ANALÝZA MIKROJADER U LIDSKÝCH PLICNÍCH FIBROBLASTŮ

Kateřina Hoňková
Ústav epidemiologie a ochrany veřejného zdraví, Lékařská fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Syllabova 19, 703 00, Ostrava - Zábřeh
katerina.honkova@astronomie.cz

Abstrakt

Tento výzkum se věnoval hodnocení mikrojader u embryonálních lidských plicních fibroblastů (HEL 12649) s aplikací látek vyskytující se ve znečištěném ovzduší. Byla použita klasická metoda hodnocení v optickém mikroskopu a automatická obrazová analýza programem Metafer MNScore (MetaSystems) na Ústavu experimentální medicíny AV v Praze. Výsledky obou metod byly porovnány ($p > 0.05$) a nebyl mezi nimi nalezen statisticky významný rozdíl. Obě metody však mezi sebou nevykazovaly žádnou korelaci ($r = -0.127$). Buňky HEL se ukázaly jako ne zcela optimální pro analýzu mikrojader vzhledem k nízkému výtěžku hodnotitelných dvoujaderných buněk a problémovou kultivaci. Pro budoucí analýzy mikrojader tuto linii nedoporučuji.

Klíčová slova: *mikrojádra, plicní fibroblasty, cytogenetické metody, genotoxicita, buněčné linie*

Úvod

Mikrojádra (MN) jsou jaderné anomálie, nacházené v cytoplazmě dvoujaderných buněk (BNC) [1], jež při mitóze kondenzují z chromosomových fragmentů, či celých chromosomů, které se při anafázi nezačlenily do nově vzniklých jader. Mikrojádra jsou tak odrazem genetického poškození a dle jejich frekvence se sledují různé asociace (národová onemocnění, způsoby léčby, demografické rozdíly, životní styl, ale také i znečištěné ovzduší).

Většina těchto studií je prováděná na snadno zpracovatelných lidských periferních lymfocytech [2], výjimečně jsou používány i epiteliální buňky [3, 4]. Uváděný výzkum se zaměřuje na buněčnou linii lidských embryonálních plicních fibroblastů (HEL 12469), na poli mikrojader zcela neprozkoumanou. Pro testování byla využita aplikace benzo[a]pyrenu (B[a]P) a extrahovatelné organické hmoty (EOM) získané z prachových částic o průměru < 2,5 µm ($PM_{2,5}$).

Klasické hodnocení mikrojader (klasická, vizuální metoda) je prováděno v optickém mikroskopu počítáním dvoujaderných buněk a v nich stanovené frekvenci mikrojader. Standardně se hodnotí 1000 dvoujaderných buněk (MN/1000 BNC). Ačkoliv je metoda poměrně jednoduchá, je časově velmi zdlouhavá a monotónní, proto je přístup klasického hodnocení je pomalu nahrazován automatickými systémy. Nejčastěji používaným systémem, umožňující automatickou obrazovou analýzu, je Metafer MNScore firmy MetaSystems (Německo) [5], který kromě mnoha jiných aplikací, dokáže detekovat dvoujaderné buňky a nacházet v jejich blízkém okolí mikrojádra.

V této práci jsou buňky HEL 12469 s aplikací látek, běžně se vyskytující ve znečištěném ovzduší (vzorky odebrané z Prahy a Ostravy, v letním a zimním období) testovány jak v klasické vizuální analýze, tak pomocí automatického systému Metafer MNScore. Výzkum byl prováděn v Laboratoři genetické ekotoxikologie Ústavu experimentální medicíny, Akademie Věd v Praze, pod vedením MUDr. Radima Šráma, DrSc.

Hlavním cílem této práce bylo otestovat vhodnost navrženého metodického postupu a analýzy mikrojader u lidských plicních embryonálních fibroblastů (HEL 12469) s využitím vizuálního a automatického hodnocení.

Materiál a metody

Kultivace a zpracování

Lidské embryonální plicní fibroblasty byly kultivovány v esenciálním médiu E-MEM. Buňky byly kultivovány při 37°C v atmosféře obsahující 5% CO_2. Během kultivace byly do buněk přidány tři koncentrace látek (B[a]P: 1, 10 a 25 µM; EOM: 1, 10, 25 µg/ml).

Po 24h od začátku kultivace bylo vyměněno médium za médium s aplikovanou látkou, po 48h od začátku kultivace bylo médium nahrazeno za čisté s 10% fetálního bovinního séra. Za dalších 24h byl do média aplikován cytochalasin B (5 µg/ml kultury) na dobu určené inkubace (30h). Po 30h byly buňky zpracovány.

Protože buňky HEL rostou přisedle, byl pro zpracování preparátů využit trypsin (0.5g/L), dále hypotonický roztok 0.55% KCl a fosfátový pufr.

Bylo připraveno celkem 45 preparátů – 5 kultivačních sérií s obsahem B[a]P, EOM z Prahy v letním a zimním období, EOM z Ostravy v letním a zimním období. V každé sérii byla krom příslušných koncentrací EOM a B[a]P i pozitivní kontrola etoposid a preparáty pouze s DMSO určené jako negativní kontrola.

Všechny preparáty byly připraveny ve dvou provedeních - kontroly A a B, u kterých se předpokládala rovnocennost.

Barvení

Pro klasické vizuální hodnocení byly preparáty barveny 10% roztokem Giemsa. Po zhodnocení odbarveny fixačním roztokem (kyselina octová : methanol = 1 : 3) a pro automatickou analýzu obarveny fluorescenčním barvivem DAPI (4 µl zásobního roztoku o koncentraci 6µg/ml, spolu se 100 µl montovacího média VECTASHIELD.

Mikroskopická analýza klasickou metodou

Mikroskopická analýza probíhala v mikroskopu Olympus BH2. Celkem bylo hodnoceno 44 preparátů a na každý preparát bylo předpokládáno hodnocení 1000 dvoujaderných buněk a v nich stanovená frekvence mikrojader. Hodnocení se řídilo kritérii na požadavky tvaru buněk, patrné cytoplazmy, maximálního počtu mikrojader v jedné buňce, či podobné morfologii mikrojader s hlavními jádry [6].

Mikroskopická analýza automatickou metodou

Po zhodnocení všech preparátů klasickou metodou byly všechny preparáty odbarveny a připraveny pro automatické hodnocení systémem Metafer MNScore firmy MetaSystems. Podobně jako klasická vizuální metoda se řídí kritérii hodnocení, automatická analýza z těchto kritérií vychází, proto je systém nastaven na vyhledávání topografických parametrů či velikostí, vzdáleností a poměrovými parametry hledaných objektů [7].

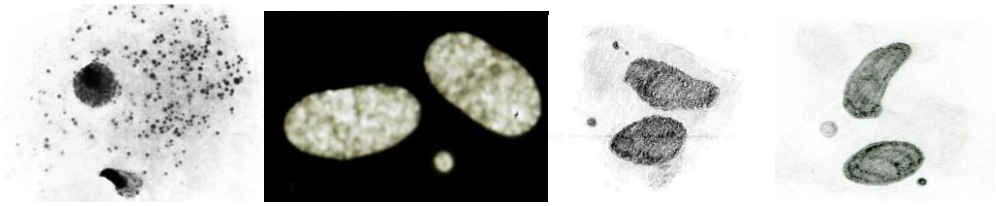
Výsledky a diskuse

Při klasické analýze se ukázalo, že hodnotitelných buněk na preparátů je velmi málo a převládají místo dvoujaderných buněk buňky jednojaderné, rovněž s vysokou koncentrací apoptotických či nekrotických buněk (viz obrázek 1_a). U některých preparátů ani nebylo možno dosáhnout limitu 1000 dvoujaderných buněk.

Kontroly A, ač byly připraveny stejným způsobem jako kontroly B, vykazovaly velké množství neoddělených shluků buněk, které jsou dány zřejmě přirozenou vlastností plicních fibroblastů při nedostatečné trypsinizaci.

U kontrol B se naopak objevovalo velké množství nehodnotitelných buněk z důvodu nepatrné cytoplazmy kolem jader buněk. Tento jev mohl být naopak příčinou nadměrné trypsinizace.

Při automatické analýze byly preparáty problémové převážně z důvodu velmi nízkých výtěžků dvoujaderných buněk. Plicní fibroblasty mají na rozdíl od tradičně používaných periferních lymfocytů, které mají symetricky kulová jádra, jádra poměrně protáhlá (viz obrázek $1_{b, c, d}$), která se při automatické analýze špatně detekují.



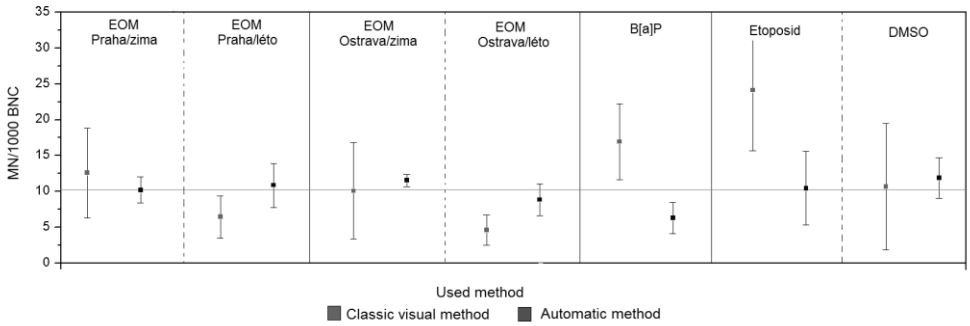
Obrázek 1. Ukázka dvoujaderných buněk. A) apoptotická buňka; oválné tvary jader: B) dvoujaderná buňka s mikrojádrem; C) buňka s 2 mikrojádry; D) buňka s 2 mikrojádry

Statistické srovnání všech preparátů zhodnocených klasickou a automatickou metodou pomocí párového *t-testu* neukázalo žádný statisticky významný rozdíl mezi oběma použitými metodami ($p > 0.05$), avšak data mezi sebou nevykazovala korelaci ($r = -0.127$). Průměrné hodnoty MN/1000 BNC byly u obou použitých metod podobné (viz tabulka 1). Nicméně použití statistického t-testu poukázalo na statisticky významný rozdíl ($p < 0.05$) mezi kontrolami A a B.

Tabulka 1. Celková průměrná hodnota MN/1000 BNC pro všechny preparáty zhodnocené klasickou vizuální metodou a automatickou metodou.

hodnota	**metoda**	**VISUAL**	**AUTO**		
		A+B	A+B	A	B
MN/1000 BNC	průměr	**12.07**	**10.14**	**12.11**	**9.13**
	S.D.	9.13	3.09	4.49	3.95
	CV (%)	75.6	30.47	37.07	43.26

Obrázek 2 shrnuje průměrné hodnoty MN/1000 BNC u jednotlivých kategorií preparátů – B[a]P, EOM z Ostravy a Prahy, v letním a zimním období, negativní a pozitivní kontroly. Z obrázku je patrné, že v létě jsou frekvence mikrojader nižší než v zimním období, výsledky jsou však výraznější použitím klasické vizuální metody, která ovšem vykazuje větší odchylku a vyšší variační koeficient. Proto jsou výsledky mezi danými soubory preparátů nejednoznačné.



Obrázek 2. Výsledné průměrné hodnoty MN/1000 BNC pro jednotlivé soubory preparátů použitím klasické vizuální a automatické metody.

Závěr

Buňky HEL 12469 se ukázaly jako ne zcela optimální model pro analýzy mikrojader. Jak pro automatickou metodu, ve které se hodnocení setkávalo s problémem nízkého výtěžku dvoujaderných buněk a přítomnosti protáhlých jader plicních fibroblastů, tak pro klasickou analýzu, kde byly buňky nehodnotitelé z důvodu přítomností shluků buněk, či naopak poškozené cytoplazmy. Problémy jsou pravděpodobně spojené s nutností trypsinizace přisedle rostoucích buněk, a rovněž pomalého růstu buněk s neochotou se dělit (převaha jednojaderných buněk nad potřebnými dvoujadernými).

I přes značné potíže s kultivací a hodnocením, jsou však výsledné průměrné hodnoty získané pomocí obou metod srovnatelné.

Poděkování

Práce byla součástí výzkumu Ústavu experimentální medicíny, AV ČR, který byl finančně podpořen Grantovou agenturou České republiky (P503/11/0084).

Literatura

[1.] FENECH, M., et al. *Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells*. Mutagenesis, 2010, roč. 26, č. 1, s. 125-132. ISSN 0267-8357.

[2.] FENECH, M., MORLEY, A. A. *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. Mutat. Res., 1985, roč. 147, s. 29-36.

[3.] HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRCH-VOLDERS, M., BONNASI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., FENECH, M. *The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps*. Mutat. Res, 2008, roč. 659, s. 93-108.

[4.] BALLARIN, C., SARTO, F., GIACOMELLI, L., BARTOLUCCI, G., CLONFERO, E. *Micronucleated cells in nasal mucosa of formaldehyde-exposed workers*. Mutation Research, 1992, roč. 280, s. 1-7.

[5.] SCHUNCK, C., JOHANNES, T., VARGA, D., LORCH, T., PLESCH, A**.** *New developments in automated cytogenetic imaging: unattended scoring of dicentric chromosomes, micronuclei, single cell gel electrophoresis, and fluorescence signale.* Cytogenet. Genom Res., 2004, roč. 104, s. 383-389.

[6.] FENECH, M. *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nature Protocols, 2007, roč. 2, č. 5, s. 1084-1104. ISSN 1750-2799.

[7.] VARGA, D. et al. *An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis*. Mutagenesis, 2004, roč. 19, č. 5, s. 391-397. DOI: 10.1093/mutage/geh047.

Abstract

Micronuclei are cell bodies, usually analyzing in cytoplasm of binucleated cells which are biomarker of cytogenetic damage. This research was devoted to evaluate of micronuclei in human embryonal lung fibroblast (HEL 12469) within application of samples of air pollutants. There was used classic visual method of evaluation in optic microscope and automated imaging analysis by software Metafer MNScore (MetaSystems) in Institute of Experimental Medicine, AS Prague. The results both of methods was compared ($p > 0.05$). There was no statistically difference between the methods. Also, there is no correlation between the methods each other ($r = -0.127$). The cell line HEL 12469 is showed as inappropriate for analysis of micronuclei due to the low yields evaluable binucleated cells and problematic cultivation. I do not recommend this cell line for future analysis of micronuclei.