

České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská  
Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření



## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vliv individuální radiosenzitivity tumoru na  
výsledky radioterapie

Autor: Michaela Šmerková  
Vedoucí: Ing. Anna Jelínek Michaelidesová, Ph.D.  
Akademický rok: 2022/2023



*Katedra:* KDAIZ

*Akademický rok:* 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

*Student:* Michaela Šmerková

*Studijní program:* Radiologická technika

*Specializace:* ---

*Název práce:* Vliv individuální radiosensitivitý tumoru na výsledky radioterapie  
(česky)

*Název práce:* The role of the individual tumor radiosensitivity  
(anglicky) on the radiotherapeutical outcome

*Pokyny pro vypracování:*

1. Student popíše účinky ionizujícího záření na živé organismy, shrne různé metody a běžná frakcionační schémata radioterapie.
2. Student provede důkladnou rešerší literatury na téma individuální tumorová radiosensitivita a zhodnotí vliv individuální tumorové radiosensitivitý na účinky radioterapie.
3. Student provede ozáření a zhodnocení radiosensitivitý pomocí klonogenního testu třech různých rakovinných buněčných linií stejného tkáňového původu.

*Doporučená literatura:*

- [1] RASSAMEGEVANON, Treewut, Steffen LÖCK, Michael BAUMANN, Mechthild KRAUSE a Cläre VON NEUBECK. Comparable radiation response of ex vivo and in vivo irradiated tumor samples determined by residual  $\gamma$ H2AX. *Radiotherapy and Oncology*. 2019, **139**, 94-100. ISSN 01678140. DOI:10.1016/j.radonc.2019.06.038.
- [2] MENECEUR, Sarah, Steffen LÖCK, Volker GUDZIOL, et al. Residual gammaH2AX foci in head and neck squamous cell carcinomas as predictors for tumour radiosensitivity: Evaluation in pre-clinical xenograft models and clinical specimens. *Radiotherapy and Oncology*. 2019, **137**, 24-31. ISSN 01678140. DOI:10.1016/j.radonc.2019.04.009.
- [3] KATO, Takamitsu A., Paul F. WILSON, Hatsumi NAGASAW, Yuanlin PENG, Michael M. WEIL, John B. LITTLE a Joel S. BEDFORD. Variations in radiosensitivity among individuals: a potential impact on risk assesment? *Health Physics*. 2009, **97**(5), 470-480. ISSN 0017-9078. DOI:10.1097/HP.0b013e3181b08eee.

*Jméno a pracoviště vedoucího bakalářské práce:*

Ing. Anna Jelínek Michaelidesová, Ph.D.  
České vysoké učení technické v Praze  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská  
Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření  
Břehová 7  
115 19 Praha 1

Akademie věd České republiky  
Ústav jaderné fyziky, v.v.i.  
Oddělení dozimetrie záření  
Na Truhlářce 39/64  
180 00 Praha 8


*Jméno a pracoviště konzultanta bakalářské práce:*

---

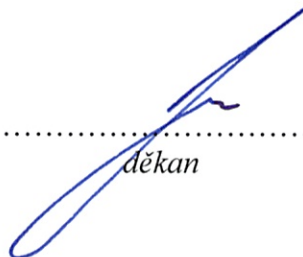
*Datum zadání bakalářské práce:* 24.9.2021

*Termín odevzdání bakalářské práce:* 7.7.2022

*Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.*

  
.....  
garant programu

  
.....  
vedoucí katedry

  
.....  
děkan

V Praze dne 24.9.2021







## PROHLÁŠENÍ

Já, níže podepsaný

*Jméno a příjmení studenta:* Michaela Šmerková

*Osobní číslo:* 486490


*Název studijního programu (oboru):* Radiologická technika

prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem:

**Vliv individuální radiosenzitivity tumoru na výsledky radioterapie**

vypracovala samostatně a uvedla veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných prací.

V Praze dne 1. 5. 2023

  
.....

podpis

## **Poděkování**

Za odborné vedení mé bakalářské práce, velkou míru trpělivosti a ochoty, lidský přístup a také za cenné a velmi podnětné rady při zpracovávání práce děkuji mé vedoucí práce Ing. Anně Jelínek Michaelidesové, Ph.D. Dále bych ráda poděkovala Ing. Irině Danilové za ochotnou pomoc v rámci vykonání experimentální části této práce. A v neposlední řadě děkuji mé rodině, snoubenci a přátelům za neutuchající podporu a lásku.

Michaela Šmerková

*Název práce:*

## **Vliv individuální radiosenzitivity tumoru na výsledky radioterapie**

*Autor:* Michaela Šmerková

*Studijní program:* Radiologická technika

*Druh práce:* Bakalářská práce

*Vedoucí práce:* Ing. Anna Jelínek Michaelidesová, Ph.D.

Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze

Oddělení dozimetrie záření, Ústav jaderné fyziky, Akademie věd České republiky

*Abstrakt:*

Individuální radiosenzitivita tumorů je parametr, který zásadně ovlivňuje radioterapeutickou léčbu. Znalost radiosenzitivity by mohla být přínosná pro indikaci radioterapeutické léčby a celkově by mohla zlepšit účinnost léčby. Za účelem zjištění radiosenzitivity byl proveden klonogenní test tří buněčných linií U251, A172 a T98G. Radiosenzitivita těchto buněčných linií je hodnocena pomocí tří křivek přežití. Dle výsledků byla jako nejvíce radiosenzitivní vyhodnocena buněčná linie A172. Radiosenzitivita buněčných linií U251 a T98G je dle výsledků nižší. Je diskutován vliv dalších faktorů na radiosenzitivitu jako je například věk pacienta a jeho zdravotní stav.

*Klíčová slova:*

Radioterapie, buněčná biologie, radiosenzitivita, klonogenní test.

*Title:*

**The role of the individual tumor radiosensitivity on the radiotherapeutic outcome**

*Author:* Michaela Šmerková

*Specialization:* Radiological technology

*Sort of project:* Bachelor thesis

*Supervisor:* Ing. Anna Jelínek Michaelidesová, Ph.D.

Department of dosimetry and application of ionizing radiation, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University in Prague

Department of Radiation Dosimetry, Nuclear Physics Institute, Czech Academy of Sciences

*Abstrakt:*

The individual radiosensitivity of tumors is a parameter that fundamentally affects radiotherapy treatment. Knowledge of radiosensitivity could be beneficial for the indication of radiotherapy treatment and overall could improve the effectiveness of the treatment. In order to determine the radiosensitivity, a clonogenic assay of three cell lines U251, A172 and T98G was performed. The radiosensitivity of these cell lines is evaluated using three survival curves. According to the results, the A172 cell line was evaluated as the most radiosensitive. According to the resulting survival curves, the radiosensitivity of the U251 and T98G cell lines is lower. The influence of other factors on radiosensitivity, such as the patient's age and health status, is discussed.

*Key words:* Radiotherapy, cellular biology, radiosensitivity, clonogenic assay.



# Obsah

<b>Úvod</b>	<b>10</b>
<b>1 Teoretický úvod</b>	<b>11</b>
1.1 Základní dělení buněk . . . . .	11
1.2 Popis živočišné buňky . . . . .	11
1.3 DNA . . . . .	13
1.4 Buněčný cyklus . . . . .	13
1.5 Účinky ionizujícího záření na DNA . . . . .	15
1.6 Oprava DNA . . . . .	16
1.7 Onkogeneze . . . . .	16
1.8 Mikroprostředí tumoru . . . . .	17
<b>2 Radioterapie</b>	<b>19</b>
2.1 Ionizující záření . . . . .	19
2.2 Obecný úvod k radioterapii . . . . .	19
2.3 Metody radioterapie . . . . .	20
2.4 Frakcionace a příklady . . . . .	23
<b>3 Radiobiologie a radiosenzitivita</b>	<b>24</b>
3.1 Radiobiologie a její principy . . . . .	24
3.2 Vliv individuální radiosenzitivity na průběh radioterapie . . . . .	25
<b>4 Experimentální část: Radiosenzitivita tří rakovinných buněčných linií stejného tkáňového původu</b>	<b>29</b>
4.1 Úvod . . . . .	29
4.2 Materiály a metody . . . . .	29
4.3 Postup experimentu . . . . .	33
4.4 Zpracování . . . . .	35
4.5 Diskuze . . . . .	43
<b>Závěr</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografie</b>	<b>47</b>

# Úvod

Hlavním cílem práce bylo prozkoumat vliv individuální radiosenzitivity tumoru na výsledky radioterapie, a proto jsou v práci popsány základní radiobiologické principy, účinky ionizujícího záření na lidský organismus, individuální tumorová radiosenzitivita, radiosenzitivita buněk a organismu jako celku. Dále je v práci obsaženo téma radioterapie. V poslední kapitole je popsán praktický experiment a jeho výsledky. Diskutuje se přínos znalostí o individuální radiosenzitivitě pro klinickou léčbu.

Text je členěn na čtyři kapitoly. První tři kapitoly jsou rešeršní a závěrečná kapitola je věnována experimentální části. První kapitola obsahuje obecný popis buňky, jednotlivých buněčných organel, dělení buňky. Dále je popisováno DNA, poškození DNA ionizujícím zářením a metody opravy DNA. Závěr první kapitoly pojednává o vzniku, tvorbě a struktuře tumorů.

Ve druhé kapitole je obecně popsáno ionizující záření a začátky jeho užití v medicíně. Dále jsou formulovány jednotlivé metody radioterapie jako je brachyterapie, konvenční radioterapie, 3D konformní radioterapie, radioterapie s modulovanou intenzitou svazku, neutronová záchytová terapie a hadronová terapie. Na konci kapitoly jsou uvedeny frakcionační režimy.

V pořadí třetí kapitola je věnována individuální radiosenzitivitě tumorů. Radiosenzitivita je významným činitelem, který ovlivňuje úspěšnost léčby. Jsou popsány faktory, které ovlivňují odpověď tumorů na radioterapii. Dále je rozebrána problematika indikace radioterapie a dalších onkologických léčebných modalit jako je chemoterapie, imunoterapie, chirurgie, atd.

Poslední kapitola popisuje experimentální část, ve které byly zkoumány tři buněčné linie glioblastomů U251, A172 a T98G. Jsou popsány metody experimentu, použité vybavení a materiál. Kapitola obsahuje také podrobný popis postupu experimentu. Na konci kapitoly jsou uvedeny naměřené hodnoty a jsou diskutovány výsledky experimentu.

Téma práce je velmi komplexní a pro obor radioterapie může být zkoumání tumorové radiosenzitivity velmi přínosné. Znalost radiosenzitivity jednotlivých rakovinných buněk je jedním z rozhodujících parametrů pro volbu onkologické léčby.

# Kapitola 1

## Teoretický úvod

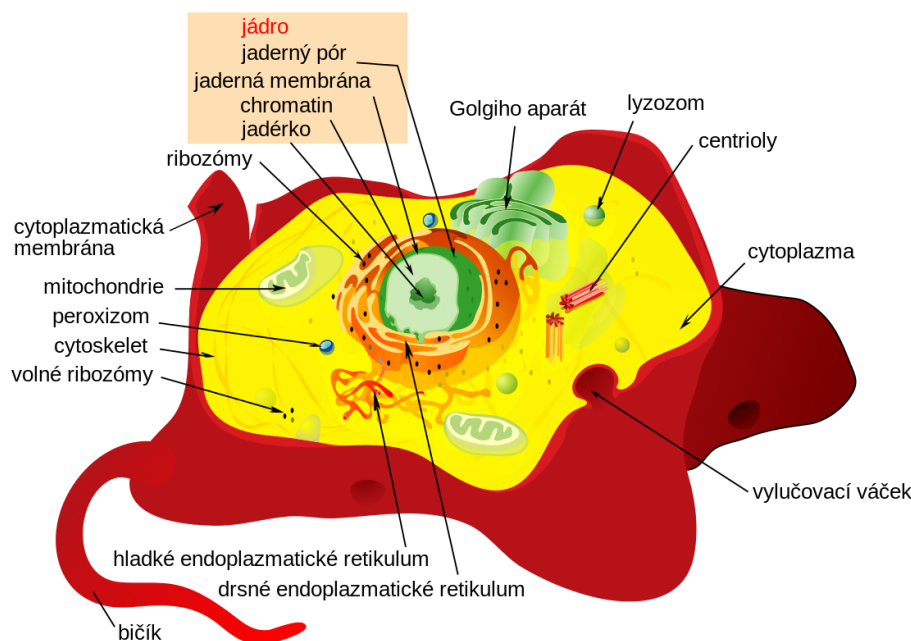
### 1.1 Základní dělení buněk

Buňka je základní morfologickou a funkční jednotkou všech jednobuněčných i mnohobuněčných organismů. Zastává v organismu celou řadu funkcí a vykazuje všechny znaky živé hmoty. Rozměry buňky se pohybují v řádech mikrometrů. Pozorovatelné jsou proto téměř výhradně mikroskopem. Tvar buňky závisí na funkci, kterou buňka v těle vykonává. Jiným tvarem se vyznačují buňky prokaryotní a eukaryotní. Prokaryotní buňky jsou jednodušší a menší než eukaryotní, evolučně se vyvinuly dříve. Do těchto buněk řadíme sinice a bakterie. Eukaryotní buňky jsou složitější a obsahují více vnitřních složitých organel. Dělíme je na rostlinné a živočišné. Tato práce se věnuje výhradně živočišným buňkám, proto budou v následujícím textu popisovány jen ty [1].

### 1.2 Popis živočišné buňky

Živočišné buňky se dále dělí na buňky jednobuněčných a mnohobuněčných organismů. Tato práce pojednává pouze o mnohobuněčných organismech, dále se tedy bude věnovat pouze jejich popisu. Průměrná velikost živočišné buňky se pohybuje v rozmezí 10 – 20  $\mu\text{m}$ . Mají rozmanité tvary v závislosti na vykonávané funkci v organismu. V lidském těle je přibližně 45 biliónů buněk [2]. Jejich součástí jsou různorodé organely zastávající různé funkce. Schématické znázornění buňky je na Obr. 1.1. Soudržnost buněk je zajištěna pomocí cytoskeletu, takzvané kostry buňky. Ochrannou vnější vrstvu buňky tvoří cytoplazmatická membrána, která je polopropustná. Uvnitř buňky jsou rozmístěny jednotlivé organely. Prostor mezi nimi je vyplněn cytoplazmou. Jedná se o viskózní roztok, který je tvořen především z vody, potřebných živin, enzymů, odpadních produktů a dalších látek [3], [4].

Důležitou organelou je jádro (nucleus). Je obaleno do dvojité jaderné membrány. Uvnitř jádra nalezneme jedno nebo někdy i více jadérek. Uvnitř jadérka je uložena veškerá genetická informace potřebná pro replikaci DNA [6].



Obrázek 1.1: Živočišná buňka a její organely [5].

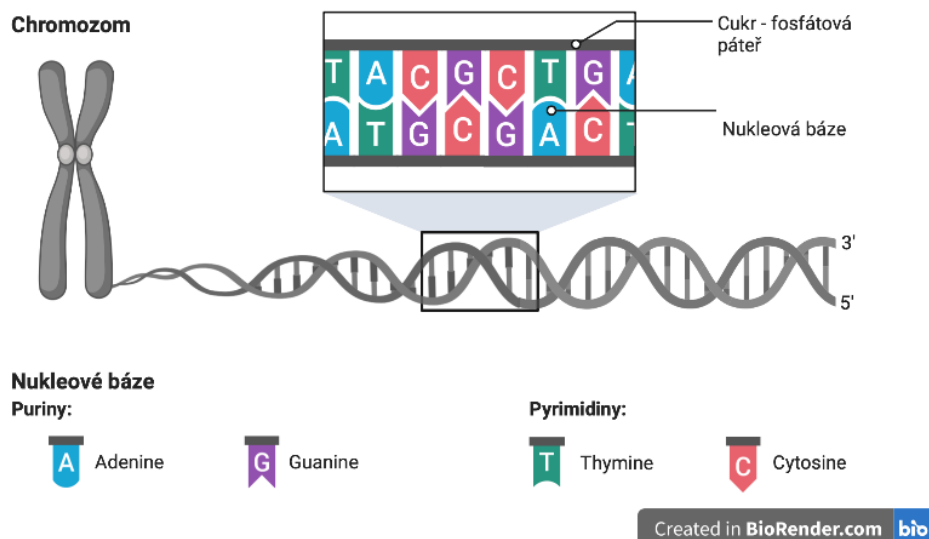
Endoplazmatické retikulum se nachází v bezprostřední blízkosti jádra. Jedná se o uskupení zvláštních cisteren a tubulů ohraničených membránou. Rozlišujeme dva druhy endoplazmatického retikula: drsné a hladké. Povrch drsného endoplazmatického retikula je poset množstvím malých částic, tzv. ribozómů. V drsném endoplazmatickém retikulu probíhá syntéza bílkovin. Oproti tomu hladké endoplazmatické retikulum na svém povrchu ribozómy nemá [6].

Golgiho aparát je organela tvořená svazkem cisteren, které jsou propojené pomocí mikrotubulů. Látky vyprodukované endoplazmatickým retikulem jsou přeneseny do golgiho aparátu. Zde dojde k jejich zabalení do váčků. Těmito látkami jsou bílkoviny, lipidy a steroidy. Odtud poté tyto látky ve váčcích putují do místa určení [6].

Další organelou je mitochondrie. Mitochondrie jsou tyčinkovité útvary, které v buňce slouží jako zdroj energie. Probíhá zde buněčné dýchání, pomocí kterého buňka získává energii. Mitochondrií je v buňce velké množství, až několik set [6].

Mezi mikrotělíška patří lysozomy a peroxizomy. Jsou ohraničeny jednoduchou membránou. Lysozomy zajišťují likvidaci buněčných součástí. Jsou schopné některé součásti z rozložených organel dále poskytnout k využití [6]. Peroxizomy slouží k detoxikaci buňky. Nejvíce peroxizomů najdeme v jaterních a ledvinových buňkách [6].

Centriola je párová buněčná organela. Dvě centrioly dohromady tvoří centrozom. Při buněčném dělení se tento centrozom duplikuje a každý se přesune na opačnou stranu buňky. Zde se vytvoří póly dělicího vřeténka. Centrozomy jsou tedy velmi důležité při vlastním dělení buňky [6].



Obrázek 1.2: Struktura DNA.

## 1.3 DNA

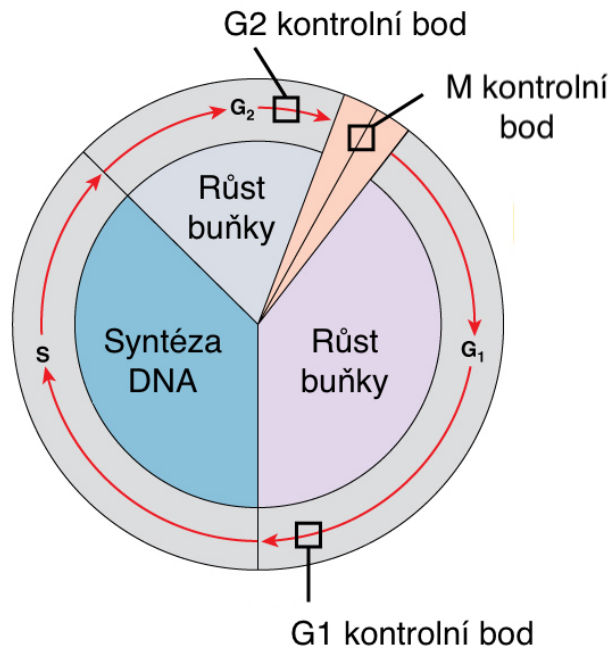
DNA (deoxyribonukleová kyselina) je genetická informace, která je unikátní pro každý organismus. Kompletní genetickou informaci nazýváme genom. Ten je uložen především v jádrech buněk. Vlastní DNA disponují také například mitochondrie. DNA je v jádře uložena do chromozomů. Člověk má 46 chromozomů, rozdělených na 23 párů [7].

V DNA je zakódováno mnoho informací. Některé úseky uchovávají informaci o tvorbě proteinů. Tyto oblasti se nazývají geny a buňky jsou díky nim schopné si syntetizovat všechny potřebné proteiny [7].

Struktura DNA je zobrazena na Obr. 1.2. DNA je uložena do tvaru dvoušroubovice. Tato dvoušroubovice je tvořena dvěma k sobě nasedajícími řetězci, které se skládají z fosfátové páteře a cukru deoxyribózy. Na každém cukru je navázána nukleová báze. Spojení fosfátu, cukru a nukleové báze nazýváme nukleotid. Nukleotidy jsou spojeny pomocí vodíkových můstků. Rozlišujeme čtyři nukleové báze: adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G) [7]. Pořadí jednotlivých nukleových bází tvoří tzv. DNA sekvenci. Pro umístění a navázání bází k sobě platí pravidlo komplementarity, tedy adenin se váže pouze s thyminem a guanin jen s cytosinem [7].

## 1.4 Buněčný cyklus

Jedná se o cyklus, kterým buňka prochází mezi svými děleními. V rámci buněčného cyklu buňka zdvojnásobí svůj obsah, který je následně rozdělen do dvou dceřinných buněk. Doba trvání buněčného cyklu se nazývá generační doba a pro jednotlivé buňky se může výrazně lišit. Většina buněk v lidském těle setrvává ve fázi G<sub>0</sub> a již



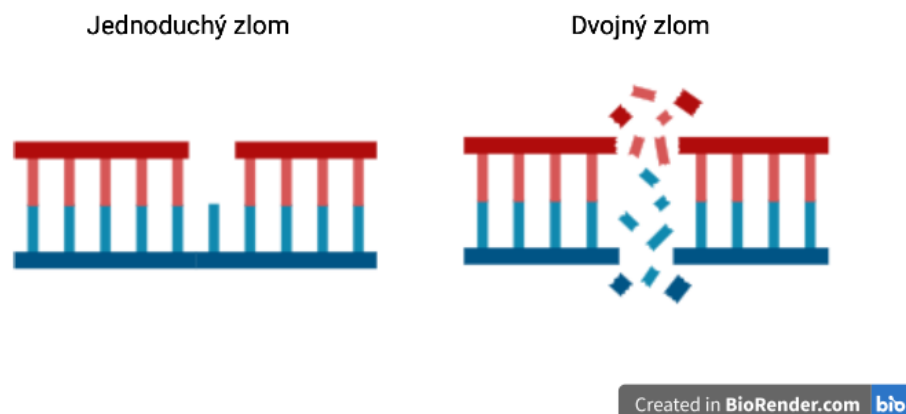
Obrázek 1.3: Buněčný cyklus [10].

se dále nedělí. Jedná se o již diferencované buňky. Příkladem plně diferencovaných buněk jsou neurony. Oproti tomu například jaterní buňky mohou vstoupit do G<sub>0</sub> fáze a po čase přejít opět do G<sub>1</sub> fáze a začít se opět dělit [8].

V G<sub>1</sub> fázi buňka roste a připravuje se na další dělení. V této fázi se kontroluje a opravuje DNA, aby nedošlo k replikaci chybné DNA. Další fází je S fáze, kde dochází k replikaci DNA na dvojnásobné množství. Následuje G<sub>2</sub> fáze, kde se zdvojují organely v buňce a tvoří se struktury potřebné pro dělení. Připravují se proteiny, které následně kondenzují chromozomy, tvoří mitotický aparát a jsou zodpovědné za destrukci jaderného obalu. Fáze G<sub>1</sub>, S a G<sub>2</sub> patří do tzv. interfáze [8].

Po interfázi dochází k mitotické fázi. Tato fáze je velmi rychlá. Skládá se z jaderného dělení a vlastní cytokineze. Mitóza je nejčastější typ jaderného dělení (karyokineze). Na konci mitózy vzniknou dvě zcela rovnocenné dceřinné buňky. Mitóza má celkem čtyři fáze. První fází je profáze. Dochází k rozpuštění jaderné membrány a jadérek, zkracují se chromozomy (kondenzace) a začíná vznikat dělicí vřeténko. V metafázi jsou již chromozomy kondenzované a seřazené do ekvatoriální roviny. Dělicí vřeténko se navazuje na centromery chromozomů. Dále probíhá anafáze, kde dojde k rozdělení chromozomů v centromerách a jejich pohybu k pólům buňky. Následuje telofáze, kde dojde k zániku dělicího vřeténka, chromozomy dekondují a znovu se vytvoří jadérko a jaderná membrána. Následuje samotné rozdělení buňky (cytokineze). Při cytokinezi vzniká přepážka mezi dceřinnými buňkami a buňky se rozdělí rýhováním [8].

V buněčném cyklu je několik kontrolních uzlů, kde je kontrolováno, zda vše probíhá v pořádku. Aby tedy došlo k nějaké mutaci, která se přenesla na dceřinné buňky, musí tyto ochranné mechanismy selhat [9]. Schéma buněčného cyklu je na Obr. 1.3.



Obrázek 1.4: Poškození DNA.

## 1.5 Účinky ionizujícího záření na DNA

Na řetězci DNA může vlivem ionizujícího záření docházet k poškozením. Účinky ionizujícího záření na buňky dělíme na přímý a nepřímý. Přímý účinek ionizujícího záření může měnit chemickou strukturu buněk v důsledku interakcí záření s látkou. Jeho pravděpodobnost závisí na velikosti molekul DNA a jejich koncentraci. Čím vyšší je koncentrace molekul, tím vyšší je pravděpodobnost interakce a vzniku radiačního poškození buňky [11].

Nepřímý účinek je způsoben reaktivními molekulami v okolním prostředí buněk. Okolí buněk je z velké části vyplněno vodou. První ionizační potenciál vody je 12,6 eV [11]. Takové množství energie je již schopno vyrazit elektron z molekuly vody. Interagující částice ionizujícího záření však nejčastěji ztrácejí svou energii postupně v několika interakcích. Mohou excitovat nebo vyrazit elektrony z elektronových obalů atomů vody. Tyto vyražené elektrony mohou dále ionizovat prostředí. To způsobuje radiolýzu vody. V okolí buněk tedy vzniknou volné radikály, například H a OH. Radikál je poté schopen difundovat k biomolekulám a poškodit je [11].

Účinek ionizujícího záření na DNA se může projevit například jednoduchými zlomy, poškozením báze, dvojnými zlomy, spojením jednoho řetězce DNA na špatném místě jak v rámci stejného řetězce, tak i mezi dvěma řetězci a také připojením proteinu k DNA řetězci [11]. Poškození jednoduchým a dvojným zlomem je schematicky znázorněno na Obr. 1.4. Depozice energie ionizujícího záření není v objemu homogenní. Pokud se v buňce deponuje větší množství energie či působí volné radikály, mohou vznikat komplexní poškození. Na jednom řetězci DNA se vyskytuje celá řada poškození.

## 1.6 Oprava DNA

Opravy DNA probíhají celou řadou různých mechanismů. Podobný princip sdílí tři opravné mechanismy, a to oprava chybného párování (mismatch repair MMR), oprava vyjmutím báze (base excision repair BER) a oprava vyjmutím nukleotidů (nucleotide excision repair NER). Při rozpoznání poškozeného místa se aktivují tyto reparační mechanismy a dojde k odstranění poškozené části DNA. V případě BER dojde k odstranění pouze jednoho nukleotidu, při MMR a NER je odstraněno několik nukleotidů. Dále se vyplní mezera po odstraněných nukleotidech a řetězec DNA se zase spojí. Další možnou opravou je postreplikační oprava (homologní rekombinace HR). Uplatňuje se především při opravě dvojných zlomů. Jedno vlákno homologního chromosomu se spáruje a zrekombinuje s poškozenou DNA. Oprava DNA pomocí HR je možná pouze tehdy, když existuje sesterský chromosom (pozdní fáze S a G2), ze kterého buňka může čerpat informaci o správné DNA. Oproti tomu nehomologní spojování volných konců (NHEJ) může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu. Jedná se o opravu dvojných zlomů, ke které není potřeba nasyntetizovaný sesterský chromosom [12].

Jednoduchý zlom dvoušroubovice je snadno reparovatelný. Dvojný zlom představuje pro buňku větší obtíž. Jeho reparace je často provedena s chybami, které se následně mohou projevit mutacemi. Ve fázích buněčného cyklu, kde již buňka nemá nasyntetizované kopie DNA pro reparaci chybí předloha, takzvaný templát, podle kterého by bylo možné správnou opravu provést. V S a G2 fázi buněčného cyklu může buňka jako templát použít nasyntetizovanou kopii chromozomu [11]. Dalším možným poškozením je křížení. Dojde k tomu, že nukleonové báze se například vzájemně spojí obě na jedné straně řetězce DNA, na druhé straně tedy zůstanou dvě volné báze. Pro reparaci poškození je důležitá dostupnost templátu.

Reakce organismu na radiační poškození je také doprovázena zvýšenou reprodukcí buněk, organismus se snaží nahradit ztráty. Někdy buňka není schopna správně opravit radiační poškození. To často znamená, že u ní začne probíhat řízená buněčná smrt, takzvaná apoptóza. Je to aktivní proces, kdy buňka aktivuje specifické geny. Buňka se rozdělí na jednotlivé váčky, které jsou následně zpracovány imunitním systémem. Oproti tomu může probíhat také takzvaná nekróza. To je neřízená buněčná smrt, kdy organely i celá buňka začnou zvětšovat svůj objem až se jejich struktury rozpadnou a uvolní do mezibuněčného prostředí. Takový rozpad vyvolá zánět [13].

## 1.7 Onkogeneze

Onkogeneze je nádorové bujení. Pokud při replikaci DNA nebo při opravách poškození dojde k nějaké chybě, kterou ochranné mechanismy buňky včas neodhalí, může dojít k mutacím. Mutované buňky se mohou začít nekontrolovaně dělit a expandovat do okolí. Pokud se tyto zmutované nádorové buňky začnou rychle dělit a narušovat zdravou tkáň, mluvíme o vzniku tumoru [14].

Následně může docházet k šíření rakovinných buněk do dalších částí těla. Nádorové buňky dokáží proniknout přes stěny cév, a tak vniknout do krevního řečiště,



kterým mohou cirkulovat. Nádorová buňka nebo shluky nádorových buněk jsou často větších rozměrů než kapiláry, kterými procházejí. Proto může dojít k jejich zastavení v úzkých místech cévního řečiště. Pokud se nádorové buňky v daném místě uchyty a nezaniknou (např. apoptoticky), tak vznikne sekundární nádor - metastáza [14].

Základem onkogeneze jsou změny v genetické informaci buňky. Poškozené geny způsobující transformaci zdravé buňky nazýváme onkogeny. V buňkách se vyskytují také geny s opačnou funkcí, tzv. antionkogeny (neboli tumor supresorové geny), které brání buněčné transformaci. Jedním z nejznámějších je gen p53, který je považován za ochránce buňky. Antionkogeny brzdí buněčné dělení, účastní se oprav DNA a podporují apoptózu [14].

V souvislosti s nepříznivými biologickými účinky ionizujícího záření mluvíme o onkogenezi jako o stochastickém jevu. Při diagnostice rakoviny nejsme schopni určit, zda byla indukována ionizujícím zářením. Víme však, že ionizující záření zvyšuje pravděpodobnost výskytu stochastických účinků. Známe i další kancerogenní faktory. Jednou skupinou těchto činitelů jsou chemické, mezi které patří například inhalce cigaretového kouře, konzumace alkoholu, arzen a azobarviva. Další kancerogenní faktory jsou biologické, a to jsou například viry a bakterie. Všechny tyto faktory ovlivňují riziko vzniku tumoru [15].

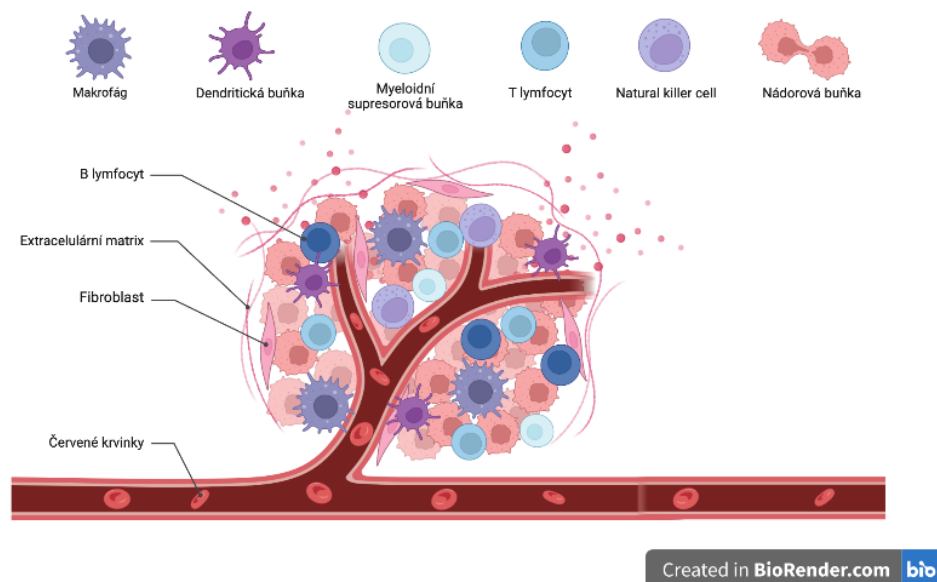
Rozlišujeme benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné) nádory. Benigní nádory rostou výrazně pomaleji než ty maligní a zachovávají charakter původní tkáně. Maligní nádory jsou agresivnější, mohou se vytvořit z buněk jakékoliv tkáně, nekontrolovaně se zvětšují a prorůstají do okolních tkání. Buňky maligních nádorů poškozují strukturu orgánu a omezují jeho funkci. Taková buňka má menší senzitivitu k okolním vlivům, nereaguje na podněty a může se začít nekontrolovaně dělit. Velice rychle vzniká velké množství dceřinných buněk, které se také dále nekontrolovaně dělí. Tato maligní nádorová tkáň utlačuje zdravou tkáň a následně může expandovat do dalších orgánů a metastázovat [9].

## 1.8 Mikroprostředí tumoru

Nádorové mikroprostředí je velmi důležitou součástí komplexního pohledu na onkogenezi. Obsah nádorového mikroprostředí ovlivňuje agresivitu nádoru. Jako mikroprostředí tumoru označujeme ekosystém, který obklopuje samotný tumor nebo je uvnitř tumoru a v jeho okolí. Tumor a jeho mikroprostředí se vzájemně ovlivňují. Mikroprostředí umožňuje tumoru růst a vyživovat se [16].

Tumory jsou tvořeny dvěma velmi provázanými komponentami. Jedná se o vlastní parenchym (nádorové buňky) a stroma. Tumory totiž potřebují, stejně jako orgány v lidském těle, dodávat kyslík a živiny. Solidní tumory proto obsahují také nenádorové buňky různých typů. Na Obr. 1.5 je schematicky znázorněn tumor a jeho mikroprostředí, které obsahuje mnoho druhů buněk. Jedná se například o makrofágy, lymfocyty, natural killer buňky a nádorové buňky. Na obrázku je také vidět cévní zásobenění tumoru [16].

Nádory obsahují tzv. cancer stem cells (CSC), které mají schopnost sebeobnovy



Obrázek 1.5: Mikroprostředí tumoru.

a diferenciace. Vysílají do okolí signály a jsou tak schopné přinutit ostatní zdravé buňky ke spolupráci. CSC mají schopnost diferenciace i v nenádorové buňky. Mohou se přeměnit v endoteliální buňky či fibroblasty. Ty následně tvoří buňky hladké svaloviny a pojivovou tkáň. Takto může vzniknout cévní síť, která nádor zásobuje kyslíkem a živinami. Tvorba této sítě se nazývá angiogeneze [17].

V současné době se stále mnoho věcí o mikroprostředí tumoru neví. Probíhá tedy celá řada výzkumů, abychom zjistili, jak přesně ovlivňuje mikropstředí tumoru jeho růst a jaké je postavení mikroprostředí ve vztahu k onkologické léčbě [18].

# Kapitola 2

## Radioterapie

### 2.1 Ionizující záření

Již v roce 1895 objevil W. K. Röntgen záření X. Hned o rok později objevil Henri Becquerel radioaktivitu. Následoval objev radia a polonia, který uskutečnili Marie a Pierre Curie. V následujících letech se vědci snažili popsat co nejdokonaleji chování radiaktivního materiálu a také pro něj najít využití. Velmi brzy se záření X použilo k léčbě nádoru (1896). Gamma záření  $^{226}\text{Ra}$  se také záhy začalo používat pro léčbu zhoubných nádorů (1903) [19].

V začátcích využití ionizujícího záření pro onkologickou léčbu nebyl příliš kladen důraz na radiační ochranu. To představovalo vysoké riziko pro personál, který musel manipulovat s radioaktivními látkami. V průběhu let se zdokonalila radiační ochrana personálu i pacientů [19].

V padesátých letech dvacátého století došlo k zavedení vysokoenergetických kobaltových ozařovačů do radioterapeutické praxe. Tím se výrazně zvýšila efektivita léčby. Přírodní izotopy byly nahrazeny bezpečnějšími uměle vyráběnými a celková účinnost léčby se zvýšila. Další vývoj radioterapie byl velmi rychlý. Začaly se využívat lineární urychlovače pro externí radioterapii. Velkým přínosem jsou také sofistikované plánovací systémy, které umí velmi přesně počítat dávkové distribuce jednotlivých patientských plánů. Pro plánování léčby byl také důležitý posun v oblasti diagnostiky. Využití moderních zobrazovacích modalit, jako je především výpočetní tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR), rovněž zvýšilo kvalitu plánování radiační terapie [19].

### 2.2 Obecný úvod k radioterapii

Radioterapie je metoda využívající ionizující záření pro léčbu široké škály onemocnění. Nejčastěji se jedná o onkologickou léčbu. Ionizujícím zářením však můžeme léčit i nenádorová onemocnění jako jsou například patní ostruhy a různá zánětlivá či kloubní onemocnění. Dále se budu zabývat pouze onkologickou částí radioterapie.



Obrázek 2.1: Terapeutický lineární urychlovač ve Fakultní Nemocnici Bulovka.

Cílem radioterapeutického ozařování je nádorová tkáň. Ozařuje se tzv. cílový objem. Cílový objem se definuje na základě diagnostických snímků. Nejčastěji se užívá CT skenů, někdy se využívá také doplňkových modalit jako je magnetická rezonance, ultrazvuk či pozitronová emisní tomografie (PET). Výsledky těchto diagnostických modalit se poté mohou zobrazit jako obrazová fúze.

Snahou je doručit velmi přesně dávku přesně definovanému cílovému objemu a co nejnižší dávku okolní zdravé tkáni.

## 2.3 Metody radioterapie

Rozlišujeme dva rozdílné způsoby radioterapie, a to vnější (externí) radioterapii a brachyterapii. Externí radioterapie je velmi rozsáhlá metoda využívající ionizujícího záření pro léčbu různých onemocnění. Samotná externí radioterapie se dále dělí na konvenční radioterapii, 3D konformní radioterapii a radioterapii s modulovanou intenzitou svazku [15]. Lineární urychlovač, který se využívá k doručení dávky v externí radioterapii nacházející se ve Fakultní nemocnici Bulovka je pro ukázkou zobrazen na Obr. 2.1.

## Brachyterapie

Brachyterapie je radioterapeutická metoda, kdy se maligní ložisko ozařuje z velmi malé vzdálenosti buď na povrchu těla nebo uvnitř těla pacienta pomocí zavedení zářiče do těla pacienta. Výhodou této metody je velmi dobré rozložení dávky. Přesné doručení dávky do cílového objemu a rychlý spád dávky ve zdravé tkáni. Jedná se o lokální ozařování a tudíž se velmi dobře chrání zdravá tkáň [15].

K ozařování se používají malé zapouzdřené radionuklidové zdroje. Nejčastěji se jedná o radionuklidy  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$ ,  $^{198}\text{Au}$ ,  $^{125}\text{I}$  a  $^{103}\text{Pd}$  [15]. Brachyterapeutické metody se dále dělí dle umístění zdroje v těle pacienta na intersticiální, intrakavitární, intraluminární a povrchové. Intersticiální zavedení zdroje znamená, že zdroj je implantován přímo do nádoru (např. nádory prsu). Při intrakavitární brachyterapii je zářič umístěn do tělních dutin (např. gynekologické aplikace). Dále při intraluminární brachyterapii se zdroj umísťuje do trubicovitých orgánů (např. jícen, žlučové cesty). A nakonec povrchová aplikace se využívá pro kožní nádory [15].

Výhodou brachyterapie oproti externí radioterapii je přesné dodání dávky do cílového objemu a malá zátěž okolní tkáně díky vysokému gradientu dávky. Nevýhodou je omezená možnost využití. Brachyterapii lze použít pouze pro poměrně malé nádory definovaných rozměrů a snadné lokalizace [15].

## Konvenční radioterapie

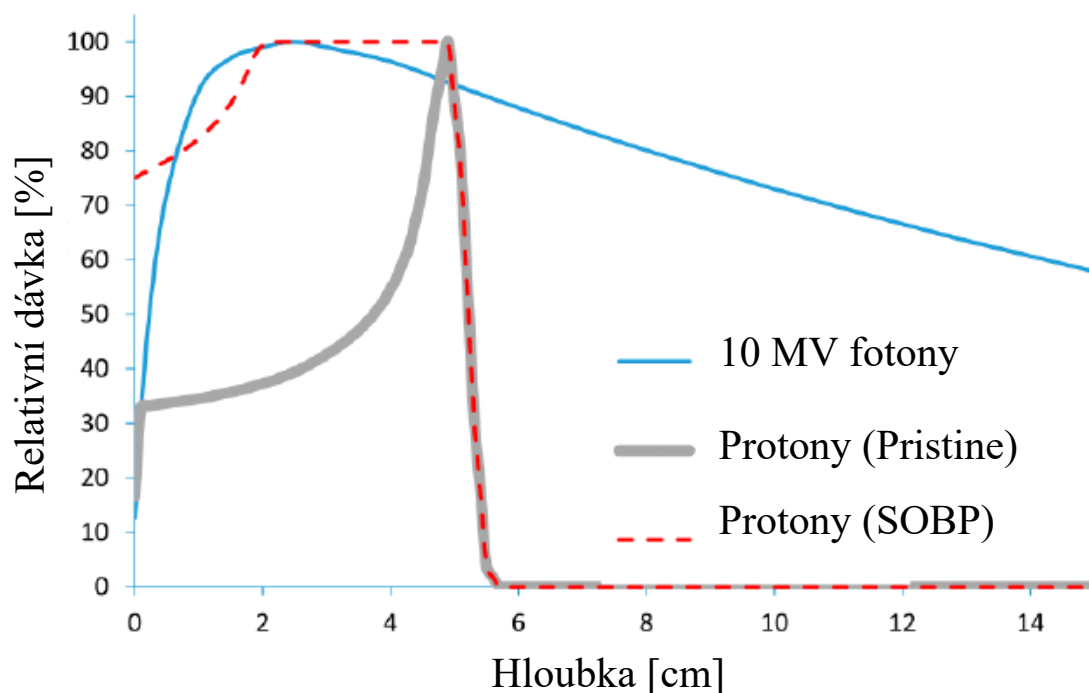
Konvenční radioterapie využívá homogenních svazků ionizujícího záření. Jedná se o nejstarší radioterapeutickou metodu. Při konvenční radioterapii se nejčastěji užívá vysokoenergetických fotonů. Některé kritické orgány je možné odstínit pomocí individuálně odlitých stínících bloků [15].

## 3D konformní radioterapie

Oproti tomu 3D konformní radioterapie využívá lépe tvarovaných polí. K úpravě polí do různých tvarů se využívá tzv. vícemelový kolimátor. Tento kolimátor umožňuje tvarovat ozařovací pole do různých tvarů z různých směrů tak, aby tvar pole odpovídal tvaru cílového objemu z dané projekce [15].

## Radioterapie s modulovanou intenzitou svazku

Radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (IMRT) je speciální tím, že lze používat pole s proměnnou intenzitou. Zároveň jsou IMRT urychlovače opatřeny také vícemelovým kolimátorem. Pole lze tedy tvarovat individuálně ve všech směrech. Možnost modulovat intenzitu svazku výrazně snižuje dávku okolním zdravým tkáním [15].



Obrázek 2.2: Braggova křivka [21].

### Neutronová záchyťová terapie

Neutronová terapie je zatím pouze na experimentální úrovni. Nejrozšířenější je výzkum v Japonsku. Neutronová terapie je určena k léčbě lokálních invazivních maligních nádorů. Pacientovi se do nádoru musí vpravit borové činidlo obsahující  $^{10}\text{B}$ . Tok neutronů následně reaguje s borem obsaženým v nádoru. Z této reakce vznikne jádro  $^7\text{Li}$  a částice alfa. Ty mají v tkáni velmi krátký dolet. Energie se tedy deponuje přímo v nádoru a zdravá tkáň není poškozena. Výzkum neutronové terapie se provádí také v Ústavu jaderného výzkumu a.s. v Řeži s využitím reaktoru LVR-15 [20].

### Hadronová terapie

Jedná se o ozařování pomocí těžkých nabitých částic. Tyto částice jsou urychleny na velmi vysoké energie. Nejčastěji se jedná o léčbu protony. Pro tuto metodu je důležité odlišné chování těžkých iontů v hmotě. Těžké částice zanechávají na své dráze jen malou část energie a směr jejich letu se příliš nemění. Většinu své energie deponují na krátké dráze a všechny ve stejném místě. To nám umožňuje efektivně ochránit zdravou tkáň, která je v těle před nádorem. Tuto skutečnost dobře ilustruje tzv. Braggova křivka (Obr. 2.2) [20].

## 2.4 Frakcionace a příklady

Na základě pozorování křivek přežití za užití různých metod a podmínek při ozařování byly v průběhu výzkumu v minulosti odvozeny základní modely radiobiologického mechanismu. Rozlišujeme dva základní režimy ozáření, a to jednorázové (stereotaktické) a frakcionované. Při frakcionovaném ozáření se užívá menšího biologického efektu ozáření při rozdělení dané dávky do více frakcí. Mezi frakcemi dochází k reparačním procesům subletálních poškození zdravé tkáně. Pro léčbu různých onemocnění jsou vhodné různé frakcionační režimy:

- normofrakcionace (10 Gy/týden,  $5 \times 2$  Gy)
- kontrahovaná frakcionace (více než 10 Gy/týden)
- protrahovaná frakcionace (méně než 10 Gy/týden)
- hyperfrakcionace (více než 5 frakcí/týden)
- kombinovaná kontrakce a hyperfrakcionace [15].

Nejčastěji užívaný frakcionační režim je normofrakcionace. Při frakcionované radioterapii pozorujeme reparaci buněk zdravé tkáně. V době mezi frakcemi se subletálně poškozené nádorové i zdravé buňky mohou opravovat. Po dobu reparace se v buňce zastaví buněčný cyklus. Pokud je reparace možná, buňka obnoví svůj buněčný cyklus. Pokud oprava není možná, dojde k apoptóze. Dalším radiobiologickým jevem pozorovaným při frakcionovaném ozařování je repopulace. Pojem repopulace se užívá pro doplňování počtu nádorových buněk po jejich úbytku. Regenerace se týká obnovy zdravých tkání. Dojde k dorůstání zdravé tkáně z kmenových buněk [15].

# Kapitola 3

## Radiobiologie a radiosenzitivita

### 3.1 Radiobiologie a její principy

Radiobiologie je mezioborové odvětví na hranici mezi biologií a fyzikou; často sem vtupuje také chemie. Zabývá se působením ionizujícího záření na živé organismy, tkáně, buňky a jejich součásti. Zkoumá veškeré vyskytující se zdroje ionizujícího záření. Předmětem zájmu jsou přírodní i umělé zdroje záření a jejich užití v medicíně, průmyslu, výzkumu, atd. Snahou radiobiologie je popsat účinky ionizujícího záření na živou hmotu jak z hlediska samotné interakce, tak i následné procesy, které záření v živé hmotě vyvolá [22].

#### Klonogenní test

Důležitým radiobiologickým nástrojem při zkoumání radiosenzitivity je klonogenní test. Tato metoda je založena na schopnosti buněk dělit se, tedy klonovat se a tím tvořit početné kolonie. Přičemž kolonie je definována jako skupina alespoň padesáti buněk. Principem testu je, že buňky jsou podrobeny nějakému negativnímu činitele v různé míře a je sledováno jejich přežití a schopnost tvořit kolonie. Pomocí této metody je možné popsat míru odpovědi buněk na dané negativní činitele [23].

Výstupem klonogenního testu je závislost přežití buněk na dávce záření, kterou popisuje tzv. křivka přežití. Nejde jen o přežití jednotlivé buňky, ale záleží i na zachování reprodukční funkce. Křivky přežití je možné popsat různými matematickými modely. V radioterapii se často využívá lineárně-kvadratického modelu (LQ model). Dle LQ modelu se spočte přeživší frakce  $S$  jako:

$$S = S_0 e^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (3.1)$$

kde  $D$  je absorbovaná dávka,  $S_0$  je původní počet nasazených buněk a  $\alpha$  a  $\beta$  jsou parametry modelu. Parametry  $\alpha$  a  $\beta$  popisují radiosenzitivitu zkoumaných buněk. V literatuře se často pro popis radiosenzitivity tumorů užívá podíl  $\alpha/\beta$ . Parametr  $\alpha$  udává tvar křivky přežití v oblasti nízkých dávek. S rostoucí absorbovanou dávkou roste vliv parametru  $\beta$  na průběh křivky přežití. Pokud je v oblasti nízkých dávek strmý pokles přeživší frakce, bude poměr  $\alpha/\beta$  vyšší. Tedy buňky jsou velmi senzitivní



již v oblasti nízkých dávek. Tvar křivky přežití může mít naopak na začátku raménko a pokles přeživší frakce je tak pozorován až při vyšší absorbované dávce. Toto může poukazovat na potřebu akumulace více poškození pro pokles přeživší frakce. Přeživší frakce se vynáší do grafu zpravidla v logaritmické škále [24].

Jednotlivé studie se velmi různí v konkrétních hodnotách parametru  $\alpha/\beta$ . Lze však říci, že např. nádory hlavy a krkku, děložního čípku, močového měchýře a jater ( $\alpha/\beta \approx 10$  Gy) mají vyšší poměr  $\alpha/\beta$  než nádory prsou a prostaty ( $\alpha/\beta \approx 4$  Gy). Poměry parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  pro nádory rekta, jícnu, centrální nervové soustavy, kůže a plic se mezi jednotlivými studiemi velmi odlišují. To je pravděpodobně způsobeno výraznými nehomogenitami v histologii těchto tkání. Vyšší poměr  $\alpha/\beta$  naznačuje vhodnost užití hypofrakcionace. Naopak při nižším poměru  $\alpha/\beta$  by bylo vhodné indikovat hyperfrakcionační režim radioterapie [25].

## 3.2 Vliv individuální radiosenzitivity na průběh radioterapie

Radioterapeutická léčba a její parametry jsou indikovány převážně na základě stupně diferencovanosti buněk nádoru (grading) a rozsáhlosti nádorového onemocnění (staging). Dalším parametrem, který vstupuje do rozhodovacího procesu je to, o jaké nádorové onemocnění se jedná a kde se nachází. Není však běžnou praxí hodnotit při nastavení léčby také individuální radiosenzitivitu jedince [26], [27].

Významným faktorem v radioterapeutické onkologické léčbě je radiosenzitivita. Tumory různých jedinců pocházející ze stejné tkáně a ve stejném stádiu vývoje mohou mít však extrémně rozdílnou radiosenzitivitu. Radiosenzitivitu lze vnímat ve vztahu k organismu jako k celku, radiosenzitivitu jednotlivých tkání či jako individuální tumorovou radiosenzitivitu. Radiosenzitivita tumoru je určujícím parametrem účinnosti radioterapeutické léčby [28], [29].

### Celková radiosenzitivita organismu

Odpověď na ionizující záření se mezi lidmi jako jednotlivci různí. Tento fakt byl prezentován již před více než sto lety a je dodnes platný. Na počátku 20. století se ionizující záření začalo hojně využívat k léčebným účelům. Vědci a lékaři si všímali odlišných reakcí na stejnou léčbu u různých pacientů. Zpočátku byly tyto rozdíly přisuzovány nepřesnému určení doručené dávky pacientovi. S postupem času a rostoucím množstvím pacientů však vědci došli k závěru, že za odlišnou reakcí na ionizující záření stojí individuální radiosenzitivita jednotlivce [30].

### Radiosenzitivita tkání

Pojem radiosenzitivita popisuje míru odpovědi nádoru či tkáně na ozáření a velikost a rychlost regrese po ozáření. Radiosenzitivita tkání přímo souvisí s citlivostí

buněk na účinky záření. Míra této citlivosti je dána především schopností reparace DNA [28], [31].

Již v roce 1906 vědci přišli na myšlenku, že radiosenzitivita tkáně je přímo úměrná její reprodukční aktivitě a nepřímo úměrná stupni diferenciaci. Nejvíce radiosenzitivní jsou tedy buňky, které se často dělí nebo málo diferenciované buňky. Toto pravidlo označujeme jako zákon Bergonié a Tribondeau. Následkem této zákonitosti je také vyšší radiosenzitivita u dětí [32].

Za vysoce radiosenzitivní tkáně lidského těla považujeme kostní dřeň, žaludek, tlusté střevo, plíce či mléčnou žlázu. Při užití radioterapie tedy tyto orgány označujeme jako kritické a snažíme se je chránit před ionizujícím zářením. Naopak poměrně vysokou radiorezistenci vykazují svaly, kosti a nervový systém [28], [32].

## Tumorová radiosenzitivita

Radiosenzitivita nádorových buněk je určující pro odpověď tumoru na radioterapii. Poslední studie naznačují, že pro výsledek radioterapie je nejdůležitější radiosenzitivita stromatu<sup>1</sup>. Bylo prokázáno, že radiosenzitivita tumoru jako celku koreluje s radiosenzitivitou buněk daného typu *in vitro*<sup>2</sup>. Některé studie ovšem opouňují a za determinant odpovědi nádoru na záření považují radiosenzitivitu vnitřních struktur nádoru, jako je například cévní systém [35]. Jako ukazatel radiosenzitivity nádoru považujeme zpomalení růstu nádoru nebo dokonce zmenšení nádoru [28].

Radiosenzitivita nádorů souvisí s jejich tkáňovým původem. Vysokou radiosenzitivitu vykazují nádory ze tkáně emryonální, zárodečné a lymfoidní. Středně radiosenzitivní jsou nádory z epitelální a žlázné tkáně. A nízkou radiosenzitivitou se charakterizují nádory ze svalové, žlázné a nervové tkáně [28]. Nádory hlavy a krku jsou obecně velmi agresivní a účinnost jejich léčby je často nízká. Je to způsobeno vysokým zastoupením nedostatečně radiosenzitivních nádorů (až 60 %) [29].

Potřebná dávka pro účinné usmrcení určitých buněk se může lišit až stonásobně. Tento fakt souvisí také s tím, že tumorová radiosenzitivita je ovlivněna celou řadou faktorů. Záleží například na reparačních schopnostech buňky po radiačním poškození DNA. Dalším faktorem je přítomnost kyslíku, který zesiluje účinky ionizujícího záření. Naopak anoxické podmínky zvyšují radiorezistenci nádorových buněk. Anoxické prostředí se často nachází uvnitř velkých rychle rostoucích tumorů, jejichž cévní zásobení není dostatečné [36].

Dalším činitelem, který ovlivňuje tumorovou radiosenzitivitu je počet právě se dělících buněk a distribuce buněk v buněčném cyklu. Všechny výše zmíněné parametry korelují s radiosenzitivitou buněčných linií *in vitro* [36]. Radiosenzitivitu buněčných linií *in vitro* lze zkoumat pomocí tzv. klonogenního testu. Pomocí tohoto

---

<sup>1</sup>Stroma je hmota nádoru, která obsahuje fibroblasty, buňky imunitního systému, endotelální buňky. Jedná se o tzv. kostru nádoru, zajišťuje také jeho cévní zásobení a sehrává zásadní roli při metastazování [33].

<sup>2</sup>*In vitro* (tj. ve zkumavce, ve skle) je termín, který v medicíně a biologii označuje pěstování ve skle, tedy mimo organismus [34].

radiobiologického experimentu je možné odhadovat odpověď daných nádorových buněk na záření. Výsledky klonogenních testů korelují s klinickými výsledky. Radiobiologický výzkum jednotlivých buněčných linií může pomoci v klinickém rozhodování o volbě druhu léčby, případně frakcionaci [37].

Pokud se podíváme na reálnou radioterapeutickou léčbu, najednou nám do celého procesu vstupuje ještě více proměnných. Odpověď tumoru na léčbu závisí také na zdravotním stavu a věku pacienta, stádiu diferenciacie tumoru, velikosti tumoru, atd. [38]. Nádorová onemocnění se častěji vyskytují u lidí v pokročilejším věku. U starších pacientů se vyskytují velmi často další komorbidity<sup>3</sup>, což negativně přispívá k účinnosti léčby. Pacienti s komorbiditami mají obecně nižší přežití [38].

Účinnost léčby lze zvýšit kombinací radioterapie s jinými metodami onkologické léčby jako je například chemoterapie, chirurgie nebo imunoterapie [39]. Volba primární léčebné modalit je pro výsledek léčby zásadní. Dodnes však neexistuje žádný jednoznačný marker<sup>4</sup>, dle kterého by se dalo rozhodovat o indikaci radioterapie [29].

## Známé a detekovatelné markery

Některé nádorové markery jsou detekovatelné pomocí laboratorních testů krve a tkání. Mezi markery, které se již poměrně běžně stanovují patří např. BRCA1 a BRCA2 vzhledem ke karcinomu prsu, RB1 pro retinoblastom<sup>5</sup> a K-ras pro kolo- rektální karcinom [40].

Souhrnně BRCA jsou tumor supresorové geny<sup>6</sup>. Rozlišujeme dva typy těchto genů, a to BRCA1 a BRCA2. Mutace na těchto genech výrazně zvyšují pravděpodobnost vzniku nádorových onemocnění. Jedná se převážně o nádorová onemocnění prsou a vaječníků. Mutace na genech BRCA1 a BRCA2 se v rodinách dědí autosomálně dominantně<sup>7</sup>. Riziko vzniku zhoubného nádoru je u nositelek těchto mutací celoživotně velmi vysoké. Nádory se u nich vyvíjí přibližně o 15-20 let dříve než u pacientek bez mutací na BRCA1 a BRCA2. V rodinách s pozitivní anamnézou (výskyt nádorového onemocnění prsu a vaječníků) se provádí vyšetření krve, ze kterého jsme schopni detekovat přítomnost mutací na genech BRCA1 a BRCA2. Při zjištění těchto mutací je pacient nadále onkologicky sledován. V některých případech se přistupuje k preventivní masektomii<sup>8</sup> či adnexotomii<sup>9</sup> [46].

Radioterapie je vhodnou a často používanou terapeutickou modalitou při léčbě maligních nádorů prsu. Účinnost léčby je však z velké části podmíněna podtypem nádoru. Je možné rozlišit např. triple negativní karcinom prsu (TNBC), lumenální

---

<sup>3</sup>Komorbidity je termín, který označuje přítomnost dalších onemocnění vyskytujících se současně s primární chorobou [38].

<sup>4</sup>Marker je pojem užívaný v medicíně pro prokazatelné znaky, jejichž přítomnost indikuje nějaké onemocnění [40].

<sup>5</sup>Retinoblastom je zhoubný nádor sítnice [41].

<sup>6</sup>Tumor supresorové geny hrají zásadní roli při maligní karcinogenezi. Produkty těchto genů regulují buněčný cyklus a reparaci [42].

<sup>7</sup>Autosomálně dominantní dědičnost se týká nepohlavních chromozomů (autozomů) a jedná se o přenos znaku podmíněného dominantní alelou [43].

<sup>8</sup>Masektomie je chirurgické odstranění celé mléčné žlázy [44].

<sup>9</sup>Adnexotomie je chirurgické odstranění vaječnicku a vejcovodu [45].

karcinom prsu a HER-2 pozitivní karcinom prsu. Nejpříznivějších výsledků je dosaženo při léčbě lumenálního typu karcinomu prsu. Oproti tomu HER-2 pozitivní karcinom prsu a TNBC jsou při radioterapii odolnější. Vykazují vyšší radiorezistenci, agresivitu a malignitu [47].

## Experimenty pro nalezení vhodných markerů

Vědci se snaží najít parametry, dle kterých by bylo možné individualizovat a zefektivnit léčbu a její výsledky. Jedním z dostupných biomarkerů, pomocí kterého lze rozhodovat o individuální radiosenzitivitě, je fosforylovaný histon H2AX ( $\gamma$ H2AX). Při radiačním poškození DNA dvojným zlomem dojde k fosforylaci a následně lze tato ložiska reziduálních  $\gamma$ H2AX mikroskopicky detekovat. Na základě výskytu  $\gamma$ H2AX mohou být detekovány dvojně zlomy DNA, které určují míru poškození DNA [26].

Při léčbě nádorů hlavy a krku lze usuzovat úspěšnost radioterapie na základě přežití frakce po absorbování dávky 2 Gy ( $SF_2$ ). Nádory hlavy a krku jsou léčeny především chirurgicky, radioterapeuticky a chemoterapií, případně kombinací těchto léčebných modalit. Faktor  $SF_2$  je získán pomocí provedení klonogenního testu na buňkách daných tumorů *in vitro*. Faktor  $SF_2$  lze použít jako marker pro posouzení individuální radisenzitivity nádorů hlavy a krku. V klinické praxi však není stanovování parametru  $SF_2$  za účelem idikace léčebné modalit prováděno [48].

Další průzkum biomarkerů radiační odezvy je veden pomocí techniky OE-MRI (Oxygen-Enhanced Magnetic Resonance Imaging). Zkoumá se vliv hladiny kyslíku v ozařované tkáni na výsledek radioterapie pomocí zobrazování na magnetické rezonanci. Bylo zjištěno, že inhalace kyslíku během hypofrakcionované radioterapie významně zlepšila odpověď na záření. Pomocí magnetické rezonance bylo možné sledovat zpoždění růstu nebo zmenšení nádoru. Výzkum naznačil, že znalost některých parametrů jako je např. prokysličené tkáně by mohla být užitečná pro stratifikaci pacientů a individuální plánování léčby [49].

Předmětem zkoumání je dále například souvislost mezi zvýšenou expresí receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) a radiosenzitivitou. Tento růstový faktor je zodpovědný za buněčnou diferenciaci, proliferaci a regulaci buněčného cyklu. Výrazně zvýšená exprese EGFR může způsobit nádorové bujení. EGFR také výrazně snižuje odpověď nádoru na radioterapeutickou léčbu. Inhibice EGFR by mohla zefektivnit léčbu některých epiteliálních nádorů [50].

# Kapitola 4

## Experimentální část: Radiosenzitivita tří rakovinných buněčných linií stejného tkáňového původu

### 4.1 Úvod

Experimentální část je zaměřena na zkoumání radiosenzitivity tří rakovinných glioblastomových linií. Experiment byl proveden na Ústavu jaderné fyziky Akademie věd České republiky v Oddělení dozimetrie záření. Stejný experiment byl opakován celkem třikrát. První opakování experimentu bylo provedeno s významnou pomocí a za dozoru vedoucí práce Ing. Anny Jelínek Michaelidesové, Ph.D. Druhé a třetí opakování experimentu jsem již prováděla samostatně a vedoucí práce pouze dohlížela a pomáhala jen v nutných případech.

### 4.2 Materiály a metody

Experiment byl proveden jako klonogenní test (viz Kap. 3.1). V tomto případě bylo jako negativní činitel použito ionizující záření. Výsledkem experimentu jsou křivky přežití, které popisují radiosenzitivitu zvolených glioblastomových buněčných linií.

#### Použité buněčné linie

V rámci mého experimentu byly pěstovány tři buněčné linie glioblastomů, a to U251 MG, A172 a T98G. Tyto buněčné linie byly vybrány, jelikož na Oddělení dozimetrie záření se glioblastomům aktuálně věnuje velká pozornost. Jednalo se o buněčné linie, které byly zakoupeny v podobě ampulek s buňkami zmrazenými tekutým dusíkem. Takto je možné buňky uchovávat po velmi dlouhou dobu. Dle předchozích testů provedených na Oddělení dozimetrie záření již můžeme vycházet

ze stanovených hodnot parametrů  $\alpha$  a  $\beta$ . Tyto předpokládané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4.1.

Z Tab. 4.3, Tab. 4.4 a Tab. 4.5 lze vidět, že počet nasazovaných buněk se zvyšuje s rostoucí dávkou. Pro danou buněčnou linii a aplikovanou dávku byl požadovaný počet nasazovaných buněk vždy stejný ve všech opakováních. Snahou je, aby při výsledném počítání kolonií byl ve všech vzorcích přibližně stejný počet buněk.

Buněčná linie	$\alpha$ ( $\text{Gy}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{Gy}^{-2}$ )
U251	0,35	0,01
A172	0,29	0,03
T98G	0,09	0,03

Tabulka 4.1: Předpokládané hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  dle měření na Oddělení dozimetrie záření.

Všechny použité buněčné linie byly glioblastomové. Glioblastom je nejagresivnějším a nejčastějším maligním nádorem mozku u dospělých. Příznaky těchto nádorů jsou velmi těžko rozpoznatelné a diagnóza bývá tedy stanovena často již v pokročilém stadiu onemocnění. Léčba je nejčastěji vedena pomocí chirurgie, radioterapie a chemoterapie [51].

Všechny zmíněné buněčné linie jsou lidské. Buněčná linie U251 MG (U251) byla odebrána z mozku 75 let starého muže a jedná se o glioblastom astrocytom. Astrocytom je nejčastějším gliomem mozku [52]. Buňky z linie A172 byly odebrány z glioblastomu 53 let starého muže. Tento nádor byl klasifikován jako astrocytom [53]. Buňky T98G jsou klasifikovány jako multiformní glioblastomy a jedná se o jedny z nejmalignějších nádorových onemocnění mozku. Buňky této linie byly odebrány z glioblastomu 61 let starého muže [54].

## Vybavení laboratoře

Biologická laboratoř na Oddělení dozimetrie záření posloužila experimentu jako vhodné zázemí pro veškerou potřebnou práci s buňkami. Oddělení dozimetrie záření poskytlo také  $^{60}\text{Co}$  ozařovač. Laboratoř disponuje laminárním boxem, inkubátory, mikroskopy, centrifugou, počítadlem buněk MUSE, počítadlem buněk Scepter, analytickými vahami a dalším drobným vybavením. Některé používané přístroje a vybavení jsou na Obr. 4.1, Obr. 4.2, Obr. 4.3 a Obr. 4.4.

Bylo použito velké množství spotřebního materiálu. Mezi tento materiál se řadí kultivační láhve (Obr. 4.5), tuby, lahvičky, pipety, živná média, PBS (Phosphate Buffered Saline), trypsin, desinfekční prostředky, rukavice, barvicí látka crystal violet a další.



Obrázek 4.1: Laminární box.



Obrázek 4.2: Mikroskopy.



Obrázek 4.3: Počítač buněk MUSE.



Obrázek 4.4: Počítač buněk Scepter [55].





Obrázek 4.5: Kultivační láhve [56].

### 4.3 Postup experimentu

Na začátku experimentu bylo potřeba buňky rozmrazit a vypěstovat populace buněk. Buňky byly nasazeny do kultivačních lahviček do živného média a byly umístěny do inkubátoru, aby měly co nejvhodnější podmínky pro dělení. Takto byly buněčné linie pěstovány přibližně po dobu dvou týdnů.

Po uplynutí této doby byly buněčné kolonie připraveny na ozařování. Kultivační lahvičky s napěstovanými buňkami byly doplněny médiem tak, aby byly plné. Lahvičky musely být plné proto, aby v nich bylo homogenní prostředí. Všechny vzorky byly odneseny k ozařovači (Obr. 4.6). Po celou dobu byla snaha uchovávat veškeré vzorky ve stejných podmínkách. Proto byly i lahvičky s buňkami, které neměly být ozářeny, přeneseny do ovladovny ozařovny. Postupně byly jednotlivé lahvičky s buňkami ozářeny dávkami dle Tab. 4.2 na  $^{60}\text{Co}$  ozařovači. Lahvičky byly umístěny do prostředí vodního fantomu a ozařovány ve vzdálenosti 5 cm vody od primárního kolimátoru. Voda byla ohřáta na teplotu přibližně 37 °C, aby byly zachovány co nejpříznivější podmínky pro buňky. Ozařovač s vodním fantomem a umístěnou lahvičkou před ozařováním můžete vidět na Obr. 4.7.

Buněčná linie	$D_1$ (Gy)	$D_2$ (Gy)	$D_3$ (Gy)	$D_4$ (Gy)	$D_5$ (Gy)	$D_6$ (Gy)
U251	0	1	2	4	6	8
A172	0	1	2	4	6	8
T98G	0	2	4	6	8	10

Tabulka 4.2: Dávky, kterými byly buněčné linie ozářeny.

Po ozáření všech vzorků bylo potřeba buňky odlepit ode dna a spočítat je. Proces uvolnění buněk ze dna se nazývá trypsinizace. Z lahviček se odebralo médium a buňky se dvakrát opláchly pomocí PBS. Dále byl do každé lahvičky přidán 1 ml trypsinu a byla provedena samotná trypsinizace. Trypsinizace se provádí v inkubátoru a trvá přibližně čtyři minuty. Tímto procesem docílíme toho, že buňky se odlepi ode dna a začnou volně plavat v trypsinu. Pro kontrolu toho, že trypsinizace proběhla správně, je vhodné vzorky zkontrolovat pod mikroskopem. Buňky by



Obrázek 4.6: Přenos lahviček s buněčnými liniemi.



Obrázek 4.7:  $^{60}\text{Co}$  ozařovač a vodní fantom s umístěnou lahvičkou v ozařovací geometrii.

měly v lahvičce volně plavat. Do lahviček bylo poté přidáno médium, které pomůže zastavit proces trypsinizace.

Následně byly odebrány vzorky pro počítání koncentrace buněk na přístroji MUSE. Pomocí počítadla buněk MUSE byly zjištěny koncentrace buněk v jednotlivých vzorcích. Dle zjištěných koncentrací byly vypočteny objemy, které bylo potřeba nasadit do šestijamkových kultivačních destiček. Počet nasazených buněk byl přizpůsoben očekávanému přežití pro každou dávku. Očekávané přežití vycházelo z předchozích odborných měření v laboratoři na Oddělení dozimetrie záření (Tab. 4.1). Takto nasazené buňky byly umístěny do inkubátoru na kolonie, kde byly vzorky ponechány po dobu jedenácti dní.

Po uplynutí doby inkubace byly vzorky vyjmuty z inkubátoru a obarveny. Z kultivačních destiček bylo vylito médium a do jednotlivých jamek bylo aplikováno speciální barvivo crystal violet. Toto barvivo je dodáváno ve formě prášku a je mícháno v roztoku metanolu a vody. Ukázka vzorků s aplikovaným barvivem je na Obr. 4.8. Jedná se o roztok, který má fungicidní a antibakteriální vlastnosti. Po aplikaci crystal violet došlo k usmrcení buněk.

Barvivo bylo nutné ze vzorků vymýt. Vymytí crystal violet z kultivačních destiček bylo provedeno pomocí vlažné vody. Následně byly kultivační destičky usušeny na vzduchu při pokojové teplotě. Sušení kultivačních destiček se zafixovanými a obarvenými buňkami je vyobrazeno na Obr. 4.9.

Po usušení již bylo možné počítat jednotlivé kolonie. Nejdříve je nutné pod mikroskopem najít referenční kolonii, která odpovídá počtu padesáti buněk. Následně dle této referenční kolonie pouhým okem byly spočteny všechny kolonie v jednotlivých jamkách. Usušené kultivační destičky pro buněčné linie U251, A172 a T98G jsou na Obr. 4.10, Obr. 4.11 a Obr. 4.12. K usnadnění počítání kolonií sloužilo počítací pero, které vždy při stisknutí hrotu zaznamenalo navýšení počtu kolonií o jedna. Tento údaj byl zobrazen na displeji pera. Speciální počítací pero je na Obr. 4.13.

Zaznamenané hodnoty počtu kolonií a odpovídající aplikované dávky posloužily pro další zpracování.

## 4.4 Zpracování

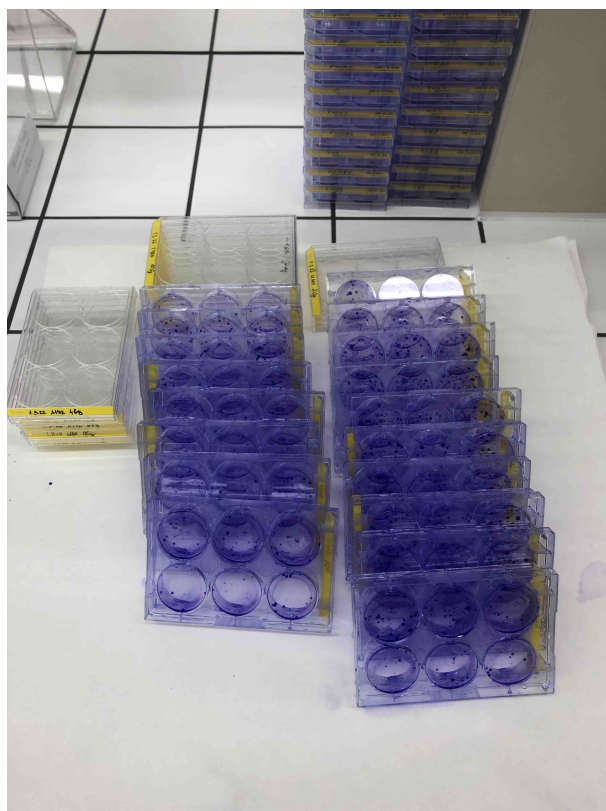
Naměřené hodnoty pro první opakování experimentu pro buněčné linie U251, A172 a T98G jsou v Tab. 4.3, Tab. 4.4 a Tab. 4.5. Každá kultivační destička má šest jamek, čemuž odpovídá šest hodnot počtu kolonií pro každou aplikovanou dávku  $D$ . Z každé kultivační destičky je dále vypočtena průměrná hodnota počtu kolonií  $\overline{n}_D$  na jednu jamku daného vzorku ozářeného dávkou  $D$ . Následně je vypočteno relativní přežití buněk  $S$  po ozáření danou dávkou  $D$  vůči neozářenému vzorku jako:

$$hS = \frac{\overline{n}_D}{S_{0D}} \cdot \frac{S_{00}}{\overline{n}_0} \cdot 100, \quad (4.1)$$

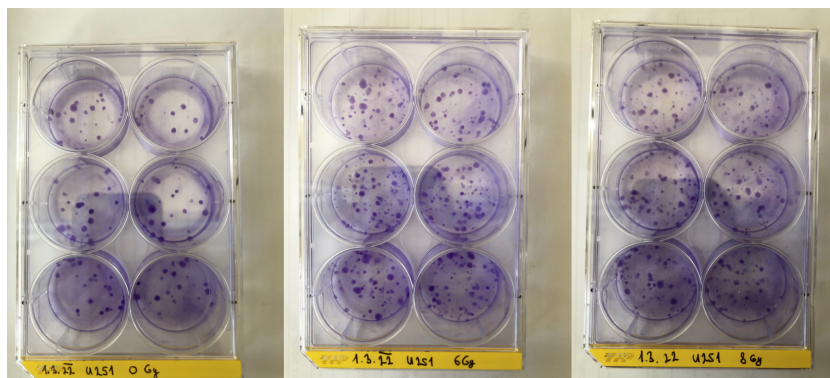
kde  $S_{0D}$  je počet nasazených buněk ve vzorku, který byl ozářen dávkou  $D$ ,  $S_{00}$  je počet nasazených buněk pro neozářený vzorek a  $n_0$  je průměrný počet kolonií na



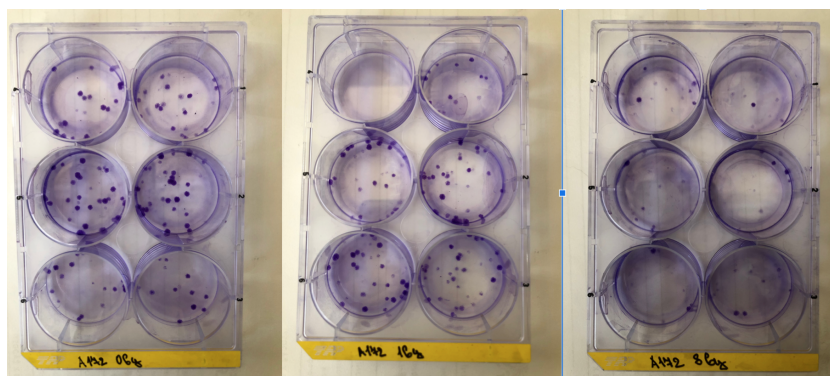
Obrázek 4.8: Vzorky naplněné barvivem crystal violet.



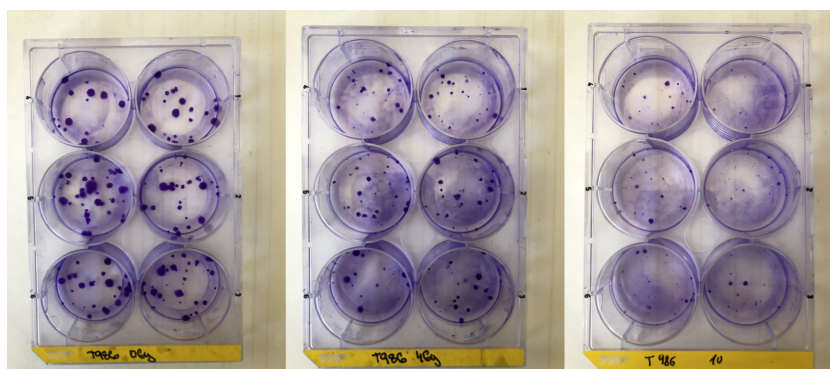
Obrázek 4.9: Sušení vzorků po obarvení.



Obrázek 4.10: Ukázka usušených kultivačních destiček kolonie U251.



Obrázek 4.11: Ukázka usušených kultivačních destiček kolonie A172.



Obrázek 4.12: Ukázka usušených kultivačních destiček kolonie T98G.



Obrázek 4.13: Počítání buněk po usušení pomocí speciálního pera s počítadlem.

jednu jamku, které byly spočteny v neozářeném vzorku.

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
U0	75	0	39	32	33	27	30	34	32,50	100,00
U1	108	1	31	25	36	33	34	42	33,50	71,58
U2	158	2	49	43	44	44	43	42	44,17	64,51
U4	357	4	58	50	57	59	50	46	53,33	34,48
U6	878	6	59	61	52	74	65	63	62,33	16,38
U8	2340	8	43	48	39	48	51	45	45,67	4,50

Tabulka 4.3: Data z prvního opakování experimentu pro buněčnou linii U251 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
A0	60	0	23	38	25	25	35	24	28,33	100,00
A1	73	1	33	33	25	35	27	-	30,60	88,77
A2	94	2	15	24	17	26	21	19	20,33	45,81
A4	184	4	16	9	12	20	15	16	14,67	16,88
A6	462	6	10	20	10	13	14	14	13,50	6,19
A8	1472	8	9	7	6	11	7	10	8,33	1,20

Tabulka 4.4: Data z prvního opakování experimentu pro buněčnou linii A172 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
T0	60	0	39	33	32	35	49	34	37,00	100,00
T2	94	2	61	46	41	38	61	48	49,17	84,82
T4	101	4	25	27	24	24	32	21	25,50	40,94
T6	167	6	14	17	11	18	26	21	17,83	17,32
T8	322	8	16	21	11	17	20	20	17,50	8,81
T10	731	10	6	6	5	7	13	12	8,17	1,81

Tabulka 4.5: Data z prvního opakování experimentu pro buněčnou linii T98G zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Naměřené hodnoty počtů kolonií pro druhé opakování experimentu pro buněčné linie U251, A172 a T98G jsou v Tab. 4.6, Tab. 4.7 a Tab. 4.8.

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
U0	75	0	3	3	0	0	2	1	1,50	100,00
U1	108	1	2	3	1	5	2	2	2,50	115,74
U2	158	2	0	1	4	3	3	3	2,33	73,84
U4	357	4	4	2	3	2	3	2	2,67	37,35
U6	878	6	2	0	2	3	1	3	1,83	10,44
U8	2340	8	3	1	3	3	4	1	2,50	5,34

Tabulka 4.6: Data ze druhého opakování experimentu pro buněčnou linii U251 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
A0	60	0	1	1	2	4	1	4	2,17	100,00
A1	73	1	2	2	1	1	1	1	1,33	50,58
A2	94	2	2	1	0	0	0	1	0,67	19,64
A4	184	4	1	0	1	0	2	0	0,67	10,03
A6	462	6	0	0	0	0	1	1	0,33	2,00
A8	1472	8	1	0	0	1	0	1	0,50	0,94

Tabulka 4.7: Data ze druhého opakování experimentu pro buněčnou linii A172 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
T0	60	0	2	1	2	4	4	9	3,67	100,00
T2	94	2	2	3	2	2	1	1	1,83	31,91
T4	101	4	0	0	0	1	1	2	0,67	10,80
T6	167	6	1	1	1	0	3	4	1,67	16,33
T8	322	8	0	2	2	3	3	3	2,17	11,01
T10	731	10	0	0	2	1	1	0	0,67	1,49

Tabulka 4.8: Data ze druhého opakování experimentu pro buněčnou linii T98G zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Naměřené hodnoty počtů kolonií pro třetí opakování experimentu pro buněčné linie U251, A172 a T98G jsou v Tab. 4.9, Tab. 4.10 a Tab. 4.11.

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
U0	75	0	8	12	10	15	11	10	11,00	100,00
U1	108	1	15	19	16	22	10	14	16,00	101,01
U2	158	2	17	13	16	19	17	19	16,83	72,64
U4	357	4	22	22	21	25	23	18	21,83	41,70
U6	878	6	18	15	16	15	18	16	16,33	12,68
U8	2340	8	14	12	9	12	17	11	12,50	3,64

Tabulka 4.9: Data ze třetího opakování experimentu pro buněčnou linii U251 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
A0	60	0	13	8	26	16	7	9	13,17	100,00
A1	73	1	4	8	9	9	9	10	8,17	50,98
A2	94	2	4	5	10	6	2	2	4,83	23,43
A4	184	4	1	1	3	7	3	5	3,33	8,26
A6	462	6	0	0	2	1	0	1	0,67	0,66
A8	1472	8	1	0	0	0	0	0	0,17	0,05

Tabulka 4.10: Data ze třetího opakování experimentu pro buněčnou linii A172 zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .



Vzorek	$S_0$	$D$ (Gy)	Počet kolonií						$\bar{n}$	$S$ (%)
T0	60	0	3	2	0	2	0	4	1,83	100,00
T2	94	2	1	1	3	0	1	3	1,50	52,22
T4	101	4	1	0	0	2	0	0	0,50	16,20
T6	167	6	1	1	2	0	0	0	0,67	13,06
T8	322	8	0	1	1	0	2	2	1,00	10,16
T10	731	10	0	0	0	1	0	0	0,17	0,75

Tabulka 4.11: Data ze třetího opakování experimentu pro buněčnou linii T98G zahrnující: počet nasazených buněk v jednotlivých vzorcích  $S_0$ , aplikovanou dávku  $D$ , naměřené počty kolonií po ozáření a inkubaci a jejich průměr  $\bar{n}$ , relativní přežití  $S$ .

Pro všechny tři buněčné kolonie byla pro další zpracování vybrána pouze data z prvního a třetího opakování experimentu. Hodnoty relativního přežití  $S$  z těchto dvou opakování byly zprůměrovány a jsou uvedeny pro jednotlivé buněčné linie U251, A172 a T98G v Tab. 4.12, Tab. 4.13 a Tab. 4.14. Data ze druhého opakování nebyla zahrnuta. V době druhého opakování experimentu totiž nefungoval počítač buněk MUSE a pro zjištění koncentrace buněk bylo využito alternativní metody (počítání buněk pomocí Scepteru), která není tak přesná. Nedostatečný počet vzrostlých kolonií je pravděpodobně způsoben nízkým počtem nasazených buněk.

$D$ (Gy)	$S$ (%)	$\sigma_S$ (%)
0	100,00	16,04
1	86,30	16,96
2	68,57	9,29
4	38,09	5,21
6	14,53	1,85
8	4,07	0,60

Tabulka 4.12: Průměrné hodnoty relativního přežití  $S$  a odchylka  $\sigma_S$  v závislosti na aplikované dávce  $D$  pro první a třetí opakování experimentu pro buněčnou linii U251.

$D$ (Gy)	$S$ (%)	$\sigma_S$ (%)
0	100,00	37,95
1	69,87	17,68
2	34,62	10,89
4	12,57	4,26
6	3,42	1,08
8	0,63	0,19

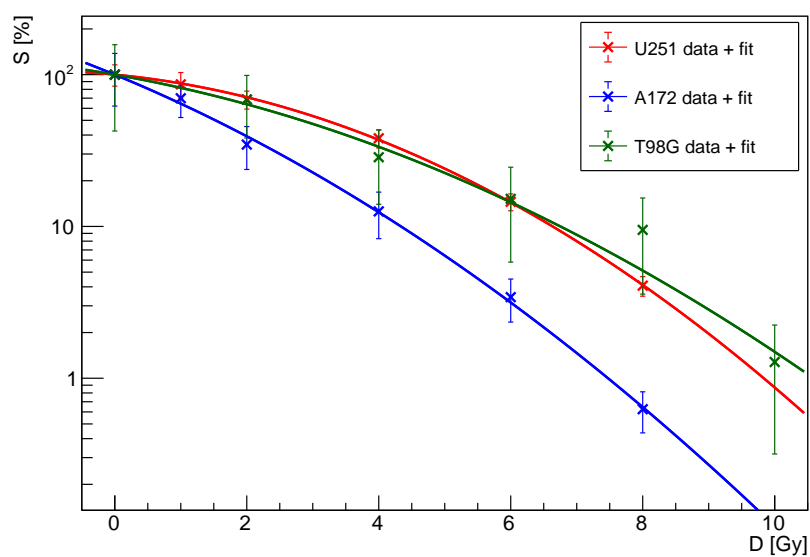
Tabulka 4.13: Průměrné hodnoty relativního přežití  $S$  a odchylka  $\sigma_S$  v závislosti na aplikované dávce  $D$  pro první a třetí opakování experimentu pro buněčnou linii A172.

$D$ (Gy)	$S$ (%)	$\sigma_S$ (%)
0	100,00	57,49
2	68,52	30,28
4	28,57	14,58
6	15,19	9,37
8	9,49	5,90
10	1,28	0,96

Tabulka 4.14: Průměrné hodnoty relativního přežití  $S$  a odchylka  $\sigma_S$  v závislosti na aplikované dávce  $D$  pro první a třetí opakování experimentu pro buněčnou linii T98G.

Závislost relativního přežití  $S$  na aplikované dávce  $D$  byla proložena pomocí vztahu (3.1). Byla použita data uvedená v Tab. 4.12, Tab. 4.13 a Tab. 4.14. Pro proklad bylo užito programu Root.

Výsledkem jsou tři křivky přežití pro tři buněčné linie: U251, A172 a T98G, které jsou znázorněny na Obr. 4.14. Z prokladu dat pomocí vztahu (3.1) byly zjištěny parametry  $\alpha$  a  $\beta$ . Zjištěné parametry  $\alpha$  a  $\beta$  pro jednotlivé buněčné linie jsou uvedeny v Tab. 4.15.



Obrázek 4.14: Výsledné křivky přežití tří buněčných linií, data byla proložena pomocí vztahu (3.1) v programu Root.

Buněčná linie	$\alpha$ ( $\text{Gy}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{Gy}^{-2}$ )
U251	$0,10 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,01$
A172	$0,41 \pm 0,11$	$0,03 \pm 0,02$
T98G	$0,18 \pm 0,14$	$0,02 \pm 0,02$

Tabulka 4.15: Zjištěné hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  pomocí prokladu dle vztahu (3.1) pro tři buněčné linie U251, A172 a T98G.

## 4.5 Diskuze

Výstupem experimentu jsou křivky přežití pro jednotlivé buněčné linie U251, A172 a T98G, které jsou zobrazeny na Obr. 4.14. Pomocí prokladu naměřených dat byly zjištěny parametry  $\alpha$  a  $\beta$ , které jsou uvedeny v Tab. 4.15. Výsledné křivky přežití buněčných linií U251, A172 a T98G jsou vytvořeny z průměrů relativního přežití  $S$  pro první a třetí opakování experimentu pomocí dat uvedených v Tab. 4.12, Tab. 4.13 a Tab. 4.14. Dat zjištěných ze druhého opakování nebylo využito. Neúspěch druhého opakování experimentu je pravděpodobně způsoben chybami při počítání koncentrací buněk před jejich nasazením do kultivačních destiček. V době konání druhého opakování experimentu totiž nebyl funkční počítač buněk MUSE a bylo využito alternativní metody pomocí počítače buněk Scepter, která však není tak přesná. Došlo tedy pravděpodobně k tomu, že nebylo nasazeno dostatečné množství buněk, což vedlo k nedostatečnému nárůstu kolonií v době inkubace po ozáření.

Z Obr. 4.14 vidíme, že hodnoty relativního přežití pro buněčnou linii T98G jsou zatíženy vysokou chybou. Tato chyba je způsobena průměrováním hodnot z prvního a třetího opakování experimentu. Ve třetím opakování totiž nenarostlo zdaleka tolik buněčných kolonií jako při prvním opakování. Všechna opakování experimentu jsou však zatížena chybou. Jedná se o práci s živými organismy, které jsou velmi náchylné na změny okolních podmínek jako je teplota, přístup světla, otřesy, atd.

Důležitým faktorem, který vstupuje do měření je manipulace se vzorky. S buňkami je často potřeba pracovat rychle, např. při nabírání jednotlivých objemů vzorku pro nasazení buněk do kultivačních destiček. Tyto buňky mohou v tubě sedimentovat ke dnu a jejich koncentrace při nabírání pipetou u hladiny je nižší, než jaká by byla v případě homogenního roztoku. Nízká koncentrace buněk před jejich nasazením do kultivačních destiček tak může vést k nedostatečnému nárůstu kolonií po inkubaci. Nedostatečný absolutní počet vzrostlých kolonií způsobuje obrovský rozptyl počtu kolonií v jednotlivých jamkách, které se následně průměrují. Práce s buňkami vyžaduje určitou zručnost a svižnost, kterou lze získat praxí. První opakování experimentu bylo provedeno s výraznou pomocí mé školitelky, oproti tomu třetí opakování jsem prováděla samostatně. Práci v laboratoři při druhém a třetím opakování jsem vykonávala téměř samostatně a pod dohledem, abych si vyzkoušela práci na radiobiologickém výzkumu. Je pravděpodobné, že tato nezkušenost ovlivnila výsledky experimentu a nejsou tedy v souladu s výsledky zkušených vědců.

Dle křivek přežití na Obr. 4.14 lze pozorovat, že nejvíce radiosenzitivní je buněčná linie A172. Pokles přeživší frakce buněk v závislosti na dávce je nejstrmější právě pro tuto buněčnou linii. Oproti tomu buněčné linie U251 a T98G jsou mnohem více radiorezistentní. Z těchto výsledků usuzuji, že glioblastomy T98G a U251 jsou mnohem odolnější vůči ionizujícímu záření než nádorové buňky z linie A172. Nádorové buňky linie A172 jsou citlivější na vliv ionizujícího záření, tj. postačuje nižší aplikovaná dávka na usmrcení buněk této linie. Buněčná linie T98G vykazuje mírně vyšší radiosenzitivitu pro nízké dávky než buněčná linie U251. Naopak pro vyšší dávky je pořadí buněčných linií zaměněné, tedy linie U251 je citlivější k ionizujícímu záření v oblasti vyšších dávek.

Důvody rozdílné radiosenzitivity mohou být různé. Zde můžeme vzít v potaz

věk osob, kterým byly odebrány vzorky tumorů pro buněčné linie. Nejmladší z pacientů poskytl buňky z buněčné linie A172, která byla vyhodnocena jako nejvíce radiosenzitivní. Z toho lze usoudit, že glioblastomové buňky v mladším organismu jsou citlivější na ionizující záření. Mohlo by to znamenat, že mladší jedinec bude mít lepší odezvu na léčbu pomocí radioterapie než starší pacienti. Naopak buněčné linie pocházející od starších pacientů (pro buněčnou linii U251 byl věk pacienta 75 let a pro T98G byl věk pacienta 61 let) vykazovaly nižší radiosenzitivitu. Tyto buňky potřebovaly vyšší dávku ionizujícího záření, aby byly usmrceny.

Buněčná linie	$\alpha$ ( $\text{Gy}^{-1}$ )	$\beta$ ( $\text{Gy}^{-2}$ )
U251	$0,33 \pm 0,15$	$0,09 \pm 0,03$
A172	$0,36 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$
T98G	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$

Tabulka 4.16: Hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  v odborné literatuře pro buněčné linie U251 [57] a pro A172 a T98G [58].

Zjištěné hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  jsou uvedeny v Tab. 4.15. Hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $\beta$  dle odborné literatury jsou uvedeny v Tab. 4.16. Předpokládané hodnoty těchto parametrů dle předchozích experimentů na Oddělení dozimetrie záření jsou uvedeny v Tab. 4.1. Zjištěné hodnoty parametrů v této práci (Tab. 4.15) nejsou v souladu s předpokládanými hodnotami ani s hodnotami z odborné literatury. V předpokládaných hodnotách parametrů jsou nejvyšší parametry pro buněčnou linii U251, nicméně z naměřených hodnot vyplynula jako nejvíce radiosenzitivní buněčná linie A172. Tento nesoulad může být způsoben snahou pracovat samostatně a bez pomoci zkušenějších experimentátorů. Dalším faktorem, který ovlivňuje výsledek experimentu je počítání kolonií po obarvení vzorků. Označení shluku buněk za kolonii je do jisté míry subjektivní a počet zjištěných kolonií tedy závisí i na osobě, která je počítala.

# Závěr

Tato práce se zabývá vlivem individuální radiosenzitivity tumorů na výsledky radioterapie. Významnou pasáží je kapitola věnovaná radioterapii. Radioterapie představuje jednu z nejčastějších modalit užívaných při onkologické léčbě. Z dostupných dat vyplývá, že přibližně 50 % onkologických pacientů je někdy v průběhu jejich léčby indikována radioterapie [59]. Například při léčbě karcinomu plic v České republice je aplikována radioterapie přibližně ve 22 % případů [60]. Poslední kapitola pojednává o experimentu na třech glioblastomových buněčných liniích U251, A172 a T98G. Byla zkoumána jejich radiosenzitivita pomocí provedení tzv. klonogenního testu.

Text je členěn na čtyři kapitoly. V první kapitole je popsáno fungování buňky, její orgány, buněčný cyklus, druhy poškození ionizačním zářením a mechanismy opravy těchto poškození. Zmíněna je také tvorba novotvarů, jejich struktura, růst a zásobování. Tyto základní znalosti jsou klíčové pro pochopení fungování organismu ve vztahu k ionizujícími záření.

Druhá kapitola pojednává o radioterapii. Nejdříve je popsán W. K. Röntgenův objev záření X, který započal významnou kapitolu lidské historie. Tento objev byl následován snahou využít ionizující záření ku prospěchu společnosti. Od té doby do nynějška je ionizujícího záření v medicíně hojně využíváno. Je uvedeno rozdělení radioterapie na externí radioterapii a brachyterapii. Jednotlivé radioterapeutické modalit jsou dále rozvedeny. Popsány jsou také běžně užívané frakcionační režimy radioterapeutické léčby.

Ve třetí kapitole je popsána individuální radiosenzitivita tumorů. Radiosenzitivita tumorů významně souvisí s radioterapií a je důležitým faktorem její efektivity a úspěšnosti. Jsou popsány faktory, které vstupují do procesu léčby tumorů pomocí záření. Dále je rozebrána problematika indikace radioterapie a dalších onkologických léčebných modalit jako je chemoterapie, imunoterapie, chirurgie, atd.

Poslední kapitola pojednává o experimentu na třech glioblastomových buněčných liniích U251, A172 a T98G. Byla zkoumána jejich radiosenzitivita pomocí provedení tzv. klonogenního testu. Experiment se uskutečnil v laboratoři na Oddělení dozimetrie záření. Jsou popsány základní radiobiologické principy a metody, které byly využity. Dále jsou uvedeny také jednotlivé přístroje, materiál a vybavení, které bylo nezbytné pro uskutečnění experimentu.

Jednalo se o experiment na třech glioblastomových buněčných liniích U251, A172 a T98G. Experimentální část práce vyžadovala strávit mnoho času v labora-

toři. Experiment byl opakován celkem třikrát, přičemž každé opakování experimentu trvalo tři až čtyři týdny. Všechny buněčné linie byly pěstovány a následně ozářeny různými dávkami za účelem zjištění jejich individuální radiosenzitivity. Výsledky druhého opakování byly vyhodnoceny jako nedostatečné. Absolutní počty kolonií, které narostly ve vzorcích, byly velmi nízké. To je pravděpodobně způsobeno tím, že v průběhu experimentu nefungoval počítač buněk MUSE a muselo být využito alternativní metody, která však není tak přesná. Tato data tedy nebyla zahrnuta do výsledků. Jako nejvíce radiosenzitivní byla vyhodnocena buněčná linie A172. Výsledky zjištěné v této práci však neodpovídají výsledkům zkušených experimentátorů.

Z rešerše i z výsledků experimentu vyplývá, že radiosenzitivita nádorů stejného původu a rozsahu se může velmi různit mezi jedinci. Toto zásadně komplikuje indikaci onkologické léčby a predikci její úspěšnosti. Výzkumu v oblasti onkologie se v současné době věnuje značná pozornost a prostředky. Výzkum radiosenzitivity jednotlivých tumorů v závislosti na dalších vstupujících parametrech má potenciál významně zdokonalit rozhodovací proces indikace léčebné metody a celkově tedy vylepšit úspěšnost léčby.

# Bibliografie

- [1] D. Sitná et al., *Biologie*, [online, cit. 3.1.2022], 2016. URL: <https://publi.cz/books/294/Impresum.html>.
- [2] J. Hanzlová et al., *Stavba lidského těla*, [online, cit. 26.1.2022], 2015. URL: [https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady\\_anatomie/zakl\\_anatomie\\_I/pages/stavba\\_tela.html](https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_I/pages/stavba_tela.html).
- [3] Kolektiv PŘF UPOL, *Živočišná buňka*, [online, cit. 3.1.2022], 2016. URL: [https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy\\_k\\_vyuce/BBCMB\\_Zivocisna\\_bunka\\_2016.pdf](https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/kbb/Dokumenty/Materialy_k_vyuce/BBCMB_Zivocisna_bunka_2016.pdf).
- [4] F. Brauner et al., *Buněčná biologie*, [online, cit. 3.1.2022], 2015. URL: <https://eluc.kr-olomoucky.cz/verejne/lekce/5>.
- [5] M. Mañas, *Živočišná buňka - kresba*, [online, cit. 4.1.2022], 2006. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal\\_cell\\_structure\\_cs.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_cell_structure_cs.svg).
- [6] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, 5th. New York: Garland Science, 2008, [online, cit. 5.1.2022], ISBN: 978-0-8153-4105-5. URL: <https://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/592640>.
- [7] T. Aghová, *Kde DNA najdeme, z čeho je složená a jak vypadá?*, [online, cit. 5.1.2022]. URL: <https://doba-genova.cz/kde-dna-najdeme/>.
- [8] A. Šípek, *Buněčný cyklus*, [online, cit. 19.4.2022], čvn. 2012. URL: <http://www.genetika-biologie.cz/bunecny-cyklus>.
- [9] J. Hofmanová, *Nádorové onemocnění, úvod a základní pojmy*, [online, cit. 27.1.2022], 2013. URL: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01\\_nador.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps13/genotox/web/pages/01_nador.html).
- [10] OpenStax, *Cell Cycle With Cyclins and Checkpoints*, [online, cit. 18.8.2022], květ. 2016. URL: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0332\\_Cell\\_Cycle\\_With\\_Cyclins\\_and\\_Checkpoints.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0332_Cell_Cycle_With_Cyclins_and_Checkpoints.jpg).
- [11] V. Mornstein, *Biologické účinky ionizujícího záření*, [online, cit. 26.1.2022], 2016. URL: [https://www.med.muni.cz/biofyz/files/ucebnice/Biol\\_ucinky\\_zar.pdf](https://www.med.muni.cz/biofyz/files/ucebnice/Biol_ucinky_zar.pdf).
- [12] J. Halaška et al., *Oprava DNA*, [online, cit. 10.7.2022]. URL: <http://fbmi.sirdik.org/2-kapitola/23/233.html>.
- [13] P. Mlejnek, *Buněčná smrt*, [online, cit. 27.1.2022], srp. 2004. URL: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2004/cislo-8/bunecna-smrt.html>.

- [14] I. Slaninová, *Onkogeny, nádorové supresory, onkogenní viry*, [online, cit. 10.7.2022], 2006. URL: [https://is.muni.cz/elportal/estud/lf/js06/bltm0111p/p25\\_Onkogeny06.pdf](https://is.muni.cz/elportal/estud/lf/js06/bltm0111p/p25_Onkogeny06.pdf).
- [15] I. Koniarová, *Radiologická fyzika v radioterapii*, [online, cit. 9.3.2022], led. 2014. URL: <https://behounek.fjfi.cvut.cz/course/view.php?id=65>.
- [16] B. Arneth, “Tumor microenvironment”, *Medicina*, roč. 56, 1 led. 2020, [online, cit. 10.7.2022], ISSN: 1010660X. DOI: 10.3390/MEDICINA56010015. URL: <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/1/15>.
- [17] A. Ryška et al., *Nádorové mikroprostředí: nejen nádorové buňky!*, [online, cit. 29.9.2022], dub. 2014. URL: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/nadorove-mikroprostredi-nejen-nadorove-bunky/>.
- [18] M. Kelley, *3 things to know about the tumor microenvironment*, [online, cit. 10.7.2022], břez. 2021. URL: <https://www.mdanderson.org/cancerwise/what-is-the-tumor-microenvironment-3-things-to-know.h00-159460056.html>.
- [19] J. Petera, *Zdroje a biologické účinky záření*, [online, cit. 23.8.2022], čvc. 2014. URL: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lecit/radioterapie-ozarovani/zdroje-a-biologicke-ucinky-zareni/>.
- [20] A. Degiovanni et al., “History of hadron therapy accelerators”, *Physica Medica*, roč. 31, č. 4, s. 322–332, čvn. 2015, [online, cit. 29.12.2022]. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.03.002>.
- [21] A. T. Berman et al., “Proton beam therapy for non-small cell lung cancer: Current clinical evidence and future directions”, *Cancers*, roč. 7, s. 1178–1190, 3 čvc. 2015, [online, cit. 25.4.2023], ISSN: 20726694. DOI: 10.3390/CANCERS7030831.
- [22] M. Šíp, *Molekulární radiobiologie*, [online, cit. 25.4.2023]. URL: [https://www.zsf.jcu.cz/images/ZSF/fakulta/ustavy/urt/pro-studenty/radiologicky-asistent/sipmolekularni-radiobiologie\\_1ra.pdf](https://www.zsf.jcu.cz/images/ZSF/fakulta/ustavy/urt/pro-studenty/radiologicky-asistent/sipmolekularni-radiobiologie_1ra.pdf).
- [23] N. Franken et al., “Clonogenic assay of cells *in vitro*”, *Nature Protocols*, roč. 1, č. 5, s. 2315–2319, 2006, [online, cit. 6.12.2022], ISSN: 1754-2189. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. URL: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.339>.
- [24] R. Mohan, “A review of proton therapy – Current status and future directions”, *Precision Radiation Oncology*, roč. 6, s. 164–176, 2 čvn. 2022, [online, cit. 13.4.2023], ISSN: 2398-7324. DOI: 10.1002/PRO6.1149. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro6.1149>  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro6.1149>  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro6.1149>.



- [25] C. M. van Leeuwen et al., “The alfa and beta of tumours: A review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies”, *Radiation Oncology*, roč. 13, s. 1–11, 1 květ. 2018, [online, cit. 1.5.2023], ISSN: 1748717X. DOI: 10.1186/S13014-018-1040-Z/FIGURES/3. URL: <https://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-018-1040-z>.
- [26] T. Rassamegevanon et al., “Comparable radiation response of *ex vivo* and *in vivo* irradiated tumor samples determined by residual  $\gamma$ H2AX”, *Radiotherapy and Oncology*, roč. 139, s. 94–100, říj. 2019, [online, cit. 5.1.2023], ISSN: 0167-8140. DOI: 10.1016/J.RADONC.2019.06.038.
- [27] M. Chua et al, “Biomarkers of Radiation Exposure: Can They Predict Normal Tissue Radiosensitivity?”, *Clinical Oncology*, roč. 25, s. 610–616, 10 říj. 2013, [online, cit. 1.5.2023], ISSN: 0936-6555. DOI: 10.1016/J.CLON.2013.06.010.
- [28] J. Zitterbartová, *Vývoj a moderní trendy v radioterapii*, [online, cit. 29.9.2022], břez. 2017. URL: [https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8440/um/03\\_2017.pdf](https://is.muni.cz/el/1431/jaro2017/Bi8440/um/03_2017.pdf).
- [29] Z. Horáková et al., *In vitro stanovení radiosenzitivity nádorů hlavy a krku*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarni-tym/kongresy/>.
- [30] M. Bourguignon et al., “100 Years of Individual Radiosensitivity: How We Have Forgotten the Evidence”, *Radiology*, roč. 264, č. 3, s. 627–631, zář. 2012, [online, cit. 18.11.2022]. DOI: 10.1148/radiol.12112560. URL: <https://www.researchgate.net/publication/230733837>.
- [31] P. J. Deschavanne et al., “A review of human cell radiosensitivity *in vitro*”, *International Journal of Radiation Oncology - Biology - Physics*, roč. 34, s. 251–266, 1 led. 1996, [online, cit. 5.1.2023], ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/0360-3016(95)02029-2.
- [32] L. Navrátil et al., “Klíčové momenty v historii československé radiobiologii”, *Časopis lékařů českých*, roč. 159, č. 7-8, s. 252–257, 2020, [online, cit. 29.9.2022]. URL: <https://www.prolekare.cz/casopisy/casopis-lekaru-ceskych/2020-7-8-1/download?hl=cs>.
- [33] H. Li et al., “Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer”, *Journal of Cellular Biochemistry*, roč. 101, s. 805–815, 4 čvc. 2007, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 1097-4644. DOI: 10.1002/JCB.21159. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.21159>.
- [34] L. Withers, “4. *In-vitro* conservation”, *Biological Journal of the Linnean Society*, roč. 43, s. 31–42, 1 květ. 1991, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 0024-4066. DOI: 10.1111/J.1095-8312.1991.TB00581.X. URL: <https://academic.oup.com/biolinnean/article/43/1/31/2654312>.
- [35] L. E. Gerweck et al., “Tumor Cell Radiosensitivity Is a Major Determinant of Tumor Response to Radiation”, *Cancer Research*, roč. 66, s. 8352–8355, 17 zář. 2006, [online, cit. 30.9.2022], ISSN: 0008-5472. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0533. URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/66/17/8352/526013/Tumor-Cell-Radiosensitivity-Is-a-Major-Determinant>.

- [36] B. Zhivotovsky et al., “Tumor Radiosensitivity and Apoptosis”, *Experimental Cell Research*, roč. 248, s. 10–17, 1 dub. 1999, [online, cit. 4.1.2023], ISSN: 0014-4827. DOI: 10.1006/EXCR.1999.4452. URL: <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4452>.
- [37] L. J. Forker, “Biomarkers of Tumour Radiosensitivity and Predicting Benefit from Radiotherapy”, *Clinical Oncology*, roč. 27, s. 561–569, 10 říj. 2015, [online, cit. 17.4.2023], ISSN: 0936-6555. DOI: 10.1016/J.CLON.2015.06.002.
- [38] D. Sarfati et al., “The impact of comorbidity on cancer and its treatment”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, roč. 66, s. 337–350, 4 čvc. 2016, [online, cit. 4.1.2023], ISSN: 1542-4863. DOI: 10.3322/CAAC.21342. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21342>.
- [39] L. Zhao et al., “Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity”, *Carcinogenesis*, roč. 33, s. 2220–2227, 11 lis. 2012, [online, cit. 4.1.2023], ISSN: 0143-3334. DOI: 10.1093/CARCIN/BGS235. URL: <https://academic.oup.com/carcin/article/33/11/2220/2464157>.
- [40] I. E. Tothill, “Biosensors for cancer markers diagnosis”, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, roč. 20, s. 55–62, 1 ún. 2009, [online, cit. 5.1.2023], ISSN: 1084-9521. DOI: 10.1016/J.SEMCDB.2009.01.015.
- [41] H. Dimaras et al., “Retinoblastoma”, *Nature Reviews Disease Primers 2015 1:1*, roč. 1, s. 1–23, 1 srp. 2015, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 2056-676X. DOI: 10.1038/nrdp.2015.21. URL: <https://www.nature.com/articles/nrdp201521>.
- [42] A. J. Levine, “The Tumor Suppressor Genes”, roč. 62, s. 623–651, lis. 2003, [online, cit. 24.4.2023], ISSN: 00664154. DOI: 10.1146/ANNUREV.BI.62.070193.003203. URL: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.62.070193.003203>.
- [43] M. Lee et al., “BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management”, <https://doi.org/10.1148/rg.2017160144>, roč. 37, s. 1005–1023, 4 květ. 2017, [online, cit. 24.4.2023], ISSN: 15271323. DOI: 10.1148/RG.2017160144. URL: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.2017160144>.
- [44] D. R. Aitken et al., “Complications Associated with Mastectomy”, *Surgical Clinics of North America*, roč. 63, s. 1331–1352, 6 pros. 1983, [online, cit. 27.4.2023], ISSN: 0039-6109. DOI: 10.1016/S0039-6109(16)43192-0.
- [45] D. E. Pittaway et al., “Laparoscopic adnexectomy: A comparison with laparotomy”, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, roč. 171, s. 385–391, 2 srp. 1994, [online, cit. 27.4.2023], ISSN: 0002-9378. DOI: 10.1016/S0002-9378(94)70039-7.
- [46] M. Lee et al., “BRCA-associated Cancers: Role of Imaging in Screening, Diagnosis, and Management”, <https://doi.org/10.1148/rg.2017160144>, roč. 37, s. 1005–1023, 4 květ. 2017, [online, cit. 27.4.2023], ISSN: 15271323. DOI: 10.1148/RG.2017160144. URL: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.2017160144>.

- [47] L. He et al., “The prognosis comparison of different molecular subtypes of breast tumors after radiotherapy and the intrinsic reasons for their distinct radiosensitivity”, *Cancer Management and Research*, roč. 11, s. 5765, 2019, [online, cit. 30.4.2023], ISSN: 11791322. DOI: 10.2147/CMAR.S213663. URL: /pmc/articles/PMC6612049/%20/pmc/articles/PMC6612049/?report=abstract%20https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6612049/.
- [48] T. Björk-Eriksson et al., “Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers”, *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, roč. 46, s. 13–19, 1 led. 2000, [online, cit. 1.5.2023], ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/S0360-3016(99)00373-9.
- [49] D. A. White, “Developing oxygen-enhanced magnetic resonance imaging as a prognostic biomarker of radiation response”, *Cancer Letters*, roč. 380, s. 69–77, 1 zář. 2016, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 0304-3835. DOI: 10.1016/J.CANLET.2016.06.003.
- [50] I. Sirák, “Receptor pro epidermální růstový faktor a jeho úloha v radioterapii”, *Klinická onkologie*, 2008, [online, cit. 14.4.2023]. URL: <https://www.researchgate.net/publication/24344801Epidermalgrowthfactor%5C%5CreceptorandradiotherapyArticleinKlinick%C3%A1onkologie:casopisCesk%C3%A9Slovensk%C3%A9onkologick%C3%A9spolecnosti%C2%B7>.
- [51] H. Wirsching et al., “Glioblastoma”, *Malignant Brain Tumors*, s. 265–288, led. 2016, [online, cit. 5.1.2023]. DOI: 10.1007/978-3-319-49864-5\_18/COVER. URL: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-49864-5\\_18](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-49864-5_18).
- [52] Cellosaurus, *Cellosaurus cell line U-251MG (CVCL\_0021)*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_0021](https://www.cellosaurus.org/CVCL_0021).
- [53] —, *Cellosaurus cell line A-172 (CVCL\_0131)*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_0131](https://www.cellosaurus.org/CVCL_0131).
- [54] —, *Cellosaurus cell line T98G (CVCL\_0556)*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: [https://www.cellosaurus.org/CVCL\\_0556](https://www.cellosaurus.org/CVCL_0556).
- [55] Merck KGaA, *Scepter™ 2.0 Handheld Automated Cell Counter*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: <https://www.merckmillipore.com>.
- [56] P-LAB, *Kultivační lahve*, [online, cit. 5.1.2023]. URL: <https://www.p-lab.cz/kultivacni-lahve>.
- [57] M. Petrás et al., “Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin- $\beta$ 1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt-mediated in vitro radioresistance”, *Neuro-Oncology*, roč. 15, s. 1027–1040, 8 srp. 2013, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 1522-8517. DOI: 10.1093/NEUONC/NOT046. URL: <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/15/8/1027/1205216>.

- [58] M. Suzuki et al., “Relative biological effectiveness for cell-killing effect on various human cell lines irradiated with heavy-ion medical accelerator in Chiba (HIMAC) carbon-ion beams”, *International Journal of Radiation Oncology*, roč. 48, s. 241–250, 1 srp. 2000, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 0360-3016. DOI: 10.1016/S0360-3016(00)00568-X. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036030160000568X>.
- [59] Y. Lievens et al., “Provision and use of radiotherapy in Europe”, *Molecular Oncology*, roč. 14, s. 1461–1469, 7 čvc. 2020, [online, cit. 6.1.2023], ISSN: 1878-0261. DOI: 10.1002/1878-0261.12690. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1878-0261.12690>.
- [60] M. Zemanová, “Místo radioterapie v léčbě karcinomu plic”, *Onkologie*, s. 281–284, 2009, [online, cit. 5.1.2023]. URL: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2009/05/04.pdf>.