

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Jana Skálová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Jana Skálová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**VLIV DÁVKY ZÁŘENÍ NA ZMĚNU ZASTOUPENÍ ZNAKU
H2AX**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana SKÁLOVÁ**
Osobní číslo: **Z18B0142P**
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Vliv dávky záření na změnu zastoupení znaku H2AX**
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- BARTŮŇKOVÁ, Jiřina a PAULÍK, Milan. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2.*, přepracované vydání. Praha: GRADA Publishing, 2011, 168 s. ISBN 987-80-247-3533-7.
- HOŘEJŠÍ, Václav, BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, BRDIČKA, Tomáš a ŠPÍŠEK, Radek. *Základy imunologie. 6.*, aktualizované vydání. Praha: Stanislav Juhaňák – TRITON, 2017, 304 s. ISBN 987-80-7553-250-3.
- HAVRÁNKOVÁ, Renata. *Klinická radiobiologie*. Praha: GRADA Publishing, 2020, 184 s. ISBN 978-80-247-4098-0.
- ŘEZÁČOVÁ, Martina, HAVELEK, Radim, LUKÁŠOVÁ, Emilie a VÁVROVÁ, Jiřina. Fosforylovaný histon H2AX – nový indikátor poškození DNA. *Chemické listy*. 2011, **105**(2), 108-113. ISSN 1213-7103.
- ZHANG, Junlin, HE, Ying, SHEN, Xianrong, JIANG, Dingwen, WANG, Qingrong, LIU, Qiong and FANG, Wen. Gama-H2AX responds to DNA damage induced by long-term exposure to combined low-dose-rate neutron and gama-ray radiation. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016, **795**, 36-40. ISSN 1383-5718.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Bc. Tomáš Vlas

Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce:

1. června 2020

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. března 2021

PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu literatury.

V Plzni dne 31. 3. 2021.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Skálová Jana

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Vliv dávky záření na změnu zastoupení znaku H2AX

Vedoucí práce: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Počet stran – číslované: 35

Počet stran – nečíslované: 19

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 30

Klíčová slova: histon H2AX, ionizující záření, gama záření, biodozimetrie, průtoková cytometrie

Souhrn:

Bakalářská práce je zaměřena na stanovení míry exprese fosforylovaného histonu H2AX (γ -H2AX) po vystavení škodlivému gama záření. Byla sledována závislost mezi zastoupením molekuly γ -H2AX ve vzorku a jeho přijatou dávkou radiace. Analyzované výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Výsledkem této práce je zjištěný fakt, že exprese zmíněné molekuly je závislá na velikosti přijaté dávky radiace. O znaku γ -H2AX lze tedy teoreticky uvažovat jako o ukazateli velikosti přijaté dávky ionizujícího záření.

Abstract

Surname and name: Skálová Jana

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Effect of dose of ionizing radiation on histone H2AX

Consultant: Ing. Bc. Tomáš Vlas

Number of pages – numbered: 35

Number of pages – unnumbered: 19

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 30

Keywords: histone H2AX, ionizing radiation, gamma radiation, biodosimetry, flow cytometry

Summary:

The bachelor thesis is focused on the scale of expression of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) after exposure to gamma radiation. The dependency between share of γ -H2AX molecule in a sample and dose of radiation, which the sample was irradiated, was examined. The analysed results were statistically evaluated. The outcome of this thesis is the evaluation that production of this molecule is dependent on dose of radiation. The result is that this histone represents an indicator of the received dose of ionizing radiation.

Předmluva

Bakalářská práce byla napsána z důvodu mého zájmu o oblast imunologie, a zároveň o oblast ionizujícího záření. Jedná se o poměrně náročnou a jen z malé části prozkoumanou problematiku. Cílem práce bylo nahlédnout do světa radioaktivity a zjistit, jak působí ionizující záření na lidské buňky. Perspektivním tématem se jeví sledování nízkých dávek záření a jejich dlouhodobý vliv na lidské zdraví, což může být zajímavé z důvodu života lidí v kontaminovaných oblastech.

Poděkování

Děkuji Ing. Bc. Tomáši Vlasovi za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů. Dále děkuji pracovníkům Ústavu imunologie a alergologie ve Fakultní nemocnici Plzeň za poskytování příležitostných rad a samotnému ústavu za poskytnutí prostor a potřebných pomůcek. Rovněž mé poděkování patří i Hematologicko-onkologickému oddělení ve Fakultní nemocnici Plzeň za poskytnutí potřebného přístroje a doc. MUDr. Danieľovi Lysákovi, Ph.D. za pomoc při používání tohoto přístroje. V neposlední řadě děkuji dárčům za poskytnutí biologického materiálu.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 BUŇKA A H2AX.....	17
1.1 Organizace buněčného jádra	17
1.2 Struktura chromatinu	17
1.3 Mechanismy remodelace chromatinu	18
1.4 Rodina histonů H2A	18
1.4.1 Definice H2AX.....	18
1.5 Poškození DNA	19
2 IONIZUJÍCÍ A NEIONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ V MEDICÍNĚ.....	20
2.1 Záření alfa	20
2.1.1 Využití alfa záření v medicíně.....	20
2.2 Záření beta	20
2.2.1 Využití beta záření v medicíně	21
2.3 Záření gama	21
2.3.1 Využití gama záření v medicíně	22
2.4 Rentgenové záření.....	22
2.4.1 Využití rentgenového záření v medicíně	23
2.5 Neutronové záření.....	23
2.5.1 Využití neutronového záření v medicíně.....	24
2.6 Ultrafialové záření	24
2.6.1 Využití ultrafialového záření v medicíně	25
3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS	26
3.1 Přímý a nepřímý účinek ionizujícího záření	26
3.2 Mechanismy účinku ionizujícího záření na živou tkáň.....	26
3.3 Stochastické a deterministické a účinky ionizujícího záření	28
3.4 Nemoc z ozáření	28
4 VLIV IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA H2AX	29
4.1 Molekulární mechanismy vedoucí k fosforylaci H2AX.....	29
4.2 Oprava DSB pomocí γ -H2AX	29
4.3 Deficit kináz a H2AX	30

4.4	Možnosti detekce γ -H2AX.....	30
5	SEPARACE NA HUSTOTNÍM GRADIENTU	32
6	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	33
	PRAKTICKÁ ČÁST	35
7	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	35
7.1	Hlavní cíl.....	35
7.2	Dílčí cíle.....	35
8	VÝZKUMNÉ OTÁZKY	36
9	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	37
10	METODIKA PRÁCE	38
10.1	Separace na hustotním gradientu.....	38
10.2	Příprava vzorku a samotné ozáření gama zářením.....	39
10.3	Inkubace a intracelulární značení.....	40
10.4	Stanovení na průtokovém cytometru.....	41
11	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	43
11.1	Analýza surových dat	43
11.2	Interpretace výsledků	43
11.3	Statistické zhodnocení.....	44
11.4	Zhodnocení mediánů proložením křivky	46
	DISKUZE	47
	ZÁVĚR.....	50
	SEZNAM LITERATURY	51
	SEZNAM PŘÍLOH	54
	PŘÍLOHY	55
	Příloha A – Grafický výstup dat z programu Kaluza Analysis 2.1	55

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Grafické zobrazení bodového grafu (dot plotu), „základní leuko-gate“	34
Graf 2 Grafické zobrazení histogramu	34
Graf 3 Stanovení znaku γ -H2AX.....	45
Graf 4 Zhodnocení mediánů proložením křivky	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Stádia probíhajících procesů po vystavení organismu ionizujícímu záření 27

Obrázek 2 Separace buněk na hustotním gradientu..... 32

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Míra exprese znaku γ -H2AX.....	44
Tabulka 2 Rozdíly mediánů.....	46

SEZNAM ZKRATEK

AT	ataxia telangiectasia, ataxie telangiektázie
ATM	ataxia telangiectasia mutated, mutovaná ataxie telangiektázie
ATP	adenosine triphosphate, adenosintrifosfát
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3-related
BNCT	boron neutron capture therapy, borová neutronová záchytová terapie
bp	base pair, pár bází
CD	cluster of differentiation, základní leukocytární znaky
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase, DNA-dependentní protein kináza
DSB	double-strand break, dvouřetězcové zlomy
FBS	fetal bovine serum, fetální hovězí sérum
H3K9me3	trimethylovaný histon H3
HR	homologous recombination, homologní rekombinace
IZ	ionizující záření
KO	krome orange
L-PHA	L-Phytohaemagglutinin, fytohemagglutinin
NHEJ	non-homologous end joining, nehomologní spojování konců
PB	pacific blue
PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
PET	positron emission tomography, pozitronová emisní tomografie

PFA paraformaldehyd

PI-3..... fosfatidylinositol-3-kináza

RTG rentgenové záření

SS side scatter, boční rozptyl

UV ultraviolet, ultrafialové záření

UVA..... ultraviolet A, ultrafialové záření typu A

UVB ultraviolet B, ultrafialové záření typu B

UVC ultraviolet B, ultrafialové záření typu C

ÚVOD

Bakalářská práce s názvem „Vliv dávky záření na změnu zastoupení znaku H2AX“ je zpracována metodou kvantitativního výzkumu a zabývá se stanovením specifického znaku, který poukazuje na poškození DNA způsobené ionizujícím zářením. Biologická dozimetrie hraje důležitou roli při odhadování dávek radiace na vystavené jedince po radičních nehodách, kde nejsou dostupné fyzikální dozimetry. DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení řadě exogenních i endogenních látek. Ionizující záření, ale i jiné škodlivé vlivy, indukují širokou škálu lézí DNA, z nichž nejzávažnější jsou dvouřetězcové zlomy DNA. V reakci na zlomy je indukována exprese molekuly γ -H2AX, která je hlavním předmětem této práce. Při hodnocení výsledků je třeba dbát na správnou interpretaci. Celá problematika je stále aktuální, jelikož odhad dávek radiace na základě exprese znaku γ -H2AX stále není stoprocentní.

Hlavním cílem této práce bylo zhodnotit vliv gama záření na buňky, a tedy zjistit, zda je exprese molekuly γ -H2AX v korelaci s přijatou dávkou radiace. Dílčími cíli pak bylo nalézt vhodný postup pro stanovení míry exprese γ -H2AX a vhodné interpretace výsledků.

V teoretické části se zabýváme uvedením do problematiky. Věnujeme se popisu základní stavby buněčného jádra a fyziologickým mechanismům buňky. Dále jsou vymezeny různé druhy ionizujícího záření a jejich využití ve zdravotnictví. Následuje podrobný popis biologických účinků ionizujícího záření na organismus. Souvislost mezi ionizujícím zářením a samotnou molekulou γ -H2AX je popsána v samostatné kapitole. V posledních kapitolách teoretické části uvádíme principy metod, kterých jsme při zpracování využívali.

Praktická část popisuje principy, pomůcky a pracovní postupy u měření hladiny γ -H2AX. Dále obsahuje porovnání výsledků u ozářených vzorků s negativními kontrolami, a to pomocí statistického zhodnocení.

Posledními kapitolami této kvalifikační práce jsou diskuze a závěr, kde se věnujeme vyhodnocení a interpretaci výsledků, které jsme získali.

TEORETICKÁ ČÁST

1 BUŇKA A H2AX

1.1 Organizace buněčného jádra

Buněčné jádro představuje největší, velmi významnou organelu eukaryotické buňky o velikosti 10–20 μm v průměru. Od cytoplazmy eukaryotické buňky je odděleno jaderným obalem s jadernými póry, které umožňují transport látek. Buněčné jádro obsahuje nukleoplazmu, která obsahuje téměř veškerý genetický materiál buňky, který je nazýván jako DNA (deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina). (Koolman, 2012)

1.2 Struktura chromatinu

V jádře je DNA uloženo ve formě chromatinu, který je kondenzován během mitózy na chromozomy viditelné ve světelném mikroskopu, zatímco v průběhu interfáze buněčného cyklu je téměř rozpuštěn. Uspořádání chromatinu je založeno na nukleozomech, jakožto základních stavebních jednotkách, o průměru 10 nm. Každý nukleozom má strukturu oktameru, který je složen vždy ze dvou stejných molekul čtyř různých typů jaderných proteinů (histonů) – H2A, H2B, H3 a H4. Podjednotky H3 a H4 tvoří ve středu nukleozomu symetrickou jednotku. Dva páry histonů H2A a H2B jsou poté vázány na vnější stranu komplexu H3-H4 a doplňují histonový oktamer. Kolem proteinového jádra je navinuto 147 párů nukleotidových bází neboli bp (base pair, pár bází) DNA, které vytváří 1,8 levotočivých nadšroubovicových závitů. Histony jsou pevně vázány na DNA a tvoří tak velmi stabilní komplexy. (Koolman, 2012; Sinden, 1994; Řezáčová, 2011)

Nukleozomy jsou spojeny krátkými úseky DNA přímo nespojenými s histonovými oktamerami (linkery DNA) za vzniku opakujících se jednotek. Linkery DNA a vnější stranu nukleozomu spojuje další histon – H1 a předpokládá se, že kontaktuje DNA, kde do nukleozomu vstupuje a vystupuje. Délka linkeru se může dynamicky měnit např. v závislosti na stupni diferenciaci buňky a odrážet tak funkční stav chromatinu. S přítomným histonem H1 je s nukleozomem spojeno 167 bp, které tvoří dva úplné šroubovicové závity. Nukleozom s vázaným histonem H1 je nazýván jako chromatozom. DNA v chromatozomu je stabilnější a kompaktnější než v nukleozomu a je předpokládáno, že jsou tyto oblasti DNA transkripčně neaktivní. (Nasheuer, 2010; Sinden, 1994; Koolman, 2012)

Genom (veškerá genetická informace uložená v DNA) každé lidské buňky obsahuje řádově $6 \cdot 10^9$ bp, což odpovídá délce vlákna dvoušroubovice DNA více než 2 m. V konečném důsledku je pak v jedné lidské buňce stočeno 90 mm chromatinových vláken o průměru 30 nm. (Řezáčová, 2011)

1.3 Mechanismy remodelace chromatinu

Přes jeho modulační strukturu není uspořádání chromatinu statické a dochází k remodelacím. Všechny procesy v buněčném jádře jako například transkripce, replikace a opravy DNA probíhají ve struktuře chromatinu a existují lokální i globální mechanismy, které mohou tuto strukturu měnit. Tato modifikace je řízena dvěma obecnými mechanismy. Prvním z nich jsou enzymatické aktivity schopné posttranslační modifikace histonů a regulace histonového kódu. Druhý z mechanismů je zajišťován ATP-dependentními (adenosin triphosphate, adenosintrifosfát) remodelátory a proteiny vázající chromatin, které mohou přímo modifikovat jeho strukturu. (Řezáčová, 2011; Weyemi, 2018)

Zachování stability genomu má pro všechny organismy zásadní význam. Savčí buňky jsou vybaveny řadou přísně regulovaných drah poskytujících účinnou opravu DNA v reakci na endogenní nebo exogenní genotoxické látky. Nedostatečná oprava DNA může vést k široké škále genetických poruch, až k rakovině. (Weyemi, 2018)

1.4 Rodina histonů H2A

Rodina H2A má dvě biochemicky oddělitelné izoformy klasifikované jako H2A1 a H2A2. Jejich jediný rozdíl je v genetickém kódu. H2A1 kóduje v pozici 51 leucin a H2A2 methionin. Tyto varianty tvoří většinu savčího H2A a nejsou zjištěny žádné odlišnosti v jejich funkci. Jsou označovány rovněž jako majoritní varianty. Lidský genom obsahuje 10 genů, které tyto dvě varianty rodiny H2A kódují. (Nasheuer, 2010; Řezáčová, 2011)

Existuje 5 dalších lidských genů H2A, označovaných jako varianty minoritní, které kódují peptidy sekvenčně významně odlišné od variant H2A1 a H2A2 – H2AX a H2AZ. Přestože je výskyt těchto variant podstatně méně častý, hrají významnou úlohu v chromatinovém metabolismu. Existují další minoritní varianty, jako například makro-H2A1, makro-H2A2 a H2A-Bbd. (Nasheuer, 2010; Řezáčová, 2011)

1.4.1 Definice H2AX

Histonová varianta H2AX patří do rodiny histonů H2A a představuje přibližně 20 % H2A a 2 % všech histonů v buňce. Množství H2AX závisí na typu organismu a typu buněk.

Od histonu H2A se liší pouze prodloužením na karboxylovém konci, z 96 % je s ním shodná. (Kahl, 2015; Řezáčová, 2011)

H2AX hraje zásadní roli při opravě dvouřetězcových zlomů (DSB, double-strand breaks) DNA a stabilitě genomu a je klasifikován také jako tumor supresor. H2AX obsahuje fosfatidylinositol-3-kinázy (PI-3 kinázy) a zvyšuje přesnou a efektivní opravu DSB v genomové DNA nebo zabraňuje jejich nepřesným a neúčinným opravám. Řada kináz rozpoznává DSB, které jsou způsobeny například ionizujícím zářením nebo genotoxickým činidlem. Tyto kinázy fosforylují vyčnívající C-terminální doménu (serin 139) během několika minut po nástupu podnětu, čímž vzniká fosforylovaná varianta histonu H2AX (γ -H2AX). (Nashauer, 2010; Kahl, 2015; Weyemi, 2018)

1.5 Poškození DNA

DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení látek, které ji poškozují. Poškození může vzniknout vlivem externích zdrojů jako je expozice různým druhům záření nebo toxinům z prostředí. Do endogenních zdrojů patří například reaktivní formy kyslíku nebo chyby během replikace DNA. Tyto události mohou generovat širokou škálu lézí DNA, včetně modifikovaných bází nebo cukerných zbytků, tvorby DNA aduktů a DSB. V důsledku toho si buňky vyvinuly nejméně šest různých drah opravy DNA, aby se vypořádaly s těmito odlišnými typy poškození DNA. (Řezáčová, 2011; Price, 2013)

Z celé škály poškození DNA jsou nejzávažnější právě DSB. Reprezentují velký zásah do integrity genomu a jsou pro buňku potenciálně smrtícím poškozením, protože dochází k fyzickému štěpení samotné „páteře“ DNA. K DSB může dojít během zpracování mezi-vláknových křížových vazeb nebo po vystavení ionizujícímu záření (IZ), a to v důsledku zhroucení replikační vidlice. (Řezáčová, 2011; Price, 2013)

2 IONIZUJÍCÍ A NEIONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ V MEDICÍNĚ

Obecně lze záření považovat za určitou specifickou formu energie, která je od zdroje záření šířena do prostoru v podobě částic nebo vlnění. Záření je rozděleno na ionizující a neionizující. IZ se vyznačuje tím, že při interakcích s látkou ionizuje atomy této látky. Ionizace je proces, při kterém dochází k vyražení jednoho z vnějších elektronů původně elektricky neutrálního atomu, načež se z něj stává kladně nabitý iont (kationt). (Kubinyi, 2018; Ullmann)

Ionizující záření lze rozčlenit do dvou skupin – přímo a nepřímo ionizující záření. Za přímo ionizující záření je považován proud elektricky nabitých částic (alfa, beta), které přímo vyražejí Coulombickými elektrickými silami elektrony z atomů. Mezi nepřímo ionizující záření patří zejména fotony a neutrony, které svou kinetickou energii předávají v látce nejprve nabitým částicím a ty teprve přímými účinky na atomy látku ionizují. (Kubinyi, 2018; Ullmann)

2.1 Záření alfa

Záření alfa je proud alfa částic – jader helia, která jsou uvolňována z jader rozpadajících se prvků. Jádro helia je tvořeno dvěma protony a dvěma neutrony. Následkem ztráty dvou protonů se původní atom přemění na jiný prvek, který má atomové číslo snižené o dvě jednotky. Tento druh záření je možné velmi snadno odstínit, například listem papíru nebo lidskou kůží. (Kubinyi, 2018)

2.1.1 Využití alfa záření v medicíně

Ze všech typů záření, je záření alfa využíváno v lékařství nejméně. Příkladem můžou být radioaktivní koupele (balneologie), jejichž podstatou je radonová voda. Radon je nejtěžší přirozeně se vyskytující chemický prvek ve skupině vzácných plynů. Jeho jádra se rozpadají alfa rozpadem za vzniku alfa částice. Nízké dávky alfa záření ve formě aplikace radonu vyvolávají v organismu krátké podráždění, které stimuluje buňky a orgány. Léčebné kúry zmírňují příznaky onemocnění pohybového aparátu a mají příznivý vliv na různé metabolické a fyziologické procesy, včetně těch imunitních. (Léčebné lázně Jáchymov a.s., 2019; Kusala, 2004)

2.2 Záření beta

Záření beta je tvořeno rychle letícími elektrony (záření β^-) nebo pozitrony (záření β^+) vznikajícími v jádře radioaktivního prvku. K emisi záření β^- dochází u jader nuklidů,

která mají nadbytek neutronů. Nadbytečný neutron se může přeměnit na proton a elektron. Proton zůstává v jádře, zatímco elektron jádro opouští. Přeměna β^+ je charakteristická u jader, které mají nadbytek protonů. Může dojít k přeměně některého z protonů na neutron a pozitron. Podobně jako v předchozím případě, neutron zůstává v jádře atomu a pozitron jádro opouští. V porovnání se zářením alfa jsou částice beta mnohem lehčí, pohybují se proto při stejné energii podstatně rychleji a při průchodu prostředím daleko méně ionizují a excitují. S tím souvisí i výrazně větší prostup záření beta. (Rosina, 2013; Hála, 1998)

Ke stínění se nepoužívají těžké materiály, protože s rostoucím protonovým číslem prvku, který je obsažen v ochranném materiálu, roste intenzita vznikajícího pronikavého brzděného rentgenového záření, které se ze stínění uvolňuje. Vhodným stíněním je proto plexisklo a materiály s nízkým protonovým číslem. (Rosina, 2013; Hála, 1998)

2.2.1 Využití beta záření v medicíně

Beta záření, konkrétně pozitronové záření, je používáno v pozitronové emisní tomografii (PET). Při průchodu látkou se pozitrony chovají v zásadě stejně jako elektrony, avšak pozitron na konci své dráhy, když se jeho energie blíží nule, anihiluje. Anihilace je jev, při kterém se spojí pozitron s volným elektronem, přičemž obě původní částice zanikají a vyzáří se energie v podobě dvou anihilačních fotonů. Principem metody je lokalizace vzniku těchto fotonů v místech, kde se v těle navázalo podané radiofarmakum. (Kubinyi, 2018; Doležalová, 2014)

PET je diagnostická metoda umožňující zobrazení fyziologických a patologických procesů probíhajících v organismu. Tímto se zásadně liší od výpočetní tomografie či magnetické rezonance, které podávají informace pouze o anatomické struktuře. V současné době je PET klinicky využívána především v onkologii, kardiologii a neurologii. (Kubinyi, 2018; Doležalová, 2014)

2.3 Záření gama

Záření gama je forma elektromagnetického záření (fotony) s velmi krátkou vlnovou délkou a vysokou energií, jež vzniká při radioaktivním rozpadu řady radionuklidů, zpravidla současně se zářením alfa nebo beta. Nově vzniklé jádro se tímto způsobem zbavuje přebytečné energie, přičemž nedochází ke změně protonového ani nukleonového čísla. (Rosina, 2013; Kubinyi, 2018)

2.3.1 Využití gama záření v medicíně

Scintigrafie (gamagrafie) je fyzikálně-elektronická metoda umožňující zobrazení různých orgánů nebo soustav v lidském těle pomocí radioaktivních látek (radiofarmak). Posouzení distribuce radioindikátoru v organismu je založeno na zevní detekci vycházejícího záření gama, které radiofarmakum emituje. Použitím scintigrafických metod tak můžeme zachytit nejen dvourozměrný nebo prostorový obraz vyšetřovaného orgánu, ale použitím dynamické scintigrafie můžeme také získat cenné informace o funkční schopnosti takového orgánu. (Ullmann; Rosina, 2006; Weyemi, 2018; Hála, 1998)

Terapie nádorových onemocnění se v současné době opírá o tři hlavní metody – chirurgie, chemoterapie a radioterapie, přičemž se tyto metody často kombinují. Radioterapie nádorových onemocnění je založena na účincích ionizujícího záření na živou tkáň. Předpokladem radioterapeutického využití tohoto záření jsou jeho letální účinky na buňky orgánů a tkání, tj. schopnost vyvolat jejich zánik, spolu se skutečností, že citlivost různých buněk k letálnímu působení záření se ve velkém rozsahu mění. Obecně platí, že buňky jsou vůči záření tím citlivější, čím vyšší je jejich proliferační aktivita a čím nižší je stupeň jejich diferenciace. Proto právě zhoubné nádory (zvláště rychle rostoucí, s vysokou proliferační aktivitou) bývají velice citlivé vůči radioaktivnímu záření. Pro zevní ozařování se používají například kobaltové a cesiové ozařovače, gama nože, lineární urychlovače, betatrony nebo cyklotrony. (Hála, 1998; Ullmann; Rosina, 2006; Rosina, 2013; Beneš, 2015)

2.4 Rentgenové záření

Rentgenové (RTG) záření je pronikavé elektromagnetické záření o velmi krátkých vlnových délkách a vysokých frekvencích. Přírodní zdroj RTG záření představuje Slunce, ale i další kosmické zdroje. Jako základní, uměle vytvořený zdroj RTG záření, slouží speciální vakuová elektronka zvaná rentgenka. RTG záření vzniká v rentgence dvěma způsoby – jako brzdové a charakteristické záření. Brzdové RTG záření je charakterizováno rychle letícími elektrony, které jsou urychlovány elektrickým polem a při dopadu na anodu jsou náhle zbrzděny a jejich kinetická energie je přeměněna na energii fotonů. Kromě brzdového RTG záření je vyzařováno i určité množství charakteristického RTG záření, jehož energie není závislá na anodovém napětí, ale je dána materiálem anody. Elektrony dopadající na anodu předávají svou energii elektronům v atomech anody, což má za následek jejich excitaci do vyšší energetické hladiny nebo častěji úplné vyražení z atomu (ionizaci). Pokud je elektron vyražen, jeho místo je zaplněno elektronem z jedné energeticky bohatších hladin, čímž se atom snaží získat zpět svoji stabilitu. Jelikož se jedná o značné rozdíly mezi energetickými hladinami,

je rozdíl energií vyzářen ve formě fotonu neboli charakteristického RTG záření. (Seidl, 2012; Beneš, 2015)

Pronikavé RTG záření prochází přes vyšetřovaný objekt, přičemž část záření je absorbována v závislosti na tloušťce a hustotě tkáně, zbylá část prochází tkání a je zobrazována buď fotograficky nebo na luminiscenčním stínítku, nověji pak pomocí elektronických detektorů. Při expozici RTG záření vzniká rentgenový obraz vyšetřované tkáně. (Seidl, 2012; Rosina, 2006)

2.4.1 Využití rentgenového záření v medicíně

Diagnostické využití RTG záření je závislé na schopnosti všech tkání a orgánů pohlcovat v různé míře RTG paprsky. Tato schopnost vzrůstá s rostoucím protonovým číslem prvků nacházejících se v absorbující tkáni. Z hlediska provedení a zpracování obrazů je RTG diagnostika rozdělena na skiografii (snímkování) a skiaskopii (prosvěcování). (Seidl, 2012; Rosina, 2006)

Při prostém RTG snímkování, zvaném skiografie, dopadá RTG záření prošlé vyšetřovanou tkání na fotografický film obsahující halogenidy stříbra. Vzniklý RTG obraz představuje negativní zobrazení hustoty tkáně. Místa s nízkou hustotou (měkké tkáně) mají nižší absorpci, proto jsou na filmu zobrazena černě a naopak. (Seidl, 2012; Rosina, 2006)

Skiaskopický zobrazovací systém je určen pro dynamické (pohybové) dvojrozměrné zobrazení trojrozměrné anatomické struktury. Tato metoda poskytuje pouze omezenou kvalitu obrazu. Skiaskopický zobrazovací systém umožňuje dosáhnout pouze limitovaného rozlišení při vysokém kontrastu. (Seidl, 2012)

Na podkladě všech poznatků medicíny byly vyvinuty účinné metody a techniky (téměř) kontaktní rentgenové terapie, které jsou nepostradatelné zejména v léčbě kožních nádorů, bolestivých artróz nebo tenisových loktů. Léčba má symptomatický, analgetický efekt, který je obvykle poměrně rychlý a přetrvává relativně dlouhou dobu. Podle řady kritérií rozeznáváme povrchovou, polohloubkovou, hloubkovou a vysokovoltážní terapii. (Seidl, 2012)

2.5 Neutronové záření

Neutronové záření je forma ionizujícího záření, která je definována jako proud volných neutronů. Neutrony lze získat zpravidla pouze specifickými jadernými reakcemi, nevznikají při přirozeném rozpadu jader, až na výjimku – spontánní štěpení. Proud neutronů

sice nezpůsobuje ionizaci, ale porušuje stabilitu atomu, čímž může vyvolat radioaktivitu u látek neradioaktivních. Zdrojem neutronů jsou například neutronové generátory, radionuklidové zdroje, jaderné reaktory či jaderné exploze. (Seidl, 2012; Rosina, 2013)

2.5.1 Využití neutronového záření v medicíně

I přes vyšší pozitivní míru odpovědi ve tkáních je vzhledem k vnitřní toxicitě konvenčních terapií rakoviny žádoucí minimalizovat vysokou toxicitu při těchto terapiích. Jednou ze strategií řešení tohoto problému je změna zdroje záření. (Seidl, 2012; Rosina, 2013; Marek, 2005; Li, 2021)

Terapie záchytem borových neutronů (BNCT, boron neutron capture therapy) představuje experimentální formu radioterapie, která je založena na interakci toku neutronů s borem. Jako cílená léčba rakoviny má BNCT méně nežádoucích účinků, což z ní teoreticky činí lepší volbu pro radiochemoterapii. Pacientovi je nitrožilně podána sloučenina boru-10, který je upraven tak, aby se vázal na nádorové buňky nebo se hromadil ve tkáni nádoru. Poté je pacient, resp. místo postižené nádorem vystaveno toku neutronů, jehož zdrojem je již zmíněný jaderný reaktor nebo částicový urychlovač. (Seidl, 2012; Rosina, 2013; Marek, 2005; Li, 2021)

Navzdory pozitivním zprávám o uzdravení některých pacientů není doposud dokázáno, že by byla tato metoda lepší než ostatní. Je velmi nákladné financovat provoz jaderného reaktoru jako zdroj neutronů pro BNCT, proto zatím nebyla zavedena do běžného klinického využití. (Marek, 2005)

2.6 Ultrafialové záření

Do skupiny neionizujících záření patří ultrafialové (UV, ultraviolet) záření, které je definováno jako elektromagnetické záření o vlnové délce 100–400 nm. Jeho zdrojem v přírodě je Slunce, ale lze generovat i uměle. Vzniká například při průchodu proudu mezi dvěma elektrodami ve výbojce naplněné rtuťovými parami. Podle vlnové délky, účinku a výskytu jsou rozeznávány tři typy záření – UVA (ultrafialové záření typu A), UVB (ultrafialové záření typu B) a UVC (ultrafialové záření typu C). UVA záření má nejdelší vlnovou délku, ale nejmenší energii. S UVA zářením, tzv. měkkým UV zářením, je možno se setkat například v soláriích. Vyvolává zhnědnutí kůže produkcí melaninu. UVB záření je považováno za biologicky nejvýznamnější, způsobuje zčervenání kůže, při vyšších dávkách tvorbu puchýřů až kožních nádorů. Nejkratší vlnovou délku, ale nejvyšší energii má záření UVC, které je

zachycováno ozonovou vrstvou, tudíž na zemský povrch neproniká. (Rostová, 2006; Lajčíková, 2009; Rosina, 2013; Hála, 1998)

2.6.1 Využití ultrafialového záření v medicíně

Obecně expozice nechráněné kůže těla slunečnímu UV záření je hlavní příčinou rozvoje rakoviny kůže. I nebezpečných účinků UV záření však dnes člověk dokáže využívat, konkrétně pro jeho schopnost likvidovat živé organismy. UV záření je proto někdy používáno jako germicidní. Této schopnosti se dá využít k dezinfekci a sterilizaci ovzduší v nemocničních zařízeních, potravinářství nebo úpravách vody. UV záření dokáže porušovat DNA mikroorganismů a tím zabránit jejich množení nebo je úplně zlikvidovat. (Rostová, 2006; Rosina, 2013)

Z dalších pozitivních účinků UV záření lze také uvést, že vlnové délky pod 300 nm způsobují vznik vitamínu D, který se ukládá do kůže, jater, mozku a kostí. Účinně řídí metabolismus vápníku a reguluje dynamickou přestavbu kostí. Proto se UV záření využívá v léčbě a prevenci křivice, dále k léčbě špatně se hojících ran a vředů u některých kožních onemocnění. (Rosina, 2013)

3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY ZÁŘENÍ NA ORGANISMUS

Při průchodu záření živou hmotou dochází k absorpci záření podobným způsobem jako při jeho průchodu neživým prostředím, převážně mechanismem ionizace a excitace atomů prostředí. Dávky záření představující z fyzikálního hlediska malé energie však mohou mít na organismus velmi zhojbné účinky. (Rosina, 2013)

Důsledek působení záření závisí na aktivitě zářiče, typu emitovaného záření a jakou energii toto záření nese. Mírou velikosti účinku ionizujícího záření na látku je absorbovaná dávka (D). Je definována jako energie záření absorbovaná objemem hmoty o jednotkové hmotnosti. Jednotkou je Gray (Gy), který představuje 1 J energie absorbované v 1 kg látky. Jednotlivé druhy záření mají rozdílnou biologickou účinnost, která je vyjadřována pomocí tzv. jakostního faktoru. Dávka vynásobená jakostním faktorem je nazývána dávkový ekvivalent (H), jehož jednotkou je Sievert (Sv). (Hála, 1998; Ullmann)

3.1 Přímý a nepřímý účinek ionizujícího záření

Při **přímém účinku IZ** dochází k absorpci záření v biologicky důležitých makromolekulách. Změny chemických vazeb vedou k inaktivaci až rozpadu zasažených molekul. Tento způsob převládá v buňkách s nízkým obsahem vody. Přímý účinek se pokládá za závažný hlavně u nukleových kyselin. (Hála, 1998; Rosina, 2013; Beneš, 2015)

Nepřímý účinek souvisí s radiolýzou vody s tvorbou agresivních volných radikálů (H⁺, OH⁻), které jsou odpovědné za poškození důležitých molekul. Absorpce záření v biologickém prostředí je ovlivněna vysokým obsahem vody. Na molekulární úrovni se za nejzávažnější pokládají změny ve struktuře a biosyntéze DNA. (Hála, 1998; Rosina, 2013; Beneš, 2015)

3.2 Mechanismy účinku ionizujícího záření na živou tkáň

Proces účinku IZ na organismus probíhá ve čtyřech vyhraněných stádiích, lišících se svou rychlostí a druhem probíhajících procesů (příslušná stádia zobrazuje Obrázek 1).

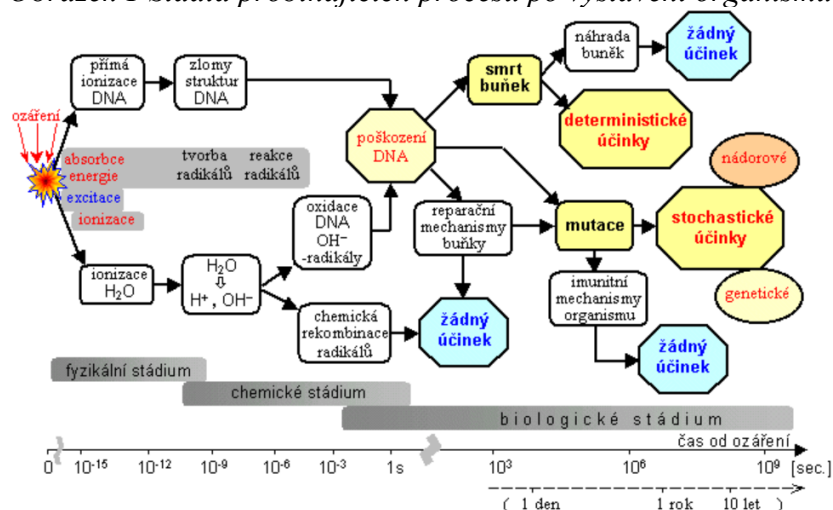
Fyzikální stádium. Při vzájemném působení IZ a hmoty předává záření svoji energii elektronům v atomech, a to za vzniku excitace a ionizace. Jestliže mají uvolněné elektrony dostatečně vysokou energii, mohou utvářet řadu kaskádovitých excitací a ionizací dalších atomů. (Ullmann; Rosina, 2013)

Fyzikálně-chemické stádium. Vlivem excitace a ionizace jsou narušeny chemické vazby mezi atomy a molekulami a nastává sekundární fyzikálně-chemická fáze. Jedná se o vzájemné interakce iontů s molekulami, během nichž dochází k rozštěpení molekul a vzniku volných radikálů. (Ullmann; Rosina, 2013)

Chemické stádium. Produkty vzniklé v předešlém stádiu reagují s biologicky významnými organickými molekulami a zásadně mění jejich strukturu a funkci. Pro chemickou fázi jsou charakteristické DSB, atypické vazbové „můstky“ v DNA nebo poškození purinových a pyrimidinových bází. (Ullmann; Rosina, 2013)

Biologické stádium. Život buňky zasažené IZ se dále může vyvíjet třemi směry. V prvním případě buňka poškození zcela opraví pomocí svých reparačních mechanismů a bude žít i nadále. Ionizační záření ve výsledku nezpůsobí buňce žádné následky. V druhém případě buňka zanikne na následky rozsáhlých poškození DNA. Organismus může buňku nahradit jinou, se stejnou nebo podobnou funkcí („kompenzační proliferace buněk“) a výsledkem budou opět nulové následky. Pokud však organismus nedokáže uhynulé buňky nahradit, může dojít k selhání postiženého orgánu nebo celého organismu (deterministické účinky). V třetím případě buňka přežije, ale neopraví všechna poškození (stochastické účinky). V tom případě hrozí riziko, že vyvolá rakovinné bujení, nebo že se její poškození projeví genovou mutací u narozeného dítěte (jedná-li se o spermii nebo vajíčko). (Ullmann; Rosina, 2013)

Obrázek 1 Stádia probíhajících procesů po vystavení organismu ionizujícímu záření



Zdroj: <https://astronuklfyzika.cz/strana2.htm>

Obrázek 1 je schématické znázornění probíhajících procesů, které u organismu nastávají během 10 let po vystavení ionizujícímu záření.

3.3 Stochastické a deterministické a účinky ionizujícího záření

Stochastické účinky jsou charakterizovány určitou pravděpodobností poškození, která je úměrná dávce ozáření. Pokud dávka není velká, s naprostou většinou poškození se organismus vyrovná svými reparačními mechanismy. Existuje však určitá pravděpodobnost, že některá poškození se opravit nepodaří a dochází ke genové nestabilitě, která může vyústit v mutace. Pokud jsou mutované buňky dále děleny, mohou vzniknout pozdní trvalé následky genetického nebo nádorového charakteru. Takové následky jsou individuální, nepředvídatelné a zcela náhodné (stochastické). (Beneš, 2015; Ullmann)

O **deterministických účincích** IZ je možno hovořit tehdy, kdy poškození tkáně již není náhodné, naopak předvídatelné a přímo úměrné obdržené dávce. Dochází k tomu v případě, kdy buňky po vysoké dávce IZ nejsou schopny se zcela opravit a hynou. Tyto účinky se projeví na konkrétní osobě. Jedná se vlastně o tkáňovou reakci na ozáření. Do těchto účinků je řazena akutní a chronická nemoc z ozáření. (Beneš, 2015; Ullmann)

3.4 Nemoc z ozáření

Nemoc z ozáření je komplex patologických změn v organismu vyvolaných účinkem velkých dávek IZ. Akutní nemoc z ozáření vzniká po jednorázovém ozáření celého těla, chronická nemoc z ozáření nastává po opakované expozici menším dávkám IZ. Klinický průběh závisí na velikosti dávky. Při dávkách od 3 Gy do 8 Gy vzniká krevní (dřeňová, hematologická) forma způsobená poškozením orgánů krvetvorby. Jestliže jsou v kostní dřeni zachovány funkční kmenové buňky krvetvorby, může docházet k postupné regeneraci. Expozice dávkám vyšším než 10 Gy je fatální, nenávratně ničí buňky krvetvorby a střevní výstelky, v krajním případě vede k velmi rychlé centrálně nervové smrti. (Ullmann; Rosina, 2006; Rosina, 2013; Beneš, 2015)

Akutní nemoc z ozáření má typický klinický průběh a probíhá obvykle ve čtyřech fázích. **Časná fáze** velmi rychle odeznívá. Během několika málo minut po ozáření se objevuje celková nevolnost, zvracení, bolesti hlavy a při vyšších dávkách zažívací potíže s průjmami. Po krátkodobém trvání počátečních příznaků nastupuje období bez klinických příznaků (**latentní fáze**). Třetí období (**manifestní fáze**) se vyznačuje horečkami, krvácením a záněty sliznic s možností rozvoje bakteriálních i virových infekcí. **Fáze rekonvalescence** nastává u postižených, kteří nebyli vystaveni smrtelné dávce záření. Dochází k částečnému nebo úplnému uzdravení. (Ullmann; Rosina, 2006; Rosina, 2013; Beneš, 2015)

4 VLIV IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA H2AX

Ionizující záření indukuje širokou škálu lézí DNA, z nichž nejzávažnější jsou DSB. Neúčinná oprava DSB vede k tvorbě chromozomálních aberací a je považována za kritickou událost. (Řezáčová, 2011; Zhang, 2016)

4.1 Molekulární mechanismy vedoucí k fosforylaci H2AX

Fosforylace H2AX je jedním z prvních dějů aktivovaných po vzniku DSB. V reakci na DSB je H2AX fosforylován na serinu 139 a vytváří ohniska v nebo v blízkosti DSB. Lze předpokládat úzkou korelaci mezi počtem ohnisek γ -H2AX a odhadovaným počtem DSB a nazývat tudíž γ -H2AX jako „marker DSB“. Fosforylovaný γ -H2AX je však indukován některými podmínkami, které nejsou DSB, a hojně se tvoří i v apoptóze, což vyvolává obavy z nadhodnocení míry γ -H2AX indukovaného po expozici IZ. Ústředními kinázami pro fosforylaci jsou tři kinázy z rodiny PI-3 kináz: ataxia telangiectasia mutated (ATM), ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) a DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). (Řezáčová, 2011; Zhang, 2016)

Fosforylace H2AX na serinu 139 je zprostředkována hlavně pomocí ATM kinázy, která je aktivována komplexem detekujícím DSB. Kinázová aktivita je dále zvyšována prostřednictvím její acetylace pomocí enzymu, který se akumuluje na místech DSB díky vazbě na trimetylovaný histon H3 (H3K9me3). Tato ATM kináza pak fosforyluje H2AX a hromadí se v místech DSB. K aktivaci ATR kinázy dochází zejména pod vlivem UV záření. Naproti tomu DNA-PK je zodpovědná za fosforylaci H2AX v průběhu apoptózy. (Luczak, 2018; Řezáčová, 2011)

Fosforylace H2AX se šíří po chromatinu obklopujícím DSB. V místě DSB pak dochází k akumulaci mnoha proteinů a vzniku tzv. zářením indukovaných ložisek. Kromě ATM nebo ATR kináz a γ -H2AX je zde lokalizováno několik dalších proteinů. Funkce těchto proteinů jsou různé. Některé formují funkční komplex, který slouží jako senzor pro DSB, jiné zase působí jako adaptorové molekuly a umožňují interakce ostatních proteinů s poškozeným místem. (Řezáčová, 2011)

4.2 Oprava DSB pomocí γ -H2AX

Přítomnost γ -H2AX je přímo rozpoznávána mediátorem DNA poškození (MDC1) prostřednictvím jeho tandemové C-terminální domény. Chromatinem vázaný MDC1 zahajuje kaskádu ubikvitinace proteinů prostřednictvím náboru E3 ligázy RNF8, která

ubikvitinuje histon H1. Ubikvitinovaný H1 rekrutuje další E3 ligázu RNF168, která katalyzuje monoubikvitinaci γ -H2AX, což je nezbytné pro následnou polyubikvitinaci chromatinových proteinů. (Luczak, 2018)

Tyto počáteční signalizační události jsou vyžadovány pro aktivaci opravných drah DSB. Na opravě DSB se podílejí dvě cesty – nehomologní spojování konců (NHEJ, non-homologous end joining) a homologní rekombinace (HR, homologous recombination). γ -H2AX hraje důležitou roli při modulaci obou cest. Cesta NHEJ je hlavním mechanismem opravy radiačně indukovaných DSB, jejíž core proteiny jsou Ku80 a Ku70. Buňky s nedostatkem některého z core proteinů vykazují větší přecitlivělost na IZ a sníženou schopnost znovu se napojit k radiačně indukovaným DSB. NHEJ je proces probíhající jak v proliferačních, tak v diferencovaných buňkách (např. neuronech) a je tak více náchylný k chybám. Nezbytná je pro NHEJ cestu monoubikvitinace γ -H2AX, zatímco HR je založená na následné polyubikvitinaci proteinu vázaného na protein K63. Tato homologní rekombinace je na rozdíl od NHEJ omezena na S- nebo G2-fázi po dokončení replikace DNA. Jedná se o bezchybný proces, který přednostně probíhá v proliferačních buňkách (např. progenitorech). Jakýkoli nedostatek těchto drah může vést ke stabilním mutacím vedoucím k rakovině, vývojovým abnormalitám a předčasnému stárnutí. (Meador, 2008; Weyemi, 2018; Sharma, 2012; Zhang, 2016; Luczak, 2018)

4.3 Deficit kináz a H2AX

Deficit kináz pro opravu DSB (hlavně ATM) vede k fatálnímu autozomálně recesivnímu neurologickému onemocnění známému jako ataxie telangiektázie (AT, ataxia telangiectasia). Pacienti s AT vykazují širokou škálu klinických projevů, včetně progresivní cerebelární degenerace, okulomotorické dysfunkce, zvýšeného výskytu rakoviny, endokrinních abnormalit, choreoatetózy, imunodeficience, zpomalení růstu, neúplného sexuálního zrání a předčasného stárnutí kůže. Nedostatek H2AX vede k neurobehaviorálním deficitům. Dále mohou buňky s deficitem H2AX vykazovat předčasnou a rozsáhlou apoptickou smrt. (Weyemi, 2018; Meador, 2008)

4.4 Možnosti detekce γ -H2AX

Ve srovnání s jinými technikami používanými k detekci poškození DNA, jako je kometová analýza nebo pulzní gelová elektroforéza, je detekce ohnisek γ -H2AX mnohem citlivější. Stejná výhoda platí ve srovnání s jadernými ložisky vytvořenými různými proteiny umožňující opravu DNA, jejichž detekce je technicky náročnější z důvodu jejich omezující

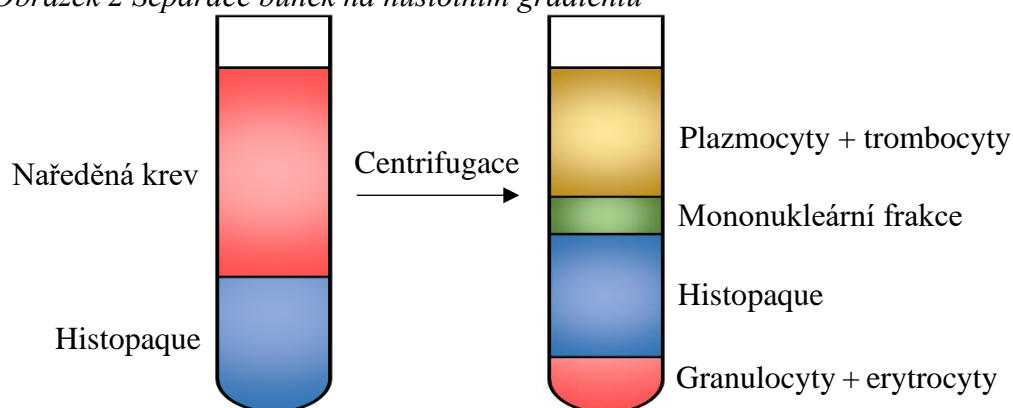
citlivosti nebo omezenějšího výskytu. Zatímco γ -H2AX lze detekovat ve všech fázích buněčného cyklu, ostatní ohniska jsou omezena na S- a G-fázi. (Sharma, 2012)

Metody využívané pro detekci γ -H2AX jsou založené na imunodetekci specifické primární protilátky. Jedná se o mikroskopii, imunoblot (western blot) a průtokovou cytometrii. Imunoblot měří celkové hladiny γ -H2AX v buňkách, je to nejjednodušší a relativně levná metoda. Poskytuje však pouze semikvantitativní ukazatele. Imunochemické značení a následná detekce v mikroskopu umožňuje sledovat vznik ohnisek a společnou kolokalizaci γ -H2AX s dalšími proteiny. Výsledkem je počet určených ložisek v jednotlivých jádrech. Výhodou je možnost sledovat vzájemnou lokalizaci, ale metoda je časově velmi náročná a při větším poškození, kdy ohniska splývají, nepřesná. Jako nejvýhodnější se pro detekci a kvantifikaci γ -H2AX jeví průtoková cytometrie. Umožňuje rychlé a přesné měření fosforylace H2AX v jednotlivých buňkách a vyžaduje relativně malý počet buněk. Tato metoda je nejrychlejší, kvantifikace je objektivní a je vhodná i pro rutinní stanovení. (Sharma, 2012; Řezáčová, 2011)

5 SEPARACE NA HUSTOTNÍM GRADIENTU

Metoda je založena na rozdílné hustotě separovaných buněk. Hlavním materiálem je plná krev odebraná do zkumavky s heparinem. Krev je pak naředěna v poměru 1:1 kultivačním médiem RPMI. Naředěná krev se navrství na vrstvu separačního činidla. Zkumavka se vloží do centrifugy na dobu a intenzitu potřebnou k dostatečné separaci, která je také závislá na objemu vzorku ve zkumavce (400 g, 15–30 minut). Vlivem odstředivé síly v centrifuze dojde k rozdělení složek krve podle jejich hustoty. Erytrocyty a granulocyty mají vyšší hustotu než monocyty a lymfocyty v mononukleární frakci, tudíž klesají ke dnu. (Bartůňková, 2011)

Obrázek 2 Separace buněk na hustotním gradientu



Zdroj: vlastní

Obrázek 2 znázorňuje krev se separačním činidlem Histopaque před a po centrifugaci. Zde je možné pozorovat jednotlivé složky krve, rozdělené podle hustoty. Částice s největší hustotou nasednou na dno centrifugační zkumavky.

Separace na hustotním gradientu je běžně využívanou metodou k přípravě buněk k následným funkčním testům (proliferace, průtoková cytometrie) a patří mezi základní imunologické techniky. (Bartůňková, 2011)

6 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

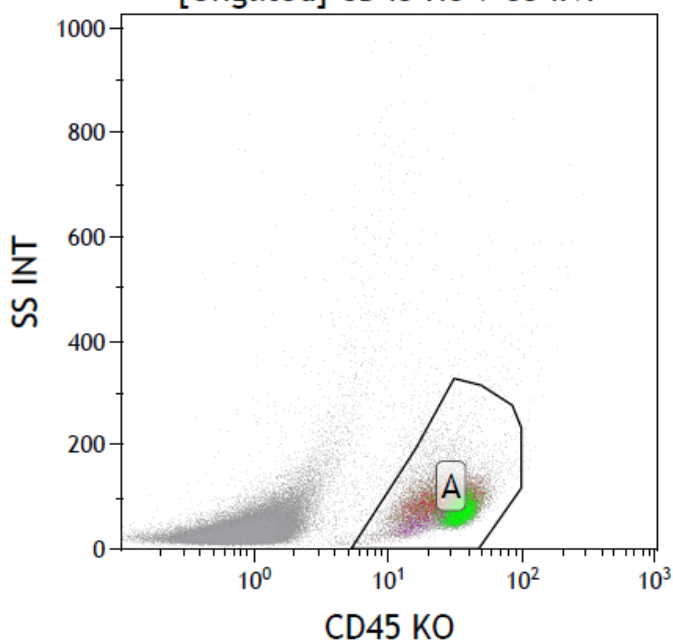
Průtoková cytometrie je standartní metoda pro analýzu buněk v suspenzi. Umožňuje studovat různé parametry, včetně povrchových i intracelulárních antigenů. Detekce je umožněna monoklonálními protilátkami s navázaným fluorescenčním barvivem, tzv. fluorochromem. Tyto molekuly jsou specificky navázány na antigeny buněk. Připravená suspenze takto značených buněk je vložena do průtokového cytometru. (Bartůňková, 2011; Penka, 2011; Bouchalová, 2016)

Díky přetlaku je v cytometru utvořen tenký laminární proud suspenze, v němž jsou buňky unášeny nosnou kapalinou. Procesem hydrodynamické fokusace jsou buňky vstřikovány do měřicí komory jedna po druhé. Tento proud je protnut laserovým paprskem. Jakákoliv částice v suspenzi způsobí, že je laserové světlo od ní odraženo a rozptýleno. V měřicí komoře dochází k tím většímu množství odraženého světla, čím je buňka více granulovaná (Tyndallův jev). Dalším jevem je světlo rozptýlené, které vykazuje přímou úměrnost s velikostí buňky. Je-li na buňce navázán fluorochrom, vzniká ještě světlo emitované. Každý světlem excitovaný fluorochrom po deexcitaci emituje foton – světlo o specifické vlnové délce. Toto emitované záření je detekováno fotonásobiči v optické části přístroje a výsledný signál je zpracován počítačově. Díky použití různých monoklonálních protilátek současně je možné stanovit přítomnost několika antigenů v buňce zároveň. Další výhodou je velké množství analyzovaných částic (např. oproti fluorescenčnímu mikroskopu). (Bartůňková, 2011; Penka, 2011; Bouchalová, 2016)

Analyzovanými parametry je kromě vlnové délky i velikost buňky vyjádřena v tzv. forward scatteru a komplexita (granularita) buňky, která je znázorněna pomocí tzv. side scatteru. Všechny tyto parametry získané převodem světelného signálu na elektrický jsou zaznamenávány ve formě tzv. listmode. Získaná data jsou následně analyzována počítačovými programy, a to nejčastěji pomocí nejjednodušších histogramů (procentuální zobrazení) nebo bodových grafů, tzv. dot plotů (jedna tečka představuje jednu buňku). (Bartůňková, 2011; Penka, 2011; Bouchalová, 2016)

Průtoková cytometrie je hojně využívána k diagnostice poruch imunity, haplotypu nebo imunofenotypu maligních buněk. Je proto dostupná hlavně v imunologii, hematologii i onkologii. (Bartůňková, 2011; Penka, 2011; Bouchalová, 2016)

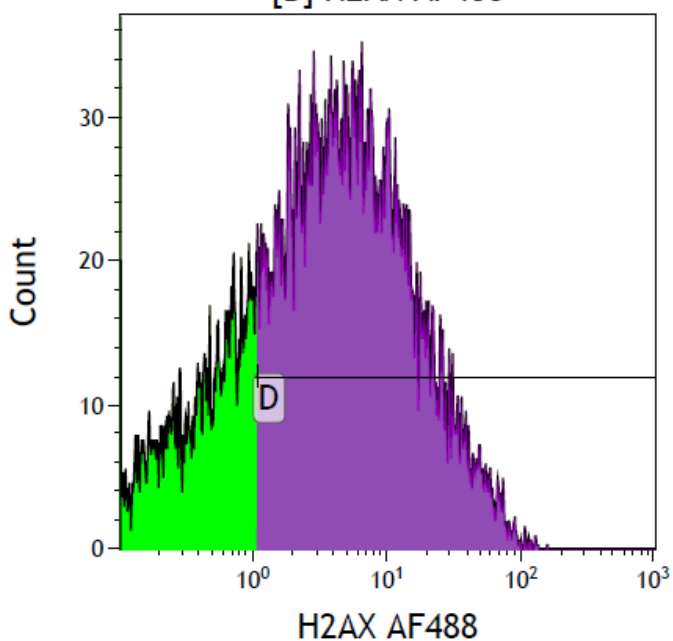
Graf 1 Grafické zobrazení bodového grafu (dot plotu), „základní leuko-gate“
[Ungated] CD45 KO / SS INT



Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 1 ukazuje způsob výběru („gatování“) populace lymfocytů (A), při kombinaci znaku CD45 a parametru SS (side scatter, boční rozptyl).

Graf 2 Grafické zobrazení histogramu
[B] H2AX AF488



Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 2 ukazuje způsob výběru („gatování“) H2AX pozitivní populace (D) jako jednoparametrový graf (histogram).

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

7.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem bylo zjistit, zda je exprese znaku γ -H2AX závislá na dávce ionizujícího záření.

7.2 Dílčí cíle

1. Dílčím cílem bylo nalézt vhodný postup pro stanovení míry exprese znaku γ -H2AX po ozáření gama zářením.
2. Na závěr bylo cílem zajistit vhodnou interpretaci získaných výsledků.

8 VÝZKUMNÉ OTÁZKY

Výzkumná otázka č. 1: Je množství analyzovaného znaku γ -H2AX v korelaci s dávkou záření?

Výzkumná otázka č. 2: Dochází ke změnám exprese γ -H2AX v dávkách 0,5 Gy, 1 Gy a 2 Gy gama záření?

Výzkumná otázka č. 3: Dochází ke změnám exprese γ -H2AX po 24 hodinách, 48 hodinách a 72 hodinách po vystavení gama záření?

9 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Pro praktickou část bakalářské práce bylo stanovení provedeno ze čtrnácti vzorků plné krve od zdravých 22–27letých dárců. Od každého dárce bylo získáno 16 ml plné krve. Jednotlivé vzorky byly odebrány do zkumavek s heparinem. Potřebná mononukleární frakce buněk byla získána separací na hustotním gradientu.

10 METODIKA PRÁCE

10.1 Separace na hustotním gradientu

Materiál

- plná krev odebraná do zkumavky s heparinem

Pomůcky

- zkumavky typu Falcon
- Pasteurovy pipety
- centrifugační zkumavky
- kultivační zkumavky
- automatická pipeta (+ špičky)

Reagencie

- RPMI 1640 (Lonza, USA)
- Histopaque®-1077 (Sigma, Velká Británie)
- L-Phytohaemagglutinin (EXBIO Praha, a.s, Česká republika)

Přístroje

- laminární box Labculture® Class II, Type A2 (Esco, USA)
- centrifuga Rotina 46R (Hettich Zentrifugen, Německo)
- termostat (Sheldon Manufacturing, Inc., USA)

Postup

Plná krev každého vzorku byla naředěna kultivačním médiem RPMI 1640 v poměru 1:1. Na dno centrifugační zkumavky byly napipetovány 2 ml separačního média Histopaque pomocí Pasteurovy pipety, které byly poté opatrně převrstveny naředěnou krví po horní rysku. Zkumavky byly vloženy do centrifugy, a to na 20 minut při 2 200 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo třeba získat ze zkumavky mononukleární frakci tvořenou pouze monocyty a lymfocyty. Tato frakce utvořila ve zkumavce tzv. obláček, který byl šetrně odsán Pasteurovou pipetou a vložen do nové centrifugační zkumavky. Zkumavka s mononukleární frakcí byla po horní rysku doplněna kultivačním médiem RPMI 1640. Následně byla směs centrifugována 10 minut při 2 000 otáčkách za minutu, čímž se směs promyla. Po

centrifugaci byl supernatant slitím odstraněn a suspenze na dně zkumavky byla doplněna o 2 ml kultivačního média RPMI 1640. Tato směs byla přepipetována do kultivační zkumavky, společně s mitogenem L-Phytohaemaglutinin (L-PHA) s 1 ml RPMI 1640. Konečná koncentrace mitogenu v reakční směsi byla 500 µg/ml. Toto pipetování bylo provedeno již automatickou pipetou, aby byl přenesen veškerý materiál. Do kultivační zkumavky bylo v posledním kroku dolito do 25 ml kultivačního média RPMI 1640. Takto připravená zkumavka byla dána na noc do termostatu nastaveného na 37 °C. Pro zamezení kontaminace vzorků byla veškerá manipulace s nimi prováděna sterilně v laminárním boxu.

10.2 Příprava vzorku a samotné ozáření gama zářením

Materiál

- kultivovaná buněčná suspenze

Pomůcky

- centrifugační zkumavky
- pístový nástavec pro pipety (+ serologické pipety)

Přístroje

- laminární box Labculture® Class II, Type A2
- zářič Gammacell® 1000 Elite (Best Theratronics, Kanada)
- termostat

Postup

Suspenze byla po 6 ml sterilně převedena pomocí pístové pipety do čtyř centrifugačních zkumavek, které jsou díky svým rozměrům kromě centrifugace vhodné i k ozařování. Tři zkumavky byly poté ozářeny gama zářením o intenzitě 0,5 Gy, 1 Gy a 2 Gy. Poslední zkumavka byla ponechána jako negativní kontrola. Ozáření proběhlo na cesiovém zářiči Gammacell® 1000 Elite. Ozářené vzorky byly ponechány 24 hodin v termostatu při 37 °C ke kultivaci.

10.3 Inkubace a intracelulární značení

Materiál

- ozářené buněčné suspenze + neozářená buněčná suspenze (negativní kontrola)

Pomůcky

- pracovní protokol
- pístový nástavec pro pipety (+ serologické pipety)
- cytometrické zkumavky
- automatická pipeta (+ špičky)

Reagencie

- PBS (pH 7,4) (Lékárna FN Plzeň Lochotín, Česká republika)
- BD Cytifix (4,2 %) (BD Biosciences, USA)
- Triton® X-100 (Life Technologies, USA)
- FBS (3 %) (Biosera, Francie)
- CD45 KO (Beckman Coulter, USA)
- CD3 PB (Beckman Coulter, USA)
- Alexa Fluor® 488 Mouse anti-H2AX (BD Biosciences, USA)

Přístroje

- laminární box Labculture® Class II, Type A2
- centrifuga Rotina 46R

Postup

Z každé ze čtyř zkumavek byly sterilně přeneseny 2 ml suspenze do čtyř cytometrických zkumavek, pomocí pístové pipety. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 3 minut při 1 800 otáčkách za minutu. Všechny vzorky byly slity a doplněny automatickou pipetou o 250 µl fosfátového pufru (PBS, phosphate buffered saline) o pH 7,4. Dále proběhla 3minutová centrifugace o 1 800 otáčkách za minutu. Poté, co byl supernatant slit, byla suspenze resuspendována. K resuspendované suspenzi bylo přidáno 250 µl fixačního roztoku BD Cytifix (4,2% PFA, paraformaldehyd). Směs byla po dobu 5 minut inkubována. Po inkubaci byly zkumavky vloženy do centrifugy, a to na 3 minuty a 1 800 otáček za minutu. Zcentrifugované zkumavky byly slity a ke zbylé suspenzi bylo napipetováno 250 µl PBS. Poté byly

zkumavky opět zcentrifugovány (3 minuty, 1 800 otáček za minutu), slity a resuspendovány. Pro permeabilizaci buněk bylo do zkumavky přidáno 250 μ l 0,1% roztoku Tritonu® X-100, který se ředí s 1% zásobním roztokem PBS v poměru 1:9. Tato směs byla inkubována po dobu 10 minut, centrifugována 3 minuty při 1 800 otáčkách za minutu a nakonec slita a resuspendována. Následně bylo k buňkám napipetováno 250 μ l 3% fetálního hovězí séra (FBS, fetal bovine serum), které blokuje reaktivní skupiny odkryté působením Tritonu® X-100. Poté opět byla provedena centrifugace po dobu 3 minut a 1 800 otáčkách za minutu. Byl slit supernatant a zbylá suspenze resuspendována. K resuspendovaným buňkám bylo napipetováno 5 μ l každé monoklonální protilátky. Pro stanovení znaku γ -H2AX bylo potřeba třech monoklonálních protilátek, kterými jsou CD45 KO (kromě orange), CD3 PB (pacific blue) a Alexa Fluor® 488 Mouse anti-H2AX. Takto označené buňky musely být ve tmě 30 minut inkubovány. Po uplynutí inkubace se směs nechala centrifugovat 3 minuty při 1 800 otáčkách za minutu. Po vyjmutí zkumavek z centrifugy byl slit supernatant a buňky resuspendovány. K buňkám byl napipetován 3% roztok FBS o objemu 250 μ l, zkumavky byly centrifugovány při stejných podmínkách jako v předchozích krocích, supernatant slit a buňky resuspendovány. Takto zpracované vzorky byly připraveny pro měření na průtokovém cytometru.

10.4 Stanovení na průtokovém cytometru

Materiál

- předem připravené buněčné kultury s navázanými protilátkami

Pomůcky

- automatická pipeta (+ špičky)

Reagencie

- PBS (Lékárna FN Plzeň Lochotín, Česká republika)

Přístroje

- průtokový cytometr Navios (Beckman Coulter, USA)

Software

- Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter, USA)

Postup

Připravená buněčná suspenze byla před samotným měřením doplněna o 400 μ l PBS, aby byl zvětšen objem, který je prosáván průtokovým cytometrem. Všechny vzorky byly vloženy do cytometru a pojmenovány. Měření na průtokovém cytometru proběhlo pomocí protokolu „fotoforeza.pro.“ Získaná data byla analyzována v programu Kaluza Analysis 2.1.

11 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

11.1 Analýza surových dat

Surová data jako výstup měření na průtokovém cytometru byla analyzována v programu Kaluza Analysis 2.1. Pomocí gatovací strategie byla vybrána jen ta data, která byla potřebná k vyhodnocení znaku γ -H2AX.

Dot plot CD45 KO/SS znázorňuje veškeré buňky ve vzorku, jimiž jsou lymfocyty a monocyty, obsažené v mononukleární frakci. Byla vybrána pouze populace lymfocytů pozitivní na znak CD45 popsaná jako gate A. CD45 negativní jsou již zmíněné monocyty, které pro toto měření nemají význam. Z populace lymfocytů byly vybrány gatem B CD3 pozitivní buňky – T-lymfocyty. CD3 negativními jsou pak označovány B-lymfocyty a NK buňky. Z výsledné populace byl vytvořen histogram se znakem γ -H2AX. Přímkou D ukazuje procento T-lymfocytů s poškozenou DNA. Grafický výstup dat z programu Kaluza Analysis 2.1 je vyobrazen v Příloha A. Grafický výstup udává procento zastoupení znaku γ -H2AX i číselně.

11.2 Interpretace výsledků

Pro analýzu bylo použito čtrnáct vzorků plné krve, ze které byla odebrána potřebná mononukleární frakce. Každá frakce byla rozdělena do čtyř vzorků (negativní, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy). Měření bylo získáno celkem 56 výsledků. Tabulka 1 znázorňuje procenta exprese znaku γ -H2AX u vybrané populace z každého vzorku.

Tabulka 1 Míra exprese znaku γ -H2AX

Vzorek	0 Gy [%]	0,5 Gy [%]	1 Gy [%]	2 Gy [%]
1	2,92	23,60	24,15	30,36
2	36,18	56,55	64,62	66,49
3	2,20	19,62	25,63	31,87
4	47,22	58,87	73,57	67,93
5	2,65	7,19	10,64	16,65
6	3,87	45,86	44,63	50,72
7	5,73	32,15	37,44	31,83
8	24,98	23,01	33,26	40,25
9	5,54	19,05	22,50	25,06
10	28,05	36,36	34,01	23,72
11	3,26	8,54	9,40	7,29
12	6,90	14,16	19,39	22,97
13	20,09	33,55	40,36	42,08
14	16,59	36,77	30,33	34,88

Medián	6,315	27,875	31,795	31,850
---------------	-------	--------	--------	--------

Zdroj: vlastní

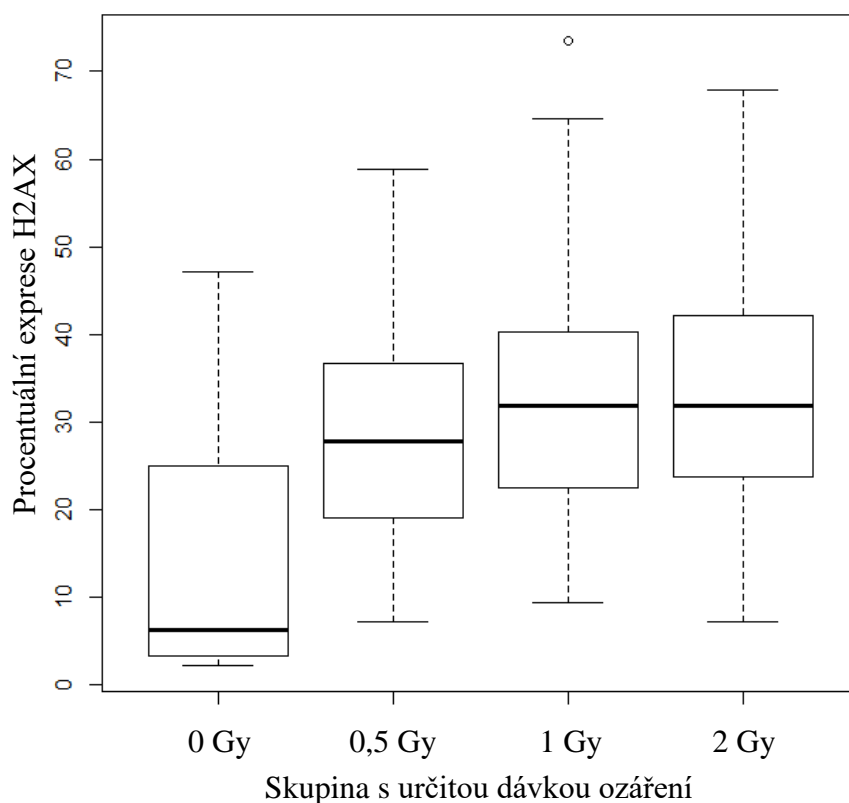
Tabulka 1 znázorňuje všechny naměřené výsledky. V tabulce je 14 hodnot představujících procentuální zastoupení znaku γ -H2AX ze všech buněk ze zkumavky u jednotlivých vzorků (100 %) pro každou úroveň ozáření. Ve spodní části tabulky jsou uvedeny mediány pro použité úrovně.

11.3 Statistické zhodnocení

Naměřené výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny v programu R (R Core Team, New Zealand). Pro zhodnocení byl aplikován Wilcoxonův test, který sleduje rozdíly mediánů.

Z Grafu 3 je viditelné, že mezi mediánem negativní kontroly (0 Gy) a vzorku ozářeného gama zářením o intenzitě 0,5 Gy byl zjištěn významný statistický rozdíl v expresi znaku γ -H2AX. Statistickou významnost potvrzuje i hodnota pravděpodobnosti (p) vypočítaná pomocí Wilcoxonova testu, jejíž hodnota činí 0,0106 (hodnoty $p > 0,05$ jsou považovány za statisticky nevýznamné).

Graf 3 Stanovení znaku γ -H2AX



Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Graf 3 znázorňuje velikost a rozmezí mediánů získaných z výsledků procentuálního zastoupení znaku v ozářených vzorcích, které byly výstupem z průtokového cytometru. Tento graf byl zpracován v programu R.

Rozdíly mezi mediány ozářených vzorků jsou sice z Grafu 3 také patrné, ale vzhledem k malému počtu vzorků statisticky nevýznamné. Pokud by bylo k dispozici např. sto vzorků, statistický rozdíl mezi mediány by mohl mít již význam. Pro úplnost představy o rozdílech mediánů pomocí hodnoty p je přiložena Tabulka 2. Zobrazuje rozdíly mediánů napříč jednotlivými skupinami ozářených vzorků.

Tabulka 2 Rozdíly mediánů

Medián skupiny		0,5 Gy	1 Gy	2 Gy
0 Gy	Δ	21,560	25,480	25,535
	p	0,0106	0,004162	0,001729
0,5 Gy	Δ		3,920	3,975
	p		0,5409	0,4544
1 Gy	Δ			0,055
	p			0,8036

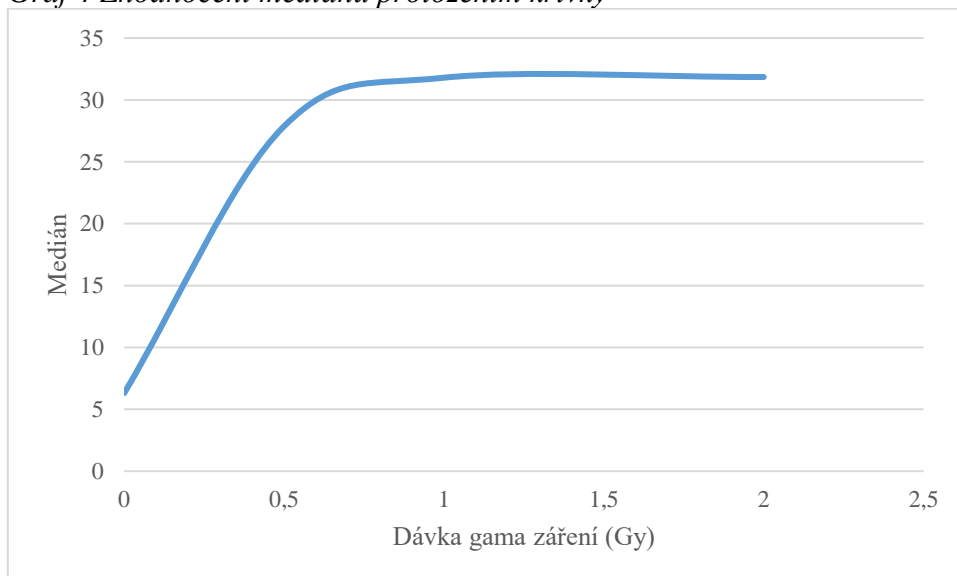
Zdroj: vlastní

V Tabulce 2 jsou znázorněny rozdíly mezi mediány pro jednotlivá stanovení označené Δ a jednotlivé hodnoty pravděpodobnosti p. Za statisticky významný rozdíl je považována pouze $p < 0,05$.

11.4 Zhodnocení mediánů proložením křivky

Pro zhodnocení mediánů proložením křivky byl použit program Excel (Microsoft, USA). Byl vytvořen spojnicový graf na základě dat o mediánech a intenzitě ozáření. Ukázalo se, že část mezi mediány negativních kontrol a vzorky ozáření 0,5 Gy gama záření má téměř lineární průběh, což je pro toto měření žádoucí. Dále je možné pozorovat zvyšující se medián s rostoucí dávkou gama záření na vzorek. Tato závislost je uvedena v následujícím Grafu 4.

Graf 4 Zhodnocení mediánů proložením křivky



Zdroj: vlastní

Graf 4 popisuje závislost velikosti mediánů na dávce ozáření jednotlivých skupin vzorků. Čím vyšší je dávka ozáření vzorků, tím vyšší je její medián.

DISKUZE

První výzkumná otázka bakalářské práce a také hlavní cíl práce dává za úkol zjistit, zda je míra exprese analyzovaného znaku γ -H2AX ve vzorku v korelaci s přijatou dávkou ionizujícího záření vzorkem. Dřívější studie Redona (2010) prokázala užitečnost stanovení γ -H2AX nejen pro odhadování velikosti dávek, ale také pro monitorování účinnosti opravy DSB u savců.

K hodnocení této, ale i dalších výzkumných otázek, bylo k dispozici čtrnáct vzorků plné krve od zdravých dárců. Plná krev byla zpracována tak, aby byla získána potřebná mononukleární frakce (monocyty, lymfocyty). Tato frakce každého dárce byla následně rozdělena do čtyř zkumavek. Jedna zkumavka každého dárce byla použita jako negativní kontrola, zbylé byly ozářeny dávkami gama záření na třech hladinách – 0,5 Gy, 1 Gy a 2 Gy. K ozáření byl použit gama zářič s cesiovým (Cs-137) zdrojem. Po 24hodinové inkubaci byla stanovena míra exprese znaku γ -H2AX.

Vlivem působení ionizujícího záření gama dochází u buněk ke dvouřetězcovým zlomům, jakožto nejzávažnějšímu poškození DNA vůbec. Po řadě kaskádovitých reakcí na DSB dochází k fosforylaci histonu H2AX a vzniká γ -H2AX. Dle Rogakoua (1998) po expozici dávkou 1 Gy gama záření vzniká v buňce cca 40 DSB a přibližně 1 % H2AX je fosforylováno. Každý DSB vyvolá fosforylaci zhruba 2 000 molekul H2AX. Fosforylovaná verze H2AX je snadno detekovatelná pomocí konkrétních protilátek a průtokové cytometrie. Histon γ -H2AX je proto považován za spolehlivý specifický marker DSB. Díky jeho povaze byla hledaná závislost mezi procentuálním zastoupením (expresí) γ -H2AX a dávkou přijatého záření statisticky potvrzena.

Obecně je známo, že faktory jako jsou druhy reagensů, náhodné chyby způsobené při zpracování vzorků, věk, pohlaví nebo životní styl dárců mohou výsledky zásadně ovlivnit. Vzhledem k malému počtu vyšetřovaných, ač zdravých, dárců je pravděpodobné, že měření je těmito faktory do jisté míry ovlivněno. V malé analyzované skupině vzorků mohou mít i malé odchylky jedině velký vliv na konečné výsledky. Sedelnikova (2008) uvádí, že podíl buněk obsahujících marker DSB (γ -H2AX) je vyšší u starších jedinců. Dále také prokázala, že se u starších jedinců vyskytuje výrazný nárůst celkového počtu buněk s ohnisky γ -H2AX. Vliv této odchylky je však v práci irelevantní, neboť dárce krve patří do mladé věkové skupiny jsou mezi nimi minimální věkové rozdíly.

Je důležité zmínit také fakt, že tvorba ložisek γ -H2AX se objevuje nejen v buňkách, ve kterých byly indukovány DSB, ale vznikají také jako odpověď na syntézu DNA nebo apoptózu buněk. Kvůli této skutečnosti jsou všechny výsledné hodnoty vyšší. Stejně tak je tomu i u kontrolních buněk, které nebyly ozářené, ale i tak nemají nulové hodnoty exprese γ -H2AX. Nicméně se předpokládá, že tato odchylka by měla být u všech vzorků totožná, díky čemuž nemá vliv na statistické hodnocení.

Ihned po ozáření buněk ionizujícím zářením začíná kromě fosforylace histonu H2AX současně i řada jiných procesů, snažících se DSB co nejrychleji opravit a v případě většího poškození buňku zničit, aby organismu neuškodila. Míra poškození a rychlost těchto mechanismů je, stejně jako exprese γ -H2AX, zároveň závislá na velikosti přijaté dávky IZ. Je proto velmi obtížné určit „ideální čas“ nejvyšší koncentrace ohnisek γ -H2AX ve vzorku po vystavení zdroji záření. Navíc, pro praktické využití by bylo mnohem užitečnější zjištění přesné časové dynamiky než pouze okamžiku nejvyšší koncentrace, v souvislosti s mírou exprese γ -H2AX po ozáření. To by pak mohlo být využito v reálných scénářích, jako jsou například radiační nehody. Pacientům by na základě známého času od ozáření a vyšetřené míry exprese γ -H2AX bylo zjištěno postižení zářením.

Dílčími cíli bylo shledání vhodného postupu pro stanovení míry exprese znaku γ -H2AX po vystavení zdroji gama záření a vhodné interpretace analyzovaných výsledků. Uvedená metodika práce vychází z metody pro stanovení γ -H2AX, extrakorporální fotoforesy. Při této metodě vznikají zlomy v DNA vlivem chemických látek a stanovení γ -H2AX je dlouhodobě zavedeno na 24 hodin po reakci s těmito látkami. Za vhodnou interpretaci výsledků se považuje specifická analýza surových dat z průtokového cytometru. Touto analýzou je myšlen výběr („gatování“) potřebných buněk, v tomto případě lymfocytů. „Gatování“ bylo provedeno v programu Kaluza Analysis 2.1.

Druhá výzkumná otázka bakalářské práce se týká změn exprese γ -H2AX mezi skupinami vzorků ozářené určitou přijatou dávkou gama záření. Bylo zpozorováno, že křivka má mezi hodnotami 0 Gy a 0,5 Gy téměř lineární průběh. Statistická změna o hodnotě pravděpodobnosti $p = 0,0106$ je tak velmi významná. Ostatní změny v expresi γ -H2AX oproti nulovému ozáření mají $p > 0,05$, čímž se z nich stávají změny považovány za statisticky nevýznamné. Vzhledem k omezeným možnostem zářiče byla nejnižší aplikovatelná dávka 0,5 Gy.

Míra exprese γ -H2AX byla ověřována i v rámci mediánu fluorescence (X-Med), ale změny nebyly patrné. Z toho vyplývá že pro stanovení znaku γ -H2AX není tato metoda tak vhodná, jako již zmíněné procentuální zastoupení míry exprese γ -H2AX.

Před samotným měřením bylo provedeno pokusné stanovení tří dávek záření a měření po 24, 48 a 72 hodinách. Jako nejlepší se jevílo stanovení po 24 hodinách, protože zde byla pozorována největší exprese znaku γ -H2AX. Pokles exprese u měření po více hodinách je způsoben buď vlivem opravných drah DNA nebo následného úmrtí buněk po vystavení gama záření. Tímto byla zodpovězena třetí výzkumná otázka.

Studie prokázaly, že maximální úrovně ohnisek γ -H2AX bylo dosaženo 30–120 minut po ozáření; postupně se poté snižovala, ale zbytková ohniska byla stále detekovatelná i za 24 hodin a později. (Hamasaki, 2007) Vzhledem k výchozí metodě, u které je exprese γ -H2AX měřena až po 24 hodinách, nebyly kratší časy ověřeny.

V budoucích studiích by se mohl výzkum soustředit na měření exprese γ -H2AX pouze v rozmezí dávek 0,5 Gy a menší. Nicméně k tomu je potřeba vhodnější zářič, než byl k dispozici pro tuto práci. Zároveň by bylo vhodné analyzovat indukci DSB na základě markeru γ -H2AX v kratších časech (v řádu desítek minut) po ozáření, případně zhodnotit celkovou časovou dynamiku exprese γ -H2AX po ozáření. Pro statisticky významější data by také bylo vhodnější mít k dispozici více než zmíněných čtrnáct vzorků, což pro tuto práci nebylo bohužel možné.

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala molekulou γ -H2AX, která vzniká v živých buňkách po vystavení ionizujícímu záření a dalším faktorům způsobujících buněčný stres. Několik vzorků krve, přesněji kultivované buněčné suspenze s mononukleární frakcí, bylo vystaveno různým dávkám gama záření. Expres γ -H2AX byla měřena pomocí průtokové cytometrie. Data byla analyzována a statisticky vyhodnocena.

V kapitolách teoretické části je popsán podrobný mechanismus eukaryotické buňky po vystavení různým vnějším i vnitřním faktorům, které způsobují poškození DNA. Dále je uveden výčet druhů ionizujícího záření a jejich využití ve zdravotnictví. Praktická část se věnuje samotnému postupu zpracování vzorků před i po ozáření a následnému vyhodnocení analyzovaných dat. Jednalo se o grafické a statistické zhodnocení naměřeného procentuálního množství γ -H2AX v jednotlivých vzorcích.

Všechny cíle byly splněny a podařilo se zodpovědět všechny výzkumné otázky této bakalářské práce. V budoucnu by mohla tato metoda najít uplatnění v praktických scénářích, a to například u zpětného určování přijaté dávky osob po radiačních nehodách. Má velký potenciál, nicméně bude třeba provést spoustu dalších stanovení a testů. Lze doporučit jak vhodnější zdroj záření, který je možné nastavit na velmi nízkou intenzitu, tak stanovení markeru γ -H2AX po méně než 24 hodinách po ozáření.

SEZNAM LITERATURY

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, Milan PAULÍK et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2., přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.

BENEŠ, Jiří, Jaroslava KYMPLOVÁ a František VÍTEK. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.

BOUCHALOVÁ, Kateřina, Marián HAJDÚCH et al. *Prediktivní a prognostická onkologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2016. ISBN 978-80-244-3188-8.

DOLEŽALOVÁ, Irena, Karol BOLČÁK a Robert KUBA. Využití pozitronové emisní tomografie (PET) v neurologii. *Neurologie pro praxi*. 2014, **15**(1), 16–21. ISSN 1213-1814.

HÁLA, Jiří. *Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie*. Brno: Konvoj, 1998. ISBN 80-85615-56-8.

HAMASAKI, Kanya, Kazue IMAI, Kei NAKACHI, Norio TAKAHASHI, Yoshiaki KODAMA a Yoichiro KUSUNOKI. Short-term culture and γ H2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2007, **48**(1), 38–47. ISSN 0893-6692.

KAHL, Grünter. *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics*. Volume 1 A–D. Fifth, Greatly, Enlarged Edition. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. ISBN 978-3-527-32852-9.

KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Překlad 4. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.

KUSALA, Jaroslav. Radioaktivita slouží. *Jaderná energetika*. Miniencyklopedie [online]. 2004 [cit. 15. 1. 2021]. Dostupné z: <https://www.cez.cz/edee/content/microsites/nuklearni/k23.htm>.

LAJČÍKOVÁ, Ariana a Luděk PEKÁREK. UV záření a jeho vliv na zdraví. *Hygiena*. 2009, **54**(2), 57–61. ISSN 1210-7840.

LÉČEBNÉ LÁZNĚ JÁCHYMOV a.s. Čím léčíme. *Lázně Jáchymov*. [online]. 2019 [cit. 15. 1. 2021]. Dostupné z: <https://www.laznejachymov.cz/cim-lecime/>.

LI, Liping, Kun DAI, Jiyuan LI et al. A Boron-10 nitride nanosheet for combinational boron neutron capture therapy and chemotherapy of tumor. *Biomaterials*. 2021, **268**(120587). ISSN 0142-9612.

LUCZAK, Michal W. a Anatoly ZHITKOVICH. Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018, **355**, 238–246. ISSN 0041-008X.

MAREK, Milan. Borová neutronová záchyťová terapie dnes. *Vesmír*. 2005, **84**(3), 132–134. ISSN 0042-4544.

MEADOR, JA, M ZHAO, Y SU, G NARAYAN, CR GEARD a AS BALAJEE. Histone H2AX is a critical factor for cellular protection against DNA alkylating agents. *Oncogene*. 2008, **27**(43), 5662–5671. ISSN 0950-9232.

NASHEUER, Heinz Peter. *Genome Stability and Human Diseases*. London: Springer Science+Business Media B.V., 2010. ISBN 879-90-481-3470-0.

PENKA, Miroslav, Eva TESAŘOVÁ et al. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. Hematologie. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

PRICE, Brendan D. a Alan D. D'ANDREA. Chromatin Remodeling at DNA Double Strand Breaks. *Cell*. 2013, **152**(6), 1344–1354. ISSN 0092-8674.

REDON, Christophe E., Asako J. NAKAMURA, Ksenia GOULIAEVA, Arifur RAHMAN, William F. BLAKELY a William M. BONNER. The Use of Gamma-H2AX as a Biodosimeter for Total-Body Radiation Exposure in Non-Human Primates. *PLOS ONE*. 2010, **5**(11). ISSN 1932-6203.

ROGAKOU Emmy P., Duane R. PILCH, Ann H. ORR, Vessela S. IVANOVA, William M. BONNER. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**(10), 5858–5868. ISSN 0021-9258.

ROSINA, Jozef, Jana VRÁNOVÁ, Hana KOLÁŘOVÁ a Jiří STANEK. *Biofyzika*. Pro zdravotnické a medicínské obory. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.

ROSTOVÁ, Jana, Lenka BORSKÁ, Zdeněk FIALA a Jan KREJSEK. Vybrané akutní účinky UV záření na organismus. *Vojenské zdravotnické listy*. 2006, **75**(1), 17–24. ISSN 0372-7025.

ŘEZÁČOVÁ, Martina, Radim HAVELEK, Emilie LUKÁŠOVÁ a Jiřina VÁVROVÁ. FOSFOROYLOVANÝ HISTON H2AX – NOVÝ INDIKÁTOR POŠKOZENÍ DNA. *Chemické listy*. 2011, **105**(2), 108–113. ISSN 0009-2770.

SEDELNIKOVA, Olga A. et al. Delayed kinetics of DNA double-strand break processing in normal and pathological aging. *Aging cell*. 2008, **7**(1), 89–100. ISSN 1474-9718.

SEIDL, Zdeněk et al. *Radiologie pro studium i praxi*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-4108-6.

SHARMA, Arishya, Kamini SINGH a Alexandru ALMASAN. Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. In: BJERGBÆK, Lotte, eds. *DNA Repair Protocols*. New York: Springer Science+Business Media, 2012. **920**, 613–626. ISBN 978-1-61779-997-6.

SINDEN, Richard R. *DNA Structure and Function*. San Diego: Academic Press, 1994. ISBN 978-0-12-645750-6.

ULLMANN, Vojtěch. Jaderná fyzika, Ionizující záření, Radiologie. *AstroNuklFyzika*. [online]. [cit. 29. 1. 2021]. Dostupné z: <https://astronuklfyzika.cz/strana2.htm>.

WEYEMI, Urbain, D. Paul BINDU, Adele M. SNOWMAN et al. Histone H2AX deficiency causes neurobehavioral deficits and impaired redox homeostasis. *Nature Communications* [online]. 2018, **1526**(9) [cit. 1. 1. 2021]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03948-9>.

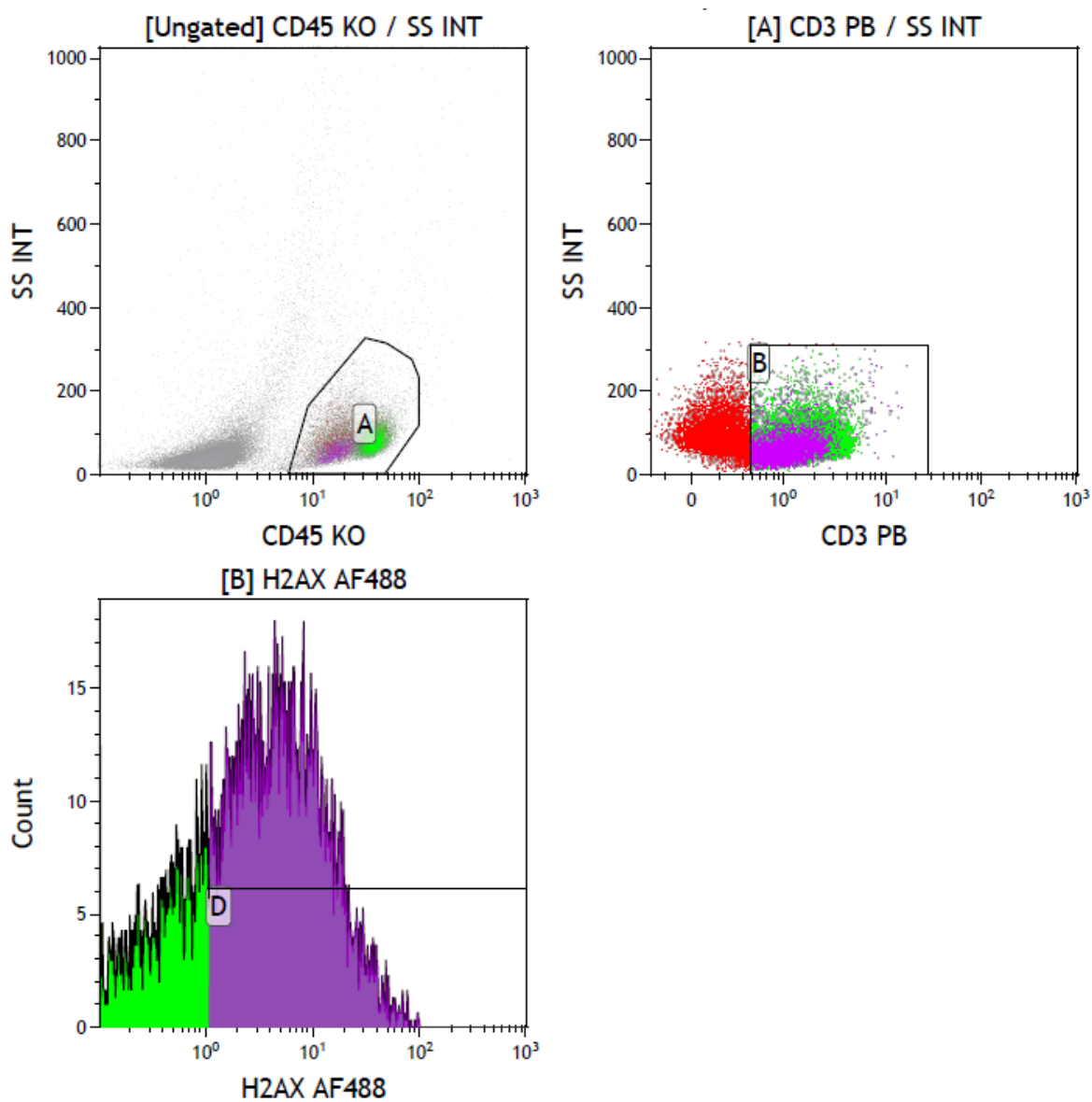
ZHANG, Junlin, Ying HE, Xianrong SHEN et al. γ -H2AX responds to DNA damage induced by long-term exposure to combined low-dose-rate neutron and γ -ray radiation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2016, **795**, 36–40. ISSN 1383-5718.

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha A – Grafický výstup dat z programu Kaluza Analysis 2.1

PŘÍLOHY

Příloha A – Grafický výstup dat z programu Kaluza Analysis 2.1



Gate	%Gated	X-Med
All	100.00	0.10
D	23.60	5.21

Zdroj: Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň