

Integrácia multimódovej čítačky na zobrazovanie buniek "Cytation 5" do rádiobiologického výskumu

Integration of the „Cytation 5“ Multimode Cell Imaging Reader Into Radiobiological Research

Veronika Wohlmuthová¹, Lucián Zastko^{2,3}

¹Katedra teoretickej elektrotechniky a biomedicínskeho inžinierstva, Fakulta elektrotechniky a informačných technológií, Žilinská univerzita v Žiline, Žilina, Slovenská republika

²Katedra laboratórnych vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Fakulta zdravotníctva, Katolícka univerzita v Ružomberku, Ružomberok, Slovenská republika

³Oddelenie rádiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava, Slovenská republika

<https://doi.org/10.54937/zs.2024.16.2.3-9>

Abstrakt

V článku popisujeme integráciu nových cytogenetických metód do rádiobiologického výskumu s využitím multimódovej čítačky Cytation 5, poskytujeme prehľad všeobecne používaných cytogenetických metód v rádiobiologickom výskume ako aj podrobný opis multimódovej čítačky mikroplatničiek Cytation 5. Súčasťou práce je taktiež prezentácia výsledkov, získaných využitím čítačky Cytation 5, pomocou ktorej sme analyzovali vplyv extrémne-nízko frekvenčného magnetického poľa na bunky ľudského glioblastómu *in vitro*.

Kľúčové slová: Rádiobiologický výskum. Cytogenetické metódy. Cytation 5.

Abstract

In the article, we describe the integration of new cytogenetic methods into radiobiological research using the Cytation 5 multimode reader, we provide an overview of commonly used cytogenetic methods in radiobiological research as well as a detailed description of the Cytation 5 multimode microplate reader. The work also includes a presentation of the results obtained using the Cytation 5 reader, in which we analyzed the effect of an extremely low-frequency magnetic field on human glioblastoma cells *in vitro*.

Key words: Radiobiological research. Cytogenetic methods. Cytation 5.

Úvod

V súčasnej dobe predstavuje rádiobiologický výskum jednu z kľúčových oblastí v boji proti rôznym ochoreniam, vrátane nádorových ochorení. Rôzne cytogenetické metódy, ktoré analyzujú poškodenie buniek alebo ich genetickej informácie, poskytujú cenné informácie o účinkoch ionizujúceho, neionizujúceho žiarenia prípadne iných látok na genómovú stabilitu buniek. Vytváraním nových metód dochádza ku snahe optimalizovať a inovovať rádiobiologický výskum zvýšením jeho efektivity, rýchlosti a presnosti. Práve tieto novo zavedené metódy môžu viesť k objaveniu nových poznatkov o bunkách, čo môže zabezpečiť zlepšenie diagnostiky, či terapie ochorení spojených so žiarením.

Cytogenetické metódy využívane v rádiobiologickom výskume

Cytogenetika ako vedný odbor sa zaoberá štúdiom vzťahov medzi chromozomálnymi aberáciami a genetickými ochoreniami u ľudí. Moderné cytogenetické metódy nám umožňujú presne lokalizovanie ľubovoľného génu na chromozóme, skúmanie rôznych typov tkanív vrátane nádorových buniek a identifikáciu buniek, ktoré prejavujú aneuploidiu (stratu alebo získanie jedného alebo viacerých chromozómov), prípadne translokácie chromozómových fragmentov [1].

Medzi jednu zo základných cytogenetických metód je možné zaradiť karyotypizáciu. Karyotypizácia je proces

párovania a usporiadania všetkých chromozómov organizmu na vytvorenie celogenómovej snímky chromozómov jednotlivca. Jednotlivé karyotypy sa pripravujú pomocou štandardizovaných postupov farbenia, ktoré zvýraznia charakteristické znaky chromozómov [2]. Na chromozómovú analýzu somatických buniek počas mitotického delenia je možné použiť všetky živé bunky, obsahujúce bunkové jadro. Po dosiahnutí dostatočného množstva mitotických buniek je potrebné zablokovanie mitózy v metafáze. Nasleduje zabezpečenie korektného rozloženia a dochádza ku farbeniu a fixácii preparátov [3]. Pod svetelným mikroskopom je však skoro nemožné dôkladne diagnostikovať štruktúrne vlastnosti chromozómov. Aby sme dosiahli presnejšiu analýzu, chromozómy sú farbené rôznymi farbivami. Po ich aplikácii dochádza ku vytvoreniu charakteristických pásových vzorov na jednotlivých chromozómoch [4]. Následne sa adekvátne preparáty ofotografujú. Vhodné chromozómy sa vytrihnú a roztriedia podľa Denverskej klasifikácie na základe ich veľkosti a uloženia centroméry. Získaná fotomontáž všetkých chromozómov jednej bunky je nazývaná karyotyp [5]. V dnešnej dobe patrí vyšetrenie karyotypu medzi základné vyšetrenia v cytogenetickej praxi, používané na diagnostiku širokého spektra chromozomálnych porúch u jedinca [2].

Prietoková cytometria je ďalšia metóda často využívaná v cytogenetickej praxi. Táto technológia umožňuje rýchlu a efektívnu multiparametrickú analýzu buniek. Prístroj využíva laser ako svetelný zdroj, okolo ktorého prechádzajú bunky suspendované v tekutine. Bunky, prípadne ich jednotlivé časti

(napríklad chromozómy), sú farbené rôznymi fluorescenčnými farbivami, ktoré fluoreskujú v laserovom lúči. Po interakcii lasera s bunkami dochádza k fluorescencii a rozptylu žiarenia, ktoré je snímané detektormi, ako sú fotodiódy a fotonásobiče. Bunkové populácie môžu byť analyzované na základe ich fluorescenčných alebo rozptylových charakteristík. Niektoré prístroje sú taktiež schopné analyzovať bunky pomocou elektrickej impedancie. Táto technika má uplatnenie vo viacerých vedných disciplínach ako je imunológia, virológia, molekulárna biológia a pri rôznych štúdiách rakoviny. Medzi konkrétne aplikácie možno zaradiť imunofenotypizácie, multiparametrické analýzy DNA, proliferácie alebo počítanie buniek [6, 7].

Metódy molekulárnej cytogenetiky predstavujú ďalší „upgrade“ vo svete cytogenetických metód. Vyznačujú sa najmä vysokou citlivosťou, pretože dokážu charakteristickou hybridizáciou chromozómov špecifických DNA sekvencií určiť celé chromozómy alebo ich časti. Pomocou metód molekulárnej cytogenetiky je možné určiť numerické aberácie chromozómov, chromozómové translokácie. A taktiež odhaliť jemné štruktúrne aberácie, ktoré mohli vzniknúť v dôsledku radiačnej mutagenézy [5]. In situ hybridizácia (ISH) alebo hybridizácia nukleových kyselín je jedna z najpoužívanejších metód v molekulárnej biológii. Metóda umožňuje lokalizáciu a identifikáciu špecifických sekvencií v DNA alebo RNA, ktoré možno vizualizovať pomocou fluorescenčných (fluorescenčná in situ hybridizácia, FISH) alebo chromogénnych sond (chromogénna in situ hybridizácia, CISH). Princíp metódy je založený na komplementárnej funkcii DNA/RNA a ich špecifickom párovaní jednotlivých báz. Dochádza ku väzbe sekvencií jednoreťazcovej DNA, označovaných ako sondy, s komplementárnymi cieľovými jednoreťazcovými úsekmi DNA. Prvý krok pre správne stanovenie ISH zahŕňa prípravu špecifickej sondy. Ďalej nasleduje denaturácia (oddelenie jednotlivých vlákien DNA) a aplikácia sondy na vzorku. Posledný krok zahŕňa proces hybridizácie, počas ktorého je krátka sekvencia nukleovej kyseliny definovaná ako sonda, ktoré je komplementárne naviazaná na cieľovú sekvenciu skúmaného génu. Následne je možná detekcia sondy [5, 8]. Medzi jednu z najpoužívanejších ISH považujeme metódu FISH, ktorá využíva fluorescenčné sondy na detekciu DNA sekvencií. Sondy sú značené nepriamo pomocou imunofluorescencie alebo priamo pomocou inkorporácie fluorochrómu [9, 10].

Spektrálna karyotypizácia alebo SKY (z anj. - *spectral karyotyping*) sa zaraďuje medzi jednu z novších metód určených na chromozomálnu analýzu. Táto metóda pracuje na princípe FISH a umožňuje diagnostikovať široké spektrum ochorení vďaka možnosti zafarbenia všetkých 24 ľudských chromozómov [11]. Princíp SKY pozostáva z merania emisných spektier špeciálnych sond. Sondy sú rovnako, ako pri FISH naviazané na jednotlivé chromozómy. Sú značené fluorescenčnými farbivami, pričom práve vďaka miešaniu samostatných farbív sme schopný zafarbiť a odlíšiť všetky chromozómy. Táto metóda je zaraďovaná medzi technicky náročnejšie. Na zaznamenávanie je využívaný Fourierov spektroskop a na vyhodnocovanie je používaná CCD kamera [9, 11]. Medzi ďalšiu metódu využívanú v rádiobiologickom výskume možno začleniť napríklad komparatívnu genómovú hybridizáciu, ktorá je využívaná na detekciu a analýzu chromozomálnych nálezov najmä v onkológii. Princíp metódy spočíva v meraní, vyhodnotení a následnom porovnaní intenzity signálu v zdravej a nádorovej DNA [5, 12].

Vybrané cytogenetické metódy využívané v rádiobiologickom výskume

Nasledujúca časť sa zaoberá vybranými cytogenetickými metódami, ktoré sú široko využívané v rádiobiologickom výskume na hodnotenie a analýzu poškodenia genetického materiálu. Metódy zahrnuté v tomto článku sú: mikrojadrový test, koméťový test, metódy určené na detekciu apoptózy a analýzy DNA opravných fokusov.

Mikrojadrový test (z anj. - *micronucleus assay*) predstavuje jednu z najpoužívanejších metód hodnotenia genotoxicity spôsobenej rôznymi chemickými a fyzikálnymi faktormi [13]. Mikrojadrá sú malé mimojadrové telieska, ktoré zvyčajne obsahujú poškodené chromozómové časti, prípadne celé chromozómy. Tieto fragmenty alebo celé chromozómy neboli počas anafázy korektné pritiažené k pólom bunky. Sú obalené jadrovou membránou a štruktúrou sa podobajú na dcérske jadrá. Mikrojadrá obsahujúce acentrické chromatídy/chromozómové fragmenty zvyčajne vznikajú po rozsiahlych poškodeniach DNA, ktoré neboli správne opravené [14]. Všetky mikrojadrové testy sú založené na princípe analýzy frekvencie výskytu mikrojadier. Odlišujú sa z hľadiska druhu použitých buniek a protokolov. Poznáme mikrojadrové testy blokujúce cytokinézu, ktoré sú zaraďované medzi najpopulárnejšie in vivo/in vitro testy. V dvojjadrových bunkách sa zabezpečí zastavenie cytokinézy pridaním cytochalazínu B. Vykonávajú sa na určenie biologickej dozimetrie, genotoxicity a v experimentoch pre určenie cytogenetického poškodenia. Následne je tu možné zaradiť mikrojadrové testy v cicavčích erythrocytoch, mikrojadrové testy buniek ústnej dutiny a mikrojadrové testy v iných typoch buniek [13, 14].

Koméťový test (z anj. - *comet assay*, CA) je rozsiahlo používaný test určený na detekciu poškodenia a opravy DNA v jednotlivých bunkách. Test zahŕňa kombináciu gélovej elektroforézy a fluorescenčnej mikroskopie. Bunky určené na testovanie sú uložené v tenkej vrstve agarózy a znehybnené. Následne sú lyzované detergentami a soľami, čím dochádza k prerušeniu membrán a histónov. Dôsledkom lyzácie je vytvorený nucleoid, ktorý je stále pripravený k jadrovým proteínom necitlivým na lyzáciu. Ďalší krok zahŕňa použitie elektroforézy na dané podložné sklíčko s bunkami [15]. Ak sú v bunke prítomné zlomy, pod pôsobením elektrického prúdu fragmenty migrujú z tela nucleoidu (z hlavy kométy), pričom dochádza k formácii obrazu pripomínajúceho chvost kométy. Po aplikácii elektroforézy sú preparáty zafarbené fluorescenčnými farbivami a nasleduje analýza pomocou fluorescenčného mikroskopu [15, 16, 17]. Pri analýze CA je potrebné zahrnutie základných informácií, akými sú počet percent DNA nachádzajúcich sa vo chvoste kométy, samotná dĺžka chvosta, moment chvosta, počet komét na vzorke a celková úroveň DNA migrácie [16].

Apoptóza, inak nazývaná aj programovaná bunková smrť, zohráva dôležitú úlohu pri zachovaní stálosti vnútorného prostredia, vývoji orgánov, starnutí, diferenciácii tkaniva a eliminácii zmutovaných buniek. V súčasnosti existuje mnoho metód a technológií, ktoré nám umožňujú detegovať apoptózu, pričom je potrebné prihliadať na rôzne faktory pri ich výbere [15]. Ako prvé je možné spomenúť metódy detekcie založené na morfológických zmenách. Počas apoptózy dochádza ku zmenšovaniu buniek, zníženiu vody v cytoplazme, rozpadu jadra, degradácii cytoskeletu a následnému vzniku apoptických teliesok. Rôzne morfológické zmeny je možné identifikovať

pomocou svetelnej mikroskopie po aplikácii hematoxilínu a eozínu (HE), Giemsovho, prípadne Wrightsovho farbenia. Pomocou elektrónového mikroskopu dokážeme určiť, ktoré bunky prešli apoptózou po zafarbení uranylacetátom a citrátom olovnatým. Počas apoptózy dochádza ku mnohým biochemickým procesom. Faktory indukujúce apoptózu priamo/nepriamo zvyšujú koncentráciu Ca^{2+} a Mg^{2+} , čím dochádza ku aktivácii endogénnych endonukleáz. Apoptotické proteázy a endonukleázy spôsobujú štiepenie proteínov a fragmentáciu samotnej DNA. Medzi používané prostriedky je možné napríklad zaradiť test TUNEL (z anj. - *terminal deoxynucleotidyl transferase (dUTP) nick end labeling*). Test využíva enzým terminálnej deoxynukleotidyltransferázy na začlenenie fluorescenčných značiek do poškodených oblastí nukleových kyselín.

Mechanizmus apoptózy môže byť rozdelený do vonkajších a vnútorných signálnych dráh. Samotný výskyt apoptózy dokážeme zdetegovať pomocou zmien v cieľových dráhach proteínov. Technika imunolabelovania je spojená s reakciou antigén - protilátka, značiacich antigénov alebo protilátok s fluoresceínom, enzýmami, rádioizotopmi. Taktiež je možné použitie prietokovej cytometrie na detekciu apoptotických buniek po využití farbenia pomocou Annexín V/propidium jodidu (PI). Annexín V je možné využiť ako fluorescenčnú sondu, pomocou ktorej je označený odhalený fosfatidylserín na vonkajšej strane bunkovej membrány (ku expozícii fosfatidylserínu dochádza pri strate asymetrie plazmatickej membrány pri apoptóze). PI je farbivo umožňujúce zafarbenie nukleovej kyseliny, ktoré nedokáže preniknúť cez nepoškodené bunkové membrány. Množstvo farbiva koreluje s množstvom DNA v bunke [18 - 20].

Analýza enumerácie DNA opravných fokusov - po poškodení DNA dochádza ku spusteniu bunkových reakcií, ktoré vedú k oprave, prípadne ku spracovaniu poškodenia pomocou rôznych mechanizmov. Proteíny pre opravu DNA teda môžu predstavovať dôležité biomarkery, určené na detekciu a kvantifikáciu poškodenia. V súčasnej dobe existuje viacero prístupov určených na skúmanie a detekciu týchto základných mechanizmov. Medzi proteíny, ktoré sú využívané ako molekulové markery možno zaradiť fosforylovaný histónový proteín H2AX. Po poškodení DNA dochádza ku fosforylácii H2AX, čo umožňuje detekciu a kvantifikáciu poškodenia DNA. Primárna metóda využívaná na detekciu je založená na princípe imunofluorescencie s využitím špecifickej protilátky pre serín 139: γH2AX na určenie jej prítomnosti a lokalizácie v miestach poškodenia DNA [21]. Podobne je možné určenie aj ďalšieho významného proteínu 53BP1, ktorý zohráva významnú úlohu pri oprave DNA. 53BP1 je taktiež možné hodnotiť pomocou špecifických protilátok a imunofluorescencie [22].

Multimodálna čítačka Cytation 5

Multimódové čítačky platničiek predstavujú zariadenia určené na analýzu kultúr/testovacích platničiek v biologických, chemických alebo biomedicínskych experimentoch. Medzi najväčšie výhody využitia multimódových čítačiek patrí jednoduché a rýchle vykonávanie širokého spektra aplikácií pri možnosti zníženia nákladov [23]. Cytation 5 je plne integrovaná multimódová čítačka, ktorá kombinuje digitálnu fluorescenciu, brightfield, farbenie H&E a fázový kontrast pre optimálnu flexibilitu detekcie a výkonu s optickým systémom založenom na filtroch a monochromátoroch [24].

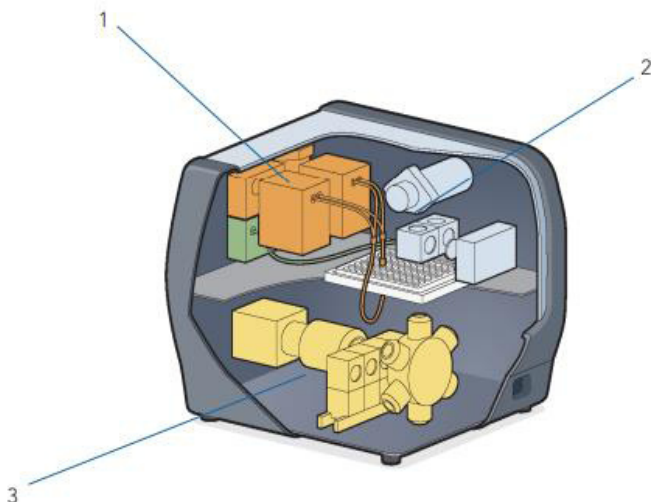
Cytation 5 kombinuje digitálnu mikroskopiu s multimódovou detekciou. Samotný prístroj sa skladá z troch oddelených systémov. Multimódový detekčný systém zahŕňa optickú dráhu zloženú z monochromátora, ktorý môžeme vidieť na Obr. 1, časť 1 a optickú dráhu zloženú z filtrov (Obr. 1, časť 2). Zobrazovacia časť prístroja na Obr. 1, časť 3 sa skladá z CCD kamery, filtračných kociek, LED diód a až šiestich objektívov [25].

Cytation 5 je kompatibilný s viacerými laboratórnymi pomôckami. A to s 6 až 1536 jamkovými mikroplatičkami, mikroskopickými sklíčkami, T25 bankami, Petriho miskami (100, 60 a 35 mm) a komôrkami na počítanie buniek [24]. Multimódový systém detekcie mikrodoštičiek v Cytation 5 využíva flexibilné optické časti na báze monochromátora s pridaným optickým modulom na báze filtrov. Zdroj žiarenia predstavuje xenónová záblesková lamp. Svetlo je následne modulované štvornásobnými monochromátormi a privedené cez optické vlákno ku vyšetrovanej vzorke. Žiarenie je od vzorky privádzané pomocou optického vlákna a detegované pomocou PMT detektorov (fotonásobičov) [25]. Štvornásobný monochromátor ponúka voľbu vlnovej dĺžky v rozsahu 250 nm až 750 nm. Možnosť zvolenia šírky pásma (od 9 nm do 50 nm v 1 nm inkrementoch) napomáha optimalizácii detekcie pre fluorofóry [24].

Filteračný modul obsahuje vlastný svetelný zdroj a dichroický systém výberu vlnovej dĺžky. Aj v tomto prípade tvorí zdroj svetla xenónová záblesková lamp. Svetlo je následne filtrované cez filtračné kocky a prenášané na vyšetrovanú vzorku. Odkiaľ je detegované pomocou PMT detektorov [25]. Multimódový detekčný systém umožňuje viacero módov detekcie ako UV-Vis absorpcia, intenzita fluorescencie, TRF (z anj. - *time-resolved fluorescence*), fluorescenčná polarizácia, luminiscencia [24]. UV-Vis absorpčný mód využíva zdroj svetla, ktorý osvetľuje vzorku svetlom s vlnovou dĺžkou od UV po viditeľné spektrum. Následne je meraná absorpcia svetla vzorkou pri konkrétnych vlnových dĺžkach [26]. Mód na určenie intenzity fluorescencie využíva optický systém, ktorý osvetľuje vzorku pomocou špecifickej vlnovej dĺžky. Excitačná vlnová dĺžka je zvolená pomocou optického filtra/monochromátora a dochádza ku excitácii vzorky, ktorá sa prejavuje emitovaním svetla pri rozdielnej vlnovej dĺžke [27]. TRF mód je podobný módu na určenie intenzity fluorescencie. Rozdiel predstavuje načasovanie procesu budenia/merania. Pri meraní intenzity dochádza ku procesom excitácie a k meraniu emisie v rovnaký čas. Nevýhodou predstavuje najmä detegovanie excitačného svetla detekčným systémom. TRF rieši túto problematiku využitím špecifických fluorescenčných molekúl (lantanoidy), ktoré dokážu emitovať žiarenie dlhšiu časovú dobu [28]. Meranie fluorescenčnej polarizácie prebieha pomocou polarizačných filtrov. Vzorky sú excitované pomocou polarizovaného svetla. Následne v závislosti od mobility molekúl dochádza ku vyžarovaniu polarizovaného alebo nepolarizovaného svetla [29]. Multimodálny detekčný systém dokáže taktiež merať úroveň luminiscencie. Výhodou detekcie luminiscencie je jej jednoduchosť, nakoľko nie je potrebné využívať zdroj svetla na excitáciu [30].

Zobrazovací systém Cytation 5 zahŕňa svetelné zdroje LED spolu so zostavami filtračných kociek. Cytation 5 môže obsahovať až 4 filtračné kocky, ktoré umožňujú meranie v štandardných RGB (červená, zelená, modrá) farbách. V prístroji sú spojené dve kocky, pričom spodná obsahuje vysokovýkonnú LED diódu a fokusačnú sošovku. Prístroj dokáže využívať LED s rôznymi vlnovými dĺžkami (356 nm, 390 nm až 740 nm). Horná

kocka obsahuje excitačný, dichroický a emisný filter. Je možné využitie až 17 druhov filtračných kociek (Texas Red, CY5, CY7 a pod.). LED diódy sú prispôbené farebným požiadavkám filtrov v hornej časti [31]. Prístroj využíva inverzný mikroskop. Súčasťou je 6 objektívov umožňujúcich zväčšenie 1.25x, 2.5x, 4x, 10x, 20x, 40x a 60x a fázový kontrast s možnosťou 4x, 10x, 20x a 40x zväčšenia. Objektívy sú umiestnené v softvérovo riadenom turnikete, ktorý umožňuje ich priblíženie a oddialenie, čo zohráva dôležitú úlohu v prípade automatického zaostrovania [24, 25]. Cytation 5 využíva CCD kameru so Sony čipom, ktorý obsahuje zabudovanú tubusovú šošovku pre zabezpečenie kvality obrazu [24].



Obr. 1 Cytation 5 - časti zariadenia. Prístroj je zložený z troch oddelených systémov: 1.) Optická dráha zložená z monochromátora. 2.) Optická dráha zložená z filtrov. 3.) Zobrazovacia časť prístroja, upravené podľa: [24].

Digitálna mikroskopia umožňuje rôzne zobrazovacie módy ako digitálnu fluorescenciu, *brightfield* (svetelné pole), farbenie H&E a fázový kontrast [25]. Prístroj ponúka viacero zobrazovacích metód: jednofarebné a viacfarebné zobrazovanie, montáž, časozber a takzvaný Z-stacking, ktorý umožňuje zlepšenie ostroty pomocou kombinácie série obrazov, zachytených pri rozličnej ohniskovej vzdialenosti [26, 27].

Materiály a metódy

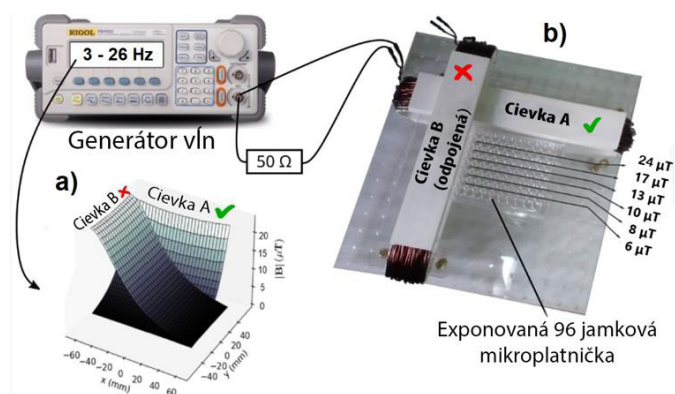
Expozičný systém

Systém na expozíciu buniek pozostával z dvoch spoštených ortogonálnych cievok (Obr. 2) so vzduchovým jadrom. Obe cievky boli navinuté okolo polyvinylchloridových (PVC) podpier samostatne pripevnených na akrylovej základni s hrúbkou 8 mm. Vyrobené cievky obsahujú 40 vinutí medeného drôtu s priemerom 1.450 mm [28]. Základňa uložená pod cievkami mala pre zabezpečenie lepšieho prúdenia vzduchu v inkubátore na povrchu umiestnené otvory s veľkosťou 6 mm, rozmiestnené vo štvorcovej sieti s 20 mm rozstupmi. Na zabezpečenie efektívneho umiestnenia štandardnej 96 jamkovej mikroplatničky vo vzdialenosti 1 milimetra od roviny symetrie systému bola nainštalovaná akrylová polička.

V rámci nášho vykonaného experimentu sme využívali cievku A, umiestnenú rovnobežne s riadkami exponovanej 96 jamkovej mikroplatničky (Obr. 2, časť b). Do cievky, ktorá bola súbežná so stĺpcami mikroplatničky (vertikálna cievka B)

nebol injektovaný žiadny prúd. Po privedení striedavého prúdu s amplitúdou 100 mA (amplitúda bola zvolená v maximálnom rozsahu od -5 do 5 V) do cievky A, bolo generované magnetické pole s frekvenciami od 3 po 26 Hz, pričom každú hodinu dochádzalo ku inkrementu frekvencie o 1 Hz. Každá frekvencia (3 Hz, 4 Hz, ..., 26 Hz), ovplyvňovala bunky po dobu 60 minút pred zmenou na nasledujúcu. Bunky boli teda celkovo exponované po dobu 24 hodín, pričom nasledujúcich 24 hodín boli ponechané v inkubátore, pre sledovanie neskorých účinkov z ožiarenia. Kontrolná mikroplatnička bola uložená v rovnakom inkubátore so vzdialenosťou, pri ktorej došlo k vylúčeniu dosiahnutia magnetických polí generovaných cievkou A.

Kvôli riziku rýchlejšieho odparovania neboli bunky umiestnené v okrajových jamkách. Boli teda využívané iba rady B – G a stĺpce 2 – 11. Vďaka využitiu jednej cievky boli jamky každého radu vystavené rovnakým hodnotám magnetického poľa. To znamenalo že bunky radu B (stĺpce 2 – 11) boli vystavené magnetickému poľu s hodnotami 24 μT (Obr. 2, časť b), bunky radu C 17 μT , rad D 13 μT , rad E 10 μT , rad F 8 μT a rad G 6 μT . Sériovým zapojením 50 W rezistora s cievkou A prechádzal striedavý prúd, ktorý generoval generátor DG1022. Tento prístroj dokáže vytvárať ľubovoľný tvar signálu (napr. sínusové, obdĺžnikové, pílovité vlny). Pomocou digitálneho osciloskopu DS1052E dochádzalo súčasne k monitorovaniu pretekajúceho prúdu (Obr. 2, časť a). Po zavedení jednosmerného prúdu s hodnotami 600 mA do oboch cievok dochádzalo ku zvýšeniu teploty o 0.2 $^{\circ}\text{C}$ v jamke A1. Vzhľadom na fakt, že zvýšenie teploty bolo úmerné druhej mocnine efektívnej hodnoty (RMS) prúdu, bolo odhadnuté, že pri trojuholníkovom striedavom prúde s hodnotou 100 mA boli hodnoty ohrievania nižšie ako 10^{-3} $^{\circ}\text{C}$. Teplota bola preto vylúčená, ako možná skresľujúca premenná. Elektrická intenzita elektromagnetického poľa generovaného cievkou A bola v rozmedzí 10^{-9} – 10^{-8} V/m. Rádiofrekvenčné žiarenie pozadia merané 3-osovým magnetometrom dosahovalo rovnaké hodnoty $E = 0.5$ mV/m, $H = 1.378$ $\mu\text{A}/\text{m}$, $S = 0.001$ mW/cm² na oboch miestach uložených kontrolných a exponovaných mikroplatničiek. DC pole pozadia analyzované pomocou 3-osového magnetometra HCM5883L bolo homogénne na celej exponovanej mikroplatničke.



Obr. 2 Schéma zapojenia a generované magnetické polia experimentálnej zostavy. a.) 3D znázornenie polí generovaných oboma cievkami, v našom prípade dochádzalo ku generácii poľa len cievkou A. b.) 96 jamková mikroplatnička vystavená magnetickému poľu generovanému cievkou A so striedavým prúdom sínusového tvaru (3 – 26 Hz), upravené podľa: [Rádiobiologické laboratórium: Oddelenie rádiobiológie, Ústav experimentálnej onkológie, BMC SAV, v. v. i.].

Metódy

Na experimentálne merania pomocou prístroja Cytation 5 sme použili bunky U251 bunkovej línie ľudského glioblastómu (kat. č. 09063001).

Zmrazené bunky sme z tekutého dusíka umiestnili do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C. Po rozmrazení sme bunky presunuli do Falconovej skúmavky, do ktorej sme pridali DMEN (Gibco, Life technologies, (USA)) médium ohriaté na 37 °C. Bunky sme v Falconovej skúmavke centrifugovali pri 3200 otáčkach za minútu po dobu 5 minút, odsali sme roztok a bunkový pelet sme rozpustili v 10 ml média. Následne sme bunky presunuli do malej Petriho misky, do ktorej sme pridali 100 µl amphotericínu (Gibco, Invitrogen (Nemecko)). Petriho misku s bunkami sme uložili do inkubátora (NB-203XL, CO2 inkubátor). Po približne 48 hodinách sme z buniek odobrali médium a premyli ich v PBS (Gibco, Invitrogen, (Nemecko)) roztoku s teplotou 37 °C. Po premytí sme pridali 1 ml 0.4 % trypsínu a umiestnili Petriho misku s bunkami do inkubátora na 5 minút pri teplote 37 °C. Po uplynutí doby sme Petriho misku vybrali z inkubátora, pridali 2 ml DMEN média a bunky premiestnili do 15 ml Falconovej skúmavky. Bunky sme rozsuspendovali v skúmavke, odobrali sme 20 µl bunkovej suspenzie a pridali sme 20 µl 0.4 % roztoku trypanovej modrej (po pridaní dochádza ku zafarbeniu neživých buniek na modro). Následne sme pomocou Burkerovej komôrky a mikroskopu určili počet buniek. Po rozmrazení počiatočných $1 \cdot 10^6$ buniek sme po inkubácii dosiahli počet $3.22 \cdot 10^6$ v 7 ml. Pre potreby experimentu bolo potrebných 2500 buniek na jamku. Pomocou pasážovania sme dosiahli počet 2775 buniek v 200 µl. Pre účely ďalšieho spracovania sme pomocou pipety presunuli 1.2 ml bunkovej suspenzie (200 µl / jamku) do 60 prostredných jamiek na 96-jamkovej mikroplatničke. Pri kontrolnej mikroplatničke sme postupovali obdobne. Ako kontrolné sme využili rady D a E, pričom sme naplnili len stĺpce 5 až 8.

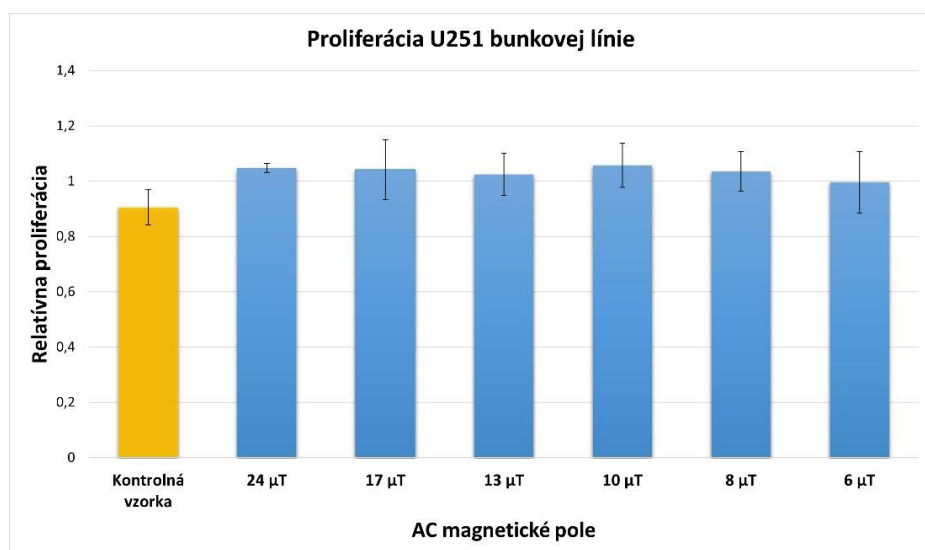
MTT test

Po expozícii buniek sme použili nami navrhnutý MTT test za účelom zistenia ich proliferácie. MTT (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5 difenyltetrazoliumbromid) test predstavuje účinnú metódu

určenú na meranie životaschopnosti buniek. Metóda je založená na prítomnosti mitochondriálnej aktivity životaschopných buniek. Táto aktivita sa prejavuje konverziou tetrazóliovej soli MTT na kryštály formazánu. Zvýšenie alebo zníženie počtu životaschopných buniek možno zistiť pomocou merania optickej hustoty formazánu [29]. Úvodný krok pozostával z výpočtu množstva reagentu, ktorý bude potrebný. V našom prípade sa jednalo o 50 µl reagentu na jednu jamku. Pri využiteľnej 96-jamkovej platničke, v ktorej sa bunky nachádzali len v 60 jamkách, bolo požadovaných 3 ml (0.05 ml·60 = 3 ml) činidla. V ďalšom kroku sme v Eppenderfovej skúmavke odvážili požadované množstvo MTT prášku (Sigma-Aldrich, (USA)). Bolo nevyhnutné dodržať pomer 1 mg na 1 ml, preto sme v tomto prípade odvážili 3 mg. MTT prášok sme rozpustili v predhriatom kultivačnom médiu DMEN (bez FBS) vo Falconovej skúmavke. Bolo potrebné zabrániť vystaveniu skúmavky s roztokom svetlu, pretože MTT je vysoko svetlocitlivý, čo sme dosiahli zabalením skúmavky hliníkovou fóliou. Po vytiahnutí mikroplatničky z inkubátora sme okamžite do každej jamky pridali 50 µl MTT reagentu ohriateho vo vodnom kúpeli. Platničku sme v nasledujúcom kroku inkubovali 3 h pri 37°C v inkubátore. Po presune mikroplatničky z inkubátora sme odstránili všetku tekutinu a pridali 150 µl DMSO (Centralchem) do každej jamky. V našom prípade sme spotrebovali 9 ml DMSO. Následne sme umiestnili mikroplatničku na miešačku po dobu 15 minút pri 550 otáčkach za minútu, pri 22 °C. Po aplikácii MTT protokolu bolo možné meranie optickej hustoty pri 540 nm a 690 nm. Pre správne zobrazenie výsledkov je potrebné odčítanie výsledkov optickej hustoty pri 690 nm od výsledkov optickej hustoty nameraných pri 540 nm.

Výsledky

V rámci rádiobiologického výskumu bolo doposiaľ skúmaných množstvo účinkov ionizujúceho, či neionizujúceho žiarenia na rôzne typy buniek pričom došlo k využívaniu veľkého množstva metód a postupov na ich analýzu. Súčasťou našej práce bolo zavedenie nových experimentálnych metód a následná analýza experimentálnych dát pomocou multimódovej čítačky Cytation 5.



Obr. 3 Expozícia buniek ľudského glioblastómu AC magnetickému poľu (3 – 26 Hz).

Meranie experimentálnych výsledkov bolo prevedené na U251 bunkovej línie ľudského glioblastómu. Výber expozičných parametrov aj buniek sa opieral o mnohé štúdie, ktoré sa zaoberali účinkami slabých elektromagnetických polí na bunkovú proliferáciu. Bolo zistených mnoho účinkov, či už inhibícia alebo stimulácia ich rastu, ktoré záviseli od typu buniek alebo podmienok expozície. Štúdium expozície buniek týmto magnetickým poliam je dôležité nielen pre jeho možné karcinogénne účinky, ale zohráva dôležitú úlohu pri možnosti jeho terapeutického využitia [30].

Po vystavení buniek ľudského glioblastómu nízkym magnetickým poliam v rozsahu 6 – 24 µT po dobu 24 hodín boli bunky ponechané v inkubátore po rovnakú dobu na sledovanie neskorých účinkov z ožiarovania. Následne sme aplikovali MTT test, z dôvodu určenia

životaschopnosti týchto buniek a teda dopadov žiarenia na tieto bunky. Bunky boli analyzované pomocou Cytation 5, pričom dochádzalo ku meraniu optickej hustoty exponovanej a kontrolnej vzorky pri vlnových dĺžkach 540 nm a 690 nm. Po nameraní hodnôt absorpcie pri 690 nm a 540 nm v oboch kontrolných aj exponovaných vzorkách, sme hodnoty od seba odčítali pre odstránenie možného príspevku pozadia, prípadne iných látok, kvôli zabezpečeniu presnejšieho merania životaschopnosti buniek. Na Obr. 3 môžeme vidieť graf proliferácie buniek U251 bunkovej línie vystavenej magnetickým poľiam od 6 μT do 24 μT po 24 hodinách. Tento graf zobrazuje výsledok jedného experimentu a jeho interpretáciu je potrebné brať len ako predbežnú. Avšak tieto výsledky môžu poskytnúť predstavu o možnom výsledku nasledujúcich troch experimentov. Na osi y je zobrazená relatívna proliferácia buniek, ktorá sa pohybovala v rozmedzí od 0 po 1.05. Na y osi sú vizualizované expozičné parametre (modré stĺpce) a kontrolná vzorka (žltý stĺpec). Z grafu vyplýva zvýšenie proliferácie buniek vystavených rôznym intenzitám striedavých magnetických poľí. Kontrolná vzorka slúžila ako referenčný bod na porovnanie s bunkami vystavenými magnetickým poľiam. Bunky, ktoré boli vystavené magnetickému poľu s hodnotami 24 μT a 17 μT , preukázali vyššiu proliferáciu v porovnaní s kontrolnou vzorkou a to až o 0.14. Proliferácia buniek vystavených 13 μT magnetickému poľu klesla, avšak stále dosahovala vyššie hodnoty, ako bunky v kontrolnej vzorke. Bunky vystavené 10 μT dosahovali najvyššiu proliferáciu a to až 1.05, zo všetkých hodnôt magnetického poľa. Stĺpce s hodnotami 8 μT a 6 μT dosahovali najnižšie hodnoty, avšak boli stále o 0.13 vyššie v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Všeobecne v našom prípade platilo, že po vystavení buniek nízkym magnetickým poľiam v rozsahu 6 – 24 μT po dobu 24 hodín došlo ku zvýšeniu ich proliferácie. Avšak zároveň sa zdá, že s klesajúcou intenzitou magnetického poľa dochádzalo k poklesu proliferácie nádorových buniek s výnimkou magnetického poľa s hodnotou 10 μT .

Záver

Výskum v oblasti rádiobiológie predstavuje kľúčovú úlohu pre lepšie porozumenie účinkov žiarenia na bunky a tkanivá v ľudskom organizme. Jeden z najdôležitejších aspektov tohto výskumu predstavuje vývoj a testovanie nových cytogenetických metód. Nové cytogenetické metódy sú nevyhnutné pre posúdenie a presné monitorovanie poškodenia prostredníctvom žiarenia.

V rámci našej práce sme popisali všeobecne využívané cytogenetické metódy ako napríklad karyotipizácia, in situ hybridizácia a prietoková cytometria. V nasledujúcej časti sme sa zaoberali vybranými cytogenetickými metódami využívanými v rádiobiologickom výskume: mikrojadrovým testom, kométovým testom, metódami detekcie apoptózy a metódami analýzy DNA opravných fokusov. Posledná časť detailne popisovala novo zavedený prístroj Cytation 5. Naše experimentálne merania pomocou novo zavedenej metódy boli vykonané na nádorových líniách U251 ľudského glioblastómu. Tieto bunky boli vystavené nízkofrekvenčnému magnetickému poľu pomocou expozičného systému, ktorý pozostával z dvoch ortogonálnych cievok. Hodnoty intenzity magnetického poľa sa pohybovali v rozmedzí od 24 μT do 6 μT s postupným inkrementom frekvencie od 3 – 26 Hz po dobu 24 hodín. Bunky boli ponechané na identickom mieste na sledovanie neskorých účinkov z ožiarovania ďalších 24 hodín. Na analýzu bola zvolená MTT metóda, pri ktorej

dochádzalo ku hodnoteniu proliferácie buniek. Po aplikácii MTT testu a meraní optickej hustoty pomocou Cytation 5 sme mohli sledovať zvýšenie proliferácie nádorových línií v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Na základe uskutočnenia len jedného experimentu však nie je možné vyvodit' žiadne závery, preto boli tieto dáta analyzované len ako predbežné. MTT test v spolupráci s Cytation 5 sa však preukázal ako účinná cytogenetická metóda, ktorá môže nájsť široké uplatnenie v rádiobiologickom výskume.

Referencie

- [1] Chial H. Cytogenetic Methods and Disease: Flow Cytometry, CGH, and FISH. [online]. Nature Education. 2008. <https://mphilemb.wordpress.com/wp-content/uploads/2020/04/cytogenetic-approaches-for-studying-human-disease.pdf>. Accessed November 15, 2023.
- [2] O'Connor C. Karyotyping for Chromosomal Abnormalities. [online]. Nature Education. 2008. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/karyotyping-for-chromosomal-abnormalities-298/>. Accessed October 16, 2023.
- [3] Lei T, Du S, Peng Z, Chen L. Multifaceted regulation and functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB repair. [online]. J Mol Med 50. 2022. Accessed November 1, 2023. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5145>
- [4] Rass E, Willaume S, Bertrand P. 53BP1: Keeping It under Control, Even at a Distance from DNA Damage. [online]. Genes. 2022,. Accessed November 1, 2023. <https://doi.org/10.3390/genes13122390>
- [5] Sršeň Š, Sršňová K. Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata. Martin, Slovakia : KD Osveta, 2005. 446. ISBN: 978-80-8063-185-7.
- [6] McKinnon K, M. Flow Cytometry: An Overview. [online]. Current protocols in immunology. 2018. Accessed November 21, 2023. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- [7] Picot J, Guerin C, Le Van Kim, C, Boulanger C. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. [online]. Cytotechnology. 2012. Accessed November 17, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>
- [8] Veselinyová D, Mašlanková J, Kalinová K, Mičková H, Mareková M, Rabajdová M. Selected In Situ Hybridization Methods: Principles and Application. [online]. Molecules. 2021. Accessed November 20, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules26133874>
- [9] Repiská V, Böhmer D, Braxatorisová T, Malová J. LEKÁRSKA BIOLÓGIA A GENETIKA 2. Bratislava, Slovakia : Univerzita Komenského v Bratislave, 2020. 135. ISBN 978-80-223-4929-1.
- [10] Shakoori R. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications. [online]. Chromosome Structure and Aberrations. 2017. Accessed November 20, 2023. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3_16
- [11] Imataka G, Arisaka O. Chromosome Analysis Using Spectral Karyotyping (SKY). [online]. Cell biochemistry and biophysics. 2011. Accessed November 20, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12013-011-9285-2>
- [12] Weiss M, Hermsen M, Meijer G, van Grieken N, Baak J, Kuipers E, et al. Comparative genomic hybridisation. [online]. Mol Pathol. 1999. <https://>

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC395705/pdf/520243.pdf Accessed November 22, 2023. <https://doi.org/10.1136/mp.52.5.243>
- [13] Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. [online]. International journal of molecular sciences. 2020. Accessed December 30, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- [14] Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. [online]. Frontiers in genetics. 2013. Accessed December 1, 2023. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
- [15] Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. [online]. Biophysical Chemistry. 2018. Accessed December 5, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.003>
- [16] Møller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milic M. et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. [online]. Nat Protoc. 2020. Accessed December 5, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0398-1>
- [17] Cordelli E, Bignami M, Pacchierotti F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. [online]. Toxicology research. 2021. Accessed December 5, 2023. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- [18] Guo M, Lu B, Gan J, Wang S, Jiang X, Li H. Apoptosis detection: a purpose-dependent approach selection. [online]. Cell cycle. 2021. Accessed December 10, 2023. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1919830>
- [19] Heisler-Taylor T, Kim B, Reese Y, Hamadmad S, Kusibati R, Fischer A, et al. A New Multichannel Method Quantitating TUNEL in Detached Photoreceptor Nuclei. [online]. Experimental eye research. 2018. Accessed December 15, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.06.028>
- [20] Engeland, M. Nielend L, Ramaekers C, Schutte B. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. [online]. Cytometry Part A. 1998. December 15, 2023. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R)
- [21] Figueroa-González G, Pérez-Plasencia C. Strategies for the evaluation of DNA damage and repair mechanisms in cancer. [online]. Oncology letters. 2017. Accessed December 15, 2023. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6002>
- [22] Zastko L, Račková A, Petrovičová P, Durdík M, Mišek J, Marková E, et al. Evaluation of Calyculin A Effect on γ H2AX/53BP1 Focus Formation and Apoptosis in Human Umbilical Cord Blood Lymphocytes. [online]. International journal of molecular sciences. 2021. Accessed November 6, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms22115470>
- [23] Importance of the Multimode Plate Reader in the Field of Scientific Research. [online]. 2023. <https://thejournalofmhealth.com/importance-of-the-multimode-plate-reader-in-the-field-of-scientific-research/>. Accessed December 20, 2023.
- [24] Cytation™ 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader. [online]. https://www.agilent.com/cs/library/Support/Documents/Sales/Agilent_BioTek_Cytation_5_brochure-final.pdf Accessed December 20, 2023.
- [25] From Basics to Mastery: A Comprehensive Guide to Annexin V Apoptosis Assay. [online]. <https://www.linkedin.com/pulse/from-basics-mastery-comprehensive-guide-annexin-v-apoptosis>. Accessed December 15, 2023.
- [26] Larson B, Banks P. Z-Stacking of Single Plane Digital. [online]. 2022. <https://www.bioprocessonline.com/doc/z-stacking-of-single-plane-digital-widefield-fluorescent-images-0001> Accessed January 10, 2024.
- [27] Agilent Technologies. Training Manual. [online]. 2022. https://cehs.unl.edu/cehs/BORC/Cytation10/Imaging_Training_Manual.pdf. Accessed January 20, 2024.
- [28] Makinistian L. A novel system of coils for magnetobiology research. [online]. Rev Sci Instrum. 2016. Accessed February 15, 2023. <https://doi.org/10.1063/1.4968200>
- [29] van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L., Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: Cree, I. (eds) Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology, vol 731. Humana Press. Accessed February 15, 2024. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- [30] Makinistian L, Marková E, Belyaev I. A high throughput screening system of coils for ELF magnetic fields experiments: proof of concept on the proliferation of cancer cell lines. [online]. BMC cancer. 2019. Accessed March 10, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5376-z>

Kontakt - Korešpondujúci autor:

RNDr. Lucián ZASTKO, PhD.
Fakulta zdravotníctva
Katolícka univerzita v Ružomberku
Námestie A. Hlinku 48
03401, Ružomberok
e-mail: lucian.zastko@ku.sk