

BADANIE DZIAŁANIA CYTOTOKSYCZNEGO SUBSTANCJI CHEMICZNYCH

CYTOTOXIC ASSAYS OF CHEMICAL SUBSTANCES

Janusz SKIERSKI

Pracownia Cytometrii Zakładu Biologii Komórki, Narodowy Instytut Leków,
Warszawa

Streszczenie: W pracy przedstawiono mechanizmy komórkowe procesu apoptozy i nekrozy oraz podstawowe metody badania ilościowego procesu apoptozy. Przedstawiono metody oceny apoptozy przy użyciu testu z diocetanem fluoresceiny (FDA/PI), Aneksyną V, testu PARP i testu TUNEL. Opisano szczegóły poszczególnych testów oraz zalety i wady poszczególnych metod, a także zasady ich stosowania.

Summary: The molecular aspects of the apoptotic and necrotic processes are presented in this paper. The basic methods of apoptosis assays (fluoresceine diacetate/Propidium iodide, Annexin V/PI, PARP cleavage test, and TUNEL test) are also presented in details.

Substancje cytotoksyczno-cytostatyczne (szczególnie leki onkologiczne) działają wielokierunkowo na żywą komórkę. Zaburzeniom może ulegać szereg szlaków metabolicznych, w tym szlaków produkcji związków wysokoenergetycznych. Innym bardzo istotnym czynnikiem jest wpływ tych leków na syntezę kwasów nukleinowych, szczególnie DNA i RNA oraz białek.

Odpowiedzią komórki na działanie czynnika cytotoksyczno-cytostatycznego może być jej zatrzymanie w cyklu życiowym bądź indukcja śmierci drogą apoptozy, lub – przy większym nasileniu działania tego czynnika – śmierć poprzez nekrozę.

Definicja śmierci komórki nastęrcza zasadnicze problemy. Niewątpliwie proces śmierci komórki kończy się ustaniem jej biologicznej aktywności. Komórki zatrzymane („uśpione”) w cyklu życiowym (w fazie G_0), mają aktywność biologiczną (biochemiczną) obniżoną w sposób odwracalny, natomiast zmiany towarzyszące śmierci komórki są odwracalne tylko do pewnego momentu. Z teoretycznego punktu widzenia można więc zdefiniować komórkę martwą jako taką, która osiągnęła lub przekroczyła ten punkt (*no-return point*). Określenie tego punktu jest jednak trudne w praktyce, gdyż proces umierania ma charakter ciągły, a nie skokowy. Nie występują

również charakterystyczne zjawiska, które mogłyby zdefiniować ten punkt. Wyczerpujący przegląd zjawisk zachodzących w komórce ulegającej śmierci w drodze apoptozy lub nekrozy oraz metody badania obu tych zjawisk przedstawiono w pracy Darzynkiewicza [2,5] i Majno [24].

APOPTOZA

Apoptoza jest procesem zaprogramowanym genetycznie i służącym do eliminacji komórek, które są w danym momencie zbędne, lub które zostały uszkodzone. Proces ten zachodzi w warunkach fizjologicznych, jak również w odpowiedzi na stress (np. wysiłek fizyczny [33]). Z morfologicznego punktu widzenia apoptoza charakteryzuje się postępującym odwodnieniem i obkurczaniem się komórki oraz kondensacją chromatyny, dobrze widoczną w mikroskopie fluorescencyjnym po wybarwieniu DNA (ryc. 1). Początkowo kondensacja ta nadaje chromatynie jądrowej kształt półksiężyca. Następnie zachodzi fragmentacja DNA i jądra komórkowego. W ostatnim stadium apoptozy fragmenty jądra z pewną liczbą organelli zostają otoczone błoną komórkową i tworzą ciała apoptotyczne. Interesujące jest, że ciało apoptotyczne zawiera tylko jeden rodzaj kwasu nukleinowego: RNA lub DNA [16]. W odróżnieniu od procesu nekrozy, cytoplazma oraz zawartość organelli komórki ulegającej apoptozie nie zostają uwolnione do przestrzeni międzykomórkowej, a ciała apoptotyczne zostają sfagocytowane przez otaczające komórki lub makrofagi. W procesie apoptozy nie dochodzi do naciekania tkanki przez granulocyty i makrofagi i tym samym do procesu zapalnego tej tkanki (przeciwnie niż w przypadku nekrozy komórek) [4,5]. Proces apoptozy podlega precyzyjnej regulacji, niezależnie od czynników indukujących ten proces. Istnieją „punkty kontrolne”, w których układy enzymatyczne komórki mogą zahamować proces apoptozy lub spowodować, że proces ten będzie biegł dalej, aż do destrukcji komórki. Zainteresowanie onkologów procesem apoptozy wynika m.in. z faktu, że ta droga śmierci komórki jest wyzwalana przez szereg substancji przeciwnowotworowych, promieniowanie jonizujące i hipertermię, a także dlatego, że odpowiedź apoptotyczna komórek nowotworowych jest modulowana przez szereg czynników, takich jak: ekspresja genów *bcl-2*, *bax*, *c-myc*, jak również genu *p53*. Apoptoza odgrywa istotną rolę w przebiegu szeregu chorób – odrzucaniu przeszczepów, chorobie „przeszczep przeciw gospodarzowi” (*graft versus host*), chorobach autoimmunizacyjnych, chorobie Hodgkina. Wiadomo również, że limfocyty T o fenotypie CD4⁺ ulegają apoptozie pod wpływem wirusa HIV [6].

Proces apoptozy może przebiegać dwiema drogami. Jedna z nich zaczyna się od receptorów na błonie komórkowej. W wyniku kolejnej aktywacji szeregu białek pośredniczących w przekazywaniu sygnału apoptotycznego, aktywacji ulegają enzymy zwane kaspazami. Działanie kaspaz doprowadza do degradacji DNA i ostatecznie do samozniszczenia komórki. Drugi szlak apoptozy zaczyna się od zmian w mitochondriach i prowadzi również do aktywacji kaspaz.

Jednym z sygnałów zewnątrzkomórkowych, wyzwalających proces apoptozy, jest ligand Fas (FasL), który wiąże się z błonowym receptorem Fas (CD-95). Ligand ten, należący do rodziny TNF (*tumor necrosis factor*), znajduje się na powierzchni aktywowanych limfocytów T i komórek NK. Innymi znanymi czynnikami

zewnątrzkomórkowymi, inicjującymi apoptozę są TNF, TRAIL, a także glikokortykoidy (szczególnie w odniesieniu do komórek immunokompetentnych). TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*), podobnie jak FasL, jest cytokiną z rodziny TNF i występuje między innymi na powierzchni krążących limfocytów i makrofagów [30]. Na powierzchni komórek występują receptory dla TRAIL, z których dwa – TRAIL-R1 i TRAIL-R2 zawierają tzw. domenę śmierci. Szereg białek transbłonowych pełni rolę receptorów dla czynnika TNF (np. TNF-R1 i TNF-R2). Do tej grupy receptorów należy również receptor Fas/APO-1. Interesujące jest, że receptory z grupy TNF uczestniczą zarówno w przekazywaniu sygnałów prowadzących do śmierci komórki, jak i do jej podziału [15]. Istotną cechą wyżej wymienionych receptorów jest obecność w ich strukturze charakterystycznej sekwencji 85-aminokwasowej, zwanej domeną śmierci. Domena ta bierze udział w tworzeniu kompleksów receptorów i w wiązaniu tych receptorów z białkami adaptorowymi, które również zawierają domenę śmierci. W szlaku apoptozy indukowanej przez receptory z grupy TNF białkami adaptorowymi są FADD i RIP (*receptor interacting protein*). Proces apoptozy, w którym uczestniczy FADD, nie może zostać zahamowany przez białko Bcl-2. Innym białkiem adaptorowym jest DAXX (*FAS death domain associated protein*). Wiąże się ono z domeną śmierci receptora Fas. Dalszy proces apoptozy może jednak być zablokowany przez białko Bcl-2. Z receptorem TNF-R1 wiążą się białka TRADD, TRAF-2 i FAN, z receptorem TNF-R2 - TRAF 1 i TRAF -2, natomiast z TRAIL-1 – białka TRADD, FADD i RIP. Szlak sygnałowy prowadzi dalej do grupy kaspaz inicjujących (kaspaza 2, 8, 9 i 10), które aktywują kaspazy wykonawcze (3, 6 i 7) [13,15].

Drugi szlak apoptozy (wewnątrzkomórkowy) rozpoczyna się w mitochondriach. Induktorami apoptozy są: promieniowanie UV [34], aktywacja białek hamujących wzrost nowotworów, np. białka p53, stres oksydacyjny, niedobór ATP (jeden z mechanizmów działania 2-CdA), obniżenie zawartości glutationu, czy też działanie wielu substancji chemioterapeutycznych. Silnymi induktorami apoptozy są również inhibitory transportu elektronów w mitochondriach, np. antymycyna A (AMA) [19]. Zablockowanie transportu elektronów powoduje spadek gradientu protonów na wewnętrznej błonie mitochondrialnej $\Delta\Psi_m$ i produkcję wolnych rodników tlenowych (ROS). Istotną rolę w przepuszczalności kanałów mitochondrialnych odgrywa stężenie jonów wapnia [11, 12, 25, 32]. Zmiany stężenia wapnia w komórkach wywołane induktorem apoptozy (Tri-n-butyliną) były badane przez Grundlera [14]. W wyniku otwarcia megakanałów, z mitochondriów z przestrzeni międzybłonowej wydostaje się do cytoplazmy wiele białek: cytochrom c, Smac/DIABLO (Smac: *second mitochondria-derived activator of caspases*, DIABLO: *direct IAP-binding protein with low pI*), AIF (*apoptosis inducing factor*) oraz różne prokaspazy. Uwolniony do cytoplazmy cytochrom c wraz z białkiem Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*) i ATP tworzy strukturę zwaną apoptosomem. Następuje oligomeryzacja białka Apaf-1 i przyłączenie szeregu cząsteczek prokaspazy-9. Następnie cząsteczki prokaspazy-9 ulegają samoaktywacji, a powstała w ten sposób nowa struktura jest aktywna katalitycznie przez dłuższy

czas. Podstawową rolą apoptosomu jest aktywacja kaspazy-3, zasadniczego enzymu wykonawczego procesu apoptozy. Skutkiem działania kaspaz jest proteoliza lamin jądrowych, histonów, białka PARP (polimeraza poli ADP-rybozy), topoizomera oraz innych białek w komórce. Nukleazy zależne od kaspaz degradują DNA na krótkie fragmenty o długości 180 par zasad, dające charakterystyczny obraz elektroforetyczny [15, 18]. Degradacja PARP jest obecnie wykorzystywana do ilościowego oznaczania apoptozy [21, 22]. W innym szlaku apoptozy bezpośrednio działają dwa białka mitochondrialne – czynnik AIF i endonukleaza G. Oba te białka migrują z mitochondriów do jądra komórkowego, gdzie zaaktywowana przez AIF endonukleaza G degraduje DNA. DNA-zy aktywowane przez kaspazy degradują DNA na mniejsze fragmenty, niż czyni to endonukleaza G. Interesujące jest, że ten sam induktor apoptozy, np. flawopirydol, może wyzwać śmierć apoptotyczną przez uwalnianie cytochromu c i aktywację kaspaz bądź przez uwalnianie czynnika AIF bez aktywacji kaspaz, w zależności od rodzaju komórek poddanych działaniu tego induktora [31].

Kluczową rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywają białka z rodziny Bcl-2 (nazwanej tak od białaczki B-komórkowej (*B-cell leukemia/lymphoma*)). Rodzina ta jest dzielona, ze względu na działanie, na podrodzinę Bcl-2 o działaniu antyapoptotycznym, (Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, Bcl-w) oraz dwie podrodziny o działaniu proapoptotycznym: podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) i podrodzinę BH3 (Bad, Bik, Bid). Białka z podrodziny Bcl-2 charakteryzują się obecnością specyficznej domeny umożliwiającej im zakotwiczenie się w błonach mitochondriów, siateczki śródplazmatycznej, aparatu Golgiego i w otoczce jądrowej. Pod wpływem bodźców apoptotycznych białka te przemieszczają się z cytoplazmy do mitochondriów i ulegają zmianom konformacyjnym umożliwiającym im oligomeryzację. Homodimer Bax:Bax zwiększa przepuszczalność wewnętrznej i zewnętrznej błony mitochondrialnej. Uważa się, że białka Bcl-2 i Bax zakotwiczone obok siebie w błonie mitochondrium odgrywają rolę w otwieraniu i zamykaniu megakanałów. Stwierdzono [22], że białko Bax, w zależności od stężenia może bądź powodować uwolnienie do cytoplazmy białek wewnątrzblonowych, w tym cytochromu c, bez trwałego obniżenia błonowego potencjału $\Delta\Psi_m$. Natomiast przy wyższych stężeniach (250 nM–1 μ M) białko Bax może długotrwale otwierać megakanał, co powoduje nieodwracalny spadek tego potencjału i degradację mitochondriów. Proces apoptozy jest regulowany przez równowagę dimerów białek z rodziny Bcl-2. Wiadomo jest, że homodimer Bcl 2:Bcl-2 działa silnie antyapoptotycznie, podczas gdy heterodimer Bcl-2:Bax ma działanie proapoptotyczne [8].

Zespół Darzynkiewicza [22] stwierdził, że aktywacja kaspaz, oceniana przez pomiar ilości fragmentów polimerazy poli-ADP-rybozy (PARP), jest niezależna w czasie od spadku potencjału błony mitochondrialnej, przynajmniej w przypadku komórek białaczki HL-60 i chłoniaka U-937. Stwierdzono również [7], że apoptoza komórek HL-60, indukowana staurosporyną, aktynomycyną D i etopozydem może zachodzić bez spadku potencjału $\Delta\Psi_m$ mitochondriów.

Gen *bcl-2* jest uważany za protoonkogen. W wielu nowotworach (np. chłoniakach nieziarniczych) stwierdza się translokację tego genu z chromosomu 18 na chromosom 14, czemu towarzyszy nadekspresja tego genu i nadprodukcja białka Bcl-2. Guzy lite, w których stwierdza się nadprodukcję Bcl-2, są odporne na chemio- i radioterapię [26–29]. Ekspresja genu *bcl-2* była badana przez Steube [36]. Stwierdził on, że komórki

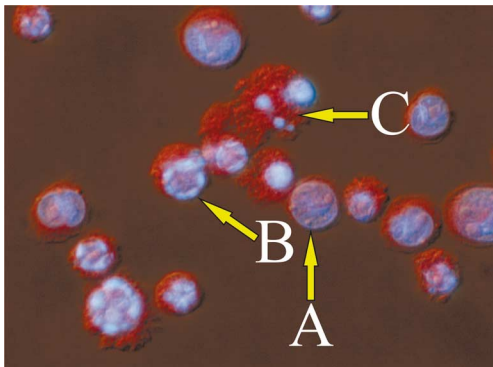
białaczki HL-60 zawierają znaczną ilość białka Bcl-2 i *bcl-2* m-RNA, natomiast komórki linii KG-1 – ilości znacznie mniejsze. W komórkach linii Jurkat nie wykryto białka Bcl-2, a zawartość m-RNA była niewielka. Wydaje się, że ekspresja genów (onkogenów) odpowiedzialnych za produkcję białek hamujących apoptozę (np. genu *bcl-2* [39]) jest przyczyną rozwoju wielu ludzkich nowotworów. Pełne poznanie kaskady zjawisk prowadzących do apoptotycznej śmierci komórki może w przyszłości doprowadzić do sterowania tym procesem w onkologii i innych dziedzinach medycyny [5].

NEKROZA

Nekroza jest procesem biernym, niezaprogramowanym genetycznie. Proces ten zachodzi w sytuacji, gdy czynnik toksyczny (chemiczny lub fizyczny) działa z tak dużym nasileniem, że komórka „nie ma czasu” na uruchomienie mechanizmów naprawczych lub uruchomienia kaskady zjawisk charakterystycznych dla apoptozy. Martwica jest procesem katabolicznym i degeneracyjnym. Charakteryzuje się ona początkowo obrzmieniem mitochondriów i innych organelli, a następnie pęknięciem błony cytoplazmatycznej i uwolnieniem do przestrzeni międzykomórkowej zawartości komórki wraz z enzymami proteolitycznymi. Chromatyna jądrowa ulega miejscowej kondensacji, a jądro komórkowe rozpadowi (karioliza). Procesowi nekrotycznemu towarzyszy naciekanie objętej tym procesem tkanki przez komórki żerne i następnie rozwinięcie się procesu zapalnego. Zejściem nekrozy jest powstanie blizny łącznotkankowej i upośledzenie funkcji narządu, w którym miała ona miejsce.

METODY BADANIA APOPTOZY I NEKROZY

Znanych jest szereg metod badania działania cytotoksycznego substancji chemicznych. Metody te opierają się na różnych efektach końcowych działania tych substancji. Niezależnie od zastosowanej metody występowanie lub brak występowania apoptozy wymaga potwierdzenia metodami mikroskopowymi (decyduje morfologia komórek) [3]. Na rycinie 1 przedstawiono mikrofotografię komórek chłoniaka U937 wykonaną przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX60 z optyką polaryzacyjno-interferencyjną. Komórki zostały wybarwione roztworem DAPI i sulforodaminą, co pozwoliło na uwidocznienie chromatyny. Komórka oznaczona „A” ma prawidłową morfologię. Komórka oznaczona „B” ma wyraźnie obkurczone jądro i charakterystycznie skondensowaną chromatynę w postaci „wianuszka”. W komórce oznaczonej literą „C” nastąpił rozpad jądra, a skupiska DNA zostaną następnie wyrzucone z komórki w postaci ciałek apoptotycznych. Między komórką A i B widać dwie komórki o różnym stopniu obkurczenia jądra i kondensacji chromatyny. Pokazane na tej rycinie zmiany morfologii komórek są jedynym pewnym dowodem zachodzenia apoptozy. Analogiczne obrazy można otrzymać używając dowolnego mikroskopu fluorescencyjnego ze wzbudzeniem w UV, niezależnie od optyki.



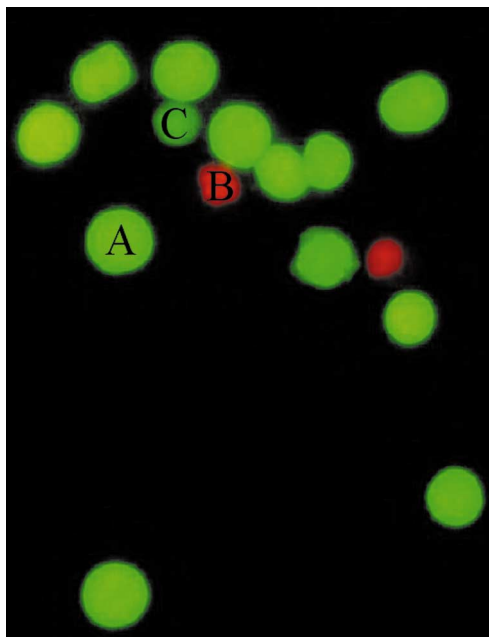
RYCINA 1. Mikrofotografia komórek U937 barwionych DAPI i sulforodaminą. Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60. Kontrast interferencyjno-polaryzacyjny + fluorescencja. Wzbudzenie fluorescencji w zakresie światła nadfioletowego z podświetleniem światłem białym. Komórka „A” – komórka o prawidłowej morfologii. Komórka „B” – komórka w dość wczesnej apoptozie (widoczne obkurczenie jądra komórkowego, kondensacja chromatyny). Między komórką „A” i „B” dwie komórki w późniejszych stadiach apoptozy (jeszcze bardziej obkurczone jądra, silniejsza kondensacja i zanik struktury chromatyny). Komórka „C” – dezintegracja jądra komórkowego, różnej wielkości skupiska chromatyny – późniejsze ciała apoptotyczne

Barwienie DAPI i sulforodaminą jest proste i szybkie. Polega ono na zmieszaniu na szkiełku podstawowym kropli zawiesiny komórek z kroplą roztworu DAPI + sulforodamina. Po ok. 5 minutach natężenie fluorescencji osiąga maksimum. Ze względu na obecność detergentów w roztworze DAPI do badania mogą być użyte komórki żywe. Niestety obserwacja mikroskopowa nie może służyć do ilościowej oceny odsetka komórek apoptotycznych, ze względu na zbyt małą liczbę komórek, które można w praktycznym czasie przeanalizować.

Jednym z często stosowanych testów jest badanie integralności błony komórkowej. W teście tym inkubuje się badane komórki z roztworem barwnika o dodatnim ładunku. Klasycznym przykładem jest szeroko stosowane oznaczanie odsetka komórek żywych przy użyciu błękitu trypanu (*trypan blue exclusion test*). Ten test zawdzięcza popularność swojej prostocie i nieskomplikowanej aparaturze potrzebnej do jego przeprowadzenia. Polega on na zmieszaniu zawiesiny badanych komórek z roztworem błękitu trypanu i natychmiastowym policzeniu pod mikroskopem (w czasie nie dłuższym niż 2 minuty) odsetka niebiesko zabarwionych komórek (martwych). Problemem jest prawidłowe zakwalifikowanie komórek bladoniebieskich. Należy tu jednak podkreślić, że test ten mierzy odsetek komórek nekrotycznych.

JODEK PROPIDYNY

Do przeprowadzenia testu z jodkiem propidyny (PI) konieczny jest mikroskop fluorescencyjny (ryc. 2) lub cytometr przepływowy. Jodek propidyny (PI) nie przenika przez nieuszkodzoną błonę komórkową. W przypadku naruszenia ciągłości błony komórkowej, PI wnika do wnętrza komórki barwiąc kwasy nukleinowe i powoduje, że po wzbudzeniu w świetle niebieskim komórka ta świeci na czerwono-pomarańczowo [40]. Wynik testu z PI jest bardziej jednoznaczny niż testu z błękitem trypanu, gdyż nie występują komórki „słabo barwiące się” PI. W obu wyżej omówionych testach, poprzez badanie integralności błony komórkowej, mierzy się odsetek komórek nekrotycznych. Na rycinie 2 (mikrofotografia z mikroskopu fluorescencyjnego) widać

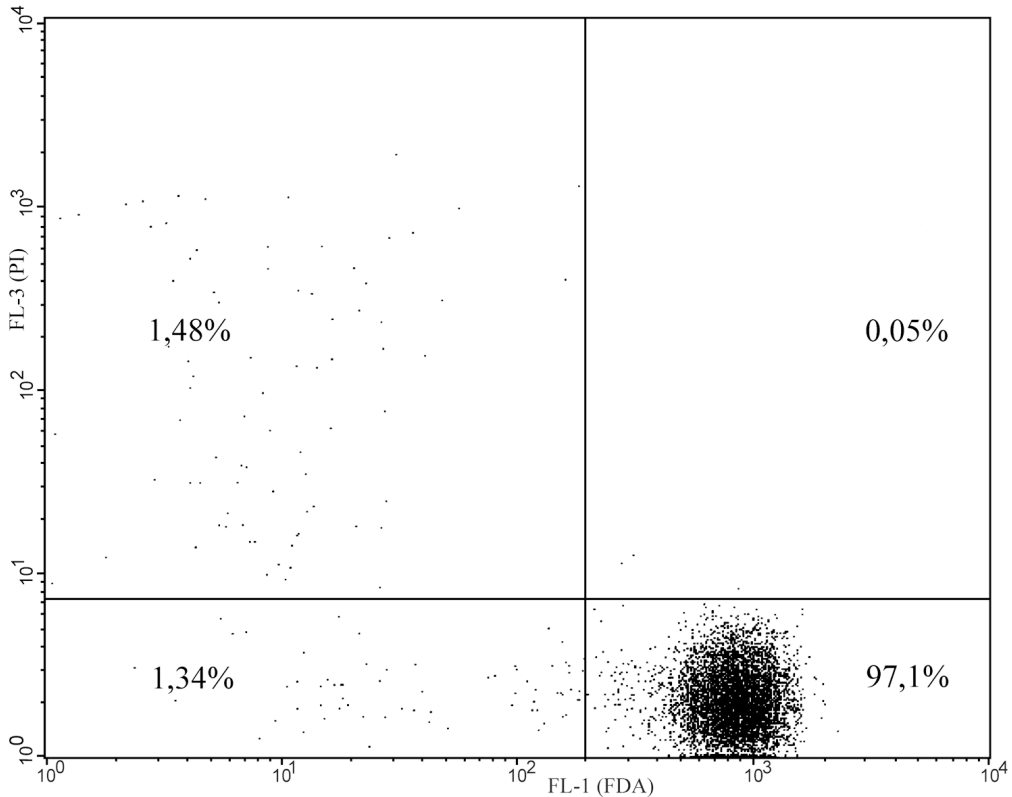


RYCINA 2. Mikrofotografia komórek białaczki barwionych diocctanem fluoresceiny i jodkiem propidyny (FDA/PI). Mikroskop fluorescencyjny Olympus BX60. Wzbudzenie fluorescencji światłem niebieskim. Komórka jasnozielona oznaczona „A” (i inne tej samej jasności fluorescencji zielonej) – żywa; komórka czerwona, oznaczona „B” – nekrotyczna; komórka bladezielona, oznaczona „C” /0 apoptotyczna. Komórki oznaczone „B”, nekrotyczne, barwią się w teście z błękitem trypanu na niebiesko

komórki żywe (komórka „A”), komórki we wczesnej apoptozie, bladezielone (komórka „C”) i nekrotyczne, czerwone (komórka „B”).

DIOCTAN FLUORESCEINY/JODEK PROPIDYNY (FDA/PI)

W teście z diocctanem fluoresceiny (FDA) i jodkiem propidyny (FDA /PI) [17] wykorzystuje się lipofilność FDA. Substancja ta swobodnie przechodzi przez nienaruszoną błonę komórkową. W żywej komórce ulega ona rozkładowi przez esterazy cytoplazmatyczne do fluoresceiny (substancji o właściwościach lipofobowych), która gromadzi się w cytoplazmie. Fluoresceina, w odróżnieniu od FDA jest związkami fluoryzującym. W mieszaninie inkubacyjnej znajduje się zarówno FDA, jak i PI, tak więc można rozróżnić trzy populacje: a) komórki barwiące się na zielono fluoresceiną („żywe”), b) niebarwiące się lub słabo barwiące się fluoresceiną i niebarwiące się PI (martwe apoptotyczne) i c) barwiące się na czerwono jodkiem propidyny i niebarwiące się fluoresceiną (martwe nekrotyczne) (ryc. 2). Komórki ulegające apoptozie wykazują słabsze działanie esteraz i, co za tym idzie, słabszą zieloną fluorescencję. Ryciny 3 i 4 przedstawiają wyniki pomiaru przeżywalności dwóch populacji komórkowych – kontrolnej (ryc. 3) i poddanej działaniu substancji o właściwościach cytotoksycznych (ryc. 4). Interpretując, uzyskane przy użyciu testu FDA/PI, wyniki należy pamiętać, że nie jest właściwe nazywanie komórek w kwadrancie dolnym lewym „komórkami apoptotycznymi”, gdyż zmniejszenie aktywności esteraz nie jest cechą charakterystyczną dla apoptozy. Analizując więc wyniki przedstawione na rycinach 3 i 4 należy powiedzieć: „przeżywalność badanych



RYCINA 3. Test FDA/PI. Wynik badania w cytometrze przepływowym. Populacja prawidłowo rosnąca. Oś odciętych – natężenie fluorescencji fluoresceiny, oś rzędnych – natężenie fluorescencji jodku propidyny. Kwadrant dolny prawy – komórki żywe (97%). Kwadrant górny lewy – komórki nekrotyczne (1,5%). Kwadrant dolny lewy – komórki prawdopodobnie apoptotyczne (1,3%)

komórek zmniejszyła się z 97,1% do 34,9%”. Innymi słowy analizujemy jedynie odsetek komórek w prawym dolnym kwadrancie. Porównując wyniki uzyskane przy użyciu metody błękitu trypanu, samego PI i metody FDA/PI można powiedzieć, że odsetek komórek żywych mierzony metodą FDA/PI jest z reguły nieco niższy niż przy użyciu pozostałych metod, gdyż mierzony jest zarówno odsetek komórek nekrotycznych, jak i apoptotycznych.

Odczynniki i przebieg barwienia

Roztwór zapasowy FDA: 0,5 mg/ml FDA w acetonie lub DMSO

Roztwór roboczy FDA: 4 μ l roztworu zapasowego FDA + 10 ml PBS

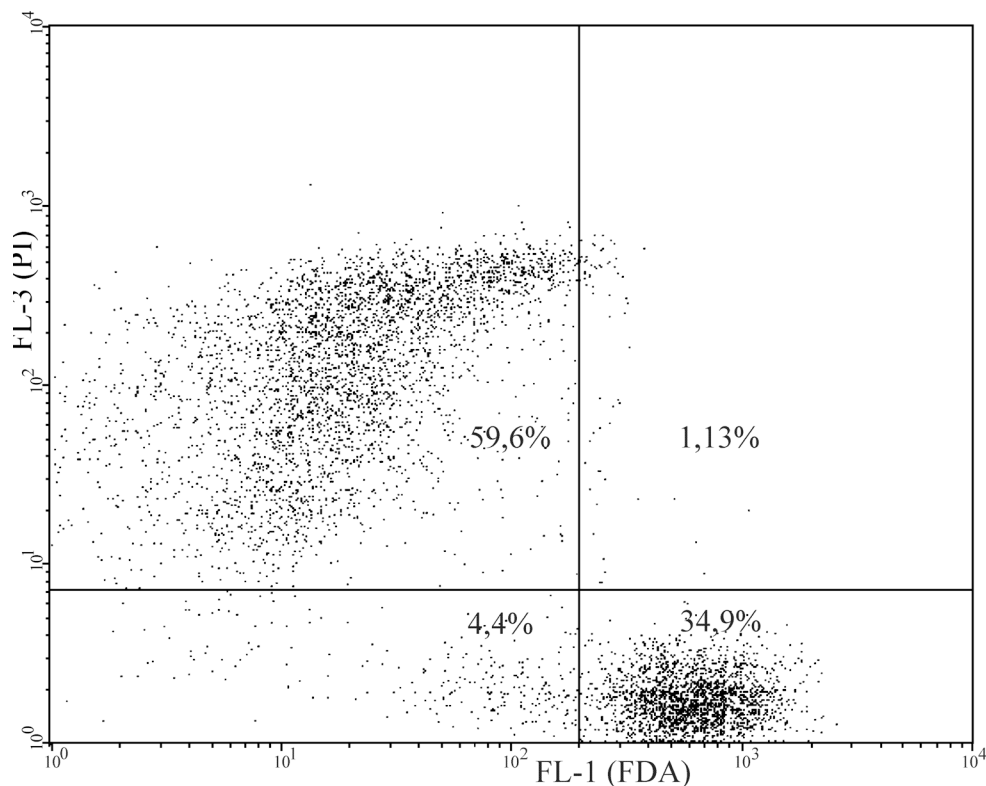
Roztwór roboczy PI: 1 mg PI rozpuścić w 50 ml PBS

UWAGA! roztwór roboczy FDA przygotowywać za każdym razem na świeżo, nie przechowywać. Roztwór zapasowy FDA i roboczy PI są trwałe przez ok. 6 miesięcy w ciemności i w lodówce.

Przebieg barwienia

1. Uzyskać zawiesinę komórek w HBSS lub PBS.

2. Pobrać 0,2 ml tej zawiesiny do probówki pomiarowej (ok. $2 \cdot 10^5$ komórek).

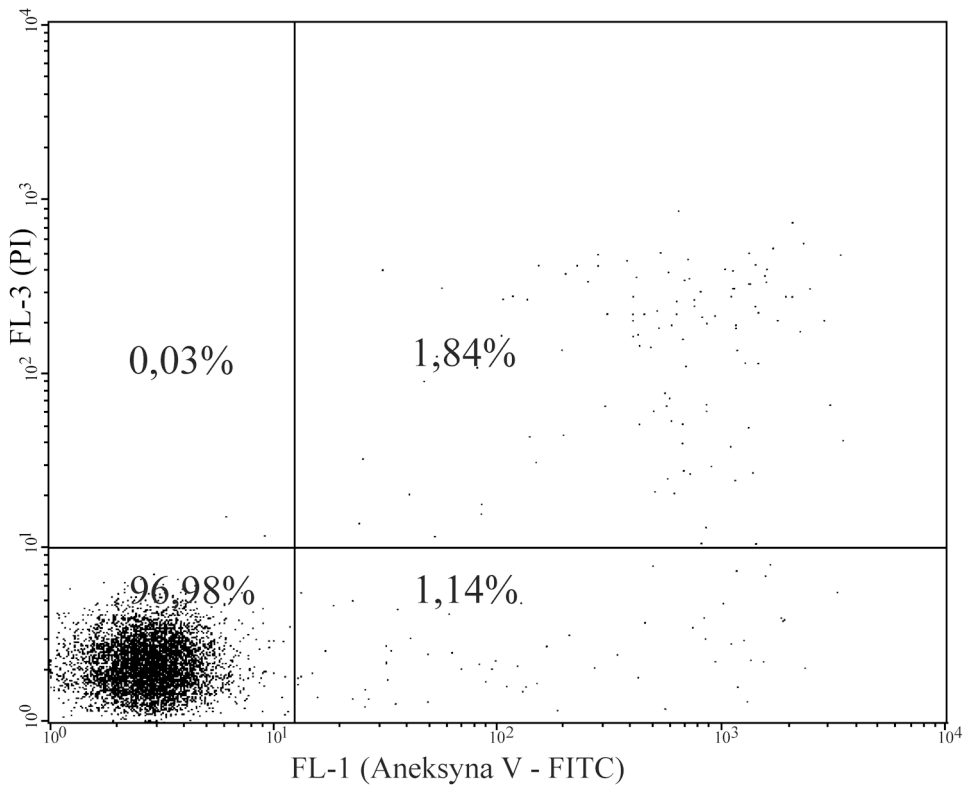


RYCINA 4. Test FDA/PI. Wynik badania w cytometrze przepływowym. Populacja traktowana substancją cytotoksyczną. Oś odciętych – natężenie fluorescencji fluoresceiny, oś rzędnych – natężenie fluorescencji jodku propidyny. Kwadrant dolny prawy – komórki żywe (34,9%). Kwadrant górny lewy – komórki nekrotyczne (59,6%). Kwadrant dolny lewy – komórki prawdopodobnie apoptotyczne (4,4%)

3. Dodać 0,1 ml roztworu roboczego (0,02 μg) FDA i 0,03 ml (0,6 μg) PI.
4. Inkubować 3 min w temperaturze pokojowej i następnie umieścić probówki na lodzie.
5. Mierzyć fluorescencję w ciągu godziny.
6. Wysokie napięcie fotonowielacza FL1 zmniejszyć w razie potrzeby tak, aby klaster komórek żywych znajdował się w okolicach wartości 10^3 lub między 10^3 i 10^4 (w czwartej dekadzie).
7. Krzyż kwadrantu ustawić tak, aby granice kwadrantu prawego dolnego obejmowały symetrycznie od lewej i górnej strony klaster komórek. Populacja kontrolna (komórki nietraktowane żadnym czynnikiem toksycznym) powinna charakteryzować się przeżywalnością w granicach 95% (wartość statystyki w kwadrancie LR).

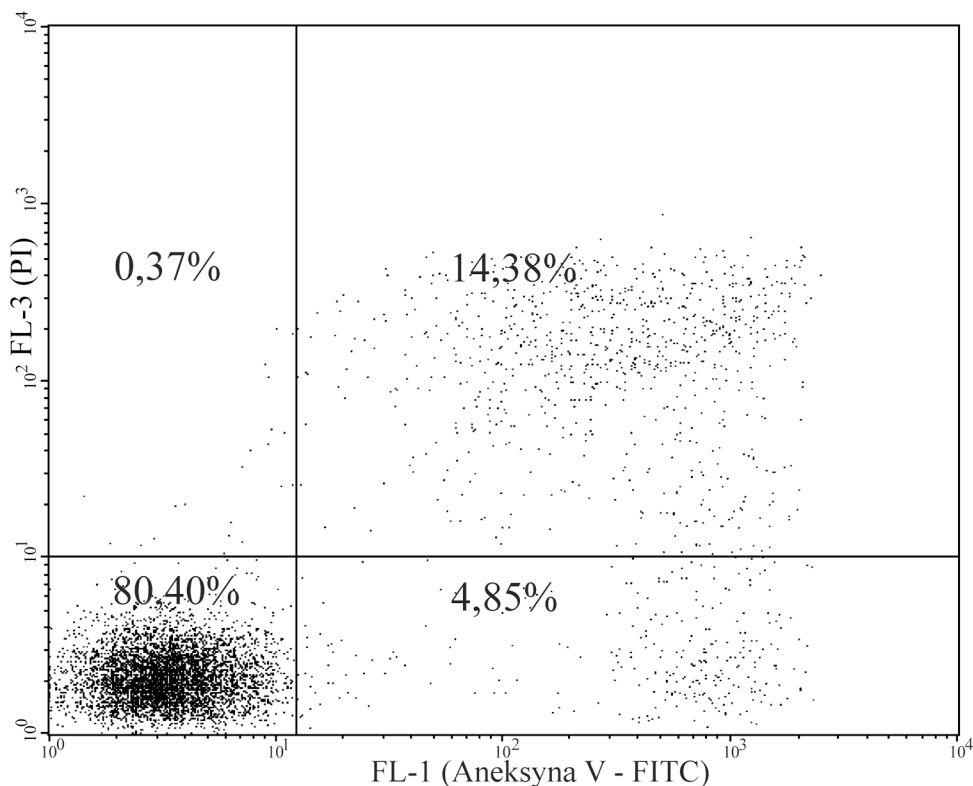
ANEKSYNA V/PI

Komórki nienarażone na działanie czynników toksycznych wykazują asymetrię błony komórkowej. Asymetria ta polega na tym, że cząsteczki fosfatydyloseryny znajdują się wyłącznie na wewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Jednym z



RYCINA 5. Test z aneksyną V i PI. Wynik badania w cytometrze przepływowym. Populacja kontrolna. Oś odciętych – natężenie fluorescencji FITC związanej z aneksyną V, oś rzędnych – natężenie fluorescencji jodku propidyny. Kwadrant dolny lewy (LL) – komórki żywe (96,98%). Kwadrant górny lewy (UL) – komórki nekrotyczne (0,03%). Kwadrant dolny prawy (LR) – komórki we wczesnej apoptozie (1,14%). Kwadrant górny prawy (UR) – komórki w późnej apoptozie (1,84%)

pierwszych etapów procesu programowanej śmierci komórki (apoptozy) jest wydostawanie się tych cząsteczek na zewnętrzną stronę błony. Aneksyna V (związana chemicznie z tioizocyjanianem fluoresceiny – FITC) jest białkiem, które w obecności jonów wapnia wiąże się specyficznym z fosfatydyloseryną, pozwalając na detekcję wczesnych etapów apoptozy. Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej jodku propidyny pozwala jednocześnie badać integralność błony komórkowej. W wyniku testu możemy więc rozróżnić 4 populacje komórek: niebarwiące się żadnym z odczynników (żywe), kwadrant dolny lewy; barwiące się jedynie jodkiem propidyny (komórki nekrotyczne), kwadrant górny lewy; barwiące się w różnym stopniu aneksyną V (komórki apoptotyczne w różnych, początkowych stadiach apoptozy), kwadrant dolny prawy i wreszcie komórki barwiące się jednocześnie oboma odczynnikami (komórki w stadium późnej apoptozy), kwadrant górny prawy (ryc. 5 i 6) [1, 20]. W szczególności możliwość odróżnienia komórek obumierających drogą apoptozy od komórek obumierających w wyniku nekrozy ma duże znaczenie praktyczne.



RYCINA 6. Test z aneksyną V i PI. Wynik badania w cytometrze przepływowym. Populacja inkubowana z substancją cytotoksyczną. Oś odciętych – natężenie fluorescencji FITC związanej z aneksyną V, oś rzędnych – natężenie fluorescencji jodku propidyny. Kwadrant dolny lewy (LL) – komórki żywe (80,4%). Kwadrant górny lewy (UL) – komórki nekrotyczne (0,37%). Kwadrant dolny prawy (LR) – komórki we wczesnej apoptozie (4,85%). Kwadrant górny prawy (UR) – komórki w późnej apoptozie (14,38%)

Do barwienia komórek Aneksyną V i jodkiem propidyny służą zwykle gotowe zestawy, zawierające wszystkie potrzebne odczynniki, jakkolwiek jest możliwe zakupienie samej Aneksyny V znakowanej FITC, jodku propidyny i sporządzenie buforów.

Autor używa najczęściej zestawu zwanego „Annexin-V FITC Apoptosis Kit” firmy BioSource Int. W skład tego zestawu wchodzi rekombinowana Aneksyna V skoniugowana z FITC w buforze Tris z BSA i azydkiem sodu, bufor zawierający jodek propidyny (50 µg/ml) i bufor wiążący oparty na HEPES z dodatkiem NaCl i CaCl₂ (można również użyć PBS z wapniem i magnezem).

Proces barwienia przebiega następująco:

1. Badane komórki przepłukać dwukrotnie PBS i zawiesić w stężeniu $2-3 \cdot 10^6$ komórek/ml w buforze wiążącym.
2. Odpipetować 100 µl zawiesiny do próbki pomiarowej.
3. Do każdej próbki dodać 5 µl roztworu Aneksyny V i 10 µl roztworu PI.
4. Inkubować w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
5. Dodać do każdej próbki 400 µl buforu wiążącego.

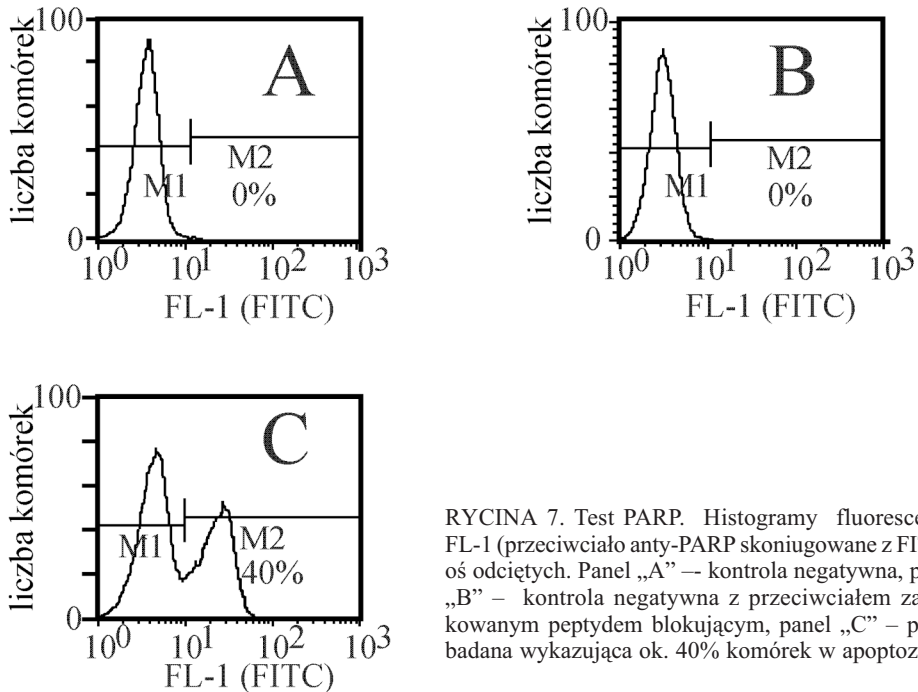
6. Mierzyć fluorescencję w kanałach FL1- i FL-3 natychmiast, nie później jednak niż w ciągu 1 godziny od zakończenia procesu barwienia.

METODA PARP

Inną metodą badania apoptozy jest detekcja specyficznych białek enzymatycznych zaangażowanych w procesie apoptozy – kaspaz (proteazy cysteinowe). Kaspazy są syntezowane w komórce w nieaktywnej postaci proenzymów i następnie po zapoczątkowaniu apoptozy ulegają bądź autoproteolizie, bądź proteolizie pod wpływem innych kaspaz. Aktywne formy enzymów degradują lub aktywują szereg białek cytoplazmatycznych lub jądrowych, w tym PARP, D4-GDI, DFF, MEKK i inne. Wytworzenie przeciwciał monoklonalnych przeciwko aktywnej kaspazie-3 pozwala na wykrywanie aktywnego procesu apoptozy w późniejszych jego stadiach. Doświadczenie autora z wykorzystaniem tych przeciwciał jest jednak negatywne. Ostatnio pojawiły się prace wykorzystujące fluoryzujące (po rozcięciu przez aktywną kaspazę) peptydy o sekwencji podobnej do PARP (polimerazy poli-ADP-rybozy) – naturalnego substratu kaspazy 3 [37], a także wykorzystujące specyficzne, fluoryzujące inhibitory kaspaz – FLICA (*fluorochrome-labelled inhibitors of caspases*) [21, 22, 35]. Dostępne są również przeciwciała monoklonalne rozpoznające odcięty fragment białka PARP. Te ostatnie są dostępne w postaci zestawu (np. *Anti-PARP CSSA FITC apoptosis detection kit* firmy BioSource). W zestawie tym jest: królicze przeciwciało poliklonalne rozpoznające miejsce rozcięcia PARP (*anti-PARP cleavage site specific antibody*), roztwór zawierający BSA i azydek sodu; roztwór paraformaldehydu do utrwalenia komórek; roztwór permeabilizujący błonę komórkową, zawierający saponinę; peptyd (o sekwencji rozciętego PARP) blokujący reakcję wiązania antygen-przeciwciała (kontrola negatywna).

Barwienie przebiega następująco:

1. Uzyskać zawiesinę badanych komórek. W przypadku komórek rosnących na powierzchni użyć do ich oderwania od powierzchni naczynia hodowlanego 2 mM EDTA (nie trypsyny).
2. Wirować komórki przy 300 g przez 5 minut.
3. Utrwalić osad komórek w paraformaldehydzie (20 minut w 4°C).
4. Zwirować komórki i przepłukać dwukrotnie PBS.
5. Zawiesić komórki w buforze permeabilizującym i doprowadzić do stężenia $1 \cdot 10^6$ komórek na 50 μ l zawiesiny (ok. 20 milionów komórek na mililitr!).
6. Odpipetować po 50 μ l zawiesiny do probówek pomiarowych.
7. Dodać po 10 μ l przeciwciała do każdej próbówki i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej.
8. Dwukrotnie przepłukać komórki 2 ml buforu permeabilizującego.
9. Przepłukać w PBS i zawiesić komórki w 0,5 ml PBS.
10. Kontrola negatywna: zamiast dodania przeciwciała (punkt 7) zmieszać 10 μ l tego przeciwciała z 10 μ l peptydu blokującego, inkubować nieco dłużej niż 30 minut w temperaturze pokojowej i następnie dodać całe 20 μ l do zawiesiny komórek i inkubować 30 minut w temperaturze pokojowej. Dalsze czynności (punkty 8 i 9) – jak wyżej.



11. Mierzyć fluorescencję w kanale FL-1 (zielona fluorescencja FITC).

Na rycinie 7 przedstawiono przykładowe wyniki oznaczenia – rycina pochodzi z ulotki firmy BioSource. Panel A przedstawia histogram fluorescencji FITC (FL-1), z którą związane jest przeciwciało anti-PARP. Na histogramie ustawia się dwa regiony (M1 i M2), przylegające do siebie. Region M1 obejmuje tło (w tym autofluorescencję) i sięga od 10^0 do ok. 10^1 . Odsetek komórek w regionie M2 powinna wynosić od 0 do 5% dla prawidłowo rosnącej populacji komórek. Panel B przedstawia kontrolę negatywną z przeciwciałem anti-PARP zablokowanym specyficznym peptydem (patrz punkt 10 powyżej). Metoda PARP jest czuła, precyzyjna i swoista i jest często stosowana przez autora.

TUNEL

Jedną z istotnych cech późniejszych stadiów apoptozy jest fragmentacja DNA przez jądrowe endonukleazy. Stwierdzenie tego zjawiska jest możliwe dzięki istnieniu szeregu testów. Jednym z nich jest opisana przez Darżynkiewicza [4, 5, 6] elucja drobnocząsteczkowego DNA w buforze cytrynianowym. Po inkubacji w tym buforze, komórki apoptotyczne cechują się niższą niż charakterystyczna dla fazy G_1 zawartością DNA i znajdują się na histogramach DNA w regionie sub-diploidalnym (sub- G_1). Podobny wynik można otrzymać znakując DNA dowolnym, specyficznym barwnikiem (np. DAPI) i mierząc zawartość DNA w komórkach bez uprzedniej

elucji DNA. Odsetek komórek w zakresie poniżej piku G_1 na histogramie przedstawiającym profil DNA może również służyć jako orientacyjny wskaźnik cytotoxyczności. Test ten nie może jednak służyć do oceny ilościowej. Należy bowiem pamiętać, że komórki mające zawartość DNA poniżej 10% zawartości komórek w fazie G_1 są ciałkami apoptotycznymi! Innym testem jest elektroforeza żelowa DNA (w żelu agarozowym), która pozwala na stwierdzenie obecności niskocząsteczkowych (o długości ok. 300 par zasad) fragmentów. Metoda ta jest jednak trudna do ilościowej analizy. Obecność fragmentów DNA (pęknięć nici) można również stwierdzić przy użyciu metody zwanej TUNEL [2, 9, 10, 23]. Polega ona na dołączaniu nukleozydów (bromodeoksy-urydynotrifosforanu, deoksyurydynotrifosforanu lub innych) do wolnych końców 3'-OH podwójnej lub pojedynczej nici DNA przez enzym TdT (końcową transferazę deoksynukleozydów). Trifosforany nukleozydów zostają wbudowane do nici DNA w miejscach jej pęknięć, a przeciwciało przeciwko dołączanemu nukleozydowi, skoniugowane z fluorochromem, pozwala na ilościową ocenę stopnia degradacji DNA. Zestawy do metody TUNEL są dostępne komercyjnie (np. APO-BrdU Kit, BD Pharmingen).

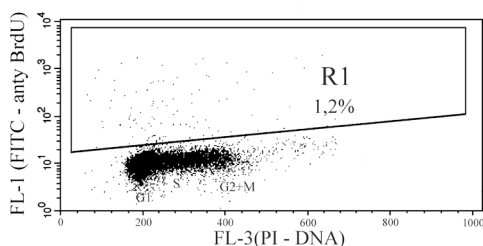
Powyższy zestaw zawiera: przeciwciało monoklonalne anty-BrdU znakowane FITC; bufor barwiący z PI i RNA-zą; bufor reakcyjny zawierający kwas kakodylowy; bufor do płukania; bufor „myjący”. W osobnym opakowaniu, przesyłanym w temperaturze -80°C (w suchym lodzie), znajduje się Br-dUTP; utrwalone komórki kontroli negatywnej; utrwalone komórki do kontroli pozytywnej; enzym TdT.

Barwienie przebiega następująco:

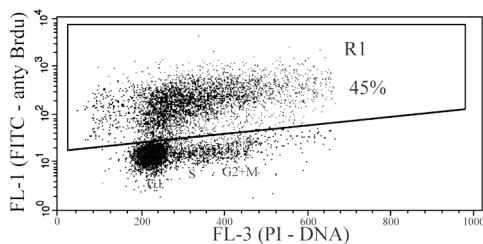
1. Komórki powinny być uprzednio utrwalone w paraformaldehydzie i przechowywane w 70% alkoholu etylowym w -20°C .
2. Zwirować komórki (300 g, 5 min), odrzucić etanol.
3. Dwukrotnie zawiesić osad w 1 ml buforu myjącego, zwirować i odessać supernatant.
4. Zawiesić ok. 10^6 komórek w 50 μl roztworu znakującego DNA (przygotowanego *ex tempore* z odczynników zawartych w zestawie (bufor reakcyjny, enzym TdT, Br-dUTP, woda destylowana).
5. Inkubować w 37°C przez 60 min, w łaźni wodnej, potrząsając co 15 minut.
6. Dodać 1 ml buforu płuczającego, zwirować (300 g, 5 min).
7. Powtórzyć płukanie.
8. Zawiesić osad komórek w 0,1 ml roztworu przeciwciała anty-BrdU i inkubować w ciemności, w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
9. Dodać 0,5 ml buforu barwiącego zawierającego PI i RNA-zę; inkubować następne 30 minut w ciemności i w temperaturze pokojowej.
10. Mierzyć fluorescencję. Natężenie fluorescencji zielonej FITC (FL-1) jest zależne od liczby pęknięć nici DNA, natomiast wartości natężenia światła w kanale FL-3 (jodek propidyny, wzmocnienie liniowe!!!) daje obraz cyklu komórkowego. To podwójne barwienie pozwala na stwierdzenie istnienia (lub nieistnienia) współzależności śmierci komórek i fazy cyklu komórkowego.

Ryciny 8 i 9 przedstawiają cytogramy komórek kontrolnych (ryc. 8) i komórek traktowanych substancją cytotoxyczną (ryc. 9), niewykazującą specyfiki w stosunku do fazy cyklu komórkowego. Na obu rycinach naniesiono opisy faz cyklu komórkowego (fazy G_1 , S i G_2 +M).

Dobór zastosowanej metody zależy od wielu czynników. Pamiętać należy, że wynik negatywny uzyskany którąkolwiek metodą jest bez wartości, natomiast wynik pozytywny świadczy o występowaniu w danej próbce apoptozy. Jedyną metodą „pewną” jest stwierdzenie lub nie stwierdzenie w próbce wybarwionej barwnikiem DNA (PI lub DAPI), w mikroskopie fluorescencyjnym, charakterystycznych zmian morfologicznych w komórce – obkurczenia komórki, obkurczenia jądra komórkowego i charakterystycznej kondensacji chromatyny i wreszcie tworzenia się ciałek apoptotycznych (ryc. 1). W praktyce autora badanie wpływu cytotoksycznego substancji chemicznych rozpoczynamy od najprostszego i najtańszego testu z FDA/PI. Następnie stosujemy test z Aneksyną V i PI i w wybranych przypadkach test



RYCINA 8. Test TUNEL. Cytogram FL-1/FL-3. Oś odciętych – natężenie fluorescencji jodku propidyny (FL-3) – zawartość DNA; oś rzędnych – natężenie fluorescencji FITC (FL-1) – ilość pęknięć nici DNA. Region R1 zawiera komórki w późnej apoptozie. Populacja kontrolna (ok. 1% komórek w apoptozie). Na osi odciętych zaznaczono fazy cyklu komórkowego. W kanale ~200 – faza G_1 , dalej faza S, w kanale ok. 400 fazy G_2 i M. Należy zwrócić uwagę, że wzmocnienie fluorescencji FL-3 jest liniowe!



RYCINA 9. Test TUNEL. Cytogram FL-1/FL-3. Oś odciętych – natężenie fluorescencji jodku propidyny (FL-3) – zawartość DNA; oś rzędnych – natężenie fluorescencji FITC (FL-1) – ilość pęknięć nici DNA. Region R1 zawiera komórki w późnej apoptozie. Populacja traktowana substancją cytotoksyczną (ok. 45% komórek w apoptozie). Na osi odciętych zaznaczono fazy cyklu komórkowego. W kanale ~200 – faza G_1 , dalej faza S, w kanale ok. 400 fazy G_2 i M. Należy zwrócić uwagę, że wzmocnienie fluorescencji FL-3 jest liniowe!

PARP. Dla potwierdzenia późnej apoptozy stosujemy TUNEL, który jest najbardziej pracochłonny i kosztowny. Inne metody – jak badanie potencjału błony mitochondrialnej lub badanie zawartości aktywnej kaspazy 3 przy użyciu specyficznego przeciwciała nie są w naszej Pracowni w rutynowym użyciu.

Na zakończenie należy dodać uwagę na temat planowania doświadczenia. Czas trwania ekspozycji komórek na substancję cytotoksyczną powinien być co najmniej równy rzeczywistemu czasowi podwojenia populacji (czasowi trwania cyklu komórkowego). W przypadku działania przez czas krótszy, szczególnie jeżeli badana substancja działa w określonej fazie cyklu komórkowego (np. pochodne nukleozydów działają w fazie S), nie wszystkie komórki są poddane temu działaniu i wyniki ilościowe mogą być niepoprawne. Wiele cennych uwag na ten temat znajdzie czytelnik w fundamentalnej pracy Franka Traganosa [38], a w szczególności rozważania dotyczące określania czasu trwania cyklu komórkowego i poszczególnych jego faz (tzw. metoda statmokinetyczna opracowana przez Darżynkiewicza) [38, str. 289].

LITERATURA

- [1] CLODI K, KLICHE KO, ZHAO S, WEIDNER D, SCHENK T, CONSOLI U, JIANG S, SNELL V, ANDREEF M. Cell-Surface Exposure of Phosphatidylserine Correlates With the Stage of Fludarabine-Induced Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia and Expression of Apoptosis-Regulating Genes. *Cytometry* 2000; **40**: 19–25.
- [2] DARZYNKIEWICZ Z, BEDNER E, TRAGANOS F. Difficulties and pitfalls in analysis of apoptosis. w: *Methods in Cell Biology. Cytometry. Tom 63, wyd. 3. 2001.* [red.] Z. Darzynkiewicz, HA Crissman, J.P. Robinson. Academic Press.
- [3] DARZYNKIEWICZ Z, BRUNO S, DEL BINO G, GORCZYCA W, HOTZ MA, LASSOTA P, TRAGANOS F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; **13**: 795–808.
- [4] DARZYNKIEWICZ Z, GORCZYCA W, ARDELT B, HALICKA D, JUAN G, TRAGANOS F. Cytometria apoptozy i martwicy. *Central Eur J Immunol* 1996; **21**: S156–S170.
- [5] DARZYNKIEWICZ Z, JUAN G, XUN LI, GORCZYCA W, MURAKAMI T, TRAGANOS F. Cytometry in Cell Necrobiology: Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Necrosis). *Cytometry* **27**: 1 - 20, 1997.
- [6] DARZYNKIEWICZ Z, XUN LI, GONG J. Assays of Cell Viability: Discrimination of cells Dying by Apoptosis. W: *Methods in Cell Biology.* [red.] Z. Darzynkiewicz, J. P. Robinson, H.A. Crissman. Academic Press, San Diego, 1994; **41**: 16–39.
- [7] FINUCANE DM, WATERHOUSE NJ, AMARANTE-MENDES GP, COTTER T, GREEN DG. Collapse of the inner mitochondrial transmembrane potential is not required for apoptosis of HL60 cells. *Exp Cell Res* 1999; **251**: 166–174.
- [8] GODLEWSKI MM, MOTYL MA, GAJKOWSKA B, WARĘSKI P, KORONKIEWICZ M, MOTYL T. Subcellular redistribution of BAX during apoptosis induced by anticancer drugs. *AntiCancer Drugs* 2001; **12**: 607–617.
- [9] GORCZYCA W, BRUNO S, DARZYNKIEWICZ R, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1992; **1**: 639– 648.
- [10] GORCZYCA W, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; **52**: 1945–1951.
- [11] GRĄDZKA I. Apoptoza: decyzja należy do mitochondrium. *Post Bioch* 2000; **46**: 2–16.
- [12] GREEN DR, REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309–1312,
- [13] GRUBER BM. Samobójcza śmierć komórek – mechanizm i rola w powstawaniu i leczeniu chorób człowieka. *BIL* 2002; **46**: 155–174.
- [14] GRUNDLER W, DIRSCHERL P, BEISKER W, MARX K, STAMPFL A, MAIER K, ZIMMERMANN I, NÜSSE M. Early Functional Apoptotic Responses of Thymocytes Induced by Tri-n-butylin. *Cytometry* 2001; **44**: 45–56.
- [15] GRZELAKOWSKA-SZTABERT B. Molekularne mechanizmy apoptozy indukowanej poprzez aktywację błonowych receptorów z nadrodziny TNF-R. *Post Biochem* 1998; **44**: 8–21.
- [16] HALICKA HD, BEDNER E, DARZYNKIEWICZ Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; **260**: 248–256.
- [17] JONES KH, SENFT JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem* 1985; **33**: 77–79.
- [18] KILIAŃSKA ZM, MIŚKIEWICZ A. Kaspazy kręgowców; ich rola w przebiegu apoptozy. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 129–152.
- [19] KING MA, RADICCHI-MASTROIANI MA. Antimycin A-induced apoptosis of HL-60 cells. *Cytometry* 2002; **49**: 106–112.
- [20] LECOEUR H, PRÉVOST MC, GOUGEON ML. Oncosis is Associated with Exposure of Phosphatidylserine Residues on the Outside Layer of the Plasma Membrane: A Reconsideration of the Specificity of the Annexin V/Propidium Iodide Assay. *Cytometry* **44**: 65 - 72, 2001.
- [21] LI X, DARZYNKIEWICZ Z. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase measured in situ in individual cells: relationship to DNA fragmentation and cell cycle position during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; **255**: 125–132.

- [22] LI X, DU L, DARZYNKIEWICZ Z. During apoptosis of HL-60 and U-937 cells caspases are activated independently of dissipation of mitochondrial electrochemical potential. *Exp Cell Res* 2000; **257**: 290–297.
- [23] LI X, MELAMED MR, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of apoptosis and DNA replication by different labeling of DNA strand breaks with fluorochromes of different color. *Exp Cell Res* 1996; **222**: 28–37.
- [24] MAJNO G, JORIS I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An overview of Cell Death. *Am J Pathol* 1995; **146**: 3–16.
- [25] MIGNOTTE B, VAYSSIERE JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; **252**: 1–15.
- [26] MOTYL T. Regulation of apoptosis: involvement of Bcl-2-related proteins. *Reprod Nutr Dev* 1999; **39**: 49–59.
- [27] MOTYL T. Apoptoza – śmierć warunkująca życie. *Post Biol Kom* 1998; **25**: 313–334.
- [28] MOTYL T, GAJKOWSKA B, PŁOSZAJ T, WARĘSKI P, ORZECZOWSKI A, ZIMOWSKA W, WOJEWÓDZKA U, RYNIWICZ Z, REKIEL A. Rola bax i bcl-2 w regulacji apoptozy komórek nabłonka gruczołu mlekowego. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 31–51.
- [29] MOTYL T, GRZELKOWSKA K, ZIMOWSKA W, SKIERSKI J, WARĘSKI P, PŁOSZAJ T, TRZECIAK L. Expression of bcl-2 and bax in TGF-1-induced apoptosis of L-1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol* 2000; **75**: 367–374.
- [30] MRÓZ P, MŁYNARCZUK I. Mechanizmy indukcji apoptozy i zastosowanie TRAIL w terapii nowotworów. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 113–128.
- [31] NEWCOMB EW, TAMASDAN C, ENTZMINGER Y, ALONSO J, FRIEDLANDER D, CRISAN D, MILLER DC, ZAGZAG D. Flavopiridol induces mitochondrial-mediated apoptosis in murine glioma GL261 cells via release of cytochrome c and apoptosis inducing factor. *Cell Cycle* 2003; **2**: 243–250.
- [32] PEREZ-GALÁN P, MARZO I, GIRALDO P, RUBIO-FELIX D, LASSIERRA P, LARRAD L, ANEL A, NAVAL J. Role of caspases and apoptosis - inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; **16**: 2106–2114.
- [33] PHANEUF S, LEEUWENBURGH C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**: 393–396.
- [34] RADZISZEWSKA E, PIWOCKA K, SKIERSKI J, SIKORA E. UVC-induced cell death of IL-2-dependent human lymphocytes. *Cell Biol Int* 1999; **23**: 97–103.
- [35] SMOLEWSKI P, BEDNER E, DU L, HSIEH T-C, WU JM, PHELPS DJ, DARZYNKIEWICZ Z. Detection of Caspases Activation by Fluorochrome-Labelled Inhibitors: Multiparameter Analysis by Laser Scanning Cytometry. *Cytometry* 2001; **44**: 73–82.
- [36] STEUBE KG, JADAN A, TEEPE D, DREXLER HG. Expression of bcl-2m-RNA and protein in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 1995; **9**: 1841–1846.
- [37] TELFORD WG, KOMORIYA A, PACKARD BZ. Detection of localized Caspase activity in early apoptotic cells by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2002; **47**: 81–88.
- [38] TRAGANOS F. Mechanism of antitumor drug action assessed by cytometry. W: *Methods in Cell Biology* [red.] Z. DARZYNKIEWICZ, M. ROEDERER and H. TANKE. Elsevier, San Diego 2004; **75**: 257–305.
- [39] TSUJIMOTO Y, IKEGAKI N, CROCE CM. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene* 1987; **2**: 3–7.
- [40] ZAMAI L, CANONICO B, LUCHETTI F, FERRI P, MELLONI E, GUIDOTTI L, CAPPELLINI A, CUTRONEO G, VITALE M, PAPA S. Supravital Exposure to Propidium Iodide Identifies Apoptosis on Adherent Cells. *Cytometry* 2001; **44**: 57–64.

Janusz Skierski

Pracownia Cytometrii Zakładu Biologii Komórki,

Narodowy Instytut Leków, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34

e-mail: jskierski@aol.pl