali množství  $\gamma$ H2AX pomocí průtokové cytometrie. Rozdíl mezi skupinami byl analyzován

neparametrickým Mann-Whitney U testem a na hladině statistické významnosti  $p \leq 0,05$ , vyjímaje dávku 3 Gy, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v množství histonu  $\gamma$ H2AX mezi oběma skupinami. Na základě našich výsledků se můžeme domnívat, že *in vivo* gama zářením-poškozené lymfocyty obsažené v periferní krvi, která je odebrána a *ex vivo* skladována na ledu, nemohou opravit radiační poškození DNA. Zároveň ani nemohou být v případě neopravitelného poškození odstraněny činnosti monocyto-makrofágového systému těla potkanů. Skladování při 4 °C na ledu navíc pravděpodobně inhibuje aktivitu všech enzymů včetně fosfatasy a ubikvitin-proteasomového systému zodpovědných za vymizení  $\gamma$ H2AX foci během případné reparace DNA. Těchto poznatků je možné využít v případě odložené analýzy vzorku krve pro účely biologické dozimetrie.

V našich experimentech jsme dále studovali vliv lokálního ozáření oblasti plic na změny v množství  $\gamma$ H2AX 1 h od ozáření. Z výsledkových histogramů průtokové cytometrie logaritmu intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC na ose y versus intenzita fluorescence propidium jodidu na ose x lze však vysledovat, že ozáření organismu je nerovnoměrné (vzestup  $\gamma$ H2AX jen v části populace lymfocytů). Je zřejmé, že lymfocyty krevního oběhu postupně přítomné během doby ozáření v ozářované oblasti vykazovaly vzestup  $\gamma$ H2AX, naopak v lymfocytech, které unikly působení záření se  $\gamma$ H2AX ohniska netvořila. Výsledky jsme potvrdili vizuální identifikací  $\gamma$ H2AX pomocí imunofluorescenční mikroskopie. V experimentech jsme také po lokálním ozáření dávkou 20 Gy sledovali časově závislé změny  $\gamma$ H2AX. Maximum imunofluorescence jsme pozorovali 1 h od ozáření, za 24 h byla fluorescence mírně zvýšena a 21 dní od ozáření byla pod úrovní kontrolní neozářené skupiny (Havelek et al. 2011b). Redon et al. (2011) využil při částečném ozáření makaka rhesus stanovení  $\gamma$ H2AX pomocí laser-scanning konfokální mikroskopie ve folikulech chlupů pocházejících z ozářované oblasti. Průměrné množství ohnisek  $\gamma$ H2AX na jednu buňku (tzv. foci per cell-fpc) po ozáření dávkami v rozmezí 1-6,5 Gy nepřesáhlo hodnoty 1 fpc. Po dávce 8,5 Gy pozoroval necelé 2,5 fpc  $\gamma$ H2AX v průměru. Maximální množství  $\gamma$ H2AX pozorovali do 24 hodin od ozáření dávkami v rozmezí 1-8,5 Gy. Na základě porovnání výsledků stanovení  $\gamma$ H2AX ve folikulech chlupů z ozářené a neozářené oblasti dospěli k názoru, že celkové množství  $\gamma$ H2AX pozitivních folikulů jedince závisí na dávce záření a ploše těla, která je záření vystavena. Podobně Horn a kolektiv pomocí průtokové cytometrie detekoval maximální imunofluorescenci  $\gamma$ H2AX v *in vitro* ozářených lidských lymfocytech 1 h od expozice buněk záření. Dvacet čtyři hodin od ozáření byla intenzita imunofluorescence nízká. Mísením rozdílných poměrů *in vitro* ozářených (4 Gy) a neozářených lymfocytů vytvořili směsnou populaci buněk, která obsahovala různý podíl  $\gamma$ H2AX pozitivních buněk v závislosti na velikosti frakce ozářených lymfocytů (Horn et al. 2011).

Z pohledu kinetiky tvorby a vymizení  $\gamma$ H2AX ohnisek v lymfocytech periferní krve se naše výsledky shodují se závěry publikovanými po ozáření lidských lymfocytů *in vitro*. Andrievski a kolegové studovali pomocí průtokové cytometrie dávkově a časově závislou tvorbu  $\gamma$ H2AX v CD4, CD8 a CD19 pozitivních lidských lymfocytech. Maximální vznik  $\gamma$ H2AX detekovali 1 h od ozáření, mezi 1. a 2. hodinou od ozáření množství  $\gamma$ H2AX neklesalo. Dvacet čtyři hodin od ozáření se imunofluorescence  $\gamma$ H2AX ozářených vzorků nelišila od hodnoty kontrol. Výsledky byly podobné pro jednotlivé lymfocytární subpopulace odlišené na základě CD znaků a jednotlivé dárce krve (n=7) (Andrievski et al. 2009). Analogické výsledky dosažené pomocí laser-scanning konfokální mikroskopie publikoval ve stejném roce team Redona. Maximum tvorby  $\gamma$ H2AX pozorovali 30 minut od ozáření lidských lymfocytů, další studovaný interval (4 h) od ozáření byl již pozorován dramatický pokles  $\gamma$ H2AX ohnisek, 24 hodin od ozáření byl pozorován pokles k úrovni kontrol (Redon et al. 2009).

Lymfocyty patří k nejvíce radiosenzitivním buňkám organismu. Po expozici jedince gama záření umírají apoptózou v množství proporcionálně stoupajícím s velikostí obdržené dávky gama záření. Již za 24 hodin je u lidí pozorován masivní pokles počtu lymfocytů s maximem 72 hodin od ozáření (Goans et al. 1997). Dávka 1 Gy vede k menšímu poklesu počtu lymfocytů, než dávka 3 Gy. Po působení dávky 1 Gy dojde do 30. dne od ozáření k obnovení absolutního počtu lymfocytů na výchozí hodnoty před ozářením, avšak po ozáření 3 Gy lymfopenie přetrvává až do 60. dne od ozáření (Cervený et al. 1999). *In vitro* lymfocyty umírají apoptózou. Šest hodin od ozáření dávkou 7 Gy se objevují první lymfocyty umírající apoptózou, za 24 h byly všechny buňky apoptotické (Vokurková et al. 2006). Na základě těchto charakteristik a jejich snadné dostupnosti jako biologického materiálu k analýze jsou využívány k účelům biologické dozimetrie (biodozimetrie). Z těchto důvodů jsme je rovněž použili ke stanovení histonu  $\gamma$ H2AX *in vivo*. V podmínkách *in*

*vitro* je možné apoptotické lymfocyty snadno prokázat stanovením externalizace fosfatidylserinu pomocí vazby Annexin V komerčně konjugovaného s fluorochromy (Hertveldt et al. 1997). Externalizace fosfatidylserinu patří k časnějším dějům probíhající apoptózy (van Engeland 1998). Důvodem nepoužitelnosti stanovení vazby Annexinu V u lymfocytů izolovaných z periferní krve po ozáření je, že v prostředí *in vivo* je externalizace fosfatidylserinu silným signálem fagocytózy („eat me“ signálem) zejména pro makrofágy a dendritické buňky (Fadok et al. 1992). Makrofágy detekují fosfatidylserin přes své fosfatidylserin receptory (PSR), MFG-E8 a některé scavenger receptory jako jsou CD36 a SR-BI, které se přímo váží k fosfatidylserinu (Scott et al., 2001). Důsledkem je, že apoptotické lymfocyty externalizující fosfatidylserin v krvi *in vivo* ve zvýšeném množství neprokážeme. V prostředí *in vivo* jsou časně apoptické buňky rychle fagocytovány, a proto vhodnějším ukazatelem je stanovení absolutního počtu lymfocytů po ozáření v krvi exponovaných subjektů. Metoda v kontextu biodozimetrie má však svá úskalí. Počty lymfocytů v periferní krvi zdravých osob kolísají mezi  $1,5-3 \times 10^9/l$ , proto pro lepší odhad obdržené dávky bylo vhodné znát počty lymfocytů v období před ozářením. V našich experimentech detekujících pokles lymfocytů po celotělovém a lokálním ozáření jsme použili až na výjimku shodných dávek jako v případě kvantifikace  $\gamma$ H2AX. Porovnáním statisticky významných výsledků poklesu počtu lymfocytů a vzestupu  $\gamma$ H2AX lze konstatovat, že dávky gama záření, které vyvolaly u zkoumané skupiny fosforylaci histonu H2AX, vedly ve většině případů (s výjimkou dávky 1 Gy celotělově) 24 hodin od ozáření k poklesu počtu lymfocytů periferní krve. Je pravděpodobné, že většina klidových lymfocytů fosforylujících H2AX jako následek vzniku DSB toto poškození DNA není schopné opravit a během 24 hodin umírají apoptózou. Oporou pro naše tvrzení mohou být experimenty s ozářeními lidskými klidovými lymfocyty *in vitro*, kdy dávka 4 Gy vyvolávající fosforylaci histonu H2AX 1 h od ozáření vedla 24 hodin později k apoptóze měřené vazbou Annexinu V a propidium jodidu (přes 42 % časně a pozdně apoptotických buněk) (Vilasová et al. 2008).

Na protipólu radiosenzitivních lymfocytů stojí relativně radiorezistentní mesenchymální kmenové buňky (MKB). Je známo, že expozice hematopoetických kmenových buněk ionizujícímu záření vede k apoptóze (Vávrová et al. 2002, Meng et al. 2003). Jak již bylo naznačeno, stejný osud často potká buňky hematopoetického původu jakou jsou lymfocyty periferní krve, nebo buňky leukemické (Řezáčová et al. 2008). MKB se ale chovají rozdílně, jsou do jisté míry rezistentní ke gama zářením-indukované apoptóze (Chen et al. 2006, Muthná et al. 2010, Schönmeier et al. 2007). Po ozáření *in vitro* (1 h) dojde k dávkově závislé tvorbě  $\gamma$ H2AX napříč buněčnou populací MKB nezávisle na fázi buněčného cyklu. Vzestup  $\gamma$ H2AX dosahuje maxima 1 hodinu od ozáření u MKB izolovaných ze zubní pulpy a periodontálního ligamenta. Během 24 h však dojde k reparaci většiny zářením indukovaných DSB, kdy jen malé, relativně zanedbatelné procento buněk stále spadá do oblastí vysoké imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC ohraničené pomocí gating analýzy. Pro MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta toto množství představuje mezi 1 a 8 % v závislosti na dávce ionizujícího záření, které byly původně vystaveny. Kinetika formace a vymizení  $\gamma$ H2AX v MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta odpovídá poznatkům získaných studiem fosforylace H2AX v nádorových buněčných liniích (Banath et al. 2004), v lidských lymfocytech (Andrievski et al. 2009, Redon et al. 2009), v lidských embryonálních kmenových buňkách (Momcilovic et al. 2009), ale i v lidských MKB kostní dřeni (Prendergast et al. 2011). Prendergast detekoval pomocí Western blot analýzy a imunofluorescenční mikroskopie maximální vzestup  $\gamma$ H2AX 2 h od ozáření MKB kostní dřeni dávkou 10 Gy. Tvorba  $\gamma$ H2AX byla nejdříve detekována 30 minut od ozáření, vrcholu dosáhla 6 h od ozáření a následně klesala (Prendergast et al. 2011). Momcilovic et al. detekovala mikroskopicky viditelná ohniska  $\gamma$ H2AX 20 minut od ozáření embryonálních kmenových buněk dávkou 1 Gy. Během následujících 4 h vymizela většina  $\gamma$ H2AX ohnisek, 6 h od ozáření se jejich množství nelišilo od hodnoty kontrol (Momcilovic et al. 2009). MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta poškození DNA ve formě DSB z větší části během 24 h od ozáření reparují, avšak za cenu zástavy buněčného cyklu. Již první den od ozáření dojde k akumulaci MKB v G2 fázi buněčného cyklu. Tento trend se zjevně nemění do 6. dne od ozáření. MKB zůstávají v permanentní zástavě buněčného cyklu, nehynou významněji apoptózou. Tento fakt je markantnější v kontrastu se stanovením buněčného cyklu u relativně také radiorezistentních, p53 negativních leukemických buněk HL-60 (Vávrová et al. 2000). Dvacet čtyři hodin od ozáření buňky indukují výrazný G2 blok, apoptóza je v tuto dobu od ozáření minimální (5 %). Avšak 3.



den od ozáření dojde k masivní smrti buněk apoptózou (78 %), detekovanou jako sub-G1 peak v histogramu analýzy buněčného cyklu. Tato buněčná smrt je označována jako oddálená apoptóza. Buňky se během 2 dnů pokusí opravit poškození DNA, nakonec ale dojde k apoptóze (Aldridge et al. 1998). Co se tedy dále děje s MKB pokud nehynou významněji apoptózou a to včetně oddálené apoptózy během 6 dnů? Vysvětlení poskytlo stanovení aktivity  $\beta$ -galaktosidasy spojené se senescencí (SA- $\beta$ -galaktosidasy) při vyšším pH. U všech třech typů MKB izolovaných z kostní dřene, periodontálního ligamenta a zubní pulpy jsme detekovali rozvoj senescence. U kmenových buněk zubní pulpy dojde ke zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy kvantifikované pomocí průtokové cytometrie již první den od ozáření dávkou 6 Gy. Od třetího dne po ozáření je tento vzestup potvrzen i pomocí detekce SA- $\beta$ -galaktosidasy použitím chromogenního substrátu a mikroskopie. Aktivita SA- $\beta$ -galaktosidasy se u MKB zubní pulpy dále zvyšuje až do 6. dne od ozáření, kdy dosáhne plató. Zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy jsme dále stanovili u MKB kostní dřene a periodontálního ligamenta po dávce 20 Gy 6. a 13. den od ozáření. Závěrem lze konstatovat, že naše výsledky stanovení buněčného cyklu u MKB jsou v souladu s výsledky publikovanými Schönmeirem a kolegy, kteří studovali MKB izolované z kostní dřene potkanů. Zjistili, že ozáření potkaních MKB dávkami 7 a 12 Gy způsobilo signifikantní akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu, která následně přetrvala minimálně po dobu 3 dnů u skupiny ozářené 7 Gy a alespoň 7 dnů u skupiny ozáření 12 Gy (Schönmeyr et al. 2007). Podobné výsledky, tj. preferenční akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu byly pozorovány u ozářených MKB izolovaných ze zubní pulpy (Muthná et al. 2010) nebo záření exponovaných lidských embryonálních kmenových buněk (Filion et al. 2009). Na druhou stranu, výsledky Chen et al. (2006) popisují, že ozáření lidských MKB kostní dřene dávkou 9 Gy se projeví o 36 h později akumulací buněk v G1 a G2 fázi buněčného cyklu. Prendergast et al. (2011) ve shodě s námi pozoroval reparaci záření-indukovaných DSB u lidských MKB kostní dřene prostřednictvím vymizení ložisek  $\gamma$ H2AX do 24 h od ozáření. Schönmeyr et al. (2007) prokázal vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy v potkaních MKB kostní dřene 3. a 7. den od ozáření dávkami 7 a 12 Gy. Muthná et al. (2010) detekovala vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy u MKB zubní pulpy po ozáření dávkou 20 Gy 3. až 13. den od ozáření. Naopak team Chen et al. (2006) nedetekoval vzestup aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy 5 dnů po ozáření MKB kostní dřene dávkou 9 Gy. Bohužel, delší časové intervaly v této studii nebyly vyšetřovány.

V dalších fázích experimentů jsme sledovali, jak ovlivní inhibice ATM kinasy zářením indukovanou fosforylací H2AX a G2 zástavu buněčného cyklu u MKB periodontálního ligamenta a zubní pulpy. K inhibici ATM kinasy je možné použít jednak nespecifické inhibitory – kofein (Vávrová et al. 2003) nebo specifické inhibitory KU55933 (Hickson et al. 2004). K inhibici ATM kinasy jsme použili inhibitor KU55933 v koncentraci, jakou doporučuje výrobce. Z dat je patrné, že inhibice ATM kinasy zcela potlačila ionizujícím zářením-indukovanou tvorbu  $\gamma$ H2AX u mesenchymálních kmenových buněk. Oba typy MKB reagovaly stejně, po ozáření nedošlo při inhibici ATM kinasy 1. h a 24. h od ozáření k signifikantnímu vzestupu  $\gamma$ H2AX. Analýza buněčného cyklu odhalila rozdíl v reakci MKB na inhibici ATM kinasy během záření indukované akumulace buněk v G2 fázi. Inhibice ATM kinasy u MKB periodontálního ligamenta statisticky signifikantně potencovala akumulaci buněk v G2 fázi a u MKB zubní pulpy inhibovala akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Výsledky ukazující redukci záření-indukované tvorby  $\gamma$ H2AX po inhibici ATM kinasy u MKB zubní pulpy a periodontálního ligamenta jsou ve shodě s daty publikovanými Prendergast et al. (2011) u MKB kostní dřene. Inhibice ATM kinasy u MKB periodontálního ligamenta a zubní pulpy nevedla k potlačení akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu, jak po působení KU55933 pozorovala Momcilovic et al. (2009) u lidských embryonálních kmenových buněk. I když je aktivní ATM kinasa důležitá pro průběh signální kaskády schopné spustit zástavu buněčného cyklu, u MKB zjevně v této funkci není nepostradatelná. Prendergast et al. (2011) ve své práci s lidskými MKB kostní dřene, kde studoval molekulární cesty aktivované po expozici buněk záření za inhibice ATM a DNA-PK, vyzdvihuje význam DNA-PK. Možná právě aktivita zbylých fosfatidylinositol-3 kinas aktivovaných po poškození DNA zde zastoupila úlohu ATM kinasy v kontrole buněčného cyklu.

S experimenty studujícími vliv inhibice ATM kinasy na apoptózu obohacené o inhibici MEK1/2 kinas jsme volně pokračovali u buněk leukemických. Vybrali jsme si p53-pozitivní T-lymfocytární leukemii MOLT-4. K inhibici ATM kinasy jsme použili nespecifického inhibitoru kofeinu. K inhibici MEK1/2 kinas jsme použili komerčně dodávaného inhibitoru U0126. Jako

genotoxický agens, jehož vliv jsme samostatně, nebo v kombinaci s kofeinem a U0126 studovali, jsme volili inhibitor DNA topoisomerasy II a interkalační látku mitoxantron. U0126 působí inhibičně na aktivaci MEK1/2-ERK1/2 signální kaskády po vzniku DSB, která potencuje signální dráhy vedoucí k proliferaci a přežití buňky po poškození DNA (Golding et al. 2007). Kofein inhibuje ATM-Chk1/2-p53 signální kaskádu aktivovanou DSB, která naopak spouští molekulární cesty vedoucí k apoptóze (Vávrová et al. 2003). Dvacet čtyři hodin od přidání mitoxantronu došlo k signifikantnímu zvýšení procenta časně a pozdně apoptotických buněk. Spolupůsobení kofeinu a mitoxantronu vedlo k útlumu mitoxantronem-indukované apoptózy. Naopak společné působení U0126 a MTX vedlo k zesílení účinku mitoxantronu. Ačkoliv je kofein znám jako látka zvyšující cytotoxický efekt látek poškozujících DNA, jako je například ionizující záření (Eastman 2004) nebo cisplatin (Kawahara et al. 2008), během studovaného intervalu se tento efekt neprojevil. Zvláště účinný je kofein v potlačení poškození DNA indukované zástavy buněčného cyklu v G2 fázi u buněk s mutovanou formou, nebo bez p53. Zkrácení doby reparace během zástavy v G2 fázi vede ke zvýšení citlivosti buněk, záření a smrti mitotickou katastrofou. Po preinkubaci p53 negativních buněk HL-60 s kofeinem nedochází 24 h od ozáření dávkou 6 Gy k akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Radiační poškození není reparováno, buňky vstoupí do buněčného cyklu s nereparovanou DNA a dojde k indukci apoptózy během 7-10 dní od ozáření (Vávrová et al. 2003). V rozporu tedy je, že kombinace látek ze skupiny topoisomeras II (doxorubicin a mitoxantron) spolu s kofeinem vede k potlačení mitoxantronem-zprostředkovaného cytotoxického účinku (Traganos et al. 1993). Mimo potlačení aktivace signální kaskády vedoucí ke smrti u p53-pozitivní buňky během 24 h, může mít příčina i jiné vysvětlení. Za vším podle mnohých se zjištění stojí tvorba komplexů mezi mitoxantronem a kofeinem (a dalšími látkami ze skupiny inhibitorů topoisomeras II), který tak potlačí frakci volného mitoxantronu schopného vykonání svého účinku (Piosik et al. 2002, Traganos et al. 1993). Dalším vysvětlením může být nástup apoptózy v pozdějším čase (Vávrová et al. 2003).

V rámci práce jsme se dále věnovali studiu cytotoxického potenciálu vanadocen dichloridu u p53-negativních leukemických buněk HL-60, p53-pozitivních MOLT-4 a zdravých lidských lymfocytů periferní krve. Cytotoxické působení vanadocen dichloridu je často porovnáváno se strukturálně podobnou cisplatinou (Köpf-Majer et al. 1994). Jednu hodinu od počátku expozice buněk HL-60 VDC jsme stanovili lineární dávkově závislý vzestup průměru intenzity imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC nezávisle na fázi buněčného cyklu. Vzestup po působení VDC byl homogenní napříč celou populací buněk. Naopak vzestup po působení CP nebyl homogenní, vydělila se populace buněk s vyšší hodnotou imunofluorescence  $\gamma$ H2AX-FITC zejména v S, minoritně také v G1 fázi buněčného cyklu. Předcházející práce potvrdily cytotoxický (Doležalová 2009, Ghosh et al. 2000, Moebus et al. 1997) a apoptózu-vyvolávající účinek VDC u jaterních hepatocelulárních buněk HepG2 (Aubrecht et al. 1999) a buněk HL-60 (Doležalová 2009). Také naše výsledky potvrdily apoptózu-indukující vlastnosti VDC u leukemických buněk HL-60 (prostřednictvím fragmentace DNA detekované jako sub-G1 peak) a MOLT-4 (prostřednictvím vazby Annexinu V a propidium jodidu). Závěry, že CP indukuje apoptózu u buněk HL-60 a MOLT-4, jsou v souladu se dříve publikovanými daty (Floros et al. 2003). Naše výsledky ukázaly akumulaci buněk MOLT-4 v G2 fázi buněčného cyklu po působení VDC. Ve shodě se zde prezentovanými výsledky, akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu byla detekována u buněk Ehrlichova ascitova tumoru (Köpf-Maier et al. 1981), u buněk rakoviny prsu BT-20 a u buněk glioblastomu U373 (Navara et al. 2001). Zvýšená tvorba  $\gamma$ H2AX detekovaná přednostně v S fázi (méně během G1 fáze) buněčného cyklu po působení CP byla v souladu s výsledky publikovanými Olive a Banáth 2009. Autoři popisují vzestup  $\gamma$ H2AX přednostně v S fázi buněčného cyklu 2 h od přidání CP k buňkám. Po expozici vyšším dávkám CP pozorovali vzestup  $\gamma$ H2AX také v G1 fázi buněčného cyklu.

## 8. Závěr

Naše práce poukazuje na kvantitativní a kvalitativní rozdíly mezi buněčnou odpovědí a senzitivitou lidských nebo potkaních lymfocytů periferní krve, dospělých mesenchymálních kmenových buněk a buněk lidských leukemických linií na poškození DNA působením genotoxických agens rozdílného mechanismu účinku a dávky. Úkolem této práce bylo odpovědět na základní otázky definované dílčími cíly v úvodu.

Jednu hodinu od celotělového ozáření potkanů dávkami v rozmezí 1-10 Gy jsme kvantifikovali lineární dávkově závislý vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z periferní krve. Vzestup  $\gamma$ H2AX byl statisticky významný od dávky 3 Gy. Jednu hodinu od lokálního ozáření potkanů na oblast hrudníku dávkami v rozmezí 5-30 Gy jsme kvantifikovali dávkově závislý vzestup od 10 Gy, statisticky významný pro dávky 20 a 30 Gy. U celotělového ozáření došlo k vzestupu  $\gamma$ H2AX homogenně napříč populací lymfocytů, u lokálního ozáření došlo k vzestupu  $\gamma$ H2AX jen v subpopulaci lymfocytů. Výsledky byly stanoveny pomocí průtokové cytometrie a nezávisle potvrzeny pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Dvacet čtyři hodin od lokálního ozáření již nebyl prokázán statistický významný vzestup  $\gamma$ H2AX v lymfocytech izolovaných z krve. **Kvantifikace  $\gamma$ H2AX 1 h od celotělového ozáření lze využít jako zpětného molekulárního indikátoru obdržené dávky celotělového ozáření.** Pro celotělové ozáření potkana jsme vytvořili kalibrační křivku v rozmezí 1-10 Gy. **Stanovením  $\gamma$ H2AX jsme schopni rozlišit celotělové a lokální ozáření.** Histon  $\gamma$ H2AX je jako analyt stabilní během 23 h skladování v plné krvi na ledu při 4 °C, což umožňuje jeho využití v praxi.

Dávky ionizujícího záření, které vyvolaly 1 h od ozáření vzestup  $\gamma$ H2AX, vedly 24 h později k poklesu počtu lymfocytů periferní krve potkana.

**U mesenchymálních kmenových buněk zubní pulpy a periodontálního ligamenta** jsme 1 h od ozáření 20 Gy stanovili statisticky významný **vzestup  $\gamma$ H2AX**. Dvacet čtyři hodin od ozáření byl pozorován pokles  $\gamma$ H2AX, kdy stanovené hodnoty již nebyly statisticky významné. Inhibice ATM kinasy vedla k potlačení záření indukované tvorby  $\gamma$ H2AX.

Vystavení mesenchymálních kmenových buněk účinku ionizujícího záření vedlo k **dávkově závislé akumulaci buněk v G2 fázi buněčného cyklu**. Po dávce 20 Gy tato akumulace přetrvávala do 6. dne od ozáření. Inhibice ATM kinasy vedla u kmenových buněk zubní pulpy k potlačení záření indukované akumulace buněk v G2 fázi buněčného cyklu. Naopak u kmenových buněk periodontálního ligamenta inhibice ATM kinasy vedla ke zvýšení procenta buněk akumulovaných v G2 fázi buněčného cyklu.

První den od ozáření 6 Gy jsme použitím fluorogenního substrátu stanovili **zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy u kmenových buněk zubní pulpy**. Vzestup byl mikroskopicky potvrzen 3. den od ozáření pomocí chromogenního substrátu. Zvýšení aktivity SA- $\beta$ -galaktosidasy bylo detekováno a kvantifikováno u mesenchymálních kmenových buněk kostní dřeně a periodontálního ligamenta 6. a 13. den od ozáření dávkou 20 Gy.

Vanadocen dichlorid indukuje dávkově závislou apoptózu u buněk HL-60 16 h po 1 h preinkubaci. Jednu hodinu od expozice buněk HL-60 vanadocen dichloridu jsme stanovili dávkově závislou formaci  $\gamma$ H2AX, která byla vyšší v porovnání s cisplatinou. Na základě výsledků stanovení  $\gamma$ H2AX se můžeme domnívat, že mechanismus cytotoxického působení vanadocen dichloridu je alespoň z části zprostředkován tvorbou DSB. Vanadocen dichlorid působí cytotoxicky indukci apoptózy u buněk MOLT-4. Bohužel však naše výsledky ukazují, že **vanadocen dichlorid je v porovnání s cisplatinou méně cytotoxický vůči leukemickým buňkám (MOLT-4 a HL-60) a zároveň více toxický ke zdravým lymfocytům.**

Mitoxantron během 24 h svého permanentního působení indukuje apoptózu u leukemických buněk MOLT-4. **Inhibice ATM kinasy kofeinem snižuje mitoxantronem indukovanou apoptózu. Naopak inhibice MEK1/2-ERK1/2 signální kaskády U0126 potencuje působení mitoxantronu.**

## 9. Použitá literatura

1. ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 3rd edition, 1994. New York (State of New York); Garland Science. ISBN-10: 0-8153-1619-4.
2. ALDRIDGE, D.R., RADFORD, I.R. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Research*, 1998, vol. 58, no. 1, s. 2817–2824.
3. ANDRIEVSKI, A., WILKINS, R.C. The response of gamma-H2AX in human lymphocytes and lymphocytes subsets measured in whole blood cultures. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, vol. 85, no. 4, s. 369–76.
4. AUBRECHT, J., NARLA, R.K., GHOSH, P., STANEK, J., UCKUN, F.M. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, vol. 154, no. 3, s. 228–235.
5. BANATH, J.P., MACPHAIL, S.H., OLIVE, P.L. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, no. 1, s. 7144–7149.
6. BEKKER-JENSEN, S., LUKAS, C., KITAGAWA, R., MELANDER, F., KASTAN, M.B., BARTEK, J., LUKAS, J. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *The Journal of Cell Biology*, 2006, vol. 173, no. 2, s. 195–206.
7. BURMA, S., CHEN, B.P., MURPHY, M., KURIMASA, A., CHEN D.J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 45, s. 42462–42467.
8. CEREVNY, T.J., MACVITTIE, T.J., YOUNG, R.W. *Medical consequence of nuclear warfare*. TMM Publications, 1999, Armed Forces Radiobiology Research Institute, Kapitola 2, Acute radiation syndrome in humans, s.15–36.
9. CHEN, M.F., LIN, C.T., CHEN, W.C., YANG, C.T., CHEN, C.C., LIAO, S.K., LIU, J.M., LU, C.H., LEE, K.D. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics*, 2006, vol. 66, no. 1, s. 244 – 253.
10. ČMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., SOUKUP, T., JIROUTOVÁ, A., VÍŠEK, B., SUCHÁNEK, J., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., MUTHNÁ, D., BRUCKOVÁ, L., FILIP, S., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, vol. 88, no. 5, s. 393–404.
11. CORY, S., HUANG, D.C., ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 53, s. 8590–8607.
12. DEBACQ-CHAINIAUX, F., ERUSALIMSKY, J.D., CAMPISI, J., TOUSSAINZ, O. 2009. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 2009, vol. 4, no. 12, s. 1798–1806.
13. DIMRI, G.P., LEE, X., BASILE, G., ACOSTA, M., SCOTT, G., ROSKELLEY, C., MEDRANO, E.E., LINSKENS, M., RUBELJ, I., PEREIRA-SMITH, O., PEACOCKE, M., CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, vol. 92, no. 20, s. 9363–9367.
14. DOLEŽALOVÁ, P. *Stanovení buněčné cytotoxicity vybraných vanadocenových a 1,1'-dimethyl vanadocenových komplexů*. Pardubice: Univerzita Pardubice. Fakulta chemicko-technologická. Katedra biologických a biochemických věd, 2009. 54 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jaromír Vinklár, Dr.
15. EASTMAN, A. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2004, vol. 91, no. 2, s. 223–231.
16. EL-DEIRY, W.S., HARPER, J.W., O'CONNOR, P.M., VELCULESCU, V.E., CANMAN, C.E., JACKMAN, J., PIETENPOL, J.A., BURRELL, M., HILL, D.E., WANG, Y. WAF1/CIP1 Is Induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Research*, 1994, vol. 54, no. 5, s. 1169–1174.
17. EL-DEIRY, W.S., TOKINO, T., VELCULESCU, V.E., LEVY, D.B., PARSONS, R., TRENT, J.M., LIN, D., MERCER, W.E., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, vol. 75, no. 4, s. 817–825.
18. FADOK, V.A., VOELKER, D. R., CAMPBELL P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L., HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *The Journal of Immunology*, 1992, vol. 148, no. 7, s. 2207–2216.

19. FILON, T.M., QIAO, M., GHULE, P.N., MANDEVILLE, M., WIJNEN, A.J., STEIN, J.L., LIAN, J.B., ALTIERI, D.C., STEIN, G.S. Survival responses of human embryonic stem cells to DNA damage. *Journal of Cellular Physiology*, 2009, vol. 220, no. 3, s. 586–592.
20. FISHER, R.P., MORGAN, D.O. A novel cyclin associates with MO15/cdk7 to form the cdk-activating kinase. *Cell*, 1994, vol. 78, no. 4, s. 713–724.
21. FLOROS, K.V., THOMADAKI, H., LALLAS, G., KATSAROS, N., TALIERI, M., SCOROLAS, A. Cisplatin-induced apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells: differential expression of BCL2 and novel apoptosis-related gene BCL2L12. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003, vol. 1010, no. 1, s. 153–158.
22. FURUTA, T., TAKEMURA, H., LIAO, Z.Y., AUNE, G.J., REDON, C., SEDELNIKOVA, O.A., PILCH, D.R., ROGAKOU, E.P., CELESTE, A., CHEN, H.T., NUSSENZWEIG, A., ALADJEM, M.I., BONNER, W.M., POMMIER, Y. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian topoisomerase I cleavage complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 22, s. 20303–20312.
23. GHOSH, P., CRUZ, O.J., NARLA, R.K., UNKUM, F.M. Apoptosis-inducing Vanadocene Compounds against Human Testicular Cancer. *Clinical Cancer Research*, 2000, vol. 6, no. 4, s.1536–1545.
24. GOANS, R.E., HOLLOWAY, E.C., BERGER, M.E., RICKS, R.C. Early dose assessment following severe radiation accidents. *Health Physics*, 1997 vol. 72, no. 4, s. 513–8.
25. GOLDING, S. E., ROSENBERG, E., NEILL, S., DENT, P., POVIRK, L. F., VALERIE, K. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Research*, 2007, vol. 67, no. 3, s. 1046–53.
26. HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., PEJCHAL, J., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX in peripheral blood mononuclear cells after thoracic irradiation of rats. *Journal of Applied Biomedicine*, 2011b, vol. 9, no. 1, s. 1–10.
27. HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX as an indicator of received dose of gamma radiation after whole-body irradiation of rats. *Acta Veterinaria Brno*, 2011a, vol. 80, no. 1, s. 113–118.
28. HERTVELD, K., PHILIPPE, J., THIERENS, H. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*, 1997, vol. 71, no. 4, s. 429–433.
29. HICKSON, I., ZHAO, Y., RICHARDSON, C.J., GREEN, S.J., MARTIN, N.M., ORR, A.I., REAPER, P.M., JACKSON, S.P., CURTIN, N.J., SMITH, G.C. Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Research*, 2004, vol. 64, no. 24, s. 9152–9159.
30. HILL, M.M., ADRAIN, C., DURIEZ, P.J., CREAGH, E.M., MARTIN, S.J. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO Journal*, 2004, vol. 23, no. 10, s. 2134–2145.
31. HORN, S., BARNARD, S., ROTHKAMM, K. Gamma-H2AX-based dose estimation for whole and partial body radiation exposure. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 9, s. 25113–25113.
32. JACKSON S.P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23, no. 5, s. 687–96.
33. JEFFREY P.D., RUSSO, A.A., POLYAK, K., GIBBS, E., HURWITZ, J., MASSAGUE, J., PAVLETICH, N.P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex. *Nature*, 1995, vol. 376, no. 1, s. 313–320.
34. KAWAHARA, M., TAKAHASHI, Y., TAKAZAWA, K., TSUCHIYA, H., TOMITA, K., YOKOGAWA, K., MIYAMOTO, K. Caffeine dose-dependently potentiates the antitumor effect of cisplatin on osteosarcomas. *Anticancer Research*, 2008 vol. 28, no. 3, s. 1681–1685.
35. KHANNA, K.K., JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, 2001, vol. 27, no. 1, s. 247–54.
36. KINNER, A., WU, W., STAUDT, CH., ILIAKIS, G.  $\gamma$ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, no. 17, s. 5678–5694.
37. KÖPF-MAIER, P., Wagner, W. Cytokinetic behavior of Ehrlich ascites tumor after in vivo treatment with cis-diamminedichloroplatinum(II) and metallocene dichlorides. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1981, vol. 102, no. 1, s. 21–30.

38. KÖPF-MAJER, P. Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1994, vol. 47, no. 1, s. 1–16.
39. MATSUSHIME, H., ROUSSEL, M.F., ASHMUN, R.A., SHERR, C.J. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 1991, vol. 65, no. 4, s. 701–713.
40. MENG, A., WANG, Y., BROWN, S.A., Van, Z.G., Zhou, D. Ionizing radiation and busulfan inhibit murine bone marrow cell hematopoietic function via apoptosis-dependent and independent mechanisms. *Experimental Hematology*, 2003 vol.1, no. 2, s. 1348–1356.
41. MOEBUS, V.J., STEIN, R., KIEBACK, D.G., RUNNEBAUM, I.B., SASS, G., KREIENBERG, R. Antitumor activity of new organometallic compounds in human ovarian cancer cell lines and comparison to platin derivatives. *Anticancer Research*, 1997, vol. 17, no. 2, s. 815–821.
42. MOMČILOVIĆ, O., CHOI, S., VARUM, S., BAKKENIST, C., SCHAZTEN, G., NAVARA, C. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G(2) but not G(1) cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2009, vol. 27, no. 8, s. 1822–1835.
43. MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995, vol. 374, no. 6518, s. 131–134.
44. MUKHERJEE, B., KESSINGER, C., KOBAYASHI, J., CHEN, B.P., CHEN D.J., CHATTERJEE, A., BURMA, S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, 2006, vol. 5, no. 5, s. 575–590.
45. MUTHNA, D., SOUKUP, T., VÁVROVÁ, J., MOKRY, J., CMIELOVA, J., VISEK, B., JIROUTOVA, A., HAVELEK, R., SUCHANEK, J., FILIP, S., ENGLISH, D., REZACOVA, M. Irradiation of Adult Human Dental Pulp Stem Cells Provokes Activation of p53, Cell Cycle Arrest and Senescence but not Apoptosis. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 12, s. 1855–1862.
46. NAVARA, C.S., BENYUMOV, A., VASSILEV, A., NARLA, R.K., GHOSH, P., UCKUN, F.M. Vanadocenes as potent anti-proliferative agents disrupting mitotic spindle formation in cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 2001, vol. 12, no. 4, s. 369–376.
47. OLIVE, P.L., BANÁTH J.P. Kinetics of H2AX phosphorylation after exposure to cisplatin. *Cytometry B Clinical Cytometry*. 2009, vol. 76, no. 2, s. 79–90.
48. ÖSTERREICHER, J., PEJCHAL, J., ŠKOPEK, J., MOKRÝ, J., VILASOVÁ, Z., PSUTKA, J., VÁVROVÁ, J., MAZUROVÁ, Y. Role of type II pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2004, vol. 56, no. 3, s.181–187.
49. PARK, E.J., CHAN, D.W., PARK, J.H., OETTINGER, M.A., KWON, J. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 23, s. 6819–6827.
50. PETERS, J.M. SCF and APC: the yin and yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, vol. 10, no. 6, s. 759–768.
51. PINTO, D.M., FLAUS, A. Structure and Function of Histone H2AX. *Subcellular Biochemistry*, 2010, vol. 50, no. 1, s. 55–78.
52. PIOSIK, J., ZDUNEK, M., KAPUSCINSKI, J. The modulation by xanthenes of the DNA damaging effect of polycyclic aromatic agents. Part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone. *Biochemical Pharmacology*, 2002, vol. 63, no. 4, s. 635–646.
53. PRENDERGAST, A.M., CRUET-HENNEQUART, S., SHAW, G., BARRY, F.P., CARTY, M.P. Activation of DNA damage response pathways in human mesenchymal stem cells exposed to cisplatin or  $\gamma$ -irradiation. *Cell Cycle*, 2011, vol. 10, no. 21, s. 3768–3777.
54. RAMAKRISHNAN, V. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997, vol. 26, no. 1, s. 83–112.
55. REDON, C.E., DICKEY, J.S., BONER, W.M., SEDELNIKOVA, O.A.  $\gamma$ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in Space Research*, 2009, vol. 43, no. 8, s. 1171–1178.
56. REDON, C.E., NAKAMURA, A.J., GOULIAEVA, K., RAHMAN, A., BLAKELY, W.F., BONNER, W.M. The use of gamma-H2AX as a biodosimeter for total-body radiation exposure in non-human primates. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 11, s. 1–8.
57. REDON, C.E., NAKAMURA, A.J., GOULIAEVA, K., RAHMAN, A., BLAKELY, W.F., BONNER, W.M. Q( $\gamma$ -H2AX), an analysis method for partial-body radiation exposure using  $\gamma$ H2AX in nonhuman primate lymphocytes. *Radiation Measurements*, 2011, vol. 46, no. 9, s. 877–881.
58. ŘEZÁČOVÁ, M., HAVELEK, R., LUKÁŠOVÁ, E., VÁVROVÁ, J. Fosforylovaný histon H2AX – nový indikátor poškození DNA. *Chemické listy*, 2011, vol. 105, s. 108–113.

59. ŘEZÁČOVÁ, M., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J., VOKURKOVÁ, D., LUKÁŠOVÁ, E. Is defect in phosphorylation of Nbs1 responsible for high radiosensitivity of T-lymphocyte leukemia cells MOLT-4? *Leukemia Research*, 2008, vol. 32, no. 8, s. 1259–1267.
60. ROGAKEU, E.P., PILCH, D.R., ORR, A.H., IVANOVA, V.S., BONNER, W.M. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 1, s. 5858–5868.
61. ROTHKAMM, K., LÖBRICH, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, vol. 100, no. 9, s. 5057–5062.
62. SCHÖNMEYR, B.H., WONG A.K., SOARES, M., FERNANDEZ, J., CLAVIN, N., MEHRA, B.J. Ionizing radiation of mesenchymal stem cells results in diminution of the precursor pool and limits potential for multilineage differentiation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2007, vol. 122, no. 1, s. 64–76.
63. SCOTT, R. S., MCMAHON, E. J., POP, S. M., REAP, E.A., CARICCHIO, R., COHEN, P.L., EARP, H. S., MATSUSHIMA G.K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, 2001, vol. 411, no. 1, s. 207–11.
64. SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no. 1, s. 155–168.
65. SOLIER, S., POMMIER, Y. The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 2009, vol. 8, no. 12, s. 1853–1859.
66. SOUKUP, T., MOKRÝ, J., KARBANOVÁ, J., PYTLÍK, R., SUCHOMEL, P., KUCEROVÁ, L. Mesenchymal stem cells isolated from the human bone marrow: cultivation, phenotypic analysis and changes in proliferation kinetics. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2006, vol. 49, no. 1, s. 27–33.
67. TRAGANOS, F., KAPUSCINSKI, J., GONG, J., ARDELT, B., DARZYNKIEWICZ, R.J., DARZYNKIEWICZ Z. Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, no. 19, s. 4613–4618.
68. VAN ENGELAND, M., NIELAND, L.J., RAMAEKERS, F.C., SCHUTTLE, B., REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998, vol. 31, no. 1, s. 1–9.
69. VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D. Lidské hematologické nádorové linie a jejich citlivost k účinkům ionizujícího záření. *Vojenské zdravotnické listy*, 2000, vol. 69, no. 6, s. 267–276.
70. VÁVROVÁ, J., MAREKOVÁ-ŘEZÁČOVÁ, M., VOKURKOVÁ, D., SZKANDEROVÁ, S.S., PSUTKA, J. Caffeine induces a second wave of apoptosis after low dose-rate gamma radiation of HL-60 cells. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2003 vol. 42, no. 3, s. 193–199.
71. VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Importance of Senescence in Ionizing Radiation-Induced Tumor Suppression. *Folia Biologica*, 2011, vol. 57, no. 2, s. 41–46.
72. 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 Biologica*, 2002, vol. 48, no. 2, s. 51– 57.
73. VILASOVÁ, Z., REZÁČOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., TICHÝ, A., VOKURKOVÁ, D., ZOELZER, F., ŘEHÁKOVÁ, Z., OSTERREICHER, J, LUKÁŠOVÁ, E. Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta Biochimica Polonica*, 2008, vol. 55, no. 2, s. 381–90.
74. VINDELOV, L.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 Archiv - B: Cell Pathology*, 1977, vol. 24, no. 1, s. 227–242.
75. VOKURKOVÁ. D., SINKORA, J., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M., KNÍŽEK, J., OSTERREICHER, J. CD8+ natural killer cells have a potential of a sensitive and reliable biosimetric marker in vitro. *Physiological Research*, 2006, vol. 55, no. 6, s. 689–98.
76. WILKINSON, G., BIRMINGHAM, J.M. Dicyclopentadienyl compounds of titanium, zirconium, vanadium, niobium, and tantalum. *Journal of the American Chemical Society*, 1954, vol. 76, no. 1, s. 4281–4284.
77. ZHOU, B.B., ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 2000, vol. 408, no. 6811, s. 433–439.

## 10. Přehled publikovaných prací

### Původní vědecké publikace s impakt faktorem:

HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., PEJCHAL, J., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX in peripheral blood mononuclear cells after thoracic irradiation of rats. *Journal of Applied Biomedicine*, 2011, vol. 9, no. 1, s. 209-218. (IF: 1,689)

HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., TICHÝ, A., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of histone H2AX as an indicator of received dose of gamma radiation after whole-body irradiation of rats. *Acta Veterinaria Brunensis*, 2011, vol. 80, no. 1, s. 113-118. (IF: 0,534)

CMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., SOUKUP, T., JIROUTOVÁ, A., VÍŠEK, B., SUCHÁNEK, J., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., MUTHNÁ, D., BRUCKOVÁ, L., FILIP, S., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, vol. 88, no. 5, s. 393-404. (IF: 1,861)

CMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., JIROUTOVÁ, A., KOHLEROVÁ, R., SEIFRTOVÁ, M., MUTHNÁ, D., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence. *Physiological Research*, 2011, vol. 60, no. 4, s. 667-677. (IF: 1,646)

SEIFRTOVÁ, M., HAVELEK, R., CMIELOVÁ, J., JIROUTOVÁ, A., SOUKUP, T., BRUČKOVÁ, L., MOKRÝ, J., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*, 2012, vol. 45, no. 5, s. 401-412. (IF: 2,383)

SEIFRTOVÁ, M., HAVELEK, R., CHMELAROVÁ, M., CMIELOVÁ, J., MUTHNÁ, D., STOKLASOVÁ, A., ZEMÁNKOVÁ, S., ŘEZÁČOVÁ, M. The Effect of ATM and ERK1/2 inhibition on mitoxantrone-induced cell death of leukaemic cells. *Folia Biologica*, 2011, vol. 57, no. 2, s. 74-81. (IF: 0,729)

MUTHNÁ, D., SOUKUP, T., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., CMIELOVÁ, J., VÍŠEK, B., JIROUTOVÁ, A., HAVELEK, R., SUCHÁNEK, J., FILIP, S., ENGLISH, D., ŘEZÁČOVÁ, M. Irradiation of adult human dental pulp stem cells provokes activation of p53, cell cycle arrest, and senescence but not apoptosis. *Stem Cells and Development*, 2010, vol. 19, no. 12, s. 1855-1862. (IF: 4,791)

ŘEZÁČOVÁ, M., RUDOLFOVÁ, G., TICHÝ, A., BAČÍKOVÁ, A., MUTHNÁ, D., HAVELEK, R., VÁVROVÁ, J., ODRÁŽKA, K., LUKÁŠOVÁ, E., KOZUBEK, S. Accumulation of DNA damage and cell death after fractionated irradiation. *Radiation Research*, 2011, vol. 175, no. 6, s. 708-718. (IF: 2,578)

### Původní vědecké publikace v recenzním řízení:

HAVELEK, R., ŠIMAN, P., CMIELOVÁ, J., STOKLASOVÁ, A., VÁVROVÁ, J., VINKLÁREK, J., KNÍŽEK, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Differences in vanadocene dichloride and cisplatin effect on MOLT-4 leukemia and human peripheral blood mononuclear cells. *Medicinal Chemistry*, v tisku. (IF: 1,603)



ZÁRYBNICKÁ, L., VÁVROVÁ, J., HAVELEK, R., TICHÝ, A., PEJCHAL, J., ŠINKOROVÁ, Z. Lymphocyte subsets and their H2AX phosphorylation in response to in vivo irradiation in rats. *International Journal of Radiation Biology*, v recenzním řízení. (IF: 1,861)

ČMIELOVÁ, J., HAVELEK, R., KÖHLEROVÁ, R., SOUKUP, T., VÁVROVÁ, J., MOKRÝ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. The effect of ATM kinase inhibition on the initial response of human dental pulp and periodontal ligament mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *International Endodontic Journal*, v recenzním řízení. (IF: 2,383)

### **Přehledové články:**

ŘEZÁČOVÁ, M., HAVELEK, R., LUKÁŠOVÁ, E., VÁVROVÁ, J. Phosphorylation of Histone H2AX-A Novel Indicator of DNA Damage. *Chemické listy*, 2011, vol. 105, no. 2, s. 108-113. (IF: 0,620)

### **Přednášky na odborných setkáních:**

Fakultní konference studentů DS 2. ročníku, 24. 5. 2010. Hradec Králové – ústní sdělení s názvem MOŽNOSTI PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE V ANALÝZE REAKCE BUNĚK NA GENOTOXICKÝ STRES.

6<sup>th</sup> Postgraduate Medical Students Conference, 25. 10. 2010, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem PHOSPHORYLATION OF HISTONE H2AX AS AN INDICATOR OF RECEIVED DOSE OF GAMMA RADIATION AFTER LOCAL AND WHOLE-BODY IRRADIATION OF RATS.

Operační program Praha - Adaptabilita, 22. 4. 2011, Revmatologický ústav Praha – ústní sdělení s názvem DETEKCE APOPTÓZY POMOCÍ FLOW CYTOMETRIE – PŘEHLED VYBRANÝCH METOD.

13. vědecko-pedagogická konference učitelů biochemických oborů lékařských fakult ČR a SR, 15. – 16. 9. 2011, Hradec Králové – ústní sdělení s názvem FOSFOROVANÝ HISTON H2AX - MOLEKULÁRNÍ INDIKÁTOR OBDRŽENÉ DÁVKY GAMA ZÁŘENÍ.

### **Postery:**

HAVELEK, R., ŠIMAN, P., KREJČÍŘÍKOVÁ, P., ZÁRYBNICKÁ, L., ŠINKOROVÁ, Z., VINKLÁREK, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Differences in vanadocene dichloride and cisplatin effect on apoptosis induction in MOLT-4 leukemia cells and human lymphocytes of peripheral blood. 34<sup>th</sup> FEBS Congress, Prague, 4. – 9. 7. 2009. Abstrakt uveřejněn v: *FEBS Journal*, 2009, vol. 276, s. 313. (IF: 3,129)

HAVELEK, R., ČMIELOVÁ, J., ŠIMAN, P., VINKLÁREK, J., VÁVROVÁ, J., ŘEZÁČOVÁ, M. Comparison of histone H2A.X (Ser139) and ATM kinase (Ser1981) phosphorylation after one hour treatment of HL-60 cells with vanadocene dichloride and cisplatin; relation to the cell-cycle phases. 36<sup>th</sup> FEBS Congress, Göteborg, 26. 6. 2010 – 1. 7. 2010. Abstrakt uveřejněn v: *FEBS Journal*, 2010, vol. 277, s. 151. (IF: 3,129)

HAVELEK, R., ŘEZÁČOVÁ, M., ŠINKOROVÁ, Z., ZÁRYBNICKÁ, L., PEJCHAL, J., VÁVROVÁ, J. A comparison of gammaH2AX increase after whole-body and partial irradiation. 36<sup>th</sup> FEBS Congress, Torino, 25. – 30. 6. 2011. Abstrakt uveřejněn v: *FEBS Journal*, 2011, vol. 278, s. 347. (IF: 3,129)