



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Srovnání experimentálních přístupů biodozimetrických metod
Comparing of Experimental Approaches of Biodosimetric Methods

Diplomová práce

Studijní program: Ochrana obyvatelstva

Studijní obor: Civilní nouzové plánování

Vedoucí práce: plk. gšt. doc. MVDr. Zuzana ŠINKOROVÁ, Ph.D.

Bc. Kateřina Zichová

Kladno, květen 2017

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Bc. Kateřina Zichová**
Studijní obor: Civilní nouzové plánování
Téma: **Srovnání experimentálních přístupů biodozimetrických metod**
Téma anglicky: Comparing of Experimental Approaches of Biodosimetric Methods

Zásady pro vypracování:

Předmětem práce bude srovnání dvou biodozimetrických metod sloužících ke zpětnému odečtu obdržené dávky ionizujícího záření. Cílem práce bude srovnat výsledky získané měřením pomocí těchto metod. Jde o standardní cytogenetický test (odečet mikrojadér) a perspektivní kvantitativní metodu stanovení zlomů DNA pomocí detekce H2AX proteinu. Tato metoda představuje méně používanou alternativu ke standardním metodám.

Teoretická část práce se bude zabývat oborem biodozimetrie, jež je v současné době jedním z funkčních prostředků, sloužících ke zpětnému odečtu dávky ozářených osob. Část moderních biodozimetrických metod je založena na sledování změn struktury, funkce a syntézy nukleových kyselin, které jsou v důsledku ionizujícího záření změněny a často nenávratně poškozeny.

V praktické části budou porovnány výsledky získané měřením pomocí výše citovaných metod a následně budou vyhodnoceny jejich přednosti a nedostatky. Výstupem práce bude porovnání přesnosti měření obou metod (zejména v rozmezí absorbované dávky 0,5 – 4 Gy); celkové srovnání výhod a nevýhod jednotlivých přístupů s následným doporučením pro praxi.

Seznam odborné literatury:

- [1] NAVRÁTIL, Leoš, ROSINA, Jozef, Medicínská biofyzika, ed. 1., Praha: Grada Publishing, 2005, ISBN 978-80-247-1152-2
- [2] ŠINKOROVÁ, Zuzana, NAVRÁTIL, Leoš, Biomedicínská detekce ionizujícího záření: organizace zdravotnické péče po zevní kontaminaci radionuklidy, ed. 1., Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2014, ISBN 978-80-01-05626-4
- [3] ONDŘEJ, Vladan, Základy radiobiologie, ed. 1., Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, ISBN 978-80-244-3426-1

Vedoucí: plk. gšt. doc. MVDr. Zuzana Šinkorová, Ph.D.

Zadání platné do: 20.08.2018

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 12.12.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Srovnání experimentálních přístupů biodozimetrických metod vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Hradci Králové dne 18.05.2017

.....

podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí této diplomové práce paní doc. MVDr. Zuzaně Šinkorové, Ph.D. za možnost pracovat na Katedře radiobiologie, Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, za cenné rady a velice vstřícný přístup během mého výzkumu. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Marcele Jeličové za odbornou pomoc a dohled při práci v laboratoři, zpracovávání dat a vytvoření příjemného prostředí.

Zvláště bych pak chtěla poděkovat rodině a přátelům za všestrannou podporu po celé období mého studia.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá srovnáním dvou biodozimetrických metod sloužících ke zpětnému odečtu obdržené dávky ionizujícího záření. Cílem práce je porovnat výsledky získané měření pomocí standardního cytogenetického testu a nového experimentálního přístupu, který umožňuje efektivní kvantifikaci zlomů DNA v jádře periferních lymfocytů pomocí proteinu gama H2AX.

V teoretické části jsou popsány biologické účinky ionizujícího záření, druhy záření s jejich následným rozdělením do podskupin a jejich vlastnosti. Dále se v práci popisuje vztah dávky a účinku, deterministické a stochastické účinky ionizujícího záření i možné genetické změny či akutní nemoc z ozáření. V další části je popsán obor biologická dozimetrie, přes přiblížení od historických počátků až po současné trendy, význam oboru pro praxi a dále přehledné rozdělení biodozimetrických metod. Podrobněji jsou popsány cytologické a cytogenetické laboratorní metody a metoda vícebarevné průtokové cytometrie.

Další částí je stanovení cílů diplomové práce a následně podrobněji popsána hypotéza, jež je v práci použita.

V experimentální části je představen zvířecí model, jenž byl pro tuto práci použit a byl tak klíčovým bodem pro celou práci. Dále následuje metodický popis, jak probíhala izolace lymfocytů z periferní krve experimentálního zvířecího modelu, práce s buňkami a přípravy buněčných suspenzí pro jednotlivé experimentální přístupy. Podrobně je zde vysvětlen postup kultivace a ozařování analyzovaných vzorků gama zářením.

Detailně se metodika věnuje mikrojadernému testu, kde je uveden nejen jeho přesný postup provedení, ale i všechna důležitá kritéria při mikroskopickém vyhodnocení mikrojaderných. Obdobně je popsáno stanovení jaderného proteinu H2AX pomocí vícebarevné průtokové cytometrie, kde důležitou roli hraje zejména správná fixace připravovaných vzorků. U obou metod jsou uvedeny všechny používané chemikálie, přístroje a způsob, jak byly vzorky vyhodnoceny, včetně statistické analýzy.

Ve výsledkové části práce byly vytvořeny přehledné grafy s výsledky, jenž byly na závěr vyhodnoceny a v diskuzi porovnány s experimentálními přístupy a výsledky

autorů zabývajících se stejnou problematikou. Nejdůležitější částí práce je závěr, kde je provedeno konečné srovnání obou metod a jejich přínos pro současný obor radiobiologie.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ionizující záření; metody; biodozimetrie; biologické účinky záření; dávka.

ABSTRACT

This work deals with comparison of two bio-dosimetric methods used to assess received dose of ionizing radiation. The aim of the study is to compare the results obtained using a standard cytogenetic assay and a new experimental approach that allows effective quantification of DNA breaks in nuclei of peripheral lymphocytes represented by gamma H2AX protein.

The theoretical part describes the biological effects of ionizing radiation, types of radiation with their subsequent subdivisions and their properties. Further, the thesis describes dose and effect relationship, deterministic and stochastic effects of ionizing radiation as well as possible genetic changes or acute radiation illness. In the next part, the field of biological dosimetry is described, including its historical beginnings to the current trends, the importance of the field in practice and the overview of biodosimetric methods. Cytological and cytogenetic laboratory methods and method of multicolored flow cytometry are described in more detail.

In the next part, the goals of diploma thesis are determined and subsequently, more detailed description of hypothesis used in the thesis is offered.

In the experimental part, the animal model is presented. The model was a key source of cells for further in vitro experiments. Then, the methodical description of lymphocyte isolation from peripheral blood of experimental animal model, processing of cells and preparation of cell suspensions for individual experimental approaches follow. A detailed description of cultivation procedure and irradiation of analyzed samples by gamma radiation is provided.

In detail, the methodology is dedicated to the micronucleus test. We explained its precise methodology and all important criteria for microscopic evaluation of micronuclei. Similarly, the determination of nuclear protein H2AX by multicolored flow cytometry is described, in which the correct fixation of prepared samples plays an important role. Both methods include all the chemicals used, the instruments and the way the samples were evaluated, including statistical analysis.

In the result section of the thesis, graphs were created, and were evaluated and discussed in the discussion with experimental approaches and results of authors dealing with the same research topic. The most important part of the thesis is the conclusion, in which of both methods were compared and their contribution to the current field of radiobiology was assessed.

KEYWORDS

Ionizing radiation; methods; biodosimetry; biological effects of irradiation; dose.

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	SOUČASNÝ STAV	8
2.1	Biologické účinky ionizujícího záření	8
2.1.1	Druhy záření a jejich účinky.....	8
2.1.2	Vztah dávky a účinku.....	11
2.1.3	Deterministické a stochastické účinky záření.....	12
2.1.4	Akutní nemoc z ozáření.....	13
2.1.5	Genetické změny.....	13
2.2	Biologická dozimetrie.....	13
2.2.1	Význam biodozimetrie	15
2.2.2	Biodozimetrické metody	16
2.2.3	Cytologické laboratorní metody	17
2.2.4	Cytogenetické metody.....	20
2.2.5	Průtoková cytometrie	26
3	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA	30
4	METODIKA.....	31
4.1	Experimentální model.....	31
4.2	Periferní krev a izolace lymfocytů	31
4.3	Počítání buněk a příprava buněčných suspenzí.....	32

4.4	Ozařování vzorků a kultivace.....	32
4.5	Mikrojaderný test.....	33
4.5.1	Postup provedení mikrojaderného testu.....	33
4.5.2	Kritéria pro vyhodnocování mikrojaderných (MN).....	34
4.6	Stanovení H2AX.....	34
4.7	Chemikálie a přístroje.....	36
4.7.1	Chemikálie pro izolaci a kultivaci lymfocytů.....	36
4.7.2	Chemikálie pro provedení mikrojaderného testu.....	36
4.7.3	Chemikálie pro stanovení histonu H2AX.....	36
4.7.4	Nástroje a materiál.....	37
4.7.5	Přístroje.....	37
4.7.6	Vyhodnocení pokusů.....	38
5	VÝSLEDKY.....	39
5.1	Stanovení gama H2AX.....	39
5.2	Vyhodnocování mikrojaderných.....	41
5.3	Kalibrační křivky dvou biodozimetrických metod.....	45
5.4	Porovnání získaných hodnot v rozsahu dávek 0,5 – 4 Gy.....	47
6	DISKUZE.....	54
7	ZÁVĚR.....	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62

9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
10	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	72
11	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK	73
12	SEZNAM PŘÍLOH.....	74

1 ÚVOD

Účinky ionizujícího záření se projevují ve větší či menší míře u všech druhů živých organismů. Závažnost těchto účinků a hodnota dávky ionizujícího záření, která je vyvolává, závisí na druhu organismu. Často se jedná o účinky negativní, jsou však známy případy, kdy ionizující záření vyvolává v živých organismech změny pozitivní.

Předmětem práce je srovnání dvou biodozimetrických metod sloužících ke zpětnému odečtu obdržené dávky ionizujícího záření. Cílem práce je srovnat výsledky získané měřením pomocí těchto metod. První metodou je standardní cytogenetický test (odečet mikrojader), který je srovnán s novou, perspektivní metodou stanovení dvojitých zlomů DNA pomocí detekce proteinu H2AX. Tato metoda představuje méně používanou alternativu ke standardním metodám. Moderní biodozimetrické metody jsou založeny na sledování změn struktury, funkce a syntézy proteinů nebo nukleových kyselin, které jsou v důsledku působení ionizujícího záření změněny a často nenávratně poškozeny.

Teoretická část práce se zabývá oborem biodozimetrie a biologickými účinky ionizujícího záření.

V praktické části jsou porovnány výsledky získané měřením pomocí výše zmíněných metod společně s vyhodnocením jejich předností a nedostatků. Výstupem práce je porovnání přesnosti měření obou metod, zejména v rozsahu absorbované dávky 0,5 - 4 Gy, celkové srovnání výhod a nevýhod jednotlivých přístupů s následným doporučením pro praxi.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Biologické účinky ionizujícího záření

Ionizující záření je tok hmotných částic či fotonů elektromagnetického záření, které jsou schopny ionizovat atomy prostředí nebo excitovat jejich jádra. Vzniká jako doprovodný jev jaderných procesů. U těchto procesů se dostává jádro (nebo obal) atomu do excitovaného stavu a stává se tak energeticky nestabilní. Stabilní stav získá vyzářením energie ve formě částic nebo fotonů elektromagnetického záření [1].

S ohledem na charakter ionizačního procesu se ionizující záření dělí na přímo a nepřímo ionizující. Přímo ionizující záření je tvořeno nabitými částicemi (elektrony, protony, pozitrony, částicemi alfa a beta apod.) mající dostatečnou kinetickou energii k tomu, aby mohly vyvolat ionizaci. Nepřímo ionizující záření zahrnuje nenabitě částice (fotony, neutrony apod.), které samy prostředí neionizují, ale při interakci s prostředím uvolňují sekundární neboli přímo ionizující nabitě částice. Ionizace prostředí je pak způsobena právě těmito sekundárními částicemi [2, 3].

Absorpce energie ionizujícího záření v látce má kvantový charakter, dochází zde k ionizacím a excitacím atomů či molekul a energie je předávána elektronům.

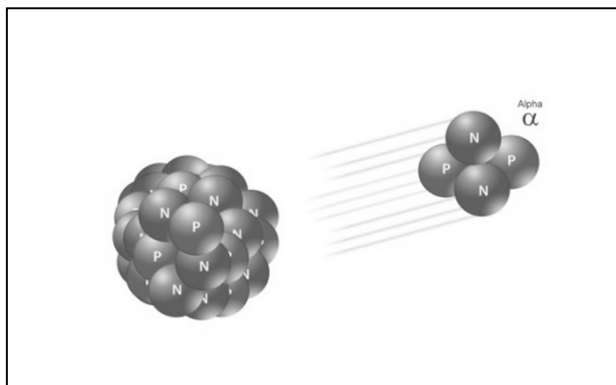
Jelikož biologické systémy obsahují vysoké procento vody, je značná část energie ionizujícího záření absorbována právě ve vodě. Při interakci ionizujícího záření s molekulami vody vznikají vysoce reaktivní produkty, jako je hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$, vodíkový radikál $\text{H}\cdot$, hydratovaný elektron e_{aq}^- a v přítomnosti kyslíku vzniká také značné množství peroxidu vodíku H_2O_2 . Všechny tyto produkty mohou vyvolávat sekundární reakce s biologickými molekulami, jedná se pak o nepřímém účinku ionizujícího záření – na rozdíl od přímého, kdy je energie ionizujícího záření přenesena bezprostředně na biologickou molekulu [4,5].

2.1.1 Druhy záření a jejich účinky

Záření alfa (α)

Záření alfa vzniká při radioaktivním rozpadu atomu, kdy mateřské jádro vyzáří částici alfa (emitování jader helia $2p + 2n$) a posouvá se v Periodické tabulce prvků o dva prvky doleva. Přebytek energie mateřského jádra se uvolní ve formě kinetické

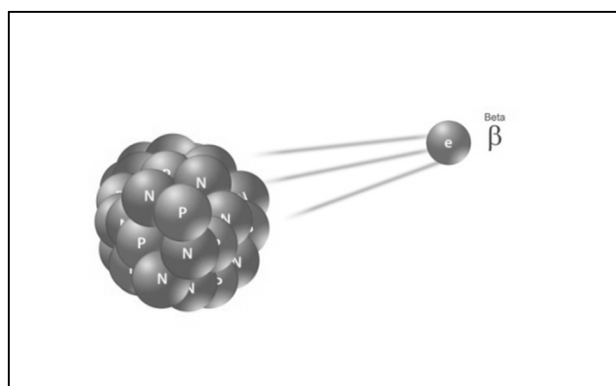
energie, přičemž většinu odnáší částice alfa, protože je vůči dceřinému jádru lehká. Vzhledem k náboji a hmotě alfa částice silně interagují s hmotou a dolet mají pouze několik centimetrů ve vzduchu. Alfa částice jsou schopny proniknout do vnější vrstvy odumřelých kožních buněk. Pokud by byla emitující látka požitá v potravinách nebo ve vzduchu, může způsobit vážné zdravotní problémy [5,6].



Obr. 1 - Emise alfa částice z jádra atomu [6]

Záření beta (β)

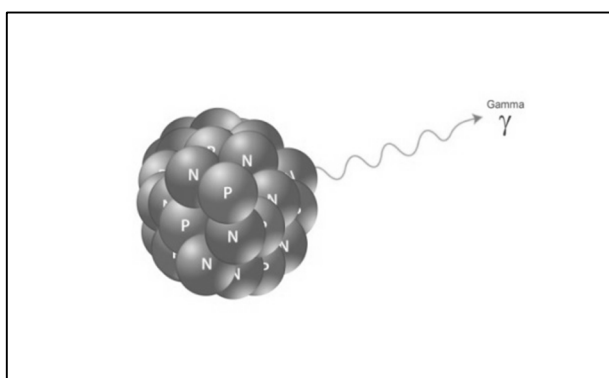
Beta záření má podobu buď jako elektron nebo pozitron (částice o velikosti a hmotnosti elektronu, ale s kladným nábojem) emitované z atomu. Vzhledem k malé hmotnosti je schopen dále cestovat ve vzduchu, a to až na několik metrů, může být však zastaven větší vrstvou plastu nebo stohem papíru. Při průniku kůží představuje poněkud velké zdravotní riziko, nicméně hlavní hrozba je stále převážně z vnitřního požití látky [7].



Obr. 2 - Emise beta částice z jádra atomu [6]

Záření gama (γ)

Gama záření se na rozdíl od alfy nebo beta záření neskládá z částic, ale z fotonů energie emitované z nestabilního jádra. Toto záření vzniká v jádře atomů při změně energetického stavu jádra za emise či absorpce částic. Gama záření má vysokou pronikavost a ztrácí (v průměru) polovinu své energie na každých 500 stop. Gama vlny lze odstínit dostatečně hustou vrstvou materiálu s vysokým atomovým číslem, jako je olovo nebo ochuzený uran [6].



Obr. 3 - Emise vysokoenergetické vlny z jádra atomu [6]

Svým charakterem odpovídá proudu fotonů či elektromagnetického vlnění, které je charakterizováno zanedbatelnou kvantovou hmotností fotonů, nulovým nábojem a vlnovou délkou 10^{-12} - 10^{-15} m. Do tohoto spektrálního pásma zasahuje i velmi tvrdé rentgenové záření, přičemž hranice mezi rentgenovým a gama zářením se překrývají. Tyto druhy záření se rozlišují dle svého zdroje, ale jinak se fyzikálně neliší [8].

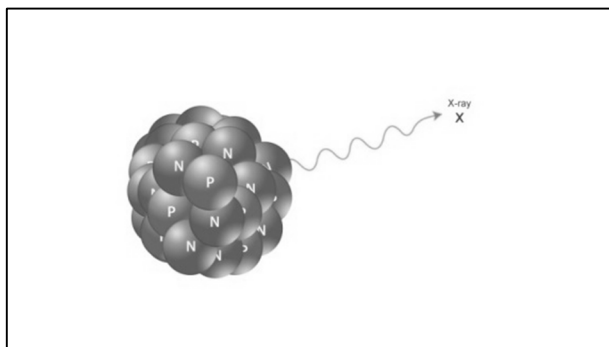
Fyziologické účinky gama záření:

Přestože gama záření je méně ionizující než alfa a beta, je pro živé organismy více škodlivé. Může způsobit různá poškození podobně jako rentgenové záření např. popáleniny, onkologická onemocnění či genové mutace. Je velice důležité se před tímto druhem záření chránit [9].

Rentgenové záření (RTG)

Rentgenové paprsky jsou podobné gama záření, s hlavním rozdílem, že foton RTG záření vzniká při interakcích vysoce energického elektronu, kdežto záření gama

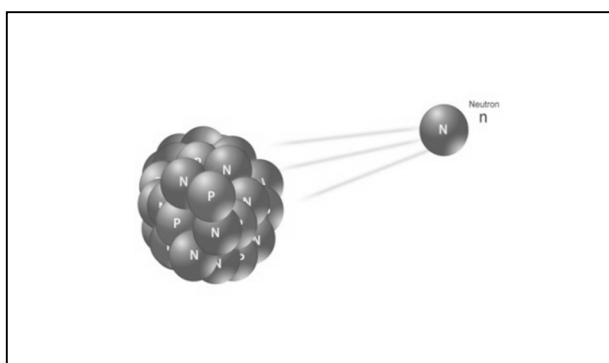
při procesech uvnitř jádra atomu. To je obecně způsobeno energetickými změnami v elektronu, jako je například přechod z vyšší energetické hladiny na nižší, což způsobuje přebytek energie, která má být uvolněna. Vlnová délka RTG záření se pohybuje v intervalu od 10^{12} - 10^8 m a šíří se rychlostí světla [5].



Obr. 4 - Emise vysoké energetické vlny z elektronového obalu atomu [6]

Neutrony

Dolet neutronů podléhá beta rozpadu. Skládá se z volného neutronu, obvykle emitovaného v důsledku spontánního nebo indukovaného jaderného štěpení. Jsou schopné cestovat stovky nebo dokonce tisíce metrů ve vzduchu, lze je však dobře odstínit materiálem bohatého na vodík, jako je beton nebo voda [6].



Obr. 5 - Emise neutronu z jádra atomů [6]

2.1.2 Vztah dávky a účinku

Při úvahách o účincích ionizujícího záření je základní veličinou absorbovaná dávka ve zkoumané látce. Dávka je však makroskopickou veličinou a nezahrnuje v sobě okamžité rozložení lokální energie přenesené na látku, jenž může výsledné účinky

ionizujícího záření ovlivnit. Řada jevů vyvolaných ionizujícím zářením (genetické změny, chemické změny, úhyn buněk, mutace) závisí na prostorovém rozložení dílčích přenosů energie jednotlivých ionizujících částic na ozařovanou látku. Z hlediska vztahu dávky a účinku jsou rozlišovány dva základní typy účinků a to stochastické a deterministické [10, 11].

2.1.3 Deterministické a stochastické účinky záření

Deterministické účinky

Pro deterministické účinky je charakteristická prahová závislost na dávce kvantitativním ukazatelem, pomocí něhož lze odhadnout možné následky ozáření. Je ohraničena prahovou dávkou charakteristickou pro daný účinek. U těchto dávek dochází k inhibici buněčného dělení, které mohou mít za následek i buněčnou smrt a následují akutní somatické účinky. Mezi tyto účinky řadíme akutní nemoc z ozáření (obrázek 6), akutní lokalizované poškození, nenádorová pozdní poškození (plicní fibróza, chronická dermatitida) a poškození plodu *in utero* [12].



Obr. 6 - Projevy deterministických biologických účinků ionizujícího záření [13]

Stochastické účinky

Stochastické účinky někdy nazývají také jako pravděpodobnostní, jelikož se stoupající dávkou stoupá i pravděpodobnost poškození. Mohou vyvolávat některé chorobné změny projevující se v průběhu dnů až týdnů, jiné v průběhu roků a desetiletí. U těchto účinků může nastat maligní transformace buněk s následným vznikem nádorů či mutace s následnými genetickými efekty. Na základě znalostí lze pro činnosti za

kontrolovaných podmínek vymezit cíle a kritéria radiační ochrany a pro případy mimořádných situací spojených s ozářením lidí odhadnout možné následky [4, 5].

2.1.4 Akutní nemoc z ozáření

Akutní nemoc z ozáření (akutní postradiační syndrom) se rozvíjí po jednorázovém ozáření celého těla nebo jeho větší části dávkou přibližně od 1 Gy a výše. V závislosti na stupni ozáření převládají v klinickém obraze příznaky od poškození krvetvorných orgánů (hematopoetický syndrom), přes gastrointestinální syndrom až k poškození cévního a centrálního nervového systému (neurovaskulární syndrom) [1].

2.1.5 Genetické změny

Mezi stochastické účinky jako pozdní bezprahové účinky ionizujícího záření je možnost postižení potomstva ozářených osob. Podkladem genetických změn je mutace pohlavní buňky, což je změna v genetické informaci buňky. Genetický účinek ionizujícího záření spočívá ve zvýšené frekvenci mutací v porovnání s mutacemi vznikajícími spontánně. Jelikož je mutovaný gen schopen reprodukce při dělení buňky, je mutace předávána do dalších generací. Splnutím mužské a ženské zárodečné buňky v období před nebo krátce po vnoření do děložní sliznice matky může v důsledku své nepříznivé genetické skladby velmi časně zaniknout, tento typ poškození se projeví jako neúspěšné oplození. V jiném případě dojde k vývoji zárodku, ale těhotenství končí předčasným porodem, potratem, úmrtím novorozence časně po porodu nebo porodem dítěte s vrozenou vadou (genetické vlivy se na samovolné potratovosti podílí z 20 - 25 %) [14, 15].

Jiným příkladem následků jsou geneticky podmíněné vývojové vady, např. Downova nemoc. Geneticky podmíněné a tudíž i zářením zasažitelné jsou i některé komplexní biologické charakteristiky, jako je inteligence, fyzická síla, motorická hbitost apod. Je odhadováno, že mutovaný gen setrvává v populaci asi 40 generací [16].

2.2 Biologická dozimetrie

Ionizující záření má negativní vliv na zdraví člověka, a proto je kladen důraz na co nejpřesnější určení velikosti absorbované dávky u ozářených osob. V dnešní době jsou lidé více vystavováni ionizujícímu záření prostřednictvím rutinních klinických

procedur a existuje i určité riziko radiačních nehod či terorismu. Expozice vyšším dávkám ionizujícího záření vede k deterministickým účinkům, které se projevují např. akutní nemoci z ozáření. Mimo jiné mezi stochastické účinky ozáření patří významné zdravotní problémy, jako jsou například různá onkologická onemocnění [17, 18].

Jedním z důležitých oborů, jak zjistit obdrženou dávku ionizujícího záření v období po ozáření, je vedle fyzikální dozimetrie tzv. biologická dozimetrie (biodozimetrie). Biodozimetrii lze charakterizovat jako subdisciplínu oboru radiobiologie, která určuje zpětně velikost absorbované dávky podle intenzity a druhu postradiační odpovědi organismu. Velká pozornost je proto věnována na základě postradiačních změn na celkové, orgánové, tkáňové, buněčné nebo molekulární úrovni organismu [19].

V minulém století se biodozimetrie zaměřovala zejména na popis postradiačních dějů a biodozimetrických ukazatelů na úrovni celého organismu a orgánu samotných. Využití těchto znalostí má v biodozimetrické praxi řadu úskalí, mezi které počítáme např. nízkou citlivost některých metod, relativně dlouhou latenci postradiačních změn, anebo vysokou finanční či edukační náročnost [20].

Dnešní trend zpětné rekonstrukce obdržené dávky ionizujícího záření se zaměřuje na metody sledující změny na buněčné a molekulární úrovni organismu. Zlatým standardem při zpětném hodnocení obdržené dávky ionizujícího záření je stanovení chromozomálních aberací. Tato metoda je používána i v současnosti, výsledky jsou ale dostupné až za relativně dlouhý čas, nejdříve 3. den od dodání vyšetřovaného vzorku do laboratoře [21].

V polovině šedesátých let minulého století bylo zjištěno, že počty chromozomálních aberací v lymfocytech ozářené periferní krve jsou dávkově závislé a mohou sloužit jako citlivý indikátor radiační expozice. Stanovení počtu chromozomálních aberací po expozici ionizujícího záření se stalo základní metodou biodozimetrie, prováděné pomocí mikroskopické analýzy chromozomů v jádrech hematopoetických buněk [22, 23].

V reakci na ozáření buňky má důležitou úlohu aktivace tumor supresorového proteinu p53, který dále reguluje blok buněčného cyklu, reparaci poškozené DNA nebo

aktivuje apoptózu cestou aktivace dalších genů a proteinů. Ionizující záření vytváří v jádře takto ozářených buněk dvojité zlomy dvoušroubovice DNA, jež má dvě formy reparace. První formou je nehomologní rekombinantní reparace probíhající v G1 - fázi buněčného cyklu. Formou druhou je homologní rekombinantní reparace DNA, jež je významná především v G2 - fázi buněčného cyklu [20, 24]. V této formě jsou v jádře dvě sady chromozomů a dvoušroubovice DNA nepoškozená dvojitým zlomem slouží jako vzor k opravě poškozeného úseku DNA druhé dvoušroubovice. Proto blok buněčného cyklu v G1 a v G2/M/ fázi slouží k opravě DNA a jsou důležitými faktory pro další funkci a existenci ozářených buněk [14, 20, 25].

2.2.1 Význam biodozimetrie

Na rozdíl od situací, při kterých lze expozici osob ionizujícího záření předpokládat a tedy i cíleně měřit dávku ozáření např. osobními dozimetry, úroveň náhodného a nepředvídatelného ozáření, ke kterému dochází při nehodách a útoku zbraněmi emitujícími ionizující záření, lze určovat pouze *ex post* a to na základě měření stupně poškození tkání a buněk ozářeného organismu. Biodozimetrie lze využít jak k upřesnění dávky stanovené fyzikálními metodami dozimetrie, tak i v případě absence dozimetrie ke kvalifikovanému zpětnému odečtu dávky. Praktické využívání biodozimetrie, tedy i její význam, lze předpokládat ve všech oblastech lidského konání, kde je zahrnut faktor ionizujícího záření [20].

Jedná se tedy převážně o pracovníky činné v riziku ionizujícího záření. První skupinou je výroba, zpracování a likvidace zdrojů ionizujícího záření. Zde jde zejména o pracovníky uranových dolů, kteří jsou nejvíce ohroženi vysokým obsahem radonu především ve vzduchu, na což dosud nemá současná věda žádný biodozimetrický ukazatel. Dále zpracovatelského průmyslu, jaderných elektráren a úložišť radioaktivních látek. Pro široké uplatnění radionuklidů v medicíně je nutné do okruhu pracovníků v riziku zahrnout i pracovníky nemocničních oddělení, a to především obory nukleární medicíny, radioterapie, radiodiagnostiky, ale i balneologie, kdy jako příklad lze uvést jáchymovské lázeňské kúry. Významným expozicím jsou dále vystaveni představitelé chirurgických oborů používající kontrastních vyšetření při operaci a peroperační RTG metody (využití C ramena apod.). Další skupinou jsou také pracovníci laboratorních zařízení využívající zdroje IZ ve výzkumných projektech. V neposlední řadě je také nutné zmínit letový personál, kosmonauty a vojáky. Ve všech výše uvedených oblastech

lidského konání je možné se díky nestandardním okolnostem setkat s významnější obdrženou dávkou ionizujícího záření a bude tedy nutné všemi dostupnými metodami kvalifikovaně zpětně určit absorbovanou dávku.

Použití biodozimetrických metod v polních podmínkách Armády České republiky je limitováno technologickými a časovými možnostmi jejich použití [23, 26].

2.2.2 Biodozimetrické metody

Změny probíhající v organismu vlivem ionizujícího záření jsou specifickým a signifikantním ukazatelem výše ozáření. Jejich rozsah závisí na celkové absorbované dávce, na typu záření i na jeho homogenitě. Na intenzitě odezvy organismu se podílí i individuální radiosenzitivita jedince [27]. Obecně lze říci, že vůči ionizujícímu záření jsou senzitivnější buňky aktivně metabolizující a nediferencované, které mají potenciál mnohonásobného dělení. U těchto buněk je díky aktivní replikaci genetického materiálu či zvýšené transkripci nejvyšší riziko vzniku chyby v důsledku zlomů DNA indukovaných ionizujícím zářením [28].

Biodozimetrie zahrnuje cytologické metody sloužící především k monitorování krevního obrazu a cytogenetické metody, které jsou zaměřeny na přítomnost chromozomových aberací v lymfocytech periferní krve. Ačkoli vznik chromozomových aberací není charakteristický pouze pro účinky ionizujícího záření, je senzitivita a specifická cytogenetických metod vysoká. Cytologické i cytogenetické metody využívají radiosenzitivních populací periferní krve jako ukazatele pro zpětný odhad dávky ionizujícího záření [29, 30].

Přehled rozdělení biodozimetrických metod:

1) Cytologické metody

- Monitorování krevního obrazu

2) Cytogenetické metody

- Stanovení dicentrických chromozomů
- Test stanovení mikrojader

- Předčasná chromozomální kondenzace
- Předčasná chromozomální kondenzace indukovaná buňkami
- Předčasná chromozomální kondenzace indukovaná chemicky
- Možnosti barvení chromozomů a automatická analýza chromozomálních aberací

3) Průtoková cytometrie

- Biodozimetrie lymfocytárních populací
- Stanovení proteinu H2AX průtokovou cytometrií

2.2.3 Cytologické laboratorní metody

Pro udržení celistvosti a vnitřní homeostázy savčího organismu je velice důležitá schopnost jeho nepřetržité regenerace, která je řízena složitou sítí regulačních mechanismů. V případě neplánované velké ztráty buněk je deficit v místě poškození nejprve doplněn buňkami uvolněnými z tkáňových rezerv. Pokud je tento kompenzační mechanismus nedostačující, dochází ke stimulaci nediferencovaných buněk, které vstupují do buněčného cyklu a následného procesu proliferace, diferenciace a maturace, aby v organismu nahradily buňky poškozené nebo chybějící [27, 31].

Kromě kůže a sliznic je jedním z nejvíce aktivních systémů s pružnou a rychlou schopností sebeobnovy krvetvorný (hematopoetický) systém. Mezi hlavní buněčné elementy v krvi patří krevní destičky (trombocyty), červené krvinky (erytrocyty) a buňky bílé krevní řady (leukocyty). Leukocyty se dále dělí na lymfocyty, monocyty a granulocyty a za fyziologických podmínek dochází denně v tomto buněčném kompartmentu k celkové výměně $4,9 \times 10^{11}$ hematopoetických buněk. Na této obměně se nejvíce podílí buňky:

- červené krevní řady (37 %)
- krevní destičky (28 %)
- granulocyty (22 %)
- monocyty (10 %)
- objemově nejméně jsou nahrazovány lymfocyty (4 %) [32]

Důsledkem působení ionizujícího záření dochází v krevním obraze k typickým změnám, jež jsou způsobeny úbytkem jednotlivých buněčných populací v periferní krvi.

Jejich pokles je přímo úměrný radiosenzitivitě jednotlivých buněčných řad a vlivem ozáření je poté indukována buněčná smrt. Při analýze zastoupení buněčných populací v periférii je důležité vzít v úvahu dobu nezbytnou pro jejich doplnění z kmenové buňky v kostní dřeni a průměrnou fyziologickou délku života buněk [26].

Monitorování krevního obrazu

Základní laboratorní metodou u ozářených osob je denní sledování krevního obrazu. Tato metoda hodnotí rozvoj a závažnost akutní nemoci z ozáření. Hlavním laboratorním ukazatelem absorbované dávky ionizujícího záření jsou změny absolutních počtů elementů v periférii a pro první hrubý odhad jsou stanovovány do 24 hodin po ozáření. Možnost opakovaných krevních odběrů nabízí dlouhodobé sledování, průběžné hodnocení prognózy onemocnění i kontrolu účinnosti léčebných postupů [25].

Počet krevních elementů v cévním řečišti je za fyziologických podmínek udržován v dynamické rovnováze. Pokles těchto buněk v periférii je způsoben buďto poškozením cirkulujících krevních elementů, patofyziologickým procesem zasahujícím proces diferenciaci v kostní dřeni nebo snížením či úplným vymizením pluripotentních buněk kostní dřene. Tyto buňky patří k nejsenzitivnějším buňkám v organismu, k jejich poškození dochází již při celotělovém rovnoměrném ozáření dávkou okolo 0,5 Gy a byla zjištěna i individuální senzitivita, svoji úlohu zde hraje i věk ozářeného jedince [33].

Nejdříve je zaznamenáván pokles absolutních počtů krevních řad u lymfocytů periferní krve, jež patří k nejcitlivějším buňkám. Úbytek těchto buněk je v případě obdržení významné dávky ionizujícího záření diagnostikován během prvního dne po ozáření. Maximální pokles je poté pozorován již dva dny po ozáření. Tabulka 1 znázorňuje závislost mezi počtem lymfocytů, velikostí dávky a typem klinických symptomů 24 hodin po nehodě představující celotělové ozáření. Úplné vymizení lymfocytů 24 hodin po ozáření koreluje s dávkou letální [34].

Tab. 1 - Počet lymfocytů v periferní krvi 24 hodin po nehodě v závislosti na velikosti obdržené dávky [26]

Počet lymfocytů	Dávka (Gy)	Symptomy
nad $1,5 \times 10^9/l$	nebyl ozářen významnou dávkou	žádné
1 - $1,5 \times 10^9/l$	lehká forma ANO	za 3 týdny nastane střední pokles granulocytů a trombocytů
0,5 - $1 \times 10^9/l$	těžká forma dřeňového syndromu ANO	hemoragické a infekční komplikace do 3 týdnů, nutnost hospitalizace
$0,5 \times 10^9/l$	těžká forma dřeňového syndromu ANO, jedinec mohl obdržet letální dávku	hospitalizace pro pancytopenické potíže, rozvoj dřeňového, případně gastrointestinálního syndromu ANO
nedetekovatelný	letální dávka	zemře na gastrointestinální nebo neurovaskulární syndrom ANO

Dalším problémem je především pokles trombocytů, který je u pacientů s dřeňovým syndromem akutní nemoci z ozáření pozorován 14. - 30. den po nehodě. Nízké počty trombocytů pro ozářeného představují závažné zdravotní komplikace a v intervalu mezi 30. až 60. dnem se ještě přidává pokles erytrocytů spojený s anémií.

Pro stanovení obdržené dávky záření je důležité, zda ozářený obdržel dávku ionizujícího záření, kdy je již obnova kostní dřeně z vlastních zdrojů nemožná a bude tedy nutná transplantace kostní dřeně (celotělová dávka okolo 9 Gy). Pokud byla dávka menší či ozáření nerovnoměrné, bude možná obnova hematopoézy z vlastních zdrojů.

Při vratném poškození kmenových buněk a vyšších dávkách (nad 2 Gy) je doporučována aplikace růstových faktorů krvetvorby GM-CSF, G-CSF a IL-3 co nejdříve po ozáření. Hranici poškození je těžké rozpoznat, proto je sledování dynamiky krevních elementů v periferní krvi často doplňováno analýzou aspirátu kostní dřeně [35].

2.2.4 Cytogenetické metody

Cytogenetické metody jsou zaměřeny na přítomnost chromozomových aberací v lymfocytech. V důsledku působení ionizujícího záření na organismus dochází také ke změnám ve struktuře DNA, což má za následek vznik chromozomových aberací. Aberace jsou mikroskopicky kvantitativně a kvalitativně vyhodnoceny erudovaným pracovníkem a odečet dávky je získán vložением odečtených dat do předem připravené kalibrační křivky. Cytogenetické metody jsou považovány za nejvhodnější a nejpřesnější biodozimetrickou metodu odečtu absorbované dávky [36, 37].

Pro detekování chromozomálních aberací máme metody přímé a nepřímé. Metody přímé stanovují vlastní přítomnost chromozomové aberace (dicentrická analýza (DA), předčasná chromozomální kondenzace (PCC)). Metody nepřímé nehodnotí přímo chromozomální aberace, ale detekují změny, které s aberacemi souvisejí (test mikrojader).

Současné cytogenetické metody se zakládají na chromozomálních aberacích. Pro jejich stanovení je vhodná populace periferních lymfocytů v klidové, tzv. presyntetické G_0 fázi buněčného cyklu, jenž se nachází v periferní krvi. Pro stanovení chromozomální aberace je nutné buňky zachytit v mitóze. Pro odečet *in vivo* indukovaných chromozomálních aberací je proto důležité chemicky nebo biologickými extrakty aktivovat lymfocyty tak, aby přešly z klidové fáze do stádia blastů, kdy je možné vizualizovat jejich jaderný chromatin a díky tomu pozorovat změny ve struktuře chromozomů [38].

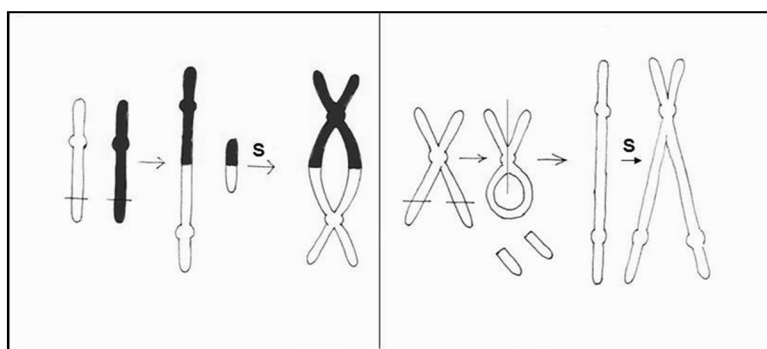
Metodu je nutné provádět ve specializované laboratoři vybavené technikami pro oddělení lymfocytů z periferní krve, jejich kultivaci a stimulaci. Tato metoda trvá minimálně 48 hodin a je tak časově velmi náročná.

Chromozomální abnormality tedy napomáhají k určení detekce míry expozice a tím napovídají o poškození organismu na buněčné úrovni. Chromozomální aberace se dělí na strukturní či numerické. Strukturní aberace jsou důsledkem chromozomových zlomů, po nichž následuje určitá přestavba a mohou vznikat spontánně nebo jako následek působení různých vnějších faktorů. Dělí se na balancované (kdy je zachováno množství genetického materiálu) a na nebalancované (kdy část genetického materiálu

chybí, či přebývá). K numerickým aberacím se řadí euploidie, při které je znásobena celá chromozomová výbava (triploidie, tetraploidie) nebo aneuploidie, kdy se početní odchylka týká pouze některého chromozomu (trisomie, monosomie). Numerické aberace naopak vznikají chybou při rozdělení chromozomů do dceřiných buněk během buněčného dělení neboli nondisjunkce [37, 39].

Stanovení dicentrických chromozomů

Dicentrický chromozom (obrázek 7) vzniká spojením dvou chromozomálních fragmentů, z nichž každý obsahuje jednu centroméru a dává tak vznik jednomu chromozomu s dvěma centromerami. Dva zbylé acentrické fragmenty chromozomu je možné detekovat v témže buněčném jádru. Podobným mechanismem mohou vzniknout, případně i tricentrické či kvadricentrické chromozomy.



Obr. 7 - Dicentrický chromozom [40]

Dicentrické chromozomy představují hlavní typ aberací sledovaných biodozimetrií. Tento test je považován za zlatý standard v tomto oboru pro svou specifitu k ionizujícímu záření a dostatečně stabilní odhad dávky i několik měsíců po ozáření [41].

Metoda je vhodná jak pro zpětný odečet nízkých dávek (okolo 100 mGy), které mohou vést k pozdním, stochastickým onemocněním (leukémiím a solidním nádorům), tak k určení dávek vyšších než 1 Gy, a tedy ke spolehlivému odhadu časných, deterministických následků, které se projeví v týdnech až měsících po ozáření.

Pro metodu je nutný odběr minimálně 2 ml heparinované periferní krve, ze které musí být na hustotním médiu izolovány mononukleární buňky (lymfocyty

a monocyty). Ty jsou pak převedeny do média, v němž jsou stimulovány po dobu dvou až tří dní rostlinným mitogenem fytohemaglutininem (PHA). Stimulace probíhá v inkubátoru při teplotě 37°C v 5% atmosféře oxidu uhličitého. Dvě až tři hodiny před koncem stimulace se k buněčné suspenzi přidává kolcemid, který zastaví mitotickou aktivitu lymfocytů ve stádiu kondenzace chromozomů. Po skončené inkubaci jsou buňky fixovány a obarveny na podložním mikroskopickém sklíčku. Pod mikroskopem jsou následně odečítány chromozomální aberace. Velká přesnost určení dávky je získána vyhodnocením 500 a více mitotických figur (v případě velkého počtu vzorků se provádí odečet minimálně 50 dicentrických chromozomů u jednoho suspektně ozářeného člověka) [42].

Pro každý druh ozáření je vytvořena kalibrační křivka závislosti absorbované dávky na průměrném počtu dicentrických chromozomů v buňce, která slouží pro případný odečet dávky ozářených jedinců. Jelikož je pro metodu nutný vysoký počet lymfocytů v periferní krvi, je výhodná zejména pro odečet absorbované dávky od 0,1 Gy do 5 Gy s možnou chybou odečtu okolo 0,5 Gy [43].

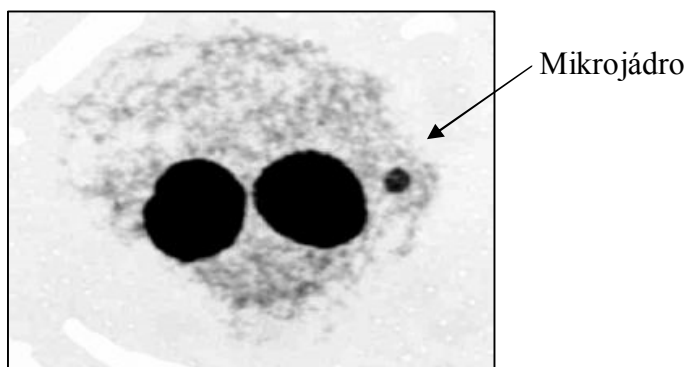
Spolehlivost a přesnost této retrospektivní metody byla doložena dobrou korelací absorbované dávky zjištěnou fyzikálními metodami. Počet dicentrických chromozomů v buňce klesá s časem tudíž srovnáním dat ozářených ihned po nehodě a v ročním odstupu byl pozorován nižší počet translokací (např. nehoda v Goiania). Proto existují i matematické modely kalibračních křivek pro odhad dávky v delším časovém horizontu po nehodě [43, 44].

Mikroskopické vyhodnocení dicentrických chromozomů je časově náročné. Jeden člověk zpravidla vyhodnocuje 500 mitotických figur 8 hodin. Z tohoto důvodu je v případě hromadných nehod bez automatické analýzy nemožné vyhodnotit více než několik desítek vzorků [44].

Test stanovení mikrojadra

Mikrojádra (obrázek 8) vznikají následkem těžkého poškození DNA, jejich výskyt je závislý na dávce ionizujícího záření. Při výskytu dvojitých zlomů dvoušroubovice DNA se mnohokrát nepodaří tyto zlomy opravit. Pokud dojde k oddělení většího fragmentu DNA od původní dvoušroubovice, je možné takový

fragment lehce identifikovat po další mitóze buňky, kdy fragment přetrvává v cytoplazmě jedné z dceřiných buněk [45].



Obr. 8 - Mikrojádru, detekované na konci mitotického dělení [46]

V roce 1976 Paul I. Countryman a John A. Heddle poprvé publikovali metodu kvantifikace chromozomálních aberací na základě odečtu počtu mikrojader v kultuře stimulovaných lidských lymfocytů po expozici ionizujícím zářením. Později byla metoda zefektivněna přidáním inhibitoru cytokineze, cytochalasinu B.

Mikrojádru jsou kvantifikována v dvoujaderných buňkách zastavených ve fázi cytokineze a musí být oddělena od obou mateřských jader. Výhodou této metody je rychlejší odečet vzorků, jelikož vyhledávání mikrojader v mikroskopických vzorcích periferní krve je snadnější než sledování dicentrických chromozomů. Nevýhodou je naopak delší doba kultivace (až 72 hodin) při přípravě vzorku [47].

Tento test periferních lymfocytů patří mezi standardní biodozimetrické metody, které lze použít jak v případě radiačních nehod, tak i monitoringu profesního ozáření osob. V roce 1885 byla metoda zefektivněna Fenechem a Morleym. Postup této metody je v určitých věcech podobný jako je u metody dicentriků, krev je opět stimulována phytohemaglutininem (PHA), cyklus zastaven cytochalasinem a následuje fixace. Metoda sleduje malé acentrické chromozomální fragmenty, které zůstanou mimo jádro během buněčného dělení. Tato mikrojádru jsou v cytoplazmě mimo hlavní dceřiná jádra. Mikrojádru mohou obsahovat jak celé chromozomy, tak i pouze jejich části [48].

Předčasná chromozomální kondenzace

Využití analýzy předčasné chromozomální kondenzace (PCC) se nabízí při

vysokých dávkách, kdy je pozorován velký absolutní pokles lymfocytů po nehodě a k dalšímu poklesu dochází během několikadenní kultivace lymfocytů. Indukce kondenzace chromozomů je vyvolána buď fúzí s buňkami chemicky, nebo v mitotické části cyklu.

Předčasná chromozomální kondenzace (PCC) indukovaná buňkami

Tato metoda je vhodná pro nízké i vysoké dávky s různým lineárním přenosem energie. Je využívána i v případech nerovnoměrného celotělového ozáření, zejména při vážných nehodách, kde je nutné udělat klíčové rozhodnutí, zda transplantovat kmenové buňky kostní dřeně, nebo zvolit růstové faktory [49].

Indukce PCC je umožněna fúzí lidských lymfocytů získaných izolací na hustotním gradientu z lidské periferní krve s buňkami izolovanými z ovarii křečka, jež jsou v mitotické fázi cyklu. Pomocí fúzní látky polyethylenglykolu dochází ke spojení lymfocytu s buňkou ovaria. Fúze je rychlá, trvá přibližně 4 minuty a po přidání kolcemidu a hodinové inkubaci je po fixaci vzorku možné pomocí optické mikroskopie zhodnotit počet translokací. V jádře fúzní buňky jsou chromozomy pocházející z ovaria křečka v párech, zatímco lidské předčasně kondenzované chromozomy jsou v buňce umístěny jednotlivě. Odečet aberací tak může být v ideálním případě zahájen za 3 až 4 hodiny od obdržení krevního vzorku.

Mitotické buňky ovarii je možné předem připravit ve velkých množstvích kultivací v kompletním médiu a zamrazit. Dlouhodobě se dají skladovat až při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. I když metoda nabízí časově výhodnější schéma než stanovení dicentrických chromozomů, v současné době se nevyužívá [49, 50].

Předčasná chromozomální kondenzace indukovaná chemicky

Chemicky indukovaná PCC umožňuje fúzi lymfocytů s okadickou kyselinou nebo s Calyculinem A. Při fúzi do 40 Gy je Calyculin A 20x efektivnější než okadická kyselina, ta je naopak používána v případě vysokých dávek.

Chemicky indukovaná PCC vyžaduje stimulaci klidových lymfocytů PHA s následnou 48hodinovou kultivací. Na druhou stranu metodika poskytuje vysokou výtěžnost, jelikož indukuje PCC ve všech fázích buněčného cyklu. To je velkou

předností při sledování chromozomálních změn po ozáření vysokými dávkami IZ, kde došlo k velkému snížení absolutních počtů lymfocytů v periferní krvi. Jestliže je i poté počet lymfocytů pro následnou klasifikaci nedostatečný, lze použít k obohacení lymfocytární frakce tzv. techniku „vysoce efektivní přípravy chromozomů“ - „high-yield chromosome preparation“.

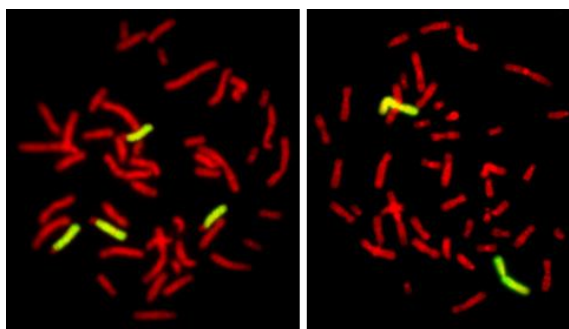
Další výhodou chemicky indukované PCC je, že v buňce není hodnocen vznik dicentrických chromozomů, nýbrž chromozomů prstenčitých, tzv. ringů. Ty jsou v mikroskopu lépe odečitatelné než dicentrické chromozomy, a tím se zkracuje doba odečtu jednoho vzorku z osmi hodin na jednu hodinu [49, 50].

Možnosti barvení chromozomů a automatická analýza chromozomálních aberací

Díky známým sekvencím DNA chromozomů jsou v současné době dostupné sondy, které umožňují zpracování vzorků metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH - obrázek 9). Je možné použít sondy značící celou sadu chromozomů tak zvané pan centromerické próby, nebo sondy pro specifické oblasti na jednotlivých chromozomech (centromery, satelitní DNA, telomery).

Z hospodárných důvodů je metoda FISH nejvíce používána u chromozomů 1 a 2 dohromady představujících 33 % genetické informace v jádře. Značení s fluorescenčními značkami je časově náročné, protože se prodlužuje doba analýzy o dobu hybridizace sondy, což je v případě zpětného odečtu dávky nepříznivé. Na druhou stranu mikroskopická, případně automatická mikroskopická analýza může při optimálním nastavení přístroje urychlit odečet aberací.

Fluorescenční *in situ* hybridizace řadíme mezi molekulárně - cytogenetická vyšetření, která umožňují lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA, případně RNA. Vyšetřované vlákno dle pravidel komplementarity je spojováno s příslušnou fluorescenční značkou (proces hybridizace). Ke spojování dochází přímo ve vyšetřovaném materiálu, tedy na místě (*in situ*), nikoli v izolované DNA. Odečet se provádí pomocí fluorescenční mikroskopie [36, 49].



Obr. 9 - Metoda FISH [51]

2.2.5 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) našla v současné době široké uplatnění téměř ve všech biomedicínských oborech. Základním principem FCM je současné měření dvou rozptylových parametrů a fluorescence (nejčastěji imunofluorescence) pomocí fluorochromů značených monoklonálních protilátek, které se specificky váží k různým druhům buněčných populací. Kvalitativní i kvantitativní detekce pak dává možnost posouzení přítomnosti jednotlivých buněk v buněčné suspenzi. Ve srovnání s fluorescenční mikroskopií má řadu výhod, ty jsou zahrnuty v tabulce 2 [52].

Vysoká úroveň automatizace, rychlost měření, velmi dobrá reprodukovatelnost dat, nízká spotřeba imunoreagencií na vzorek a možnost kvalitativního i kvantitativního vyšetření mnoha povrchových nebo i vnitrobuněčných znaků buněk v suspenzi řadí FCM mezi moderní biodozimetrické metody [53].

S postupujícím technickým pokrokem se její možnosti stále rozšiřují a jednoduché dvojlaserové či trojlaserové průtokové cytometry jsou stále častěji nahrazovány vysoce citlivými polychromatickými analyzátory. V biodozimetrii jsou

používány pro odečet počtů radiosenzitivních buněk před a po ozáření. Z poklesu jejich absolutních počtů lze zpětně odvodit obdrženou dávku ionizujícího záření [54].

Tab. 2 - Srovnání průtokové cytometrie s klasickou mikroskopií buněčných suspenzí [52]

	Klasická mikroskopie	Průtoková cytometrie
Počet vyšetřovaných buněk	$10^2 - 10^3$	$10^5 - 10^7$
Reprodukovatelnost	nízká	vysoká
Hodnocení intenzity fluorescence	subjektivní	objektivní
Rozměrové parametry	málo přesné	dobré rozlišení velikosti celkové vnitřní komplexity
Citlivost	nízká až střední	velmi vysoká (desítky epitopů)
Možnost vyšetření více znaků na jedné buňce	obtížné	snadné
Hodnocení	kvalitativní	kvalitativní i kvantitativní
Potřeba biologického materiálu	vysoká	nízká
Pracnost	vysoká	nízká, automatizace sběru
Doba jednoho vyšetření	> 5 min	okolo 1 min
Archivace výsledků	(digitální) fotografie	elektronická forma
Možnost separace buněk	není	možná (průtokové třídiče)
Možnost třídění	obtížné	u třídičů snadné
Náklady na vybavení	nižší až střední	střední až vysoké
Vysvěcování fluorochromů	významné	většinou nepodstatné
Náklady na reagenty	vyšší	nižší

Biodozimetrie lymfocytárních populací

Díky náhodnému pozorování subpopulace CD8+ NK buněk vykazujících neobvykle vysokou radiosenzitivitu s biodozimetrickým potenciálem vedla k systematickému výzkumu radiosenzitivity i třeba malých, nicméně co nejvíce homogenních subpopulací lymfocytů, jenž mohou sloužit jako lidské biodozimetrické indikátory *in vivo*, protože mají rozdílnou radiosenzitivitu k ionizujícímu záření [55].

V periferní krvi dospělého člověka představují lymfocyty 15 - 40 % leukocytů s absolutními počty přibližně 1 milionu lymfocytů na 1 ml krve. Z toho vyplývá, že pro běžná vyšetření zastoupení lymfocytárních populací a jejich hlavních subpopulací stačí 50 až 100 μ l. V případě, kdy počty bílých krvinek silně klesají, může být zapotřebí několika set μ l periferní krve na vzorek, a to zejména při absolutní či relativní kvantifikaci dobře definovaných, nicméně málo zastoupených subsetů. Zde je opět patrná výhoda mnohobarevné průtokové cytometrie, při které je běžně 8 - 10 povrchových znaků měřeno najednou [56, 57].

Stanovení proteinu H2AX průtokovou cytometrií

Histon H2AX v současné době představuje moderní, velmi vyhledávaný a využívaný biodozimetrický znak. Histon H2AX je jednou z variant histonů H2A. Lidský genom obsahuje 10 genů, které kódují peptidy klasifikované jako H2A1. Šest z nich má identickou sekvenci a zbývající čtyři se liší aminokyselinami maximálně ve 3 až 4 pozicích. Tyto peptidy jsou nerozlišitelné gelovou elektroforézou v přítomnosti Tritonu X-100 [58].

Další z genů skupiny H2A kóduje peptid, ve kterém je leucin v pozici 51 zaměněn methioninem, který vede ke změně elektroforetické mobility. Tato varianta je označována jako H2A2. Varianty H2A1 a H2A2 tvoří většinu savčího H2A a prozatím nebyly zjištěny žádné odlišnosti v jejich funkci, rovněž je značíme jako majoritní varianty.

Dále existuje dalších pět lidských genů H2A označovaných jako varianty minoritní, které kódují peptidy sekvencně významně odlišné od variant H2A1 a H2A2. I přesto, že jejich výskyt je podstatně méně častý, je čím dál víc zřejmé, že hrají velmi významnou roli v chromatinovém metabolismu. Dvě minoritní varianty H2AX a H2AZ byly objeveny v osmdesátých letech, další dvě makro H2A1 a makro H2A2 v devadesátých letech a poslední H2A-Bbd teprve nedávno [59].

Detekce gama H2AX v lidských mononukleárních buňkách periferní krve po ozáření byla poprvé publikována metodou průtokové cytometrie v roce 2006. Metoda oproti konfokální mikroskopii a metodě ELISA nabízí rychlé vyhodnocení a zpracování vzorku. Metoda byla testována na laboratorních potkanech *in vivo*, lokálně ozářených

v oblasti hrudníku dávkou 5 - 30 Gy. Expres fosforylované formy H2AX na serinu 139 byla detekována na klidových mononukleárních buňkách periferní krve a byla zde potvrzena závislost mezi zvýšením množství mononukleárních buněk periferní krve obsahujících fosforylovanou formu H2AX se zvyšující se dávkou ionizujícího záření. Závislost byla prokázána také po celotělovém ozáření potkanů dávkou od 1 do 10 Gy. Fosforylace histonu H2AX je tedy rychlý a účinný indikátor dávky ionizujícího záření v době, kdy ještě nedochází k poklesu počtu lymfocytů v periferní krvi. Rovněž byla testována možnost po odběru uchovávat vzorky až 23 hodin [58, 60].

3 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZA

Cílem diplomové práce bylo přiblížit samotný obor biodozimetrie, jeho metodické zázemí a srovnat výhody a nevýhody jednotlivých experimentálních přístupů.

Účinky ionizujícího záření na živé organismy jsou v posledních letech velice častým tématem. V počátcích této práce je proto zmíněna teorie vzniku ionizujícího záření, jeho druhy a obecná fakta, která s ním souvisí.

V další části práce bylo pojednáno o biodozimetrii a to od jejího vzniku až po její velké využití v dnešní době. Dále bylo snahou vytyčit nejpoužívanější metody tohoto oboru s jejím následným využitím v praxi.

Stanovené cíle experimentu:

- srovnat dvě vybrané biodozimetrické metody sloužící ke zpětnému odečtu obdržené dávky ionizujícího záření
- porovnat výsledky získané měřením pomocí vybraných metod společně s vyhodnocením jejich předností a nedostatků
- porovnat přesnosti měření obou metod, zejména v rozsahu absorbované dávky 0,5 – 4 Gy
- celkové srovnání výhod a nevýhod jednotlivých přístupů s následným doporučením pro praxi

V této práci byla použita metoda komparace (z lat. compare, srovnávat). Tato metoda byla použita již v teoretické části práce při srovnání dvou biodozimetrických metod a následně byla použita i v části práce výsledky. Na základě takového srovnávání pak lze vyvozovat závěry o vlastnostech a kvalitách zkoumaných metod. Komparace je základní metodou hodnocení, přičemž srovnávací metody lze využít jak při získávání poznatků, tak při jejich zpracování.

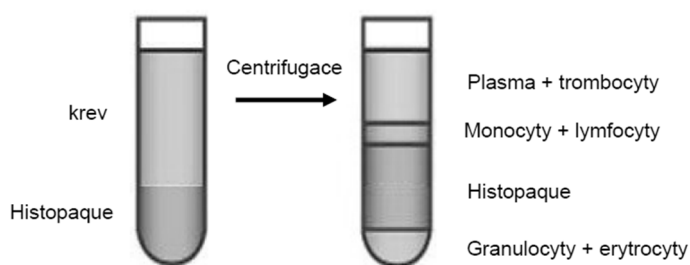
4 METODIKA

4.1 Experimentální model

Experimentálním modelem pro tuto práci bylo prase domácí. Prase, jako laboratorní zvířecí model, bylo zvoleno z důvodu velké fylogenetické a fyziologické příbuznosti s člověkem. Projekt pokusů byl schválen odbornou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat. Prasata byla chována v oddělených stájových boxech a byla krmena standartní krmnou směsí. Voda i potrava byla k dispozici *ad libitum*. Veškeré manipulace se zvířaty byly prováděny v akreditovaném viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové.

4.2 Periferní krev a izolace lymfocytů

Periferní krev byla odebírána do heparinizované zkumavky o objemu 10 ml z přední krční žíly po fixaci zvířete ve hřbetní poloze. Odebraná krev byla uchovávána až do doby experimentu při pokojové teplotě. Negativní neozářená kontrola a ozářené vzorky periferní krve dávkami 0,5 - 4 Gy byly dále použity pro separaci lymfocytů metodou gradientové centrifugace mononukleárních buněk periferní krve. Metoda je založena na rozdílné hustotě separovaných buněk. Erytrocyty a granulocyty mají vyšší hustotu než monocyty a lymfocyty (obrázek 10).



Obr. 10 - Izolace lymfocytů [61]

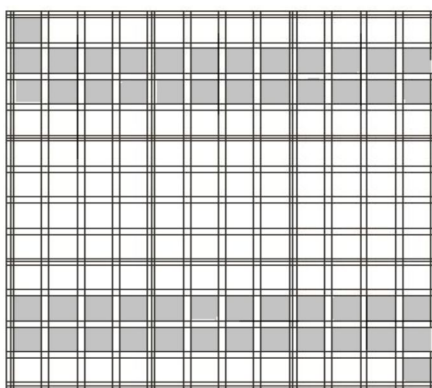
Před provedením samotné izolace buněčných populací byly chemikálie vytemperovány na pokojovou teplotu. Poté byl Histopaque přepipetován do kónické zkumavky (špičaté dno). Objem Histopaqu byl stejný jako objem vrstvené periferní krve. Důkladně promíchaná krev byla velmi opatrně po stěně zkumavky vrstvena na Histopaque a stočena při 1800 ot/min, 30 min a 21°C. Po centrifugaci byl opatrně

pipetou odsán proužek lymfocytů a monocytů, které byly přeneseny do čisté zkumavky a k nim bylo přidáno čisté RPMI médium a dvakrát promyto (1600 ot/min, 10 min, 21°C). Po odsátí supernatantu byl sediment roztřepán a k buňkám bylo přidáno 5 ml RPMI média.

4.3 Počítání buněk a příprava buněčných suspenzí

Pro stanovení výchozího množství buněk izolovaných pomocí hustotního gradientu byla použita Bürkerova komůrka. K 10 μ l buněčné suspenze bylo přidáno 190 μ l Türkova roztoku, který se připravuje z 1 ml kyseliny octové, 1 ml 1% roztoku genciánové violeti ve 100 ml destilované vody. Ledová kyselina octová tohoto roztoku rozruší erytrocyty a trombocyty, neporuší však leukocyty. Genciánová violet' obarví jádra leukocytů tak, že leukocyty jsou v zorném poli mikroskopu výrazné a tím pádem počítatelné. Absolutní počty buněk byly stanoveny pod mikroskopem při zvětšení 60krát. Buňky byly počítány v 50 čtvcích o rozměrech 0,2 x 0,2 mm v obvodě mřížky (obrázek 11). Počet buněk byl přepočten na výchozí objem suspenze následovně:

- Počet buněk v 50 čtvcích byl vynásoben 100, jenž se rovná počtu buněk v jednom μ l. Standardně se připravuje suspenze buněk 5×10^6 ml. Vypočteme tedy objem buněčné suspenze a na 1 ml doplníme promývacím roztokem (PBS s azidem a želatinou WB nebo fosfátovým pufrem PBS).



Obr. 11 - Bürkerova komůrka

4.4 Ozařování vzorků a kultivace

Lymfocyty, které jsou využívány pro biodozimetrické účely, byly ozařovány v rozmezí dávek 0,5 - 4 Gy a porovnány s negativní kontrolou. Vzorky byly zpracovány

1, 4 a 24 hodin po ozáření. Ozářené buňky byly standardně v RPMI médiu s obsahem FBS, glutaminu a antibiotik umístěny do inkubátoru a kultivovány při 37 °C a kontrolovány v atmosféře 5% CO₂ po dobu zvoleného časového intervalu zpracování.

Vzorky byly ozařovány kobaltovým zářičem (Chisokobalt ⁶⁰Co, zdroj gama záření, vzdálenost 100 cm) za dodržení všech bezpečnostních podmínek. Ozařování probíhalo v Petriho miskách o objemu 5 ml, na ozařovacím podstavci, ve vodorovné poloze do centra svazku a tak, aby byla maximální vzdálenost do 5 cm od centrálního paprsku, kvůli zachování homogenity pole. Potřebný čas na ozáření zvolenou dávkou byl vždy vypočítán podle aktuálního dávkového příkonu dle rozpisu poskytnutý katedrou radiobiologie. Z důvodu bezpečnosti a zásad radiační ochrany bylo veškeré ozařování vzorků a manipulace v kontrolovaném pásmu provedena radiačním pracovníkem kategorie A katedry radiobiologie.

4.5 Mikrojaderný test

4.5.1 Postup provedení mikrojaderného testu

K negativní, neozářené suspenzi lymfocytů i k jednotlivým ozářeným suspenzím lymfocytů byl ihned po ozáření přidán fytohemaglutinin (PHA), jeho koncentrace a objem. Poté byly vzorky umístěny do inkubátoru (37 °C, 5% CO₂, 44 hod). K jednotlivým suspenzím byl přidán Cytochalasin B (30 μl, koncentrace 1 mg/ml) a kultivace pokračovala za stejných podmínek 28 hodin. Poté byly všechny buněčné suspenze zafixovány pomocí fixačních roztoků. Fytohemaglutinin je látka rostlinného původu, která se využívá ke stimulaci lymfocytů k dělení. Cytochalasin B patří do skupiny mitotických jedů, které poruší dělicí vřeténko a zastaví tak probíhající dělení v metafázi mitózy. Optimálně zvolenými časovými intervaly mezi přidáním jednotlivých látek je dosaženo toho, že jsou lymfocyty stimulovány k dělení, kde dochází ke vzniku požadovaných binukleárních buněk, které jsou vyhodnocovány, poté je dělení zastaveno pomocí mitotického jedu a buňky jsou v tomto stádiu zafixovány.

Dále byly suspenze z Petriho misek přeneseny do zkumavek a stočeny (1200 ot/min, 10 min, 8 °C) a po odstranění supernatantu byl sediment roztřepán a resuspendován. Za stálého míchání suspenze bylo po kapkách přidáváno 5 ml fixačního roztoku č. 1 (metanol + kyselina octová + 36 - 38% formaldehyd). Následovala centrifugace (800 ot/min, 5 min, 4 °C). Po odsátí supernatantu bylo po

kapkách přidáno k roztřepanému supernatantu znovu 5 ml fixačního roztoku č. 2 (metanol + kyselina octová), tento postup byl opakován ještě jednou.

Poté byl supernatant odstraněn a přibližně 80 μ l suspenze bylo z výšky kápnuto na odmaštěná a vychlazená nesilanizovaná podložní sklíčka, která pak zasychaly v šikmé poloze. Zaslá sklíčka byla nabarvena roztokem Giemsy naředěným v poměru 1:25 deionizovanou vodou. Barvení probíhalo 10 minut, poté byla sklíčka opláchnuta pod proudem studené vody a opět se nechala zaschnout.

Takto připravená sklíčka byla odečtena na optickém mikroskopu při zvětšení 60x. Všechny výsledky byly počítány na 1000 binukleárních buněk. Data byla zapisována a vyhodnocena statistickou analýzou. Následné zobrazení výsledků bylo vykresleno v grafu.

4.5.2 Kritéria pro vyhodnocování mikrojadern (MN)

Pro správné vyhodnocení mikrojadern (MN) musí být dodržována daná kritéria. Mikrojádro musí být morfologicky shodné a menší než hlavní jádro. Také musí mít stejnou nebo větší barevnou intenzitu než jádro hlavní. Průměr MN u lidských lymfocytů se pohybuje mezi 1/16 a 1/3 středního průměru hlavního jádra. Dále musí být MN nerefraktilní a tím snadno odlišitelné od artefaktů, což je velice podstatné pro správné konečné výsledky. Nesmí být spojeny nebo nějak připojeny k hlavnímu jádru a nesmí se s ním nijak překrývat, přičemž okraje MN musí být jasně odlišitelné od jaderné hranice.

4.6 Stanovení H2AX

Nejdříve byly připraveny všechny potřebné roztoky (tabulka 3). Ze zásobního roztoku formaldehydu (10%) byl připraven 4% formaldehyd v PBS. Triton X-100 byl rozehrát ve vodní lázni při 37 °C a za tepla byl rozpuštěn v příslušném objemu taktéž vytemperovaného PBS. Promývací roztok byl připraven smícháním PBS s odpovídajícím množstvím fetálního telecího séra (FBS). Taktéž byl připraven 50% etanol a všechny připravené chemikálie kromě Tritonu X-100 v PBS byly drženy po celou dobu na ledu. Příklad přípravy chemikálií je uveden v tabulce 3, výsledné objemy a množství vždy záleželo na počtu vzorků. Centrifuga byla předem nastavena na

1600 ot/min, 5 min, 8 °C a centrifugace probíhala při zpracování vzorků u této metody vždy za stejných podmínek.

Tab. 3 - Ilustrační příprava chemikálií potřebných ke stanovení H2AX

Výsledné objemy záležit na počtu vzorků	
Chemikálie	Příprava
WB (washer buffer, promývací roztok)	2 ml FBS + 48 ml PBS
FA (formaldehyd) 4%	400 µl FA + x µl PBS
Triton X-100 v PBS	0,5 µl Tritonu rozpuštěno v 5 ml PBS
Etanol 50%	1:1 etanol x PBS (ml)

Lymfocyty byly po inkubaci následně sklizeny z Petriho misek a zcentrifugovány. Dále byl slit supernatant a k resuspendované peletě buněk bylo napipetováno 65 µl 4% FA a poté byly buňky inkubovány při pokojové teplotě 10 minut. Po proběhlé inkubaci byl připipetován 1 ml Tritonu X-100 v PBS, který byl do doby použití držen ve vodní lázni při 37 °C. Následovala 30 minutová inkubace při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 3 ml ledového WB, suspenze byla promíchána na třepačce a odstředěna. Po centrifugaci byl slit supernatant, peleta buněk roztřepána, poté byl přidán 1 ml ledového 50% etanolu se, kterým byly vzorky inkubovány 10 minut na ledu. Následovala centrifugace, znovu byl supernatant opatrně odsán a bylo přidáno 3 ml ledového WB a vzorek odstředěn. Tento promývací krok pomocí WB byl opakován ještě jednou. Po promytí bylo přidáno 0,5 µl protilátky histon H2AX. Následně byla s touto protilátkou provedena 30 minutová inkubace v lednici. Po proběhlé inkubaci bylo provedeno 2 x promytí 1 ml WB a přenesení roztoku do faxových zkumavek. Poté už bylo zahájeno samotné měření.

Měření na průtokovém cytometru CyAn Beckman Coulter probíhalo tak, že z faxových zkumavek se vzorkem byl nasát vzorek s buněčnou suspenzí. Následně se vytvořil fokusovaný proud (svazek) jednotlivých po sobě jdoucích buněk, kde bylo možno měnit rychlost a tlak. Dále byl pomocí zdroje a detektoru elektromagnetického záření, filtrů, optických hranolů a jiných optických elementů snímán optický signál (a/d převodník). Na monoklonální protilátku je navázán fluorochrom, jenž je excitován procházejícím laserovým paprskem. Zároveň dochází k emisi světla, což se projeví jako posun fluorescence a na monitoru přístroje tak můžeme rozlišit pozitivní buněčnou populaci. Naměřená data byla interpretována a zpracována programem Summit 4.3 a následně byla provedena statistická analýza [62, 63].

4.7 Chemikálie a přístroje

4.7.1 Chemikálie pro izolaci a kultivaci lymfocytů

Antibiotika (penicilin, streptomycin), (Sigma, ČR)

Fetální telecí sérum FBS (Gibco, USA)

Glutamin (Sigma, ČR)

Histopaque (Sigma, ČR)

Médium RPMI 1640 (Sigma, ČR)

PBS o pH 7,4 (NaCl 0,9 g/l, KH_2PO_4 0,144 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,795 g/l)

Turkův roztok (Kulich, ČR)

4.7.2 Chemikálie pro provedení mikrojaderného testu

Cytochalasin B (Sigma, ČR)

Destilovaná voda

Etanol (Sigma, ČR)

Formaldehyd 36 - 38% (Lach-Ner, ČR)

Fytohemaglutinin (Sigma, ČR)

Giemsovo barvivo

Kyselina octová (Lachema, ČR)

Metanol (Sigma, ČR)

4.7.3 Chemikálie pro stanovení histonu H2AX

Etanol 50%

Formaldehyd 10% (Polysciences, Inc., USA)

Promývací roztok (fetálním bovinní sérum v PBS)

Protilátka Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), klon JBW301, konjugovaná FITC (Merck Milipore, ČR)

Triton X-100 (Sigma, ČR)

4.7.4 Nástroje a materiál

Bürkerova komůrka (Meopta - optika, s.r.o. ČR)

Pipety (Brand, Německo)

Plastový materiál (TPP, Švýcarsko; Brand, Německo)

Podložní skla (Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, Německo)

Skleněný materiál ostatní – kádinky, zkumavky, odměrné válce

4.7.5 Přístroje

Binokulární mikroskop (Ergaval, Německo)

Centrifuga (Hettich Universal 32R, Německo)

CO₂ inkubátor pro buněčné kultury (Galaxy®170R, New Brunswick, Německo)

Manuální počítadlo buněk (Alchem Unimed, ČR)

Laminární box (SafeFlow 1.2 Biotech, ČR)

Průtokový cytometr (CyAn Becman Coulter, USA)

Světelný mikroskop (Olympus BX51, Japonsko)

Vodní lázeň (Biotech Julabo TW8, ČR)

Vortex (Biotech, ČR)

Výrobník ledu (Brema, Německo)

Záříč Kobalt 60 (Chisostat®)

4.7.6 Vyhodnocení pokusů

Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel. Statistické vyhodnocení pokusů spočívalo ve vypočtení aritmetických průměrů a pro statistickou analýzu dat byl použit studentův t-test, který testuje, zda se střední hodnota výběru shoduje s nulovou hypotézou. Hladina významnosti byla $p = 0,01$, jenž značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot a $p = 0,05$ značí statisticky významný rozdíl hodnot.

5 VÝSLEDKY

Lymfocyty izolované z periferní krve prasat byly kultivovány v plastových Petriho miskách o objemu 5 ml v počtu 5×10^6 buněk/miska. Buňky byly ozařovány gama zářením dávkami 0,5; 1; 2; 3 a 4 Gy. Pro každou sérii pokusu a pro každý časový interval byla jedna miska neozářená, která sloužila jako kontrola pro porovnání výsledků. V závislosti na experimentu byly buňky různě ovlivňovány a kultivovány po zvolené časové intervaly (1, 4 a 24 hodin).

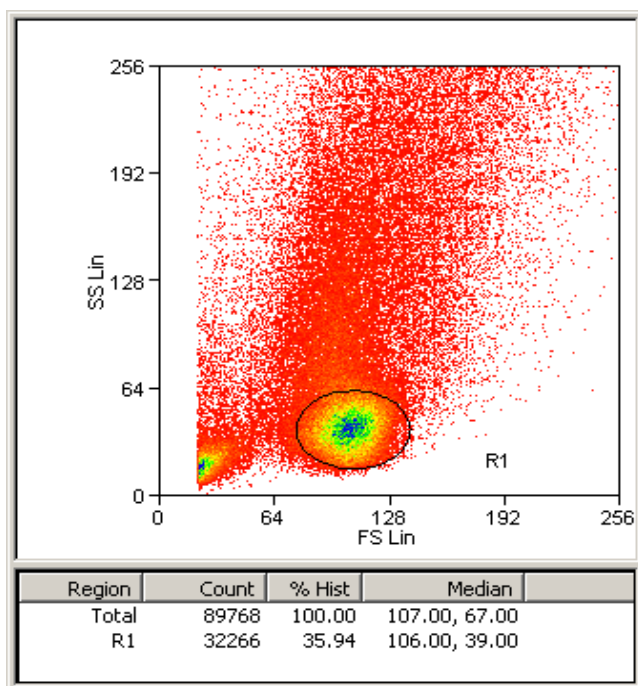
Pro mikrojaderný test byly podle časového intervalu buňky ovlivňovány fytohemaglutininem a cytochalasinem B, sklizeny a dále zpracovány. Pro stanovení fosforylovaného histonu gama H2AX pomocí průtokové cytometrie byly po uběhnutí časového intervalu buňky rovnou sklizeny a dále zpracovány. Z důvodu pracnosti, spotřeby protilátky pro detekci H2AX a časové náročnosti odečtu mikrojader byl každý pokus v jednotlivých dávkách a časových intervalech proveden 4 krát, což je postačující pro provedení základní statistické analýzy. Výsledky jsou prezentovány pomocí grafů, které poskytují lepší představu při interpretaci statistických dat. Hodnoty jsou přepočteny na procentuální zastoupení pozitivních buněk při detekci gama H2AX a procentuální zastoupení výskytu mikrojader na 1000 hodnocených buněk a vždy jako aritmetický průměr všech měření.

V první části jsou vykresleny kalibrační křivky obou metod v celém rozsahu dávek v časových intervalech 1, 4 a 24 hod po ozáření. Ve druhé části sloupcové grafy pro jednotlivé dávky (0,5 – 4 Gy) slouží k porovnání dvou metod.

5.1 Stanovení gama H2AX

Stanovení fosforylovaného histonu gama H2AX v ozářených lymfocytech periferní krve spočívalo v měření vzorků suspenze lymfocytů po inkubaci s příslušnou protilátkou průtokovým cytometrem CyAn. Přístrojem bylo analyzováno v každém vzorku 70 – 90 tisíc buněk. Signály z optické části přístroje byly zpracovány počítačovým programem Summit 4.3 pomocí tečkových (tzv. dot plotů) a sloupcových diagramů (tzv. histogramů).

Obrázek 12 znázorňuje přímý rozptyl (FSC Forward scatter) versus boční rozptyl (SSC – Side scatter) naměřených buněk. Z takto naměřených buněk si selektujeme jen testovanou oblast a to populaci malých, kompaktních buněk s nízkým bočním rozptylem (lymfocytů) tzv. gatováním, jde o oblast (región) R1.

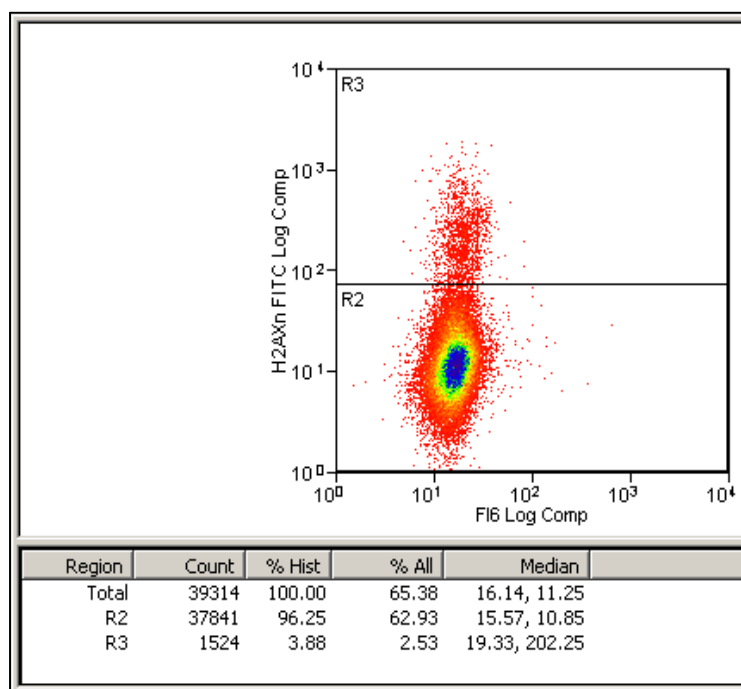


Obr. 12 – Dot plot: Forward scatter (FSC) versus Side scatter (SSC) buněk periferní krve

Pozn.: První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů, tedy 100 %. Tečkový diagram je tvořen bočním rozptylem (SSC) a přímým rozptylem (FSC). V legendě je popsán absolutní počet naměřených buněk. Po gatování (na obrázku černě ohraničené) vzniká oblast R1 obsahující námi testované lymfocyty.

Vybraná oblast (región R1) sloužila jako vstupní data pro hodnotící parametry a to fluorescenci buněk. Takže další tečkový diagram (obrázek 13) slouží k hodnocení zastoupení lymfocytů, které na svém povrchu váží pomocí specifických receptorů monoklonální protilátka gama H2AX, která je zviditelněná fluorochromem fluoresceinem isothiakyánátem (FITC) – osa y. Oblast R2 obsahuje lymfocyty z oblasti R1, které na svém povrchu příslušný receptor neexprimují a naopak oblast R3 obsahuje relativní zastoupení lymfocytů s receptorem namířeným proti příslušnému proteinu. Výška jednotlivých oblastí na ose y je dána napětím příslušného fotonásobiče, které se nastavuje v protokolu. Napětí lze měnit v závislosti na aktuálních podmínkách a parametrech experimentu, proto je

možné, že se budou výšky oblastí zde uvedených tečkových diagramů mírně lišit, protože se pro každý jednotlivý experiment nastavuje hranice positivity pomocí neozářené kontroly. Hladina proteinu H2AX pro neozářenou, označenou kontrolu je ukázána pomocí mediánu fluorescence na obrázku 13, s dávkou ozáření dochází k vzestupu této hodnoty (data nejsou ukázána formou tečkovaných diagramů).



Obr. 13 – Neozářená kontrola za 1 hod

Pozn.: Procentuální zastoupení negativních (R2) a pozitivních (R3) buněk z jejich celkového počtu. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů, tedy 100 %. Vzhledem k tomu, že jde o buňky neozářené, je zastoupení pozitivních buněk nízké (3,88 %, medián fluorescence je 202,25). K nastavení hranice negativních a pozitivních buněk sloužila neozářená kontrolní skupina.

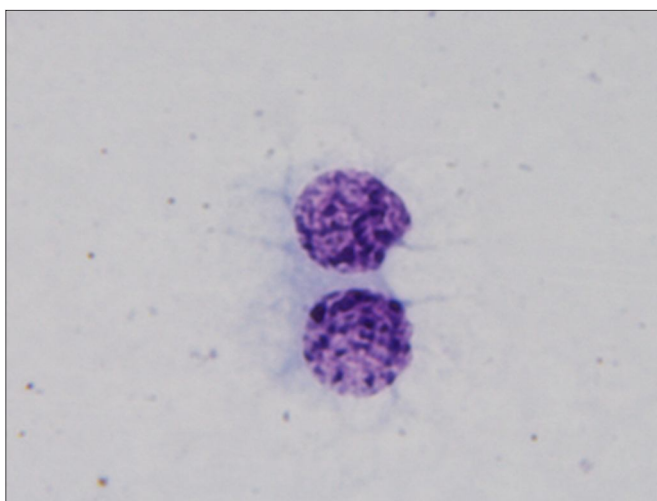
Ostatní dot ploty jsou uvedeny v příloze.

5.2 Vyhodnocování mikrojaderné

Mikrojaderný test je založen na pozorování jaderného poškození buněk po ozáření, tedy jaderných fragmentů – mikrojaderné. Mikrojádra jsou pozorována u lymfocytů stimulovaných k mitóze, kde právě v průběhu dělicího procesu vznikají jaderné fragmenty,

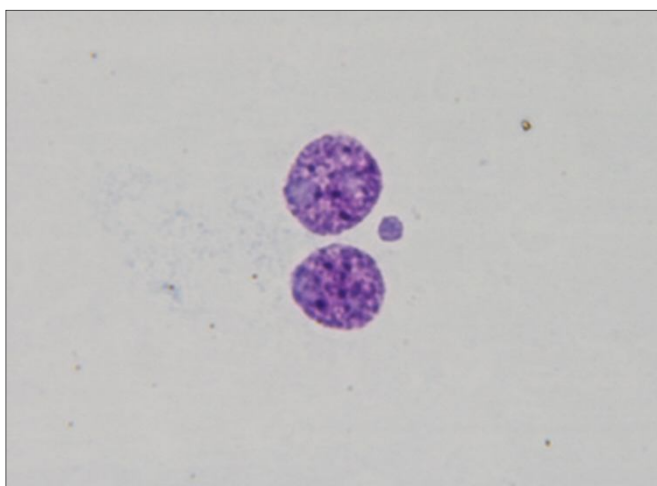
nazývaná mikrojádra. V experimentu byly hodnoceny pouze lymfocyty, které prošly dělením, tedy dvoujaderné (binukleární) buňky.

Obrázky 14 – 19 pořízené pomocí optického mikroskopu představují typické snímky lymfocytů v experimentu. Neslouží tedy k porovnání dat dle časových intervalů nebo dávek, nýbrž jsou ilustrativní pro názornou představu mikrojader, binukleárních buněk a také artefaktů, na které je možné narazit a které při nesprávném vyhodnocení mohou výrazně negativně zkreslit vyhodnocení mikrojaderného testu. Pořízené fotografie jsou při zvětšení 60 krát.



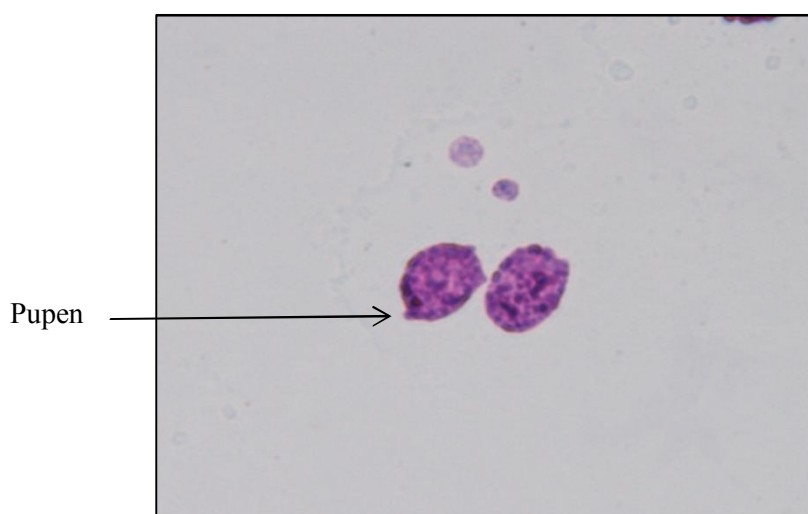
Obr. 14 - Dvoujaderná buňka

Obrázek 14 znázorňuje dvoujadernou buňku. V pozadí buňky se ve formě světle fialové barvy vyskytuje pozůstatek cytoplazmy. Tato dvoujaderná buňka splňuje kritéria pro správné hodnocení, má dvě jasně rozlišitelná velká jádra, která nemají porušenou membránu ani se nijak vzájemně nedotýkají. Taková buňka byla ve výzkumu započítávána. Mikrojádru zde však nevidíme.



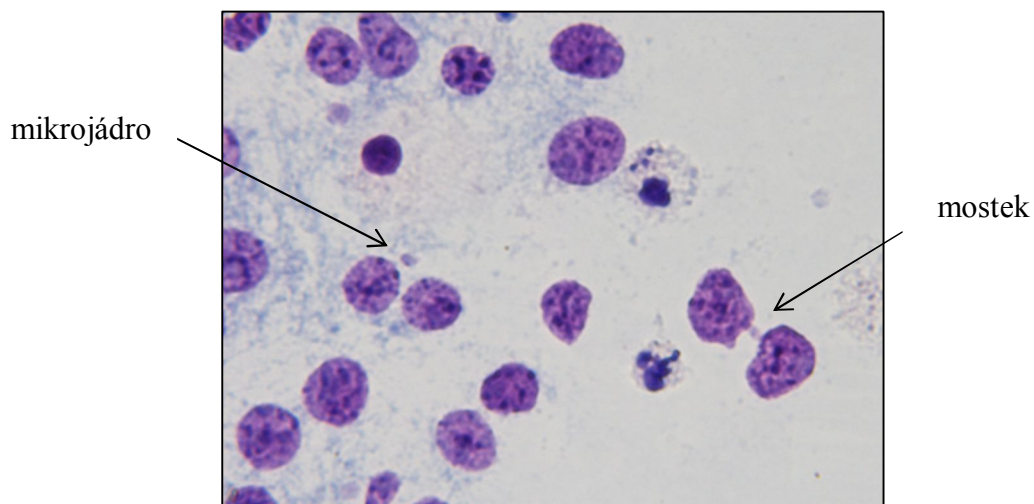
Obr. 15 - Dvoujaderná buňka s jedním mikrojádrém

Na obrázku 15 vidíme taktéž dvoujadernou buňku, a však zde je zachyceno i mikrojádro. Jelikož je morfologicky shodné a menší než jádro hlavní a splňuje i další důležitá kritéria (stejná barevná intenzita, odlišitelnost od artefaktů) je v experimentu započítáváno.



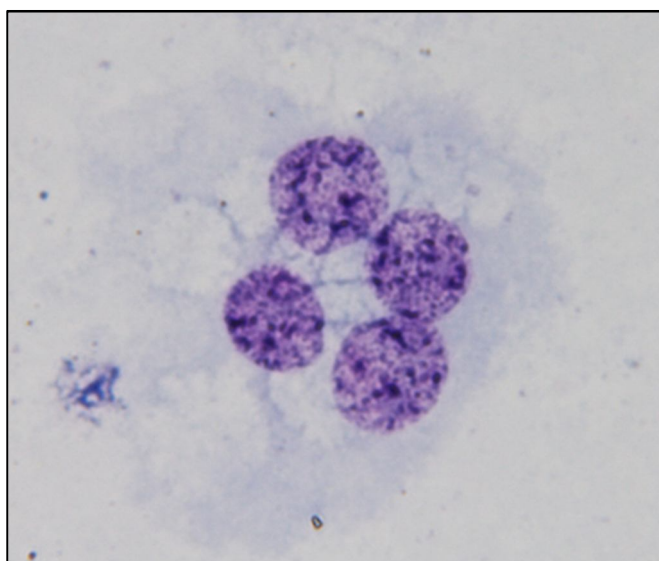
Obr. 16 - Dvoujaderná buňka se dvěma mikrojádry

Obrázek 16 znázorňuje dvoujadernou buňku se dvěma mikrojádry, která splňuje kritéria pro hodnocení mikrojaderek, tudíž byla ve studiu započítávána. Na obrázku jsou na jedné z buněk šipkou označeny tzv. pupeny, které představují druh poškození jaderného materiálu, v práci však tento druh poškození hodnocen nebyl.



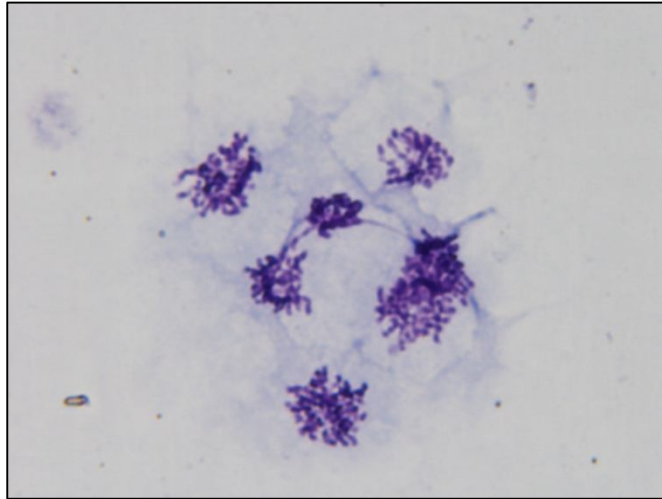
Obr. 17 - Několik dvoujaderných buněk

Obrázek 17 ukazuje několik dvoujaderných buněk, dále i buňky dvoujaderné s mikrojádrem. Vpravo dole (viz šipka) můžeme vidět i buňku spojenou nukleoplazmatickým mostkem. V takovém to přehledném rozložení buňky byly započítávány do statistického vyhodnocení výsledků



Obr. 18 – Čtyř jaderná buňka

Na obrázku 18 je vidět buňka čtyř jaderná, takové ve výzkumu nebyly hodnoceny ani započítávány. V pozadí buňky se nachází zbytek cytoplazmy.



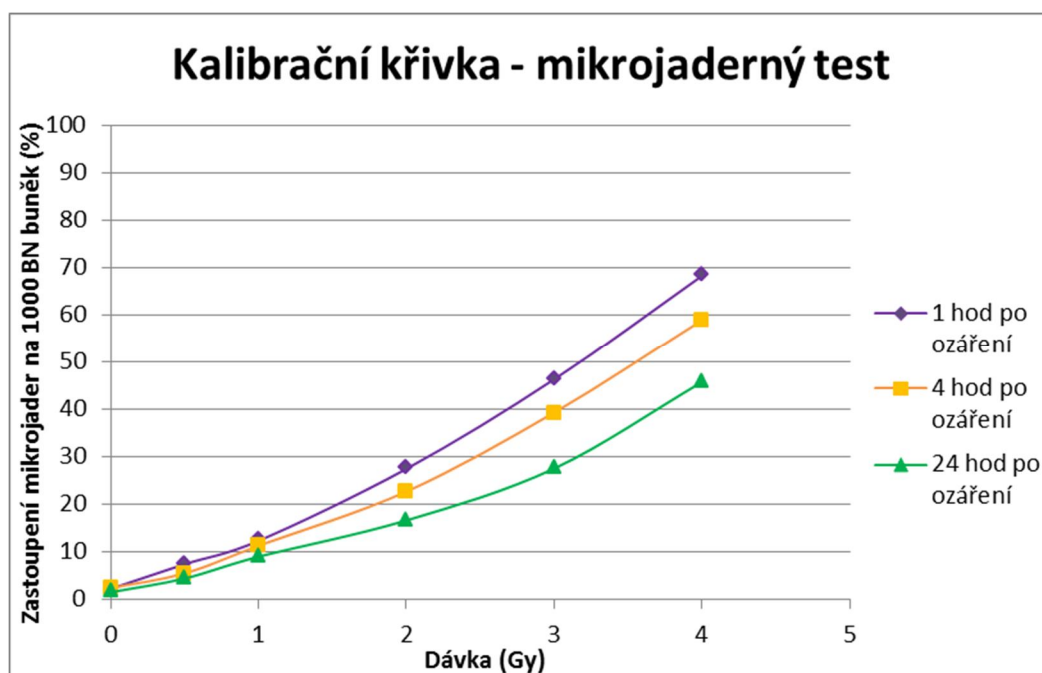
Obr. 19 - Klastry buněk v metafázi mitotického dělení

Tyto buňky se nachází v tzv. metafázi mitotického dělení, kdy se v jejím průběhu chromozomy řadí do ekvatoriální roviny dělicího vřeténka. Buňky v tomto stádiu nelze hodnotit, nelze přesně určit jejich počet a jsou neúplné.

5.3 Kalibrační křivky dvou biodozimetrických metod

Pro porovnávání závislosti míry poškození buněk na absorbované dávce byly vypracovány kalibrační křivky ve zvolených časových intervalech po gama ozáření dávkami v rozmezí 0,5 – 4 Gy, pro odečet obdržené dávky ionizujícího záření metodou mikrojaderného testu (obrázek 20) a testu pomocí detekce apoptického proteinu H2AX (obrázek 21). U mikrojaderného testu míra poškození buněk stoupá v závislosti na dávce přímo úměrně. U H2AX je časově průběh nelineární, prudce stoupá 1 hodinu po ozáření, po 4 a 24 hodinách dochází v lymfocytech k fyziologické reparaci dvojitých

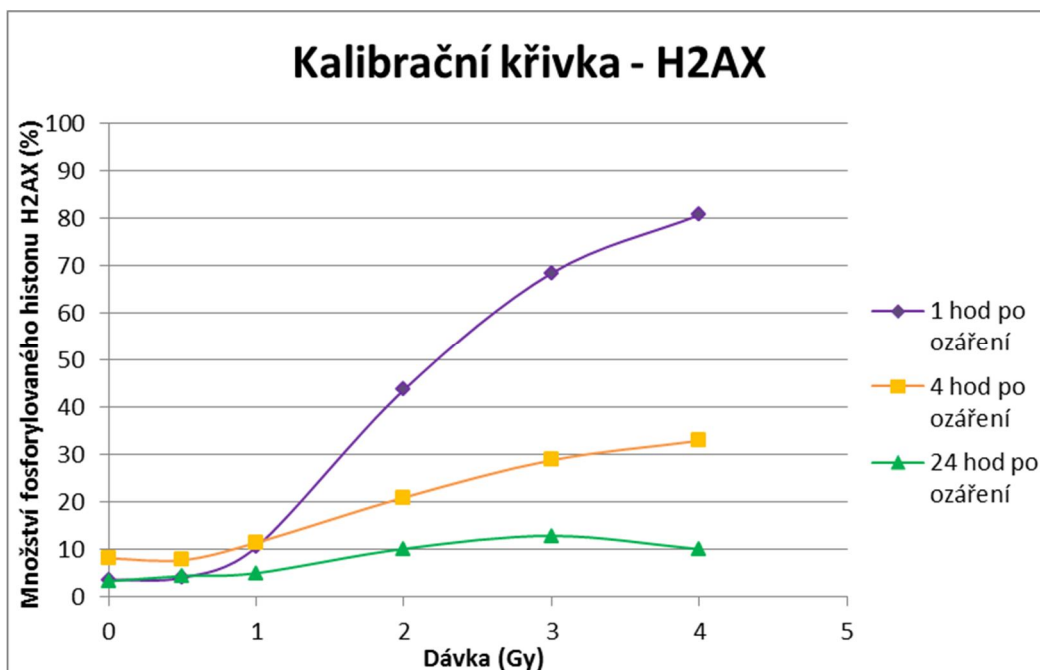
zlomů a proto se medián fluorescence uvedeného proteinu velmi výrazně snižuje.



Obr. 20 - Procentuální zastoupení dvoujaderných (BN) buněk vůči dávce ozáření

Pozn.: Množství pozitivně zastoupených binukleárních buněk, vyjádřených v procentech vztahené ke zvoleným dávkovým intervalům (0; 0,5; 1; 2; 3 a 4 Gy). Kalibrační křivky jsou tvořeny průměry jednotlivých hodnot za danou dobu po ozáření (1, 4 a 24 hod).

Na obrázku 20 je vidět pozvolný nárůst všech zastoupených křivek, u neozářených buněk, sloužících ke kontrole, máme hodnoty správně na bodu 0. Počet mikrojader na 1000 BN buněk v závislosti na absorbované dávce pozvolna stoupá a to ve všech časových intervalech. Nejvyšší hodnoty výskytu mikrojader jsou pozorovány již po 1 hodině po ozáření. Hodnoty po 4 a 24 hodinách od ozáření se výrazně snižují. U 24 hodinového intervalu byl pokles buněk téměř poloviční. To poukazuje na jejich reparační schopnosti.



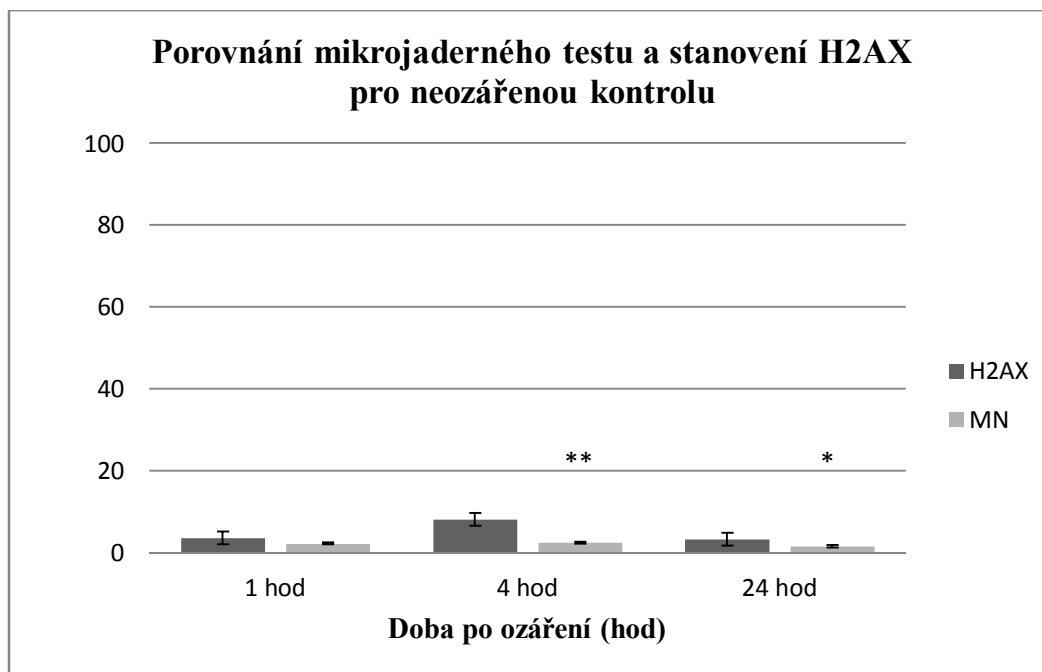
Obr. 21 - Procentuální zastoupení pozitivních buněk vůči dávce ozáření

Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk, vyjádřených v procentech vztažené ke zvoleným dávkovým intervalům (0; 0,5; 1; 2; 3 a 4 Gy). Kalibrační křivky jsou tvořeny průměry jednotlivých hodnot za danou dobu po ozáření (1, 4 a 24 hod).

Obrázek 21 přehledně znázorňuje vzestup poškozených buněk po jednotlivých hodnotách dávek. Fialová úsečka zastupující 1 hodinu po ozáření ukazuje nejvyšší vzestup oproti zbylým dvěma. Křivka se přibližuje až k 80 % pozitivních buněk. S časovým odstupem se hodnoty výrazně snížily, nejvyšší vzestup pozorujeme až 4 hodiny po ozáření dávkou 4 Gy kolem 35 %. Vyšší časový odstup po 24 hodinách od ozáření značí významný rozdíl zastoupení pozitivních buněk, u dávky 3 a 4 Gy na přibližně 13 %.

5.4 Porovnání získaných hodnot v rozsahu dávek 0,5 – 4 Gy

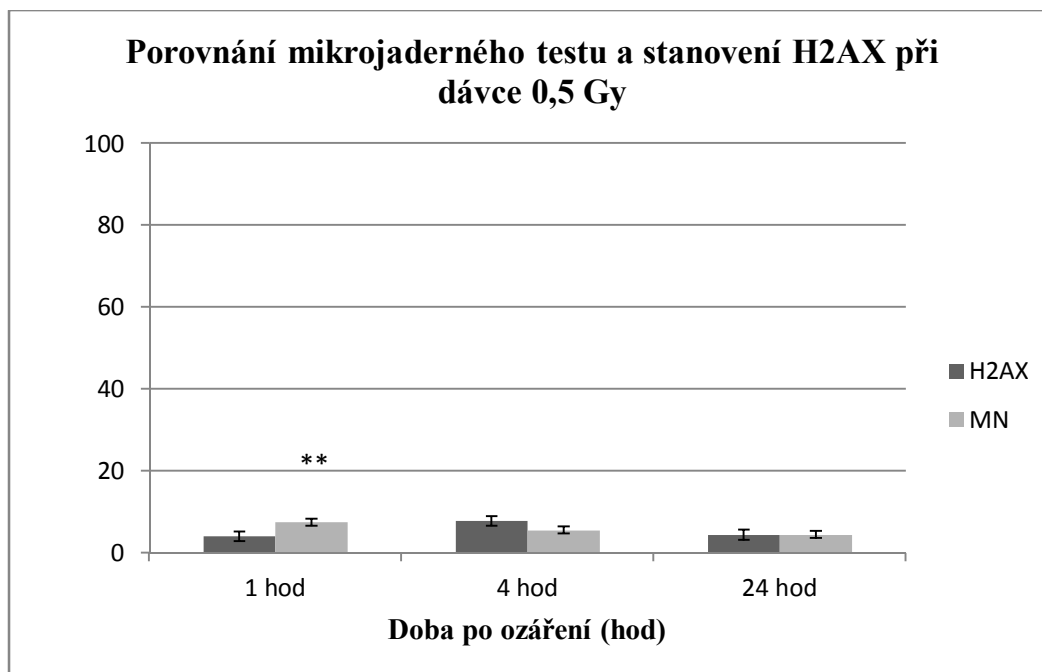
Pro srovnání dvou biodozimetrických metod, klasického mikrojaderného testu a nové metody stanovení proteinu H2AX byly vytvořeny sloupcové grafy z průměrných hodnot všech 4 měření pomocí procentuálního zastoupení poškozených buněk po ozáření. Byla tak srovnávána metoda mikrojaderného testu vůči detekci H2AX, hladina statistické významnosti rozdílu je v jednotlivých grafech vyznačena hvězdičkami.



Obr. 22 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX pro neozářenou kontrolu v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin.

Pozn.: Procentuální zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření pro neozářenou kontrolu. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).

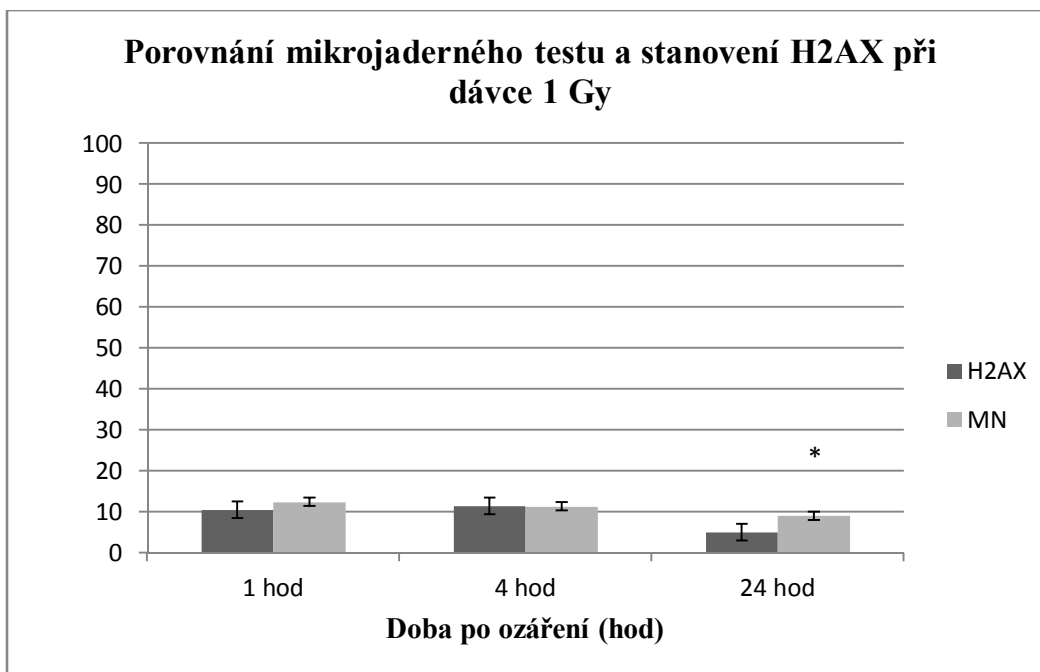
Na obrázku 22 je vidět procentuální zastoupení buněk při nulovém ozáření. Hodnoty jsou u obou metod nízké, což je pro neozářenou kontrolu charakteristické. Po 4 hodinách nám při stanovení H2AX hodnoty mírně vzrostly, což je způsobeno přirozeným nástupem apoptických procesů během kultivace buněk.



Obr. 23 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 0,5 Gy

*Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření při ozáření dávkou 0,5 Gy. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).*

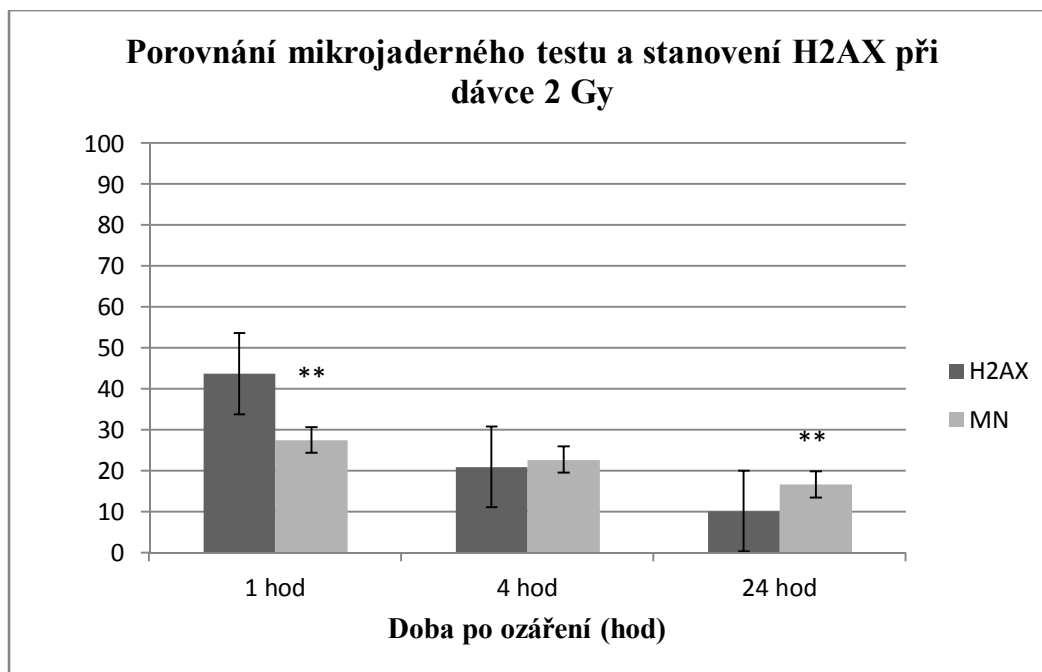
Na obrázku 23 je znázorněn statisticky významný rozdíl hodnot mezi metodou stanovení H2AX a mikrojaderným testem. Hodnoty byly vždy počítány z jednotlivých průměrů. Po 1 hodině od ozáření je patrný statisticky vysoce významný rozdíl mezi hodnotami. Statisticky nevýznamný rozdíl pak následoval u 4 i 24 hodinách od ozáření. Hodnoty u této dávky ozáření odpovídají dávce.



Obr. 24 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 1 Gy

*Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření při ozáření dávkou 1 Gy. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).*

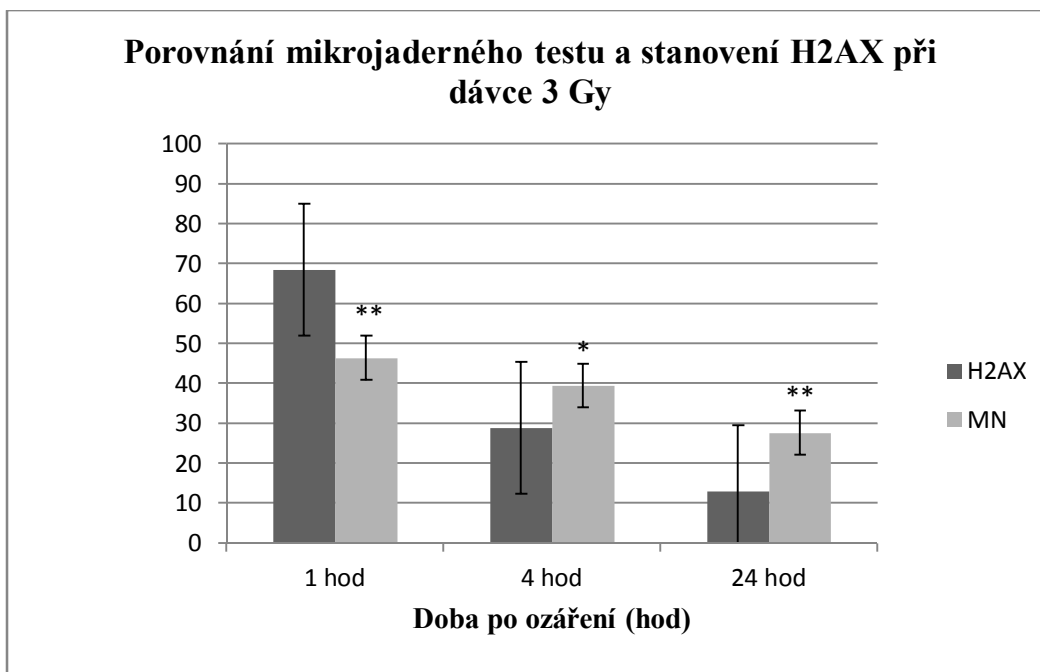
Obrázek 24 znázorňuje ozáření poškození lymfocytů po ozáření dávkou 1 Gy. Je patrné, že oproti předchozímu obrázku čili dávce 0,5 Gy došlo ke zdvojnásobení naměřených hodnot. Po 1 hodině po ozáření se hranice geneticky změněných buněk blíží k 20 %, podobně je tomu taky po 4 hodinách. U delšího časového intervalu buňky opět klesly, a to až o polovinu a pohybují se kolem 10 % u obou metod.



Obr. 25 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 2 Gy

*Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření při ozáření dávkou 2 Gy. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).*

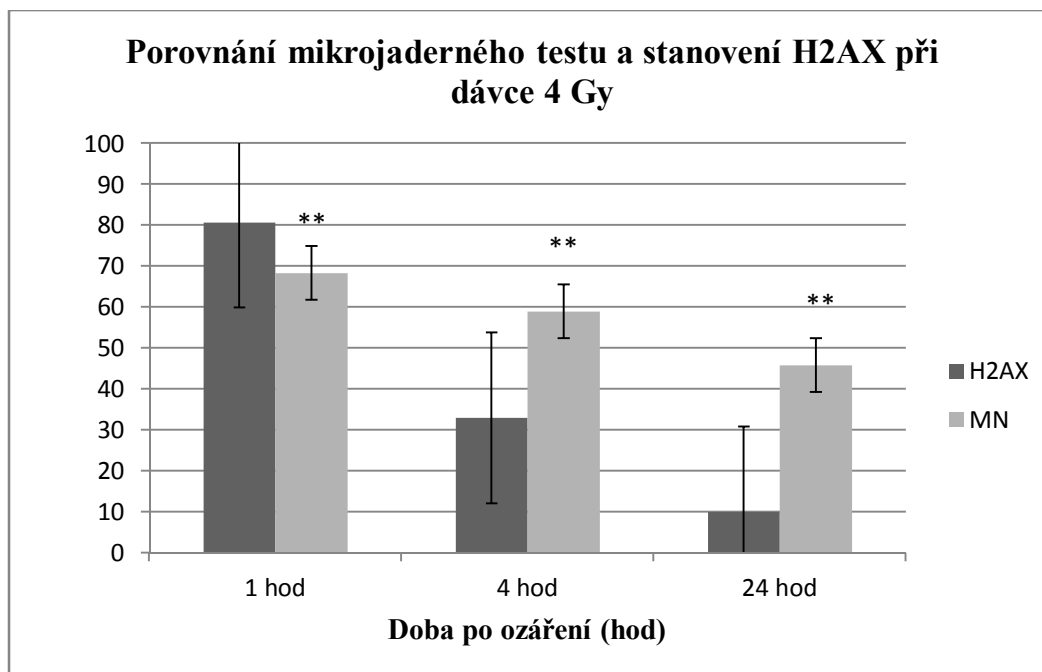
Obrázek 25 znázorňuje již překročenou hranici 40 % geneticky změněných buněk po 1 hodině od ozáření při metodě stanovení H2AX. U mikrojaderného testu je hranice 30 %. Po 4 hodinách buňky opět klesly až o polovinu stejně tak po 24 hodinách, kde je pro mikrojaderný test vysoce významný statistický rozdíl oproti stanovení H2AX.



Obr. 26 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 3 Gy

*Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření při ozáření dávkou 3 Gy. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).*

Obrázek 26 již znázorňuje dávku 3 Gy, hodnoty vzrostly prakticky o polovinu oproti dávce 2 Gy. Zastoupení buněk po 1 hodině se blíží k 70 %. U mikrojaderného testu se procentuálně držíme kolem 45 %. U metody stanovení H2AX hodnoty s časovým odstupem rovnoměrně klesají, u mikrojaderného testu tento pokles není lineární. Tento nesoulad je způsoben vyšší přesností nové metody oproti mikrojadernému testu.



Obr. 27 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 4 Gy

*Pozn.: Množství zastoupení pozitivních buněk v procentech vztahované ke zvoleným časovým intervalům (1, 4 a 24 hodin). Výsledky jsou uváděny jako průměr všech měření při ozáření dávkou 4 Gy. Pro každou skupinu je zobrazena standardní chyba, přičemž symbol * znázorňuje statisticky významné hodnoty porovnané s kontrolou ($p \leq 0,05$) a ** značí statisticky vysoce významný rozdíl hodnot porovnaných s kontrolou ($p \leq 0,01$).*

Obrázek 27 znázorňuje buňky ozářené nejvyšší použitou dávkou. Je patrné, že zastoupení buněk s mikrojádry výrazně vzrostlo oproti dávkám nižším. U metody stanovení H2AX po 1 hodině je vidět, že až 80 % periferních lymfocytů obsahovalo dvojitě zlomy a s delším časovým odstupem tato procentuální zastoupení klesají až na čtvrtinu. U mikrojaderného testu byl naměřen pokles přibližně o třetinu. Nejvyšší změny jsou u lymfocytů po 1 hodině od ozáření (70 % lymfocytů obsahuje mikrojádra). Pokles pak pokračuje v menší míře než u metody stanovení H2AX, což je způsobeno menší přesností mikrojaderného testu, než nám nabízí nová metoda stanovení apoptického proteinu H2AX).

6 DISKUZE

Vývoj biomedicínských metod zaznamenal obrovský rozvoj díky novým poznatkům v oblastech přírodních věd (fyzika, chemie, biologie, matematika) a jejich jednotlivých oborů (imunologie a buněčná biologie, molekulární biologie, nové výpočetní metody a rozvoj informačních technologií, molekulární fyzika, optika). V dnešní době je umožněné používat širokou škálu laboratorních metod nejen na buněčné, ale i na molekulární úrovni. Jsou-li správně indikovány a využívány, mohou za předpokladu správné interpretace přinést cenné diagnostické informace. Velký rozsah sbíraných dat je poté zpracován pomocí moderních počítačových technologií, jež umožňují nejen přehlednou orientaci v datových souborech, ale poskytují i interpretaci naměřených dat a statistického zpracování [36].

V počátcích biodozimetrie byl hledán radiosenzitivní marker v lidském těle, pomocí kterého by bylo možné stanovit zpětnou dávku ozáření jedince. Z historie např. změny na střešní nebo bukalní sliznici apod. V současné době patří k nejrychlejším a nejpraktičtějším metodám sledování změn krevního obrazu, jelikož se jedná o neinvazivní metodu, pro jedince optimálně zvládnutelnou. Bylo zjištěno, že nejdříve je pokles zaznamenáván u lymfocytů periferní krve, proto se staly nejdůležitějším prvkem pro biodozimetrické metody. Patří tedy k nejcitlivějším buňkám, v případě obdržení významné dávky ionizujícího záření, je jejich úbytek diagnostikován do 24 hodin po ozáření. I když lymfocyt popírá pravidlo, že radiosenzitivní buňky jsou buňky, které podléhají dělení (např. kmenové buňky hematopoézy) a diferenciaci, je jednou z nejcitlivějších buněk v našem organismu. V periferní krvi se vyskytuje v dostatečném množství, odběry krve nejsou závažným zákrokem do organismu a v našem zdravotnickém systému je zvládnutelný větší počet odběrů využitím běžných hematologických laboratoří, nemocnic nebo poliklinik. Nevýhodou stanovení poklesu absolutních počtů lymfocytů je nepřesnost kvalifikovaného odhadu při nízkých dávkách ionizujícího záření.

Oproti biologické dozimetrii je u fyzikální dozimetrie nutná přítomnost detekčního přístroje, což je u velkého radiačního postižení obyvatelstva prakticky nemožné. Na rozdíl tomu u biodozimetrie je přítomnost detekčního zařízení trvalá, jelikož zde je detekčním zařízením sám postižený jedinec. Další nevýhodou u fyzikální

dozimetrie je místo uložení detekčního přístroje. Pokud dojde k nerovnoměrnému ozáření, detekční zařízení pracuje s chybou závislou na jeho umístění. V případě absence fyzikálních dozimetrů např. při nehodě v Černobylu u obyvatelstva (1986) byla biologická dozimetrie jedinou, nezastupitelnou metodou, jak určit absorbovanou dávku ionizujícího záření. U personálu jaderné elektrárny, kteří byli vybaveni dozimetrem, byla biologická dozimetrie doplňující metodou sloužící ke korelaci dávky.

V minulém století se biodozimetrie soustřeďovala zejména na popis biodozimetrických ukazatelů a postradiačních dějů na úrovni celého organismu a orgánů samotných. Jejich použití v praxi má však řadu úskalí a nedostatků, např. jejich nízká citlivost, relativně dlouhá latence anebo vysoká časová či edukační náročnost. Dnes se zpětné rekonstrukce obdržené dávky ionizujícího záření zaměřují spíše na metody sledující změny na buněčné a molekulární úrovni organismu.

Zlatým standardem při retrospektivním hodnocení obdržené dávky záření je stanovení chromozomálních aberací (kapitola 2.2.4). Tato metoda je používána i v současnosti, je však pracovně náročná a výsledky jsou dostupné až relativně dlouho (nejdříve 3. den) od dodání vyšetřovaného vzorku do laboratoře. Metodu je nutné provádět ve specializované laboratoři vybavené technikami na oddělení lymfocytů z periferní krve, jejich stimulaci a kultivaci, její časová náročnost se pohybuje kolem 48 a více hodin. I přes časovou náročnost se tato metoda řadí mezi nejvhodnější a nej přesnější biodozimetrickou metodu odečtu absorbované dávky.

Další velice zajímavou metodou, kterou bych doporučovala, pro další experimenty je předčasná chromozomální kondenzace indukovaná chemicky. Benefitem této metody oproti klasické kultivaci a separaci je ověření v praxi. Při nehodě v japonské Tokaimuře, dva ze tří exponovaných pracovníků, měli tak nízké hodnoty lymfocytů, že nebylo možné získat jejich dostatečné množství klasickou separací na hustotním gradientu [36].

V diplomové práci byly podrobně zkoumány a porovnány dvě vybrané biodozimetrické metody: Mikrojaderný test a stanovení fosforylovaného histonu gama H2AX. Snahou bylo zjistit, která metoda je přesnější a užitečnější pro stanovení obdržené dávky při zpětném odečítání dávky po ozáření pomocí změn na úrovni radiosenzitivních buněk v prasečí periferní krvi. Tyto dvě metody byly zvoleny

z důvodu proveditelnosti výzkumu, získání všech potřebných chemikálií a dostupnosti přístrojů potřebných pro jejich provedení. Všechny experimenty byly prováděny v systému „*in vitro*“. Periferní krev prasete domácího byla zvolena vzhledem k blízké fyziologické i fylogenetické příbuznosti člověka k tomuto experimentálnímu modelu. Studie „*in vivo*“ vzhledem k účelnému poškozování buněk nebyla možná.

Periferní lymfocyty patří k radiosenzitivní populaci buněk, která je velmi citlivá k ionizujícímu záření, ale i snadno dostupná, protože současné metody odběru periferní krve jsou neinvazivní a nepoškozují ozářený organismus a z tohoto důvodu mohou být využívány i opakovaně. Mezi klasické orientační biodozimetrické metody tak patří sledování poklesu absolutních počtů lymfocytů 24 - 48 hodin po ozáření. Klasické cytogenetické metody založené na hodnocení poškození jaderného materiálu, konkrétně mikrojaderný test, jsou vhodné v rozsahu absorbované dávky 0,1 - 5 Gy. Je předpoklad, že tato metoda by mohla sloužit pro rychlé třídění velkého množství suspektně ozářených osob, naše výsledky lze podpořit experimentálními pracemi zahraničních autorů, kteří také publikovali vysoký biodozimetrický potenciál této metody. V dávkách vyšších než 5 - 6 Gy, již není mezi dávkou a tvorbou mikrojaderných lineární vztah, což vede k nejistotě v kvalifikovaných biodozimetrických odhadech. Velké dávky záření zhoršují proliferaci buněk, což vede k menšímu počtu dosažení metafáze, a proto i k nižšímu počtu hodnotitelných buněk. Vzorek krve je možné zpracovat ihned po expozici ionizujícího záření, i když se doporučuje vyčkat 12 - 24 hodin pro případ částečné radiační expozice, aby došlo k vycestování lymfocytů z poškozených orgánů do krve. Metoda stanovení mikrojaderných tak poskytuje první výsledky nejdříve 3. - 4. den po ozáření a tak velkou nevýhodou této metody je nejen zdlouhavá příprava vzorku, časově náročná kultivace i odečet mikroskopického preparátu lymfocytů. Výhodou je velká stabilita mikrojaderných (až rok po expozici), jak je uvedeno v publikaci Julie M. Sullivan et al. [64]. V experimentech uvedených v této práci byla periferní krev experimentálního modelu prasete odebírána z krční žíly a ozařována pouze v systému „*in vitro*“, tudíž jsme nečekali 12 - 24 hodin po ozáření a krve byly zpracovávány ihned a kultivovány ve třech časových intervalech (1, 4 a 24 hod). První výsledky z jednotlivých analýz byly tak získány za 5 - 6 dní po odběru a ozáření krve.

Tento test tedy velice závisí na lidském činiteli, je zde důležitá velká pozornost při odečítání buněk, což by mohl být velký problém při náhlé mimořádné události.

Závisí zde na vysoké koncentrovanosti jedince a nutné jsou i zdatné laboratorní návyky a vědomosti při laboratorní práci a při práci s optickým mikroskopem. Hodnotící musí vybírat opravdu jen ty buňky splňující kritéria pro správné hodnocení, vše poctivě zapisovat a dbát zvýšené opatrnosti vůči artefaktům a různě se překrývajícím buňkám, které lze snadno zaměnit za mikrojádra.

Mimo poškození na buněčné úrovni bylo také sledováno poškození jaderného materiálu krevních lymfocytů na úrovni nukleových kyselin, kde jedním z prvních kroků v buněčné odpovědi na dvojité zlomy DNA po ozáření je fosforylace histonu H2AX právě v místech poškození DNA. [65, 66]. Vzhledem k tomu, že gama H2AX tvoří ložiska v několika tisících kopiích kolem místa dvojitých zlomů, je proto tato metoda široce využívána pro detekci a sledování poškození a oprav dvojitých zlomů *in vitro* a *ex vivo* [67]. Reflektuje tedy aktuální procesy poškození a reparace přímo na úrovni genetického materiálu.

Pro analýzu přítomnosti H2AX byla využita metoda průtokové cytometrie. Jaderná ložiska lze značit specifickou protilátkou krátce po indukci dvojitých zlomů. Využití průtokové cytometrie se zdá být zvláště výhodné, protože H2AX fosforylace může být stanovena v jednotlivých buňkách s vysokou citlivostí a přesností a H2AX exprese v buněčných populacích umožňuje korelaci poškození DNA s dalšími atributy buňky, například s fázemi buněčného cyklu [68, 69].

Rozmezí dávek, ve kterém gama H2AX poskytuje přesné zhodnocení, je pro průtokovou cytometrii 0,5 - 10 Gy. Množství fosforylovaných proteinů gama H2AX lze detekovat přibližně 30 minut po ozáření, prudce klesá v prvních 24 hodinách a vrací se do normálu v průběhu několika dnů v závislosti na dávce záření. Proto se doporučuje zpracování provádět během 1 - 2 dnů po ozáření, nejlépe však 30 minut až 1 hodinu po expozici. Průtoková cytometrie poskytuje nejrychlejší výsledky a to do 2 hodin [64]. V této práci bylo stanovené rozmezí dávek stejně jako u mikrojaderného testu, aby mohlo dojít k porovnání. Taktéž byly pokusy prováděny ve stejném časovém rozmezí. První výsledky analýzy byly přibližně po 4 hodinách.

Metoda stanovení gama H2AX je složitější při přípravě buněk, naopak ale počítání v průtokovém cytometru probíhá rychleji a dle mého názoru přesněji než je tomu u mikrojaderného testu. Lidský činitel zde také hraje velkou roli, příprava buněk

je také plně závislá na chybách, které mohou nastat, pokud je ale výzkum proveden vícekrát (v mém případě 4 x), jistota správnosti přípravy buněk se dá snadno rozpoznat.

První část kapitoly Výsledky (kapitola 5) byla věnována přiblížení provedení metody stanovení H2AX a vyhodnocování záznamu z měření. Také jsou uvedeny obrázky pořízené z vlastního hodnocení mikrojaderného testu pro ilustraci hodnotících kritérií a obtížnosti vyhodnocení. Byla sestrojena kalibrační křivka závislosti dávky - odezvy z mikrojaderného testu, která byla díky rozsáhlým studiím na lidských lymfocytech periferní krve již vytvořena [70]. Kalibrační závislosti v této práci jsou rozšířené o časové intervaly 4 a 24 hodin, jak pro mikrojaderný test, tak pro metodu detekce H2AX. Křivka závislosti míry poškození na absorbované dávce po 1 hodině po ozáření, uvedená v této práci, je velmi obdobná jako v publikaci Jaroslav Pejchal et al., 2011 [71], která již před lety byla na katedře radiobiologie zpracována.

Náš experiment byl rozšířen o dva časové intervaly, ve kterých nejsou dostupné publikace pro porovnání. V publikaci Tucker James D. et al. [72, 73] je uveden časový interval přibližně po 48 a více hodinách s naším poklesem hodnot, který nastoupil po 4 a 24 hodinách a mohl by korelovat. Množství poškozených buněk, tedy buněk s mikrojádry, stoupá po 1 hodině po ozáření přímo úměrně se vzrůstající absorbovanou dávkou a průběh křivky je výrazný. Přímou úměrně stoupá množství poškozených buněk i po 4 a 24 hodinové kultivaci po ozáření, avšak celkové množství mikrojader klesá, u 24 hodinového intervalu téměř na polovinu. To by mohlo být způsobeno reparační schopností buněk, kde při delší časové inkubaci po ozáření měla čas na opravu poškozeného jaderného materiálu. Vzhledem k tomu, že v mikrojaderném testu počítáme jen buňky, které prošly po stimulaci jen jedním dělením, jejich buněčný cyklus byl zastaven právě ve fázi cytokineze. Pokud je jaderný materiál natolik poškozený, že vznikne mikrojádru, není již možná oprava a buňka zůstává trvale poškozena. Z toho lze usuzovat, že delší časová inkubace po ozáření vede k poskytnutí většího času na reparaci, pokud však jednou mikrojádru vznikne, již nemizí. To odpovídá poklesu po 4 a 24 hodinách v křivce závislosti.

Odlišně tomu je při křivkách z detekce histonu H2AX. Křivka má dramatický průběh po 1 hodině po ozáření, kde překračuje při nejvyšší dávce množství poškozených buněk 80 %. Po delším časovém intervalu již dochází k pohotovostní reparaci dvojitých zlomů, což odpovídá poklesu do 40 % poškozených buněk po

4 hodinách od ozáření. Po 24 hodinách je křivka výrazně mírnější a hodnoty poškození klesají přibližně na 10 %. To odpovídá prudkému poklesu fosforylace histonu gama H2AX v prvních 24 hodinách tak, jak je uváděno v dostupné literatuře.

Tyto dvě metody byly mezi sebou podrobněji porovnány ve sloupcových grafech uvedených rovněž ve výsledkové části. Je zde vidět určitá neshoda co se týče procentuálních výsledků, ale výrazná chyba nikde stanovena nebyla. U negativních kontrol byla procentuální zastoupení buněk na dolních hranicích. Ani delší časová prodleva zde neukázala nějaká výrazná navýšení. U dávky 0,5 Gy už byl znatelný menší nárůst u kontroly po 1 hodině od ozáření, avšak s delší časovou prodlevou hodnoty klesaly zpět na ty původní. Dávka 1 Gy už přinesla větší pozitivní změny na buňkách. Po 1 hodině od ozáření už bylo poškození vcelku výrazné, dokonce jednou tak vyšší než u dávky 0,5 Gy. S delší časovou prodlevou u obou metod hodnoty opět klesaly. Dávka 2 a 3 Gy už u obou metod přinesla vysoké procento zastoupení poškozených buněk (40 - 70 %) a dávka 4 Gy už lehce přesahovala 80 % poškození. S delšími časovými intervaly hodnoty klesly, což bylo způsobeno reparační schopností buněk.

Při osobním posouzení výhod a nevýhod u těchto dvou zvolených metod bych v první řadě uvedla velice vysokou časovou náročnost u provádění mikrojaderného testu. Pokud by opravdu nastala mimořádná radiační událost, rychlost zvolené metody by byla na prvním místě. Lékař potřebuje vědět nejlépe hned, jakou dávku alespoň přibližně dotyčný dostal, aby mohl zahájit správný druh léčby. Výsledky „ihned“ nám neposkytuje ani metoda pomocí stanovení gama H2AX, ale oproti mikrojadernému testu je možné zjistit výsledky první den po ozáření. U metody stanovení gama H2AX je cenová relace jednoho vzorku okolo 150,- Kč, což neřadí metodu k ekonomicky nedostupným.

Událost, která by způsobila rozsáhlou průmyslovou radiologickou nehodu, může potenciálně vystavit tisíce jednotlivců vysokým úrovním záření, které by vyžadovaly okamžité zhodnocení a lékařský zásah. Koordinované lékařské reakce zahrnující jak časné masové úrazové třídění, tak následné klinické hodnocení, je důležité pro zmírnění škod. Vývoj biodozimetrických technik je tedy mocným nástrojem v personalizaci léčebné odpovědi na absorpci záření, což představuje významný přínos pro veřejné zdraví [74].

Užitečnost biodozimetrických metod závisí především na časovém intervalu, během kterého poskytnete přesné výsledky. Metody zpravidla vyžadují specializované laboratoře pro zpracování vzorku a proběhnutí vlastního testu. Důležitou roli hraje také rychlost transportu odebraných vzorků do takto specializované laboratoře [75]. Dostupnost rychlé diagnostiky umožní přesnější třídění osob zasažených ionizujícím zářením, zacílení personálu a vybavení, lékařských protipatření a odbornou pomoc. Kvalifikované zpětné stanovení míry poškození organismu ionizujícím zářením a určení absorbované dávky je důležité pro včasné zahájení léčby akutní nemoci z ozáření. Z tohoto důvodu vyvstává praktická potřeba validních biodozimetrických ukazatelů do 24 hodin po ozáření. I přes možnost automatizace analýzy mikrojaderných či kvantifikace H2AX průtokovou cytometrií, zůstává hlavní nevýhodou analýzy cytogenetických metod jejich časová náročnost a potřeba vysoké odborné způsobilosti personálu [76].

Vzhledem k časové náročnosti mikrojaderného testu a cenám protilátek pro průtokovou cytometrii byly pokusy opakovány 4 krát. Pro základní statistiku a porovnání je to dostačující, navrhovala bych však v tomto výzkumu pokračovat a rozšířit počty opakování jednotlivých pokusů. Také by bylo vhodné detailnější hodnocení při mikrojaderném testu. Lze počítat i s výskytem mostků a pupenů, které jsou řazeny také mezi defekty buněčných jader. Také by bylo zajímavé prodloužit časové intervaly na několik dní po ozáření.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo srovnání klasické a nové biodozimetrické metody. Porovnání výsledků získaných jejich měřeními a vyhodnocení kladů a záporů jednotlivých metod, získaných porovnáním pracovní, efektivnosti, citlivosti měření a doby experimentu. Porovnání probíhalo v rozsahu dávek 0,5 – 4 Gy, v časových intervalech 1 – 24 hodin po ozáření za účelem vhodnosti jednotlivých metod pro rutinní biodozimetrickou praxi. Všechny stanovené cíle práce byly splněny.

Klasický mikrojaderný test: Mezi negativa řadíme zdlouhavou přípravu, cena na jeden vzorek je odhadem kolem 220 Kč. Tato metoda je vhodná pro rozsah dávek od 0,1 - 5 Gy a získání výsledků je nejdříve do 3 - 4 dnů, velkou nevýhodou metody je zejména nutnost erudice při mikroskopickém odečtu vzorku a dlouhá doba odečtu na jeden mikroskopický vzorek.

Nový experimentální přístup pomocí stanovení proteinu H2AX: Tato metoda je časově méně náročná (cca 120 min), cena na jeden vzorek vychází odhadem na 200 Kč. Metoda je vhodná pro větší rozsah dávek a to 0,5 - 10 Gy. Získání výsledků je do 2 hodin od obdržení vzorku. Je však nutné odběry krve provést do 24 hodin po nehodě a měřit ve speciální imunologické laboratoři školeným personálem.

Z výše uvedených důvodů navrhuji zvážit zahrnutí testu stanovení H2AX pro zpětný biodozimetrický odečet dávky do běžných biodozimetrických metod.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANO – akutní nemoc z ozáření

BN – binukleární (dvoujaderné) buňky

CD8+ - cytotoxické T-lymfocyty

DA – dicentrická analýza

DNA – dvou-řetězcová nukleová kyselina

ELISA – imunologická metoda k detekci protilátek

FA - formaldehyd

FCM – flow cytometry (průtoková cytometrie)

FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FITC - fluorescein isothiokyanát

GY – jednotka absorbované dávky (Gray)

H2A - histon

H2AX – protilátka (histon)

IZ – ionizující záření

MN - mikrojádru

NK – natural killers (přirozený zabíječ)

P53 – nádorový supresorový protein

PBS – fosfátový pufr

PCC – předčasná chromozomální kondenzace

PHA - phytohemagglutinin

RNA – ribonukleová kyselina

RPMI - médium

RTG – rentgenové záření

WB – wash buffer – promývací pufr

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] NEKULA, Josef. *Radiologie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2001. ISBN 80-244-0259-9.

[2] HÁLA, Jiří. *Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie*. Konvoj, 1998. ISBN 80-85615-56-8.

[3] BAKKENIST, Christopher J.; KASTAN, Michael B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003, 421.6922: 499.

[4] Státní ústav radiační ochrany, v.v.i. *Radiační ochrana* [online]. © 2017. Dostupné z: <http://www.suro.cz>

[5] HRAZDIRA, Ivo, et al. *Biofyzika: Celostát. vysokošk. učeb. pro lék. fak. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 8020100466.

[6] Mirion technologies. *Types of Ionizing Radiation* [online]. Dostupné z: <https://www.mirion.com/introduction-to-radiation-safety/types-of-ionizing-radiation>

[7] ULLMANN, V. *Jaderná a radiační fyzika. Radioaktivita 1.2* [online]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika2.htm>

[8] VLČEK, Jaroslav; HUŠÁK, Václav. *Základy fyziky ionizujícího záření – Interní studijní materiál BFU AVČR*

- [9] Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra nukleární medicíny. *Interakce rentgenového a gama záření s prostředím* [online]. [cit. 2009-1-3]. Dostupné z: <http://www.upol.cz/fakulty/lf/struktura/pracoviste/klinika-nuklearni-mediciny/pedagogicka-cinnost/fyzikalni-zaklady-zobrazovani-v-nuklearni-medicine-a-radiacni-ochrana/fyzikalni-zaklady/interakce-rentgenoveho-a-gama-zareni-s-prostredim/>
- [10] KLENER, Vladislav, et al. Principy a praxe radiační ochrany. *Praha: Státní úřad pro jadernou bezpečnost*, 2000. ISBN 80-238-3703-6.
- [11] FREMUTH, František. *Účinky záření a chemických látek na buňky a organismus*. SPN, 1981.
- [12] ROSINA, Jozef, et al. Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory. *Praha: Grada. Vyd*, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- [13] Radiobiologie. *Deterministické účinky. 7.5.2* [online]. Dostupné z: <http://fbmi.sirdik.org/7-kapitola/75/752.html>
- [14] ROTMAN, Galit; SHILOH, Yosef. The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint controls and cellular defence against oxidative stress. *Cancer surveys*, 1996, 29: 285-304.
- [15] WAHL, Geoffrey M.; CARR, Antony M. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nature cell biology*, 2001, 3.12: E277-E286.
- [16] Státní úřad pro jadernou bezpečnost. *Radiační ochrana, jaderná bezpečnost* [online]. Dostupné z: www.sujb.cz
- [17] BRENNER, David J.; HALL, Eric J. Computed tomography an increasing source of radiation exposure. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357.22: 2277-2284.
- [18] SAENKO, V., et al. The Chernobyl accident and its consequences. *Clinical Oncology*, 2011, 23.4: 234-243.
- [19] JARMONENKO, S. P. (Samuil Petrovič). *Radiobiologie lidem*. 1. vyd. Praha : Horizont, 1981. 116 s. : il., tab. ; 20 cm.

- [20] YANEVA, Mariana; KOWALEWSKI, Tomasz; LIEBER, Michael R. *Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies*. The EMBO journal. [online]. 1997, 16.16: 5098-5112. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%202_2005/7%20Vilasov%C3%A1-W.pdf
- [21] BENDER, M. A.; GOOCH, P. C. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiated in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1962, 48.4: 522-532.
- [22] VILASOVÁ, Z., ÖSTERREICHER, J., VÁVROVÁ, J.: *Biodozimetrie I: Praktická potřeba biodozimetrie a nejdůležitější aktivované mechanismy po ozáření*. [online]. 2005 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%202_2005/7%20Vilasov%C3%A1-W.pdf
- [23] VILASOVÁ, Z., ÖSTERREICHER, J., VÁVROVÁ, J.: *Biodozimetrie II: Přehled současných metod a perspektiva biodozimetrie* [online]. 2005 [cit. 2011-03-10]. Dostupné z: http://www.vojenskaskola.cz/skola/uo/fvz/fakulta/Documents/VZL/2005/VZL3_4_05.pdf
- [24] TSUKAMOTO, Yasumasa; KATO, Jun-ichi; IKEDA, Hideo. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1997, 388.6645: 900-903. ISSN: 0028-0836
- [25] ABRAHAM, Robert T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development*, 2001, 15.17: 2177-2196. DOI: 10.1101/gad.914401
- [26] ÖSTERREICHER, J., VÁVROVÁ, J.: *Přednášky z radiobiologie*. Praha: Manus, 2003. ISBN 80-86571-01-7.
- [27] SCHMITZ, Annette, et al. Heritability of susceptibility to ionizing radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 2007, 68.4: 1169-1177. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.03.050>

- [28] DOSTÁL, M., et al. 1975: *Vojenská radiobiologie I*. Učební texty VLA JEP Hradec Králové. 66-71.
- [29] PEJCHAL J. et al, Biodozimetrické postupy, *Vojenské zdravotnické listy, ročník 64*. [online]. 2010, č. 2. Dostupné z: http://www.unob.cz/fvz/fakulta/Documents/VZL/2010/2_2010/6_Pejchal.pdf
- [30] SWARTZ, Harold M., et al. A critical assessment of biodosimetry methods for large-scale incidents. *Health physics*, 2010, 98.2: 95.
DOI: 10.1097/HP.0b013e3181b8cffd
- [31] ABBOTT, Derek W.; HOLT, Jeffrey T. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274.5: 2732-2742.
DOI: 10.1074/jbc.274.5.2732
- [32] FLIEDNER, T. M., et al. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2002, 17.4: 405-426
- [33] KENGO, K. A. T. O.; KUWABARA, Mikinori; KASHIWAKURA, Ikuo. The influence of gender-and age-related differences in the radiosensitivity of hematopoietic progenitor cells detected in steady-state human peripheral blood. *Journal of radiation research*, 2011, 52.3: 293-299.
- [34] VÁCHA, Jiří. *Pathologická fyziologie*. Brno: Masarykova univerzita, 1993. ISBN 8021005653.
- [35] TANAKA, Shun-Ichi. Summary of the JCO criticality accident in Tokai-mura and a dose assessment. *Journal of radiation research*, 2001, 42.SUPPL: S1-S9.
- [36] ŠINKOROVÁ, Zuzana a NAVRÁTIL, Leoš. *Biomedicínská detekce ionizujícího záření: organizace zdravotnické péče po zevní kontaminaci radionuklidy*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2014. ISBN 978-80-01-05626-4.
- [37] DOSIMETRY, Biological. Chromosomal aberration analysis for dose assessment. *Vienna: International Atomic Energy Agency*, 1986.

[38] HALL, Eric J.; GIACCIA, Amato J. *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 546 p. ISBN: 0781741513.

[39] Genetika. *Váš zdroj informací o genetice*. [online]. © 2002 – 2015. 2008 [cit. 2011-09-03]. Dostupné z: <http://genetika.wz.cz/abrace.htm>

[40] *Klinická cytogenetika strukturní abrace chromozomů*. [online]. Seminář. © 2017. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3236630>

[41] FLOOD, Ann Barry, et al. A framework for comparative evaluation of dosimetric methods to triage a large population following a radiological event. *Radiation measurements*, 2011, 46.9: 916-922. [cit. 2016-09-15]. DOI: 10.1016/j.radmeas.2011.02.019. ISSN13504487.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350448711000667>

[42] BLAKELY, William F.; SALTER, Charles A.; PRASANNA, Pataje GS. Early-response biological dosimetry-recommended countermeasure enhancements for mass-casualty radiological incidents and terrorism. *Health Physics*, 2005, 89.5: 494-504. [cit. 2016-09-15]. DOI:10.1097/01.HP.0000175913.36594.a4. ISSN0017-9078.

[43] SNIGIRYOVA, H. BRASELMANN, K. SALASSIDIS, V. SHEVCHENKO AND M. BAUCHINGER, G. *Retrospective biodosimetry of Chernobyl clean-up workers using chromosome painting and conventional chromosome analysis*. International journal of radiation biology, 1997, 71.2: 119-127.

[44] Technical report No. 405, 2001. *Cytogenetics analysis for radiation dose assessment: a manual*, Vienna: International Atomic Energy Agency. [online]. ISSN 0074-1914. ISBN 92-0-102101-1.

Dostupné z: http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/TRS405_scr.pdf

[45] HALL, EJ. *Radiobiology for the radiologist*. 2nd ed. Hagerstown, Harper and Row publishers, 1978. 460 p. [online].

Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL6_2003/07.pdf

- [46] Radiobiologie. *Mikrojádra 3.2.4* [online]. Dostupné z: <http://fbmi.sirdik.org/3-kapitola/32/324.html>
- [47] FENECH, Michael; MORLEY, Alexander A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1985, 147.1-2: 29-36.
- [48] *Prevence úrazů, otrav a násilí* [online]. 2011, č. 1 [cit. 15. 6. 2011]. ISSN 1804-7858. Dostupné z: <http://casopis-zsfju.zsf.jcu.cz/prevence-urazu-otrav-a-nasili/administrace/clankyfile/20120330100904440748>.
- [49] GOTOH, E.; ASAKAWA, Y. *Detection and evaluation of chromosomal aberration induced by high doses of gama-irradiation using immunogold-silver painting of prematurely condensed chromosomes*. *Int. J. Rad. Biol.*, 1996, 70, 517-520.
- [50] HAYATA, Isamu, et al. *Cytogenetical dose estimation for 3 severely exposed patients in the JCO criticality accident in Tokai-mura*. *Journal of Radiation Research*, 2001, 42.SUPPL: S149-S155. DOI: <http://doi.org/10.1269/jrr.42.S149>
- [51] Genetika-Biologie: *Váš zdroj informací o genetice a biologii*. [online]. ©2010-2014. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/fish>
- [52] *Vojenské zdravotnické listy. Uplatnění průtokové cytometrie ve vojenské medicíně a radiobiologii*. [online]. 2008, č.4 [cit. 26. 2. 2008]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%204_2008/08%20%8Ainkorov%E1.pdf
- [53] ECKSCHLAGER, T., et al. 1999: *Průtoková cytometrie v klinické praxi*. Praha, ISBN 80-7169-279-4.
- [54] ROBINSON, J. Paul (ed.). 1993: *Handbook of flow cytometry methods*. Wiley-Liss.
- [55] VOKURKOVA, D., et al. CD8⁺ Natural Killer Cells Have a Potential of a Sensitive and Reliable Biodosimetric Marker in vitro. *Physiological research*, 2006, 55.6: 689. ISSN: 0862-8408.
- [56] VOKURKOVÁ, Doris, et al. Radiosensitivity of CD3⁻ CD8⁺ CD56⁺ NK cells. *Radiation Measurements*, 2010, 45.9: 1020-1023. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.radmeas.2010.07.028>

[57] KEREN, David F.; HANSON, Curtis A.; HURTUBISE, Paul E., 1994: *Flow cytometry and clinical diagnosis*. American Society of Clinical Pathologists Press.

[58] HAVELEK, Radim, et al., 2011: *Phosphorylation of histone H2AX in peripheral blood mononuclear cells after thoracic irradiation of rats*. Journal of Applied Biomedicine, 9.4: 209-218.

[59] REDON, Christophe, et al., 2002: Histone H2A variants h2ax and h2az. Current opinion in genetics & development. *Chemické listy: Fosforylovaný histon H2AX-nový indikátor poškození DNA*. [online]. 2011, 105, 108–113. Dostupné z: http://ww.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_02_108-113.pdf

[60] JEON, Kwang W., et al., 2013: *International review of cell and molecular biology*. Academic Press. ISBN: 9780124078444.

[61] Masaryk University [CZ]. *Metody separace buněk* [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Bi5220c/5._Metody_separace_bunek.pdf

[62] Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové. *Laboratorní metody, průtoková cytometrie*. [online]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/prutokova-cytometrie.aspx>

[63] Biofyzikální ústav Lékařské Fakulty, Masarykova Univerzita. *Průtoková cytometrie, flow-cytometrie* [online]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/biofyz/files/gerontologie/prutokova_cytometrie_prezentace.pdf

[64] SULLIVAN, Julie M., et al. Assessment of biodosimetry methods for a mass-casualty radiological incident: medical response and management considerations. Health physics, 2013, 105.6. DOI: 10.1097/HP.0b013e31829cf221. [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810609/>

[65] BURMA, Sandeep, et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276.45: 42462-42467. [online]. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/276/45/42462.full>

- [66] MARIOTTI, Luca G., et al. Use of the γ -H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. *PloS one*, 2013, 8.11: e79541. [online]. Dostupné z: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079541>
- [67] MURRAY, Philip J., et al. DNA double-strand break repair: a theoretical framework and its application. *Journal of The Royal Society Interface*, 2016, 13.114: 20150679. [online]. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/content/13/114/20150679>
- [68] PODHORECKA, Monika; SKLADANOWSKI, Andrzej; BOZKO, Przemyslaw. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *Journal of nucleic acids*, 2010, 2010. [online]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/920161/>
- [69] HUANG, Xuan; DARZYNKIEWICZ, Zbigniew. Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *DNA Repair Protocols: Mammalian Systems*, 2006, 73-80. [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1458374/>
- [70] E. RASTKHAN, F. ZAKERI et al. The cytokinesis-blocked micronucleus assay: dose – response calibration curve, background frequency in the population and dose estimation 2015. DOI: 10.1007/s00411-015-0624-3 [online]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00411-015-0624-3>
- [71] PEJCHAL J. et al, Cytokinesis - Block Micronucleus (CBMN) assay/cbmn cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry, *Vojenské zdravotnické listy*, 2011, vol 80. [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/profile/Klara_Kubelkova/publication/228503318_Cytokinesis-block_micronucleus_CBMN_assayCBMN_cytome_assay_in_human_lymphocytes_after_in_vitro_irradiation_and_its_use_in_biodosimetry/links/0912f51220ea638468000000/Cytokinesis-block-micronucleus-CBMN-assay-CBMN-cytome-assay-in-human-lymphocytes-after-in-vitro-irradiation-and-its-use-in-biodosimetry.pdf

[72] TUCKER, James D., et al. *Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: I, PAINT translocations, dicentrics, rings, fragments, and insertions*. Environmental and molecular mutagenesis, 2005, 45.2-3: 229-248.

[73] TUCKER, James D., et al. Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: II, does it matter how translocations are scored?. *Environmental and molecular mutagenesis*, 2005, 45.2-3: 249-257. TUCKER, James D., et al. Persistence of chromosome aberrations following acute radiation: II, does it matter how translocations are scored?. Environmental and molecular mutagenesis, 2005, 45.2-3: 249-257.

[74] EFRON, Bradley; TIBSHIRANI, Robert. Improvements on cross-validation: the 632+ bootstrap method. *Journal of the American Statistical Association*, 1997, 92.438: 548-560 [online]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM427866.pdf>

[75] SULLIVAN, Julie M., et al. *Assessment of biodosimetry methods for a mass-casualty radiological incident: medical response and management considerations*. Health physics, 2013, 105.6.

[76] Jeličová M. et al; *Elektrochemická detekce poškození DNA po ozáření jako nový nástroj biodozimetrie*, Bezpečnost jaderné energie, 2017, roč. 25, č. 3/4, s. 114-117. ISSN: 1210-7085.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 - Emise alfa částice z jádra atomu [6]</i>	9
<i>Obr. 2 - Emise beta částice z jádra atomu [6]</i>	9
<i>Obr. 3 - Emise vysokoenergetické vlny z jádra atomu [6]</i>	10
<i>Obr. 4 - Emise vysoké energetické vlny z elektronového obalu atomu [6]</i>	11
<i>Obr. 5 - Emise neutronu z jádra atomů [6]</i>	11
<i>Obr. 6 - Projevy deterministických biologických účinků ionizujícího záření [13]</i>	12
<i>Obr. 7 - Dicentrický chromozom [40]</i>	21
<i>Obr. 8 - Mikrojádro, detekované na konci mitotického dělení [46]</i>	23
<i>Obr. 9 - Metoda FISH [51]</i>	26
<i>Obr. 10 - Izolace lymfocytů [61]</i>	31
<i>Obr. 11 - Bürkerova komůrka</i>	32
<i>Obr. 12 – Dot plot: Forward scatter (FSC) versus Side scatter (SCC) buněk periferní krve</i>	40
<i>Obr. 13 – Neozářená kontrola za 1 hod</i>	41
<i>Obr. 14 - Dvoujaderná buňka</i>	42
<i>Obr. 15 - Dvoujaderná buňka s jedním mikrojádro</i>	43
<i>Obr. 16 - Dvoujaderná buňka se dvěma mikrojádry</i>	43
<i>Obr. 17 - Několik dvoujaderných buněk</i>	44
<i>Obr. 18 – Čtyř jaderná buňka</i>	44

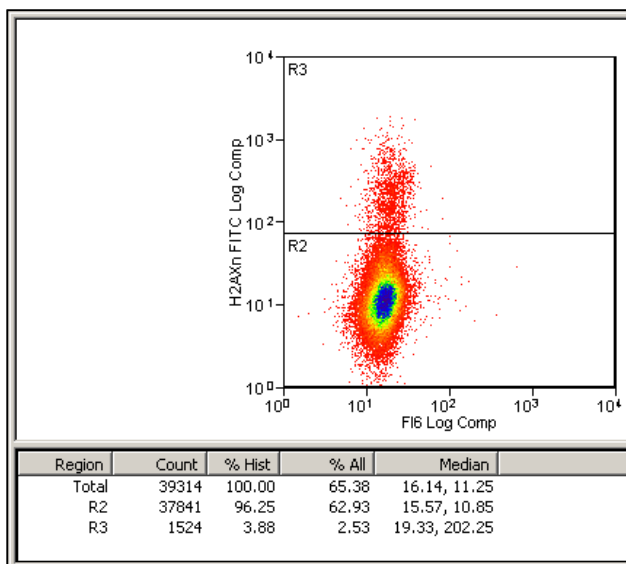
<i>Obr. 19 - Klastry buněk v metafázi mitotického dělení.....</i>	45
<i>Obr. 20 - Procentuální zastoupení dvoujaderných (BN) buněk vůči dávce ozáření</i>	46
<i>Obr. 21 - Procentuální zastoupení pozitivních buněk vůči dávce ozáření</i>	47
<i>Obr. 22 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX pro neozářenou kontrolu v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin.....</i>	48
<i>Obr. 23 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 0,5 Gy</i>	49
<i>Obr. 24 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 1 Gy</i>	50
<i>Obr. 25 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 2 Gy</i>	51
<i>Obr. 26 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 3 Gy</i>	52
<i>Obr. 27 - Srovnání mikrojaderného testu (MN) a stanovení H2AX při dávce 4 Gy</i>	53

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

<i>Tab. 1 - Počet lymfocytů v periferní krvi 24 hodin po nehodě v závislosti na velikosti obdržené dávky [26].....</i>	19
<i>Tab. 2 - Srovnání průtokové cytometrie s klasickou mikroskopií buněčných suspenzí [52]</i>	27
<i>Tab. 3 - Ilustrační příprava chemikálií potřebných ke stanovení H2AX.....</i>	35

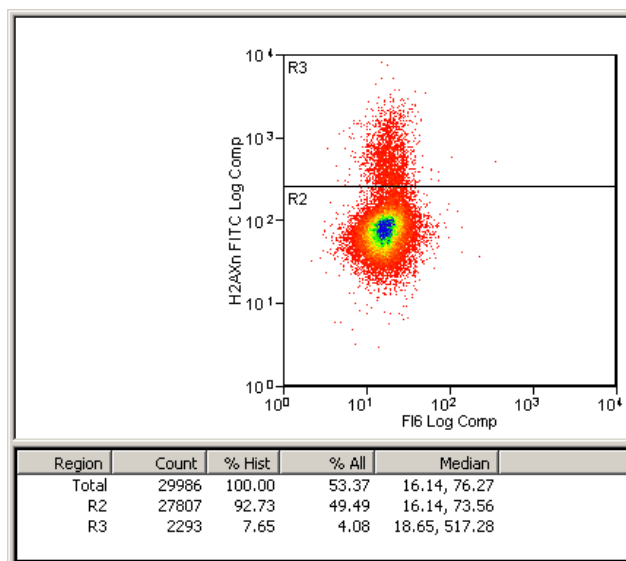
12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Neozářená kontrola za 1 hod



Pozn.: Procentuální zastoupení negativních (R2) a pozitivních (R3) buněk z jejich celkového počtu. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů, tedy 100 %. Vzhledem k tomu, že zde nenastalo ozařování buněk, je zastoupení negativních buněk přijatelně nízké. Neozářená kontrola slouží ke správnému porovnání výsledků.

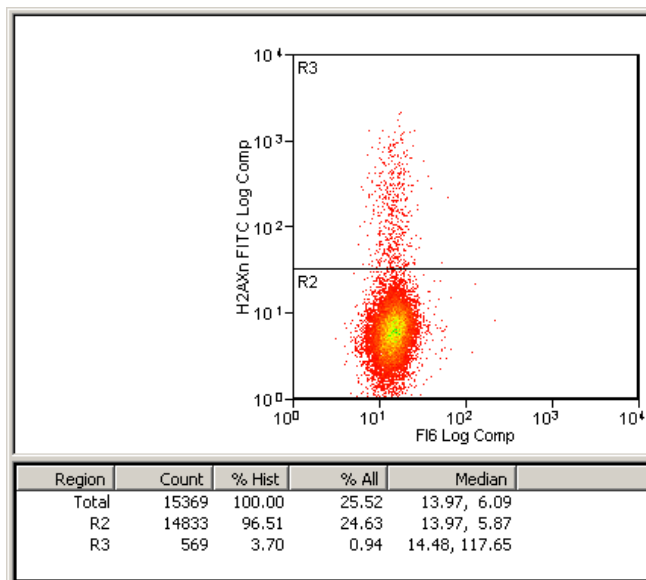
Příloha 2: Neozářená kontrola za 4 hod



Pozn.: Procentuální zastoupení negativních (R2) a pozitivních (R3) buněk z jejich celkového počtu. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Vzhledem k tomu, že

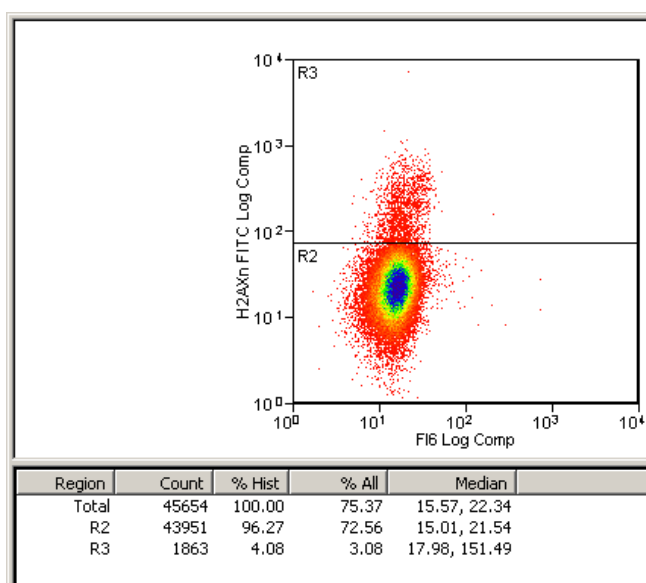
zde nenastalo ozařování buněk, je zastoupení negativních buněk přijatelně nízké. Neozářená kontrola slouží ke správnému porovnání výsledků.

Příloha 3: Neozářená kontrola za 24 hodin



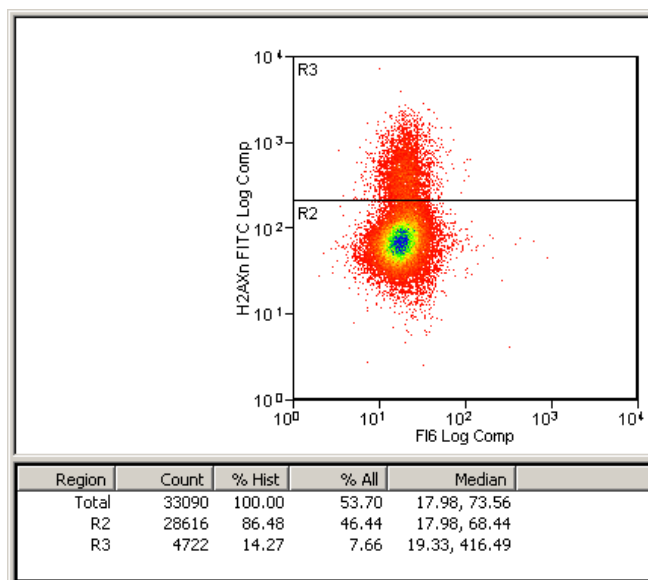
Pozn.: Procentuální zastoupení negativních (R2) a pozitivních (R3) buněk z jejich celkového počtu. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Vzhledem k tomu, že zde nenastalo ozařování buněk, je zastoupení negativních buněk přijatelně nízké. Neozářená kontrola slouží ke správnému porovnání výsledků.

Příloha 4: 0,5 Gy za 1 hod



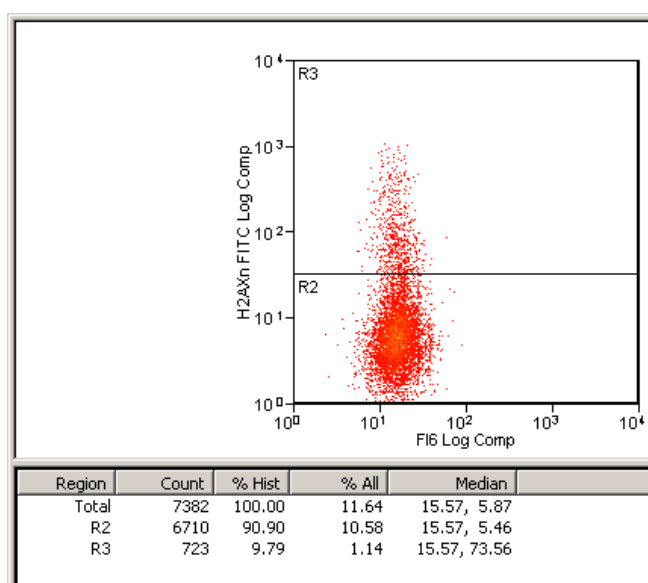
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 0,5 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Tato dávka není tolik vysoká, proto výsledné hodnoty lehce přesahují hranici normy.

Příloha 5: 0,5 Gy za 4 hod



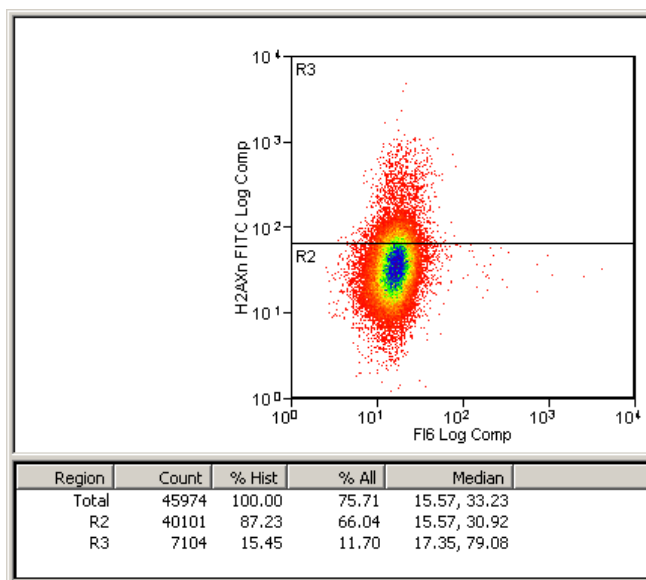
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 0,5 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Tato dávka není tolik vysoká, proto výsledné hodnoty lehce přesahují hranici normy.

Příloha 6: 0,5 Gy za 24 hod



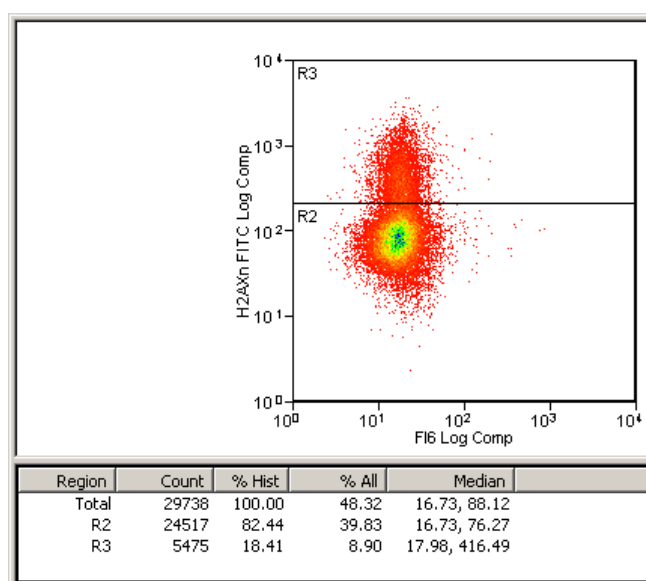
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 0,5 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Tato dávka není tolik vysoká, proto výsledné hodnoty lehce přesahují hranici normy.

Příloha 7: 1 Gy za 1 hod



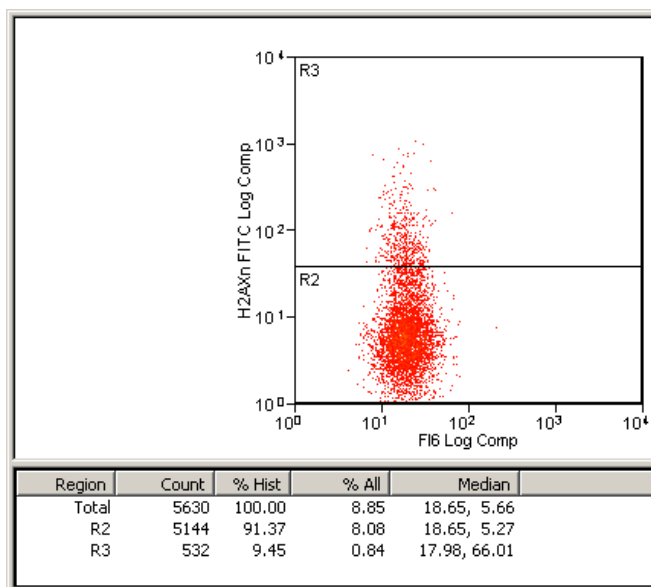
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 1 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty začínají zlehka stoupat vzhledem k vyšší dávce ozáření.

Příloha 8: 1 Gy za 4 hod



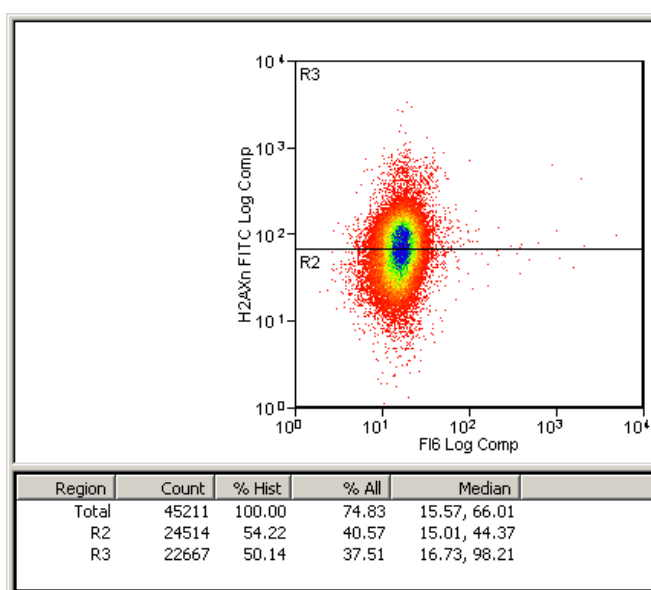
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 1 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty začínají zlehka stoupat vzhledem k vyšší dávce ozáření.

Příloha 9: 1 Gy za 24 hod



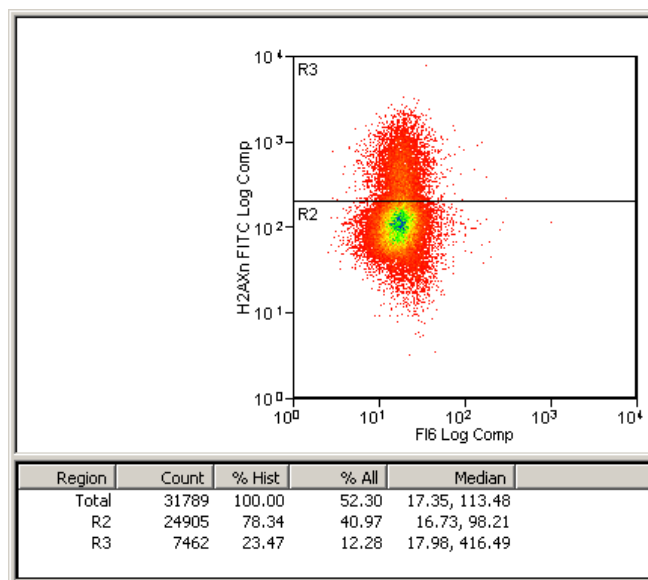
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 1 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty vzhledem k delšímu časovému odstupu 24 hodin mírně klesly.

Příloha 10: 2 Gy za 1 hod



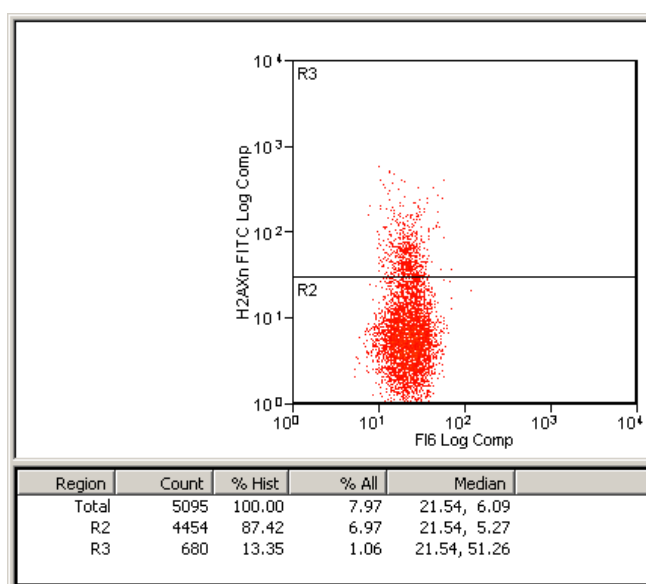
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 2 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty znatelně stouply vzhledem k vyšší dávce ozáření.

Příloha 11: 2 Gy za 4 hod



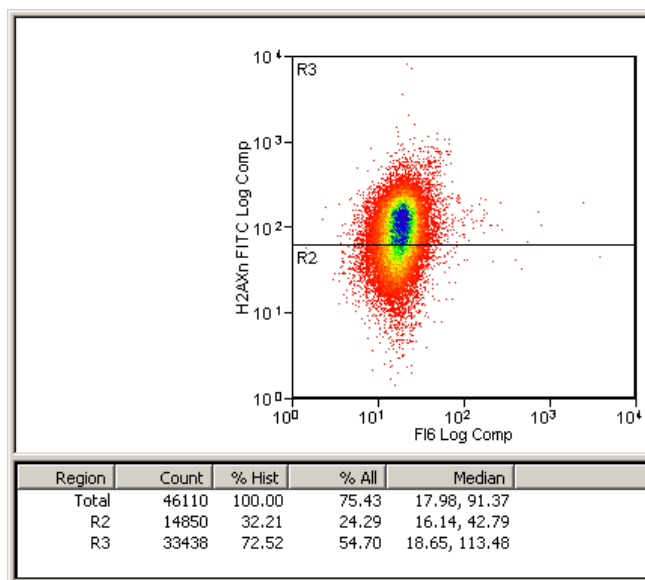
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 2 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty znatelně stouply vzhledem k vyšší dávce ozáření.

Příloha 12: 2 Gy za 24 hod



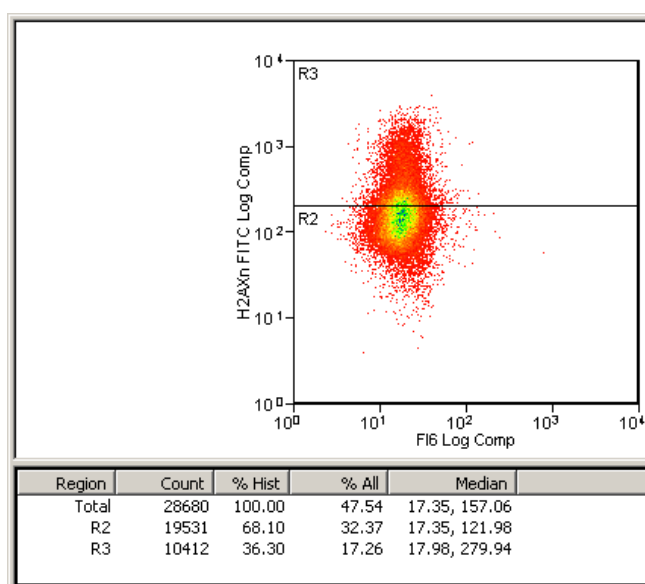
Pozn.: Znárodnění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 2 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty vzhledem k delšímu časovému odstupu 24 hodin mírně klesly.

Příloha 13: 3 Gy za 1 hod



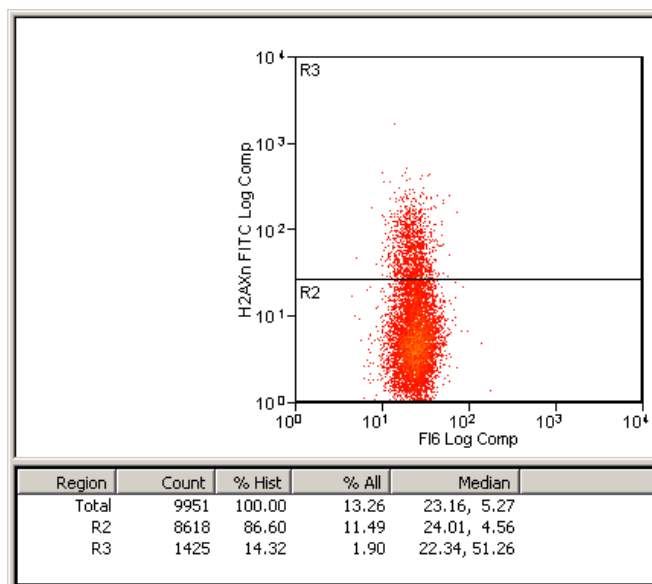
Pozn.: Znárodnění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 3 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty výrazně stouply vzhledem k ještě vyšší dávce ozáření.

Příloha 14: 3 Gy za 4 hod



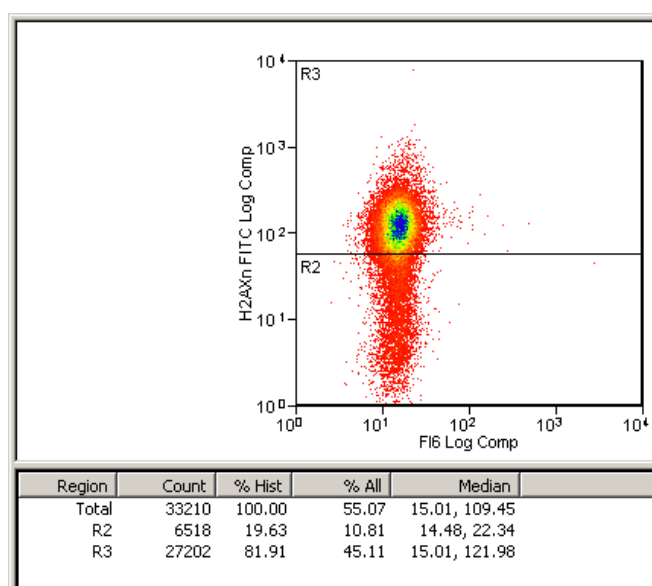
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 3 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty výrazně stouply vzhledem k ještě vyšší dávce ozáření.

Příloha 15: 3 Gy za 24 hod



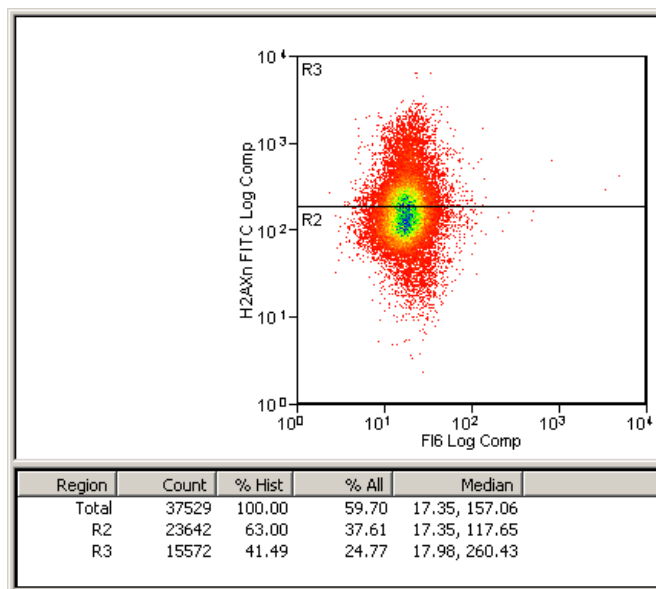
Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 3 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Hodnoty mírně klesly vzhledem k delšímu časovému odstupu 24 hodin od ozáření.

Příloha 16: 4 Gy za 1 hod



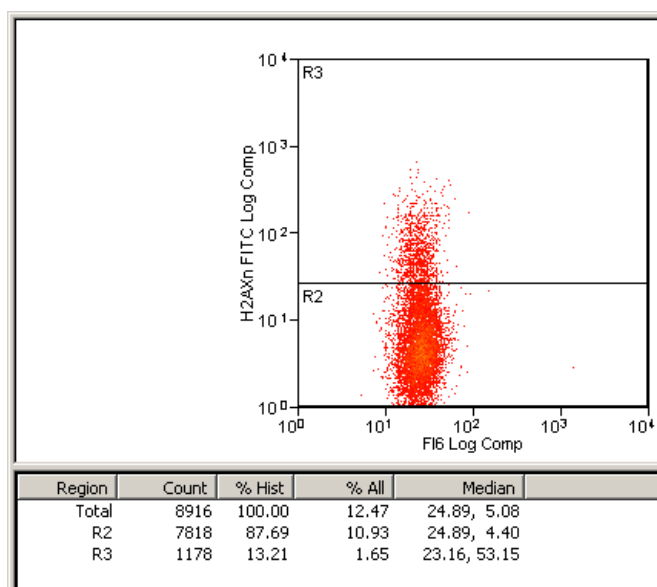
Pozn.: Znárodnění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 4 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Zastoupení pozitivních buněk se při takovéto dávce pomalu blíží k hranici 85% poškození. Zastoupení negativních buněk už klesá na nižší hodnoty (19,63 %).

Příloha 17: 4 Gy za 4 hod



Pozn.: Znárodnění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 4 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Sledujeme zde mírný pokles pozitivních buněk oproti jedné hodině. S delším časovým odstupem hodnoty pomalu klesají.

Příloha 18: 4 Gy za 24 hod



Pozn.: Znázornění zastoupení pozitivních a negativních buněk vzhledem k ozáření dávkou 4 Gy. První řádek „total“ tvoří celkové zastoupení lymfocytů tedy 100 %. Vzhledem k delšímu časovému odstupu 24 hodin zastoupení pozitivních buněk výrazně kleslo.