

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření



Bakalářská práce

Vliv laboratorních chyb na křivky buněčného
přežití v radiobiologii

Autor: Jana Ruschaková
Vedoucí práce: Ing. Anna Jelínek Michaelidesová, PhD.
Odborný konzultant: Ing. Irina Danilová
Akademický rok: 2023/2024



Katedra: KDAIZ

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: Jana Ruschaková

Studijní program: Radiologická technika

Specializace: ---

Název práce: Vliv laboratorních chyb na křivky buněčného přežití v radiobiologii
(česky)

Název práce: The effect of laboratory errors on cell survival curves in radiobiology
(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

1. Student nastuduje a popíše problematiku poškození buněk ionizujícím zářením, jak na buněčné, tak na molekulární úrovni.
2. Student představí důsledky buněčného poškození (např. mutace, buněčná smrt).
3. Student vysvětlí pojem křivka buněčného přežití, vysvětlí její důležitost a využití v radioterapii.
4. Student popíše způsoby sestavení křivek buněčného přežití a teorie popisující jejich průběh.
5. Student provede rešerši literatury pro identifikaci možných vlivů, které v laboratoři ovlivňují křivky buněčného přežití.
6. Vedoucí bakalářské práce určí tři vlivy, které následovně student laboratorně ověří, vyhodnotí a prodiskutuje jejich důležitost.

Doporučená literatura:

- [1] VAN DER KOGEL, Albert. *Basic Clinical Radiobiology* Fourth Edition. CRC Press, 2009. ISBN 978-0-340-92966-7. DOI: 10.1201/b13224.
- [2] ALBERTS, Bruce. *Essential cell biology*. 3rd ed. New York: Garland Science, c2010. ISBN 9780815341291.
- [3] BRASELMANN, Herbert, Agata MICHNA, Julia HESS a Kristian UNGER. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation Oncology*. 2015, **10**(1). ISSN 1748-717X. DOI: 10.1186/s13014-015-0529-y.

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 78/7
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:

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

Datum zadání bakalářské práce: 20. 10. 2022

Termín odevzdání bakalářské práce: 2. 8. 2023

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.




.....
garant programu


.....
vedoucí katedry


.....
děkan

V Praze dne 20.10.2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

V Praze 4.1.2024.....

Ruschaková
.....
Jana Ruschaková

Poděkování

Ráda bych vyjádřila poděkování vedoucí mé bakalářské práce Ing. Anně Jelínek Michaelidesové, Ph.D. za její rady a cenné připomínky, dále konzultantce mé bakalářské práce Ing. Irině Danilové za její rady a trpělivost při experimentální části bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala mé rodině a přátelům za nesmírnou podporu během celého bakalářského studia.

Jana Ruschaková

Název práce:

Vliv laboratorních chyb na křivky buněčného přežití v radiobiologii

Autor: Jana Ruschaková

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

Konzultant: Ing. Irina Danilová

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

Abstrakt:

Při provádění experimentů v laboratoři může docházet ke vzniku laboratorních chyb. Tyto laboratorní chyby mohou následně ovlivnit výsledky experimentů i jejich interpretaci. Vzhledem k důležitosti výsledků experimentů v radiobiologii je důležité znát vliv laboratorních chyb a minimalizovat je. Za účelem zjištění vlivu laboratorních chyb na křivky buněčného přežití byl proveden klonogenní test s použitím buněčné linie U251, během kterého byly simulovány vybrané laboratorní chyby. Následně byla provedena statistická analýza vlivu jednotlivých simulovaných chyb na křivky buněčného přežití, analýzou nebyl prokázán statisticky významný vliv vybraných laboratorních chyb na buněčné přežití. Byly však nalezeny rozdílné parametry α a β , než byly očekávány z měření na Oddělení dozimetrie záření či odborné literatury.

Klíčová slova:

Radiobiologie, klonogenní test, laboratorní chyby, křivky buněčného přežití

Title:

The effect of laboratory errors on cell survival curves in radiobiology

Author: Jana Ruschaková

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

Consultant: Ing. Irina Danilová

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

Abstrakt:

While conducting experiments in the laboratory, laboratory errors may occur. These laboratory errors can subsequently affect the results of experiments and their interpretation. Given the importance of experimental results in radiobiology, it is important to know the impact of laboratory errors and to minimize them. In order to determine the effect of laboratory errors on cell survival curves, a clonogenic assay was performed using the U251 cell line during which selected laboratory errors were simulated. Subsequently, a statistical analysis of the effect of each simulated error on the cell survival curves was performed; the analysis did not demonstrate a statistically significant effect of the selected laboratory errors on cell survival. However, the α and β parameters found differed from the values measured at the Department of Radiation Dosimetry or specialized literature.

Key words: Radiobiology, clonogenic assay, laboratory errors, cell survival curves

Obsah

Úvod	11
1 Buňka	12
1.1 Anatomie buňky	12
1.2 Buněčné jádro	17
1.2.1 Jaderná membrána	17
1.2.2 Jadérko	17
1.2.3 Chromatin	18
1.3 DNA	18
1.3.1 Chromozomy	20
1.4 Jaderné procesy	22
1.4.1 Replikace DNA	22
1.4.2 Transkripce	23
1.4.3 Translace	23
1.5 Buněčný cyklus	24
1.5.1 Interfáze	25
1.5.2 M fáze	25
1.5.3 Kontrolní body buněčného cyklu	26
2 Ionizující záření	28
2.1 Přímě ionizující záření	28
2.2 Nepřímě ionizující záření	31

3	Vliv ionizujícího záření na buňky	34
3.1	Přímý a nepřímý účinek IZ	34
3.1.1	Radiolýza vody	35
3.2	Stádia účinku IZ na organismus	35
3.3	Radiační poškození biomolekul	36
3.4	Poškození na subcelulární úrovni	39
3.4.1	Poškození chromozomů	39
3.4.2	Poškození buněčných organel	42
3.5	Odezva na poškození DNA	42
3.6	Reparační procesy	43
3.6.1	Opravy bazí	43
3.6.2	Opravy zlomů	43
3.7	Buněčná smrt	44
3.7.1	Apoptóza	44
3.7.2	Nekróza	45
3.7.3	Senescence	45
3.7.4	Autofagie	45
3.7.5	Mitotická katastrofa	46
3.8	Mutace	46
3.9	Faktory ovlivňující biologický účinek ozáření	47
4	Radiobiologie	49
4.1	Klonogenní test	49
4.2	LQ model	50
4.3	Využití LQ modelu v radioterapii	51
4.4	Laboratorní chyby v radiobiologii	53
5	Experiment	56
5.1	Úvod	56
5.2	Materiály a metody	56

5.2.1	Buněčná linie U251	56
5.2.2	Použité pomůcky	57
5.2.3	Postup experimentu	58
5.2.4	Zpracování dat	62
5.3	Výsledky experimentu	63
5.4	Cena experimentu	72
5.5	Diskuze výsledků	75
	Závěr	78

Úvod

Hlavním cílem bakalářské práce je analýza vlivu vybraných laboratorních chyb na křivky buněčného přežití v radiobiologii. Přesná a spolehlivá měření buněčného přežití po ozáření jsou zásadní pro porozumění reakcí tkání a buněk na různé dávky záření. Avšak v laboratorním prostředí jsou měření vystavena možnému vzniku laboratorních chyb, které mohou následně ovlivnit výsledky i jejich interpretaci. Vzhledem k důležitosti spolehlivosti vědeckých výsledků v oblasti radiobiologie je pochopení a minimalizace laboratorních chyb klíčové.

Text je členěn celkem na 5 kapitol. První čtyři kapitoly jsou věnovány rešerši a pátá kapitola je věnována experimentální části.

První kapitola se věnuje buněčné biologii. Obsahuje obecnou stavbu buňky, popis DNA, jaderných procesů a buněčného cyklu. V druhé kapitole je popsáno ionizující záření a jeho interakce. Třetí kapitola se zabývá vlivem ionizujícího záření na buňky. Je popsán přímý a nepřímý účinek záření, stádia účinků, radiační poškození biomolekul, chromozomů a buněčných organel, dále odezva na poškození, reparační procesy, různé typy buněčné smrti a mutací. Čtvrtá kapitola se věnuje radiobiologii a laboratorním chybám v radiobiologii. Je popsán základní radiobiologický test, kterým je klonogenní test, křivky buněčného přežití, lineárně-kvadratický model a jeho využití v radioterapii a jsou popsány laboratorní chyby, které se mohou v radiobiologii vyskytovat.

Pátá kapitola popisuje experimentální část, ve které byly zkoumány vlivy vybraných laboratorních chyb na křivky buněčného přežití. Byl prováděn klonogenní test, v jehož průběhu byly simulovány chyby šikmého pipetování, rozředění vzorku $5\times$ a $10\times$, nasazení vzorku do šestijamkových kultivačních destiček 1 hodinu po trypsinizaci a vliv počítání kolonií různými lidmi. Je popsána použitá buněčná linie U251, použité pomůcky, podrobný postup experimentu a jeho cena. Jsou uvedeny naměřené hodnoty a jsou prodiskutovány výsledky.

1. Buňka

Všechny živé organismy jsou složeny z buněk, což jsou malé, membránou ohraničené uzavřené jednotky, které jsou schopné růst a vytvářet své kopie. Podle přítomnosti pravého jádra jsou buňky rozdělovány na prokaryotické a eukaryotické.

Prokaryotické buňky

Prokaryotické buňky nemají vyvinutý obal, který by odděloval genetický materiál od dalších buněčných složek. Rovněž neobsahují specifické bazické proteiny a nemají vyvinuté membránou ohraničené buněčné organely. Namísto pravého jádra obsahují jen prokaryotický chromozom, který je tvořen obvykle z jedné molekuly deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Dále se v buňce nacházejí plazmidy, což jsou malé molekuly DNA, které nesou doplňkovou genetickou informaci. Jsou zpravidla velmi malé, jejich rozměry jsou obvykle přibližně $5 \mu\text{m}$ [1, 2].

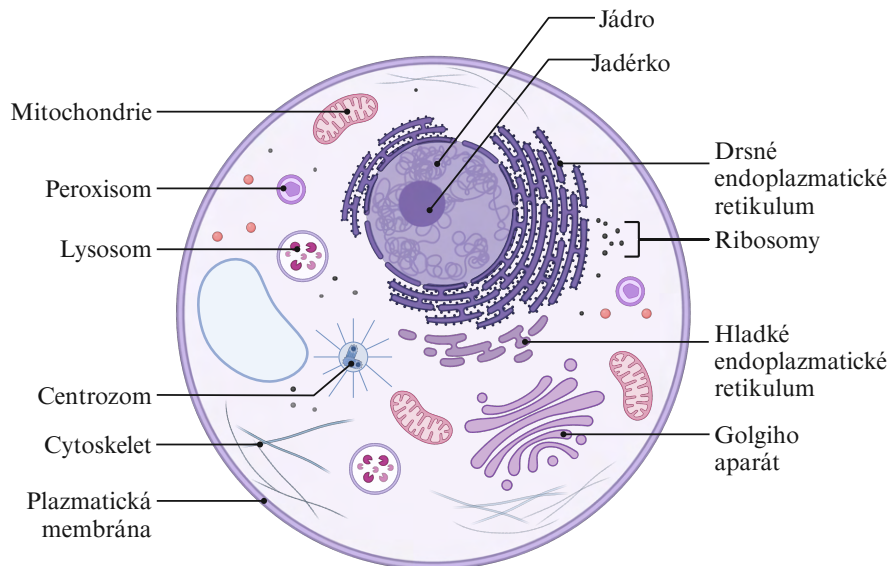
Eukaryotické buňky

Eukaryotické buňky jsou obecně větší a složitější než buňky prokaryotické. Mohou žít samostatně jako jednobuněčné organismy, nebo v mnohobuněčných souborech. Z definice mají všechny eukaryotické buňky jádro, dále mají další organely a buněčné struktury, které mají specifické funkce. V rámci jednoho organismu se vyskytuje spousta různě diferencovaných a funkčně zaměřených buněk, které díky spolupráci a komunikaci umožňují jeho život [1, 3].

1.1 Anatomie buňky

Eukaryotická buňka se dá rozdělit na buněčné jádro a zbytek buňky, který je vyplněn cytoplazmou, ve které se nacházejí buněčné organely, cytoskelet a buněčné

inkluze.



Obrázek 1.1: Anatomie buňky (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

Buněčná membrána

Buněčná membrána neboli cytoplazmatická membrána je selektivně propustná vrstva, tvořící vnější hranici buňky. Základní funkcí buněčné membrány je uzavření obsahu buňky a dále slouží jako její hranice, kterou musejí procházet látky, které do buňky vstupují nebo ji opouštějí. Z velké části se skládá z fosfolipidů a proteinů [4].

Buněčné membrány se dělí na propustné, polopropustné a selektivně propustné, jsou obvykle volně propustné pro vodu, ale fungují jako částečné bariéry pro pohyb téměř všech ostatních látek. Základem je fosfolipidová dvojvrstva ve které plavou proteiny a další komponenty [2, 4].

Semipermeabilita buněčné membrány umožňuje, že do buňky volně proniká jen voda a některé malé a nepolární molekuly, membrána nepropouští ionty a polární molekuly, z tohoto důvodu se vyvinuly transportní mechanismy, které umožňují jejich vstup do buňky pomocí transmembránových proteinů. Proteiny mohou vytvářet kanálky, mohou fungovat samy jako přenašeče nebo vytvářet iontové pumpy, které vykonávají transport [2].

Podle toho, zda je při transportu spotřebovávána energie dělíme transport na aktivní a pasivní.

- **Prostá difuze** patří k pasivnímu transportu a jedná se o pohyb látek z oblasti s vysokou koncentrací daných látek do oblasti s nižší koncentrací [2].
- **Zprostředkované difuze** využívají molekuly, které membránou volně neprostupují jako např. aminokyseliny, sacharidy a různé ionty. Pro tento transport je zapotřebí např. membránových kanálků či proteinových přenašečů. Membránové kanálky fungují obousměrně a mohou být specifické pro určité molekuly, jejichž prostřednictvím může buňka uzpůsobovat příjem látek aktuální potřebě. Proteinové přenašeče umožňují navázání transportované molekuly a její přenos skrz membránu [2, 4].
- **Aktivní transport** využívá jiné typy přenašečových proteinů a dochází při něm ke spotřebě energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). Dělí se na primární a sekundární. Při primárním transportu je energie přímo spojena s pohybem požadované látky přes membránu. Sekundární transport se týká difuze jedné látky přes membránu, která pohání transport jiné [2, 4].

Cytoplazma

Cytoplazma je základní látka, která vytváří prostředí pro existenci buněčných organel. Je tvořena přibližně z 90 % vodou dále pevnými složkami, nejčastěji bílkoviny, sacharidy, lipidy a anorganickými látkami. Cytoplazma přejímá látky z vnějšího prostředí a je místem, kde se syntetizují nové látky pro buněčné použití, dále se v ní rozpouští látky a dochází zde k jejich ředění pro chemické přeměny. V cytoplazmě probíhá transport do jiných částí buňky nebo do jiných buněk těla a usnadňuje se vylučování odpadních látek [2, 4, 5].

Cytoskelet

Základem cytoskeletu jsou bílkoviny, které v cytoplazmě vytvářejí vlákna (mikrofilamenta a intermediární filamenta) nebo duté trubičky (mikrotubuly), které tvoří v buňce funkční a dynamickou opěrnou síť, zajišťují tvar, pevnost i buněčný pohyb [3, 5].

Mitochondrie

Mitochondrie mají většinou sférický nebo válcovitý tvar o průměru 1–10 μm . Velikost i tvar mitochondrií je různý, jelikož se mohou rozdělovat ale i splývat. Jsou ohraničeny dvěma membránami – zevní a vnitřní membránou, ty se liší molekulární stavbou i původem. Zevní membrána je velmi permeabilní, vnější membrána je naopak velmi málo permeabilní. Nejčastěji se mitochondrie nacházejí poblíž jádra, nebo v oblasti buňky, která požaduje vysoký přísun energie. Mitochondrie jsou často přirovnávány k jakýmsi „buněčným elektrárnám“ protože přeměňují energii živin (cukrů a tuků) do podoby, která je buňkou využitelná – produkují ATP, která slouží jako univerzální zdroj energie. Mitochondrie obsahují vlastní mitochondriální DNA (mtDNA) a rozmnožují se nepohlavním dělením. Mitochondriální geny se však nedědí stejným způsobem jako geny jaderné, jelikož mitochondriální geny a DNA pocházejí pouze z vajíčka, a tedy se dědí jen po samičí linii. Mutace v mtDNA způsobují dědičná nebo i získaná metabolická onemocnění [1, 2, 3, 4].

Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum (ER) je různě tvarovaný a různě veliký souvislý prostor, který je ohraničený membránou. Jedná se o nepravidelný systém váčků, cisteren a kanálků. Části jsou pokryty ribozomy a jejich drsný vzhled vedl k tomu, že tyto části nazýváme drsné endoplazmatické retikulum, části ER bez ribozomů nazýváme hladké endoplazmatické retikulum. Drsné a hladké ER se tedy liší vzhledem ale i funkcí. Ribozomy na povrchu drsného ER slouží ke vkládání vyrobených bílkovin přímo do ER, které je zpracovává a poté jsou předány do Golgiho aparátu. Hladké ER má funkci v metabolických procesech, jako je např. syntéza lipidů, metabolismus sacharidů či odbourávání cizích a toxických látek [1, 4, 5].

Ribozomy

Ribozomy se buď vyskytují volně v cytoplazmě nebo pokrývají ER, nejsou mezi nimi žádné morfologické rozdíly. Ribozomy jsou tvořeny ribozomální RNA (rRNA) a ribozomálními proteiny. Mají zásadní roli v proteosyntéze, jelikož katalyzují translaci. Informační RNA (mRNA) obsahuje kód udávající pořadí jednotlivých aminokyselin v proteinech, které mají být nasyntetizovány. Ribozomy mají roli v dekodování a translaci této informace během proteosyntézy a na základě této informace

jsou na nich spojovány jednotlivé aminokyseliny (AMK) v polypeptidové řetězce [3, 4].

Golgiho aparát

Golgiho aparát se skládá ze 4 až 8 zploštělých kanálků, které jsou naskládány na sebe a na svých koncích jsou rozšířeny. Golgiho aparát se obecně nachází v blízkosti jádra a je přímo spojen s endoplazmatickým retikulem, ze kterého přijímá lipidy a bílkoviny a upravuje je do konečné podoby. Další funkcí je také třídění vzniklých proteinů a odesílání jich k jejich konečnému určení. Golgiho aparát je přítomen ve většině eukaryotických buňkách, ale významnější je v těch, kde se vylučuje mnoho látek [3, 4].

Lysozomy

Lysozomy jsou membránou ohraničené, nejčastěji sférické organely. Lysozomy obsahují hydrolytické enzymy, což jsou enzymy, které katalyzují rozklad, jehož činitelem je voda. Jsou ohraničeny poměrně tlustou membránou, která hydrolytické enzymy odděluje od ostatních buněčných komponent. Poškození této membrány a únik hydrolytických enzymů do cytoplazmy má za následek vážné poškození buňky. Funkcí lysozomů je rozklad sacharidů, proteinů, lipidů a nukleových kyselin [2, 3, 5].

Peroxisomy

Peroxisomy jsou sférické, membránou ohraničené malé struktury, které poskytují prostředí pro různé reakce. Dochází v nich např. k degradaci mastných kyselin i aminokyselin, podílejí se tedy na buněčném metabolismu a odstraňování toxických látek. Vedlejším produktem těchto reakcí je peroxid vodíku, což je velmi agresivní látka, která by mohla poškodit buněčné struktury. Z tohoto důvodu obsahují katalázu, která degraduje peroxid vodíku [2, 3].

Buněčné inkluze

Buněčné inkluze jsou neživé části buněk. Jedná se o produkty buněčného metabolismu a exogenní látky, které mohou mít zásobní funkci. Inkluze skladují látky tukové, bílkovinné či sacharidové povahy [2, 5].

1.2 Buněčné jádro

Tvar jádra závisí na tvaru buňky, nejčastěji je kulovité nebo oválné. Je největší strukturou v buňce o rozměrech přibližně 5 – 10 μm a obsahuje informace nezbytné pro život buňky. Jádro je od cytoplazmy odděleno jadernou membránou, v membráně jsou drobné póry, které umožňují komunikaci jádra a ER a předpokládá se, že látky vstupující do a vystupující z jádra procházejí právě těmito póry. Zpravidla má buňka jen jedno jádro, ale existují i vícejaderné buňky např. osteoklasty, které slouží k odbourávání kostní tkáně. Existují i buňky, které jádro nemají a to jsou např. červené krvinky. Hlavními komponenty jádra jsou chromatin a nukleoplazma, což je poměrně tekutá hmota, obsahující histony, DNA a RNA polymerázy, nukleotidy, proteiny a další [2, 4].

1.2.1 Jaderná membrána

Jádro je na povrchu ohraničeno dvojitou jadernou membránou. Na vnitřní membránu se přichytává chromatin pomocí jaderné laminy. Na vnější membránu se přichytávají ribozomy a hrubé ER. Jádro komunikuje s buněčnými organelami a mimobuněčným prostředím přes ER a Golgiho aparát. V membráně se nacházejí jaderné póry, které tvoří transmembránové kanálky a umožňují interakci mezi jádrem a cytoplazmou. Zajišťují například cirkulaci proteinů a RNA mezi jádrem, v němž probíhá syntéza RNA, a cytoplazmou, ve které probíhá syntéza proteinů, tedy transkripce a translace [2, 3].

1.2.2 Jadérko

Jedná se o dynamický útvar v jádře během interfáze, který není ohraničen membránou. Obsahuje relativně malé množství DNA, jedná se o organizátory jadérka, které nesou kopie genů pro rRNA. V buňce se nejprve vyskytuje několik prejadérek, které spolu splývají a v jádře je pak obvykle přítomno jedno jadérko, ale někdy i více podle metabolické aktivity buňky. Jadérka mají obvykle kulovitý tvar o průměru přibližně 1 – 3 μm a zajišťují hlavně syntézu ribozomální rRNA jsou také zapojena do reakcí buňky na infekci či stres [2, 3].

1.2.3 Chromatin

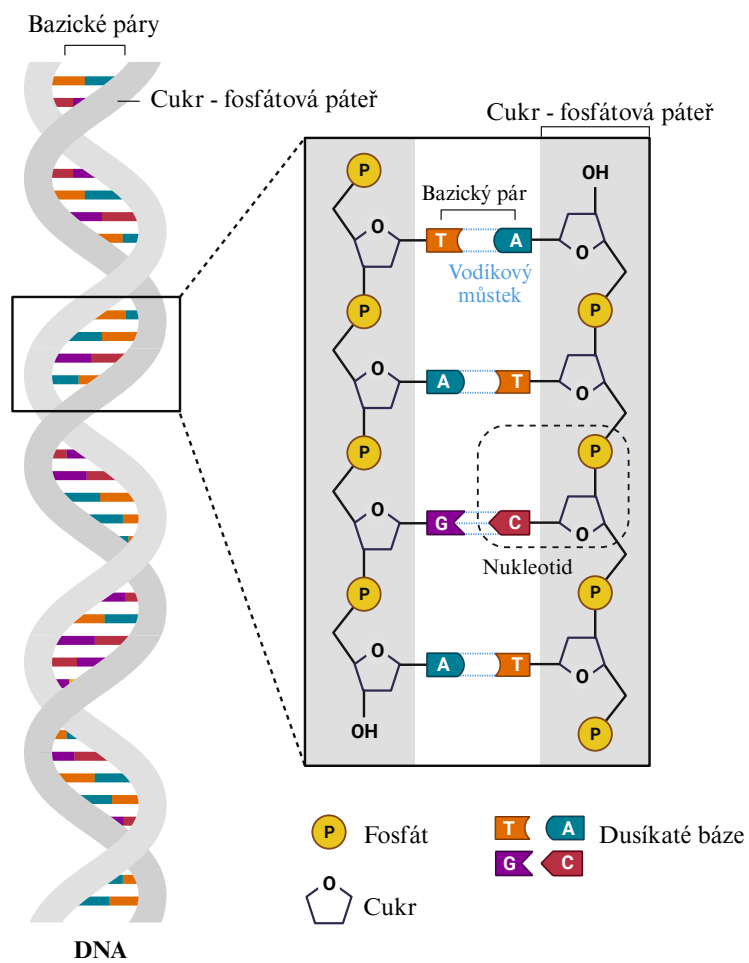
Chromatin je komplex DNA s histony a nehistonovými proteiny, který v mitóze vytváří chromozomy. Histony mají stavební a řídicí funkci, nehistonové proteiny mají řídicí funkci a ovládají vnitřní strukturu jádra. Podle stupně kondenzace (souvisí s buněčným cyklem) se dělí na euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je málo kondenzovaný a je transkripčně aktivní, tvoří asi 90 % chromatinu pro většinu buněk v interfázi. Nachází se v oblasti jaderných pórů a v centru jádra. Heterochromatin je vysoce kondenzovaný a transkripčně neaktivní, tvoří asi 10 % chromatinu pro buňky v interfázi. Chromatin se spiralizuje do podoby chromozomů, během mitózy, resp. meiózy, kdy je možno pozorovat typické struktury chromozomů, které jsou tvořeny dvěma chromatidami spojenými centromerou [2, 3, 4, 5].

1.3 DNA

Všechny živé organismy uchovávají svou dědičnou informaci v podobě dvouřetězcových molekul DNA. U eukaryot se nachází v jádře a u prokaryot v cytoplasmě. V DNA jsou zakódovány veškeré informace potřebné pro přežití a růst organismu [1]. Struktura DNA je vyobrazena na Obr. 1.2.

Molekula DNA se skládá ze dvou dlouhých polynukleotidových řetězců. Každý z těchto řetězců neboli vláken DNA je složen ze 4 typů nukleotidových podjednotek a oba řetězce jsou propojeny vodíkovými můstky. Nukleotidy jsou složeny z cukru, na který je navázána jedna nebo více fosfátových skupin a báze, která obsahuje dusík. U DNA je cukrem deoxyribóza, připojená k jedné fosfátové skupině, bázemi jsou deriváty purinu - Adenin (A), Guanin (G) a deriváty pyrimidinu - Cytosin (C) a Thymin (T). Spojením deoxyribózy a fosfátu se tvoří tzv. cukr-fosfátová páteř DNA, na kterou se pojí jednotlivé báze [1, 2].

Báze se nepárují náhodně, spolu se váží jen 2 specifické báze a to Adenin – Thymin, které jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky a Cytosin – Guanin, které jsou spojeny třemi vodíkovými můstky. Vždy se tedy páruje purin s pyrimidinem a každý purin-pyrimidinový pár se nazývá bázeový pár a toto komplementární párování bází umožňuje, aby byly bázeové páry uspořádány v energeticky nejvýhodnějším uspořádání uvnitř dvoušroubovice. V tomto uspořádání je každý pár bází podobně široký,



Obrázek 1.2: Struktura DNA (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

a drží tak cukr-fosfátové páteře ve stejné vzdálenosti podél molekuly DNA. Antiparalelní cukr-fosfátová vlákna se pak navzájem obtáčejí a tvoří dvoušroubovici obsahující 10 párů bází v každém závitě šroubovice. Důsledkem požadavků na párování bází dvoušroubovice je, že každé vlákno molekuly DNA obsahuje sekvenci nukleotidů, která je přesně komplementární k sekvenci nukleotidů svého partnerského vlákna, tato komplementarita má zásadní význam při kopírování i opravách DNA [1, 2].

Z chemického hlediska rozlišujeme 3' a 5' – konec DNA. 3'-konec je zakončen OH skupinou na uhlíku 3 deoxyribózy a 5'-konec je zakončen fosfátovým zbytkem na uhlíku 5 deoxyribózy (proto 3' a 5'). Dvoušroubovice DNA vzniká spojením antiparalelních řetězců vodíkovými můstky, tedy spojením 5 -> 3 a 3 -> 5 [2].

1.3.1 Chromozomy

Každá lidská buňka obsahuje asi 2 m DNA, ale buněčné jádro má průměr přibližně jen 5-10 μm . Dlouhé dvoušroubovice DNA musejí být při buněčném dělení zabaleny do struktur, které se nazývají chromozomy. Ty se snadno vejdu do jádra, a navíc mohou být snadno rozděleny do dvou dceřiných buněk během dělení mateřské buňky [1].

Genetická informace, která se skládá z více molekul DNA je rozdělena do více chromozomů. Každý chromozom je složen z jedné velmi dlouhé molekuly DNA spojené s proteiny, které umožňují tvorbu kompaktnější struktury DNA. Kromě proteinů, které tvoří kompaktnější strukturu DNA jsou chromozomy spojeny s dalšími proteiny, které se podílejí na expresi genů, opravách DNA a její replikaci [1, 2].

Nejdůležitější funkcí chromozomů je přenos genů. Geny jsou úseky DNA, které obsahují informace k tvorbě určitého proteinu. Chromozomy mnoha eukaryot včetně člověka obsahují kromě genů i DNA, která nenese důležitou informaci. Tato DNA je nazývána „junk DNA“, protože její užitečnost zatím nebyla objasněna [1].

Aby DNA mohla vytvořit funkční chromozom, musí nést gen, ale také musí být schopna replikace a replikované kopie musí umět spolehlivě rozdělit při každém buněčném dělení mezi dceřiné buňky. Tyto procesy popisuje buněčný cyklus [1].

V interfázi dochází k prodlužování chromozomů a specializované sekvence DNA zajišťují, aby byly tyto chromozomy účinně replikovány. Chromozomy obsahují mnoho replikačních počátků, které umožňují rychlou replikaci celého chromozomu,

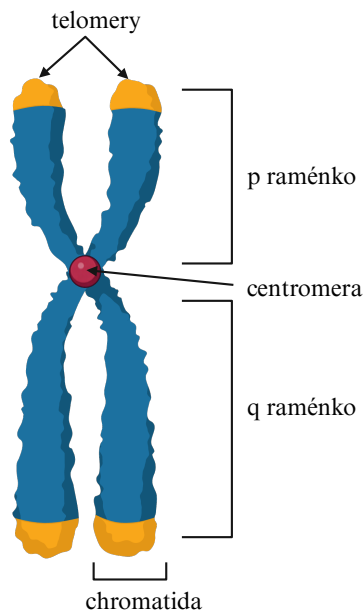
další sekvence DNA tvoří telomery [1, 2, 4].

V mitóze se DNA svinuje až vytvoří vysoce kompaktní mitotické chromozomy. V tomto vysoce kondenzovaném stavu je možné duplikované chromozomy snadno oddělit. Centromery umožňují rozdělení kopie každého chromozomu do každé dceřiné buňky [1, 2, 4].

Struktura chromozomů je dynamická. Chromozomy kondenzují a rozvolňují se v souladu s buněčným cyklem, ale různé oblasti interfázního chromozomu se musí rozbalit, aby buňkám umožnily přístup ke specifickým sekvencím DNA pro replikaci, opravu nebo expresi genů. Proteiny, které se na DNA vážou a tvoří chromozomy se dají rozdělit na histony a nehistonové proteiny. Histony zodpovídají za první úroveň kondenzace chromatinu. Histony společně s DNA tvoří nukleosomy, což jsou základní jednotky chromatinu. Nukleosomové vlákno je tlusté asi 10 nm a díky svému vzhledu je často nazýváno „korálky na niti“, tato struktura je charakteristická pro jádro v interfázi. Vlákno je dále spiralizováno do tvaru solenoidu, tento stupeň spiralizace je předpokládán pro transkripčně neaktivní geny. Další struktury se vytvářejí při formaci chromozomů během buněčného dělení, solenoidní vlákno se formuje do vyšších struktur; nejprve se formuje chromatinová struktura a jejím dalším skládáním vzniká chromatida (jedno ze dvou vláken DNA zreplikovaného chromozomu)[1, 2].

Stavba chromozomů

Každý chromozom je složen ze dvou chromatid, které jsou v místě primárního zúžení spojeny centromerou. Centromera rozděluje chromatidu na dvě raménka: krátké (p) a dlouhé (q), její funkcí je především zprostředkování rozchodu chromatid do dceřiných buněk. Podle umístění centromery rozdělujeme chromozomy na metacentrické (raménka p a q jsou přibližně stejně dlouhá), submetacentrické (raménka p a q jsou délkově odlišná) a akrocentrické (velikost ramének je ve velkém nepoměru). Na konci chromozomů se nacházejí telomery, jedná se o specifické sekvence DNA, které chrání konce chromozomů. Bez nich by volné konce chromatid byly rozpoznávány reparačními enzymy jako dvojně zlomy DNA. Konce lineární DNA nejsou nikdy zcela nareplikovány, což způsobuje postupné zkracování telomer. V pohlavních buňkách dochází k obnově délek telomer pomocí enzymu telomerázy, ale somatické buňky po určitém počtu dělení přecházejí do senescence či apoptózy (popsány v 3.7), aby se zabránilo negativním následkům absence telomer [1, 2].



Obrázek 1.3: Stavba chromozomu (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

1.4 Jaderné procesy

Při každém buněčném dělení musí buňka zkopírovat svůj genom, DNA je duplikována rychlostí přibližně 1000 nukleotidů za sekundu. Transkripce sekvence DNA na sekvenci RNA a následnou translaci dochází k syntéze proteinů [1].

1.4.1 Replikace DNA

Replikace je zdvojení buněčné DNA před rozdělením mateřské buňky na dceřiné a je iniciována v S fázi buněčného cyklu v předem určených místech. Při replikaci slouží každé ze dvou vláken DNA jako předloha pro tvorbu nového vlákna. Každá ze dvou dceřiných buněk, které vzniknou z buňky mateřské tak zdědí nové dvoušroubovice DNA, které obsahují jedno staré a jedno nové vlákno. Řetězce mateřské DNA se za pomoci enzymů v místě replikace rozvolní, tam se v DNA vytvoří oblast nespárovaných nukleotidů a do té se naváží replikační proteiny, čímž vzniknou dvě protisměrně orientované replikační vidlice. Oba oddělené řetězce fungují jako vzor pro syntézu nového řetězce. Zásadní úlohu při replikaci má DNA polymeráza, ta čte sekvenci nukleotidů na vzorovém řetězci a na základě komplementarity bazí přidává nukleotidy do nově vznikajícího řetězce. Na replikaci se podílí celá řada enzymů

a proteinů, např. helikáza, DNA primáza, ribonukleáza, ligáza a další. Replikace jaderné DNA je velice přesný proces, přesnost zajišťuje korekturní funkce DNA polymerázy a opravné mechanismy buňky, které vyměňují špatně zařazené nukleotidy za správné jak během samotné replikace, tak i po jejím dokončení[1, 2, 4].

1.4.2 Transkripce

Transkripce probíhá přepsáním určité části sekvence DNA do sekvence RNA. Transkripcí tvoří DNA kopie v podobě různých typů RNA molekul např. mRNA, rRNA a transferové RNA (tRNA). RNA se od DNA liší tím, že nukleotidy v RNA obsahují cukr ribózu místo deoxyribózy a obsahuje bázi Uracil (U) namísto Thyminu (T), Uracil se stejně jako Thymin páruje s Adeninem. Zatímco DNA se vyskytuje jako dvoušroubovice, RNA je vláknovitá. DNA se nejprve přepisuje do primárního transkriptu a jeho dalšími úpravami vzniká funkční RNA. Transkripce probíhá velmi podobně jako replikace, ale má některé odlišnosti. K replikaci dochází v S fázi, k transkripci hlavně v G1 a G2 fázi, některé geny jsou však přepisovány také v S fázi a buňka musí tyto procesy precizně regulovat. Případná kolize může vést například ke genové nestabilitě, která může být příčinou karcinogeneze. Dalším rozdílem je, že geny jsou během buněčného cyklu přepisovány opakovaně. Transkripce je iniciována vazbou transkripčních faktorů na regulační oblasti DNA a intenzita transkripce tedy odráží aktuální potřeby buňky. Základním enzymem transkripce je RNA polymeráza, ta na základě komplementarity bazí zajišťuje přepis DNA do RNA. Transkripce má větší chybovost než replikace, což ale buňku neohrožuje, jelikož chyby v transkriptech RNA nevedou k dědičnému ovlivnění genetické informace. Molekula RNA, která vznikla transkripcí (také označována jako primární transkript) obsahuje kódující a nekódující sekvence, exony a introny. Typický gen je pak v genomu zastoupen jako krátké bloky exonů a dlouhé bloky intronů. Sestřih RNA je důležitým krokem, který spojuje různé části kódující sekvence [1, 2, 4].

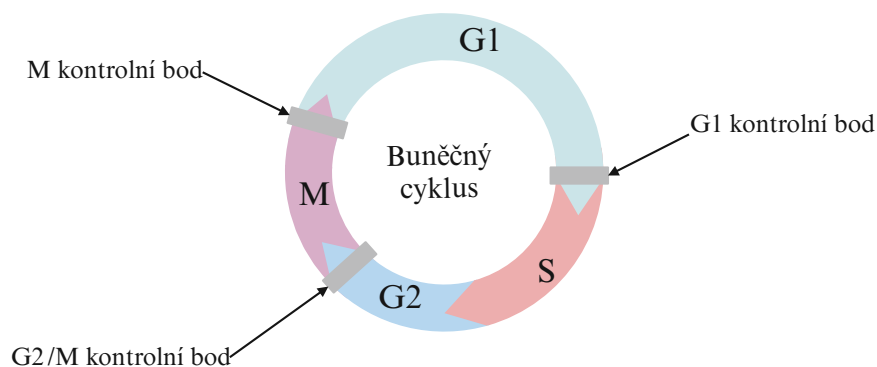
1.4.3 Translace

Proteosyntéza neboli translace je překlad sekvence mRNA do sekvence aminokyselin bílkovin. Proces translace probíhá na ribozomech, ale jelikož probíhá po transkripci, bude popsán v této kapitole. Potom co je vytvořena mRNA transkripcí je informace, která je obsažena v její nukleotidové sekvenci použita k syntéze proteinu. Z důvodu, že existují jen 4 různé nukleotidy v mRNA a 20 různých AMK

v proteinu, nelze přeložit nukleotidovou sekvenci RNA přímo na aminokyselinovou sekvenci v proteinu. Sekvence nukleotidů v genu se překládá do sekvence aminokyselin proteinu podle pravidel genetického kódu. Každé tři po sobě jdoucí nukleotidy v RNA jsou nazývány kodony a každý kodon určuje jednu AMK nebo signál k ukončení translace. Vzhledem k tomu, že genetický kód je redundantní, může několik kodonů kódovat jednu AMK, a některé tRNA mohou být schopné se vázat na více než jeden kodon. Translace mRNA na protein závisí na adaptérech, což jsou tRNA, které rozpoznávají kodony mRNA a vážou se na odpovídající aminokyseliny. Kroky vedoucí od DNA k syntéze mohou být regulovány. Buňka může například kontrolovat kdy a jak často je daný gen transkribován a jak je RNA transkript zpracován [1, 4].

1.5 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je komplexní proces, patřící k základním životním projevům buňky, je zapojený do růstu, proliferace buněk i regulace oprav DNA. Buněčný cyklus se skládá z interfáze a fáze dělení buňky (M fáze). Každá fáze má svůj specifický a nenahraditelný význam. Buněčný cyklus obsahuje řadu kontrolních bodů, které slouží k regulaci buněčného cyklu. Schéma buněčného cyklu s kontrolními body je zobrazeno na Obr. 1.4.



Obrázek 1.4: Buněčný cyklus a jeho kontrolní body (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

1.5.1 Interfáze

Jedná se o období mezi dvěma M fázemi a zaplňuje asi 90 % buněčného cyklu. Interfáze se skládá z G1 fáze, S fáze a G2 fáze.

- **G1 fáze** je také nazývána jako fáze přípravná. Během této fáze dochází ke zdvojování buněčné hmoty a syntetickým procesům – RNA a proteiny. Buňka se zvětšuje a tvoří se zásoba nukleotidů a syntetizují se enzymy pro replikaci jaderné DNA [2, 5].
- Na G1 fázi navazuje **S fáze**, která se také nazývá fáze syntetická. V této fázi dochází k replikaci jaderné DNA (popsána v kapitole 1.4.1) a k tvorbě histonů v cytoplasmě [2].
- **G2 fáze** je nazývána 2. přípravná fáze. Tato fáze je závislá na dokončení replikace DNA v S fázi. Jedná se o přípravu na mitózu, dochází v ní k syntéze a aktivaci proteinů, potřebných ke kondenzaci chromozomů, tvorbě mitotického aparátu a k destrukci jaderného obalu [2, 5].
- **G0 fáze** je období, během kterého buňka aktivně syntetizuje bílkoviny, diferencuje se a specializuje se (funkčně dozrává), vykonává svou činnost a nedělí se. Některé buňky zůstávají po celý svůj život v G0 fázi (např. neurony, buňky srdeční svaloviny a další) [2, 5].

1.5.2 M fáze

M fáze je poslední fází buněčného cyklu ve které dochází k samotnému buněčnému dělení. Somatické buňky se dělí mitózou, pohlavní dělení je nazýváno meióza.

Mitóza

Během mitózy se dělí buněčné jádro a následně cytoplazma za vzniku dvou dceřiných buněk s identickou genetickou výbavou. Zajišťuje diferenciaci, růst buněk a jejich obnovu. Dělí se na profázi, prometafázi, metafázi, anafázi a telofázi.

- **Profáze**

V profázi dochází ke kondenzaci a zkracování chromozomů, které jsou mikroskopicky viditelné a chromatidy jsou stále spojeny v centroměře. Rozpadá

se jadérko, centrozomy se posouvají k protilehlým pólům buňky a začíná se tvořit dělicí vřetenko, které se zatím nachází mimo jádro [2, 3, 5].

- **Prometafáze**

Během prometafáze pokračuje kondenzace chromozomů, které se rozptylují po celé buňce. Dochází k rozpadu obalu jádra a některé mikrotubuly dělicího vřetenka se upínají do oblastí centromer [2, 3, 5].

- **Metafáze**

V metafázi jsou kondenzované chromozomy uspořádány do ekvatoriální roviny. Sesterské chromatidy jsou odděleny a zůstávají ve spojení pouze v místě centromery [2, 3].

- **Anafáze**

Během anafáze se od sebe zdvojené chromozomy oddělují a posouvají se k protilehlým pólům buňky, každý dceřiný chromozom je v tuto chvíli složen z jedné chromatidy s centromerou. Pohyb chromozomů způsobuje prodlužování a zkracování mikrotubulů dělicího vřetenka. Na konci anafáze začíná cytokineze a buňka se začíná uprostřed zaškrcovat [2, 5].

- **Telofáze**

V telofázi již chromozomy doputovaly na opačné póly buňky do blízkosti centrozomů (dělicího vřetenka), obnovují se obaly jádra a vytvářejí se nová jádra, chromozomy se prodlužují a dekondují a nejsou tedy pod mikroskopem viditelné. Na konci telofáze se dokončí rozdělení na dvě dceřiné buňky [2, 5].

Meióza

Jedná se o redukční dělení, které spojuje dvě na sebe navazující mitózy. Meióza probíhá při vzniku a dozrávání pohlavních buněk (gamet), tedy během spermiogeneze a oogeneze. Dceřiné buňky získávají poloviční sadu chromozomů, tedy polovinu genomu[5].

1.5.3 Kontrolní body buněčného cyklu

Každá fáze buněčného cyklu má kontrolní bod, v němž dochází ke kontrole všech kroků, které jsou pro danou fázi potřebné. Pokud není poškození zjištěno, přejde

se do další fáze, pokud dojde ke zjištění chyby, buňka se ji snaží opravit a zastaví buněčný cyklus nebo nastane apoptóza. [5]

- První kontrolní bod se nachází v G1 fázi. **G1 kontrolní bod** umožňuje buňce potvrdit, zda je prostředí příznivé pro proliferaci buňky před tím, než přejde do S fáze, ve které dochází k replikaci. Dochází tedy ke kontrole velikosti buňky, dostatku živin, přítomnosti růstových faktorů a absence defektů DNA [1, 6].
- **G2/M kontrolní bod** kontroluje DNA po replikaci, je ověřováno, zda během replikace nevznikly v DNA chyby a zda proběhla kompletně. Pokud není nalezena chyba, buňka spustí mitózu či meiózu. Pokud chyba nalezena je, musí být DNA opravena [1, 6].
- Poslední je **M kontrolní bod**, který funguje během mitózy a zajišťuje, aby byly replikované chromozomy správně připojeny k dělicímu vřeténku, než vřeténko chromozomy od sebe odtrhne a rozdělí je do dceřiných buněk [1, 6].

U mnohobuněčných živočichů je kontrolní systém velmi citlivý na signály z jiných buněk, které stimulují buněčné dělení. Kontrolní systém proto hraje zásadní roli v regulaci počtu buněk v tělesných tkáních, pokud systém nefunguje správně a umožňuje například nadměrné dělení buněk, může být důsledkem vznik rakoviny. Poškození kontrolního bodu, který detekuje poškození DNA, zřejmě hraje roli při progresi nádorů.[1, 6]

2. Ionizující záření

Ionizující záření (IZ) je takové záření, jehož kvanta mají tak vysokou energii, že jsou schopna ionizovat látku. Ionizující záření se dělí na přímo a nepřímo ionizující [7].

- **Přímo ionizující záření**

Kvanta přímo ionizujícího záření nesou elektrický náboj a jsou schopna přímo interagovat s elektrony atomových obalů. Mezi přímo ionizující záření řadíme například záření alfa, beta a protonové záření [7].

- **Nepřímo ionizující záření**

Kvanta nepřímo ionizujícího záření nejsou elektricky nabitá, energii předávají v látce nejprve nabitým částicím a ty látku přímým účinkem ionizují. Mezi nepřímo ionizující záření řadíme fotonové záření a neutrony [7].

2.1 Přímo ionizující záření

V této kapitole budou nejprve popsány společné rysy přímo ionizujícího záření a následně budou popsány specifické interakce pro jednotlivé typy záření.

Nabité částice jsou obklopeny elektrickým polem, které interaguje s orbitálními elektrony a jádry všech atomů při průchodu prostředím. Přenos energie nabité částice je obecně malý a nabité částice tedy podstupují velké množství interakcí, než je jejich kinetická energie spotřebována [8].

Ionizace a excitace

Pokud energie částice nebo fotonu překročí ionizační potenciál molekuly, může dojít při srážce s molekulou k uvolnění jednoho či více elektronů z atomových obalů

a tím může způsobit ionizaci atomu [4, 7].

Interakce, při kterých dochází k přenosu energie, ale nedochází k uvolnění elektronu, tvoří excitovaný atom nebo molekulu a nazývá se excitace. Při excitaci se elektron v atomu nebo molekule přesune na vyšší energetickou úroveň, tento excitovaný stav není stálý. Elektron se při deexcitaci vrací zpět na původní hladinu a rozdíl energií je vyzářen ve formě fotonu [4, 7].

Rozptyl

Při interakcích částic s atomy a jejich atomovými jádry dochází ke změně směru pohybu částic vlivem elektrických a jaderných sil. Rozptyl se uplatňuje především pro lehké částice a nižší kinetické energie. Podle energetické bilance dělíme rozptyl na dva druhy, pružný a nepružný [7].

Pružný rozptyl

Jestliže při rozptylu nedochází k přeměně kinetické energie částice na jiný druh energie, jedná se právě o pružný rozptyl. Nastává při nižších energiích, pod prahem procesů jako např. excitace, ionizace a dalších. Při pružném rozptylu je splněn zákon zachování energie i hybnosti interagující částice a atomu či jádra, se kterým částice interaguje. Obecně po interakci částice pokračuje v odlišném směru s nižší energií i hybností než před interakcí [7, 8].

Nepružný rozptyl

Jestliže při rozptylu dochází k přeměnám kinetické energie interagující částice na jiné druhy energie při jiných procesech než při mechanickém pohybu jako např. k excitaci či emisi kvant záření, jedná se o nepružný rozptyl. Tento druh rozptylu nastává při energiích interagující částice vyšších, než je excitační či ionizační energie atomů a atomových jader a doprovází ho excitace či ionizace atomů nebo excitace jádra. Při vysokých energiích v oblasti desítek až stovek MeV může být doprovázen jadernými reakcemi [7, 8].

Dále může docházet i k mnohonásobnému rozptylu, jestliže nabitá částice procházejí prostředím, které obsahuje velké množství atomů, jednotlivé rozptyly mohou být jak pružné, tak i nepružné [7].

Záření β

Interakce elektronů probíhají nejčastěji s elektrony v atomových obalech, čímž je způsobena ionizace a excitace vázaných elektronů. Primární elektrony tedy předávají část své energie elektronům sekundárním, které byly původně pevně vázány elektronových obalech atomů prostředí. Tyto interakce nazýváme kolizní. Elektrony mohou svou energii ztrácet i radiačně tvorbou brzdného záření [7].

Pozitrony interagují stejnými procesy jako elektrony. Po zabrzdění pozitronu však dochází k anihilaci elektronu a pozitronu, při níž se elektron a pozitron přemění na 2 fotony o energiích 511 keV, které z místa anihilace vylétají v protilehlých směrech. Anihilace elektronu a pozitronu je využívána při zobrazování v nukleární medicíně metodou pozitronové emisní tomografie (PET) [7].

Záření α

Alfa částice jsou jádra atomů helia a jsou přirozeně uvolňovány při přeměně radionuklidů jako je uran či radium. Alfa částice mají z běžných kvant záření největší hmotnost a také největší elektrický náboj. Při průchodu prostředím působí alfa částice značnou elektrickou silou na elektrony z atomových obalů a účinně je uvolňuje, čímž působí ionizaci. Vlivem silných ionizačních účinků se částice alfa v prostředí rychle brzdí a její dosah je velmi krátký. Pokud mají částice alfa energii řádu několika MeV, mohou při průchodu prostředím překonávat odpudivé elektrické síly atomových jader a vstupovat do jaderných reakcí [7].

Protonové záření

Protony interagují především s elektronovými obaly atomů a tím atomy ionizují, v menší míře pak interagují s atomovými jádry, pak dochází nejčastěji k pružnému rozptylu nebo jaderným reakcím, při nichž vznikají sekundární nabitě částice či fotony [7].

Těžké nabitě ionty

Těžké ionty vyvolávají analogické účinky jako záření alfa ale kvůli většímu náboji způsobují větší hustotu ionizace [7].

2.2 Nepřímá ionizující záření

Neutronové záření

Neutrony jsou v jádrech společně s protony vázány silnými interakcemi, mohou být však uvolňovány jadernými reakcemi. Neutrony při průchodu prostředním interagují téměř výhradně s atomovými jádry, a to čtyřmi způsoby: pružným, nepružným rozptylem či jadernou reakcí.

Pružný rozptyl na jádrech je nejčastější interakcí rychlých neutronů při průchodu prostředím. Neutron předá atomovému jádru část své kinetické energie a pokračuje v pohybu se sníženou energií a změněným směrem. Atomové jádro předanou energii ztrácí ionizací a excitací okolních atomů [7, 8].

Při **nepružném rozptylu** předává neutron část své energie atomovému jádru a toto jádro excituje. Při deexcitaci jádra do původního stavu je vyzářen foton záření gama, který dále interaguje s prostředím (popsáno v 2.2) [7].

Při **jaderné reakci** je po proniknutí neutronu do jádra emitována jiná částice, která následně prostředí ionizuje. Při radiačním záchytu je neutron v jádře pevně zachycen, jedná se tedy také o jadernou reakci. Po zachycení neutronu je emitováno kvantum záření gama. Takto vzniklá jádra jsou často β^- aktivní a přeměňují se za emise dalšího ionizujícího záření [7, 8].

Fotonové záření

Fotonové záření můžeme rozdělit na záření gama a rentgenové záření, obě mají stejnou fyzikální povahu, ale liší se způsobem vzniku. Foton záření gama vzniká v atomovém jádře a foton rentgenového záření vzniká v jaderném obalu. Proces absorpce energie fotonového záření závisí na energii fotonů a na složení materiálu, který je absorbuje. Fotony s látkou interagují třemi hlavními procesy: fotoelektrickým jevem, Comptonovým rozptylem a tvorbou párů [4, 7].

Fotoelektrický jev

Při fotoelektrickém jevu neboli fotoefektu interaguje foton s vázaným elektronem na K, L nebo M slupce elektronového obalu a předává mu veškerou svou energii. Část této předané energie je spotřebována na překonání vazbové energie elektronu a jeho uvolnění z elektronového obalu atomu. Zbytek energie si odnáší elektron ve formě

kinetické energie:

$$T_{e^-} = E_\gamma - E_\nu, \quad (2.1)$$

kde T_{e^-} je kinetická energie elektronu, E_γ je energie fotonu a E_ν je vazbová energie elektronu. Po uvolnění elektronu vzniká v atomovém obalu prázdné místo, které je následně zaplněno elektronem z vyšší slupky atomového obalu. Energetický rozdíl vazbové energie vyšší a nižší slupky je uvolněn ve formě fotonu charakteristického záření. Alternativou emise charakteristického záření je předání energie některému elektronu na vyšší slupce, který je následně uvolněn jako tzv. Augerův elektron. Pravděpodobnost fotoefektu je přímo úměrná 5. mocnině protonového čísla Z a je nepřímo úměrná 3. mocnině energie interagujícího fotonu. Fotoefekt obecně převládá v oblastech nižších energií – jednotek až desítek keV [4, 7, 8].

Comptonův rozptyl

Jestliže foton interaguje s volným nebo slabě vázaným elektronem, předá mu jen část své energie a pružně se odrazí a ve svém pohybu pokračuje s nižší energií a ve změněném směru. Pro energii rozptýleného fotonu platí:

$$E_{\gamma'} = \frac{E_\gamma}{1 + \frac{E_\gamma}{m_{e0}c^2}(1 - \cos \theta)}, \quad (2.2)$$

kde $E_{\gamma'}$ je energie rozptýleného fotonu, E_γ je energie interagujícího fotonu, $m_{e0}c^2$ je klidová energie elektronu a θ je úhel rozptylu fotonu od původního směru. Z čehož vyplývá, že s rostoucím úhlem rozptylu klesá energie rozptýleného fotonu. Vázaný elektron se touto interakcí z atomového obalu uvolní s kinetickou energií $T_{e^-} = E_\gamma - E_{\gamma'}$ a následně bude prostředí ionizovat. Elektron i foton mohou po Comptonově rozptylu podstoupit další interakce, dokud není primární energie spotřebována. Comptonův rozptyl je dominantní interakcí v oblastech jednotek MeV a v oblastech desítek MeV se stává zanedbatelným ve srovnání s tvorbou elektron – pozitronových párů. Pravděpodobnost Comptonova rozptylu je úměrná protonovému číslu Z [4, 7, 8].

Tvorba elektron-pozitronových párů

Pokud mají fotony energii větší než 1,022 MeV, může docházet ke tvorbě elektron - pozitronových párů. Energie fotonu je tedy spotřebována na vytvoření páru elektron-pozitron a zbytek jeho energie je pak předána vzniklým částicím ve formě kinetické energie. Osud pozitronu je potom stejný jako je popsáno v kapitole 2.1. Prav-

děpodobnost tvorby párů je přímo úměrná 2. mocnině protonového čísla Z atomů prostředí. Tento proces je dominantní interakcí v oblastech vysokých energií fotonového záření a u látek s vysokým protonovým číslem Z [4, 7, 8].

3. Vliv ionizujícího záření na buňky

Biologické účinky ozáření jsou výsledkem událostí, které jsou způsobené průchodem IZ látkou. Nejprve dochází k ionizaci a excitaci atomů a molekul podél dráhy ionizujících částic. Tyto fyzikální reakce vedou k fyzikálně-chemickým, chemickým reakcím a následně k biologickému účinku [4].

3.1 Přímý a nepřímý účinek IZ

Při vystavení buněk IZ se nejprve vyskytují standardní fyzikální účinky mezi IZ a atomy či molekulami buněk a biologické poškození následuje později. Biologické účinky vycházejí především z poškození DNA, což je nejkritičtější cíl buňky. Poškození biologických systémů může probíhat dvěma způsoby: přímým či nepřímým účinkem [9].

Přímý účinek

Mluvíme-li o přímém účinku, pak IZ interaguje přímo s cílem v buňce. Cílové atomy mohou být ionizovány nebo excitovány vlivem Coulombických interakcí, které vedou k řetězci fyzikálních a chemických reakcí, jejichž výsledkem je biologické poškození [9].

Nepřímý účinek

Při nepřímém účinku interaguje IZ s jinými molekulami a atomy, zejména s vodou, a produkuje volné radikály, které mohou poškodit cíl uvnitř buňky. Při interakci s vodou jsou produkovány extrémně reaktivní radikály, jako ion vody či hydroxylový radikál. Tyto volné radikály následně narušují chemické vazby a působí chemické změny, které vedou k biologickému poškození [9].

Vliv přímého a nepřímého účinku na poškození biomolekul se liší podle typu IZ. IZ s nízkým lineárním přenosem energie (LET) jako např. γ nebo rentgenového záření poškozuje biomolekuly především prostřednictvím nepřímého účinku, naopak IZ s vysokým LET jako např. těžké ionty účinkují z velké části přímým účinkem. Přibližně dvě třetiny poškození odpovídají nepřímému účinku a třetina přímému účinku [2, 9].

3.1.1 Radiolýza vody

Radiolýza vody je proces, při kterém jsou molekuly vody rozštěpeny ionizujícím zářením, jako je gama záření, rentgenové záření či vysokoenergetické částice. Molekuly vody absorbují energii ionizujícího záření. Tato energie je dostatečně vysoká na to, aby překonala vazebnou energii molekuly vody, což vede k jejímu rozštěpení. Rozštěpením molekuly vody vznikají primární produkty, hydroxylový radikál, atom vodíku a sekundární elektron. Tyto primární produkty jsou vysoce reaktivní a mohou dále reagovat s dalšími molekulami vody nebo s jinými látkami v roztoku. Výsledkem jsou sekundární reakční produkty jako např. peroxid vodíku. Z hlediska radiobiologie je za nejdůležitější produkt radiolýzy vody považován hydroxylový radikál. Důvodem je jeho vysoká reaktivita a schopnost způsobovat rozsáhlé poškození biologickým makromolekulám jako je DNA, lipidy a proteiny. Tyto poškození mohou mít za následek buněčnou smrt, karcinogenezi nebo genetické mutace [10].

3.2 Stádia účinku IZ na organismus

Proces účinku IZ na živou tkáň probíhá ve čtyřech hlavních stádiích, které se liší jak svou rychlostí, tak i typy probíhajících procesů [7].

Fyzikální fáze

Fyzikální fáze je tvořena interakcemi mezi nabitými částicemi a atomy prostředí, kterými nabitá částice prochází. IZ interaguje především s elektrony, čímž způsobuje ionizace a excitace. Jestliže mají sekundární elektrony dostatečnou energii, mohou excitovat nebo ionizovat jiné atomy v jejich blízkosti a vyvolat tak kaskádu ionizací a excitací. Tento proces trvá přibližně $10^{-16} - 10^{-14}$ sekund [2, 7, 11].

Fyzikálně-chemická fáze

Ionizace a excitace vedou k narušení chemických vazeb, dochází k interakcím iontů s molekulami, jimiž dochází k disociaci molekul a tvorbě volných radikálů (např. radiolýzou vody). Tato fáze trvá přibližně $10^{-14} - 10^{-10}$ sekund [7].

Chemická fáze

Vzniklé produkty reagují s organickými molekulami jako je např. DNA, RNA, proteiny a další a mění jejich funkci a složení. Dochází k zlomům v DNA, poškození bazí, cross-linkům uvnitř DNA a dalším chemickým změnám. Tato fáze trvá až jednotky sekund [7].

Biologická fáze

V biologické fázi jsou zahrnuty všechny pozdější procesy. Dochází k opravám poškození DNA, většina těchto poškození je opravena, ale ta, co se opravit nepodaří vedou nakonec k buněčné smrti či k mutacím. Časová délka této fáze trvá přibližně několik dní na buněčné úrovni, dny v tkáních a orgánech a na úrovni celého organismu až roky. Při vysokých absorbovaných dávkách se může biologická fáze projevit již po desítkách minut, při středních během několika dní a při nízkých až po několika či desítkách let [7, 11].

3.3 Radiační poškození biomolekul

IZ napadá všechny typy biomolekul, nejzásadnější pro buňku je poškození DNA, RNA, funkce proteinů a lipidů.

Poškození proteinů

Poškození proteinů může být pro buňku fatální, jelikož proteiny zajišťují fungování buněčných činností. Proteiny jsou narušovány zářením samotným, tak i hydroxilovým radikálem pocházejícím z radiolýzy vody. Hydroxylový radikál má schopnost reagovat s peptidovým řetězcem proteinů, vázat se na aromatické zbytky aminokyseliny a může odlomit vodíkovou vazbu v řetězci. Reakce s radikálem může také aktivovat samotné proteiny a změnit je na proteinové radikály, které mohou poškodit další

proteiny a biomolekuly a tvořit nové produkty s odlišnými vlastnostmi. Poškození proteinů vlivem IZ může mít dopad nejen na buněčné procesy, ale také na další typy biomolekul, zejména DNA. Nebezpečné jsou zejména proteinové adukty na DNA, které blokují replikaci, transkripci a reparační procesy [2].

Poškození lipidů

Lipidy jsou základními stavebními jednotkami buněčných membrán. Tyto lipidy vymezují hranice buňky a chrání ji před proniknutím nežádoucích látek. Lipidy spolu s membránovými proteiny také regulují transport iontů a dalších látek přes membránu a zajišťují komunikaci buňky s okolním prostředím a tkáněmi. Stejně jako ostatní biomolekuly jsou i lipidy citlivé na poškození, především v důsledku hydroxylového radikálu. Tento radikál odštěpuje elektrony z mastných kyselin, což vede k vzniku nestabilních radikálů lipidů a ty následně s kyslíkem vytvářejí peroxylové radikály. Pokud dojde k reakci těchto radikálů s dalšími mastnými kyselinami, může se rozpoutat řetězová reakce, při které se další lipidy mění v lipidové peroxidy nebo cyklické peroxidy mastných kyselin. Tento proces může narušit strukturu membrány a snížit mobilitu membránových proteinů, což v konečném důsledku vede ke snížení selektivní permeability membrány a může vést k úniku vnitrobuněčného obsahu do prostředí. Pokud dojde k narušení homeostázy, může to mít fatální důsledky pro buňku. V některých případech dokáže buňka poškození opravit, ale v případě vysoké absorbované dávky záření může dojít ke kolapsu buněčné homeostázy a okamžité smrti buňky [2].

Poškození RNA

RNA molekuly plní v buňce důležité signální a regulační funkce. Jejich hlavní funkcí je umožnit překlad genetické informace uložené v DNA do podoby proteinů a některé RNA molekuly regulují expresi genů. RNA má podobnou molekulární strukturu jako DNA, ale je pouze jedno vláknová, což zvyšuje její náchylnost k poškození. Oxidativní poškození a zlomy RNA mohou být spojovány s poruchami syntézy proteinů a některými neurodegenerativními onemocněními [2].

Poškození DNA

DNA má zcela zásadní postavení, jelikož je nositelkou genetické informace a určuje chování buňky. DNA je velice citlivá i na nízké dávky IZ, protože k narušení funkce genu, či regulačního úseku DNA stačí i změna jedné báze v její sekvenci. Změny genetické informace mohou vést k expresi proteinů se změnou jejich funkce či k úplné ztrátě jejich funkce. Výhodou DNA je, že má řadu opravných mechanismů, které jsou schopné většinu poškození správně a včas opravit. Vzniklá poškození vyvolávají mutace genové, chromozomální i genomové. Vybraná poškození jsou vyobrazena na Obr.3.1 [2, 11].

Poškození baze

Jak již bylo popsáno v kapitole 1.2, molekula DNA se skládá z purinových (A, G) a pyrimidinových (T, C) bází. Dojde-li k chemické změně baze, může být ovlivněna tvorba vodíkových můstků mezi jednotlivými bazemi a případně i samotná struktura DNA. Tyto změny vedou k chybnému párování nukleotidů při replikaci [2].

Abazická místa

Abazická místa vznikají přerušením vazby mezi cukrfosfátovým řetězcem a bází. Tato poškození mohou vést k zařazení špatných nukleotidů do DNA nebo mohou vést ke vzniku komplexnějších poškození jako jsou např. křížové vazby nebo dvojně zlomy DNA [2].

Křížové vazby (Cross-linky)

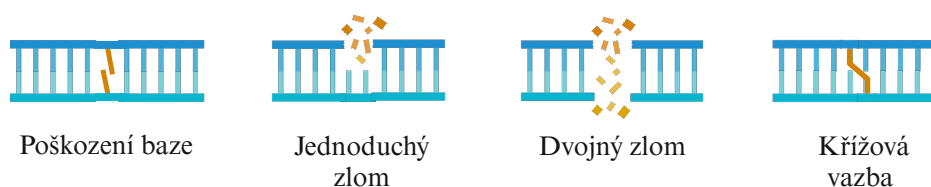
Absorpcí energie IZ se v poškozené DNA vytvářejí reaktivní místa. Tato místa spolu mohou interagovat a tvořit propojení mezi bazemi jak v rámci jednoho řetězce, tak i mezi komplementárními řetězci. Cross-linky mezi komplementárními řetězci pak zabraňují oddělení řetězců při replikaci či transkripci a tím tyto procesy blokují [2].

Jednoduché a dvojně zlomy

Přerušením páteře DNA dochází ke tvorbě jednoduchých (Single Strand Break, SSB) a dvojných (Double Strand Break, DSB) zlomů. Dvojně zlomy vznikají,

pokud přeruší částice IZ oba dva komplementární řetězce zároveň nebo pokud radikály vytvoří dva a více jednoduchých zlomů v těsné blízkosti. Jelikož reparační procesy mají určitou dobu trvání, tak při vyšším dávkovém příkonu IZ se zvyšuje pravděpodobnost, že zlom druhého vlákna DNA proběhne dříve, než je první vlákno opraveno. Dvojný zlom je nejzávažnějším poškozením, jelikož vedou k rozdělení molekuly DNA a jsou nejhůře opravitelné [2, 7, 11].

Je odhadováno, že 1 Gy fotonového záření v buňce způsobí přibližně 1000 - 2000 poškozených bazí, 500 - 1000 jednoduchých zlomů a 25 - 50 dvojných zlomů [2].

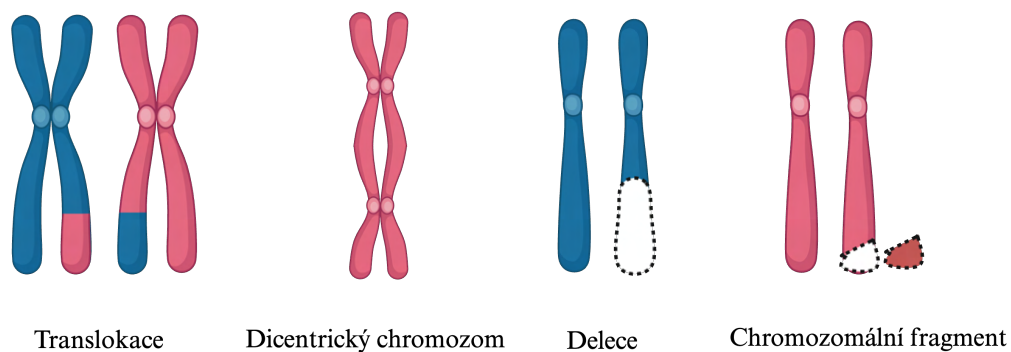


Obrázek 3.1: Poškození DNA (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

3.4 Poškození na subcelulární úrovni

3.4.1 Poškození chromozomů

Poškození chromozomů je jedním z nejvíce očividných účinků IZ. Ozáření způsobuje zpoždění vstupu buňky do mitózy, kvůli aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu. Pokud jsou buňky ozářeny ve fázi G1, pak po první mitóze produkují abnormální chromozomy, které vznikají kvůli poškození v G1 fázi. Pokud se takový chromozom v S fázi replikuje, replikuje se i poškození, které ovlivňuje obě sesterské chromatidy. Pokud jsou buňky ozářeny během S nebo G2 fáze (tedy po replikaci DNA), jsou potom abnormality jen v jedné chromatidě. Některé z těchto aberací vedou k buněčné smrti, některé mohou být přenášeny několik buněčných dělení. Poškození chromozomů jsou vyobrazeny na Obr.3.2 a 3.3 [2, 4, 12].



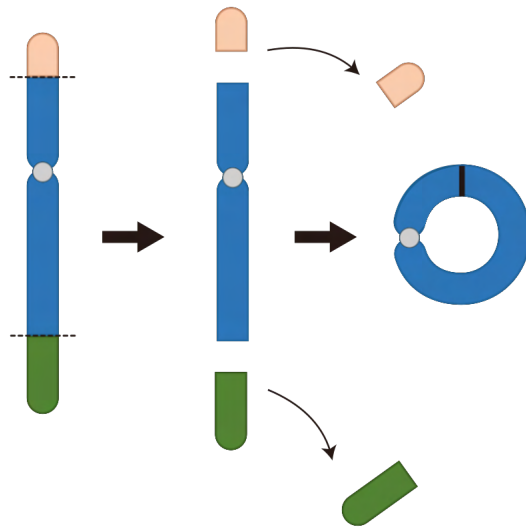
Obrázek 3.2: Chromozomální aberace (vytvořeno pomocí www.biorender.com)

Dicentrické chromozomy

Dicentrické chromozomy vznikají spojením dvou chromozomů potom, co konce ramének chromozomů přestávají být chráněna telomery a jejich spojením vzniká chromozom se dvěma centromerami [2].

Kruhové chromozomy

Kruhové neboli ring chromozomy vznikají cirkulací chromozomu a spojením krátkého a dlouhého raménka potom, co byly odlomeny terminální konce nebo byly poškozeny telomery. Přítomnost tohoto typu chromozomální aberace vede ke ztrátě genetické informace a dále způsobuje problémy během mitózy, což může vést až ke smrti buňky [2, 4].



Obrázek 3.3: Kruhový chromozom [13]

Translokace

Translokace jsou nejčastějšími chromozomálními aberacemi vyvolanými vlivem IZ. Vznikají v místech dvojných zlomů spojením nesprávných konců DNA při opravách. Translokace mohou být rozděleny na prosté a reciproké. Při prosté translokaci se fragment chromozomu přesune na jiný nehomologický chromozom. Při reciproké translokaci dochází k záměně fragmentů mezi dvěma chromozomy [2, 4].

Delece

Delece jsou označovány aberace, při kterých dochází k odpojení části chromozomu, a tedy ke ztrátě části genetického materiálu. Delece mohou vznikat vlivem samotného ozáření, ale i vlivem oprav dvojných zlomů DNA [2].

Chromozomální fragmenty

Může také docházet k oddělení krátkých fragmentů chromatinu od chromozomu. Tyto fragmenty jsou poté z jádra odstraňovány, jelikož nemají centromeru, tak nemohou být během buněčného dělení napojeny na dělicí vřeténko [2].

3.4.2 Poškození buněčných organel

Poškození buněčného jádra má největší význam, ale ani ostatní organely nejsou vůči IZ imunní. Například mitochondrie, které mají svou vlastní mtDNA vykazují k IZ ještě vyšší citlivost než buněčné jádro. Pro opravy mtDNA funguje méně reparačních mechanismů a mtDNA mutuje přibližně 10x rychleji než jaderná DNA. Po ozáření vyššími dávkami dochází i k poškození proteinů a lipidů mitochondriálních membrán, čímž selhávají jejich funkce, dochází také ke snížení produkce ATP. Důsledky radiačního poškození dalších organel zatím nebyly hlouběji prostudovány. Obecně se ale narušení funkcí membrán buněčných organel projevuje v poškození buněčného metabolismu. Významné je také poškození cytoplazmatické membrány, jelikož při jejím narušení dochází ke ztrátě kontroly nad příjmem látek a může dojít k úniku obsahu buňky do jejího okolí [2].

3.5 Odezva na poškození DNA

Mechanismy odezvy na poškození DNA (DNA Damage Response, DDR) jsou zakódovány v proteinech, které reagují na poškození použitím senzorů signálu a efektorů. Tyto mechanismy pomáhají genomu poškození průběžně korigovat či tolerovat. DDR mechanismy zahrnují opravné mechanismy, procesy tolerance poškození a kontrolní body buněčného cyklu. Sensory se skládají ze skupiny proteinů, které zkoumají genom a kontrolují přítomnost poškození a následně signalizují poškození třem efektorovým drahám. Efektorové dráhy zahrnují dráhy programované buněčné smrti, dráhy oprav DNA a dráhy, které dočasně či trvale zastavují buněčný cyklus. Mutace nebo jiné poškození genů zodpovědných za regulaci buněčného dělení nebo tumor supresorových genů ¹ může vést k genomické nestabilitě ² a karcinogenezi. Karcinogeneze, je pravděpodobnější v tkáních, které se aktivně dělí. Buňky s vysokou rychlostí proliferace jsou citlivější na poškození DNA a vznik tumorů. Genomická nestabilita zodpovídá za progresi tumorů a modifikaci zdravých buněk na rakovinné buňky [2, 16].

¹Tumor-supresorový gen je gen, který reguluje procesy během buněčného dělení. Jeli v něm přítomna mutace, tak je jeho funkce omezena či ztracena a v kombinaci s dalšími faktory může docházet k nekontrolovatelnému dělení buněk, což vede ke vzniku zhoubných nádorů [14].

²Genomická nestabilita je větší tendence genomu k výskytu mutací, jedná se o stav, při kterém jsou reparační procesy a replikace nefunkční [15].

3.6 Reparační procesy

Pro přežití buňky musí být zachována integrita DNA a jelikož je neustále poškozována, k opravám těchto poškození byly vyvinuty reparační mechanismy. Kromě opravných mechanismů jsou také využívány kontrolní body buněčného cyklu, které poškození rozpoznávají. Kontrolní body zastavují buněčný cyklus v G1 fázi, zpomalují fázi S, zastavují buněčný cyklus v G2-M fázi a v některých případech také aktivují či regulují procesy oprav DNA [17].

3.6.1 Opravy bazí

Poškozené baze či nesprávně spárované nukleotidy postihují jen jeden řetězec a jejich oprava patří mezi snazší opravy. Modifikované baze jsou opravovány pomocí **bazové excizní reparace** (BER). Enzymy nejprve odstraní poškozenou bazi, čímž vzniká abazické místo a následně vytvoří jednoduchý zlom. Na uvolněný konec DNA je přidán nový nukleotid se správnou bazí a následně je DNA řetězec spojen. Tento opravný proces je aktivní hlavně v G1 fázi buněčného cyklu [2, 16, 18].

Opravy chybného párování bazí (Mismatch Repair, MMR) odstraňují nesprávné párování mezi bazemi a vložení malých nesprávných sekvencí, ke kterým může docházet během replikace. Nejprve je nesprávné párování identifikováno specifickými senzory, řetězec s nesprávným párováním je identifikován a nukleotidy jsou vyříznuty [2, 18].

3.6.2 Opravy zlomů

Jednoduché zlomy umí buňka jednoduše spojit, dvojně zlomy představují nejhůře opravitelné poškození. Pro opravy dvojných zlomů existují dva reparační mechanismy: homologní rekombinace (HR) a nehomologní spojování konců (Non-homologous End-joining, NHEJ).

Homologní rekombinace využívá sekvence DNA nepoškozené sesterské chromatidy k rekonstrukci poškozené. HR probíhá v pozdní S-fázi nebo v G2 fázi po tom, co je DNA zreplikována a je tedy možné najít úsek v sesterské sekvenci jako předlohu. Podle této předlohy je dosyntetizován porušený úsek sekvence DNA. Výsledkem HR je většinou přesná oprava. Dohledat odpovídající sekvence však není jednoduché a je časově náročné, proto je častějším způsobem opravy NHEJ. **Nehomologní spojování konců** probíhá přímým napojením konců bez nutnosti použití jakékoliv

předlohy. Výhodou tohoto způsobu je, že může probíhat ve všech fázích buněčného cyklu, jelikož nezávisí na zreplikované sekvenci DNA. Jedná se o mnohem rychlejší a jednodušší proces, než HR, je však zdrojem chyb v sekvenci DNA, čímž dochází ke změně genetické informace [2, 7, 16, 18].

3.7 Buněčná smrt

Fyziologické mechanismy buněčné smrti využívají mnohobuněčné organismy k vývoji, ke kontrole počtu buněk a jako obrannou strategii pro odstranění poškozených buněk. Buněčná smrt je nutná pro normální vývoj mnohobuněčných organismů [19].

Biologické důsledky ozáření jsou značně ovlivněny mechanismy DDR, které určují jak citlivost buněk k ozáření, ale i typ buněčné smrti i její načasování. DDR se liší mezi různými typy buněk (normálních i nádorových) a projevy buněčné smrti se tedy mezi různými typy buněk liší. Pro hodnocení buněčné smrti se využívá určení klonogenního přežití, to je definováno jako schopnost buňky po ozáření neomezeně proliferovat a tvořit kolonie. Ztráta schopnosti reprodukce je používána jako definice buněčné smrti v radiobiologii a je stěžejní pro proliferující buňky jak nádorových, tak i zdravých tkání, které jsou pro radioterapii důležité [11].

3.7.1 Apoptóza

Apoptóza je vysoce regulovanou formou buněčné smrti a může být iniciována buď vnitřními podmínkami buňky (poškození DNA) nebo je iniciována v důsledku signálů, které získává z vnějšího prostředí buňky (okolní tkáně či imunitních buněk). Je hlavním mechanismem pro eliminaci nadbytečných buněk během embryonálního vývoje, růstu, diferenciaci a normálního života buňky. Dysregulace apoptózy může způsobovat řadu onemocnění včetně rakoviny či neurodegenerativních onemocnění [4, 20].

Apoptóza může být indukována v normálních i nádorových tkáních ozářením. Indukce apoptózy vlivem IZ silně závisí na typu buňky, hematopoetické a lymfoidní buňky jsou velmi náchylné k smrti apoptózou po vystavení IZ. Morfologicky je charakterizována kondenzací a štěpením DNA na fragmenty, fragmentací buněčného obsahu do membránou uzavřených apoptických tělísek, která jsou následně pohlcena fagocyty. Molekulárními účastníky apoptické dráhy jsou senzory, které rozhodují o zahájení apoptózy a efekторы, které zodpovídají za realizaci tohoto rozhodnutí

[11, 18].

3.7.2 Nekróza

Nekróza je neorganizovaný a neregulovaný proces destrukce buněk. Dochází k ní za nepříznivých podmínek, které nejsou slučitelné s normálním fyziologickým procesem. K těmto nepříznivým podmínkám patří například extrémní změna pH, teploty či ztráta energie. Morfologicky je nekróza charakterizována otokem buňky, deformací membrány, rozpadem organel a uvolněním hydrolytických enzymů z lysozomů, které buňku napadají. Nekróza je často pozorována u nádorů a může být vyvolána léčbou, která má za cíl poškodit DNA, tedy i radioterapií, dále při infekci, zánětu nebo ischemii [4, 11].

Nedávné výzkumy naznačují, že výskyt i průběh nekrózy může být přísně regulován. Po signalizaci poškození může nekróza vykazovat znaky řízených procesů, jako například mitochondriální dysfunkce, zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku a vyčerpání ATP [21].

3.7.3 Senescence

Senescence je programovaná reakce na buněčný stres a představuje odpověď na hromadění poškození v buňce. Indukce senescence vede k nevratnému zastavení buněčného cyklu, které je charakterizováno aktivací proteinů p53 a retinoblastomu a dále s modifikací chromatinu, které vedou k potlačení genů nezbytných pro přechod z G1 fáze do S fáze. Senescence je označována jako tumor-supresorový mechanismus, jelikož zabraňuje nadměrnému dělení buněk jako reakce na nesprávné růstové signály či dělení buněk, u kterých došlo k poškození DNA [4, 18, 22].

3.7.4 Autofagie

Autofagie využívá degradaci dlouho žijících proteinů a buněčných organel pomocí lysozomů k obnově nebo udržení buněčné homeostázy. Defekty autofagie byly charakterizovány u onemocnění jako jsou infekce, neurodegenerativní onemocnění, rakovina, stárnutí, Crohnova choroba a srdeční choroby [18, 23].

3.7.5 Mitotická katastrofa

Mitotická katastrofa je typ buněčné smrti, která je způsobena neobvyklým průběhem mitózy. Morfologicky je charakterizována hromaděním vícejaderných buněk, které obsahují nekondenzované chromozomy a jsou v nich přítomny chromozomální aberace a mikrojádra. K tomuto jevu dochází, když buňky vstoupí do mitózy s neopraveným či nesprávně opraveným poškozením DNA. Jedná se o nejčastější mechanismus buněčné smrti způsobené vlivem ozáření. Buňky umírají při prvním nebo následujícím pokusu o dělení po ozáření kvůli poškození chromozomů [4, 11, 18].

3.8 Mutace

Při ozáření nižšími dávkami nedochází k usmrcení buňky a nemusí dojít ani k zastavě buněčného cyklu, ale vzniklé radikály vyvolávají změny v DNA, které reparační mechanismy nemusí zvládnout opravit. Tím jsou tvořeny i změny ve struktuře chromozomů, které nesou zakódované genetické informace. Tyto mutace se při buněčném dělení mohou přenášet na další generace. Z hlediska genetiky způsobují právě mutace genetické choroby, vývojové vady či tvorbu nádorů. Jelikož jen malá část genomu kóduje proteiny, tak k mutacím nejčastěji dochází v nekódujících oblastech [7, 24].

Podle úrovně ovlivnění genetické informace je možné mutace rozdělit na genomové, chromozomální a genové a z pohledu typu postižených buněk na somatické a genetické.

Genomové mutace jsou nejrozsáhlejším typem mutací a týkají se velkých částí genomu nebo genomu celého. Může docházet ke znásobení celé chromozomální sady, za normálních podmínek jsou organismy diploidní ($2n$), ale při znásobení sady může být $3n$ či $4n$. Tyto stavy jsou sice běžné například u rostlin, ale u člověka jsou s životem neslučitelné. Dále může dojít ke stavu, kde chybí nebo přebývá chromozom v chromozomální sadě, tyto stavy vznikají chybou v buněčném dělení [24].

Chromozomální mutace byly popsány v sekci 3.4.1.

Genové mutace probíhají na úrovni vlákna DNA a jejich vlivem dochází ke změně pořadí nukleotidů. Tyto mutace mohou vznikat třemi způsoby: adicí, substitucí či delecí. Při adici dochází k zařazení jednoho či více nadbytečných nukleotidových párů. Při substituci dochází k náhradě báze původní sekvence za jinou. Během delece dochází ke ztrátě jednoho či více nukleotidů původní sekvence [24].

Somatické mutace postihují jen somatické buňky v průběhu života a vedou k lo-

kálnímu poškození. Poškozené buňky umírají nejčastěji apoptózou či nekrotózou, v některých případech mohou začít proces maligní transformace, který vede ke tvorbě nádorů. Tyto mutace se nepřenášejí na další generace [24].

Gametické mutace postihují pohlavní buňky organismu. Nebezpečí těchto mutací je, že když dojde pomocí zmutované gamety k oplození a vzniku zygoty, příslušná mutace se bude v zygotě nacházet, což vede k tomu, že se příslušná mutace bude nacházet ve všech buňkách organismu. Tyto mutace se přenášejí na další generace [24].

3.9 Faktory ovlivňující biologický účinek ozáření

Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je již mnoho let spojován s reakcí buňky na ozáření. Radiosenzitivita buněk v průběhu buněčného cyklu kolísá. Nejcitlivější k IZ jsou buňky v M fázi, citlivé jsou i v G2 či G1, pokud mají dlouhý buněčný cyklus. Nejvíce radiorezistentní jsou v S fázi, jelikož je během replikace vytvořeno komplementární vlákno DNA a tím dochází k rychlejším a efektivnějším opravám dvojných zlomů pomocí HR. Důležitá je také rychlost buněčného cyklu. Rychle se dělicí buňky mají obecně méně času na opravu vzniklých poškození DNA a jsou tedy více ovlivňovány neopravenými nebo špatně opravenými poškozeními DNA, z čehož plyne, že jsou radiosenzitivnější než pomalu se dělicí buňky [2, 7, 25].

Vlastnosti ionizujícího záření

Fyzikální vlastnosti různých druhů IZ mají vliv na poškození DNA. Schopnost záření poškozovat DNA a usmrctvat buňky se s rostoucím LET zvyšuje. Pro kvantifikaci biologických účinků byla zavedena relativní biologická účinnost (RBE, Relative Biological Effectiveness):

$$\text{RBE} = \frac{D_R}{D_Z}, \quad (3.1)$$

kde D_R je dávka referenčního záření (nejčastěji ^{60}Co) a D_Z je dávka zkoumaného záření, které působí stejný biologický efekt [2].

Přítomnost kyslíku

Přítomnost či nepřítomnost kyslíku v buňce silně ovlivňuje biologický účinek ozáření. Koncentrace kyslíku v buňce během ozařování má důležitý význam pro vznik volných radikálů a po ukončení ozáření je kyslík nutný pro reparační procesy. Čím více jsou buňky okysličené, tím výraznější je biologický účinek ozáření. Tento účinek je výraznější u záření s nízkým LET, zatímco u záření s vysokým LET je mnohem méně výrazný. Poměr dávek bez kyslíku a s kyslíkem, tedy pro hypoxické a dobře okysličené buňky, které mají vyvolat stejný biologický efekt se nazývá kyslíkový efekt (OER, Oxygen Enhancement Ratio). Buňky na periferii nádorů rostoucí okolo cév se stávají chronicky hypoxickými, protože je spotřebována většina kyslíku v blízkosti cévy. Přechodné uzavření cév může působit, že celý nádor bude po nějakou dobu hypoxický. Reoxygenace je proces, při kterém se hypoxické buňky po ozáření okysličují prostřednictvím usmrcení a odstranění okysličených buněk z nádoru [9].

4. Radiobiologie

Radiobiologie je mezioborová disciplína na pomezí fyziky a biologie zabývající se vlivem ionizujícího záření na živé organismy a jejich součásti. Základem radiobiologie je teorie působení ionizujícího záření na živé organismy, která je popisována samotnou interakcí a následně ději, které se v organismu odehrávají po ozáření [26].

4.1 Klonogenní test

Klonogenní test je zlatým standardem k určení reprodukční smrti buněk po ozáření. Základní myšlenkou je odebrání buněk, umístění je do definovaného růstového prostředí a následné zkoumání jejich schopnosti vytvořit kolonie. Kolonie je definována jako skupina obsahující alespoň 50 buněk. Tento test je využíván pro stanovení reprodukční smrti buněk po ozáření ionizujícím zářením, může být ale také použit ke zjištění účinnosti jiných cytotoxických látek. Výstupem tohoto testu je křivka buněčného přežití. Křivky buněčného přežití mohou být sestaveny podle různých modelů, všeobecně nejpoužívanějším je lineárně-kvadratický model (LQ model) [11, 27, 28].

Křivky buněčného přežití

Křivka buněčného přežití je grafické znázornění přeživší frakce buněk v závislosti na dávce IZ. Pokud je křivka zobrazena v lineárním měřítku, tak má sigmoidální tvar, tedy má raménko, za nímž následuje křivka, která se asymptoticky blíží k nulovému přežití. Křivky buněčného přežití jsou obvykle graficky zobrazovány s dávkou D v lineárním měřítku a přeživšími frakcemi v logaritmickém měřítku. Tento způsob zobrazování je volen proto, že zabíjení buněk je náhodné a přežití buněk je tedy exponenciální funkcí dávky, což je v logaritmickém měřítku zobrazováno jako přímka, logaritmické měřítko dále umožňuje zobrazení oblasti nízkého přežití buněk [11, 18].

4.2 LQ model

Přeživší frakce SF se dle LQ modelu určí jako funkce absorbované dávky D následovně:

$$\text{SF} = S_0 \cdot e^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (4.1)$$

kde S_0 je počet nasazených buněk, α , β jsou parametry a D je absorbovaná dávka [29].

Tento model je rozsáhle využíván k predikci a analýze reakcí buněk na ozáření. Parametr α reprezentuje lineární složku a parametr β kvadratickou složku zabíjení buněk [30].

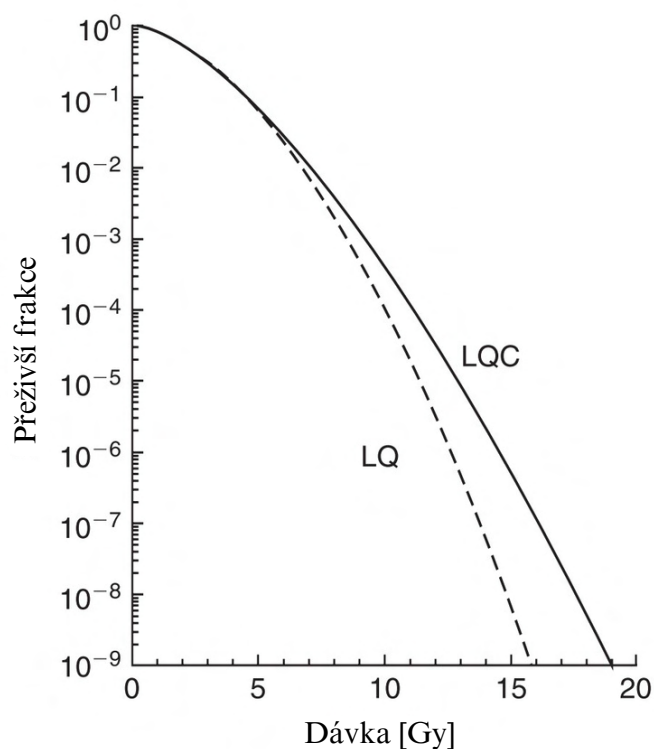
Lineárně-kvadratický-kubický model

LQ model dobře popisuje odezvu na ozáření při dávkách nižších než přibližně 5 – 6 Gy, při vyšších dávkách přežití buněk více připomíná lineární vztah mezi $\ln(\text{SF})$ a dávkou D . LQ model může být jednoduše upraven tak, aby zohledňoval lineárnější odezvu, a to přidáním kubického členu opačného znaménka, než má lineární a kvadratický člen. Tento model se nazývá lineárně-kvadratický-kubický model (LQC model) a vztah pro přeživší frakci vypadá následovně:

$$\text{SF} = e^{-\alpha D - \beta D^2 + \gamma D^3} \quad (4.2)$$

[11].

Křivky buněčného přežití sestavené pomocí LQ a LQC modelu jsou na Obr. 4.1.



Obrázek 4.1: Křivky buněčného přežití [11]

4.3 Využití LQ modelu v radioterapii

LQ model je užitečný pro předpověď efektu frakcionace a v porovnávání ekvivalentní dávky doručené ve frakcích po 2 Gy (EQD_2) různých frakcionačních režimů. Odhad výsledku radioterapie silně závisí na spolehlivém odhadu parametrů α , β a jejich poměru α/β [30].

Ranné studie ukázaly, že orgány obsahující rychle se dělicí buňky, jako je kůže, ústní sliznice či kostní dřeň, projevovaly obvykle malou citlivost na velikost dávky a reakce na ozáření se projevovaly během nebo krátce po dokončení radioterapie. Tyto časně reagující tkáně mají vysoké poměry $\alpha/\beta \approx 7 - 10$ Gy. Orgány obsahující pomalu se dělicí buňky, jako je srdce, plíce či ledviny, reagují během mnohem delšího časového intervalu a projevují se větší citlivostí na velikost dávky. Pozdě reagující tkáně mají obvykle poměry $\alpha/\beta \approx 3 - 5$ Gy [31].

Jelikož je rakovina charakterizována nekontrolovatelným dělením buněk, tak jsou tumory charakterizovány vysokým poměrem α/β , jako časně reagující tkáně. Hodnoty poměru α/β pro jednotlivé tumory se napříč studiemi různí. Odhady pro nádory

prostaty, prsu či liposarkomy jsou obvykle $\alpha/\beta \approx 4$ Gy, pro nádory hlavy a krku, dělohy, močového měchýře a jater jsou obvykle $\alpha/\beta \approx 10$ Gy. Odhady poměru α/β pro konečník, jícen, centrální nervovou soustavu, kůži a plicní nádory jsou rozmanité, což je pravděpodobně způsobeno rozmanitými histologiemi těchto tkání. Nižší hodnota poměru α/β poukazuje na vyšší citlivost na frakcionaci, vyšší hodnota poměru α/β poukazuje na výhodnost užití hypofrakcionace [29, 30].

Při použití LQ modelu se předpokládá, že klinický účinek závisí jen na počtu přeživších buněk. Klinický účinek E je spojen s logaritmem přeživší frakce, tedy:

$$E = -\ln(\text{SF})^n = -n \ln(\text{SF}) = n(\alpha d + \beta d^2) = nd(\alpha + \beta d) = D(\alpha + \beta d), \quad (4.3)$$

kde SF je přeživší frakce, n je počet frakcí, d je dávka v jednotlivé frakci a $D = nd$ je celková dávka. Tento vztah zdůrazňuje šetření tkání pomocí frakcionace. Pokud je stejná dávka D aplikována ve větším počtu frakcí, tak dojde ke snížení klinického účinku E . Zatímco frakcionace šetří všechny tkáně, úroveň šetření je viditelně závislá na poměru α/β cílové tkáně [29].

Klinický účinek radioterapie může být vyjádřen jako:

$$E = \alpha D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right). \quad (4.4)$$

Vztah (4.4) může být využit k výpočtu izoeftivních dávek mezi frakcionačními režimy. Jelikož jsou nejvýznamnější klinické plány s dávkou na frakci 2 Gy, tak jsou plány porovnávány na základě EQD₂.

Pro získání EQD₂ pro libovolný plán o n frakcích o dávce d na frakci, je nutné najít dávku, která poskytuje stejný účinek:

$$\alpha D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right) = \alpha \text{EQD}_2 \left(1 + \frac{2}{\alpha/\beta} \right),$$

což může být upraveno do následujícího tvaru:

$$\text{EQD}_2 = D \left(\frac{d + \alpha/\beta}{2 + \alpha/\beta} \right). \quad (4.5)$$

Nejjednodušším způsobem, jak porovnat účinnost radioterapeutických plánů je převést jednotlivé plány, které se skládají z různých celkových dávek D a různých dávek na frakci d , na ekvivalentní plány ve frakcích 2 Gy, které poskytují stejný biologický účinek [11, 29].

LQ model dále umožňuje určit biologicky efektivní dávku (BED):

$$\text{BED} = \frac{E}{\alpha} = D \left(1 + \frac{\beta d}{\alpha} \right) = D \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right), \quad (4.6)$$

kde D je celková aplikovaná dávka. Tento vztah je důležitý pro srovnávání účinnosti a toxicity jednotlivých frakcionačních režimů a rizika pozdních komplikací [32].

Jelikož se radiobiologické parametry mezi nádory a zdravou tkání liší, existují i různé hodnoty BED pro každou ozařovanou tkáň, a to i tehdy, pokud všechny tkáně obdrží stejnou dávku ve stejném čase. Relativní změna BED nádoru a zdravé tkáně může být užitečným ukazatelem pro hodnocení terapeutických plánů. Zohlednění hodnot BED pro různé tkáně může být využito k porovnávání různých léčebných modalit [33].

4.4 Laboratorní chyby v radiobiologii

Veškerá práce v laboratorním prostředí je náchylná ke vzniku laboratorních chyb. Laboratorní chyby jsou často zapříčiněny lidským faktorem. Nezkušenost, nedbalost či únava mohou vést ke způsobení chyb při práci se vzorky. Chyby mohou být dále způsobovány použitím nesprávného laboratorního vybavení, nesprávnou manipulací s vybavením či nepřesnou kalibrací měřicích přístrojů. Některé z těchto chyb jsou popsány dále.

Vliv pipetování

Nepřesnosti v pipetovaném objemu mají veliký vliv na správnost a přesnost výsledků experimentů. Chyby v pipetovaných objemech jsou často způsobeny špatným nastavením pipet či nesprávnou manipulací s pipetami. Na pipetování má zásadní vliv také lidský faktor, jelikož nezkušenost a nesprávná technika pipetování vede ke vzniku chyb.

Při používání mikroobjemových pipet by měl být špička ponořena 1 – 2 mm do vzorku, je-li špička ponořena příliš hluboko, dochází ke stlačení vzduchu ve špičce, což způsobuje nabrání většího objemu, než byl nastaven. Při nabírání vzorku by měl být úhel pipety co nejbližší 90°, při šikmém úhlu dochází ke snížení hydrostatického tlaku vodního sloupce uvnitř špičky pipety a je nasáván větší větší objem, než byl nastaven. Kapalina by měla být nasávána plynule a pomalu. Plná špička by měla být vytahována z kapaliny po stěně nádoby, ze které je odebírána, aby došlo k setření zbytku kapaliny z vnějšího povrchu špičky [34, 35].

Různé rozředění vzorku

Klonogenní test je ovlivněn různými faktory včetně hustoty nasazených buněk i buněčné spolupráce. U značného počtu buněčných linií byla pozorována buněčná spolupráce, při níž si buňky vzájemně pomáhají v růstu a přežívání, tato spolupráce může vést k nelineárnímu chování klonogenního růstu. Použití zředěných vzorků při klonogenních testech může značně ovlivnit výsledky i jejich interpretaci [36].

Nasazení v různý čas po trypsinizaci

Klonogenní test musí probíhat plynule a rychle, aby byl omezen celkový čas a zabránilo se nepříznivým účinkům změn prostředí, ve kterém se s buňkami pracuje. Nasazování vzorků v různé časy po trypsinizaci může vést k vystavení jednotlivých vzorků různým laboratorním podmínkám. Na buňky mají významný vliv např. změny teploty, které mají ovlivňují buněčnou fyziologii, například replikaci, transkripci a translaci. Buňky jsou běžně uchovávány v inkubátoru za teploty 37 °C, po trypsinizaci jsou ponechány v laminárním boxu za pokojové teploty. Zejména buněčná membrána je velmi citlivá na změny teploty. Vyšší teploty mohou změnit její propustnost a umožňovat vstup škodlivým molekulám. Zvyšováním teploty se také snižuje schopnost buněk tvořit kolonie a tedy snižují buněčné přežití při klonogenním testu [27, 37, 38].

Chyby v počítání kolonií

Ruční počítání kolonií je náchylné k subjektivitě a vzniku lidských chyb, například pokud je osoba, která experiment provádí rozptýlena, unavená či nezkušená. Chyby, které vznikají při počítání kolonií mohou vést k nespolehlivým údajům a výsledky jednoho experimentu není pak možné spolehlivě porovnat s výsledky jiných experimentů. S větší statistickou odchylkou jakéhokoli datového bodu, klesá síla jakéhokoli statistického srovnání. K učinění spolehlivých závěrů o statistickém rozdílu mezi dvěma experimenty je obtížné použít data s vysokou mírou variability. Vědecké výsledky požadují statistickou významnost, aby měly dopad pro výzkumnou komunitu. Z toho vyplývá, že laboratoře, které používají metodu počítání kolonií, která je zatížena lidskou chybou, mají menší šanci úspěšného publikování naměřených dat, než laboratoře, které používají spolehlivější a reprodukovatelnější metody. Z tohoto důvodu byly učiněny pokusy o zavedení automatických postupů počítání

kolonií. Komerčně dostupné nástroje pro počítání kolonií však mohou být cenově nedostupné, proto se některé laboratoře obracejí na software s otevřeným zdrojovým kódem. Software s otevřeným zdrojovým kódem může mít ale nedostatečně definovaný proces a může být problematické se spolehnout na přesnost automatizovaného procesu [39].

5. Experiment

5.1 Úvod

Experimentální část je věnována zkoumání vlivu simulovaných laboratorních chyb na křivky buněčného přežití. Bylo vybráno zkoumání vlivu šikmého pipetování, rozředění vzorku $5\times$ a $10\times$, nasazení vzorků do šestijamkových kultivačních destiček 1 hodinu po provedení trypsinizace a vliv počítání kontrolního vzorku jinou osobou. Experiment byl prováděn na Ústavu jaderné fyziky Akademie věd České Republiky na Oddělení dozimetrie záření. Experiment byl opakován celkem třikrát s pomocí a dozorem konzultantky bakalářské práce Ing. Iriny Danilové.

5.2 Materiály a metody

5.2.1 Buněčná linie U251

Pro experiment byla využita buněčná linie U251 MG (U251). Jedná se o buňky maligního tumoru glioblastom astrocytom, které byly odebrány z mozku 75 let starého muže [40, 41].

Glioblastomy jsou nejagresivnějšími a nejběžnějšími nádory mozku u dospělých a jsou typicky spojeny se špatnou prognózou a nízkou kvalitou života. Přežití pacientů od diagnózy se pohybuje od 9 do 12 měsíců. Standardní léčbou je chirurgický zákrok, radioterapie a chemoterapie [42, 43, 44].

Parametry buněčné linie U251 jsou dle měření na Oddělení dozimetrie záření: $\alpha = 0,35 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 0,01 \text{ Gy}^{-2}$ a $\alpha/\beta = 35 \text{ Gy}$.

5.2.2 Použité pomůcky

Laboratorní vybavení: laminární box, inkubátor, mikroskop, Guava Muse Cell Analyser ¹, Scepter Handheld Automated Cell Counter ², kultivační lahvičky T25 a T75, 15 ml tuby, pipety a pipetové špičky, kobaltový ozařovač, vodní fantom, držák, kádinky, rukavice.

Chemikálie: médium složené z MEM (Minimum Essential Medium) + 10% FBS (Fetal bovine serum) + PEN/STREP (Penicillin/Streptomycin) + L-glu (L-glutamine) + NEAA (Non-Essential Amino Acids Solution) + SPS (Sodium Pyruvate), trypsin, PBS (Phosphate Buffered Saline), Crystal Violet, metanol, destilovaná voda a desinfekční prostředky.

MEM je jedno z nejpoužívanějších médií, je vhodné pro růst široké škály savčích buněk. Jelikož médium MEM neobsahuje bílkoviny, lipidy ani růstové faktory, běžně vyžaduje doplnění FBS [47].

FBS se při kultivaci eukaryotických buněk používá jako doplněk růstových médií, obsahuje nutriční faktory a faktory podporující embryonální růst [48].

PEN/STREP je směs antibiotik penicilinu a streptomycinu, které se přidávají do média a jsou účinné proti kontaminaci bakteriemi [49].

L-glutamin slouží jako zdroj energie, zejména při rychlém dělení buněk. Je také důležitý při tvorbě aminokyselin, hraje roli při syntéze bílkovin a tvorbě glukózy [50].

NEAA je doplněk pro buněčné kultury a obsahuje 7 druhů neesenciálních aminokyselin potřebných pro buněčné kultury, které mohou zlepšit poměr buněčného kultivačního média [51].

SPS se přidává do média jako zdroj uhlíku [52].

Trypsin je proteolytický enzym, umožňuje odlepení buněk od stěny kultivační lahvičky a jejich následné použití [53, 54].

Crystal Violet se váže na proteiny a DNA buněk. Buňky, které podstoupily buněčnou smrt, ztratí adhezi a jsou tedy obarveny pouze vzniklé buněčné kolonie přeživších buněk. Barvivo se z prášku Crystal Violet připraví tak, že se smíchá 5 g

¹Přístroj využívá miniaturizovaného detekčního systému fluorescence a technologie mikrokapilár k poskytování kvantitativní analýzy buněk [45].

²Jedná se o přístroj pro počítání buněk založený na Coulterovém principu. Coulterův princip spočívá v průchodu roztoku, který obsahuje buňky mezi dvěma elektrodami, průchodem buněk se mění procházející proud [46].

Crystal Violet, 250 ml etanolu a 750 ml destilované vody [55].

Prováděným experimentem byl klonogenní test (popsán v 4.1), v jehož průběhu byly simulovány vybrané laboratorní chyby.

5.2.3 Postup experimentu

Před samotným začátkem experimentu musely být buňky rozmrazeny a několikrát přesazeny, než byly přesazeny pro tento experiment. Experiment probíhal ve zkratce následovně. První den byly buňky přesazeny do 5 kultivačních lahvíček T25, podle jednotlivých dávek (0, 1, 2, 4 a 6 Gy), kterými byly vzorky druhý den ozařovány. Následně byly 12 dní po ozařování vzorky obarveny a byly spočítány buněčné kolonie. Celý postup byl zopakován třikrát, jednotlivé kroky jsou v následující sekci detailněji popsány.

Přesazení buněk

Nejprve byla provedena kontrola buněk v kultivační lahvičce pod mikroskopem, bylo kontrolováno jak narostly a v jaké jsou kondici. Následně bylo nutné odlepit buňky ze stěny kultivační lahvičky, tento proces je nazýván trypsinizace a probíhá následovně. Z lahvíček bylo odebráno médium a buňky byly dvakrát opláchnuty pomocí PBS, který byl následně opět odebrán. Oplach pomocí PBS slouží k odstranění média, jinak by přidaný trypsin neúčinkoval. Při použití velkých kultivačních lahvíček (T75) bylo použito pro trypsinizaci 3 ml trypsinu (při použití T25 jen 1 ml) a lahvičky byly umístěny do inkubátoru po dobu 4 minut. Po vyndání lahvíček z inkubátoru s nimi bylo řádně zatřesen a bylo zkontrolováno mikroskopem, zda buňky v trypsinu volně plavou. Následně bylo do lahvíček přidáno médium, které proces trypsinizace zastavilo.

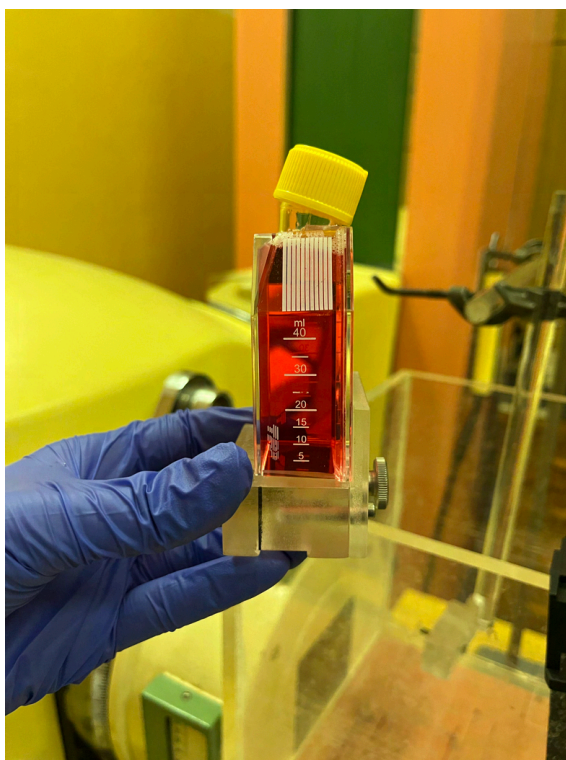
Pomocí Muse Cell Analyseru či Scepter Handheld Automated Cell Counteru bylo spočítáno, zda je ve vzorku dostatečná koncentrace buněk, případně byly stejným postupem dotrypsinizovány další buňky tak, aby byl jejich počet optimální. Muse Cell Analyser je k vidění na Obr.5.1. Posledním krokem bylo nasazení buněk do kultivačních lahvíček T25, byla snaha mít v každé lahvičce přes 50 tisíc buněk. Přesazené buňky byly umístěny do dalšího dne v inkubátoru.



Obrázek 5.1: Muse Cell Analyser

Ozařování

Prvním krokem před ozařováním byla opět kontrola buněk pod mikroskopem. Následně byly lahvičky T25 doplněny médiem po rysku, pro zajištění homogenního prostředí a také kvůli tomu, aby byly buňky stále namočené v médiu jelikož byly lahvičky ozařovány ve vertikální poloze. Naplněná kultivační lahvička T25 je k vidění na Obr. 5.2. Takto připravené lahvičky byly přeneseny v boxu k ozařovači. Aby byly všechny vzorky vystaveny stejným podmínkám, byla přenesena i lahvička, která ozařována nebyla. Před ozařováním byly napočítány ozařovací časy pro jednotlivé dávky. Lahvičky byly postupně umisťovány do vodního fantomu, voda měla přibližně 37 °C a lahvičky byly vždy umístěny do vzdálenosti 5 cm od primárního kolimátoru kobaltového ozařovače. Ozařovací geometrie je na Obr. 5.3.



Obrázek 5.2: Lahvička T25 naplněná médiem před ozařováním



Obrázek 5.3: Ozařovací geometrie

Po ozáření bylo z lahví odebráno médium a byla opět provedena trypsinizace. Na Obr. 5.4 je k vidění laminární box v průběhu přípravy vzorků před nasazováním vzorků do kultivačních destiček. V této fázi experimentu byly simulovány první tři laboratorní chyby. Vzorky, které měly ukazovat vliv nasazení buněk do šestijamkových kultivačních destiček 1 hodinu po trypsinizaci byly ponechány v laminárním boxu právě po dobu jedné hodiny. Vzorky, které měly ukazovat vliv rozředění $5\times$ a $10\times$ byly rozředěny. Po nasimulování těchto chyb byly vzorky nasazovány do šestijamkových kultivačních destiček. Nasazované μl vzorků byly přizpůsobeny očekávanému přežití pro každou dávku a danému rozředění, tedy pro $5\times$ resp. $10\times$ rozředěný vzorek bylo nasazováno $5\times$ resp. $10\times$ více μl než pro vzorky nezředěné. Jeden vzorek byl ponechán správně, jako kontrolní skupina a dále bylo při nasazování simulováno šikmé pipetování. Po nasazení vzorků byly destičky nechány v inkubátoru po dobu 12 dní a následně byly obarveny.

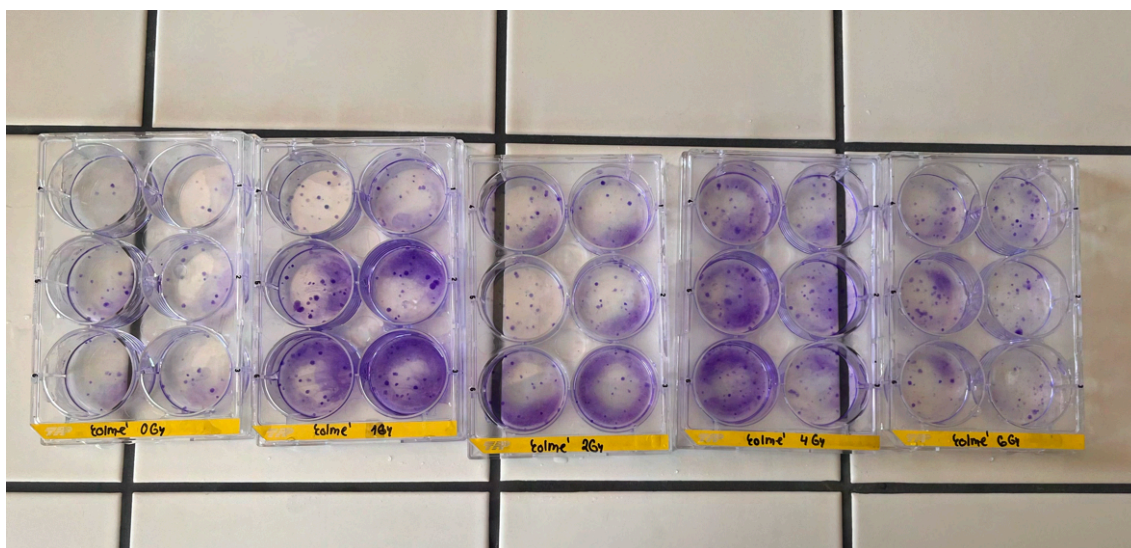


Obrázek 5.4: Příprava vzorků v laminárním boxu po ozáření

Barvení buněk

Z kultivačních destiček bylo odebráno médium a do jamek destiček bylo přidáno barvivo. Barvivo se nechalo působit po dobu cca 30 minut, následně bylo odebráno a bylo z jamek destiček vymyto vlažnou vodou. Destičky byly usušeny na vzduchu a byly spočítány buněčné kolonie. Usušené kultivační destičky jsou na Obr. 5.5.

Kolonie byly počítány pomocí počítačového pera, nejprve byla však určena kolonie obsahující 50 buněk pod mikroskopem a dále byly kolonie počítány pouze pohledem se znalostí této referenční kolonie. Počty kolonií byly zaznamenány do tabulek. Pro analýzu vlivu počítání kolonií jinými lidmi byly napočítány kolonie kontrolních vzorků i konzultantkou bakalářské práce a byly také zaznamenány do tabulek.



Obrázek 5.5: Obarvené kolonie

5.2.4 Zpracování dat

Do tabulek byly zaznamenány napočítané kolonie, jelikož má kultivační destička šest jamek, tak je v tabulkách je zaznamenáno šest počtů kolonií pro každou aplikovanou dávku. Byla provedena kontrola vybočujících hodnot Dixonovým testem (pomocí contchart.com/outliers.aspx), v testu byla zvolena hladina spolehlivosti $P = 0,05$. V tabulkách jsou vybočující hodnoty zobrazeny s přeškrtnutím. Z napočítaných kolonií byl dále určen průměr \bar{n}_D . Následně bylo určeno přežití buněk pro jednotlivé dávky S_D jako:

$$S_D = \frac{\bar{n}_D}{S_{0,D}}, \quad (5.1)$$

kde \bar{n}_D je průměrný počet kolonií pro danou aplikovanou dávku a $S_{0,D}$ je počet nasazených buněk ve vzorku. Dále bylo určeno relativní přežití buněk S [%] jako:

$$S[\%] = 100 \cdot \frac{S_D}{S_{D0}}, \quad (5.2)$$

kde S_D je přežití pro danou dávku a S_{D0} je přežití neozářených buněk.

Pro zjištění, zda je rozdíl mezi jednotlivými vzorky statisticky významný byla použita metoda analýzy rozptylu (Analysis of Variance, ANOVA). Byla provedena dvoufaktorová ANOVA, při které byl zkoumán vliv dvou nezávislých faktorů na závislou proměnnou (přežití S). Jako faktory byla zvolena dávka D a skupina vzorků (jednotlivé simulované laboratorní chyby). Kromě hlavních efektů těchto faktorů byla zahrnuta také interakce mezi nimi, což umožňuje posouzení, zda se vliv dávky D na přežití S liší v závislosti na skupině. Analýza byla provedena pomocí balíčku *statsmodels* v programovacím jazyku Python. Byl vytvořen model metodou nejmenších čtverců pro odhad parametrů modelu. Vstupem do ANOVA analýzy byly hodnoty přežití S [%] pro jednotlivé vzorky z obou experimentů. Výstupem ANOVA analýzy je tabulka F-statistik a p-hodnot. Vysoká hodnota F-statistiky znamená, že je nulová hypotéza chybná. Pokud je vypočtená p-hodnota menší než 0,05, považuje se rozdíl mezi skupinami za statisticky významný a zamítá se nulová hypotéza, že mezi skupinami není žádný rozdíl.

5.3 Výsledky experimentu

První opakování

Pro první opakování experimentu byly buňky přesazeny 23. 11. 2022, byly ozářeny 25. 11. 2022 a obarveny 7. 12. 2022.

Název vzorku, dávka D , počet nasazovaných buněk S_0 , napočítané kolonie, jejich průměr \bar{n} a přežití S jsou zaznamenány v Tab. 5.1 5.2, 5.3, 5.4, 5.5.

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
C0	0	75	23	22	17	21	11	19	18,83	100,00
C1	1	108	18	22	21	31	17	22	20,00	73,75
C2	2	158	8	4	22	20	13	12	13,17	33,19
C4	4	357	30	38	33	35	37	29	33,67	37,55
C6	6	878	36	33	42	51	52	45	43,17	19,58

Tabulka 5.1: Data pro kontrolní vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
SIK-0	0	75	3	12	6	8	2	2	5,50	100,00
SIK-1	1	108	28	19	19	31	23	9	21,50	271,46
SIK-2	2	158	7	23	24	22	13	19	18,00	115,55
SIK-4	4	357	23	25	31	37	16	27	26,50	71,48
SIK-6	6	878	26	30	46	24	26	24	26,00	40,38

Tabulka 5.2: Data pro šikmé pipetování

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
5X-0	0	75	5	12	6	12	1	3	6,50	100,00
5X-1	1	108	3	7	13	18	2	9	8,67	84,22
5X-2	2	158	12	18	15	20	16	13	15,67	76,49
5X-4	4	357	34	24	42	33	38	31	33,67	72,51
5X-6	6	878	35	34	34	29	20	40	32,00	28,34

Tabulka 5.3: Data pro 5× rozředěný vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
10X-0	0	75	2	5	10	24	2	7	5,20	100,00
10X-1	1	108	15	15	24	27	14	5	16,67	222,58
10X-2	2	158	12	16	23	27	20	6	17,33	158,23
10X-4	4	357	51	59	57	47	58	61	55,50	224,22
10X-6	6	878	45	34	32	36	27	25	34,00	54,48

Tabulka 5.4: Data pro 10× rozředěný vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
1PT-0	0	75	7	13	22	21	6	11	13,33	100,00
1PT-1	1	108	23	26	21	34	13	20	22,83	118,92
1PT-2	2	158	68	70	82	81	74	76	75,17	267,60
1PT-4	4	357	51	55	47	44	46	52	49,17	77,47
1PT-6	6	878	25	34	35	26	30	28	29,67	19,21

Tabulka 5.5: Data pro vzorek nasazený 1 hodinu po trypsinizaci

Druhé opakování

Pro druhé opakování experimentu byly buňky přesazeny 27. 3. 2023, byly ozářeny 28. 3. 2023 a obarveny 11. 4. 2023.

Název vzorku, dávka D , počet nasazovaných buněk S_0 , napočítané kolonie, jejich průměr \bar{n} a přežití S jsou zaznamenány v Tab. 5.6 5.7, 5.8, 5.9, 5.10 a 5.11.

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
C0	0	75	23	30	25	26	25	27	26,00	100,00
C1	1	108	24	27	25	23	24	26	24,83	66,33
C2	2	158	19	24	24	16	23	20	21,00	38,34
C4	4	357	28	41	33	41	29	35	34,50	37,88
C6	6	878	30	29	24	34	27	24	28,00	9,20

Tabulka 5.6: Data pro kontrolní vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
SIK-0	0	75	22	19	19	24	32	24	21,60	100,00
SIK-1	1	108	29	24	19	25	16	25	23,00	73,59
SIK-2	2	158	26	17	18	21	22	18	20,33	44,68
SIK-4	4	357	23	24	27	31	25	31	26,83	26,10
SIK-6	6	878	29	32	33	29	20	24	27,83	11,01

Tabulka 5.7: Data pro šikmé pipetování

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
5X-0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	-
5X-1	1	108	0	0	0	0	0	0	0,00	-
5X-2	2	158	8	9	6	7	9	11	8,33	-
5X-4	4	357	47	51	48	61	50	49	49,00	-
5X-6	6	878	20	17	19	20	20	13	18,17	-

Tabulka 5.8: Data pro 5× rozředěný vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
10X-0	0	75	0	0	0	0	0	0	0,00	-
10X-1	1	108	28	39	30	41	39	38	35,83	-
10X-2	2	158	18	26	29	32	32	30	27,83	-
10X-4	4	357	31	43	31	45	41	43	39,00	-
10X-6	6	878	31	37	38	34	40	37	36,17	-

Tabulka 5.9: Data pro 10× rozředěný vzorek

Z důvodu nulového přežití neozářených buněk pro 5× a 10× rozředěný vzorek nemohlo být vypočteno přežití S . Z tohoto důvodu dále nemohla být určena statistická významnost ředění vzorku.

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
1PT-0	0	75	18	23	22	27	30	26	24,33	100,00
1PT-1	1	108	34	24	22	20	24	27	25,17	71,82
1PT-2	2	158	16	11	15	15	16	10	13,83	26,99
1PT-4	4	357	34	22	23	26	24	23	23,60	20,38
1PT-6	6	878	33	34	39	36	31	26	33,17	11,64

Tabulka 5.10: Data pro vzorek nasazený 1 hodinu po trypsinizaci

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
C0	0	75	26	33	26	28	24	28	27,50	100,00
C1	1	108	29	29	31	28	24	24	29,17	73,65
C2	2	158	19	28	24	15	21	21	21,33	36,52
C4	4	357	30	43	36	37	33	40	36,50	27,88
C6	6	878	42	43	34	46	35	33	38,83	12,06

Tabulka 5.11: Data pro kontrolní vzorek počítaný jinou osobou

Třetí opakování

Pro třetí opakování experimentu byly buňky přesazeny 26. 4. 2026, byly ozářeny 27. 4. 2023 a obarveny 9. 5. 2023.

Název vzorku, dávka D , počet nasazovaných buněk S_0 , napočítané kolonie, jejich průměr \bar{n} a přežití S jsou zaznamenány v Tab. 5.12 5.13, 5.14, 5.15, 5.16 a 5.17

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
C0	0	75	8	8	13	18	12	11	11,67	100,00
C1	1	108	11	15	15	18	15	15	14,83	88,29
C2	2	158	12	15	12	13	11	14	12,83	52,22
C4	4	357	14	19	17	18	16	15	16,50	29,71
C6	6	878	15	13	11	19	12	8	13,00	9,52

Tabulka 5.12: Data pro kontrolní vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
SIK-0	0	75	8	14	16	14	10	14	12,67	100,00
SIK-1	1	108	13	13	15	15	12	15	13,83	75,84
SIK-2	2	158	11	13	17	12	12	11	11,80	44,22
SIK-4	4	357	20	15	17	20	11	14	16,17	26,81
SIK-6	6	878	9	7	9	11	6	9	8,50	5,73

Tabulka 5.13: Data pro šikmé pipetování

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
5X-0	0	75	7	3	9	8	11	8	6,50	100,00
5X-1	1	108	8	7	7	8	8	9	7,83	70,95
5X-2	2	158	3	3	7	9	5	9	6,00	37,15
5X-4	4	357	2	7	11	9	8	10	7,83	21,47
5X-6	6	878	3	4	5	5	5	1	3,83	4,27

Tabulka 5.14: Data pro 5× rozředěný vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
10X-0	0	75	13	4	17	14	13	16	14,60	100,00
10X-1	1	108	21	23	24	22	17	18	20,83	99,09
10X-2	2	158	21	22	23	23	20	20	21,50	69,90
10X-4	4	357	20	14	20	25	14	26	19,83	28,54
10X-6	6	878	14	8	11	12	18	11	12,33	7,22

Tabulka 5.15: Data pro 10× rozředěný vzorek

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
1PT-0	0	75	10	13	10	14	10	8	10,83	100,00
1PT-1	1	108	12	11	11	12	9	10	10,83	69,44
1PT-2	2	158	7	9	9	10	7	6	8,00	35,05
1PT-4	4	357	9	8	11	11	7	9	9,17	17,78
1PT-6	6	878	8	5	8	15	10	8	9,00	7,10

Tabulka 5.16: Data pro vzorek nasazený 1 hodinu po trypsinizaci

Vzorek	D [Gy]	S_0	Počet kolonií						\bar{n}	S [%]
C0	0	75	8	8	17	19	15	12	13,07	100,00
C1	1	108	21	23	29	19	24	22	23,00	121,31
C2	2	158	14	21	15	22	17	17	17,67	63,69
C4	4	357	27	23	34	35	37	26	30,33	48,40
C6	6	878	22	28	37	29	14	19	24,83	16,11

Tabulka 5.17: Data pro kontrolní vzorek počítaný jinou osobou

Z dalšího zpracování dat byly vynechány výsledky prvního experimentu, jelikož se jednalo o první zkušenost s prací v laboratoři, tak práce s buňkami probíhala velmi pomalu a zřejmě se způsobením chyb.

Byly určeny průměrné hodnoty přežití S [%] a směrodatné odchytky průměrného přežití σ_s [%] pro kontrolní vzorek, šikmé pipetování, nasazení 1 hodinu po trypsinizaci a počítání kolonií v kontrolních vzorcích jinou osobou, $5\times$ a $10\times$ rozředěné vzorky byly vynechány z důvodu nulového přežití při druhém opakování experimentu. Vypočítané hodnoty jsou zaznamenány v Tab. 5.18, 5.19, 5.20 a 5.21. Výsledné křivky buněčného přežití pro tyto vzorky jsou zobrazeny na Obr. 5.6, pro lepší vizualizaci průměrných hodnot přežití S [%] a jejich směrodatných odchylek σ_s bylo použito offsetu. Křivky buněčného přežití byly vykresleny pomocí programovacího jazyka Python. Parametry prokladu α a β LQ modelu jsou zaznamenány v Tab.5.22.

D [Gy]	S [%]	σ_s [%]
0	100,00	21,4
1	77,31	14,6
2	45,28	8,7
4	28,79	5,2
6	9,36	2,0

Tabulka 5.18: Průměrné přežití S a směrodatné odchytky σ_s pro kontrolní vzorek

D [Gy]	S [%]	σ_s [%]
0	100,00	20,3
1	72,15	12,7
2	44,42	8,2
4	25,49	4,8
6	7,96	1,5

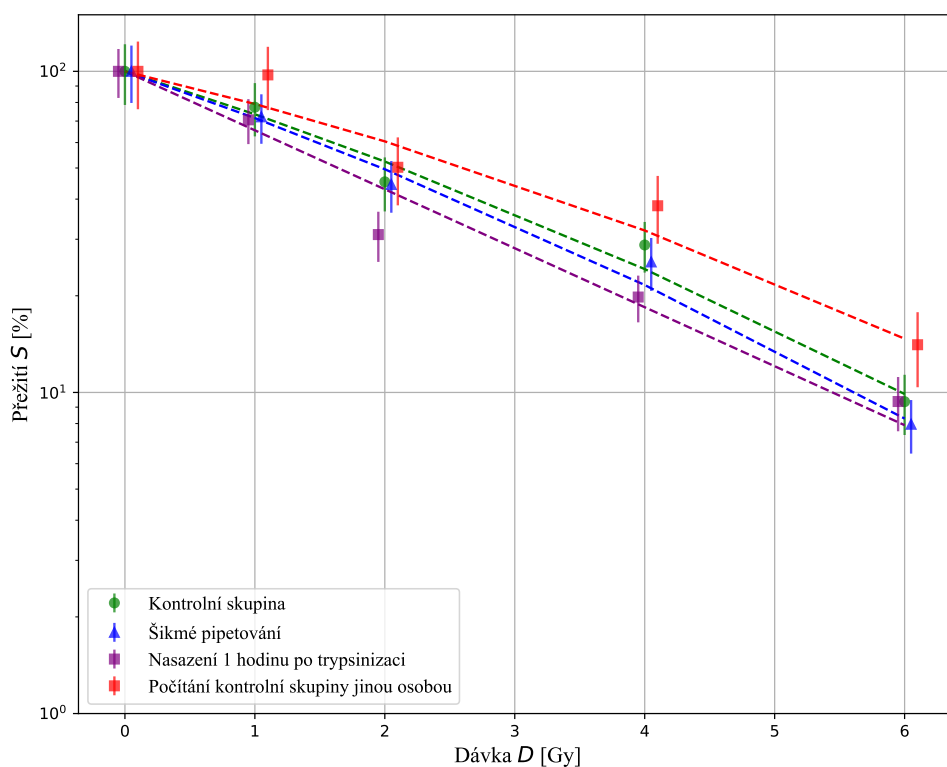
Tabulka 5.19: Průměrné přežití S a směrodatné odchytky σ_s pro šikmé pipetování

D [Gy]	S [%]	σ_s [%]
0	100,00	17,4
1	70,63	11,3
2	31,02	5,5
4	19,82	3,3
6	9,37	1,8

Tabulka 5.20: Průměrné přežití S a směrodatné odchylky σ_s pro nasazení vzorku 1 h po trypsinizaci

D [Gy]	S [%]	σ_s [%]
0	100,00	23,8
1	97,48	21,8
2	50,26	12,1
4	38,14	9,1
6	14,08	3,7

Tabulka 5.21: Průměrné přežití S a směrodatné odchylky σ_s pro počítání kontrolního vzorku jinou osobou



Obrázek 5.6: Křivky buněčného přežití pro kontrolní skupinu, šikmé pipetování, vzorek, který byl nasazen 1 hodinu po trypsinizaci a pro počítání kontrolní skupiny jinou osobou s prokladem pomocí LQ modelu (vztah 4.1)

	α [Gy ⁻¹]	β [Gy ⁻²]	α/β [Gy]
Kontrolní skupina	$0,292 \pm 0,096$	$0,016 \pm 0,018$	18,250
Šikmé pipetování	$0,319 \pm 0,093$	$0,016 \pm 0,018$	19,938
Nasazení 1 hodinu po trypsinizaci	$0,423 \pm 0,080$	$6,3 \cdot 10^{-17} \pm 0,017$	$6,7 \cdot 10^{15}$
Počítání kontrolní skupiny jinou osobou	$0,217 \pm 0,120$	$0,017 \pm 0,023$	12,765

Tabulka 5.22: Zjištěné hodnoty parametrů α , β a jejich poměru α/β získané prokladem pomocí vztahu 4.1

Pro určení statistické významnosti simulovaných laboratorních chyb byla provedena dvoufaktorová ANOVA analýza jejíž princip byl popsán v 5.2.4, výsledky jsou

zaznamenány v Tab. 5.23.

Šikmé pipetování		
faktor	F-statistika	p-hodnota
Dávka	134,58	$1,19 \cdot 10^{-8}$
Skupina	0,58	0,4645
Dávka-Skupina	0,11	0,9768
Nasazení 1 hodinu po trypsinizaci		
faktor	F-statistika	p-hodnota
Dávka	140,47	$9,66 \cdot 10^{-9}$
Skupina	4,55	0,0588
Dávka-Skupina	0,95	0,4742
Počítání kontrolního vzorku dvěma různými lidmi		
faktor	F-statistika	p-hodnota
Dávka	26,56	$2,6 \cdot 10^{-5}$
Skupina	1,49	0,25
Dávka-Skupina	0,28	0,882

Tabulka 5.23: Výsledky dvoufaktorové ANOVA analýzy

Velmi vysoká hodnota F-statistiky a velmi nízká p-hodnota pro faktor dávky potvrzuje pro všechny laboratorní chyby, že efekt dávky je statisticky velmi významný pro buněčné přežití.

Nízké hodnoty F-statistiky a p-hodnoty vyšší, než je práh statistické významnosti pro faktor skupiny poukazují na statistickou nevýznamnost simulovaných laboratorních chyb pro buněčné přežití.

Velmi nízké hodnoty F-statistiky a vysoké p-hodnoty pro faktor interakce mezi dávkou a skupinou potvrzují, že interakce simulovaných laboratorních chyb s dávkou nemají statisticky významný vliv na přežití buněk.

5.4 Cena experimentu

Experiment byl navržen tak, aby byla co nejvíce minimalizována spotřeba chemikálií i plastových pomůcek. Z tohoto důvodu bylo pro každé opakování použito pouze 5 kultivačních lahvíček, z jejichž obsahu byly následně simulovány laboratorní chyby.

Taktéž byla snížena spotřeba použitých tub, jelikož byl kontrolní vzorek, chyba šikmého pipetování a nasazení vzorku 1 hodinu po trypsinizaci nasazována ze stejné tuby.

V Tab. 5.24 a 5.25 jsou zaznamenané odhady počtů použitých plastových pomůcek a odhady ml použitých chemikálií a jejich ceny.

Šestijamkové kultivační destičky			Kultivační lahvičky T25		
	Cena [Kč]	Kusů		Cena [Kč]	Kusů
Nakoupeno	8200	126	Nakoupeno	9607	360
Použito	4881	75	Použito	480	18
Kultivační lahvičky T75			Pipetové špičky 10 μ l		
	Cena [Kč]	Kusů		Cena [Kč]	Kusů
Nakoupeno	5033	100	Nakoupeno	2891	960
Použito	453	9	Použito	813	270
Pipetové špičky 100 μ l			Serologické pipety 10 ml		
	Cena [Kč]	Kusů		Cena [Kč]	Kusů
Nakoupeno	2891	960	Nakoupeno	798,6	200
Použito	542	180	Použito	276	69
Serologické pipety 25 ml			Serologické pipety 5 ml		
	Cena [Kč]	Kusů		Cena [Kč]	Kusů
Nakoupeno	1669,8	150	Nakoupeno	1076	200
Použito	111	10	Použito	226	42
Tuby			Tuby na Muse		
	Cena [Kč]	Kusů		Cena [Kč]	Kusů
Nakoupeno	2420	500	Nakoupeno	395,67	1000
Použito	232	48	Použito	14	36

Tabulka 5.24: Použité plastové pomůcky a jejich ceny

Dále bylo použito přibližně 102 rukavic za cenu **105 Kč**. Použité plastové pomůcky stály přibližně **8 133 Kč**.

ICF Muse			Count and Viability Muse		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	3025	100	Nakoupeno	15100	240
Použito	363	12	Použito	126	2
System Check Muse			PBS		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	10000	55	Nakoupeno	613,5	500
Použito	1310	7,2	Použito	246	200
Trypsin			MEM		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	1185	100	Nakoupeno	278,3	500
Použito	711	60	Použito	1559	2800
FBS			SPS		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	9111	500	Nakoupeno	498,89	100
Použito	5103	280	Použito	140	28
NEAA			PEN/STREP		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	1057,54	100	Nakoupeno	495	100
Použito	297	28	Použito	139	28
L-glu			Etanol - sterilizace		
	Cena [Kč]	kusů		Cena [Kč]	[ml]
Nakoupeno	255,8	100	Nakoupeno	715	1000
Použito	72	28	Použito	715	1000
Metanol			Crystal Violet		
	Cena [Kč]	[ml]		Cena [Kč]	[g]
Nakoupeno	415,85	2500	Nakoupeno	3518	100
Použito	59	350	Použito	62	1,75

Tabulka 5.25: Použité chemikálie a jejich ceny

Použité chemikálie stály přibližně **10 902 Kč**.

Používaná buněčná linie U251 stojí přibližně 30 000 Kč. Buňky byly k dispozici na Oddělení dozimetrie záření a cena se nedá tedy přesně vyčíslit. Kobaltový oza-

řovač byl taktéž dispozici a proto není možné přesně vyčíslit ani cenu za ozařování. Dále nebyl započítán čas konzultantky.

Celková cena experimentu bez započtení vody, energií, ozařování, ceny buněk a času konzultantky byla přibližně **19 035 Kč**.

5.5 Diskuze výsledků

Výstupem experimentální části jsou křivky buněčného přežití pro kontrolní vzorek a jednotlivé simulované laboratorní chyby a následná statistická analýza vlivu simulovaných laboratorních chyb. Výsledné křivky buněčného přežití byly sestaveny pro průměrné přežití S z 2. a 3. opakování pro kontrolní vzorek a jednotlivé laboratorní chyby a jsou zobrazeny na Obr. 5.6, parametry α a β získané pomocí prokladu LQ modelem jsou zaznamenány v Tab.5.22. První opakování bylo ze zpracování dat vynecháno, protože sloužilo primárně k naučení práce v laboratoři a práce s buňkami. Vlivem nezkušenosti byly při prvním opakování zřejmě způsobeny různé náhodné chyby, čemuž napovídají i hodnoty vypočteného přežití S .

V Tab. 5.8 a 5.9 je vidět, že při druhém opakování došlo k nulovému přežití neozářených vzorků, což dále znemožnilo statistické vyhodnocení vlivu ředění vzorku. Nulové přežití bylo s největší pravděpodobností způsobeno nepromícháním vzorku před jeho nasazováním do kultivačních destiček. Před nasazením vzorků do kultivačních destiček je nutné vzorek v tubě řádně promíchat, aby byl co nejvíce homogenní a buňky nebyly usazené na dně, jelikož byly vzorky pipetou nasávány z několika milimetrů pod hladinou. V Tab. 5.6, 5.11, 5.12 a 5.17 jsou vidět velké rozdíly v počtech kolonií při počítání kontrolního vzorku dvěma různými lidmi. To je zřejmě způsobeno mou nezkušeností s počítáním kolonií a nevhodným určením referenční kolonie pod mikroskopem, podle které byly dále započítávány kolonie i u ostatních vzorků. Počítání kolonií bylo ztíženo pozadím v jamkách kultivačních destiček, které vzniklo barvením, kvůli tomuto pozadí byly u některých vzorků jednotlivé kolonie od sebe špatně rozlišitelné.

Pro určení statistické významnosti simulovaných laboratorních chyb na buněčné přežití byla provedena dvoufaktorová ANOVA analýza. Výsledky potvrdily, že dávka D je významným faktorem, který ovlivňuje buněčné přežití, což prokázala velmi nízká p -hodnota. Naopak, p -hodnoty pro jednotlivé skupiny, které vyjadřovaly zkoumané laboratorní chyby, byly vyšší než 0,05, což je obvyklý práh významnosti. Vyšší p -hodnoty naznačují, že tyto faktory neměly statisticky významný vliv na výsledné

přežití buněk.

I když nebyla prokázána statistická významnost simulovaných laboratorních chyb na buněčné přežití, laboratorní chyby měly vliv na výsledné parametry α , β i jejich poměr α/β , které byly získány sestavením křivek buněčného přežití pomocí LQ modelu. Z Tab. 5.22 je vidět, že nejvíce se parametry liší pro nasazení vzorku 1 hodinu po trypsinizaci, kde je hodnota parametru β o 15 řádů nižší, než bylo očekáváno. Zjištěné hodnoty parametrů pro ostatní laboratorní chyby také nejsou v souladu s parametry získanými měřeními na Oddělení dozimetrie záření. Parametr α se od očekávané hodnoty liší o 8,9 - 38 %, parametr β o 60 - 70 % a poměr α/β o 43,1 - 63,5 %. Nesoulad parametrů pro kontrolní skupinu s očekávanou hodnotou z měření na Oddělení dozimetrie záření je pro parametr α 16,6 %, pro β 60 % a pro poměr α/β 47,9 %. Pro kontrolní skupinu i všechny simulované laboratorní chyby byl výsledný poměr α/β vyšší, než 10 Gy, což znamená, že se jedná o radiorezistentní buňky, což je v souladu s tím, že buňky glioblastomů jsou obecně radiorezistentní.

Obecně se hodnoty zjištěných parametrů α , β a α/β mezi pracovišti liší, v odborné literatuře byly nalezeny hodnoty $\alpha = (0,33 \pm 0,15) \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = (0,09 \pm 0,03) \text{ Gy}^{-2}$ [56] a $\alpha = (0,109 \pm 0,011) \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = (0,0411 \pm 0,0023) \text{ Gy}^{-2}$ [57]. Dále $\alpha = (0,425 \pm 0,047) \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = (0,018 \pm 0,007) \text{ Gy}^{-2}$ [58], které byly určeny pro ozařování svazkem 6X, což je srovnatelné s ozařováním na kobaltovém ozařovači.

Pro další porovnání zjištěných parametrů α a β je možné porovnat hodnoty BED (popsáno v kapitole 4.3) pro jednotlivé vzorky se simulovanými laboratorními chybami i hodnotami nalezenými v odborné literatuře. Vypočítané hodnoty BED jsou v Tab.5.26, kde pro výpočty BED byla použita celková dávka $D = 60 \text{ Gy}$ při 2 Gy na 1 frakci.

	α	β	α/β	BED
Oddělení dozimetrie záření	0,350	0,010	35,000	63,429
Kontrolní skupina	0,292	0,016	18,250	66,575
Šikmé pipetování	0,319	0,016	19,938	66,011
Nasazení 1 hodinu po trypsinizaci	0,423	$6,3 \cdot 10^{-17}$	$6,7 \cdot 10^{15}$	60,000
Počítání kontrolní skupiny jinou osobou	0,217	0,017	12,765	69,470
<i>Petras M.</i> [56]	0,330	0,090	3,667	92,727
<i>Shridhar R.</i> [57]	0,109	0,041	2,652	105,248
<i>Howard M.</i> [58]	0,425	0,018	23,611	65,082

Tabulka 5.26: Parametry α , β , poměr α/β a vypočtené hodnoty BED pro parametry získané na Oddělení dozimetrie záření, v této práci a z odborné literatury [56], [57] a [58]

Z hodnot poměru α/β v odborné literatuře [56], [57] by byla glioblastomová buněčná linie U251 zařazena mezi radiosenzitivní, čemuž odpovídají i vypočtené hodnoty BED. Ale glioblastomy jsou obecně radiorezistentní, tomu odpovídají vypočtené hodnoty BED pro hodnoty parametrů LQ modelu z odborné literatury [58], pro měření na Oddělení dozimetrie záření i pro všechny zkoumané laboratorní chyby, kde jsou hodnoty BED nižší, což znamená nižší radiosenzitivitu.

Takto rozdílné výsledky parametrů poukazují na důležitost nastavení parametrů léčby na základě individuální radiosenzitivity pacientů, což v současnosti není běžná praxe. Individualizace radioterapie na základě parametrů LQ modelu z buněk získaných pomocí biopsie by zřejmě nebyla dostatečně vypovídající, vzhledem k tomu, že se parametry LQ modelu stejné buněčné linie mezi pracovišti výrazně liší.

Velmi důležitým faktorem, který ovlivnil výsledky experimentu, je práce se vzorky. S buňkami je potřeba pracovat rychle, zejména při nasazování do kultivačních destiček. Sedimentace buněk ke dnu ve vzorku způsobuje rozdílnou koncentraci buněk ve vzorku. Při pomalém nasazování buněk do kultivačních destiček byly vlivem sedimentace buněk do jednotlivých jamek nasazeny rozdílné koncentrace buněk, což následně způsobilo fluktuace v počtech vytvořených kolonií. Pomalá práce se vzorky ovlivnila i zkoumání vlivu nasazení vzorku 1 hodinu po trypsinizaci, jelikož u některých vzorků došlo také k nasazení v delším časovém úseku.

Závěr

Tato bakalářské práce se věnuje vlivu laboratorních chyb na křivky buněčného přežití v radiobiologii.

První čtyři kapitoly práce jsou věnovány rešerši. Jsou shrnuty informace o živočišných buňkách, DNA, jaderných procesech a buněčném cyklu. Dále je popsáno ionizující záření a jeho vliv na buňky. Jsou popsány různé typy poškození ionizujícím zářením, reparační procesy a buněčná smrt. V poslední rešeršní kapitole je popsán klonogenní test, který je zlatým standardem pro určení klonogenního přežití v radiobiologii, dále lineárně-kvadratický model křivek buněčného přežití a jeho využití v radioterapii a laboratorní chyby, které mohou mít vliv, na výsledky klonogenních testů.

Experimentální část práce se věnuje analýze vlivu laboratorních chyb na křivky buněčného přežití. Byl prováděn klonogenní test, v jehož průběhu byly simulovány chyby šikmého pipetování, různého rozředění vzorku, nasazení 1 hodinu po trypsinizaci a dále byl zkoumán vliv počítání kolonií dvěma různými lidmi. Klonogenní test proveden celkem třikrát, ale výsledky prvního opakování nebyly využity k další analýze. Při druhém opakování došlo k nulovému přežití neozářených vzorků pro rozředění $5\times$ a $10\times$, což znemožnilo provedení statistické analýzy pro tyto simulované laboratorní chyby. Byla provedena dvoufaktorová ANOVA analýza, pro určení statistického významu šikmého pipetování, nasazení vzorků 1 hodinu po trypsinizaci a počítání kolonií kontrolního vzorku dvěma různými lidmi. Nebyl prokázán statisticky významný vliv těchto simulovaných laboratorních chyb na buněčné přežití. Laboratorní chyby ale měly vliv na parametry α , β i jejich poměr α/β , což jsou parametry, které se používají při radioterapii a mají vliv na výslednou léčbu. Zjištěné parametry α , β i jejich poměr α/β se neshodují s hodnotami získanými měřeními na Oddělení dozimetrie záření ani s hodnotami z odborné literatury.

Bibliografie

1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Essential Cell Biology*. Garland Science, 2010. ISBN 9780815341307.
2. HAVRÁNKOVÁ, Renata. *Klinická radiobiologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-4098-0.
3. VAJNER, Luděk; UHLÍK, Jiří; KONRÁDOVÁ, Václava. *Lékařská histologie I. cytologie a obecná histologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-1860-9.
4. LEHNERT, S. *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*. CRC Press, 2007. Series in Medical Physics and Biomedical Engineering. ISBN 9781420011920.
5. BALKO, Jan; TONAR, Zbyněk; VARGA, Ivan. *Memorix histologie*. 3. vyd. Praha: TRITON, 2021. ISBN 978-80-7553-874-1.
6. MURRAY, Andrew. Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 1994, roč. 6, č. 6, s. 872–876 [cit. 2023-03-09]. ISSN 0955-0674. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90059-0).
7. ULLMANN, Vojtěch. *AstroNuklFyzika* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-03-09]. Dostupné z: <https://astronuklfyzika.cz/strana2.htm>.
8. PODGORSKAK, E. B. *Radiation Physics for Medical Physicists*. First Edition. Germany: Springer, [2006]. ISBN 978-3-319-79781-6.
9. PODGORSKAK, E. B. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students* [online]. First Edition. Austria: IAEA, 2005 [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-9201073044. Dostupné z: <https://www.iaea.org/publications/7086/radiation-oncology-physics>.
10. MOTL, Alois. *Úvod do radiační chemie*. 2. vyd. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT, 2004. ISBN 80-01-02929-8.

11. JOINER, M.C.; KOGEL, A. van der. *Basic Clinical Radiobiology Fourth Edition*. Taylor & Francis, 2009. ISBN 9780340929667.
12. STEEL, G. Gordon. *Basic Clinical Radiobiology*. 3rd ed. London: Hodder Education Publishers, 2002. ISBN 0340807830.
13. *Ring chromosome* [online]. 2022. [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:202206_Ring_chromosome.svg.
14. *Rejstříkový pojem - tumor-supresorový gen* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2913>.
15. *Rejstříkový pojem - nestabilita genomu* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: <https://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=1632188%5C&type=3>.
16. CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017, roč. 58, č. 5, s. 235–263.
17. LI, Lei; STORY, Michael; LEGERSKI, Randy J. Cellular responses to ionizing radiation damage. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* [online]. 2001, roč. 49, č. 4, s. 1157–1162 [cit. 2023-12-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360301600015248>.
18. HALL, E.J.; GIACCIA, A.J. *Radiobiology for the Radiologist*. Wolters Kluwer Health, 2012. ISBN 9781451154184.
19. VAUX, David L; KORSMEYER, Stanley J. Cell Death in Development. *Cell* [online]. 1999, roč. 96, č. 2, s. 245–254 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0092-8674. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80564-4).
20. LAWEN, Alfons. Apoptosis—an introduction. *Bioessays* [online]. 2003, roč. 25, č. 9, s. 888–896 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12938178/>.
21. GOLSTEIN, Pierre; KROEMER, Guido. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2007, roč. 32, č. 1, s. 37–43 [cit. 2023-04-10]. ISSN 0968-0004. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>.
22. DIMRI, Goberdhan P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell* [online]. 2005, roč. 7, č. 6, s. 505–512 [cit. 2023-04-10]. ISSN 1535-6108. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.05.025>.

23. RABINOWITZ, Joshua D.; WHITE, Eileen. Autophagy and Metabolism. *Science* [online]. 2010, roč. 330, č. 6009, s. 1344–1348 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z DOI: 10.1126/science.1193497.
24. ŠÍPEK, Antonín. *Genetika - Biologie* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/mutace>.
25. WILSON, George D. Radiation and the cell cycle, revisited. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004, roč. 23, s. 209–225. Dostupné také z: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:CANC.0000031762.91306.b4>.
26. ŠÍP, Miroslav. *Molekulární radiobiologie*. 2007. Dostupné také z: https://www.zsf.jcu.cz/images/ZSF/fakulta/ustavy/urt/pro-studenty/radiologicky-asistent/sipmolekularni-radiobiologie_1ra.pdf.
27. FRANKEN, Nicolaas AP; RODERMOND, Hans M; STAP, Jan; HAVEMAN, Jaap; VAN BREE, Chris. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* [online]. 2006, roč. 1, č. 5, s. 2315–2319 [cit. 2023-10-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.
28. BRASELMANN, Herbert; MICHNA, Agata; HESS, Julia; UNGER, Kristian. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation oncology* [online]. 2015, roč. 10, s. 1–6 [cit. 2023-10-27]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0529-y>.
29. MCMAHON, Stephen Joseph. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges [online]. 2018, roč. 64, č. 1, 01TR01 [cit. 2023-10-27]. Dostupné z DOI: 10.1088/1361-6560/aaf26a.
30. VAN LEEUWEN, CM; OEI, AL; CREZEE, J; BEL, A; FRANKEN, NAP; STALPERS, LJA; KOK, HP. The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies. *Radiation oncology* [online]. 2018, roč. 13, č. 1, s. 1–11 [cit. 2023-10-27]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/325189293_The_alfa_and_beta_of_tumours_A_review_of_parameters_of_the_linear-quadratic_model_derived_from_clinical_radiotherapy_studies.
31. FOWLER, John F. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1989, roč. 62, č. 740, s. 679–694. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1259/0007-1285-62-740-679>.
32. HYNKOVÁ, Ludmila; ŠLAMPA, Pavel. *Základy radiační onkologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2012. ISBN 978-80-210-6061-6.

33. DALE, Roger. Use of the linear-quadratic radiobiological model for quantifying kidney response in targeted radiotherapy. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2004, roč. 19, č. 3, s. 363–370. Dostupné z DOI: 10.1089/1084978041425070.
34. *Good Pipetting Practice (Správná pipetovací praxe)* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-25]. Dostupné z: <https://www.mt.com/cz/cs/home/products/pipettes/pipette/pipetting-techniques.html>.
35. BARÁNKOVÁ, Jana. Základní principy pipetování [online]. [B.r.] [cit. 2023-11-25]. ISBN 978-80-7375-961-2. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/skoleni/SKK_4_2014_sbornik.pdf.
36. BRIX, Nikko; SAMAGA, Daniel; HENNEL, Roman; GEHR, Katharina; ZITZELSBERGER, Horst; LAUBER, Kirsten. The clonogenic assay: robustness of plating efficiency-based analysis is strongly compromised by cellular cooperation. *Radiation Oncology*. 2020, roč. 15, s. 1–12. Dostupné také z: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13014-020-01697-y>.
37. MACKEY, Michael A; ROTI, Joseph L Roti. A model of heat-induced clonogenic cell death. *Journal of theoretical biology*. 1992, roč. 156, č. 2, s. 133–146. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519305806691>.
38. QUINN, Peter J. Effects of temperature on cell membranes. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1988, roč. 42, s. 237–258. Dostupné také z: <https://europepmc.org/article/med/3077859>.
39. STANWAY-WILLIAMS, Caitlin. Colony counting in a clonogenic assay: The cost of human error [online]. [B.r.] [cit. 2023-11-27]. Dostupné z: <https://automata.tech/blog/colony-counting-in-a-clonogenic-assay-the-cost-of-human-error/>.
40. *Cell Line : CVCL_0021 (U-251MG) Homo sapiens* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-24]. Dostupné z: <https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/cellline/main.html?id=21113379>.
41. *U-251 MG Glioblastoma Cell Line* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-24]. Dostupné z: <https://www.kerafast.com/item/857/u-251-mg-glioblastoma-cell-line>.

42. CASTRO, M.G; COWEN, R; WILLIAMSON, I.K; DAVID, A; JIMENEZ-DALMARONI, M.J; YUAN, X; BIGLIARI, A; WILLIAMS, J.C; HU, J; LOWENSTEIN, P.R. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacology Therapeutics* [online]. 2003, roč. 98, č. 1, s. 71–108 [cit. 2023-11-24]. ISSN 0163-7258. Dostupné z DOI: [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00014-7](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00014-7).
43. WIRSCHING, Hans-Georg; WELLER, Michael. Glioblastoma. In: *Malignant Brain Tumors : State-of-the-Art Treatment* [online]. Ed. MOLITERNO GUNEL, Jennifer; PIEPMEIER, Joseph M; BAEHRING, Joachim M. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 265–288 [cit. 2023-11-24]. Dostupné z DOI: [10.1007/978-3-319-49864-5_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49864-5_18).
44. OMURO, Antonio; DEANGELIS, Lisa M. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* [online]. 2013, roč. 310, č. 17, s. 1842–1850 [cit. 2023-11-24]. ISSN 0098-7484. Dostupné z DOI: [10.1001/jama.2013.280319](https://doi.org/10.1001/jama.2013.280319).
45. *Muse™ Cell Analyzer - User's Guide* [online]. EMD Millipore Corporation, 2012 [cit. 2023-11-26]. Dostupné z: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/instruments/muse/Muse%5C%20Cell%5C%20Analyzer%5C%20-%5C%200500-3115.pdf>.
46. PABST, W.; GREGOROVÁ, E. *Studijní materiál - Charakterizace částic a částicových soustav* [online]. VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2023-11-26]. Dostupné z: http://old.vscht.cz/sil/keramika/Characterization_of_particles/CPPS%5C%20_Czech%5C%20version_.pdf.
47. *Minimum Essential Medium (MEM)* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/mem.html>.
48. *Fetal Bovine Serum* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://www.eastport.cz/cz/eshop/produkt/18959/fetal-bovine-serum-collected-in-south-america>.
49. *Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://www.capricorn-scientific.com/en/shop/penicillin-streptomycin-pen-strep-100x~p1205>.

50. *GlutaMAX Supplement and L-Glutamine for Cell Culture* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/media-supplements/glutamax-media.html>.
51. *Non-Essential Amino Acid (NEAA) Cell Culture Supplement* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-22]. Dostupné z: <https://www.cyagen.com/us/en/product/non-essential-amino-acid-cell-culture-supplement-100ml.html>.
52. *Sodium Pyruvate*. [B.r.]. Dostupné také z: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11360070>.
53. *Trypsin Cell Dissociation Protocol* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-dissociation-with-trypsin>.
54. *Cell Dissociation and Trypsin for Cell Culture* [online]. [B.r.]. [cit. 2023-11-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/reagents/cell-dissociation.html>.
55. FEOKTISTOVA, Maria; GESERICK, Peter; LEVERKUS, Martin et al. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb Protoc* [online]. 2016, roč. 2016, č. 4, s. 343–6 [cit. 2023-11-24]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27037069/>.
56. PETRAS, Miklos; LAJTOS, Tamas; FRIEDLÄNDER, Elza; KLEKNER, Almos; PINTYE, Eva; FEUERSTEIN, Burt G; SZÖLLŐSI, János; VEREB, György. Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin-b1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt-mediated in vitro radioresistance. *Neuro-oncology* [online]. 2013, roč. 15, č. 8, s. 1027–1040 [cit. 2024-01-04]. Dostupné z DOI: 10.1093/neuonc/not046.
57. SHRIDHAR, Ravi; ESTABROOK, William; YUDELEV, Mark; RAKOWSKI, Joseph; BURMEISTER, Jay; WILSON, George D; JOINER, Michael C. Characteristic 8 keV X rays possess radiobiological properties of higher-LET radiation. *Radiation research* [online]. 2010, roč. 173, č. 3, s. 290–297 [cit. 2024-01-04]. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1667/RR1782.1>.

58. HOWARD, Michelle; BELTRAN, Chris; SARKARIA, Jann; HERMAN, Michael G. Characterization of relative biological effectiveness for conventional radiation therapy: a comparison of clinical 6 MV X-rays and ¹³⁷Cs. *Journal of radiation research* [online]. 2017, roč. 58, č. 5, s. 608–613 [cit. 2024-01-04]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jrr/article/58/5/608/3749372>.

Seznam použitých zkratek

A Adenin

AMK Aminokyselina

ANOVA Analysis of Variance

ATP Adenosintrifosfát

BED Biologicky efektivní dávka

BER Bazová excizní reparace

C Cytosin

DDR DNA Damage Response

DNA Deoxyribonukleová kyselina

DSB Double Strand Break, dvojný zlom

ER Endoplazmatické retikulum

EQD2 Ekvivalentní dávka s dávkou 2 Gy na frakci

FBS Fetal bovine serum

G Guanin

HR Homologní rekombinace

IZ Ionizující záření

L-glu L-glutamine

LQ model Lineárně-kvadratický model

LQC model Lineárně-kvadratický-kubický model

LET Lineární přenos energie

MEM Minimum Essential Medium

MMR Mismatch Repair

mtDNA Mitochondriální DNA

mRNA Informační RNA

M fáze Fáze dělení

NHEJ Non-homologous End-joining

NEAA Non-Essential Amino Acids Solution

PBS Phosphate Buffered Saline

PEN/STREP Penicillin/Streptomycin

PET Pozitronová emisní tomografie

RNA Ribonukleová kyselina

ROS Reactive Oxygen Species

RBE Relative Biological Effectiveness

rRNA Ribozomální RNA

SPS Sodium Pyruvate

SSB Single Strand Break, jednoduchý zlom

T Thymin

tRNA Transferová RNA

U Uracil