

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Lenka Fikejzlová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Modulace poškozené střevní sliznice ionizujícím zářením pomocí růstového
faktoru IGF-1

Bc. Lenka Fikejzlová

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Lenka Fikejzlová
Osobní číslo: C17419
Studijní program: N3912 Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Analýza biologických materiálů
Název tématu: Modulační poškození střevní sliznice vyvolané ionizujícím zářením pomocí IGF-1.
Zadávací katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu". V úvodu práce charakterizujte typy ionizujícího záření a jeho vliv na střevní sliznici.
2. Charakterizujte molekulu IGF-1 a signální dráhy jeho účinku.

Experimentální část:

1. Zhodnocení přežívání myši po téměř celotělovém ozáření (krytí hlavy) bez léčby a s léčbou růstovým faktorem IGF-1 po ozáření 14, 15 a 16 Gy.
2. Zhodnocení vlivu IGF-1 na morfologické poškození jednotlivých částí tenkého (duodenum, jejunum, ileum) a tlustého střeva (colon transversum) u tohoto modelu po ozáření 12 a 14 Gy.
3. Zhodnocení vlivu IGF-1 na změny krevního obrazu u tohoto modelu po ozáření 12 a 14 Gy.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.**
Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
v Hradci Králové

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice mám právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2019

Bc. Lenka Fikejzlová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své rodině za morální i materiální podporu po celou dobu mého studia a tvorby mé diplomové práce.

Dále děkuji paní Šárce Průchové za zhotovení laboratorních preparátů a cenné rady. Další poděkování bych ráda věnovala i ostatnímu personálu radiobiologického ústavu Fakulty vojenského zdravotnictví za veškerou ochotu a podporu, kterou projevili v průběhu mé práce.

Nakonec musím poděkovat svému vedoucímu diplomové práce pplk. doc. MUDr. Jaroslavovi Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za odborné vedení a zkušenosti, které mi byly předány.

ANOTACE

Tato diplomová práce se v teoretické části zaměřuje na popis druhů ionizujícího záření, akutní nemoci z ozáření, poškození střevní sliznice a charakterizuje vlastnosti zvoleného růstového faktoru IGF-1.

Experimentální část je zaměřena na zhodnocení vlivu růstového faktoru na sliznici poškozenou ionizujícím zářením.

KLÍČOVÁ SLOVA

Střevní sliznice, gama záření, inzulínu podobný faktor 1.

TITLE

Modulation of damaged intestinal mucosa by ionizing radiation using growth factor IGF-1.

ANNOTATION

The theoretical part of diploma thesis focuses on description of ionizing radiation types, acute radiation syndrome, intestinal mucosa damage and characterizes functions of selected growth factor IGF-1 and itself.

The experimental part is focused on the effect of growth factor on the mucosa damaged by ionizing radiation.

KEYWORDS

Intestinal mucosa, gamma radiation, insulin-like factor 1

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ÚVOD	16
1 Teoretická část	17
1.1 Ionizující záření.....	17
1.1.1 Rozdělení ionizujícího záření.....	17
1.1.2 Účinky ionizujícího záření.....	21
1.1.3 Nemoc z ozáření.....	23
1.1.4 Léčba akutní nemoci z ozáření.....	28
1.2 IGF-1.....	29
1.2.1 Výskyt v organismu.....	30
1.2.2 Struktura.....	31
1.2.3 Funkce.....	32
1.2.4 Mechanismus účinku.....	33
1.2.5 Signální dráhy aktivované IGF-1.....	34
1.2.6 Účinky ionizujícího záření.....	35
2 Cíle diplomové práce	37
3 Experimentální část	38
3.1 Pokusná zvířata.....	38
3.2 Zdroj záření.....	38
3.3 Způsob ozáření experimentálních zvířat.....	38
3.4 Experimentální modely.....	39
3.4.1 Experimentální model 1.....	39
3.4.2 Experimentální model 2.....	40
3.5 Analýza krve.....	41
3.6 Histologické vyšetření tkání střeva.....	41
3.6.1 Zhotovení preparátů.....	42
3.7 Hodnocení preparátů.....	45
3.7.1 Histopatologický stav sliznice.....	46
3.7.2 Počet klků a viabilních krypt.....	47
3.7.3 Morfometrická analýza.....	47
3.8 Statistická analýza.....	47
4 Výsledky	48

4.1	Experimentální model 1 (vliv IGF-1 na přežívání zvířat).....	48
4.2	Experimentální model 2	51
4.2.1	Duodenum.....	51
4.2.2	Jejunum.....	58
4.2.3	Ileum	64
4.2.5	Krevní obraz	71
4.2.6	Celkové zhodnocení signifikantních změn.....	74
5	Diskuze	77
6	Závěr	82
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.	48
Graf 2. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 15 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.	49
Graf 3. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 16 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.	49
Graf 4. Míra atrofie histopatologického skóre v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	51
Graf 5. Rozsah erozí v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	52
Graf 6. Intenzita otoku v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	53
Graf 7. Stupeň zánětu v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	53
Graf 8. Celkové histopatologické skóre v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	54
Graf 9. Počet klků v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	55
Graf 10. Délka klků v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	55
Graf 11. Počet viabilních krypt v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	56
Graf 12. Hloubka krypt v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	57
Graf 13. Míra atrofie histopatologického skóre v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	58
Graf 14. Rozsah erozí v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	59

Graf 15. Intenzita otoku v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	59
Graf 16. Stupeň zánětu v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	60
Graf 17. Celkové histopatologické skóre v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	61
Graf 18. Počet klků v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	61
Graf 19. Délka klků v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	62
Graf 20. Počet viabilních krypt v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	63
Graf 21. Hloubka krypt v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	64
Graf 22. Míra atrofie histopatologického skóre v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	65
Graf 23. Rozsah erozí v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	65
Graf 24. Intenzita otoku v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	66
Graf 25. Stupeň zánětu v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	67
Graf 26. Celkové histopatologické skóre v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	67
Graf 27. Počet klků v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	68
Graf 28. Délka klků v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	69
Graf 29. Počet viabilních krypt v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	70

Graf 30. Hloubka krypt v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	70
Graf 31. Počet erytrocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	71
Graf 32. Počet trombocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	72
Graf 33. Počet lymfocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	73
Graf 34. Počet monocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	73
Graf 35. Počet neutrofilů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.	74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Kategorie ionizujícího záření (Daniel, 2011).	18
Tabulka 2. Rozdělení tkání a orgánů dle radiosenzitivity (Rosina <i>et al.</i> , 2013).	23
Tabulka 3. Klinické symptomy v závislosti na dávce ionizujícího záření (Dicarlo <i>et al.</i> , 2011; Dörr a Meineke, 2011).	24
Tabulka 4. Rozdělení skupin laboratorních myší v experimentu 1.	39
Tabulka 5. Rozdělení skupin laboratorních myší v experimentu 2.	40
Tabulka 6. Místo odběru vzorků střeva	41
Tabulka 7. Průběh odvodnění odebraných vzorků v tkáňovém procesoru.	42
Tabulka 8. Průběh odparafinování preparátů.	43
Tabulka 9. Složení roztoku Gill hematoxylin.....	44
Tabulka 10. Průběh diferenciacce a oplachu diferencovaných preparátů.	44
Tabulka 11. Barvení eozinem a odvodnění preparátů.	45
Tabulka 12. Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované oproti ozářené, neléčené skupině při dávce 12 Gy v experimentálním modelu 2.	75
Tabulka 13. Signifikantní změny střevních parametrů pozorované oproti ozářené, neléčené skupině při dávce 14 Gy v experimentálním modelu 2.	75
Tabulka 14. Signifikantní změny střevních parametrů 3dávkového režimu IGF-1 podaného s latencí proti časným 3- a 4dávkovým schémátům.	76

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1. Trojrozměrný model molekuly IGF-1 (Brzozowski <i>et al.</i> , 2002).	32
--	----

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

^{137}Cs	radioaktivní izotop Cesia
^3H	radioaktivní izotop Vodíku
^{90}Sr	radioaktivní izotop Stroncía
aISCs	aktivní střevní kmenové buňky (active intestinal stem cells)
AKT	serinthreoninová kináza PKB (thymomas of AKR mice)
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	síran hlinitý
ANO	akutní nemoc z ozáření (acute radiation syndrome)
ASCL2	komplex homologu Achaete-scute (Achaete-scute complex homolog 2)
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
Bad	pro-apoptický protein spojený s Bcl-2 (The Bcl-2-associated death promoter)
Bim	Bcl-2-podobný protein 11 (Bcl-2-like protein 11)
BMI1	mnohohřebenatý prstencový protoonkogen BMI1 (BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger)
Ca^{2+}	vápenatý iont
CDK	cyklin-dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
CNS	centrální nervový systém
CREB	transkripční faktory (cAMP response element binding protein)
CSF	faktory stimulující faktor (Colony-Stimulating factors)
CT	výpočetní tomografie (Computed tomography)
DCLK1	serinthreoninová proteinová kináza (Serine/threonine-protein kinase)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
e^-	elektronová částice
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
E_K	kinetická energie
ERK	kináza regulované extracelulárním signálem (Extracellular signal-regulated kinase)
ERK 1	kináza regulované extracelulárním signálem 1 (Extracellular signal-regulated kinase 1)
ERK 2	kináza regulované extracelulárním signálem 2 (Extracellular signal-regulated kinase 2)
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
GIT	gastrointestinální trakt

GTP	Guanosintrifosfát (Guanosine triphosphate)
HCl	kyselina chlorovodíková
HOPX	homeodománní protein (Homeodomain-only protein)
CH ₃ COOH	kyselina octová
IGF-1	Inzulínu podobný růstový faktor 1 (Insuline-like growth factor 1)
IGF-1A	izoforma IGF-1
IGF-1B	izoforma IGF-1
IGF-1C	izoforma IGF-1
IGF-1R	receptor pro inzulínu podobný růstový faktor 1
IGF-2	Inzulínu podobný růstový faktor 2 (Insuline-like growth factor 2)
IGFBP	protein vázající inzulínu podobný faktor (Insuline-like growth factor binding protein)
IGFBP 2	protein vázající inzulínu podobný faktor 2 (Insuline-like growth factor binding protein 2)
IGFBP 3	protein vázající inzulínu podobný faktor 3 (Insuline-like growth factor binding protein 3)
IGFBP 5	protein vázající inzulínu podobný faktor 5 (Insuline-like growth factor binding protein 5)
IGFBP 7	protein vázající inzulínu podobný faktor 7 (Insuline-like growth factor binding protein 7)
IGFBP 8	protein vázající inzulínu podobný faktor 8 (Insuline-like growth factor binding protein 8)
IL-3	interleukin 3
IL-6	interleukin 6
IP-12	protein indukující interferon 12 (Interferon-inducible protein-12)
IR	inzulínový receptor (insuline receptor)
IR1-4	inzulínové receptory 1-4
IS	imunitní systém
ISCs	střevní kmenové buňky (intestinal stem cells)
KIO ₃	jodičnan draselný
KRT19	keratin 19
LD50	dávka škodlivé látky, kdy mortalita testovaných organismů je rovna 50 %
LD _{50/30}	střední letální dávka

LGR5	na leucin bohatý, obsahující G-protein receptor 5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5)
LRIG1	na leucin bohatý protein s imunoglobulinům podobnými doménami (Leucine Rich Repeats And Immunoglobulin Like Domains 1)
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly (Microtubule-associated protein)
Mdm2	E3 ubiquitin-protein ligáza (Mouse double minute 2)
MIP-16	makrofágový zánětový protein 16 (Macrophage inflammatory protein-16)
MTERT	myší telomerázová reverzní transkriptáza (Mouse telomerase reverse transcriptase)
n^0	neutronová částice
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NSILA	nesupresibilní inzulínu podobná aktivita (nonsuppressible insuline-like activity)
OLFM4	Olfactomedin 4
p^+	protonová částice
p21	protein 21
p27	protein 27
P3IK	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol-3-kinase)
p53	protein 53
PDGF	růstový faktor odvozený z trombocytů (Platelet Derived Growth Factor)
PDK1	fosfoinositid-dependentní kináza 1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1)
PKB	serinthreoninová kináza
PROM1	Prominin 1
rISCs	rezervní střevní kmenové buňky (reserve intestinal stem cells)
SHP2	proteinová tyrosinová fosfatáza
SMOC2	se SPARC související modulární protein vázající vápník 2 (SPARC-related modular calcium-binding protein 2)
SOX9	transkripční faktor kódovaným genem SOX-9 (Transcription factor SOX-9 is a protein that in humans is encoded by the SOX9 gene)
STAT5B	signální převaděč a aktivátor transkripce 5B (signal transducer and activator of transcription 5B)
STH	somatotropní růstový hormon
Thr308	threonin v pozici 308 na PKB
λ	vlnová délka [m]

ÚVOD

Ionizující záření je všudypřítomné. Dávky, které může lidský organismus obdržet z přírodního pozadí, jsou však malé a nejsou životu nebezpečné. Současná doba nicméně skýtá potenciální nebezpečí v podobě jaderných hrozeb. Rizikem jsou také přírodních katastrofy. Jak ukázala nehoda ve Fukušimě v Japonsku roku 2011, jejich následkem může být poškození reaktorů v jaderných elektrárnách, únik radionuklidů a nárůst radiace v prostředí. Vždy také bude existovat možnost nehod ve výzkumných, radiologicky zaměřených nebo laboratorních. Proto je nutné zvýšit snahu o minimalizaci možných dopadů vlivu ionizujícího záření a vyvinout nové léky a postupy pro léčbu radiačních poranění.

I z těchto důvodů se tato práce zabývá vlivem růstového faktoru IGF-1 na záření poškozenou střevní sliznici. Přičemž tento růstový faktor byl zvolen hlavně pro svůj regenerační a proliferační potenciál a dostupnost v humánní medicíně.

Teoretická část diplomové práce se nejprve věnuje typům ionizujícího záření, jeho účinkům a nemoci z ozáření. Dále se tento úsek práce zaměřuje na samotný inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), jeho strukturu, biologické účinky a signální dráhy, které aktivuje.

Experimentální část práce se zabývá dvěma pokusnými modely, jež byly provedeny na myších kmene C57B1/6J. První z nich zkoumá vliv IGF-1 na přežití pokusných zvířat po jednorázovém vystavení dávkám 14, 15 a 16 Gy gama záření z kobaltového zdroje s krytím hlavy. Druhý experiment byl zaměřen na optimalizaci dávkování IGF-1. Podobně jako v prvním experimentu byly subjekty ozářeny jednorázově s přikrytím hlavy, pouze se snížily dávky ionizujícího záření na 12 a 14 Gy. Hodnocen byl histopatologický nález, morfometrická analýza útvarů střevní sliznice ve všech částech tenkého střeva a změny v krevním obraze. Výsledky práce jsou diskutovány a shrnuty v závěru diplomové práce.

1 Teoretická část

1.1 Ionizující záření

Ionizujícím zářením obecně nazýváme takové záření, jež je schopno ionizovat prostředí, jímž prochází. Má tedy potřebné kvantum energie pro odtržení neboli ionizaci elektronu e^- z elektronového obalu atomů podél své dráhy letu. Vytvoří se tak kladně nabitý iont původního atomu a elektron, který může interagovat s dalšími částicemi matrice (Bagatin a Gerardin, 2015; Boerma *et al.*, 2016; Morelli *et al.*, 2018).

Zdroje ionizujícího záření mohou být jak přírodní, tak umělé. Přírodními zdroji jsou běžně se vyskytující radionuklidy, jako je například radon, který lze sledovat v půdě, vodě nebo v urbanizované zástavbě. Takovéto nuklidy mají snahu snížit vlastní nestabilitu protonů p^+ a neutronů n^0 v jádře a samovolně se přeměňují na nuklidy s energeticky nižším a stabilnějším stavem, a to předáním přebytečné energie do okolí v podobě ionizujícího záření. V případě plynu radonu, byla s jeho zvýšeným výskytem v prostředí zaznamenána stoupající incidence rakoviny plic (Zaballa a Eidemüller, 2016).

Ionizující záření má na druhou stranu své využití v medicíně. Lze se s ním setkat především u zobrazovacích technik typu rentgenova přístroje nebo CT, či při radioterapii malignit pomocí přístrojů, jako je například Leksellův nůž. V radiodiagnostice se také využívají radiofarmaka k zobrazení orgánů, stavu jejich metabolismu nebo zobrazení malignit a jejich progresu (Rajagopalan a Heron, 2010). Zdroje ionizujícího záření užívané v medicíně mají převážně umělý charakter. Jsou jimi různé urychlovače produkující technicky urychlené elektrony a ionty, nebo jsou produkovány prostřednictvím generátorů radionuklidů (Rosina *et al.*, 2013; Šinkorová a Navrátil, 2014).

1.1.1 Rozdělení ionizujícího záření

Záření ionizuje hmotu buď přímo nebo nepřímo. Přímá ionizace značí, že na cílové atomy působí již nabitá částice. Řadíme sem α , β^+ , β^- a p^+ záření.

Jako nepřímo ionizující záření pak označujeme taková, jejichž částice či forma nemá elektrický náboj. Ionizace proběhne tak, že je nejprve předána energie záření nabitým částicím a jejich prostřednictvím jsou následně ionizovány atomy nebo excitována jádra atomů cílové hmoty. Do této kategorie patří rentgenové paprsky X, gamma γ a neutronové záření (Reisz 2014). Přehled jednotlivých druhů záření je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1. Kategorie ionizujícího záření (Daniel, 2011).

Typ záření	Složení	Náboj	Hladina energie	Průnik prostředím	
				Vzduch	Tkáň
<i>Alfa</i>	$2 p^+ + 2 n^0$	2^+	4–8 MeV	několik cm	50–70 μm
<i>Beta</i>	$e^-; e^+$	$-1; +1$	0,018 – 3 MeV	několik m	několik cm
<i>Gamma</i>	emg paprsek	-	0,01 – 2 MeV		
<i>Rentgenové</i>	emg paprsek	-	0,01 – 150 keV		
<i>Neutronové</i>	n^0	0	0,025 eV – 5 MeV		

1.1.1.1 Přímé ionizující záření

1.1.1.1.1 α záření

Zdrojem tohoto záření jsou těžké radionuklidy. Například to mohou být transuranické prvky, jako je plutonium, neptunium, uran a další prvky s protonovým číslem vyšším než 82. Toto záření charakterizuje částice α . Je to vlastně jádro helia, které je tvořené dvěma protony a dvěma neutrony bez elektronového obalu. Energie těchto částic se pohybuje řádově v megaelektrovoltech, což odpovídá počátečním rychlostem 10^7 m/s. Tato částice má při průchodu prostředím silně ionizující a excitační charakter. Na druhou stranu ale velmi rychle ztrácí svoji energii, a proto je dosah tohoto záření značně omezen (Daniel, 2011; Chauhan *et al.*, 2011; Sgouros *et al.*, 2018). Při průchodu vzduchem urazí pouze několik milimetrů a při průchodu vodou jen jejich zlomky. Když α částice dopadnou na pokožku, absorbují se v horních vrstvách epidermis (μm). Pokud by ale došlo k požití nebo vdechnutí emitoru alfa částic, jejichž energie se vstřebá jen malým objemem tkáně, biologické účinky by mohly být velmi nepříznivé. (Celik *et al.*, 2009; Seideman *et al.*, 2010). Chauhan *et al.* (2012) zkoumali vliv α záření v dávce 1,5 Gy na lidské monocytů. Bylo pozorováno signifikantní poškození DNA monocytů, zvýšení exprese proteinu indukujícího interferonu 12 (IP-12) a cévního

růstového faktoru regulujícího T-lymfocyty. K tomu navíc monocyty méně exprimovaly 4 cytokiny včetně makrofágového zánětového proteinu-16 (MIP-16) a interleukinů 2, 15 a 17.

1.1.1.1.2 β záření

Mezi emitory β záření patří produkty radioaktivního rozpadu, jako je Cesium (^{137}Cs), Stroncium (^{90}Sr), Tritium (^3H) nebo produkty rozpadu Uranu. Toto záření tvoří buď rychle letící elektrony (β^-) nebo pozitrony (β^+). β částice nejsou uvolňovány z jádra a jejich vlastní energie se pohybuje v řádově v desítkách kiloelektrovoltů až jednotkách megaelektrovoltů. Také jsou oproti α částicím lehčí a díky tomu se pohybují mnohonásobně rychleji, až přibližně 10^8 m/s. Navíc při průchodu prostředím méně ionizují a excitují. Elektrony a pozitrony tak mají mnohem větší dolet ve vzduchu (několik metrů), vodě (desítky milimetrů) i v hustších materiálech (milimetry; Donya *et al.*, 2014; Savenkov *et al.*, 2016).

β^- částice neboli elektron, při svém průletu atomy hmoty ionizuje nebo excituje. Její trajektorie není přímočará a mění se. Dolet těchto částic závisí na velikosti energie a objemové hmotnosti prostředí.

β^+ částice, či pozitron, se pohybuje po podobných drahách jako β^- částice. Když dojde k zbrzdění pozitronu, tedy ztrátě téměř veškeré jeho energie, reaguje pozitron s elektronem a nastává anihilace. Obě částice zaniknou a vytvoří se 2 gama fotony, disponující energií 511 keV, vylétající v opačných směrech (Bailey *et al.*, 2005; Rehberg-Krause a Leipner, 1999).

Pozitrony a elektrony se dají zcela odstínit buď plasty, sklem či kovovou fólií. Představují také riziko pro organismus, neboť jsou potencionálně nebezpečné pro oči a pokožku (Robson *et al.*, 2015). Expozice beta záření v porovnání se stejnou ekvivalentní dávkou γ záření má u nádorových buněk vyšší toxický a apoptický účinek, což je pravděpodobně způsobeno rozdílnou distribucí poškození deoxyribonukleové kyseliny v jádře (Kumar *et al.*, 2014).

1.1.1.2 Nepřímo ionizující záření

1.1.1.2.1 Rentgenové záření

Rentgenové záření je elektromagnetické vlnění o vlnové délce λ v rozmezí 10^{-10} – 10^{-12} metru. Vzniká jednak prostřednictvím interakcím primárních elektronů s vysokou kinetickou energií E_K a elektronovým obalem atomů hmoty (brzdná složka záření), jednak při návratu elektronů na své původní místo v obalu ionizovaných atomů (charakteristická složka záření).

Část rentgenova záření se při průchodu látkou zcela absorbuje, část je rozptýlena a zbytek látkou proniká. Absorpce rentgenového záření pak závisí na intenzitě, tloušťce a absorpčním koeficientu prostředí. Na základě schopnosti tohoto záření pronikat různými materiály rozlišujeme záření měkké s delší vlnovou délkou a záření tvrdé s kratší vlnovou délkou (Zhang *et al.*, 2017).

1.1.1.2.2 *Neutronové záření*

Neutrony nemají elektrický náboj, proto relativně dobře pronikají prostředím. Samy o sobě sice ionizaci nezpůsobují, ale destabilizují atomy, které je zachytí do jádra, čímž se z nich stanou nestabilní radionuklidy. Tímto způsobem mohou neutronové částice vyvolat radioaktivní záření u látek neradioaktivních. Tento proces je znám jako aktivace nuklidů a slouží k přípravě umělých radionuklidů. Aktivovaná jádra nuklidů pak mohou vyzařovat β i γ záření pro dosažení vlastní stability, a tím se mohou přeměnit na nové prvky (Maughan *et al.*, 1994; Raitt *et al.*, 1994).

Neutronové záření lze odstínit materiály s vysokým obsahem vodíku (voda, plast, parafín). V těchto materiálech neutrony nejprve ztrácí svoji kinetickou energii pomocí elastického nebo neelastického rozptylu a následně jsou zachyceny v jádře atomů absorpčního materiálu (Malkapur *et al.*, 2017; Milocco *et al.*, 2018).

V současné době není běžné se dostat do kontaktu s neutronovým zářením. Jeho zdrojem může být například výbuch atomových bomb (Hirošima, Nagasaki), jaderné reaktory a vzácněji některé transurany (Kalifornium). Účinek tohoto záření byl například zkoumán na myších modelech, u nichž byla potvrzena následná zvýšená incidence myeloidních leukémií, maligních lymfomů, benigních i maligních tumorů ovarií, jater, plic a žláz (IARC, 2000).

1.1.1.2.3 *γ záření*

Zdrojem gama záření mohou být produkty přírodního rozpadu uranu nebo jeho štěpné produkty jako je cesium (^{137}Cs). Zdrojem tohoto záření jsou jádra nacházející se ve vyšším excitovaném stavu. Po vyzáření kvanta fotonu v podobě γ záření se tato jádra stabilizují, aniž by došlo k přeměně původního radionuklidu na jiný prvek.

Vlnová délka γ záření se pohybuje v rozmezí 10^{-13} – 10^{-16} m. Toto elektromagnetické vlnění většinou doprovází α nebo β záření při rozpadu radionuklidů. Jeho energie je srovnatelná s energií vyzářených pozitronů a elektronů, pohybuje se však rychlostí světla, která je pro hmotné částice dle současných znalostí nedosažitelná. Průchodem prostředím

narážejí fotony do atomů a vyrážejí z nich elektrony. Pokud jim předají dostatečné kvantum energie, jsou tyto ionizované elektrony schopné dále ionizovat okolí (Praveen *et al.*, 2017; Waterman *et al.*, 2017).

Energii ztrácí gama záření v závislosti na množství vlastní energie a objemové hmotnosti prostředí, a to buď fotoefektem, Comptonovým rozptylem nebo tvorbou elektron-pozitronových (β^- - β^+) páru.

U nižších energií převažuje fotoefekt. Při fotoefektu primární foton γ záření předá veškerou svou energii elektronu prostředí. Elektron se dostane na nižší energetickou hladinu elektronového obalu vyzářením charakteristického X-záření nebo Augerova elektronu, které jsou taktéž následně absorbovány prostředím, protože úroveň jejich energie je nízká.

Tvorba β^- - β^+ páru nastává při vyšších energiích a jedná se o děj opačný anihilaci částic.

Comptonův rozptyl nastává, pokud energie záření převyšuje 1 MeV. Při Comptonově rozptylu předá primární gamma foton pouze část své energie elektronu hmoty a z části vznikne nový sekundární foton, který podléhá dalšímu Comptonovu rozptylu nebo fotoefektu (Amato *et al.*, 2017, Sakurai *et al.*, 2016).

γ záření je tedy nepřímou ionizujícím zářením, jehož dosah činí až několik set metrů v kompaktních materiálech a není jej možno elektricky či magneticky vychylovat. Jelikož nenese náboj, γ záření silně proniká látkami. Stínění tohoto elektromagnetického vlnění se provádí pomocí silných a hustých materiálů, jako je například olovo (Barbosa *et al.*, 2017; Bordner *et al.*, 2016).

Na živé organismy, zejména na savčí modely, pak může mít toto záření v závislosti na absorbované dávce silný dopad. Například velmi vnímavé buňky kostní dřeně jsou schopny ovlivnit již dávky vyšší okolo 0,01 Gy (Irons *et al.*, 2012). Green a spol. vystavili myši záření 5 Gy a sledovali značný pokles objemu houbovitě tkáně v holenní kosti a zvýšenou produkci osteoklastů (Green *et al.*, 2012).

1.1.2 Účinky ionizujícího záření

Ionizující záření vyvolává v organismu dva typy účinků – deterministické a stochastické.

Deterministické účinky se odvíjí od vstřebané dávky. Jejich působení má za následek buněčnou smrt. Aby se projevil jejich vliv na organismus, je nutno překonat biologický práh, při kterém se v zasaženém orgánu ve velké míře sníží počty buněk a není možnost jejich náhrady. Daná tkáň pak ztrácí schopnost plnit svou fyziologickou funkci a dochází k selhání.

Účinky na organismus se liší v závislosti na tom, zda byl organismus zasažen celý nebo jen jeho část. Pak se vliv záření může projevit pouze lokálním poškozením, poškozením vyvíjejícího plodu nebo jako akutní či chronická nemoc z ozáření (Paunesku *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2016).

Stochastické účinky působí zejména na genové úrovni buněk. Buňka sice po expozici záření přežívá, ale deoxyribonukleová kyselina v jádře může být nevratně poškozena. Na dvojitě genetické informace dochází k mutacím a zlomům, které se mohou později v případě somatických buněk projevit rakovinovým bujením a v případě gametických buněk mají vliv na potomstvo. Tyto účinky mají navíc pravděpodobnostní charakter. Zatímco u deterministických lze ve vztahu k dávce určitý biologický dopad předvídat, u stochastických účinků s rostoucí dávkou roste pouze pravděpodobnost jejich výskytu (Bolus, 2001).

1.1.2.1 Dávka ionizujícího záření

Jako mezinárodní uznávaná jednotka vyjadřující dávku absorbovaného záření látkou se používá Gray (Gy). Absorbovanou dávkou se pak rozumí energie ionizujícího záření v jednotce hmotnosti ozařované látky v určitém místě. Jeden gray převedený do jednotek SI soustavy je jeden J/kg. V lékařských publikacích lze nalézt jeho ekvivalent – sievert (Sv). Sievert má stejnou hodnotu jako gray, přepočítání mezi nimi je ale ovlivněno i druhem použitého záření a typem ozařované tkáně (Pfalzner, 1983; Fisher a Fahey, 2017).

1.1.2.2 Radiosenzitivita

Pojem radiosenzitivita vyjadřuje vnímavost organismu k poškození deterministickými účinky ionizujícího záření. Dávkový práh deterministických účinků je pak různý pro různé tkáně. Navíc samotná radiosenzitivita může být ovlivněna dalšími faktory, například celkovým stavem pacienta. Dle stupně radiosenzitivity lze rozlišit tkáně a orgány jako radiosenzitivní nebo radiorezistentní (Cui *et al.*, 2017; Kupka *et al.*, 2015; Qian *et al.*, 2017).

Za tkáně radiosenzitivní lze považovat takové, jež obsahují vysoký počet rychle se dělících nebo málo diferenciovaných buněk. Příkladem je lymfatická tkáň, kostní dřev, gastrointestinální epitel nebo gonády. Naopak tkáně tvořené buňkami s vysokým stupněm diferenciace a buňkami, které se málo dělí, bývají spíše radiorezistentní (Tabulka 2).

Radiosenzitivitu můžeme rozlišit i z pohledu vnímavosti ke vzniku zhoubných malignit po ozáření, kdy bývají nejvíce citlivé orgány jako žaludek, plíce, střevo, kostní dřev a močový měchýř (Inkoom *et al.*, 2015; Neklasova *et al.*, 2014).

Tabulka 2. Rozdělení tkání a orgánů dle radiosenzitivity (Rosina *et al.*, 2013).

<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="margin-bottom: 10px;">nejvyšší radiosenzitivita</div> <div style="margin-bottom: 10px;">↓</div> <div>nejnižší radiosenzitivita</div> </div>	lymfatická tkáň, kostní dřev, střevní epitel, pohlavní žlázy, plod
	kůže a epitel, hltan, jícn, žaludek, močový měchýř, oční čočka
	malé cévy, rostoucí chrupavka a kost
	vyzrálá kost a chrupavka, dýchací orgány, játra, pankreas, endokrinní žlázy
	nervová a svalová tkáň

1.1.3 Nemoc z ozáření

Jedním z deterministických účinků je nemoc z ozáření. Nemoc z ozáření vzniká jako následek účinku velkých dávek ionizujícího záření. Z klinického hlediska lze nemoc z ozáření rozlišovat jako akutní nebo chronickou. Navíc v závislosti na dávce a na tom, jestli byl jedinec zasažen zářením celotělově nebo jen lokálně a v jakém místě. Mezi typické lokální projevy patří poškození kůže (Mettler, 2009).

1.1.3.1 Akutní nemoc z ozáření

Jako akutní nemoc z ozáření (ANO) souhrnně označujeme příznaky, které se objeví po jednorázovém homogenním nebo téměř homogenním působení ionizujícího záření na celý organismus. Expozice dávkou menší než 1 Gy nemívá žádné klinické projevy (Donnelly *et al.*, 2010; Rogacheva, 1998).

ANO lze rozdělit do několika fází, jejichž doba trvání a intenzita příznaků závisí na délce expozice, dávce záření a přidružených poraněních. Nejprve rozlišujeme fázi prodromální, která většinou trvá až 2 dny po vystavení záření. Obvykle se objeví nespecifické symptomy, jako apatie, bolest hlavy, slabost, horečka, tachykardie, nauzea a zvracení. Pokud příznaky nastoupí do 2 hodin po vystavení záření, dá se předpokládat, že dávka byla vyšší než 2 Gy a je potenciálně letální. Při dávkách vyšších než 10 Gy mohou prodromální symptomy

nastoupit do několika minut a rekonvalescence při zasažení více než 12 Gy je téměř nemožná (Anno *et al.*, 1989; López a Martín, 2011).

Poté přichází několikadenní latentní fáze, nastávající 2 až 20 dnů po ozáření. Pacient nepocítuje téměř žádné obtíže. Po této fázi se u postiženého začnou manifestovat charakteristické příznaky, jejichž závažnost se opět odvíjí od dávky záření. Od absorbovaného záření se odvíjí i doba rekonvalescence nebo příčina úmrtí.

V závislosti na dávce radiace rozlišujeme několik forem akutní nemoci z ozáření – hematopoetický, gastrointestinální a neurovaskulární syndrom. Může dojít i ke kombinovanému radiačnímu poškození, kdy jsou navíc přítomny popáleniny, traumata. Také je možnost multiorgánového selhání, které se projeví progresivní dysfunkcí 2 a více orgánů zároveň (López a Martín, 2011). Následující tabulka udává závislost dávky a odezvy lidského organismu (Tabulka 3).

Tabulka 3. Klinické symptomy v závislosti na dávce ionizujícího záření (Dicarlo *et al.*, 2011; Dörr a Meineke, 2011).

Dávka [Gy]	Klinické symptomy a průběh otravy
0,05 - 0,2	žádné symptomy; potencionální nebezpečí vzniku změn DNA a rakovinného bujení
0,2 - 0,5	žádné znatelné symptomy; dočasné snížení počtu erytrocytů
0,5 - 1	mírné symptomy – bolest hlavy; narušení buněk IS – zvýšené riziko infekce; možnost dočasné mužské sterility
1 - 2	mírná až střední nevolnost, příležitostné zvracení po 3 – 6 hodinách do konce 1. dne; latentní fáze 10-14 dnů, manifestní fáze – lehké symptomy, vyčerpání, útlum IS, zvýšené riziko infekce; obvyklá mužská sterilita, u těhotných žen nastává spontánní potrat a smrt plodu; v průběhu 30 dnů riziko úmrtí bez léčby 10 %
2 - 3	obvyklá nevolnost se zvracením; příznaky nastupují po 1 – 6 hodinách do konce 2. dne; latentní fáze spojená s celkovou alopecií a prudkým poklesem leukocytů; možnost permanentní ženské sterility;

	rekonvalescence několik měsíců; v průběhu 30 dnů riziko úmrtí bez léčby 35 %
3 - 4	symptomy stejné jako u dávky 2 – 3 Gy navíc s nekontrolovatelným krvácením z úst, kůže a močového systému; v průběhu 30 dnů riziko úmrtí bez léčby 50 %
4 - 6	nástup symptomů 0,5 – 2 hodiny s trváním do konce 2. dne; latentní fáze 7 – 14 dnů; příznaky stejné jako u předchozí dávky; obvyklá ženská sterilita; rekonvalescence měsíce až rok; pacient umírá na infekci anebo vnitřní krvácení; po 30 dnech smrtnost bez léčby 60 %
6 - 10	kostní dřev je silně poškozená, může vyvstat nutnost transplantace, GIT tkáň vážně poškozené; nástup symptomů 15 – 30 minut s trváním do konce 2. dne; latentní fáze 5 – 10 dnů; manifestní fáze s infekcemi a vnitřním krvácením; rekonvalescence není zcela možná; riziko úmrtí bez léčby až 100 % v průběhu 14 dnů
10 - 50	nástup symptomů 5 – 30 minut po expozici, silná vyčerpanost, okamžitá nevolnost; latentní fáze několik dnů nebo může chybět; manifestní fáze provázena buněčnou smrtí v GIT a zánětem v CNS; průjmy, krvácení, ztráta vody; smrt nastává v důsledku deliria a kóma ze selhání oběhu; riziko úmrtí 100% v průběhu 7 dnů smrtnost
50 - 80	nastává okamžitá dezorientace; smrt po několika hodinách v důsledku kolapsu nervového systému
> 80	možná okamžitá smrt

1.1.3.1.1 *Hematopoetický syndrom*

Tato forma nastává po celotělové expozici 1 až přibližně 10 Gy. První den se projevují nespecifické prodromální příznaky, pak nastává několikadenní období latence a v průběhu 2 – 4 týdnů nastupuje fáze plného rozvoje nemoci. Celkový stav organismu se zhoršuje, dochází k poruše krevetvorby, krvácení do pokožky, narušení imunitního systému a v případě přidružených infekcí i k rozvoji sepse (Dainiak, 2010).

Důležité je zejména sledování krevního obrazu. Ionizující záření indukuje apoptózu, která se v kostní dřeni objeví v průběhu hodin po ozáření, vedoucí k hypoplazii až aplázii. Ve velké míře dochází i k indukci buněčné smrti lymfocytů v oběhu (Fliedner, 1996). V návaznosti na poškození kostní dřene klesají po 2 až 4 týdnech hladiny neutrofilů a trombocytů na své minimum. To má za následek zvýšenou náchylnost k infekcím, ke krvácení a zhoršenému hojení ran. Lymfopénie se objevuje mnohem dříve. Zpravidla ji lze zaznamenat ještě před úbytkem ostatních krevních buněk a v závislosti na dávce záření se může projevit již 6 až 24 hodin po expozici (Goans *et al.*, 2001). Pokud došlo až k 50% snížení počtu lymfocytů do 24 hodin po ozáření a k dalšímu výraznému propadu během 48 hodin, dá se říci, že dávka záření, které byl organismus vystaven, se pohybovala v rozmezí 5 až 10 Gy (Vorobiev, 1997; Inoue, *et al.*, 1995; Van Bekkum, 1991).

1.1.3.1.2 Gastrointestiální syndrom

Epitel střeva patří mezi tkáně, které se velmi rychle obnovují. Za normálního stavu se celá epiteliální výstelka obmění průměrně za 3 až 5 dnů. Za tuto rychlou obnovu jsou především zodpovědné střevní kmenové a progenitorové buňky, které se nacházejí v proliferačním prostoru Lieberkühnových krypt. Krypty jsou společně s klky hlavními morfologickými jednotkami střevní sliznice. Klky jsou primárně tvořeny z absorpčních enterocytů, pohárkových, endokrinních a membránových epitelových buněk. Naproti tomu, uvnitř krypt probíhá mitóza, diference a následná migrace buněk směrem od báze krypt do klků (Barker, 2014).

V Lieberkühnových kryptách nalezneme dva typy střevních kmenových buněk ISC, z anglického intestinal stem cells. První z nich se nazývají sloupcové nebo aktivní střevní kmenové buňky (aISCs) a nachází se v základně krypty. aISCs se rychle dělí a dávají vznik progenitorovým buňkám v tranzitní amplifikační zóně (Barker *et al.*, 2012). Tyto kmenové buňky mají hlavní podíl na obnově epitelu. Jejich rozpoznání je možné pomocí znaků jako je LGR5, ASCL2, OLFM4, SMOC2, PROM1 a SOX9 (Formeister *et al.*, 2009). Druhým typem ISC jsou rezervní střevní kmenové buňky (rISCs), které nesou identifikační markery BMI1, MTERT, HOPX, LRIG1, DCLK1, KRT19. rISCs nalezneme v pozicích +4 a +6 ode dna krypt a jsou oproti aISCs odolnější vůči stresu (Fre *et al.*, 2011). Nejvíce náchylné k radiačnímu poškození jsou právě kmenové buňky LGR5+, což má po vystavení záření výrazný dopad na snížení až ztrátu jejich populace (Yan *et al.*, 2012). Regenerace je však možná díky rISCs. Když dojde k vyčerpání aISCs LGR5+, rezervní střevní kmenové buňky

započnou buněčný cyklus, v kryptách se zmnoží buňky a obnoví se zastoupení aISCs (Tian *et al.*, 2011). Při porovnání buněk LGR5+ v tenkém střevě a v tlustém střevě bylo zjištěno, LGR5+ tenkého střeva tolerují vyšší dávky záření než v úsecích tlustého střeva. Tento fakt byl ověřen při hodnocení buněčné proliferace a poškození DNA po 72 hodinách od expozice dávkám nepřesahujícím 4 Gy (Otsuka a Suzuki, 2016).

Regenerace střevní sliznice má 3 fáze – apoptickou, proliferativní a normalizační. Apoptická nastává dva dny po expozici záření. V této fázi dochází k úbytku počtu krypt, jejich zmenšování a zkracování délek klků. Dva až čtyři dny po ozáření nastupuje regenerace. Prežívající buňky svým množením obnovují krypty. Jestli však došlo v apoptické fázi k významnému snížení počtu krypt, regenerující krypty se vlivem kompenzační proliferace až dvojnásobně zvětšují. Po této fázi přichází normalizační období, kdy se délky klků a hloubky krypt vracejí k původním hodnotám (Kim *et al.*, 2017).

Střevní gastrointestiální forma ANO se rozvine po dávce vyšší než 5 Gy. Časné příznaky jsou výraznější než u hematopoetického syndromu a závažné obtíže se projeví již 4 až 7 den po ozáření. Postižení trpí krvácivými průjmy, kdy díky masivnímu krvácení do střev dochází ke ztrátám plazmatických bílkovin, rozvoji anémie, rozvratu vodního, minerální a acidobazického prostředí. Následuje oběhové selhání, toxémie a rozvoj septického šoku. Pokud pacient přežije 10 dnů, nastoupí příznaky postižení krvetvorných orgánů (Dörr *et al.*, 2010). Po expozici vysoké dávce ionizujícího záření od 12 do 20 Gy se plně rozvine gastrointestiální forma ANO a rekonvalescence již není možná. Léčba je v tomto případě pouze symptomatická s mizivým efektem (Elliott *et al.*, 2014).

Radiační poškození střevních epitelálních buněk bylo dobře popsáno u laboratorních myší, které byly vystaveny ionizujícímu záření o intenzitě 8 až 15 Gy. Takové dávky sice mohou způsobit gastrointestinální poškození, ale pokud je expozice celotělového charakteru, mohou být i smrtelné kvůli doprovodnému selhání kostní dřeně (Booth *et al.*, 2012). Pokusné myši schopny rekonvalescence i po celotělové expozici v případě, že dávka záření nepřesáhne 12 Gy. Pokud je dávka radiace vyšší než 13 Gy, rozvine se gastrointestinální syndrom a dochází k úhynu zvířat i přes transplantaci kostní dřeně (Pejchal *et al.*, 2015).

1.1.3.1.3 Neurovaskulární syndrom

Neurovaskulární forma se rozvíjí po celotělovém vystavení dávce vyšší než 10 Gy. U postiženého se projeví příznaky do 30 minut po ozáření. Pacient je apatický, dezorientován, trpí nevolností, ataxií, hypotenzí se zvýšenou teplotou. Latentní fáze pak může trvat několik hodin až dnů, může však i při vysokých dávkách chybět. Manifestní fázi provází změny v centrálním nervovém systému se zhoršením kapilární cirkulace a poškození hematoencefalitické bariéry. Tvoří se intersticiální otok, akutní zánět, petechiální hemoragie, zánět v meningách a nastává hypertrofie perivaskulárních astrocytů. Smrt nastává v důsledku deliria a kómatu nebo ze selhání oběhového systému v průběhu několika dnů po ozáření (Kupka *et al.*, 2015; Friesecke *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Chronická nemoc z ozáření

Chronická nemoc z ozáření je deterministický účinek způsobený dlouhodobým působením malých dávek ionizujícího záření. Toto poškození se může projevit velmi pestrými neurovegetativními symptomy, sníženou krvetvorbou, celkovým vyčerpáním a stárnutím organismu. Při lokální expozici lze jako jednu z typických forem tohoto onemocnění například uvést radiodermatitidu chronickou, jíž především v dnešní době trpí hlavně chirurgové, používající radiodiagnostická zařízení při výkonu. Dalším příkladem je katarakta. Katarakta vzniká poškozením epitelálních buněk čočky oka. Dochází tak k neefektivní diferenciaci dceřiných elementů a narušení uspořádání vláken čočky (Kuchynka *et al.*, 2012; Thompson a Lakhani, 2015).

1.1.4 Léčba akutní nemoci z ozáření

Léčba ANO je v současné době zaměřena pouze na hematopoetický syndrom. Při jeho manifestaci je nutná hospitalizace postiženého. Důležitá je i vhodná podpurná terapie, která může být v případě potřeby doplněna transfuzní terapií, případně podáním růstových faktorů stimulujících krvetvorbu. Při vysokých dávkách může být nezbytná i transplantace buněk kostní dřeně (Friesecke *et al.*, 2001).

Velkou výzvou zůstává střevní gastrointestinální syndrom ANO. Ačkoliv je její plná manifestace po ozáření vysokými dávkami považována za letální, časná aplikace růstových faktorů může její průběh mitigovat a zvýšit dávkový práh, při kterém se rozvíjí (Pejchal *et al.*, 2015). Stávající diplomová práce se soustředí na insulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1).

1.2 IGF-1

IGF-1 patří do skupiny látek zvané somatomediny. Odtud lze také odvodit i jeho starší název – somatomedin C. Somatomediny patří mezi růstové faktory, které se dělí do tří skupin. První skupinou jsou cytokiny produkované makrofágy a lymfocyty, druhou jsou takzvané faktory stimulující kolonie (Colony-Stimulating Factors, CSF) a třetí skupinou jsou látky podporující buněčné dělení a vývoj různých typů buněk – somatomediny (Ganong, 2005).

Tyto polypeptidové růstové faktory produkují primárně hepatocyty po stimulaci růstovým faktorem STH. Působí na celou řadu orgánů a patří sem nejen IGF-1, ale i další růstové faktory jako nervový růstový faktor (NGF), fibroblastový růstový faktor (FGF), epidermální růstový faktor (EGF), ovariální růstový faktor (OGF) a růstový faktor odvozený z trombocytů (PDGF). Jako první z nich byl objeven takzvaný sulfatační faktor, jež zvyšuje inkorporaci sulfátu do chrupavek. Později bylo zjištěno, že tato látka mimo jiné stimuluje i tvorbu kolagenu a byla přejmenována na IGF-1 (Ganong, 2005; Alberts, 2005).

V lidském krevním oběhu mají nejvyšší zastoupení somatomediny IGF-1 a IGF-2 (Somatomedin A), které jsou oba strukturně velmi podobné inzulinu, a taktéž ovlivňují regulaci sacharidového metabolismu, což bylo prokázáno u pacientů po pankrearektomii. Tento účinek byl objeven v 70. letech a nazývá se nesupresibilní inzulinu podobná aktivita (Nonsuppressible Insulin-Like Activity, NSILA), tedy aktivita, jež není potlačována protilátkami. Bohužel i přes tuto vlastnost inzulinu podobných růstových faktorů dochází po odebrání slinivky k rozvoji onemocnění diabetes mellitus, protože jejich účinek je oproti samotnému inzulinu mnohonásobně nižší (Blumenthal, 2010; Zapf *et al.*, 1978).

Na rozdíl však od IGF-2, který má spíše význam v prenatálním vývoji, účinky IGF-1 se uplatňují hlavně v postnatálním období. Molekula IGF-1 je důležitá zejména pro vývoj v dětství, i když její produkce probíhá po celý život a její hladiny dosahují maxima v pubertě. V dospělosti má spíše anabolický účinek a její hladiny s přibývajícím věkem v krvi klesají (Leite *et al.*, 2011). Důležitost IGF-1 pro růst a vývoj byla potvrzena pokusy provedenými na laboratorních myších. Těmto zvířatům byl molekulárně biologickou metodou zvanou „knock out“ vypnut gen, ze kterého se exprimuje molekula IGF-1. U jedinců s vypnutým genem byla vysoká porodní morbidita, měli až o 40 % sníženou porodní hmotnost, málo rozvinuté svalstvo a plicní tkáň, nebyli schopni rozmnožování a trpěli opožděnou osifikací (Powell-Braxton *et al.*, 1993).

1.2.1 Výskyt v organismu

Hlavní sérové somatomediny lze nalézt v buňkách většiny tkání, a to po celý život jedince. Molekula IGF-1 je nejvíce exprimována hepatocyty, které vyprodukují asi 10 mg za den. Dokáží ji však syntetizovat i buňky plic, srdce, ledvin, adipocyty, chondroblasty, fibroblasty nebo osteoklasty. Aby však mohl být jeden z hlavních sérových somatomedinů produkován, je nejprve zapotřebí stimulace secernujících buněk hormonem STH. Ten je v nepravidelných časových rozpětích během dne produkován v podvěsku mozkovém adenohypofyzárními somatotropiny, což jsou acidofilní sekreční buňky předního laloku hypofýzy. Vlastní sekrece růstového hormonu je pak ovlivňována mnoha podněty. Například hypoglykemií, tělesnou námahou, zvýšenou hladinou některých aminokyselin, hormony štítné žlázy, estrogeny, androgeny a lehce i prolaktin podporujícími sekrecí. Všechny tyto faktory ovlivňující hladinu produkce STH pak zároveň ovlivňují hladinu samotného IGF-1. IGF-1 je tedy primárním mediátorem STH. Naopak kortizol, glukóza nebo medroxyprogesteron působí antagonisticky (Levine *et al.*, 2014; Greenspan a Baxter, 2003; Trojan, 2003). Snížit hladinu IGF-1 může mimo jiné i nutriční stav daného jedince, protože pokud subjekt hladoví, dochází k poklesu syntézy IGF-1 i přes podávání růstového hormonu (Kučera *et al.*, 2016). Při patologických stavech, jako je například diabetes mellitus, je vyplavení IGF-1 a IGF-2 do krevního oběhu negativně ovlivněno. Po podání inzulínu se jejich hladiny vrací do normálu (Ganong, 2005).

Samotná exocytóza IGF-1 z buněk je závislá na koncentraci Ca^{2+} . Může ji však narušit porucha aktivace buněk. Jejich receptory mohou být necitlivé na růstový hormon či na svém povrchu nevystavují dostatek STH receptorů nebo dojde k selhání signalizační dráhy od receptoru zahrnující signální proteiny STAT5B a proteinovou tyrosinovou fosfatázu SHP2 (Cao *et al.*, 2011; Christoffersen *et al.*, 1994).

V organismu nalezneme IGF-1 volně v krevní plazmě (nízkomolekulární frakce) pouze v malém množství (cca 2 %). Ve vyšší míře je navázán na plazmatické proteiny (vysokomolekulární frakce). Tyto specifické vysoce afinitní plazmatické bílkoviny nazýváme proteiny vázající inzulínu podobné růstové faktory (Insulin-like growth factors binding proteins, IGFBP). IGFBP usnadňují správnou interakci IGF s jejich receptory a chrání je před proteolýzou. Díky tomu je biologický poločas jejich volných forem prodloužen z necelých 10 minut až na 12 hodin. V organismu se vyskytuje osm IGFBP proteinů, přičemž se k šesti známým proteinům posléze přidaly molekuly IGFBP-7 a IGFBP-8, které byly pouze přejmenovány po zjištění, že mají také schopnost vázat IGF-1 či IGF-2. Asi 80 % vázaného IGF-1 lze pak nalézt ve vazbě na IGFBP-3 (Ganong, 2005; Christoffersen *et al.*, 1994; Kučera

et al., 2016; Bach, 2015). IGFBP-3 lze považovat za nejdůležitějšího z vazebných proteinů vážícího IGF-1 a IGF-2 s podobnou afinitou. Zároveň můžeme sledovat i pokles jeho koncentrací v krvi pacientů s nedostatkem růstového hormonu. Naopak u jedinců s akromegálií, kteří mají zvýšenou produkci STH, dochází zároveň i k nárůstu hladiny IGFBP-3 (Kučera *et al.*, 2016). Některé z proteinů vázajících IGF-1 mají naopak inhibiční účinek. Kupříkladu IGFBP-2 a IGFBP-5 vážou inzulinu podobný faktor 1 s vyšší afinitou než se on sám váže ke svému receptoru. Pokud se tedy zvýší hladiny těchto dvou proteinů, dojde ke snížení sérových hladin IGF-1 (Bach, 2015).

1.2.2 Struktura

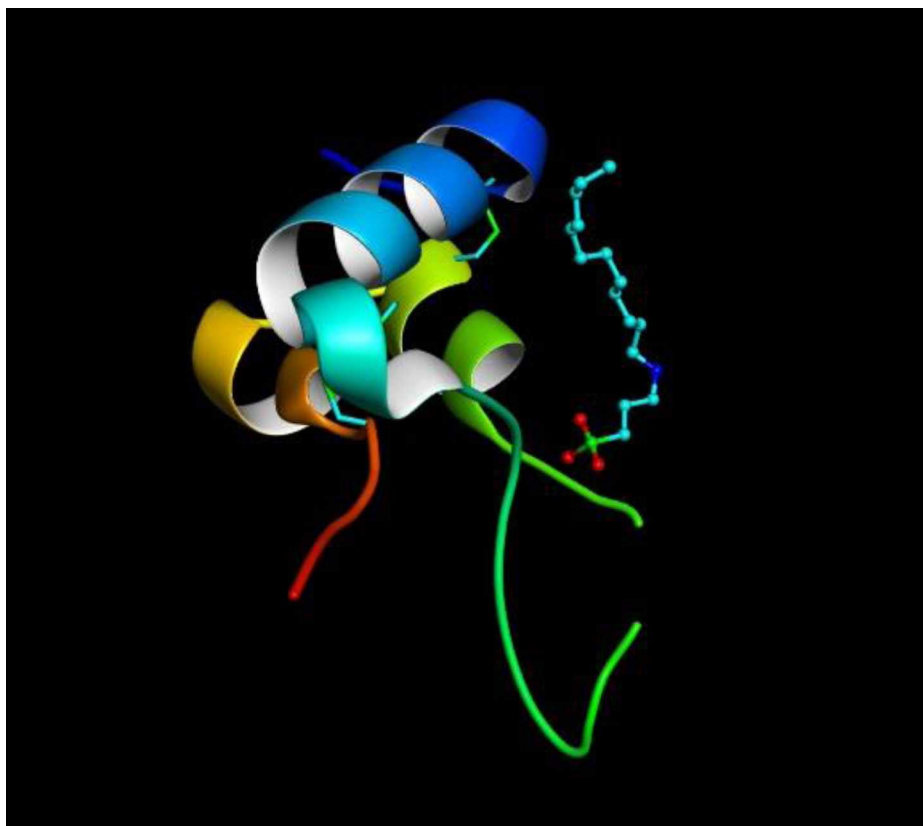
IGF-1 je jednoduchý bazický protein patřící do inzulinové rodiny. Společně s jeho receptory ho lze zařadit do integrovaného systému růstových faktorů, které mají silné mitogenní a diferenciacní účinky na většinu buněk a podílejí se na regulaci obratu bílkovin. Struktura IGF-1 je blízká samotnému inzulinu, s jehož pro-formou (proinzulinem) sdílí 50 % homologii. Strukturální podobnost vůči IGF-2 dosahuje dokonce 67 %. S tím souvisí i podobnost funkcí. IGF-2 je ale u dospělých jedinců exprimován pouze v plexus chorideus a meningách (Dora Maria *et al.*, 2017; Leroith and Roberts, 2003).

Gen pro samotný IGF-1 se nachází na dlouhém raménku na dvanáctém chromozómu v úseku 23.2. Má 7 transkriptů (variant sestříhu), 64 ortologů a 1 paralog (Dupont a Leroith, 2001). V těsné blízkosti tohoto genu se nacházejí i kódující sekvence pro-melanin koncentračního hormonu a fenylalanin hydroxylázy.

Z tohoto genu je exprimován proteinový řetězec o délce 70 aminokyselin s molekulovou hmotností 7,7 kDa. Další úpravou po translaci genetické informace do proteinu, je připojení signálního peptidu o 21 aminokyselinách, propeptidu dlouhého 27 aminokyselin, a nakonec E peptidu se 77 aminokyselinami. Díky změnám v délce nebo záměnám aminokyselin v těchto připojených řetězcích lze rozeznat až 4 izoformy IGF-1, přičemž základní řetězec růstového faktoru zůstává nezměněn a dělí se do 4 domén. První z nich je doména B (pozice 49-77), druhou je C doména (pozice 78-89), třetí je A (pozice 90-110) a poslední doménou je D (pozice 111-118).

Pokud se zaměříme na jednotlivé izoformy, nejběžnější z nich je IGF-1B dlouhá 195 aminokyselin a hmotností 21,8 kDa. Po ní se nejčastěji vyskytuje izoforma IGF-1A se 153 aminokyselinami a hmotností 17,0 kDa. Další izoforma IGF-1C je zkrácena oproti IGF-1B o 58 aminokyselin a nejvíce ji exprimují hepatocyty. Nakonec poslední nejméně známá

izoforma obsahuje 158 aminokyselin a její hmotnost je rovna 17,8 kDa. Posttranslačními úpravami se také utvářejí mezi aminokyselinami na pozicích 54 a 96, 66 a 109 a 95 a 100 tři disulfidické můstky (Brzozowski *et al.*, 2002; Raschdorf *et al.*, 1988).



Obrázek 1. Trojrozměrný model molekuly IGF-1 (Brzozowski *et al.*, 2002).

IGF-1 byl nalezen i ve dvou zmutovaných verzích. Tyto nedominantní molekuly mají defekt v pozicích 84 a 85. Jejich vazba k IGF-1 receptoru je sice v pořádku, ale defektně vážou integriny a formují ternární komplex. Signalizační kaskáda spouštěná růstovým faktorem pak neprobíhá správnou cestou a proliferace buňky je narušena. Tyto formy navíc potlačují aktivaci signalizace, která začíná vazbou IGF-1 na IGF-1R (Saegusa *et al.*, 2009; Takada *et al.*, 2017).

1.2.3 Funkce

Přestože mají IGF-1 a inzulín podobné vlastnosti, při jejich srovnání zjistíme, že funkce IGF-1 je fyziologicky odlišná. Zatímco inzulín působí převážně na adipózní a jaterní tkáň, metabolismus sacharidů, lipidů, bílkovin, IGF-1 stimuluje buněčný růst, přežití a diferenciaci buněk (Dupont a Leroith, 2001). Stimuluje růst organismu a podporuje proliferaci téměř

všech buněk v těle, především pak kosterního svalstva, chrupavky, kostí, jater, ledvin, kůže, nervové, hematopoetické i plicní tkáně (Yakar *et al.*, 2002). U myších subjektů s nadměrnou expresí IGF-1 docházelo až ke 30% navýšení růstu svalů, kostí, hmoty sleziny, slinivky břišní, mozku, ledvin a celkové hmotnosti se znatelným zvýšením exprese DNA. U hypofysektomovaných potkanů byl růst kostí celého těla zpomalen. K jeho obnovení došlo až po podávání IGF-1 (Jevdjovic *et al.*, 2005).

Působení IGF-1 má za následek zvýšení absorpce aminokyselin a glukózy, stimulaci proteosyntézy a potlačení proteolýzy. Zpětně potlačuje sekreci STH, podporuje tvorbu ovariálních hormonů a sekreci somatostatinu. Uplatňuje se i v embryonálním vývoji, kdy má vliv na diferenciaci čočky (Laviola *et al.*, 2007). Vliv na diferenciaci byl studován i u svalové a chrupavčité tkáně. Ve svalech podporuje diferenciaci myoblastů expresí regulátorů terminální diferenciaci, jako je například myogenin. IGF-1 je tedy potřeba nejen k vývoji svalů, ale i jejich správné funkci (Guntur a Rosen, 2013). Pokud se jedná o působení IGF-1 na chrupavčitou tkáň, diferenciaci byla prokázána u progenitorových buněk chrupavky v kulturách neonatálních mandibulárních kondylů. Při studii na potkanech se dále potvrdilo, že IGF-1 udržuje integritu kloubní chrupavky. Při jeho chronickém nedostatku se rozvinulo silné poškození chrupavek (Mariani *et al.*, 2014).

1.2.4 Mechanismus účinku

Molekula IGF-1 účinkuje jak endokrinně, parakrinně tak i autokrinně. Toto bylo potvrzeno i u svalových buněk, kdy po odstranění séra s růstovým médiem byla zaznamenána zvýšená exprese IGF-1. Svalové buňky pomocí autokrinní produkce používají tento růstový faktor pro vlastní diferenciaci a jako ochranu před apoptózou (Laviola *et al.*, 2007).

Mechanismus účinku je zprostředkován vazbou na receptory. Obecně se molekuly IGF vážou ke dvěma membránově povrchovým receptorům, receptor pro IGF-1 (receptor typu I) a receptor pro IGF-2 (receptor typu II). Receptor I typu s vysokou afinitou váže molekulu IGF-1, dokáže ale na sebe navázat s mnohonásobně nižší afinitou i molekulu IGF-2 nebo inzulinu. Podobně dokáže receptor II typu slabě interagovat s proteinem IGF-1, ale svojí stavbou je velmi odlišný a nemůže na sebe navázat molekulu inzulinu. Díky tomu většina pozorovaných účinků IGF-1 závisí na aktivaci signální dráhy přes IGF-1 receptor typu I, přičemž jim aktivovaná dráha sdílí intracelulární mediátory s inzulinovou kaskádou (Laviola *et al.*, 2007).

Receptor I typu je heterotetramerní glykoprotein, který se skládá ze dvou na cystein bohatých extracelulárních řetězců α , jež obsahují domény pro vazbu IGF-1, a dvou

transmembránových jednotek β , jež jsou důležité pro aktivitu tyrosinkinasy uvnitř buňky. Tento fakt se odvíjí od vazebného místa pro ATP (lysin 1003) a klastru ze tří tyrosinových zbytků na pozicích 1131, 1135 a 1136 (Laviola *et al.*, 2007). Po navázání ligandu na vnější straně membrány k α -podjednotce dochází k autokatalytické fosforylaci těchto tyrosinových residuí. Následuje fosforylace Tyrozinu 950 v juxtamembránové doméně, jež aktivuje další prvky signálních drah. Na β jednotce je také přítomna důležitá karboxylová skupina na distálním tyrosinu v poloze 1316, jež se uplatňuje při stimulaci proliferace (Guntur a Rosen, 2013).

Vazba IGF-1 a jeho koncentrace ovlivňuje samotné receptory. Pokud se hladina IGF-1 zvýší, sníží se tím počet jeho receptorů. Naopak, když množství IGF-1 poklesne, buňky začnou na svém povrchu vystavovat více IGF-1 receptorů (Holzenberger *et al.*, 2002).

Mimo receptorů I a II typu může IGF-1 s nižší aktivační účinností spolupracovat i s dalšími receptory, jako jsou receptory pro inzulin (IR1-4) nebo hybridní receptory. Všechny membránové proteiny schopné vázat IGF-1 lze ale obecně označit za receptorové tyrosinkinasy, jež se po jeho navázání ligandu fosforylují na tyrosinových zbytcích (Renehan *et al.*, 2005).

1.2.5 Signální dráhy aktivované IGF-1

Mechanismus působení na buňku začíná po navázání IGF-1 na receptor. Stimulace receptoru vede k aktivaci několika odlišných signalizačních drah (Guntur a Rosen, 2013). U některých receptorů po připojení signální molekuly dochází k dimerizaci, což znamená, že se jejich intracelulární tyrosinkinasy fosforylují navzájem. Po fosforylaci tyrosinkináz může signalizační dráha pokračovat přes malé G-proteiny, které jsou produkty protoonkogenů ras a k jejichž aktivaci je nutná vazba na GTP. Ras následně aktivuje serinkinázy Raf. Dále může vést přes různé MAP kinasy, zejména kinasy regulované extracelulárním signálem (Extracellular signal-regulated kinases ERKs) 1 a 2 (ERK1 a ERK2), které přímo ovlivňují fosforylaci transkripčních faktorů v jádře a tím je spuštěna genová exprese (Ganong, 2005). ERK regulují proliferaci, diferenciaci a samotný buněčný cyklus (Vorwerk *et al.*, 2002).

IGF-1 je také jeden z nejúčinnějších aktivátorů signální dráhy AKT. Při aktivaci této signální dráhy se po autofosforylaci β -podjednotek receptoru IGF-1 změní jejich konformace, a to umožní jejich asociaci s fosfatidylinositol-3-kinázou (PI3K). PI3K se zaktivuje a vytvoří se fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát. Ten reaguje se serinthreoninovou kinázou PKB, která se běžně účastní signalizace buněčného růstu nebo nádorové transformace přes receptory pro

inzulín a inzulínu podobné růstové faktory. Každá molekula PKB má regulační doménu na C-konci, katalytickou část uprostřed a na terminálním konci takzvanou PH doménu, na níž se váže fostatidylinositol-3,4,5-trifosfát. Po navázání PKB interaguje s kinázou PDK1, který následně fosforyluje PKB v aktivační doméně na pozici Thr308. Takto zaktivovaná PKB pak přenáší fosfátovou skupinu na cílové proteiny v cytosolu, jako jsou například transkripční faktory (CREB), nebo proteiny účastníci se signalizace spojené s poškozením DNA (Mdm2) či jeho reparací (BRCA1; Bruchim *et al.*, 2014).

IGF-1 ale nemusí nutně aktivovat signální dráhy pouze přes svůj vlastní receptor. Když IGF-1 aktivuje receptor IR1, nastávají děje obdobné jako při stimulaci receptoru I typu. Signál je veden přes PI3K, ERK a jiné mitogenem aktivované proteinové kinázy (McC Campbell *et al.*, 2006).

1.2.6 Účinky ionizujícího záření

Signální dráha AKT/PKB je spojována se stimulací reparace zvýšením exprese proteinů podílejících se na opravě dvojitých zlomů DNA a podporou proliferace aktivací cyklin-dependentních kináz (CDK) a naopak inhibicí jejich negativních regulátorů, jako jsou proteiny p21 nebo p27. Signální dráha vykazuje anti-apoptotické funkce přímou inhibicí proapoptotických molekul (např. Bad, Bim) nebo nepřímo inhibicí proteinu p53. Rovněž tlumí autofagii a naopak stimuluje proteosyntézu a metabolismus glukózy. Nepřekvapí proto, že zvýšená exprese a aktivita AKT/PKB je pozorována v řadě nádorových onemocnění a je jí přičítáno zvýšení radiorezistence. Naopak inhibitory AKT/PKB jsou postupně v rámci testování klinických studií za účelem radiosenzitizace těchto malignit (Goda *et al.*, 2016; Nitulescu *et al.*, 2016).

ERK signální dráha po ozáření vyvolává fosforylaci dalších více než 160 substrátů (Munshi a Ramesh, 2013). Aktivovány jsou například CDK-cyklinové komplexy vedoucí k progresi buněčného cyklu nebo transkripční faktory CREB a c/EBPR, indukující expresi dalších anti-apoptických proteinů (Bcl-XL, Mcl-1 a c-FLIPs) a naopak inhibice proapoptotických regulátorů (Bad, Bim a kaspáza 9; Allan *et al.*, 2003; Bonni *et al.*, 1999; Boucher *et al.*, 2000; Jost *et al.*, 2001; Tamamoto *et al.*, 1999). Členové této signální dráhy, jako je například RAS a RAF, jsou považovány za onkogeny. Podobně jako AKT/PKB signální dráha, je aktivní ERK přičítáno zvýšení radiorezistence malignit a inhibitory této kaskády vykazují potenciál radiosenzibilizujících látek (Song *et al.*, 2018; Toulany *et al.*, 2016).

Aktivace AKT/PKB a ERK tak přispívá k racionalizaci podání IGF-1, jakožto ochranného faktoru před ionizujícím zářením. Aktivace PI3K a ERK rovněž přispívá k racionalizaci podání IGF-1, jakožto ochranného faktoru před ionizujícím zářením.

2 Cíle diplomové práce

- A. Zhodnocení vlivu IGF-1 na dlouhodobé přežívání zvířat po jednorázovém ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy
- B. Zhodnocení vlivu IGF-1 aplikovaného v různých dávkovacích schématech na stav střevní sliznice 6. den po jednorázovém ozáření dávkami 12 a 14 Gy s krytím hlavy
- C. Zhodnocení vlivu IGF-1 aplikovaného v různých dávkovacích schématech na stav krevního obrazu 6. den po jednorázovém ozáření dávkami 12 a 14 Gy s krytím hlavy

3 Experimentální část

3.1 Pokusná zvířata

Pro pokus byly dodány samice laboratorních myší kmene C57B1/6 firmou Velaz s.r.o. (Únětice, Česká republika). Stáří jedinců se pohybovalo mezi 12 a 16 týdnů a jejich váha byla 18 – 23 g. Tato zvířata byla chována v klimatizované místnosti za teploty 22 ± 2 °C, relativní vlhkosti 50 ± 10 % s osvětlením od 7:00 do 19:00. Potrava se skládala výhradně z krmiva DOS-2B (BIOPO spol. s.r.o., Brno, Česká republika). Pitný režim byl zajištěn vodou z vodovodního řadu v napáječce. Všechna zvířata byla před zahájením experimentu nejméně 15 dnů ponechána v akreditovaném viváriu pro přizpůsobení se novému prostředí. Práce se zvířaty byla schválena etickou komisí FVZ UO (Hradec Králové, Česká republika) a probíhala podle platné české a evropské legislativy pro práci s laboratorními zvířaty.

3.2 Zdroj záření

Zdrojem γ záření byl kobaltový zdroj (^{60}Co , Chirana, Praha, Česká republika). Dávkový příkon zdroje je kontrolován jednou ročně pomocí dozimetru PTW-Unidos 1001 (sériové číslo 11057) s ionizační komorou PTW TM 313 (sériové číslo 0012; RPD Inc., Albertville, Minnesota, Spojené státy americké).

3.3 Způsob ozáření experimentálních zvířat

Ozáření zvířat probíhalo ze vzdálenosti 1 m s dávkovým příkonem 0,29 Gy/min u prvního experimentálního modelu a 0,27 Gy/min u druhého experimentálního modelu (viz kap. 3.4.1 a 3.4.2). Před vlastním ozářením byly pokusné myši nejprve uvedeny do lehké narkózy intramuskulární aplikací směsi Rometaru (20 mg/ml; Spofa, Praha, Česká republika), Narkamonu (50 mg/ml; Zentiva, Praha, Česká republika) a fyziologického roztoku (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo). Tato směs byla připravena v poměru 1 díl Rometaru, 3 díly Narkamonu a 12 dílů fyziologického roztoku a následně podána subjektům v dávce 10 ml/kg. Po uvedení do narkózy byla zvířata umístěna do komůrky vyrobené z plexiskla (VLA JEP, Hradec Králové, Česká republika) o rozměrech $6,5 \times 3,0 \times 2,5$ cm (délka \times šířka \times výška) a fixovány držátky okolo krku pro zajištění stabilní polohy a konzistentního jednostranného ozáření v zadopřední expozici. Při ozáření byla zvířatům kryta hlava a krk olovem o tloušťce 10 cm (Chirana, Praha, Česká republika). Po ozáření byla zvířata přenesena do vivária.

3.4 Experimentální modely

3.4.1 Experimentální model 1

Tento experiment byl zaměřen na vliv rekombinantního lidského růstového faktoru IGF-1 (účinná látka mekasermin v přípravku Increlex; Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, Francie) na přežívání laboratorních myší po jednorázovém ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy. Pokus zahrnoval 200 myší, jež byly rozděleny do 10 skupin po 20 jedincích dle schématu znázorněného v tabulce 4. Po ozáření byl kontrolním skupinám aplikován fyziologický roztok. IGF-1 byl podán ve dvou různých dávkách – 0,2 a 1,0 mg/kg váhy zvířete, přičemž pro ředění účinné látky IGF-1 byl použit fyziologický roztok. Jak fyziologický roztok u neozářené kontrolní skupiny a ozářené neléčené skupiny, tak IGF-1 byl aplikován podkožně v objemu 10 ml/kg váhy zvířete ve 3 dávkách 1, 24 a 48 hodin po expozici ionizujícímu záření. U zvířat bylo denně hodnoceno přežívání.

Tabulka 4. Rozdělení skupin laboratorních myší v experimentu 1.

Skupina	Dávka záření [Gy]	Doba podání fyziologického roztoku [hod]	Koncentrace IGF-1 [mg/kg]	Doba podání IGF-1 [hod]
1	0	1, 24, 48	-	-
2	14	1, 24, 48	-	-
3	14	-	0,2	1, 24, 48
4	14	-	1,0	1, 24, 48
5	15	1, 24, 48	-	-
6	15	-	0,2	1, 24, 48
7	15	-	1,0	1, 24, 48
8	16	1, 24, 48	-	-
9	16	-	0,2	1, 24, 48
10	16	-	1,0	1, 24, 48

3.4.2 Experimentální model 2

Na základě prvního experimentálního modelu byl pro další pokusy vybrán IGF-1 v dávce 1 mg/kg váhy zvířete. Druhý experiment byl zaměřen na to, do jaké míry může změna dávkovacího režimu růstového faktoru dále ovlivnit regeneraci střevní sliznice a změny krevního obrazu vyvolané ionizujícím zářením. Tento experiment proběhl na 96 laboratorních myších. Zvířata byla rozdělena do 16 skupin po 6 jedincích dle schématu znázorněného v Tabulce 5. Kontrolní neozářená zvířata byla podrobena stejným procedurám jako subjekty v ostatních skupinách, byl pouze vynechán krok ozáření. Zvířata, která byla ozářena, byla vystavena 12 a 14 Gy. Nižší dávky ionizujícího záření byly zvoleny proto, aby byl lépe zachycen regenerační účinek růstového faktoru. Schéma podkožní aplikace IGF-1 v dávce 1 mg/kg váhy zvířete a objemu 10 ml/kg váhy zvířete je rovněž znázorněno v Tabulce 5.

Tabulka 5. Rozdělení skupin laboratorních myší v experimentu 2.

Skupina	Dávka záření [Gy]	Počet dávek IGF-1	Doba podání IGF-1 [hod]
1	0	-	-
2	12	-	-
3	12	1	1
4	12	2	1, 24
5	12	3	1, 24, 48
6	12	4	1, 24, 48, 72
7	12	5	1, 24, 48, 72, 96
8	12	3	24, 48, 72
9	0	-	-
10	14	-	-
11	14	1	1
12	14	2	1, 24
13	14	3	1, 24, 48
14	14	4	1, 24, 48, 72
15	14	5	1, 24, 48, 72, 96
16	14	3	24, 48, 72

Z důvodu odlišných dávkovacích schémat IGF-1 nebyl negativní (kontrolní neozářená zvířata) a pozitivní kontrolní skupině (ozářená a neléčená zvířata) aplikován fyziologický roztok.

Po šesti dnech od ozáření byly všechny testované subjekty usmrceny cervikální dislokací. Při pitvě byl ze všech jedinců odebrán vzorek krve pro analýzu krevního obrazu a části tenkého střeva pro histologické vyšetření.

3.5 Analýza krve

Krev byla odebrána punkcí při autopsii z pravé komory. Odebrání bylo uskutečněno pomocí injekčních jehel (velikost 21 G; Chirana T. Injecta a.s, Stará Turná, Slovenská republika) potažených Li-heparinem (5000 UI/ml; Zentiva) do 2ml plastových odběrových kapilár s 2 μ l 80 IU iontově vyváženého Li-heparinu (Scanlab Systems, Praha, Česká republika). Vzorky pak byly ihned přeneseny do hematologické laboratoře a nejpozději do 1 hodiny vyhodnoceny hemoanalyzátozem ABX Pentra 60 C+ (Trigon-Plus s.r.o., Čestlice, Česká republika). Absolutní počty krevních buněk byly stanoveny měřením v triplicátu.

3.6 Histologické vyšetření tkání střeva

Zároveň s krevními vzorky byly odebrány i části dvanáctníku (duodenum), lačnicku (jejunum) a kyčelníku (ileum). Vzorky byly odebrány z přesně definovaných oblastí střeva dle Tabulky 6.

Tabulka 6. Místo odběru vzorků střeva

Tkáň	Místo odběru
duodenum	0,5 – 1 cm od gastroduodenálního přechodu
jejunum	4 – 5 cm od gastroduodenálního přechodu
ileum	1 – 2 cm od ileocekálního ústí

Vyjmuté orgány byly zafixovány v roztoku 10% neutrálního formalinu (Bamed s.r.o., Litvínovice, Česká republika). Z fixovaných vzorků střeva byly nejprve vyhotoveny mikroskopické preparáty barvené hematoxylinem-eozinem. Poté se tyto preparáty hodnotily okulometricky pomocí mikroskopu nebo byly nafoceny a analyzovány pomocí počítačové analýzy obrazu.

3.6.1 Zhotovení preparátů

3.6.1.1 Odvodnění preparátů a zalití do parafinu

Z fixovaných orgánů byl nejprve vymyt formalín pod tekoucí vodou po dobu 1 h. Následovalo odvodnění pomocí vzestupné alkoholové řady (Kulich, Hradec Králové, Česká republika) a xylenu (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a zalití do parafinu (Paramix, Holice, Česká republika) pomocí tkáňového procesoru Leica TP1020 (Leica, Wetzlar, Německo). Koncentrace alkoholu a doba setrvání vzorků střeva v jednotlivých lázních je znázorněna v Tabulce 7.

Odvodněné vzorky byly následně zality do parafinových bločků a po jejich ztuhnutí bylo přikročeno ke krájení. Krájení bylo provedeno pomocí mikrotomu model SM 2000R (Leica). Byly připraveny řezy o tloušťce 5 μm . Z každého bločku byly připraveny nejméně 3 řezy.

Tabulka 7. Průběh odvodnění odebraných vzorků v tkáňovém procesoru

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	ethanol 70%	1 hod
2	ethanol 70%	1 hod
3	ethanol 80%	2 hod
4	ethanol 90%	1 hod
5	ethanol 95%	1 hod
6	ethanol 95%	1,5 hod
7	ethanol 99%	3 hod
8	xylén	1,5 hod
9	xylén	1,5 hod
10	xylén	1,5 hod
11	parafin	4 hod
12	parafin	5 hod

3.6.1.2 Natažení na podložní skla

Ukrojené řezy byly nejprve přeneseny na ethanolem odmaštěná podložní skla (Bamed s.r.o.) a podlity 0,5% roztokem želatiny (Bamed s.r.o.). Aby se řez natáhnul, umístily se skla na ploténku vyhřátou na 37 až 40 °C. Nadbytečná želatina byla následně slita a nechala se

okapat. Poté se preparáty umístily do termostatu Memmert BE 500 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Německo) a při 37 °C se nechala odpařit přebytečná voda.

3.6.1.3 Odparafinování

Z řezů natažených na podložní sklička byla dále nutné odstranit parafin, aby mohly být preparáty obarveny. Pro odparafinování byla skla postupně umístěna do lázní xylenu, sestupné alkoholové řady a deionizované vody dle Tabulky 8. Deionizovaná voda byla vyrobena pomocí přístroje Aqual 29 (Aqual s.r.o., Lelekovice, Česká republika).

Tabulka 8. Průběh odparafinování preparátů.

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	xylén	10 min
2	xylén	10 min
3	xylén	10 min
4	ethanol 96%	10 min
5	ethanol 96%	10 min
6	ethanol 70%	10 min
7	deionizovaná voda	5 min

Preparáty zbavené parafinu byly následně obarveny Gillovým hematoxylinem (Merck, Kenilworth, New Jersey, Spojené státy americké) a eozinem (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Spojené státy americké).

3.6.1.4 Barvení hematoxylinem-eozinem

Pro obarvení vzorků hematoxylinem-eozinem bylo nejprve nutné připravit roztok Gillova hematoxylinu. Hematoxylin, jodičnan draselný a síran hlinitý (oba od Sigma-Aldrich) byly za stálého míchání rozpuštěny v deionizované vodě. Za neustálého míchání k nim byl posléze přidán ethylenglykol (Sigma-Aldrich) a jako poslední 100% ledová kyselina octová (Sigma-Aldrich). Přesná množství jednotlivých chemických látek pro výrobu 1 l Gillova hematoxylinu jsou uvedena v Tabulce 9.

Tabulka 9. Složení roztoku Gill hematoxylin.

LÁTKA	Hmotnost/objem jednotlivých položek
hematoxylin	4 g
KIO ₃	0,4 g
Al ₂ (SO ₄) ₃	35,2 g
deionizovaná voda	710 ml
ethylenglykol	250 ml
CH ₃ COOH	40 ml

V takto připraveném roztoku byly preparáty ponechány 3 minuty. Poté byly opláchnuty deionizovanou vodou a na několik vteřin vloženy do 70% ethanolu. Následovala diferenciacce v kyselém alkoholu, který byl připraven smícháním 200 ml 100% ethanolu, 7,5 ml 37% HCl (Sigma-Aldrich) a 900 ml deionizované vody, aby došlo ke zbarvení tkání do modra. Potom byla skla omyta v kohoutkové a následně v deionizované vodě. Celý postup diferenciacce hematoxylinu a oplachu je znázorněn v Tabulce 10.

Tabulka 10. Průběh diferenciacce a oplachu diferencovaných preparátů.

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	ethanol 70%	5 s
2	kyselý alkohol	5 s
3	pramenitá voda	20 min
4	deionizovaná voda	1 min

Nakonec byly preparáty barveny 1% vodným roztokem eozinu, opláchnuty deionizovanou vodou a promyty ve vzestupné alkoholové řadě, acetonu (Sigma-Aldrich) a xylenu (viz Tabulka 11).

Tabulka 11. Barvení eozinem a odvodnění preparátů.

Pořadí	Lázeň	Doba lázně
1	eosin 1%	1 min
2	deionizovaná voda	oplach
3	ethanol 70%	2 min
4	ethanol 80%	2 min
5	ethanol 96%	2 min
6	aceton	2 min
7	xylén	5 min
8	xylén	5 min
9	xylén	5 min

3.6.1.5 Zamontování

Posledním krokem zhotovování preparátů bylo jejich zamontování do montovacího média DPX (Sigma-Aldrich), které bylo zvoleno jak z cenového hlediska, tak pro svůj index lomu, jež je velmi blízký křemičitému sklu, aby nedocházelo ke změnám zabarvení tkáně. Na vzorky se nejprve pomocí skleněné tyčinky (Verkon s.r.o., Praha, Česká republika) nakapalo montovací médium a poté se opatrně přiložilo krycí sklíčko (Bamed s.r.o.), tak aby byly vytlačeny bubliny vzduchu. Hotové preparáty byly umístěny do termostatu, aby montovací médium zaschnulo.

3.7 Hodnocení preparátů

Ve vzorcích obarvených hematoxylinem-eozinem byl zhodnocen histopatologický stav sliznice, spočítány klky a přežívající krypty (definované dle Withers a Elkind, 1970) a byla provedena morfometrická analýza délky 10 nejdelších klků a 10 nejhlubších krypt. Pro analýzu histopatologického stavu sliznice a hodnocení počtu klků a viabilních krypt byl použit mikroskop Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Morfometrická analýza byla provedena na stejném mikroskopu, ale navíc byla použita kamera DP-71 (Olympus) pro pořízení mikroskopických snímků.

3.7.1 Histopatologický stav sliznice

Celkový histopatologický stav sliznice vycházel z okulomotorického hodnocení 4 ukazatelů dle následujícího semikvantitativního skóre:

a) atrofizace:

- 0 – nepřítomna;
- 1 – úbytek $< 50\%$ délky $< 50\%$ klků;
- 2 – úbytek $< 50\%$ délky $\geq 50\%$ klků nebo úbytek $\geq 50\%$ délky $< 50\%$ klků;
- 3 – úbytek $\geq 50\%$ délky $\geq 50\%$ klků.

b) narušení kontinuity sliznice:

- 0 – nepřítomno;
- 1 – přítomny ojedinělé mikroeroze (< 5 v 1 celistvém průřezu vzorku) v rozsahu několika buněk;
- 2 – mnohočetné mikroeroze (≥ 5) nebo rozsáhlé eroze zasahující do subepiteliálního vaziva.

c) otok

- 0 – nepřítomen;
- 1 – subepitelový otok postihující $< 25\%$ klků;
- 2 – subepitelový otok postihující $\geq 25\%$ klků a/nebo otok buněk na povrchu $< 25\%$ klků a/nebo otok lamina propria či submukózy $< 25\%$ průřezu vzorku;
- 3 – otok buněk na povrchu $\geq 25\%$ klků a/nebo otok lamina propria či submukózy $\geq 25\%$ průřezu vzorku.

d) zánět:

- 0 – infiltrace maximálně 1 až 2 granulocyty na zorné pole;
- 1 – 3 až 10 granulocytů na zorné pole;
- 2 – 10 – 50 granulocytů na zorné pole;
- 3 – více než 50 granulocytů na zorné pole při 400násobném zvětšení.

Celkové histopatologické skóre bylo dáno součtem všech 4 ukazatelů.

3.7.2 Počet klků a viabilních krypt

Počet klků a viabilních krypt byl hodnocen okulometricky při 200, respektive 320násobném zvětšení.

Klk byl definován jako vilózní útvar vyčnívající nad úroveň sliznice a obsahující minimálně 20 jaderných buněk. Jejich počet byl hodnocen v 1 příčném a cirkulárně celistvém řezu.

Viabilní krypty byly v tenkém střevě (duodenum, jejunum a ileum) definovány přítomností 10 a více buněk nepanethova typu v 1 cirkulárně celistvém, příčném řezu.

Počet klků i viabilních krypt byl hodnocen v každé části střeva vždy ve 3 řezech. Výsledné číslo u každého zvířete představoval průměr těchto hodnot.

3.7.3 Morfometrická analýza

Při celkovém 160násobném zvětšení byly pomocí programu CellSens Entry (Olympus) pořízeny snímky 15 – 20 nejdelších klků a nejhlubších krypt v průřezu vzorku. Délka objektů byla následně měřena pomocí programu určeného pro analýzu obrazu ImagePro verze 7.0 (Media Cybernetics Inc., Rockville, Maryland, Spojené státy americké). Délka klků byla definována v příčném průřezu klku a představovala ji spojnice centra jeho základny a vrcholku. Hloubku krypt reprezentovala spojnice centrálních částí báze a ústí krypty. Pro kalkulaci průměru a další statistickou analýzu byla v každém vzorku hodnocena pouze délka 10 nejdelších klků a 10 nejhlubších krypt.

3.8 Statistická analýza

Přežívání zvířat v rámci prvního experimentálního modelu bylo hodnoceno pomocí programu IBM SPSS Statistics verze 24 (IBM, Armonk, New York, Spojené státy americké). Byla použita Kaplan-Meierovůvova analýza. K určení rozdílů mezi jednotlivými skupinami následoval *post hoc* Breslowův test. Úroveň statistické významnosti byla stanovena na hladině $p \leq 0,05$.

K určení významnosti rozdílu dat získaných v druhém byl použit Kruskal-Wallisův test. Stanovení statistické významnosti mezi jednotlivými skupinami bylo provedeno *post hoc* pomocí Mann-Whitneyho testu. Úroveň statistické významnosti byla stanovena na hladině $p \leq 0,05$.

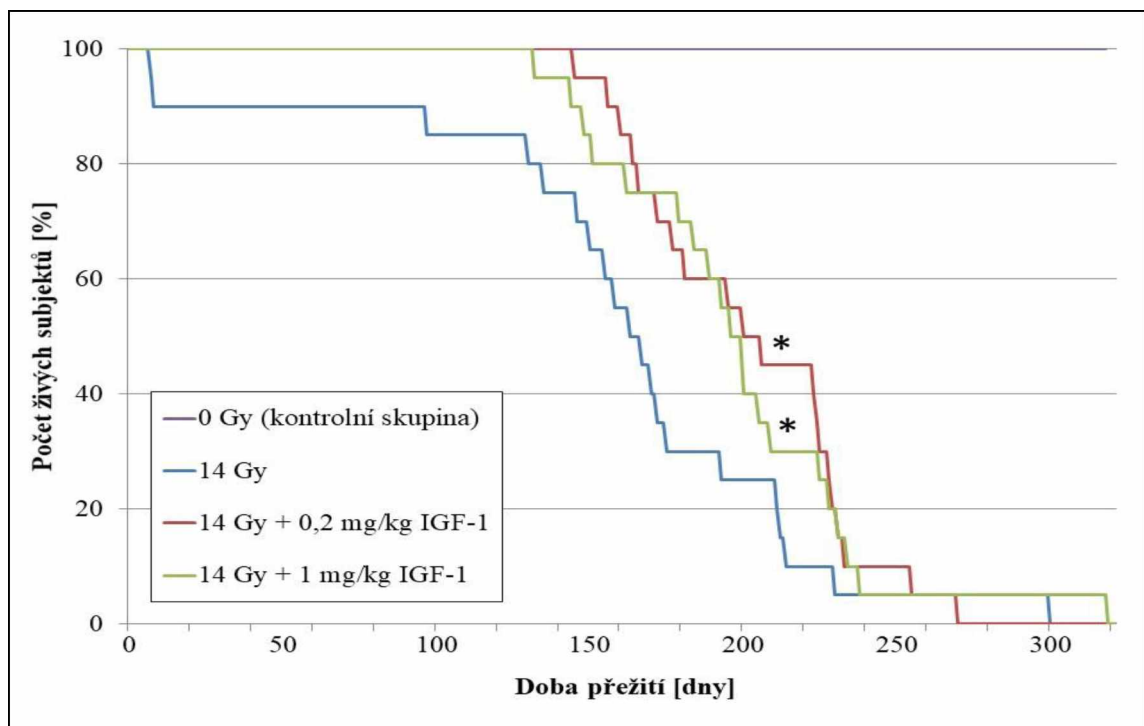
Data jsou v grafech uvedena jako průměry jednotlivých skupin \pm dvojnásobek směrodatné odchylky průměru ($2 \times$ SEM).

4 Výsledky

4.1 Experimentální model 1 (vliv IGF-1 na přežívání zvířat)

Přežívání zvířat bylo testováno na modelu myši kmene C57Bl/6J po jednorázovém ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy. Jednotlivým skupinám po 20 jedincích byl subkutánně aplikován fyziologický roztok v případě neozářené kontrolní skupiny (fialová křivka znázorněné pouze v Grafu 1) nebo ozářené neléčené skupiny (modré křivky) nebo růstový faktor IGF-1 v dávce 0,2 (červené křivky) nebo 1 mg/kg (zelené křivky) tělesné hmotnosti v intervalu 1, 24 a 48 hodin po ozáření.

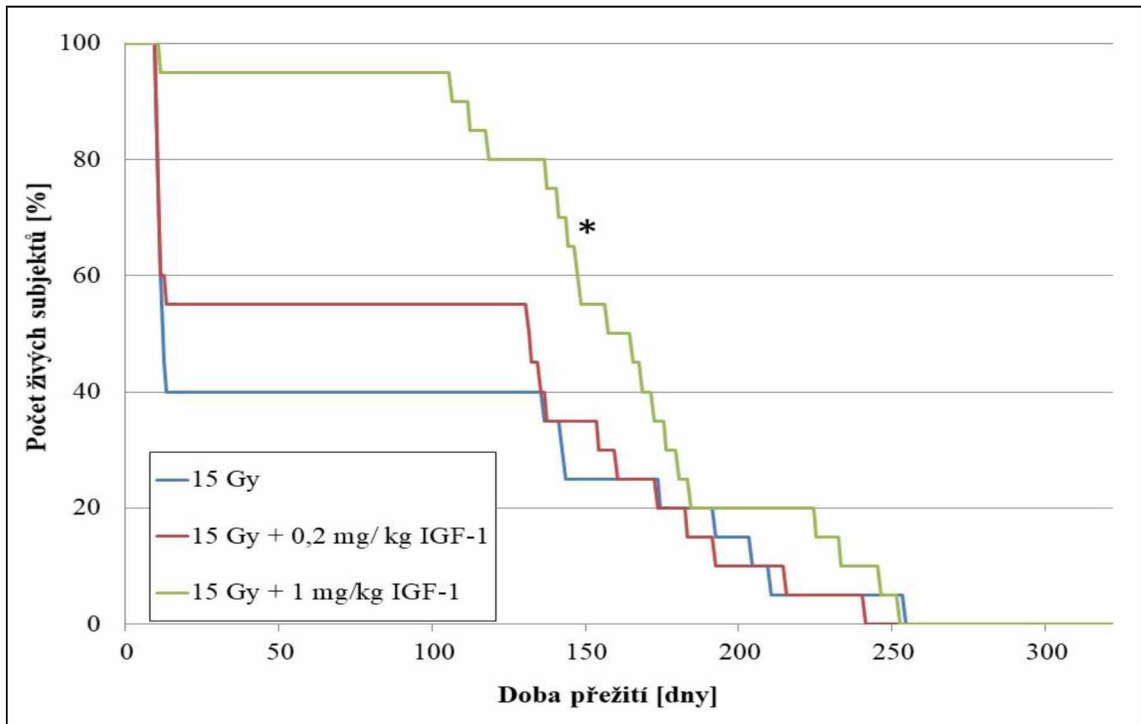
Graf 1. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

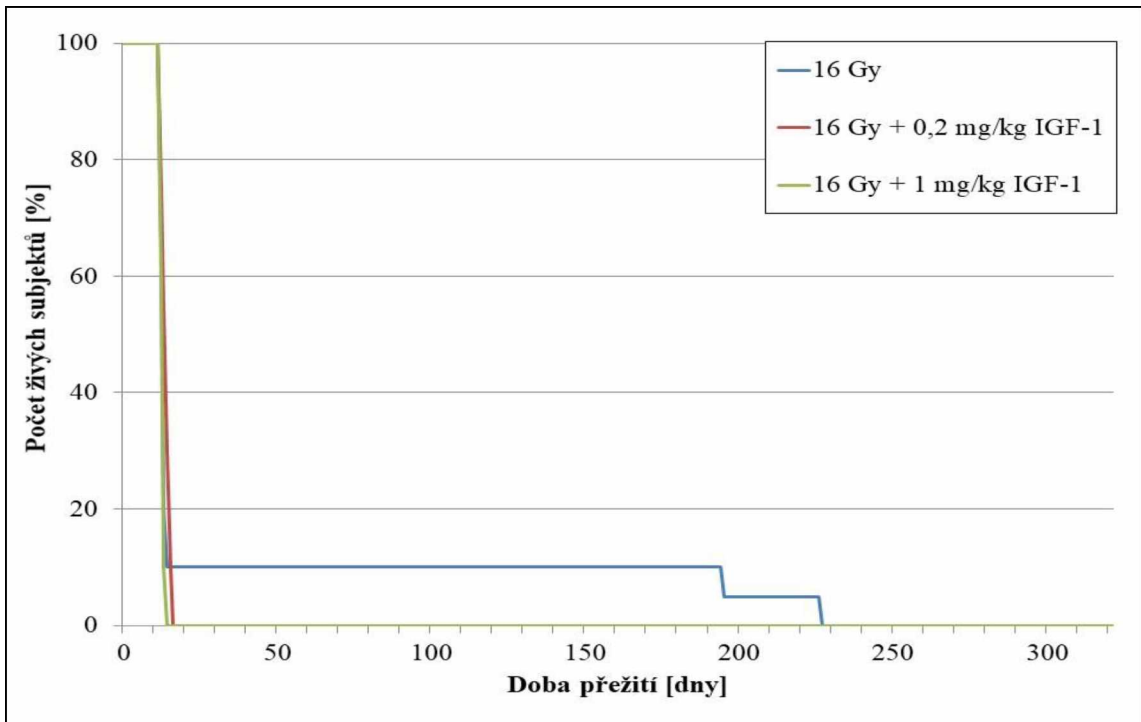
Při 14 Gy byl nalezen signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou léčenou dávkou 0,2 mg/kg ($p = 0,01$). Medián přežití se zvýšil ze 163 na 200 dnů. Po podání IGF-1 v dávce 1 mg/kg došlo k statisticky významnému zvýšení mediánu přežití na 200 dnů ($p = 0,039$; viz Graf 1).

Graf 2. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 15 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

Graf 3. Počet přežívajících jedinců po jednorázovém ozáření dávkou 16 Gy s krytím hlavy v závislosti na čase a podání IGF-1.



Po ozáření 15 Gy došlo při aplikaci IGF-1 v dávce 0,2 mg/kg k nesignifikantnímu zvýšení mediánu přežití z 12 dnů na 131 dnů. Statisticky významné zlepšení bylo však možné pozorovat při podání IGF-1 v dávce 1 mg/kg, kdy se medián zvýšil na 157 dnů ($p = 0,007$). Signifikantní rozdíl byl nalezen i při hodnocení obou léčených skupin ($p = 0,021$; Graf 2).

Jak je patrné z Grafu 3 léčba růstovým faktorem IGF-1 při 16 Gy již k signifikantním změnám oproti neléčené skupině nevedla. Rozdíly byly nalezeny pouze mezi skupinami léčenými IGF-1 ($p = 0,013$).

4.2 Experimentální model 2

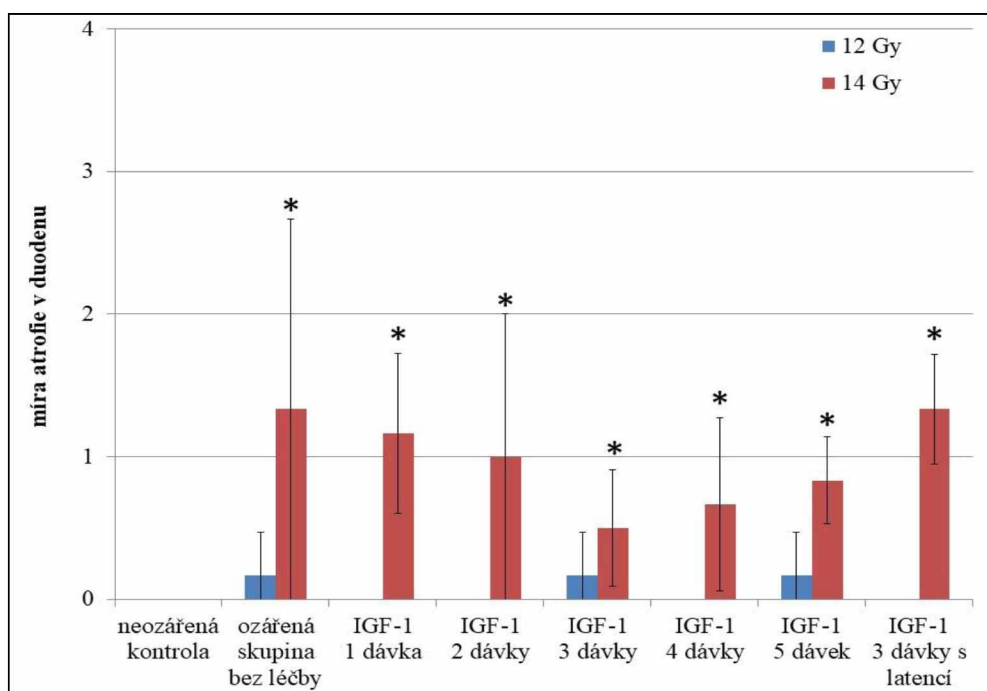
V rámci popisu výsledků druhého experimentálního modelu je hodnocen účinek radiace na jednotlivé parametry a do jaké míry může léčba různými dávkovými režimy IGF-1 poškození ve srovnání s ozářenou neléčenou skupinou ovlivnit. Signifikantní rozdíly mezi skupinami zvířat léčených IGF-1 nejsou dále rozebírány s výjimkou rozdílu mezi časným tří a čtyř dávkovým režimem a třemi dávkami růstového faktoru podanými s latencí, pokud byl přítomen (viz Tabulka 14., kapitola 4.2.6).

4.2.1 Duodenum

4.2.1.1 Vliv IGF-1 na atrofii sliznice

V duodenu nebyly po ozáření 12 Gy přítomny jakékoliv signifikantní rozdíly histopatologického skóre atrofie. Tento parametr zaznamenal 133% vzestup po ozáření 14 Gy u neléčené skupiny ($p = 0,002$). Léčba růstovým faktorem oproti této skupině signifikantní změny nevyvolala (Graf 4).

Graf 4. Míra atrofie histopatologického skóre v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.

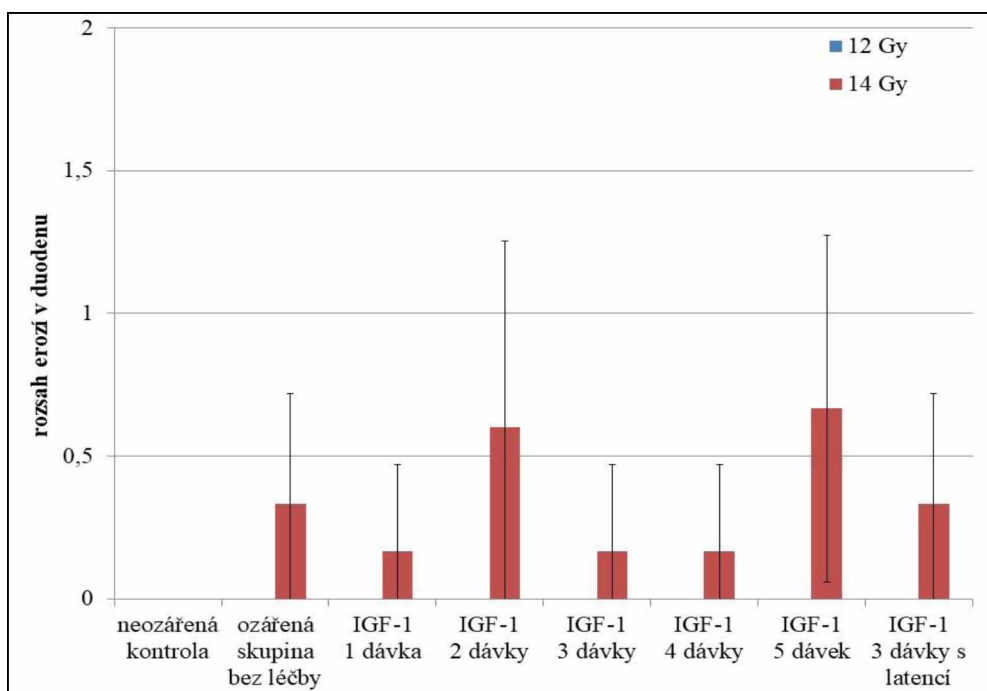


*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

4.2.1.2 Vliv IGF-1 na rozsah erozí

Ačkoliv byly v jednotlivých případech po ozáření 14 Gy drobné eroze v povrchovém epitelu duodena přítomny, nebyly mezi skupinami přítomny statisticky významné rozdíly (Graf 5).

Graf 5. Rozsah erozí v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



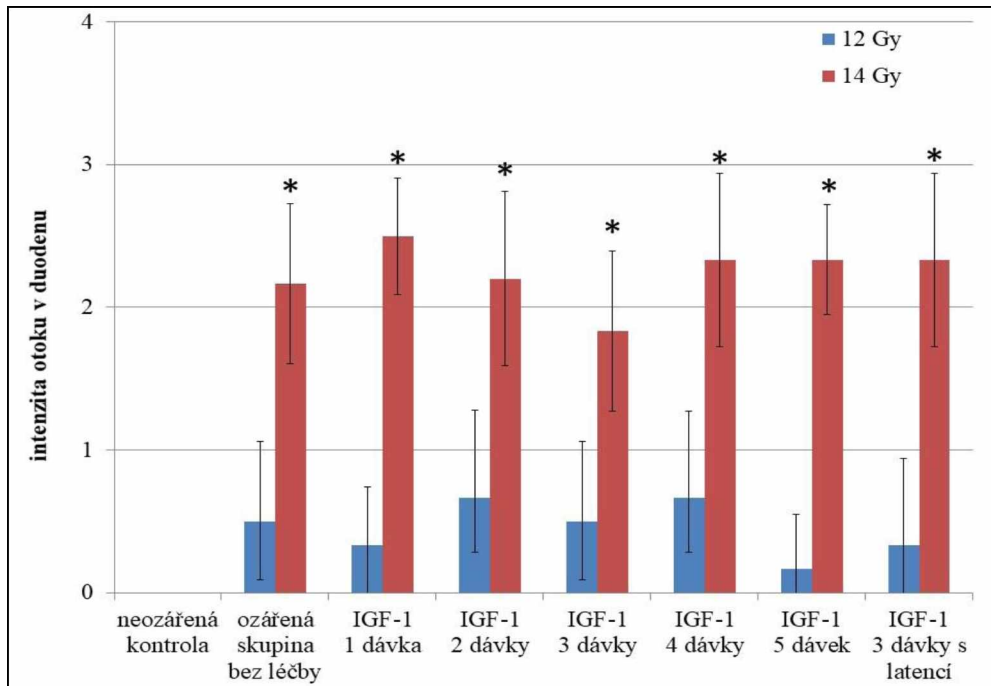
4.2.1.3 Vliv IGF-1 na intenzitu otoku

Po ozáření 14 Gy vzrostlo u neléčené skupiny histopatologické skóre otoku o 233 % ($p = 0,002$). Vliv aplikace IGF-1 na rozsah otoku ve sliznici duodena nebyl pozorován (Graf 6).

4.2.1.4 Vliv IGF-1 na stupeň zánětu

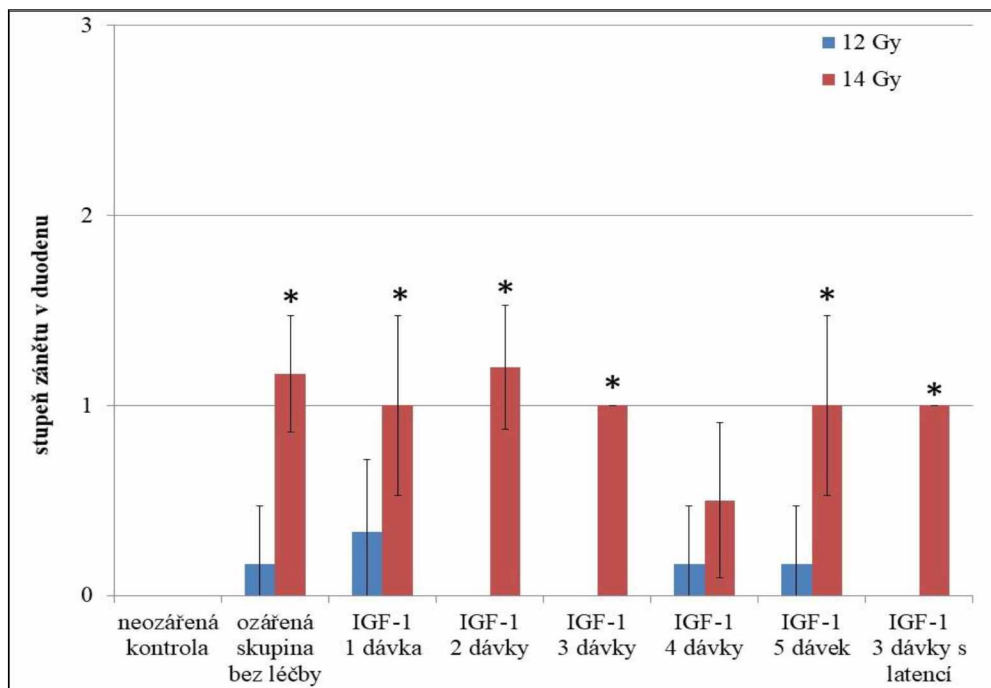
Histopatologické skóre zánětu vykazovalo nárůst o 117 % po ozáření 14 Gy u neléčené skupiny ($p = 0,002$). Léčba pomocí IGF-1 tento ukazatel signifikantně neovlivnila (Graf 7).

Graf 6. Intenzita otoku v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 7. Stupeň zánětu v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.

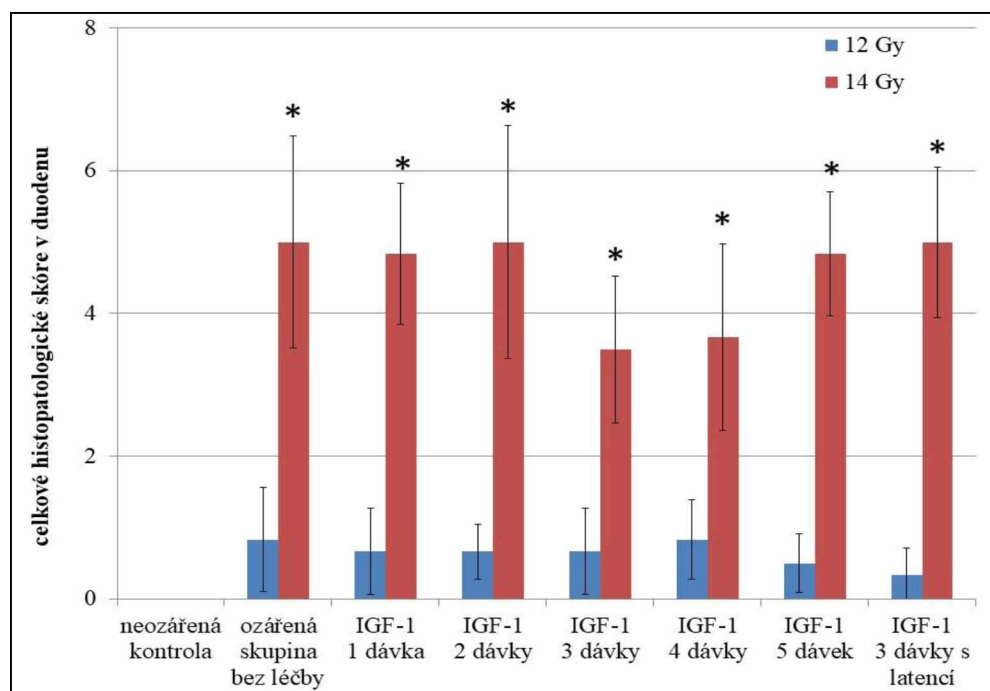


*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

4.2.1.5 Vliv IGF-1 na celkové histopatologické skóre

K statisticky významnému vzrůstu celkového histopatologického skóre došlo po ozáření 14 Gy (o 500 %, $p = 0,002$). I zde podání růstového faktoru nevykazovalo oproti ozářeným skupinám významné rozdíly (Graf 8).

Graf 8. Celkové histopatologické skóre v duodenu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

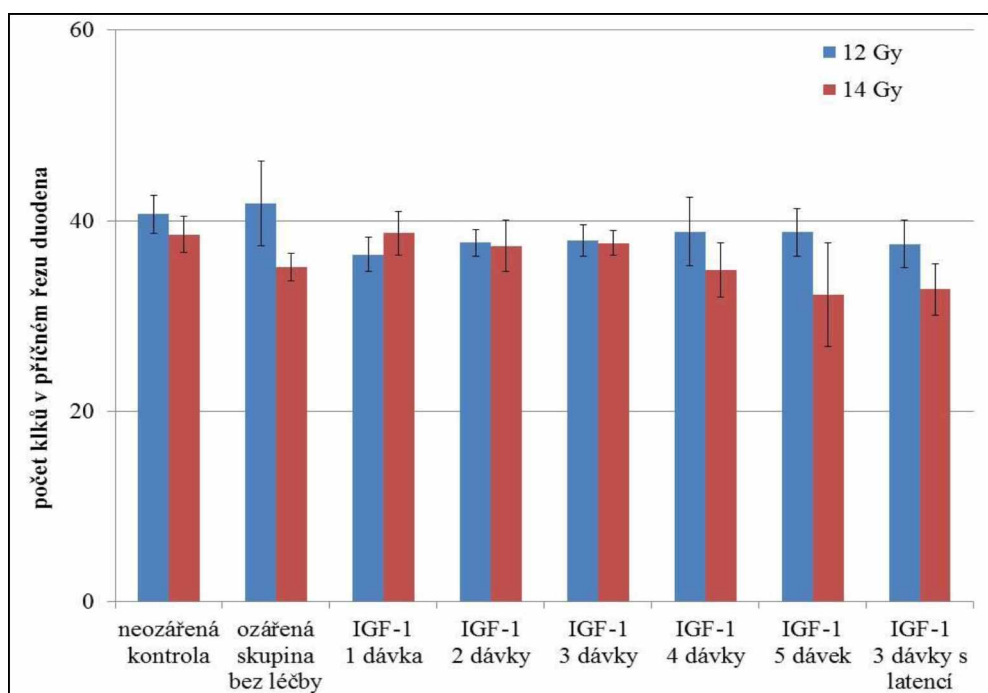
4.2.1.6 Vliv IGF-1 na počet klků

Počet klků v duodenu po ozáření nevykazoval, ať již bez nebo s léčbou IGF-1, jakékoliv významné změny (Graf 9).

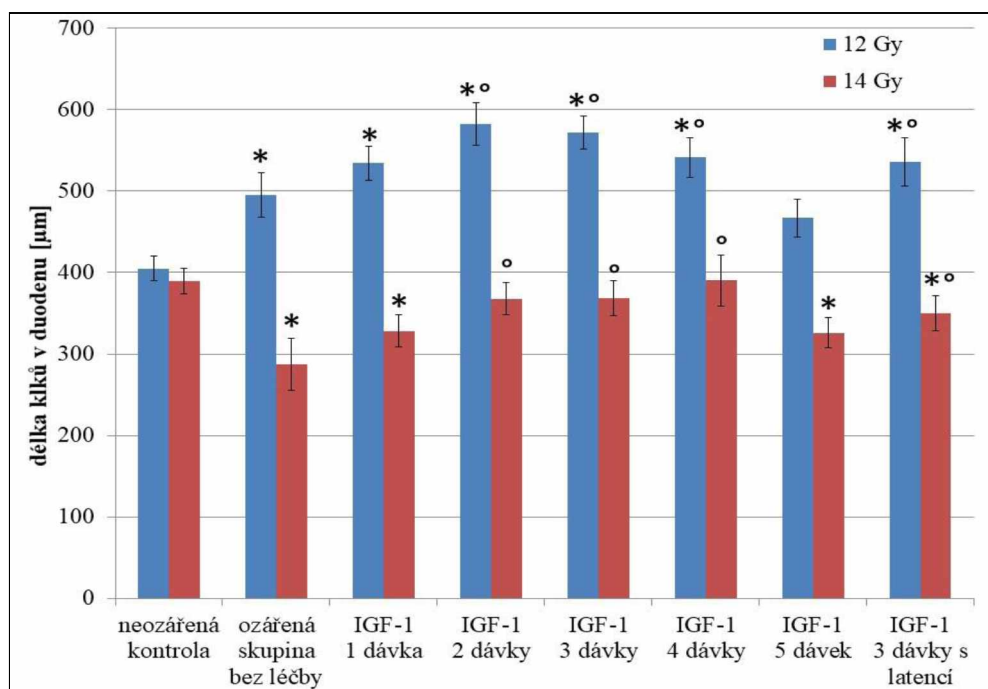
4.2.1.7 Vliv IGF-1 na délku klků

Po ozáření 12 Gy došlo u neléčené skupiny k 22% prodloužení délky klků v duodenu ($p < 0,001$). Ve srovnání s těmito zvířaty se délka klků dále významně zvýšila ve skupinách léčených 2, 3 a 4 dávkami růstového faktoru a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí, a to o 18 % ($p < 0,001$), 15 % ($p < 0,001$), 9 % ($p = 0,029$), respektive 8 % ($p = 0,026$; Graf 10).

Graf 9. Počet klků v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



Graf 10. Délka klků v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

Dávka 14 Gy vyvolala u neléčených myši pokles výšky klků o 26 % ($p < 0,001$). Oproti této skupině došlo k významnému prodloužení délky klků při aplikaci 2, 3 a 4 dávek IGF-1 a 3 dávek růstového faktoru podanými s latencí, a to o 28 % ($p = 0,001$), 28 % ($p < 0,001$), 36 % ($p < 0,001$), respektive 22 % ($p = 0,006$).

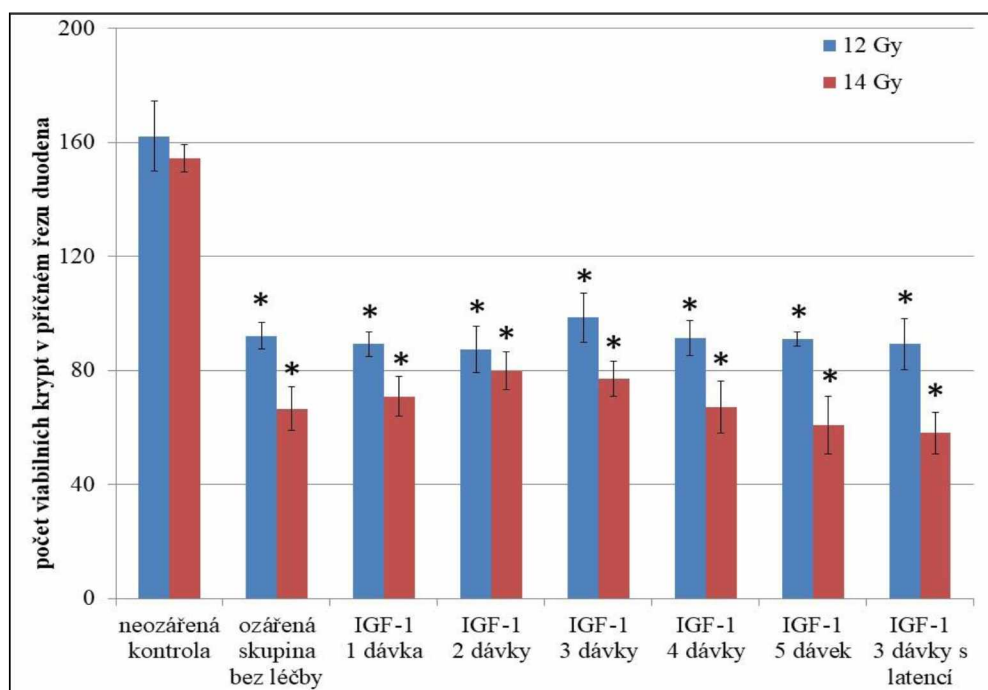
Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí po ozáření 14 Gy. Latence vedla k 10 % poklesu délky klků ($p = 0,023$; Graf 10).

4.2.1.8 Vliv IGF-1 na počet krypt

Ve srovnání s kontrolní skupinou se v duodenu počet viabilních krypt snížil po ozáření 12 a 14 Gy u neléčených myši o 45 %, respektive 49 % (obě $p = 0,002$). Oproti zvířatům, kterým nebyla podána léčba, nevykazoval IGF-1 na počet viabilních krypt jakýkoliv vliv.

Nalezen byl pouze signifikantní rozdíl mezi časným a pozdním 3dávkovým režimem po ozáření 14 Gy, kdy léčba s latencí vykazovala 25% pokles počtu viabilních krypt ($p = 0,009$; Graf 11).

Graf 11. Počet viabilních krypt v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

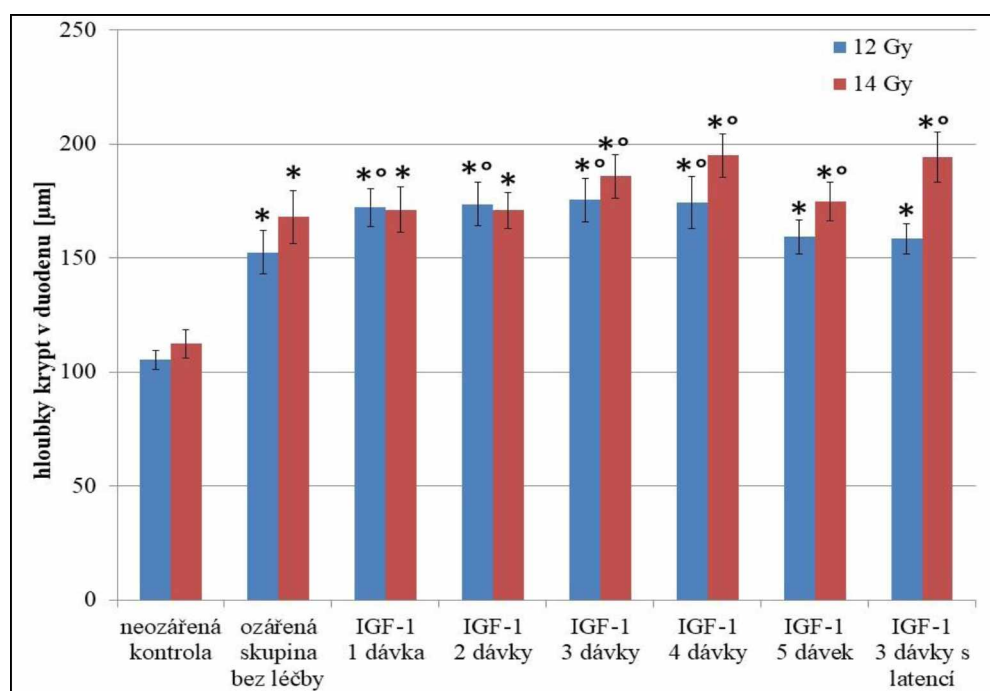
4.2.1.9 Vliv IGF-1 na hloubku krypt

Dávka 12 Gy vedla u neléčených zvířat k 44% prodloužení krypt ($p < 0,001$). Na rozdíl od této skupiny bylo možné pozorovat signifikantní rozdíl u myší léčených 1, 2, 3 a 4 dávkami IGF-1. U těchto skupin se délka krypt navíc zvýšila o 13 % ($p = 0,001$), 14 % ($p = 0,001$), 15 % ($p < 0,001$), respektive 14 % ($p = 0,003$; Graf 12).

Po ozáření 14 Gy došlo ve skupině bez léčby k 49% nárůstu hloubky krypt ($p < 0,001$). Oproti této skupině se dále tento parametr zvýšil při aplikaci 3 a 4 dávek IGF-1 a 3 dávek IGF-1 podanými s latencí, a to 11 % ($p = 0,001$), 16 % ($p < 0,001$), respektive 16 % ($p = 0,003$; Graf 12).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 3 a 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí po ozáření 12 Gy. Latence vedla k 10% ($p = 0,022$), respektive 9% poklesu délky klků ($p = 0,029$; Graf 12).

Graf 12. Hloubka krypt v příčném řezu duodena 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

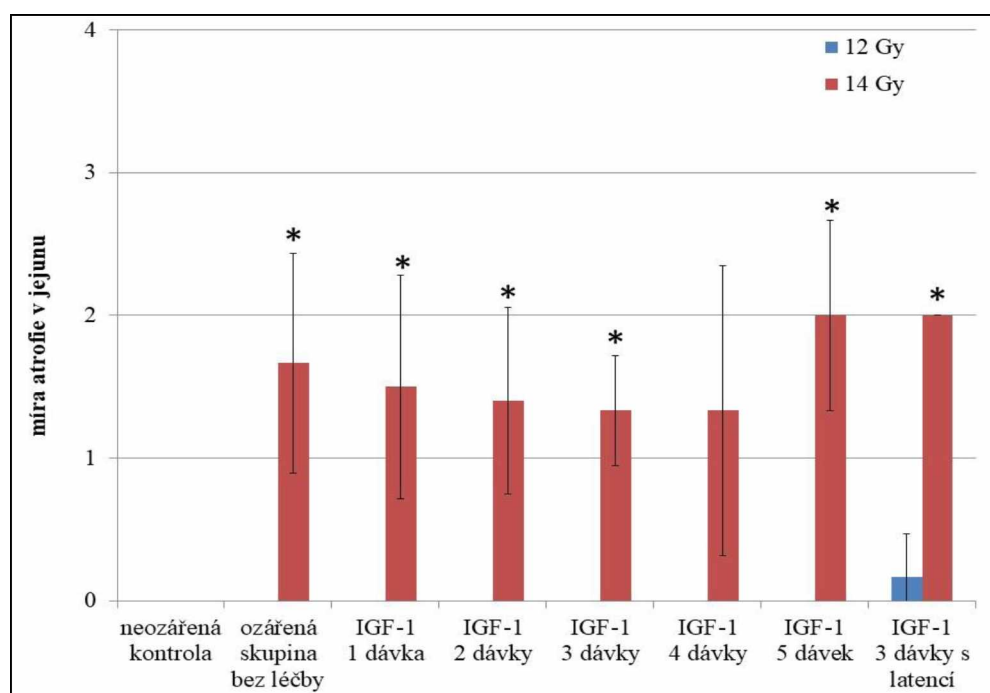
°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.2 Jejunum

4.2.2.1 Vliv IGF-1 na míru atrofie

V jejunu nebyly po ozáření 12 Gy patrné jakékoliv signifikantní rozdíly histopatologického skóre atrofie. Tento parametr zaznamenal 167% vzestup po ozáření 14 Gy u neléčené skupiny ($p = 0,015$). Léčba růstovým faktorem oproti této skupině signifikantní změny nevyvolala (Graf 13).

Graf 13. Míra atrofie histopatologického skóre v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

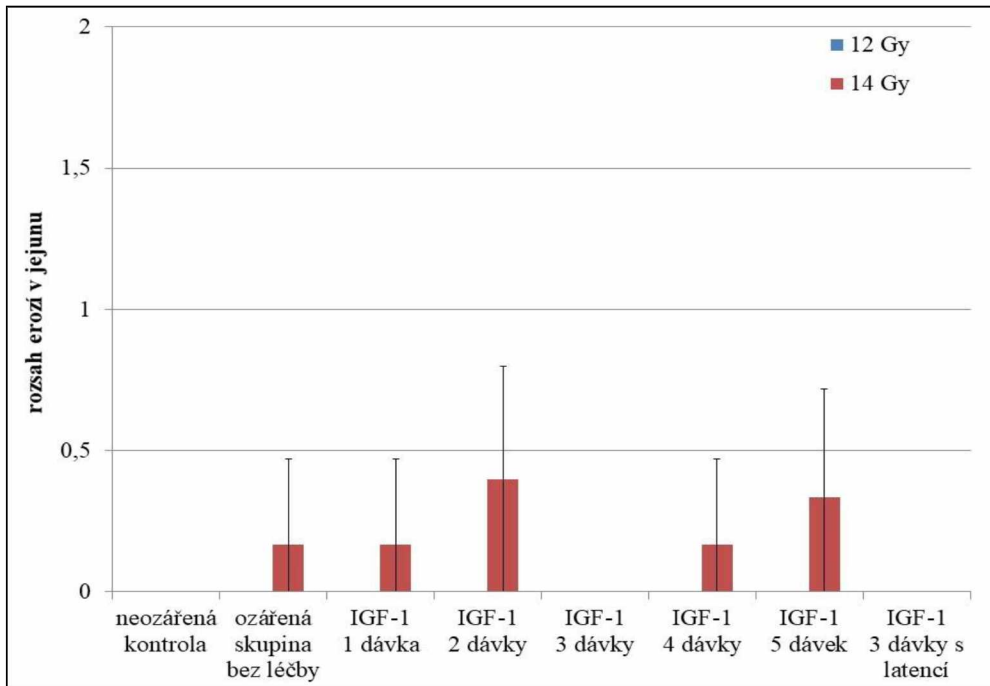
4.2.2.2 Vliv IGF-1 na rozsah erozí

V případě erozí nebyly mezi skupinami v jejunu nalezeny jakékoliv statisticky významné rozdíly (Graf 14).

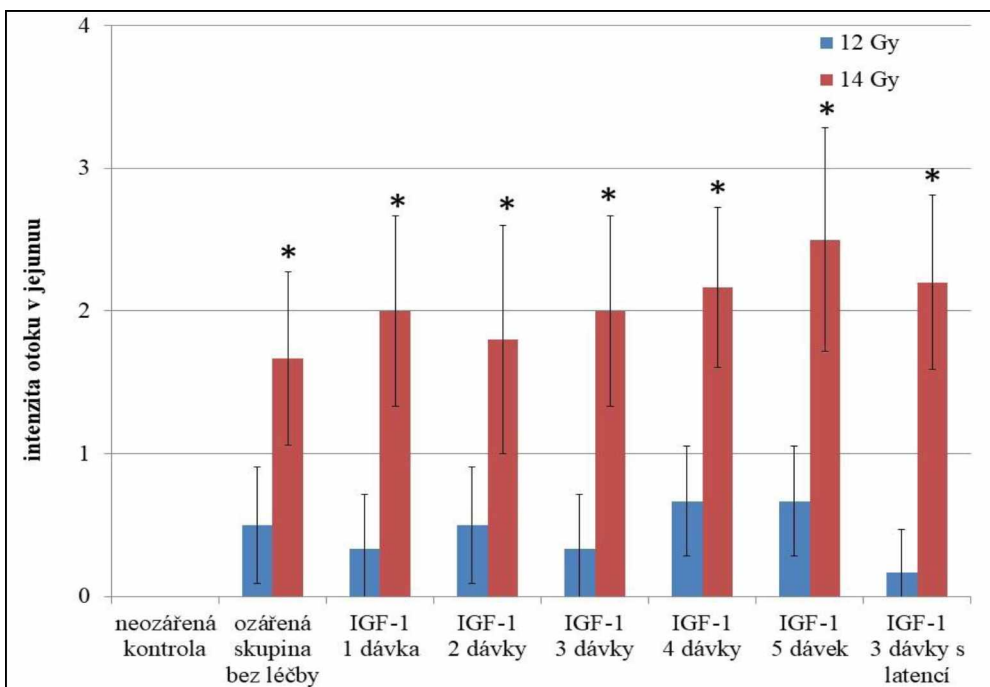
4.2.2.3 Vliv IGF-1 na intenzitu otoku

Po ozáření 14 Gy vzrostlo u neléčené skupiny histopatologické skóre otoku v jejunu o 167% ($p = 0,002$). Vliv aplikace IGF-1 na rozsah otoku ve sliznici jejunu zaznamenán nebyl (Graf 15).

Graf 14. Rozsah erozí v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



Graf 15. Intenzita otoku v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.

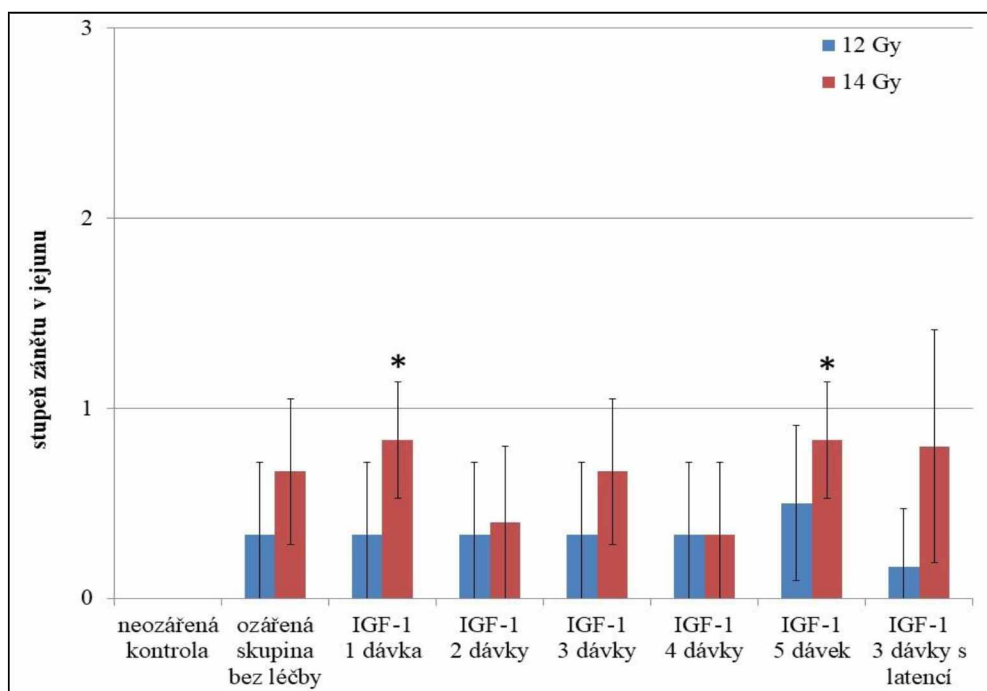


*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

4.2.2.4 Vliv IGF-1 na stupeň zánětu

Po ozáření 12 a 14 Gy nebyly u neléčených jedinců pozorovány signifikantní změny histopatologického stupně zánětu v jejunu. Oproti těmto skupinám nevykazovala aplikace IGF-1 jakýkoliv účinek (Graf 16).

Graf 16. Stupeň zánětu v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

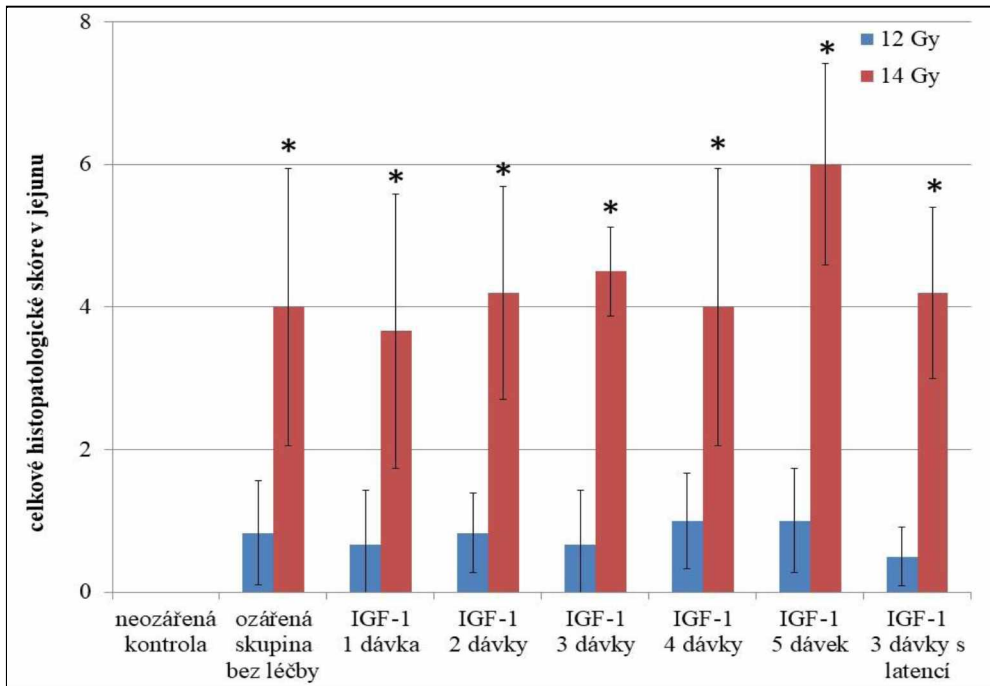
4.2.2.5 Vliv IGF-1 na celkové histopatologické skóre

K statisticky významnému vzrůstu celkového histopatologického skóre v jejunu došlo po ozáření 14 Gy (o 433 %, $p = 0,002$). I zde léčba růstovým faktorem nevykazovala oproti této skupině významné rozdíly (Graf 17).

4.2.2.6 Vliv IGF-1 na počet klků

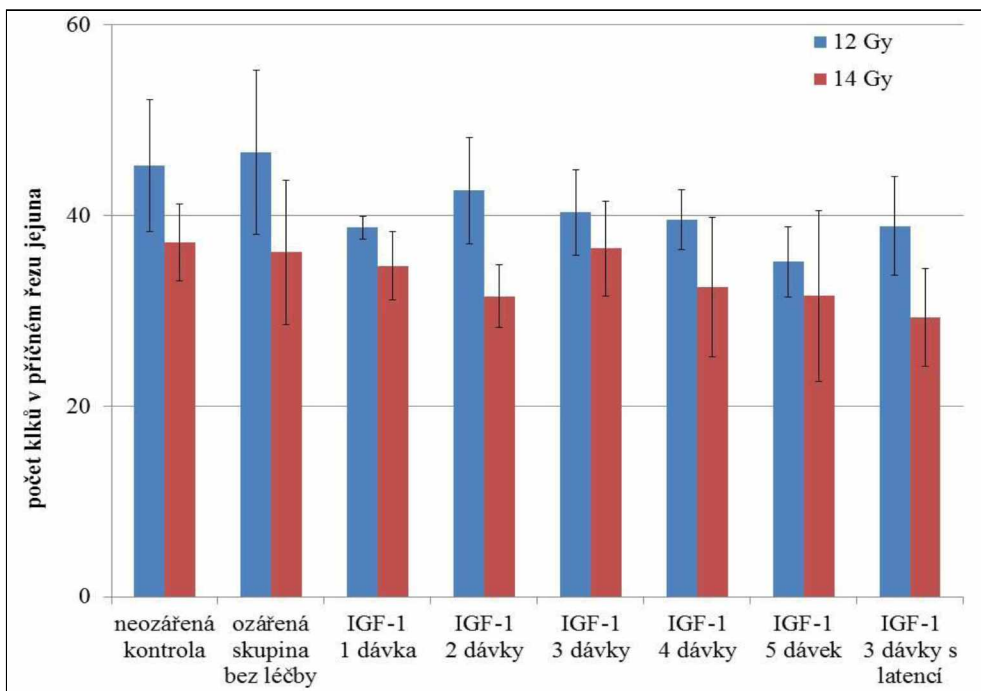
Počet klků v jejunu nevykazoval mezi skupinami jakékoliv významné rozdíly (Graf 18).

Graf 17. Celkové histopatologické skóre v jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 18. Počet klků v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

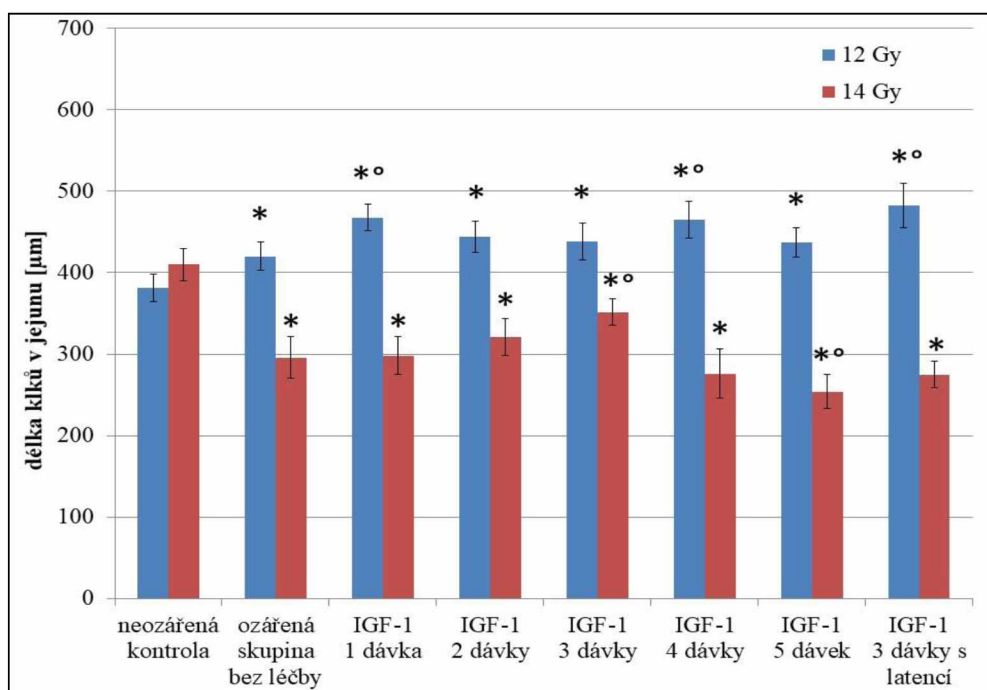
4.2.2.7 Vliv IGF-1 na délku klků

Po ozáření 12 Gy došlo u neléčené skupiny k 1,1násobnému prodloužení délky klků v jejunu ($p = 0,001$). Ve srovnání s těmito zvířaty se délka klků dále signifikantně zvýšila ve skupinách léčených 1 a 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí, a to o 11 % ($p < 0,001$), 11 % ($p = 0,002$), respektive 15 % ($p < 0,001$; Graf 19).

Dávka 14 Gy vyvolala u neléčených myši pokles výšky klků o 28 % ($p < 0,001$). Oproti této skupině došlo k 19% prodloužení délky klků po aplikaci 3 dávek IGF-1 ($p = 0,001$) a naopak k dalšímu poklesu o 14 % po podání 5 dávek IGF-1 ($p = 0,023$; Graf 19).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi oběma 3dávkami režimy po ozáření 12 a 14 Gy, kdy léčba s latencí vyvolala při 12 Gy o 10 % vyšší ($p = 0,017$) a při 14 Gy o 22 % nižší účinek ($p < 0,001$; Graf 19).

Graf 19. Délka klků v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

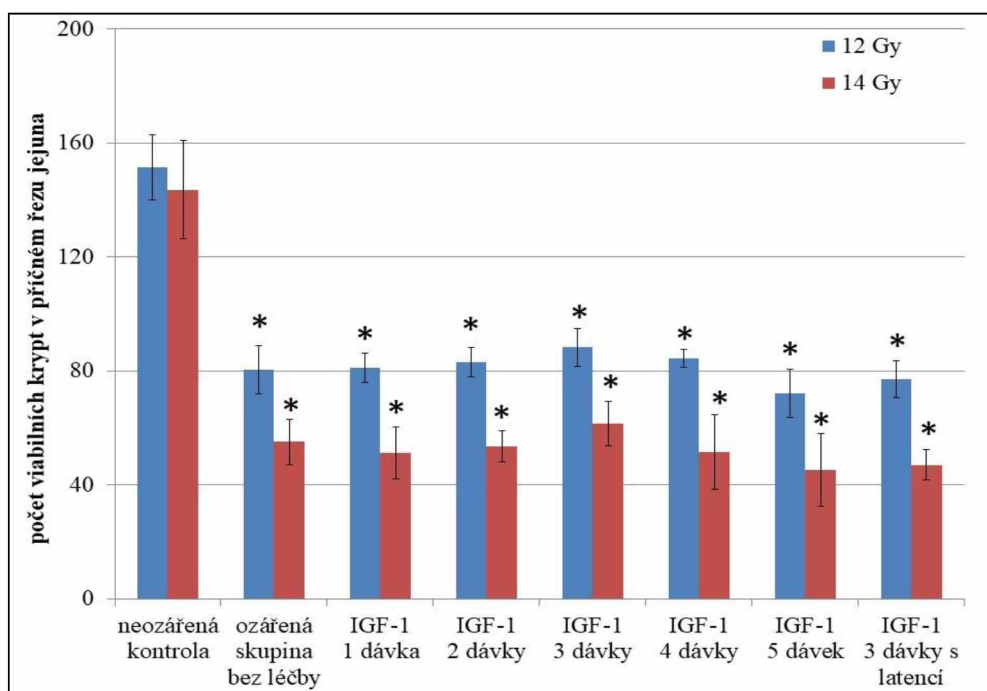
°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.2.8 Vliv IGF-1 na počet krypt

Ve srovnání s kontrolní skupinou se v duodenu počet viabilních krypt snížil po ozáření 12 a 14 Gy u neléčených myši o 47 %, respektive 62 % (obě $p = 0,002$). Oproti zvířatům, kterým nebyla podána léčba, nevykazovala léčba růstovým faktorem na tento parametr jakýkoliv účinek (Graf 20).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi oběma tři dávkými režimy po ozáření 14 Gy, kdy aplikace IGF-1 s latencí vyvolala o 23 % nižší účinek ($p = 0,009$; Graf 20).

Graf 20. Počet viabilních krypt v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

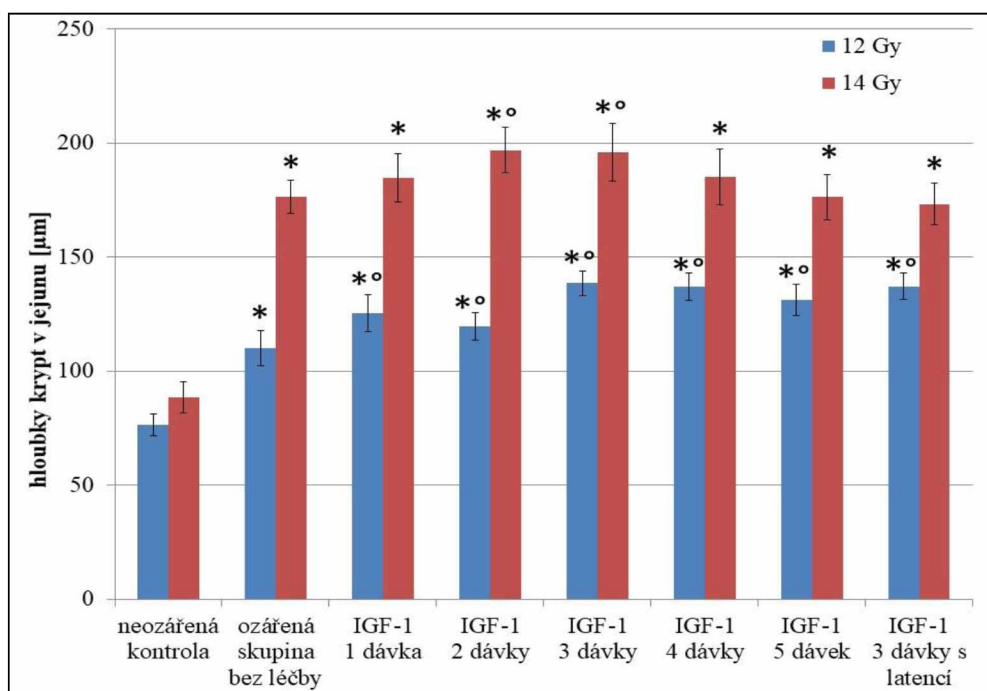
4.2.2.9 Vliv IGF-1 na hloubku krypt

Dávka 12 Gy vedla u neléčených zvířat k 44% prodloužení krypt ($p < 0,001$). Na rozdíl od této skupiny bylo možné pozorovat signifikantní rozdíl u myši léčených 1, 2, 3, 4 a 5 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 aplikovanými s latencí. U těchto skupin se délka krypt navíc zvýšila o 14 % ($p = 0,008$), 9 % ($p = 0,028$), 26 % ($p < 0,001$), 25 % ($p < 0,001$), 19 % ($p < 0,001$), respektive 25 % ($p = 0,003$).

Po ozáření 14 Gy došlo ve skupině bez léčby k 100% nárůstu hloubky krypt ($p < 0,001$). Oproti této skupině se tento parametr dále zvýšil při léčbě 2 a 3 dávkami IGF-1, a to o 12 % ($p < 0,001$), respektive 11 % ($p = 0,005$).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi oběma 3dávkými režimy po ozáření 14 Gy, kdy léčba s latencí vyvolala o 12 % nižší účinek ($p < 0,001$; Graf 21).

Graf 21. Hloubka krypt v příčném řezu jejunu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.3 Ileum

4.2.3.1 Vliv IGF-1 na míru atrofie

U neléčené skupiny vedlo po ozáření 14 Gy histopatologické skóre atrofie v ileu k vzestupu o 150 % ($p = 0,015$). Léčba růstovým faktorem oproti této skupině signifikantní změny nevyvolala (Graf 22).

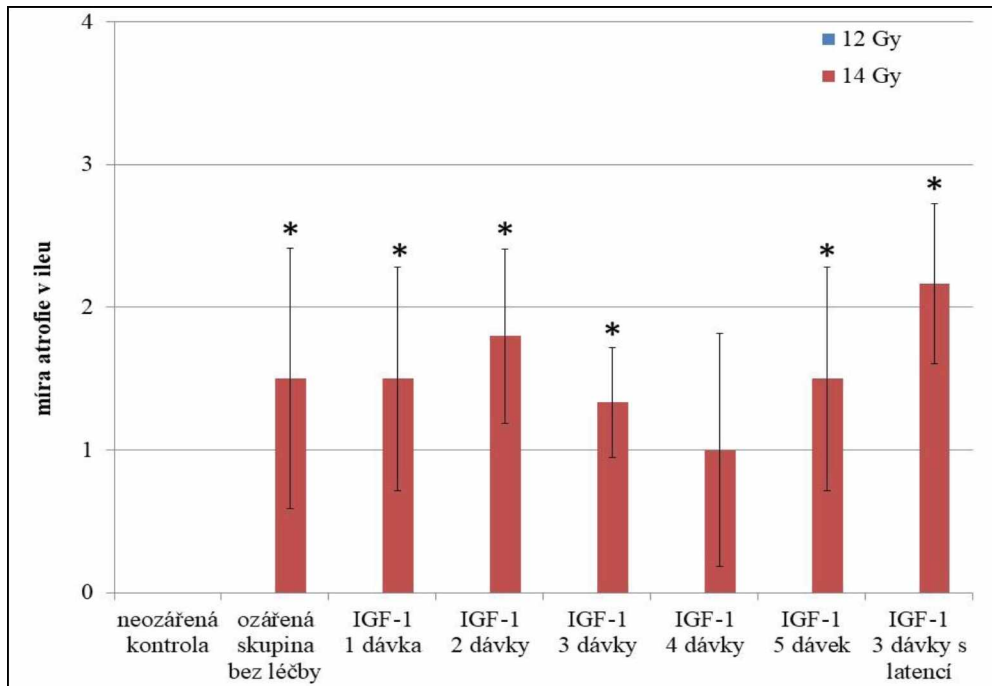
4.2.3.2 Vliv IGF-1 na rozsah erozí

V případě erozí nebyly v ileu mezi skupinami pozorovány jakékoliv statisticky významné rozdíly (Graf 23).

4.2.3.3 Vliv IGF-1 na intenzitu otoku

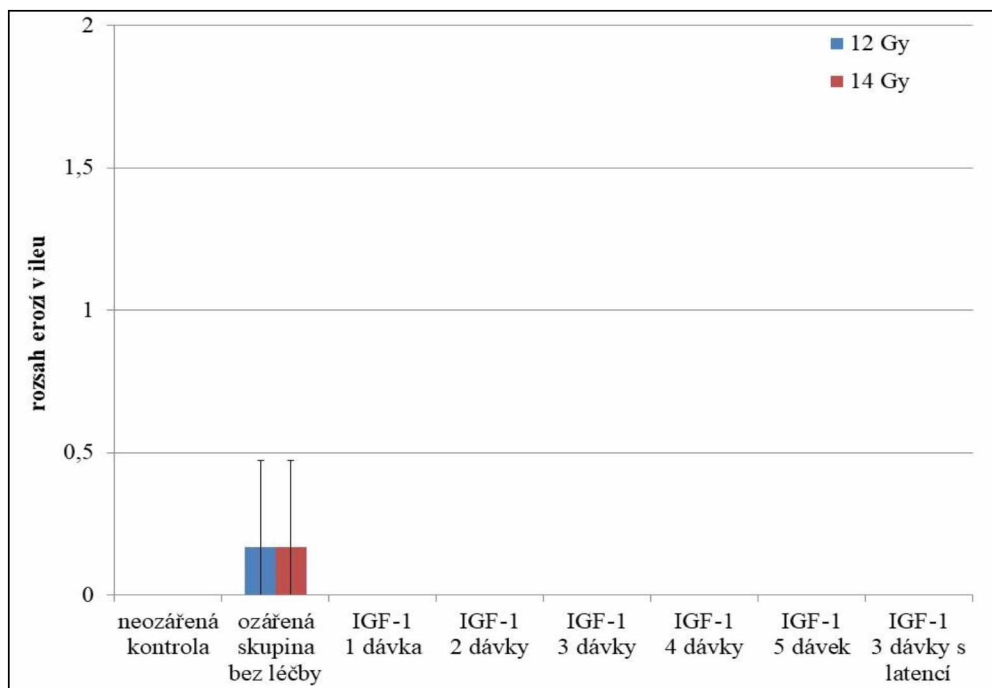
Po ozáření 14 Gy vzrostlo signifikantně u neléčené skupiny histopatologické skóre otoku v ileu o 167 % ($p = 0,002$). Vliv aplikace IGF-1 na rozsah otoku ve sliznici ilea zaznamenán nebyl (Graf 24).

Graf 22. Míra atrofie histopatologického skóre v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.

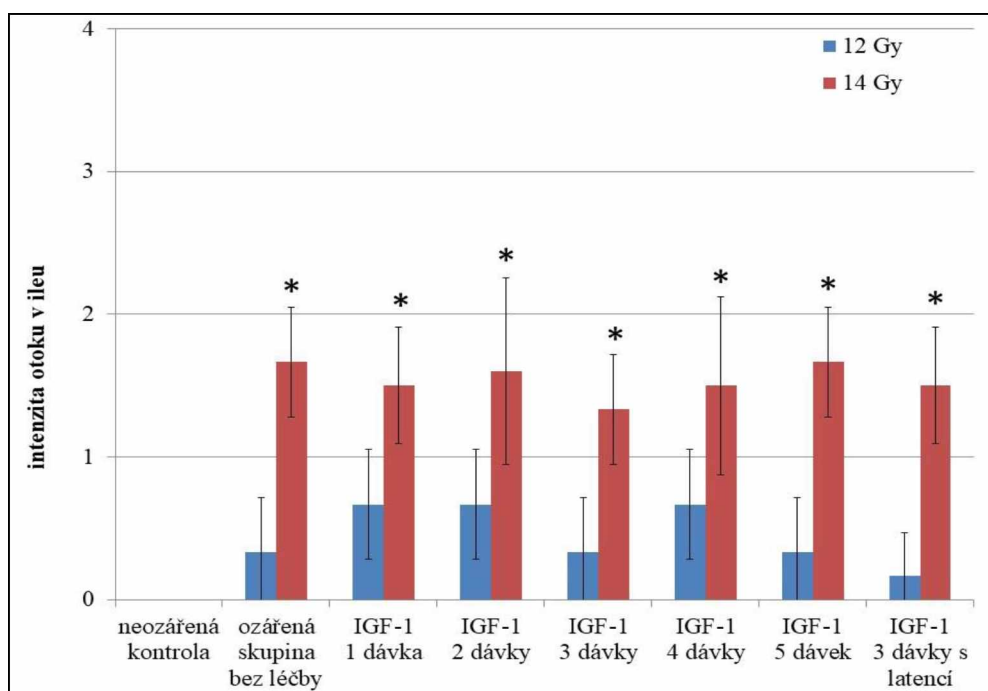


*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 23. Rozsah erozí v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



Graf 24. Intenzita otoku v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

4.2.3.4 Vliv IGF-1 na stupeň zánětu

Histopatologické skóre zánětu vykazovalo u neléčené skupiny 83% nárůst po ozáření 14 Gy ($p = 0,015$). Léčba pomocí růstového faktoru tento ukazatel signifikantně neovlivnila (Graf 25).

4.2.3.5 Vliv IGF-1 na celkové histopatologické skóre

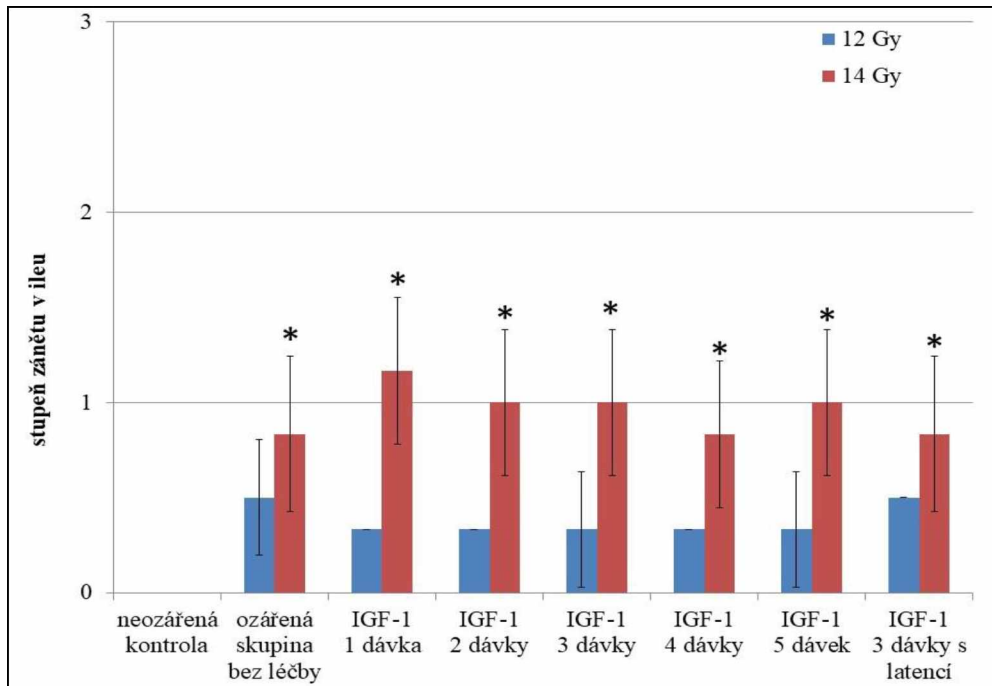
K statisticky významnému vzrůstu celkového histopatologického skóre v jejunu došlo po ozáření 14 Gy (o 501 %, $p = 0,002$). Ani zde podání růstového faktoru nepřineslo významné rozdíly (Graf 26).

4.2.3.6 Vliv IGF-1 na počet klků

Počet klků v ileu vykazoval 32% pokles po ozáření 14 Gy u neléčené skupiny ($p = 0,026$). Nicméně terapie pomocí IGF-1 vůči pozitivním kontrolám jakýkoliv statisticky významný vliv neměla.

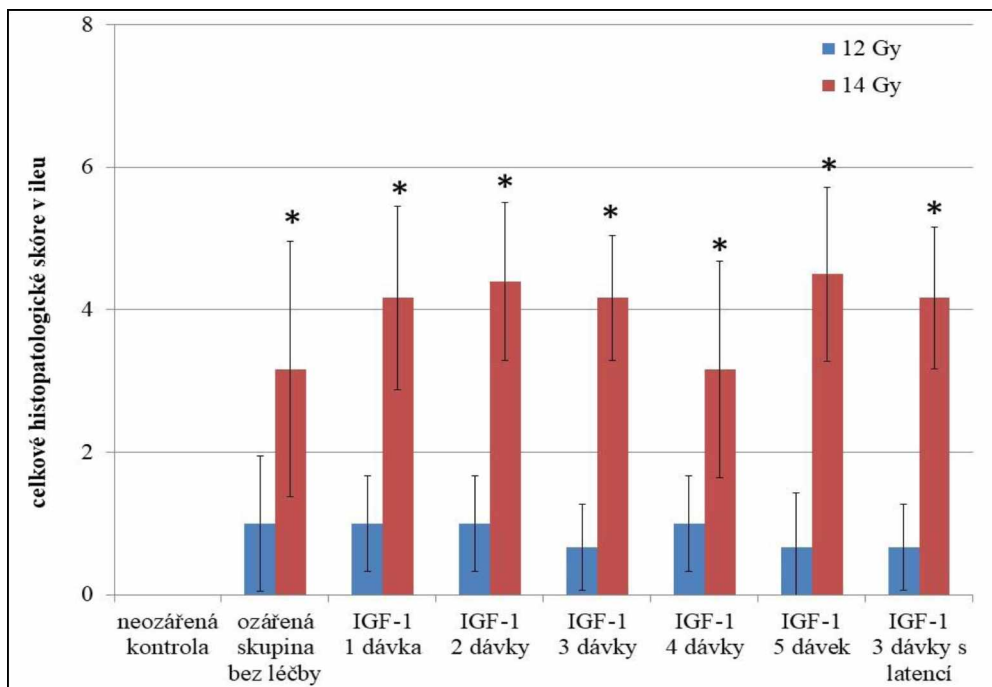
Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 3 a 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí po ozáření 14 Gy. Latence vedla k 30% ($p = 0,009$), respektive 27% poklesu délky klků ($p = 0,015$; Graf 27).

Graf 25. Stupeň zánětu v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



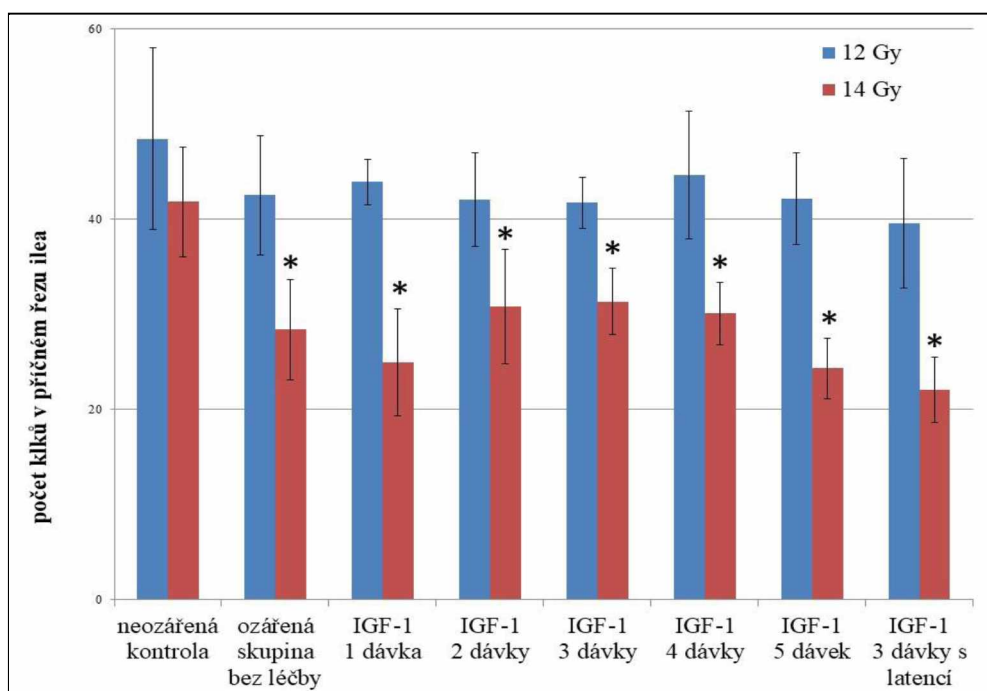
*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 26. Celkové histopatologické skóre v ileu 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 27. Počet klků v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

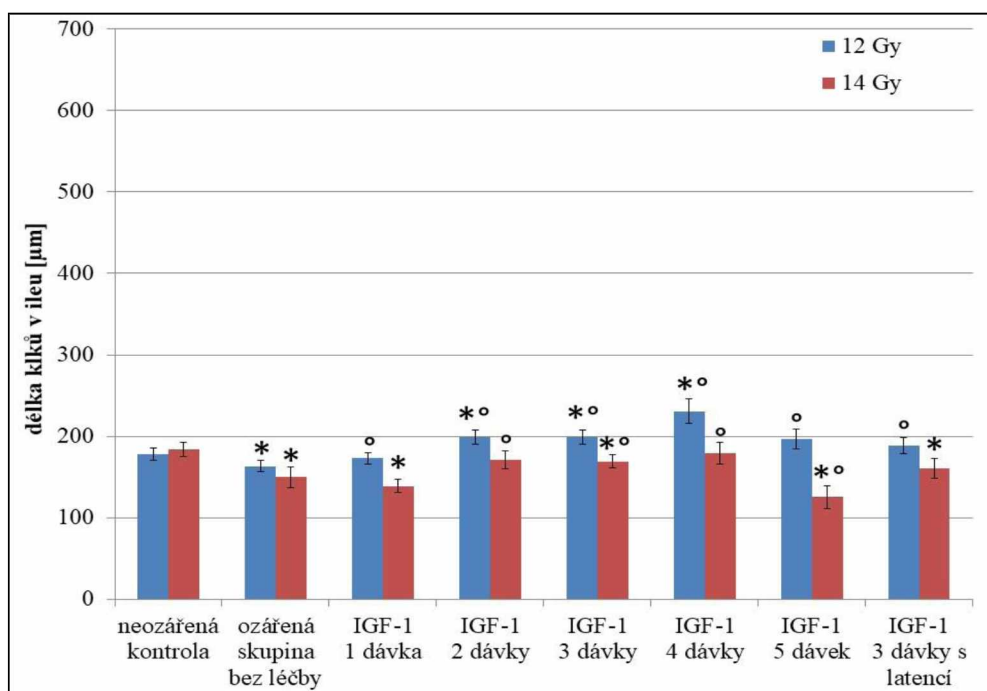
4.2.3.7 Vliv IGF-1 na délku klků

Po ozáření 12 Gy došlo u neléčené skupiny k snížení délky klků v ileu o 8 % ($p = 0,002$). Ve srovnání s těmito zvířaty byla délka klků dále signifikantně vyšší ve skupinách léčených 2, 3, 4 a 5 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí, a to o 22 % ($p = 0,022$), 22 % ($p < 0,001$), 41 % ($p < 0,001$), 20 % ($p < 0,001$), respektive 15 % ($p < 0,001$).

Dávka 14 Gy vyvolala u neléčených myši pokles výšky klků o 19 % ($p < 0,001$). Oproti této skupině došlo při aplikaci 2, 3 a 4 dávek IGF-1 k 15% ($p = 0,006$), 13% ($p = 0,003$), respektive 20% ($p = 0,002$) prodloužení délky klků. Naopak pěti dávkový režim délku klků ještě více snížil o dalších 16 % ($p = 0,012$; Graf 28).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 aplikovaných s časovým odstupem po ozáření 12 a 14 Gy. Latence vedla k 18% ($p < 0,001$), respektive 10% poklesu účinnosti ($p = 0,046$; Graf 28).

Graf 28. Délka klků v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.3.8 Vliv IGF-1 na počet krypt

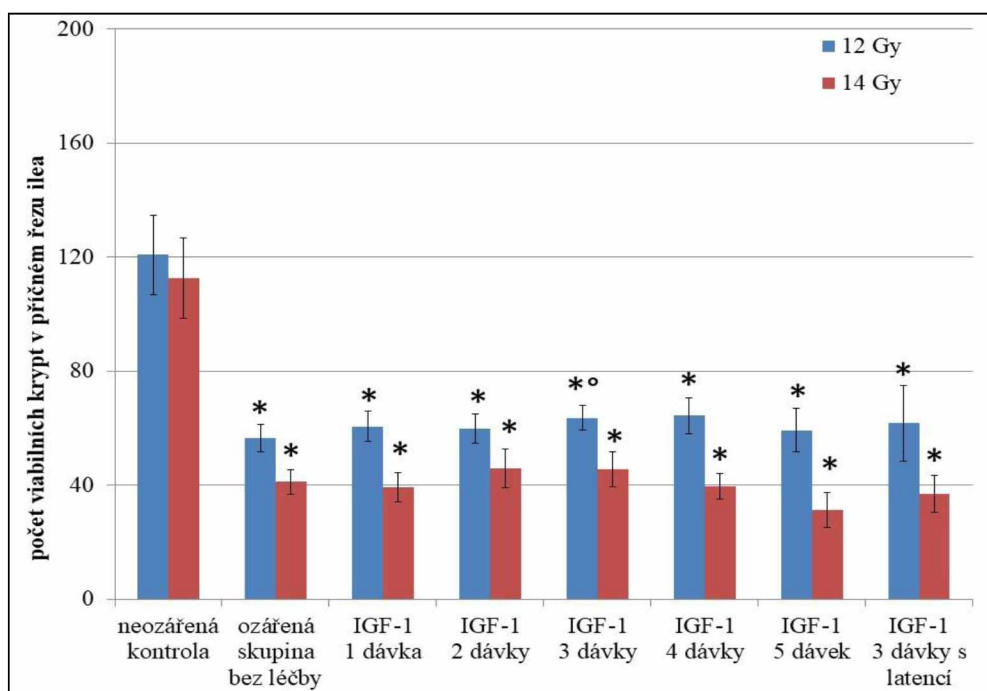
Ve srovnání s kontrolní skupinou se v ileu počet viabilních krypt snížil po ozáření 12 a 14 Gy u neléčených myší o 53 %, respektive 63 % (obě $p = 0,002$). Oproti zvířatům, kterým nebyla aplikována léčba, nevykazoval IGF-1 na počet viabilních krypt jakýkoliv vliv s jedinou výjimkou. Terapie IGF-1 vedla pouze k jedinému zlepšení, a to při dávce 12 Gy v tří dávkovém režimu, při kterém počet viabilních krypt byl vyšší o 13 % ($p = 0,041$) ve srovnání s pozitivní kontrolou (Graf 29).

4.2.4 Vliv IGF-1 na hloubku krypt

Dávka 12 Gy vedla u neléčených zvířat k 13% prodloužení krypt ($p < 0,001$). Na rozdíl od této skupiny bylo možné pozorovat signifikantní rozdíl u myší léčených 3, 4 a 5 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí, kde byla délka krypt vyšší o 9 % ($p = 0,008$), 33 % ($p < 0,001$), 12 % ($p < 0,001$), respektive 12 % ($p = 0,003$; Graf 30).

Po ozáření 14 Gy došlo ve skupině bez léčby k 26% nárůstu hloubky krypt ($p < 0,001$). Oproti této skupině se tento parametr dále zvýšil o 8 % při léčbě 2 dávkami IGF-1 ($p = 0,02$; Graf 30).

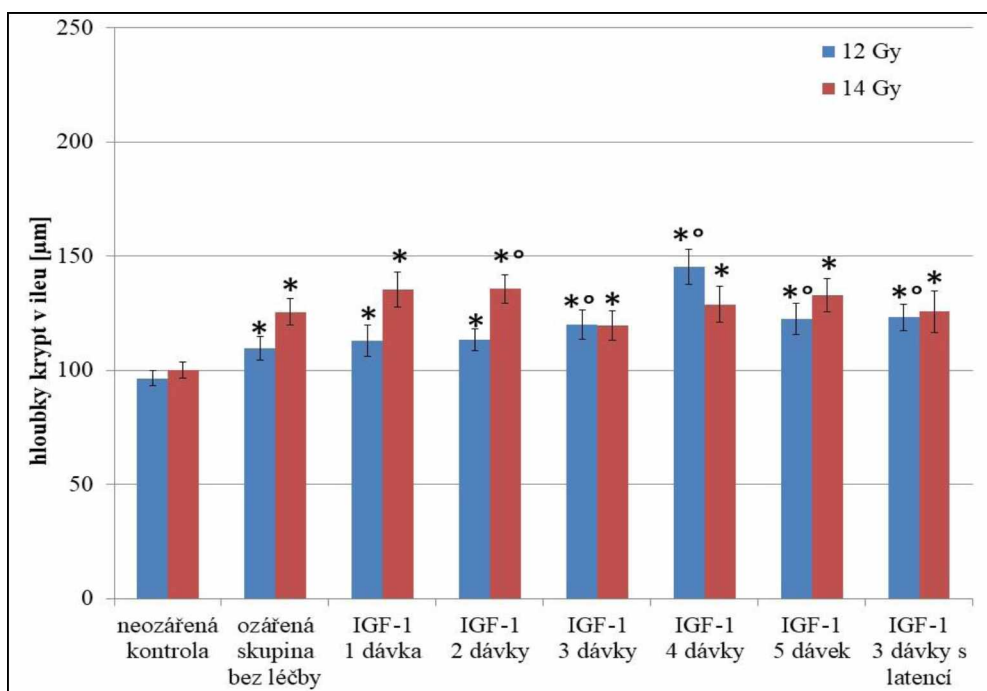
Graf 29. Počet viabilních krypt v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

^oSignifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

Graf 30. Hloubka krypt v příčném řezu ilea 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

^oSignifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

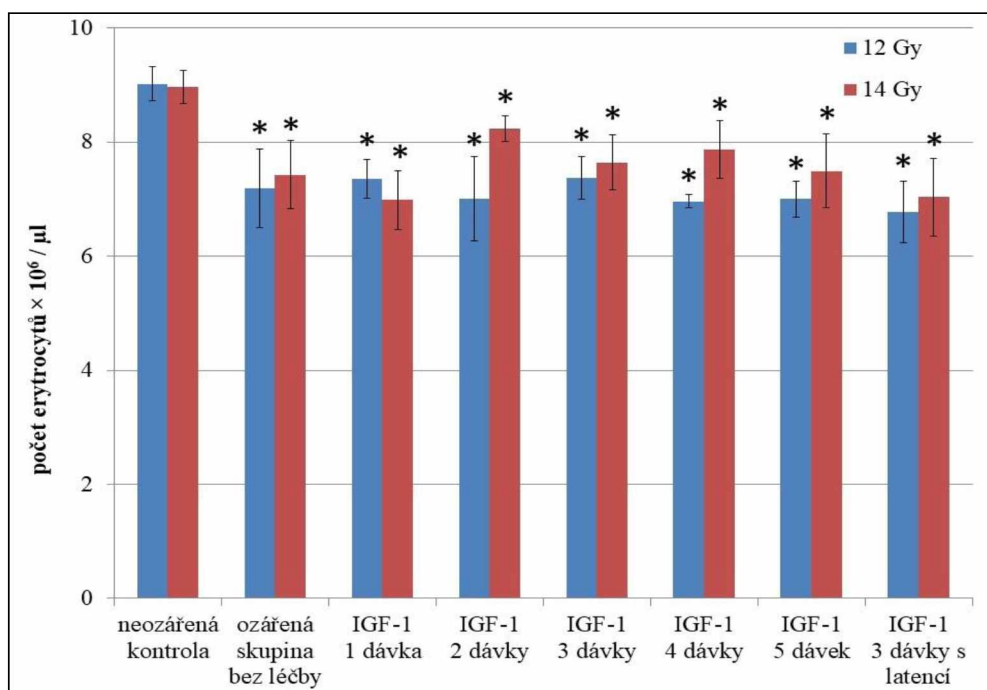
Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí po ozáření 12 Gy, při kterých byla pozdní aplikace růstového faktoru o 15 % méně účinná ($p < 0,001$; Graf 30).

4.2.5 Krevní obraz

4.2.5.1 Vliv IGF-1 na počet erytrocytů

Po ozáření dávkou 12 Gy a 14 Gy došlo k poklesu absolutních hodnot erytrocytů v krevním obraze o 20 % ($p = 0,002$), respektive 17 % ($p = 0,002$). Aplikace růstového faktoru v jakémkoliv dávkovém režimu nevedla u obou dávek ionizujícího záření k signifikantní změně (Graf 31).

Graf 31. Počet erytrocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.

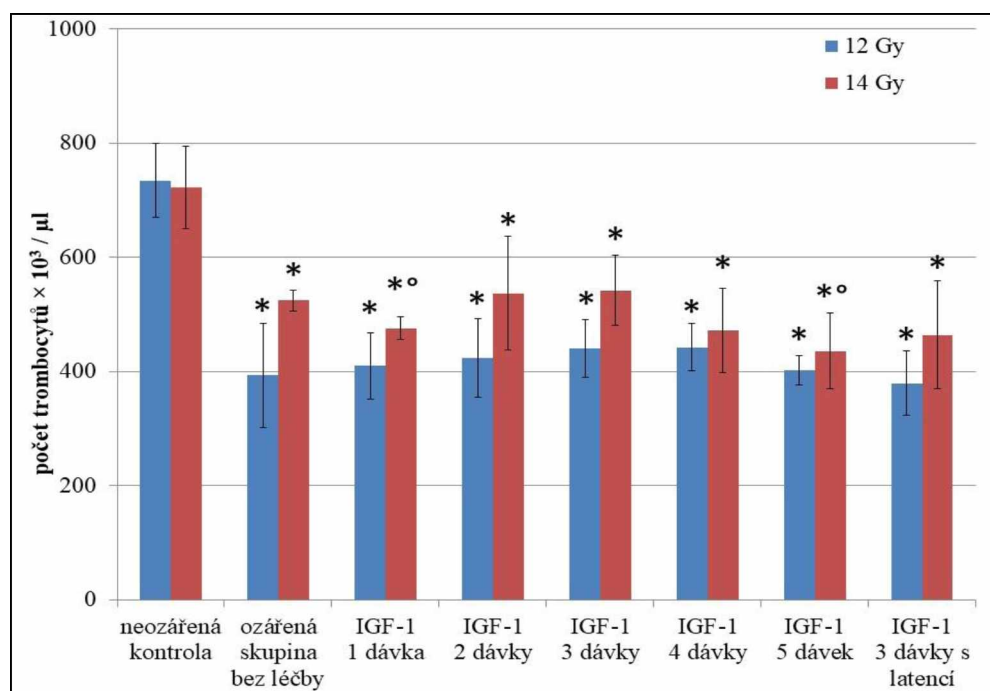


*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

4.2.5.2 Vliv IGF-1 na počet trombocytů

Počet trombocytů v krvi se po ozáření snížil, a to 46 % při 12 Gy ($p = 0,002$) a 28 % při 14 Gy ($p = 0,009$). V porovnání se skupinou ozářenou 14 Gy byl pozorován další statisticky významný pokles o 9 % při léčbě 1 dávkou IGF-1 ($p = 0,004$) a o 17 % po aplikaci 5 dávek IGF-1 ($p = 0,026$; Graf 32).

Graf 32. Počet trombocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

^oSignifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.5.3 Vliv IGF-1 na počet lymfocytů

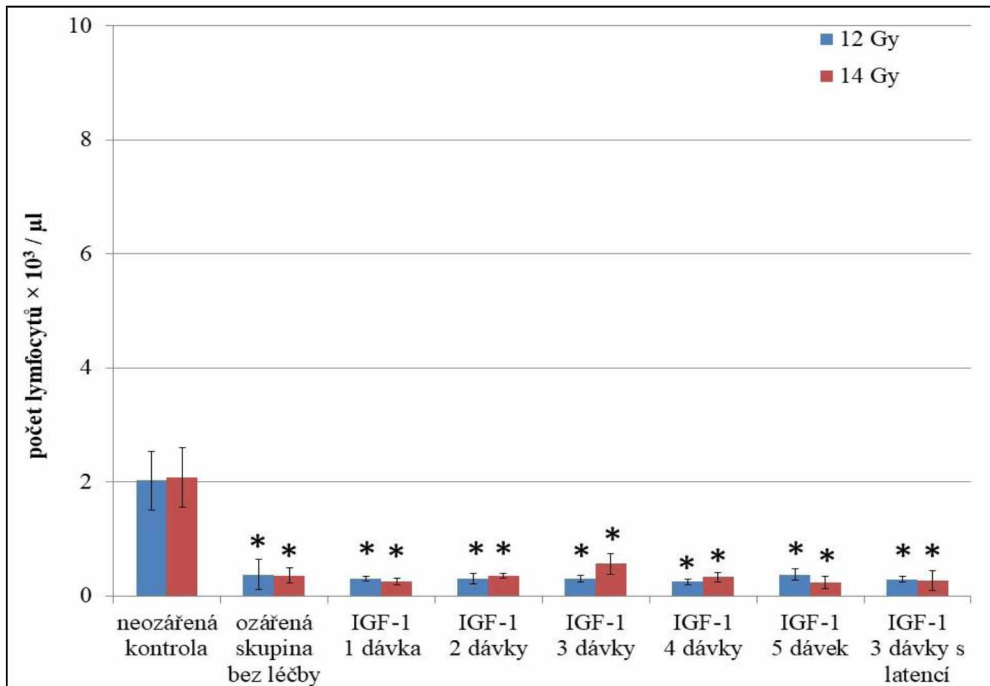
Dávka 12 Gy a 14 Gy vyvolala signifikantní pokles počtu lymfocytů o 81 %, respektive 83 % (obě $p = 0,002$). Oproti těmto skupinám léčba růstovým faktorem nevykazovala signifikantní vliv.

Statisticky významný rozdíl byl nalezen mezi oběma tří dávkovými režimy po ozáření 14 Gy, kde latence vedla k 51% poklesu počtu lymfocytů ($p = 0,026$; Graf 33).

4.2.5.4 Vliv IGF-1 na počet monocytů

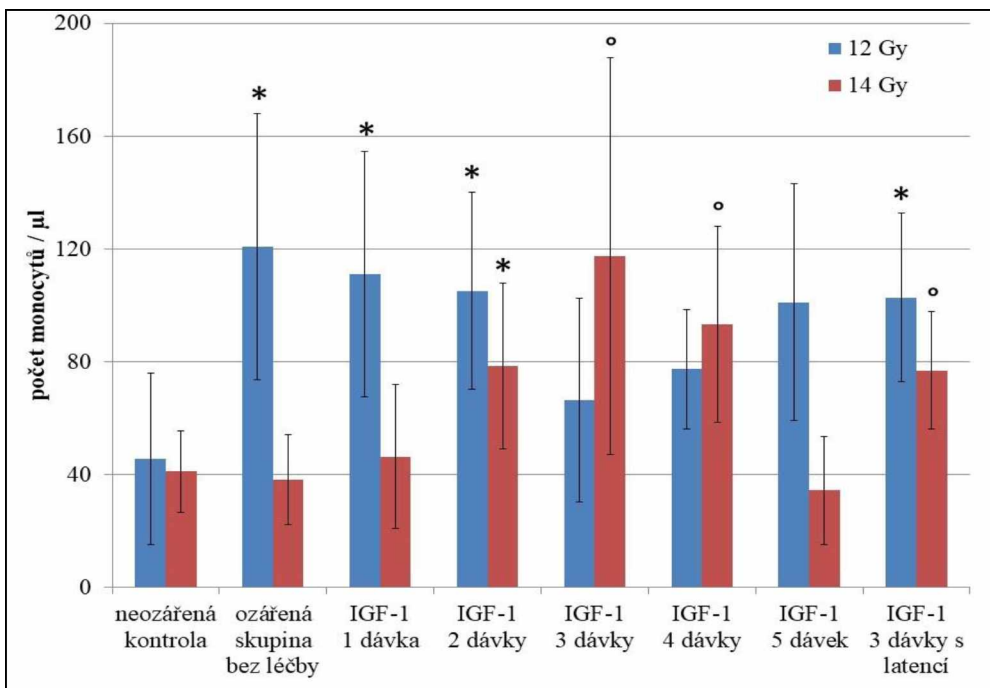
Množství monocytů se po expozici ionizujícího záření 12 Gy v krvi laboratorních zvířat zvýšilo 2,6krát ($p = 0,015$). Další statisticky významné změny byly zaznamenány pouze při porovnání skupiny ozářené 14 Gy (bez léčby) a skupin léčených 3 a 4 dávkami IGF-1 a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí. Ve skupinách léčených růstovým faktorem byl počet monocytů vyšší 3,1- ($p = 0,045$), 2,4- ($p = 0,041$), respektive 2,0násobně ($p = 0,045$; Graf 34).

Graf 33. Počet lymfocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

Graf 34. Počet monocytů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

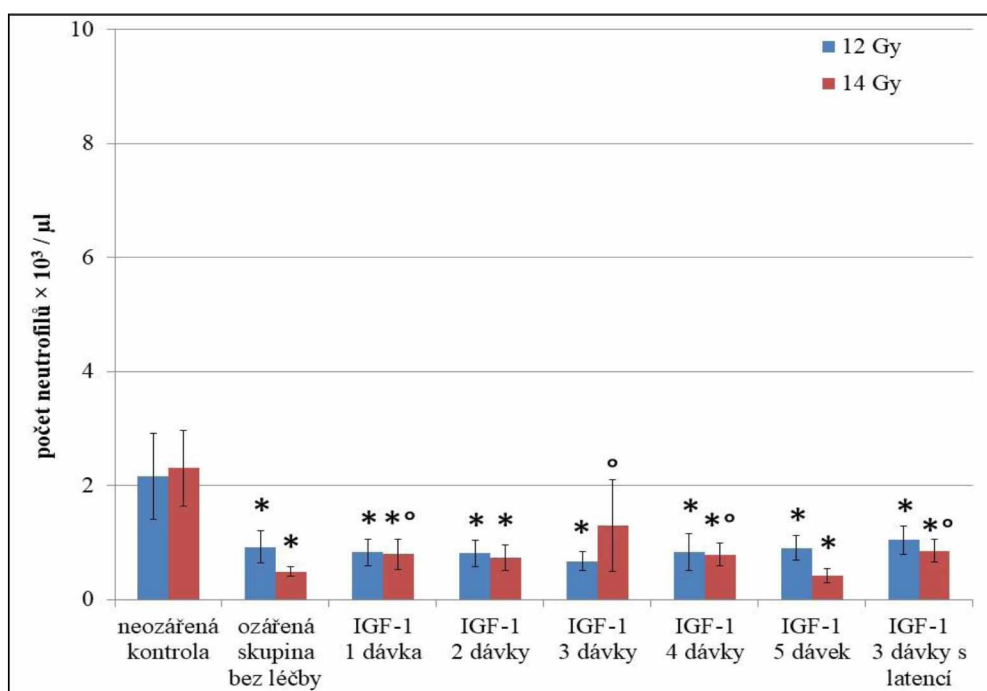
°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.5.5 Vliv IGF-1 na počet neutrofilů

Počet neutrofilů v krvi pokusných subjektů se vlivem ionizujícího záření signifikantně snížil o 57 % při 12 Gy ($p = 0,004$) a o 79 % po ozáření 14 Gy ($p = 0,002$). Statisticky významné rozdíly byly nalezeny pouze při porovnání skupiny ozářené 14 Gy bez terapie IGF-1 a skupin, kterým byly aplikovány 3 a 4 dávky růstového faktoru a 3 dávky s časovým odstupem. Ve srovnání s ozářenou neléčenou skupinou počty neutrofilních granulocytů v těchto skupinách vzrostly 2,6- ($p = 0,041$), 1,4- ($p = 0,045$) a 1,7násobně ($p = 0,004$; Graf 34).

Signifikantní rozdíl byl nalezen mezi oběma tří dávkovými režimy po ozáření 12 Gy, kde latence vedla k 26% poklesu zastoupení neutrofilních granulocytů ($p = 0,026$; Graf 34).

Graf 35. Počet neutrofilů v krvi 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 nebo 14 Gy s krytím hlavy u jednotlivých testovaných skupin v závislosti na podání IGF-1.



*Signifikantní rozdíl proti neozářené kontrolní skupině ($p \leq 0,05$).

°Signifikantní rozdíl proti ozářené skupině bez léčby ($p \leq 0,05$).

4.2.6 Celkové zhodnocení signifikantních změn

Následující tabulky (Tabulka 12 a 13) byly vytvořeny pro zhodnocení celkového účinku jednotlivých dávkovacích režimů IGF-1 ve všech částech gastrointestinálního traktu (více viz diskuze).

Po ozáření dávkou 12 Gy bylo celkové skóre regenerace 4, 4, 6, 5, 4 a 5 po aplikaci 1, 2, 3, 4 a 5 dávek IGF-1 a 3 dávek růstového faktoru podaných s latencí (Tabulka 12).

Po ozáření dávkou 14 Gy bylo výsledné skóre regenerace 1, 4, 5, 4, 1 a 3 po aplikaci 1, 2, 3, 4 a 5 dávek IGF-1 a 3 dávek IGF-1 podaných s latencí (Tabulka 13).

Tabulka 12. Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované oproti ozářené, neléčené skupině při dávce 12 Gy v experimentálním modelu 2.

Ukazatel	skupina					
	1 D	2 D	3 D	4 D	5 D	3 DL
délka klků v duodenu		+	+	+		+
délka klků v jejunu	+			+		+
délka klků v ileu	+	+	+	+	+	+
počet krypt v ileu			+			
hloubka krypt v duodenu	+	+	+	+	+	
hloubka krypt v jejunu	+	+	+	+	+	+
hloubka krypt v ileu			+		+	+
celkové skóre	4	4	6	5	4	5

+ signifikantní vzestup proti ozářené neléčené skupině
D – dávkový režim, DL – dávkový režim podaný s latencí

Tabulka 13. Signifikantní změny střevních parametrů pozorované oproti ozářené, neléčené skupině při dávce 14 Gy v experimentálním modelu 2.

Ukazatel	skupina					
	1 D	2 D	3 D	4 D	5 D	3 DL
délka klků v duodenu		+	+	+		+
délka klků v jejunu			+		-	
délka klků v ileu		+	+	+	-	
hloubka krypt v duodenu			+	+	+	+
hloubka krypt v jejunu	+	+	+	+	+	+
hloubka krypt v ileu		+			+	
celkové skóre	1	4	5	4	1	3

+ signifikantní vzestup nebo - signifikantní pokles proti ozářené neléčené skupině
D – dávkový režim, DL – dávkový režim podaný s latencí

Účelem poslední tabulky bylo celkového zhodnocení všech signifikantních změn, které nalezeny mezi oběma tří dávkovými režimy, kdy dávka 14 Gy vedla při latenci k poklesu skóre regenerace o 5. Hodnoceny byly také rozdíly mezi čtyř dávkovým režimem a 3 dávkami IGF-1 podanými s latencí. Zde při dávce 12 a 14 Gy vedla pozdní aplikace růstového faktoru k poklesu skóre regenerace shodně o 3 (Tabulka 14).

Tabulka 14. Signifikantní změny střevních parametrů 3dávkového režimu IGF-1 podaného s latencí proti časným 3- a 4dávkovým schémátům.

Ukazatel	skupina			
	12 Gy		14 Gy	
	3 D	4 D	3 D	4 D
počet klků v ileu			-	-
délka klků v duodenu				-
délka klků v jejunu	+		-	
délka klků v ileu		-		-
počet krypt v duodenu			-	
počet krypt v jejunu			-	
hloubka krypt v duodenu	-	-		
hloubka krypt v jejunu			-	
hloubka krypt v ileu		-		
celkové skóre	0	-3	-5	-3

+ signifikantní vzestup nebo - signifikantní pokles proti dávkového režimu IGF-1 podaného s latencí
D – dávkový režim

5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit možnosti modulace poškození střevní sliznice vyvolaného ionizujícím zářením pomocí růstového faktoru IGF-1. Tyto experimenty probíhaly v rámci projektu zaměřeného na využití preparátů dostupných v humánní medicíně pro mitigaci radiačního poškození. Přípravek obsahující rekombinantní lidský IGF-1 se nazývá Increlex (účinná látka mecasermin), který je terapeuticky indikován k dlouhodobé léčbě růstových poruch dětí a dospívajících od 2 do 18 let se závažnou primární deficiencí IGF-1 (Ranke *et al.*, 2009). Další indikace tento lék nemá. Na druhou stranu, lze ale racionalizaci jeho použití stran mitigace radiačního poškození střevní sliznice nalézt například v práci Wilkinsové *et al.* (2002), jež prokázali, že IGF-1 stimuluje proliferaci buněk Lüberkühnových krypt po ozáření a snižuje počet apoptotických buněk v kompartmentu kmenových buněk. Tento růstový faktor rovněž inhibuje apoptózu endotelových buněk cév gastrointestinálního traktu indukovanou ionizujícím zářením (Qiu *et al.*, 2010). Jejich viabilita významně ovlivňuje látkovou výměnu v mikroprostředí krypt a ztráta těchto buněk přispívá k dysfunkci kmenových buněk po ozáření (Paris *et al.*, 2001).

K ověření účinků IGF-1 byly v rámci této studie jako pokusné subjekty použity myši kmene C57Bl/6J. Při srovnání odlišných kmenů myší jsou tato zvířata považována za radiorezistentní (Newman *et al.*, 2014). Střední letální dávky ($LD_{50/30}$) ionizujícího záření vedoucí k úhynu myší C57Bl/6J z důvodu hematologické formy akutní nemoci z ozáření se při celotělové expozici pohybuje v rozmezí 7,76 – 8,05 Gy (Garrett *et al.*, 2014; Plett *et al.*, 2014; van Os *et al.*, 1997). Pro indukci gastrointestinálního poškození vedoucímu k úmrtí všech zvířat v průběhu 7 dnů je nutné při celotělovém ozáření zvýšit dávku na 13 Gy (Pejchal *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2004). Pokud však je, stejně jako u našeho experimentálního modelu, kryta hlava nebo je ozářena pouze abdominální dutina za účelem zachování dostatečného množství nepoškozené kostní dřeně, aby nemohlo dojít k současnému rozvoji letálního hematologického poškození, LD_{50} stran gastrointestinální formy akutní nemoci z ozáření vzrůstá přibližně k 15 Gy. Rovněž dochází k posunu doby úmrtí, neboť všechna zvířata sledovaná v průběhu 1 měsíce umírají 6. – 18. den po ozáření (Gong *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2008). Podobný nález byl pozorován i u našeho modelu. Pokud bychom například provedli probitovou analýzu za použití volně dostupného softwaru vyvinutého doc. Alpha Rajem (Raj, 2010), je u neléčených myší hodnota $LD_{50} = 15,00$ Gy (95% interval spolehlivosti = 14,53 – 15,49 Gy). K úmrtím, která lze přičíst poškození střevní sliznice, docházelo 7. – 14. den po vystavení záření. Krytí hlavy nicméně neochrání ostatní orgánové

soustavy vůči expozici. Kritické jsou zejména plíce. U samic myší C57BL/6J leží spodní práh rozvoje letálního radiačního poškození plic po ozáření hrudníku při dávce 12 Gy (Jackson *et al.*, 2016). Po překročení tohoto prahu dochází k rozvoji dvou klinicko-patologických jednotek – akutní radiační pneumonitis a radiační fibrózy plic (Beach *et al.*, 2018). Akutní radiační pneumonitis se v závislosti na dávce manifestuje v intervalu 1 – 6 měsíců, zatímco radiační fibróza se vyvíjí 6 – 24 měsíců po ozáření plicní tkáně (Beach *et al.*, 2018). V případě našeho experimentálního modelu 1 byla u neléčených zvířat po expozici 14 – 16 Gy a překročení fáze kritické stran rozvoje gastrointestinální formy ANO pozorována úmrtí v intervalu 97 – 300 dnů. Ačkoliv by časová souslednost mohla roli obou klinicko-patologických jednotek naznačovat, nelze zcela vyloučit ani význam poškození funkce jiných orgánových soustav.

V rámci prvního experimentálního modelu byl rovněž hodnocen vliv IGF-1 na dlouhodobé přežívání myší. Růstový faktor byl podán v dávkách 0,2 a 1 mg/kg váhy zvířete 1, 24 a 48 hodin po ozáření. Vzhledem k nízké incidenci letality v časně fázi po ozáření 14 Gy, nebylo možné u tohoto modelu při této dávce vliv IGF-1 stran rozvoje gastrointestinální formy akutní nemoci z ozáření zhodnotit. Na druhou stranu obě dávky přežití zvířat podstatně zlepšily, což poukazuje na schopnost IGF-1 mitigovat radiační poškození i v dalších tkáních. Signifikantní změny v časně fázi byly zaznamenány při dávce 15 Gy a pouze po podání 1 mg/kg IGF-1. Po ozáření 16 Gy již růstový faktor na délku následného přežívání nevykazoval účinek. Pro přežití organismu při expozici dutiny břišní vysokým dávkám ionizujícího záření je stěžejní udržení integrity povrchového epitelu střevní sliznice. Ta je zajištěna pouze v případě, když v intervalu přibližně 3 – 5 dnů po ozáření dojde k obnově regenerace v dostatečném množství krypt (Kim *et al.*, 2017). Po ozáření samic myší kmene C57BL/6J dávkou 16 Gy byly ale celkové ztráty regenerujících střevních krypt natolik vysoké, že se tato dávka ionizujícího záření stává vysoce letální stran gastrointestinální formy akutní nemoci z ozáření (Booth *et al.*, 2012; Paris *et al.*, 2001). Vysoká míra apoptózy kmenových buněk a progenitorů také vysvětluje neúčinnost terapie růstovými faktory, neboť jejich přítomnost je pro fungování střevní sliznice nezbytná (Hérodin a Drouet 2005).

Na základě výsledků prvního experimentálního modelu byla pro druhý experiment vybrána dávka 1 mg/kg IGF-1. Cílem druhého modelu bylo dosažení optimálního dávkovacího režimu růstového faktoru. Hodnoceno bylo celkem 6 odlišných dávkovacích schémat. Dávka ionizujícího záření byla pro tento experiment snížena na 12 a 14 Gy, aby byl lépe zachycen regenerační účinek růstového faktoru. Odběr vzorků proběhl 6. den po ozáření. V tomto intervalu probíhala ve sliznici gastrointestinálního traktu regenerace. Dávka 12 Gy

vyvolala značný úbytek Lüberkühnových krypt. Tato situace nastává, pokud v období počátečních ztrát spojených se zvýšenou apoptotickou aktivitou dojde v kryptách k eliminaci všech přibližně 4 – 6 kmenových buněk a 30 – 40 časných progenitorů. Tyto časné progenitory, přesněji dceřinné buňky 1., 2. a pravděpodobně i 3. generace, mohou při pozbytí všech kmenových buněk projít procesem dediferenciace a opětovně získat potenciál kmenové buňky (Potten a Grant 1998; Sato a Clevers, 2013; van Es *et al.*, 2012). Aby se ztráta krypt vykompenzovala, je ve zbývajících přežívajících kryptách proliferace značně zesílena (Pejchal *et al.*, 2015). V případě našeho experimentálního modelu se tento fakt projevil prodloužením jejich hloubky. Produkce nových enterocytů a pohárkových buněk byla navíc v případě duodena a jejunu natolik intenzivní, že došlo k i prodloužení délky klků. Po ozáření dávkou 14 Gy byly patrná progrese změn. Ve srovnání s nižší dávkou byl 6. den po ozáření výraznější úbytek krypt a prodloužení jejich délky. Tvorba nových buněk již však nedokázala plně kompenzovat potřeby povrchového kompartmentu. Délka klků klesla, a v případě duodena a ilea došlo i k snížení jejich počtu. S tím byly spojeny i nápadné změny histopatologické úrovně. Byla patrná atrofie střevní sliznice, doprovázená projevy zánětu – otok, infiltrace neutrofilními granulocyty, a v jednotlivých případech došlo dokonce i k mírnému narušení kontinuity střevní sliznice v podobě drobných erozí.

Aplikace IGF-1 celkově regeneraci střevní sliznice podporuje. Výsledky ukazují, že tento růstový faktor aplikovaný po ozáření zvyšuje hloubku krypt, což se dále promítá do povrchového kompartmentu prodloužením klků. Po expozici 12 Gy a aplikaci IGF-1 ve 3 dávkách 1, 24 a 48 hodin po ozáření došlo dokonce k navýšení počtu viabilních krypt v ileu. Tento efekt by mohl souviset s více než dvojnásobným relativním zastoupením IGF-1R v tomto úseku střeva ve srovnání s duodenem a jejunem (MacDonald, 1999). Rozdílná dávková schémata nicméně ukazují odlišný účinek jak v rámci jednotlivých úseků tenkého střeva, tak mezi nimi. Pro zhodnocení výsledného účinku byly vytvořeny Tabulky 12 a 13. Ačkoliv tyto tabulky mají své limity, které by např. mohly ležet v otázce, jaký parametr lépe odráží stav regenerace střevní sliznice po ozáření, umožňují dávkovací režimy porovnat. Z tabulek vyplývá, že se vzrůstajícím počtem dávek růstového faktoru aplikovaných 1 hodinu po ozáření a poté v denních intervalech se efekt IGF-1 zvyšuje až k maximu, jež bylo dosaženo podáním 3 dávek 1, 24 a 48 hodin po ozáření. Následně jeho účinek klesal. Velký propad účinnosti byl zaznamenán zejména mezi podáním 4 (1, 24, 48 a 72 h.) a 5 dávek (1, 24, 48, 72 a 96 h.). Mechanismus, který by tento jev vysvětloval, zůstává neznámý. Teoretické vysvětlení by mohlo spočívat v kinetice buněčných dějů. Po expozici vysokým dávkám ionizujícího záření se v průběhu 2 dnů po ozáření aktivuje apoptóza buněk a

mitotická aktivita se začne blížit téměř k nulovým hodnotám (Crescenti *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2010; Pejchal *et al.*, 2015). V této fázi by opakovaná aplikace růstového faktoru mohla přispět k ochraně kmenových buněk nebo časných progenitorů aktivací antiapoptotických mechanismů a podporou reparace DNA (Davaadelger *et al.*, 2017; Venkatachalam *et al.*, 2017). Další dny apoptotická aktivita klesá, proliferace se ale postupně obnovuje (Pejchal *et al.*, 2015). V tomto období by naopak převaha stimulace buněčného cyklu nad antiapoptotických působením mohla u buněk s nedostatečně opravenou DNA v konečném důsledku apoptózu indukovat (Darzynkiewicz *et al.*, 2012).

V rámci druhého experimentálního modelu byla rovněž testována efektivita tří dávkového schématu s opožděným začátkem aplikace (24, 48 a 72 h po ozáření). Oproti neléčené skupině účinnost vykazuje. Však ve srovnání s časným tří dávkovým a čtyř dávkovým režimem nicméně signifikantně klesá (viz Tabulka 14). V tenkém střevě lze maximum apoptotické aktivity zaznamenat v intervalu 3 – 6 hodin po expozici záření (Potten a Grant, 1998). Pro záchranu co největšího množství kmenových buněk a časných progenitorů, je proto nutné s aplikací začít co nejdříve po ozáření zasaženého jedince.

Dalším cílem diplomové práce bylo zhodnotit změny, ke kterým dochází v krvi. Ačkoliv byla u experimentálních zvířat kryta hlava, byla stále signifikantní část kostní dřeně vystavena dávkám ionizujícího záření, při kterých v exponovaných oblastech přežívá méně než 0,1 % kmenových buněk (Fliedner *et al.*, 2002). Poškozená kostní dřeň se může do určité míry regenerovat homingem nepoškozených kmenových buněk a progenitorů (Caocci *et al.*, 2017; Imai *et al.*, 1999). Na druhou stranu, obnova vykazuje určitou latenci, proto byly v krevním obraze 6. den po ozáření přítomny změny v krevním obraze. Nejvyšší úbytek dle našich výsledků vykazovaly lymfocyty. Lymfocyty jsou nejcitlivější buňky periferní krve. Jejich ztráty jsou způsobeny poškozením kostní dřeně a thymu, jakožto orgánu podílejícího se na zrání imunokompetentních buněk. K poklesu počtu navíc přispívá indukce apoptózy a redistribuce těchto buněk do periferních lymfatických tkání (Zdrojewicz *et al.*, 2016). Více odolné byly granulocyty. Přestože mají tyto buňky v krevním oběhu poměrně krátký poločas – cca 7 hodin, v exponovaných, ireverzibilně poškozených oblastech kostní dřeně zůstává přítomna vysoká funkční rezerva radiorezistentních nezralých, nedělících se granulocytů a zralých buněk (Fliedner *et al.*, 2007). Na rozdíl od lymfocytů, bylo u této populace v našem experimentálním modelu možné pozorovat dávkově-závislý pokles. Tento jev mohl souviset s vyšší mírou poškození střevní sliznice a rozvojem zánětu pozorovaným po ozáření 14 Gy. Dále z hlediska změn v krevním obraze následovaly trombocyty. Za fyziologických podmínek může trombocyt setrvat v krevním oběhu až 12 dní (Fliedner *et al.*, 2002). Polyploidní

megakaryocyty jsou navíc poměrně radiorezistentní a mohou vytvářet funkční rezervu (Gruzdev *et al.*, 1996). V případě trombocytů demonstrují naše výsledky opačný trend ve vztahu k dávce ionizujícího záření, než jaký byl nalezen u granulocytů. Mechanismus, který by tento děj vysvětloval, není znám. Svoji roli by podobně mohl sehrávat rozvoj zánětu a produkce prozánětlivých cytokinů, jako jsou např. IL-3 nebo IL-6, jež také podporují trombogenezi (Kiang a Fukumoto, 2014). Nejmenší pokles byl zaznamenán u erytrocytů. Tyto změny s nejvyšší pravděpodobností vysvětluje doba, již tyto terminálně diferencované buňky setrvávají v krevním oběhu – asi 120 dní (Fliedner *et al.*, 2002). Ve srovnání s výše jmenovanými druhy krevních buněk byl u monocytů pozorován odlišný trend. Po ozáření 12 Gy jejich počet významně vzrostl, zatímco při 14 Gy dosahoval pouze kontrolní úrovně. Monocyty jsou jaderné buňky schopné proliferace (Swirski *et al.*, 2014). Produkce cytokinů ozářenými tkáněmi může stimulovat jejich mitotickou aktivitu a přispět k jejich uvolnění do krevního oběhu (Langstein *et al.*, 2000). Rozvoj zánětu ve střevní sliznici by, podobně jako u granulocytů, mohl jejich migraci do tohoto orgánu zesílit a vysvětlit jejich pokles po ozáření 14 Gy.

Aplikace růstového faktoru v některých dávkových režimech ovlivnila v periferní krvi počet trombocytů, monocytů a granulocytů. Podání 1 nebo 5 dávek IGF-1 vedlo po ozáření 14 Gy k signifikantnímu poklesu trombocytů. Chen *et al.* (2012) sledoval účinky IGF-1 (100 µg/kg po dobu 7 dnů) na rozvoj hematologického poškození u myši kmene Balb/c po celotělovém ozáření 5 Gy. Růstový faktor množství trombocytů v periferní krvi neovlivnil do 9. dne po ozáření. Od 11. dne však byla pozorována rychlejší regenerace trombogeneze myší léčených IGF-1. Signifikantní změny nebyly pozorovány ani u našeho modelu po ozáření 12 Gy. Při vyšší dávce tak spíše mohlo sehrát roli poškození střevní sliznice, tvorba erozí, která mohou být spojena s krvácením, jež s kinetikou trombocytů mohla dále interferovat. Co se týče monocytů a granulocytů, nastalo po podání 3 (ať již časně nebo s latencí) a 4 dávek IGF-1 zvýšení jejich počtu v krvi po ozáření dávkou 14 Gy. Ačkoliv Chen *et al.* (2012) pozoroval u výše zmíněného modelu vyšší obnovou granulocytů vlivem IGF-1 již 7. den po ozáření, nález nesignifikantních změn po expozici 12 Gy a selektivní účinnost tří a čtyř dávkových režimů naznačuje, že zde roli mohla sehrát spíše mitigace radiačního poškození gastrointestinálního traktu.

6 Závěr

Úkolem diplomové práce bylo zhodnotit účinek IGF-1 na dlouhodobé přežívání experimentálních zvířat po jednorázovém ozáření dávkou ionizujícího záření 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy. Dalším cílem bylo klasifikovat vliv inzulínu podobného faktoru 1, aplikovaného v různých dávkovacích schématech, na stav střevní sliznice a krevního obrazu po celotělovém vystavení dávkám 12 a 14 Gy s krytím hlavy. Pro tyto oba pokusné modely byly zvoleny samice myši kmene C57B1/6J, kterou jsou v porovnání s jinými kmeny více radiorezistentní.

Námi zvolený růstový faktor při hodnocení dlouhodobého přežívání laboratorních myší lépe fungoval na prodloužení mediánu přežití v dávce 1 mg/kg hmotnosti zvířete, a to jak při vystavení dávce 14 Gy, tak i 15 Gy. Sice aplikace růstového faktoru v množství 0,2 mg/kg rovněž medián přežití pokusných subjektů po ozáření 14 Gy zvýšila, nicméně pro další experimentální model byla zvolena dávka 1 mg/kg pro signifikantnější posun délky života po ozáření a pro statistický rozdíl menší 0,05. Podání inzulínu podobného faktoru 1 nemělo na dobu přežití po expozici záření o intenzitě 16 Gy žádný znatelný vliv.

V druhém úkolu při hodnocení histopatologického hlediska byly zachyceny parametry poškození sliznice zejména po ozáření dávkou 14 Gy ve většině úsecích tenkého střeva. Podání IGF-1 pomáhá ke zmírnění těchto zkoumaných parametrů.

Analýza klků a krypt ukazuje, že se populace krypt a klků střevní sliznice po ozáření 12 a 14 Gy snižují a léčba růstovým faktorem na jejich počty nemá značný vliv s výjimkou ilea po expozici 12 Gy, kdy po aplikaci tří dávkového režimu bez latence, došlo k navýšení počtu viabilních krypt. Naopak délky klků a hloubky krypt se po ozáření obecně prodloužily a při použití téhož dávkovacího schématu se prodloužení ještě více zvětšilo.

Zhodnocení absolutních počtů vybraných krevních elementů, byl obecně pozorován trend v poklesu jejich zastoupení v krvi. Nicméně nejsignifikantněji tyto hodnoty zvyšovalo dávkovací schéma se třemi dávkami růstového faktoru bez časového odstupu. Rozdíl byl zaznamenán zejména v případě monocytů, kdy došlo po expozici 14 Gy ke zvýšení jejich zastoupení po aplikaci čtyř a tří dávek IGF-1 s latencí i bez.

Celkově se jeví tří dávkový režim s aplikací růstového faktoru po 1, 24 a 48 hodinách jako nejoptimálnější pro podporu opravných intestinálních mechanismů.

Po zhodnocení jak histopatologických parametrů, tak i morfologické a morfometrické analýzy, lze potvrdit regenerační vliv růstového faktoru IGF-1 na střevní sliznici, jež byla poškozena ionizujícím zářením.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBERTS, B., 2005. Základy buněčné biologie. Ústí nad Labem, 2. vyd., 740 s, Espero Publishing. ISBN: 80-902906-2-0.

ALLAN, L.A., et al, 2003. Inhibition of Caspase-9 through Phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nature Cell Biology*, 07, vol. 5, no. 7, pp. 647-54 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 14657392. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1005>.

AMATO, E., et al, 2017. A Didactic Experiment Showing the Compton Scattering by Means of a Clinical Gamma Camera. *Physica Medica : PM : An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology : Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 06, vol. 38, pp. 119-121 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.05.061>.

ANNO, G.H., BAUM, S.J., WITHERS, H.R. and YOUNG, R.W., 1989. Symptomatology of Acute Radiation Effects in Humans After Exposure to Doses of 0.5-30 Gy. *Health Physics*, vol. 56, no. 6, pp. 821-838 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0017-9078, 0017-9078.

BAGATIN M. a GERARDIN S., *Ionizing Radiation Effects in Electronics: From Memories to Imagers*, 2015, 1. vyd., 394 s, ISBN: 9781498722605.

BACH, L.A., 2015. Endothelial Cells and the IGF System. *Journal of Molecular Endocrinology*, 02, vol. 54, no. 1, pp. R1-13 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1530/JME-14-0215>.

BAILEY LD., TOWNSEND WD., VALK EP., MAISEY NM., *Positron Emission Tomography*, London, Springer, 2005 ISBN: 978-1-84628-007-8.

BARBOSA, S.M., MIRANDA, P. and AZEVEDO, E.B., 2017. Short-Term Variability of Gamma Radiation at the ARM Eastern North Atlantic Facility (Azores). *Journal of*

Environmental Radioactivity, 06, vol. 172, pp. 218-231 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.03.027>.

BARKER, N., 2014. Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 01, vol. 15, no. 1, pp. 19-33 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 14710072. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3721>.

BARKER, N., VAN OUDENAARDEN, A. and CLEVERS, H., 2012. Identifying the Stem Cell of the Intestinal Crypt: Strategies and Pitfalls. *Cell Stem Cell*, Oct 05, vol. 11, no. 4, pp. 452-460 ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 1934-5909, 1934-5909. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.009>.

BEACH, T.A., GROVES, A.M., WILLIAMS, J.P. and FINKELSTEIN, J.N., 2018. Modeling Radiation-Induced Lung Injury: Lessons Learned from Whole Thorax Irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, Oct 25, pp. 1-16 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1080/09553002.2018.1532619>.

BLUMENTHAL, S., 2010. FROM INSULIN AND INSULIN-LIKE ACTIVITY TO THE INSULIN SUPERFAMILY OF GROWTH-PROMOTING PEPTIDES: A 20th-Century Odyssey. *Perspectives in Biology and Medicine*, Autumn, vol. 53, no. 4, pp. 491-508 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; Science Database. ISSN 00315982.

BOERMA, M., et al, 2016. Effects of Ionizing Radiation on the Heart. *Mutation Research*, vol. 770, pp. 319-327 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.07.003>.

BOLUS, N.E., 2001. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 06, vol. 29, no. 2, pp. 67-73; test 76-7 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Technology Collection; Science Database. ISSN 00914916.

BONNI, A., et al, 1999. Cell Survival Promoted by the Ras-MAPK Signaling Pathway by Transcription-Dependent and -Independent Mechanisms. *Science*, Nov 12, vol. 286, no. 5443, pp. 1358-62 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection; Science Database. ISSN 00368075.

BOOTH, C., et al, 2012. Acute Gastrointestinal Syndrome in High-Dose Irradiated Mice. *Health Physics*, 10, vol. 103, no. 4, pp. 383-399 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

BORDNER, A.S., et al, 2016. Measurement of Background Gamma Radiation in the Northern Marshall Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun 21, vol. 113, no. 25, pp. 6833 ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection; Science Database. ISSN 00278424.

BOUCHER, M.J., et al, 2000. MEK/ERK Signaling Pathway Regulates the Expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and Promotes Survival of Human Pancreatic Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, Sep 07, vol. 79, no. 3, pp. 355-369 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0730-2312, 0730-2312.

BRUCHIM, I., SARFSTEIN, R. and WERNER, H., 2014. The IGF Hormonal Network in Endometrial Cancer: Functions, Regulation, and Targeting Approaches. *Frontiers in Endocrinology*, vol. 5, pp. 76 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1664-2392, 1664-2392. DOI <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00076>.

BRZOWSKI, A.M., et al, 2002. Structural Origins of the Functional Divergence of Human Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin. *Biochemistry*, Jul 30, vol. 41, no. 30, pp. 9389-9397 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0006-2960, 0006-2960.

CAO, P., MAXIMOV, A. and SÜDHOF, T.,C., 2011. Activity-Dependent IGF-1 Exocytosis is Controlled by the Ca²⁺ -Sensor Synaptotagmin-10. *Cell*, Apr 15, vol. 145, no. 2, pp. 300-311 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0092-8674, 0092-8674. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.034>.

CAOCCI, G., GRECO, M. and LA NASA, G., 2017. Bone Marrow Homing and Engraftment Defects of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, vol. 9, no. 1, pp. 1 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 2035-3006, 2035-3006. DOI <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2017.032>.

CELIK, N., CEVIK, U., CELIK, A. and KOZ, B., 2009. Natural and Artificial Radioactivity Measurements in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, Feb 15, vol. 162, no. 1, pp. 146-153 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0304-3894, 0304-3894. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.017>.

CRESCENTI, E.J.V., et al, 2011. Radioprotection of Sensitive Rat Tissues by Oligoelements Se, Zn, Mn Plus Lachesis Muta Venom. *Journal of Radiation Research*, vol. 52, no. 5, pp. 557-567 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

CUI, L., et al, 2017. Radiosensitization by Gold Nanoparticles: Will they Ever make it to the Clinic?. *Radiotherapy and Oncology : Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 09, vol. 124, no. 3, pp. 344-356 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2017.07.007>.

DAINIYAK, N., 2010. RATIONALE AND RECOMMENDATIONS FOR TREATMENT OF RADIATION INJURY WITH CYTOKINES. *Health Physics*, 06, vol. 98, no. 6, pp. 838-842 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0017-9078, 0017-9078. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/HP.0b013e3181b3fce5>.

DANIEL, H. A. *The Occupational Environment: Its Evaluation, Control, and Management*, 3. edition. AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION: 2011, 1735 s. ISBN 978-1-935082-15-6.

DARZYNKIEWICZ, Z., et al, 2012. DNA Damage Signaling Assessed in Individual Cells in Relation to the Cell Cycle Phase and Induction of Apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 49, no. 5-6, pp. 199-217 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2012.738808>.

DAVAADELGER, B., et al, 2017. The IGF-1R/AKT Pathway has Opposing Effects on Nutlin-3a-Induced Apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*, Nov 02, vol. 18, no. 11, pp. 895-903 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1080/15384047.2017.1345397>.

DICARLO, A.L., et al, 2011. Radiation Injury After a Nuclear Detonation: Medical Consequences and the Need for Scarce Resources Allocation. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 03, vol. 5, pp. S32-S44 ProQuest Central. ISSN 19357893. DOI <http://dx.doi.org/10.1001/dmp.2011.17>.

DONNELLY, E.H., et al, 2010. Acute Radiation Syndrome: Assessment and Management. *Southern Medical Journal*, 06, vol. 103, no. 6, pp. 541-546 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181ddd571>.

DONYA, M., et al, 2014. Radiation in Medicine: Origins, Risks and Aspirations. *Global Cardiology Science & Practice*, vol. 2014, no. 4, pp. 437-448 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 2305-7823, 2305-7823. DOI <http://dx.doi.org/10.5339/gcsp.2014.57>.

DORA MARIA, C.P., et al, 2017. Direct Integrin Binding to Insulin-Like Growth Factor-2 through the C-Domain is Required for Insulin-Like Growth Factor Receptor Type 1 (IGF1R) Signaling. *PLoS One*, 09, vol. 12, no. 9 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0184285>.

DÖRR, H. and MEINEKE, V., 2011. Acute Radiation Syndrome Caused by Accidental Radiation Exposure - Therapeutic Principles. *BMC Medicine*, vol. 9, pp. 126 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-9-126>.

DÖRR, H., FLIEDNER, T.M., and MEINEKE, V., 2010. Clinical Estimation of Radiation Effects Using the Organ-Related Response Categories Concept., *RAPID DIAGNOSIS IN POPULATIONS AT RISK FROM RADIATION AND CHEMICALS*, vol. 73, pp.153-161. DOI: 10.3233/978-1-60750-645-4-153.

DUPONT, J. and LEROITH, D., 2001. Insulin and Insulin-Like Growth Factor I Receptors: Similarities and Differences in Signal Transduction. *Hormone Research*, vol. 55 Suppl 2, pp. 22-26 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0301-0163, 0301-0163.

ELLIOTT, T.B., et al, 2014. Gastrointestinal Acute Radiation Syndrome in Göttingen Minipigs (*Sus Scrofa Domestica*). *Comparative Medicine*, 12, vol. 64, no. 6, pp. 456-463 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1532-0820, 1532-0820.

FISHER, D.R. and FAHEY, F.H., 2017. Appropriate use of Effective Dose in Radiation Protection and Risk Assessment. *Health Physics*, 08, vol. 113, no. 2, pp. 102-109 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/HP.0000000000000674>.

FLIEDNER, T.M., GRAESSLE, D., MEINEKE, V. and DÖRR, H., 2007. Pathophysiological Principles Underlying the Blood Cell Concentration Responses used to Assess the Severity of Effect After Accidental Whole-Body Radiation Exposure: An Essential Basis for an Evidence-Based Clinical Triage. *Experimental Hematology*, 04, vol. 35, no. 4, pp. 8-16 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0301-472X, 0301-472X.

FLIEDNER, T.M., GRAESSLE, D., PAULSEN, C. and REIMERS, K., 2002. Structure and Function of Bone Marrow Hemopoiesis: Mechanisms of Response to Ionizing Radiation Exposure. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 08, vol. 17, no. 4, pp. 405-26 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; Science Database. ISSN 10849785. DOI <http://dx.doi.org/10.1089/108497802760363204>.

FLIEDNER, T.M., TIBKEN, B., HOFER, E.P. and PAUL, W., 1996. Stem Cell Responses After Radiation Exposure: A Key to the Evaluation and Prediction of its Effects. *Health Physics*, 06, vol. 70, no. 6, pp. 787-797 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0017-9078, 0017-9078.

FORMEISTER, E.J., et al, 2009. Distinct SOX9 Levels Differentially Mark stem/progenitor Populations and Enteroendocrine Cells of the Small Intestine Epithelium. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 05, vol. 296, no. 5, pp. G1108-G1118

MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0193-1857, 0193-1857. DOI <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00004.2009>.

FRE, S., et al, 2011. Notch Lineages and Activity in Intestinal Stem Cells Determined by a New Set of Knock-in Mice. PLoS ONE, Oct 03, vol. 6, no. 0 ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025785>.

FRIESECKE, I., BEYRER, K., FLIEDNER, T.M. and METREPOL team Medical treatment protocols for radiation accident victims as a basis for a computerised guidance system, 2001. How to Cope with Radiation Accidents: The Medical Management. The British Journal of Radiology, 02, vol. 74, no. 878, pp. 121-122 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0007-1285, 0007-1285.

GANONG, W., 2005. Přehled lékařské fyziologie. Praha, 20.vyd., 890 s., Galén. ISBN: 80-7262-311-7.

GARRETT, J., et al, 2014. Subcutaneous Wounding Postirradiation Reduces Radiation Lethality in Mice. Radiation Research, 06, vol. 181, no. 6, pp. 578-583 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1667/RR13267.1>.

GOANS, R.E., HOLLOWAY, E.C., BERGER, M.E. and RICKS, R.C., 2001. Early Dose Assessment in Criticality Accidents. Health Physics, 10, vol. 81, no. 4, pp. 446-449 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0017-9078, 0017-9078.

GODA, J.S., et al, 2016. Targeting the AKT Pathway: Repositioning HIV Protease Inhibitors as Radiosensitizers. The Indian Journal of Medical Research, 02, vol. 143, no. 2, pp. 145-159 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0971-5916, 0971-5916. DOI <http://dx.doi.org/10.4103/0971-5916.180201>.

GONG, Wei et al. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. Cell Death and Disease [online]. 2016, vol. 7, no. 9, s. 8.

GREEN, D.E., ADLER, B.J., CHAN, M.E. and RUBIN, C.T., 2012. Devastation of Adult Stem Cell Pools by Irradiation Precedes Collapse of Trabecular Bone Quality and Quantity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 04, vol. 27, no. 4, pp. 749-759 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0884-0431, 0884-0431. DOI <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.1505>.

GREENSPAN, F. a BAXTER, J. 2003. *Základní a klinická endokrinologie*. 1 vyd., H+H. ISBN: 80-86022-56-0.

GRUZDEV, G.P., CHISTOPOL'SKIĬ, A.S. and SUVOROVA, L.A., 1996. Radiosensitivity and Postradiation Kinetics of Megakaryocyte Release of the Bone Marrow (Analysis Based on Data of the Chernobyl AES Accident Sequelae)]. *Radiatsionnaia Biologiia, Radioecologiia*, vol. 36, no. 2, pp. 250-263 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0869-8031, 0869-8031.

GUNTUR, A.R. and ROSEN, C.J., 2013. IGF-1 Regulation of Key Signaling Pathways in Bone. *BoneKEy Reports*, Oct 02, vol. 2, pp. 437 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 2047-6396, 2047-6396. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2013.171>.

HÉRODIN, F. and DROUET, M., 2008. Myeloprotection Following Cytotoxic Damage: The Sooner the Better. , 07, MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2008.02.005>.

HOLZENBERGER M., DUPONT J., DUCOS B., LENEUVE P., GELOEN A., EVEN CP., CERVERA P., LÉBOUC Y., IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice, *Nature*, str. 182-187, 2003.

CHAUHAN, V., et al, 2011. Differential Effects of Alpha-Particle Radiation and x-Irradiation on Genes Associated with Apoptosis. *Radiology Research and Practice*, vol. 2011, pp. 679806 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1155/2011/679806>.

CHAUHAN, V., et al, 2012. Biological Effects of Alpha Particle Radiation Exposure on Human Monocytic Cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 04, vol. 215, no. 3, pp. 339-344 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.11.002>.

CHEN, S., et al, 2012. Subcutaneous Administration of rhIGF-I Post Irradiation Exposure Enhances Hematopoietic Recovery and Survival in BALB/c Mice. *Journal of Radiation Research*, 07, vol. 53, no. 4, pp. 581-587 ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 0449-3060, 0449-3060. DOI <http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rrs029>.

CHRISTOFFERSEN, C.T., et al, 1994. Negative Cooperativity in the Insulin-Like Growth Factor-I Receptor and a Chimeric IGF-I/insulin Receptor. *Endocrinology*, 07, vol. 135, no. 1, pp. 472-475 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0013-7227, 0013-7227.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Ionizing Radiation, Part I, X- and Gamma- Radiation and Neutrons. Lyon, France, 26 may-2 June 1999. MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

IMAI, K., et al, 1999. Selective Transendothelial Migration of Hematopoietic Progenitor Cells: A Role in Homing of Progenitor Cells. *Blood*, Jan 01, vol. 93, no. 1, pp. 149-156 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0006-4971, 0006-4971.

INKOOM, S., et al, 2015. Location of Radiosensitive Organs Inside Pediatric Anthropomorphic Phantoms: Data Required for Dosimetry. *Physica Medica : PM : An International Journal Devoted to the Applications of Physics to Medicine and Biology : Official Journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*, 12, vol. 31, no. 8, pp. 882-888 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2015.06.005>.

INOUE, T., et al, 1995. Survival of Spleen Colony-Forming Units (CFU-S) of Irradiated Bone Marrow Cells in Mice: Evidence for the Existence of a Radioresistant Subfraction. *Experimental Hematology*, 11, vol. 23, no. 12, pp. 1296-1300 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0301-472X, 0301-472X.

IRONS, S.L., et al, 2012. The Effect of Genetic Background and Dose on Non-Targeted Effects of Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 10, vol. 88, no. 10, pp. 735-742 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

JACKSON, I.L., et al, 2016. Pathophysiological Mechanisms Underlying Phenotypic Differences in Pulmonary Radioresponse. *Scientific Reports*, Nov 15, vol. 6, pp. 36579 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/srep36579>.

JEVDJOVIC, T., et al, 2005. The Effect of Hypophysectomy on Pancreatic Islet Hormone and Insulin-Like Growth Factor I Content and mRNA Expression in Rat. *Histochemistry and Cell Biology*, 02, vol. 123, no. 2, pp. 179-88 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 09486143. DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-005-0760-y>.

JOST, M., et al, 2001. Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Control of Keratinocyte Survival and Bcl-xL Expression through a MEK-Dependent Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, Mar 02, vol. 276, no. 9, pp. 6320-6326 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0021-9258, 0021-9258.

KIANG, J.G. and FUKUMOTO, R., 2014. CIPROFLOXACIN INCREASES SURVIVAL AFTER IONIZING IRRADIATION COMBINED INJURY: T-H2AX FORMATION, CYTOKINE/CHEMOKINE, AND RED BLOOD CELLS. *Health Physics*, 06, vol. 106, no. 6, pp. 720-726 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0017-9078, 0017-9078. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/HP.000000000000108>.

KIM, C., YANG, V.W. and BIALKOWSKA, A.B., 2017. The Role of Intestinal Stem Cells in Epithelial Regeneration Following Radiation-Induced Gut Injury. *Current Stem Cell Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 320-332 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 2198-7866, 2198-7866. DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s40778-017-0103-7>.

KUČERA, R., et al, 2016. IGF1 (insulin-like growth factor 1), základní charakteristika, signální dráha, závislost na věku a pohlaví. *Klinická biochemie a metabolismus*, 24 (45), No. 1, p. 14-19. <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2016/2016-1/KBM-1-2016-Kucera-1-14.pdf>.

KUDRYASHEVA, N.S., BONDAR, A.A., PETROVA, A.S. and DEMENTYEV, D.V., 2017. Exposure of Luminous Marine Bacteria to Low-Dose Gamma-Radiation. *Journal of*

Environmental Radioactivity, 04, vol. 169-170, pp. 64-69 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0265-931X, 0265-931X. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.01.002>.

KUCHYNKA, P., et al, 2012. Standards in Diagnosis and Therapy: Cataracts in Adults]. Ceska a Slovenska Oftalmologie : Casopis Ceske Oftalmologicke Spolecnosti a Slovenske Oftalmologicke Spolecnosti, 12, vol. 68, no. 6, pp. 228-234 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1211-9059, 1211-9059

KUMAR, C., et al, 2014. Cellular and Molecular Effects of Beta Radiation from I-131 on Human Tumor Cells: A Comparison with Gamma Radiation. Current Radiopharmaceuticals, vol. 7, no. 2, pp. 138-143 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

KUPKA, K., KUBINYI, J., ŠÁMAL, M., et al, *Nukleární medicína, 2. vydání*. P3K: 2015, 160 s. ISBN 97-80-87343-54-8.

LANGSTEIN, J., et al, 2000. Comparative Analysis of CD137 and LPS Effects on Monocyte Activation, Survival, and Proliferation. Biochemical and Biophysical Research Communications, Jun 24, vol. 273, no. 1, pp. 117-122 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0006-291X, 0006-291X.

LAVIOLA, L., NATALICCHIO, A. and GIORGINO, F., 2007. The IGF-I Signaling Pathway. *Current Pharmaceutical Design*, 03, vol. 13, no. 7, pp. 663-9 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 13816128. DOI <http://dx.doi.org/10.2174/138161207780249146>.

LEE, K.K., et al, 2008. Biology Contribution: Recombinant Human Epidermal Growth Factor Accelerates Recovery of Mouse Small Intestinal Mucosa After Radiation Damage. International Journal of Radiation Oncology, Biology, & Physics, 07, vol. 71, no. 4, pp. 1230-1235 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0360-3016, 0360-3016. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.03.041>.

LEITE, D.B., et al, 2011. Serum Insulin-Like Growth Factor-I Adult Reference Values for an Automated Chemiluminescence Immunoassay System. *African Journal of Biotechnology*,

Dec 07, vol. 10, no. 78, pp. 18027-18033 ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 1684-5315, 1684-5315. DOI <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.2323>.

LEROITH, D. and ROBERTS, C.T., 2003. The Insulin-Like Growth Factor System and Cancer. *Cancer Letters*, Jun 10, vol. 195, no. 2, pp. 127-137 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 03043835. DOI [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00159-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00159-9).

LEVINE, M.E., et al, 2014. Low Protein Intake is Associated with a Major Reduction in IGF-1, Cancer, and overall Mortality in the 65 and Younger but Not Older Population. *Cell Metabolism*, Mar 04, vol. 19, no. 3, pp. 407-417 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.006>.

LÓPEZ, M. and MARTÍN, M., 2011. Medical Management of the Acute Radiation Syndrome. Reports of Practical Oncology and Radiotherapy : Journal of Greatpoland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology, Jul 13, vol. 16, no. 4, pp. 138-146 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1507-1367, 1507-1367. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpor.2011.05.001>.

MACDONALD, R.S., 1999. The Role of Insulin-Like Growth Factors in Small Intestinal Cell Growth and Development. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, vol. 31, no. 2-3, pp. 103-113 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0018-5043, 0018-5043.

MALKAPUR, S.M., et al, 2017. Neutron Radiation Shielding Properties of Polymer Incorporated Self Compacting Concrete Mixes. *Applied Radiation and Isotopes : Including Data, Instrumentation and Methods for use in Agriculture, Industry and Medicine*, 07, vol. 125, pp. 86-93 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2017.03.029>.

MARIANI, E., PULSATELLI, L. and FACCHINI, A., 2014. Signaling Pathways in Cartilage Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 5, pp. 8667-8698 Hospital

Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15058667>.

MAUGHAN, R.L., POWERS, W.E. and BLOSSER, H.G., 1994. A Superconducting Cyclotron for Neutron Radiation Therapy. *Medical Physics*, 06, vol. 21, no. 6, pp. 779-785 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0094-2405, 0094-2405.

MCCAMPBELL, A.S., BROADDUS, R.R., LOOSE, D.S. and DAVIES, P.J.A., 2006. Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor and Activation of the AKT Pathway in Hyperplastic Endometrium. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, Nov 01, vol. 12, no. 21, pp. 6373-6378 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1078-0432, 1078-0432.

METTLER, F.A., et al, 2009. Radiologic and Nuclear Medicine Studies in the United States and Worldwide: Frequency, Radiation Dose, and Comparison with Other Radiation Sources--1950-2007. *Radiology*, 11, vol. 253, no. 2, pp. 520-531 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2532082010>

MILOCCO, A., et al, 2018. NEUTRON RADIATION DAMAGE IN CCD CAMERAS AT JOINT EUROPEAN TORUS (JET). *Radiation Protection Dosimetry*, Aug 01, vol. 180, no. 1-4, pp. 109-114 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1093/rpd/nex220>.

MORELLI, F., BENEDETTI, Y., MOUSSEAU, T.A. and MØLLER, A.P., 2018. Ionizing Radiation and Taxonomic, Functional and Evolutionary Diversity of Bird Communities. *Journal of Environmental Management*, Aug 15, vol. 220, pp. 183-190 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.032>.

MUNSHI, A. and RAMESH, R., 2013. Mitogen-Activated Protein Kinases and their Role in Radiation Response. *Genes & Cancer*, 09, vol. 4, no. 9-10, pp. 401-408 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1947-6019, 1947-6019. DOI <http://dx.doi.org/10.1177/1947601913485414>.

NEKLASOVA, N.Y., ZHARINOV, G.M. and GREBENYUK, A.N., 2014. Modification of Radiosensitivity in Malignant and Normal Tissues during Radiotherapy of Malignant Neoplasms]. *Radiatsionnaia Biologiia, Radioecologiia*, vol. 54, no. 6, pp. 597-605 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0869-8031, 0869-8031.

NEWMAN, M.R., et al, 2014. The Methylation of DNA Repeat Elements is Sex-Dependent and Temporally Different in Response to X Radiation in Radiosensitive and Radioresistant Mouse Strains. *Radiation Research*, 01, vol. 181, no. 1, pp. 65-75 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 00337587.

NITULESCU, G.M., et al, 2016. Akt Inhibitors in Cancer Treatment: The Long Journey from Drug Discovery to Clinical use (Review). *International Journal of Oncology*, 03, vol. 48, no. 3, pp. 869-885 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.3306>.

OH, H., et al, 2010. Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF) Protects Radiation-Induced Intestine Injury in Murine System. *Journal of Radiation Research*, vol. 51, no. 5, pp. 535-541 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection.

OTSUKA, K. and SUZUKI, K., 2016. Differences in Radiation Dose Response between Small and Large Intestinal Crypts. *Radiation Research*, 09, vol. 186, no. 3, pp. 302 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0033-7587, 0033-7587. DOI <http://dx.doi.org/10.1667/RR14455.1>.

PARIS, F., et al, 2001. Endothelial Apoptosis as the Primary Lesion Initiating Intestinal Radiation Damage in Mice. *Science*, Jul 13, vol. 293, no. 5528, pp. 293-7 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection; Science Database. ISSN 00368075.

PAUNESKU, T., HALEY, B., BROOKS, A. and WOLOSCHAK, G.E., 2017. Biological Basis of Radiation Protection Needs Rejuvenation. *International Journal of Radiation Biology*, 10, vol. 93, no. 10, pp. 1056-1063 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1080/09553002.2017.1294773>.

PEJCHAL, J., et al, 2015. Attenuation of Radiation-Induced Gastrointestinal Damage by Epidermal Growth Factor and Bone Marrow Transplantation in Mice. *International Journal of Radiation Biology*, vol. 91, no. 9, pp. 703-714 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.3109/09553002.2015.1054528>.

PFALZNER, P.M., 1983. Sievert, Gray and Dose Equivalent. *Journal of the Canadian Association of Radiologists*, 12, vol. 34, no. 4, pp. 298-300 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0008-2902, 0008-2902.

PLETT, P.A., et al, 2014. PEGylated G-CSF (BBT-015), GM-CSF (BBT-007), and IL-11 (BBT-059) Analogs Enhance Survival and Hematopoietic Cell Recovery in a Mouse Model of the Hematopoietic Syndrome of the Acute Radiation Syndrome. *Health Physics*, 01, vol. 106, no. 1, pp. 7-20 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/HP.0b013e3182a4dd4e>.

POTTEN, C.S. and GRANT, H.K., 1998. The Relationship between Ionizing Radiation-Induced Apoptosis and Stem Cells in the Small and Large Intestine. *British Journal of Cancer*, 10, vol. 78, no. 8, pp. 993-1003 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0007-0920, 0007-0920.

POWELL-BRAXTON, L., et al, 1993. IGF-I is Required for Normal Embryonic Growth in Mice. *Genes & Development*, 12, vol. 7, no. 12, pp. 2609-2617 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0890-9369, 0890-9369.

PRAVEEN, M.K., et al, 2017. Evaluation of DNA Damage Induced by Gamma Radiation in Gill and Muscle Tissues of *Cyprinus Carpio* and their Relative Sensitivity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 10, vol. 144, pp. 166-170 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.022>.

QIAN, X., et al, 2017. Astaxanthin Increases Radiosensitivity in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through Inducing Apoptosis and G2/M Arrest. *Diseases of the Esophagus : Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus*, Jun 01, vol. 30, no. 6, pp. 1-7 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1093/dote/dox027>.

QIU, W., LEIBOWITZ, B., ZHANG, L. and YU, J., 2010. Growth Factors Protect Intestinal Stem Cells from Radiation-Induced Apoptosis by Suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 Axis. *Oncogene*, Mar 18, vol. 29, no. 11, pp. 1622-32 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 09509232. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2009.451>

RAITT, M.H., et al, 1994. Runaway Pacemaker during High-Energy Neutron Radiation Therapy. *Chest*, 09, vol. 106, no. 3, pp. 955-957 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0012-3692, 0012-3692.

RAJ, A. M., 2010

[online]:[https://www.researchgate.net/profile/Ikbal_Chaieb/post/How_to_do_the_probit_analysis_for_acute_toxicity_test/attachment/5a9cf78d4cde266d588f3e6a/AS:600729278480384@1520236429117/download/LD50_LC50_Probit_Analysis+\(1\).xlsx](https://www.researchgate.net/profile/Ikbal_Chaieb/post/How_to_do_the_probit_analysis_for_acute_toxicity_test/attachment/5a9cf78d4cde266d588f3e6a/AS:600729278480384@1520236429117/download/LD50_LC50_Probit_Analysis+(1).xlsx)

RAJAGOPALAN, M.S. and HERON, D.E., 2010. Role of PET/CT Imaging in Stereotactic Body Radiotherapy. *Future Oncology*, 02, vol. 6, no. 2, pp. 305-17 Hospital Premium Collection; ProQuest Central. ISSN 14796694. DOI <http://dx.doi.org/10.2217/fon.09.166>.

RANKE, M.B., WÖLFLE, J., SCHNABEL, D. and BETTENDORF, M., 2009. Treatment of Dwarfism with Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor-1. *Deutsches Arzteblatt International*, 10, vol. 106, no. 43, pp. 703-709 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2009.0703>.

RASCHDORF, F., et al, 1988. Location of Disulphide Bonds in Human Insulin-Like Growth Factors (IGFs) Synthesized by Recombinant DNA Technology. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 10, vol. 16, no. 1-12, pp. 3-8 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0887-6134, 0887-6134.

REHBERG-KRAUSE R., LEIPNER SH., *Positron Annihilation in Semiconductors: Defect Studies*, Springer Science & Business Media, 1999, 378 s, ISBN: 978-3-540-64371-5.

REISZ, J.A., et al, 2014. Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules-Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 21, no. 2, pp. 260-292 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1523-0864, 1523-0864. DOI <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5489>.

RENEHAN, A.G., ZWAHLEN, M., EGGER, M. and SHALET, S.M., 2005. IGF-I; IGF-Binding Protein-3 and Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Online*, 01, vol. 8, no. 1 Hospital Premium Collection; ProQuest Central

ROBSON, R.E., et al, 2015. Positron Kinetics in an Idealized PET Environment. *Scientific Reports (Nature Publisher Group)*, 08, vol. 5, pp. 12674 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; Science Database. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/srep12674>.

ROGACHEVA, S.A., 1998. Experimental Substantiation of the use of Cytokines in Acute Radiation Disease]. *Radiatsionnaia Biologiia, Radioecologiia*, vol. 38, no. 6, pp. 854-873 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0869-8031, 0869-8031.

ROCHA, F.S., et al, 2016. The Effects of Ionizing Radiation on the Growth Plate in Rat Tibiae. *Microscopy Research and Technique*, 12, vol. 79, no. 12, pp. 1147-1151 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22769>.

ROSINA, J., VRÁNOVÁ, J., KOLÁŘOVÁ, H., STANEK, J. *Biofyzika*. GRADA: 2013, 224 s. ISBN 978-80-247-4237-3.

SAEGUSA, J., et al, 2009. The Direct Binding of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) to Integrin $\alpha v \beta 3$ is Involved in IGF-1 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, Sep 04, vol. 284, no. 36, pp. 24106-24114 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0021-9258, 0021-9258. DOI <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.013201>.

SAKURAI, H., et al, 2016. Densitometry and Temperature Measurement of Combustion Gas by X-Ray Compton Scattering. *Journal of Synchrotron Radiation*, 03, vol. 23, no. 2, pp. 617-

621 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1107/S1600577516001740>.

SATO, T. and CLEVERS, H., 2013. Growing Self-Organizing Mini-Guts from a Single Intestinal Stem Cell: Mechanism and Applications. *Science*, Jun 07, vol. 340, no. 6137, pp. 1190-1194 ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0036-8075, 0036-8075. DOI <http://dx.doi.org/10.1126/science.1234852>.

SAVENKOV, G.G., et al, 2016. The Effect of Beta Radiation on the Susceptibility of High-Energy Materials to a High-Current Electron Beam. *Technical Physics Letters*, vol. 42, no. 9, pp. 895-897 ProQuest Central; ProQuest Technology Collection. ISSN 10637850. DOI <http://dx.doi.org/10.1134/S106378501609008X>.

SEIDEMAN, J.H., SHUM, D., DJABALLAH, H. and SCHEINBERG, D.A., 2010. A High-Throughput Screen for Alpha Particle Radiation Protectants. *Assay and Drug Development Technologies*, 10, vol. 8, no. 5, pp. 602-614 ProQuest Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 1540-658X, 1540-658X.

SGOUROS, G., HOBBS, R. and JOSEFSSON, A., 2018. Dosimetry and Radiobiology of Alpha-Particle Emitting Radionuclides. *Current Radiopharmaceuticals*, vol. 11, no. 3, pp. 209-214 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.2174/1874471011666180426130058>.

SONG, Q., et al, 2018. Radiosensitivity of Human Ovarian Cancer Cells is Enhanced by Pseudolaric Acid B due to the Inhibition of the Ras/Raf/ERK Signaling Pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 01, vol. 15, no. 1, pp. 685-690 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1792-0981, 1792-0981. DOI <http://dx.doi.org/10.3892/etm.2017.5500>.

SWIRSKI, F.K., HILGENDORF, I. and ROBBINS, C.S., 2014. From Proliferation to Proliferation: Monocyte Lineage Comes Full Circle. *Seminars in Immunopathology*, 03, vol. 36, no. 2, pp. 137-48 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1863-2297. DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-013-0409-1>.

ŠINKOROVÁ, Z., L. NAVRÁTIL. *Biomedicínská detekce ionizujícího záření, 1. vydání*. Praha: ČVUT, 2014, **88** s. ISBN 978-80-01-05626-4.

TAKADA, Y., TAKADA, Y.K. and FUJITA, M., 2017. Crosstalk between Insulin-Like Growth Factor (IGF) Receptor and Integrins through Direct Integrin Binding to IGF1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 04, vol. 34, pp. 67-72 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.01.003>.

TAMAMOTO, T., et al, 1999. Correlation between Gamma-Ray-Induced G2 Arrest and Radioresistance in Two Human Cancer Cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, Jul 01, vol. 44, no. 4, pp. 905-909 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0360-3016, 0360-3016.

THOMPSON, J. and LAKHANI, N., 2015. Cataracts. *Primary Care*, 09, vol. 42, no. 3, pp. 409-423 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2015.05.012>.

TIAN, H., et al, 2011. A Reserve Stem Cell Population in Small Intestine Renders Lgr5-Positive Cells Dispensable. *Nature*, Sep 18, vol. 478, no. 7368, pp. 255-259 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/nature10408>.

TOULANY, M., et al, 2016. Dual Targeting of PI3K and MEK Enhances the Radiation Response of K-RAS Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncotarget*, Jul 12, vol. 7, no. 28, pp. 43746-43761 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.9670>.

TROJAN, S., 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha, 4. vyd., 771 s., Grada. ISBN: 80-247-0512-5.

VAN BEKKUM, D.W., 1991. Radiation Sensitivity of the Hemopoietic Stem Cell. *Radiation Research*, 10, vol. 128, no. 1, pp. S4-S8 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0033-7587, 0033-7587.

VAN ES, J.H., et al, 2012. Dll1 Super(+) Secretory Progenitor Cells Revert to Stem Cells upon Crypt Damage. *Nature Cell Biology*, 10, vol. 14, no. 10, pp. 1099-1104 ProQuest

Natural Science Collection; ProQuest Technology Collection. ISSN 1465-7392, 1465-7392. DOI <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2581>.

VAN OS, R., LAMONT, C., WITSELL, A. and MAUCH, P.M., 1997. Radioprotection of Bone Marrow Stem Cell Subsets by Interleukin-1 and Kit-Ligand: Implications for CFU-S as the Responsible Target Cell Population. *Experimental Hematology*, 03, vol. 25, no. 3, pp. 205-210 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0301-472X, 0301-472X.

VENKATACHALAM, S., et al, 2017. The Impact of the IGF-1 System of Cancer Cells on Radiation Response - an in Vitro Study. *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 12, vol. 7, pp. 1-8 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctro.2017.09.006>.

VOROBIEV, A.I., 1997. Acute Radiation Disease and Biological Dosimetry in 1993. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, vol. 15 Suppl 2, pp. 269-274 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1066-5099, 1066-5099.

VORWERK, P., et al, 2002. Expression of Components of the IGF Signalling System in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Molecular Pathology : MP*, 02, vol. 55, no. 1, pp. 40-45 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1366-8714, 1366-8714.

WANG, Y., et al, 2004. Activation of Nuclear Factor kappaB in Vivo Selectively Protects the Murine Small Intestine Against Ionizing Radiation-Induced Damage. *Cancer Research*, Sep 01, vol. 64, no. 17, pp. 6240-6246 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0008-5472, 0008-5472.

WATERMAN, G., et al, 2017. Selective Shielding of Bone Marrow: An Approach to Protecting Humans from External Gamma Radiation. *Health Physics*, 09, vol. 113, no. 3, pp. 195-208 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1097/HP.0000000000000688>.

WILKINS, H.R., et al, 2002. Reduction of Spontaneous and Irradiation-Induced Apoptosis in Small Intestine of IGF-I Transgenic Mice. *American Journal of Physiology.Gastrointestinal*

and Liver Physiology, 08, vol. 283, no. 2, pp. G457-G464 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0193-1857, 0193-1857.

WITHERS, H.R. and ELKIND, M.M., 1970. Microcolony Survival Assay for Cells of Mouse Intestinal Mucosa Exposed to Radiation. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*, vol. 17, no. 3, pp. 261-267 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0020-7616, 0020-7616.

YAKAR, S., et al, 2002. Circulating Levels of IGF-1 Directly Regulate Bone Growth and Density. *Journal of Clinical Investigation*, 09, vol. 110, no. 6, pp. 771-81 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 00219738.

YAN, K.S., et al, 2012. The Intestinal Stem Cell Markers *Bmi1* and *Lgr5* Identify Two Functionally Distinct Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jan 10, vol. 109, no. 2, pp. 466-471 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1118857109>.

ZABALLA, I. and EIDEMÜLLER, M., 2016. Mechanistic Study on Lung Cancer Mortality After Radon Exposure in the Wismut Cohort Supports Important Role of Clonal Expansion in Lung Carcinogenesis. *Radiation and Environmental Biophysics*, 08, vol. 55, no. 3, pp. 299-315 Hospital Premium Collection; ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection; Science Database. ISSN 0301-634X. DOI <http://dx.doi.org/10.1007/s00411-016-0659-0>.

ZAPF, J., RINDERKNECHT, E., HUMBEL, R.E. and FROESCH, E.R., 1978. Nonsuppressible Insulin-Like Activity (NSILA) from Human Serum: Recent Accomplishments and their Physiologic Implications. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 12, vol. 27, no. 12, pp. 1803-1828 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 0026-0495, 0026-0495.

ZDROJEWICZ, Z., PACHURA, E. and PACHURA, P., 2016. The Thymus: A Forgotten, but very Important Organ. *Advances in Clinical and Experimental Medicine : Official Organ Wroclaw Medical University*, vol. 25, no. 2, pp. 369-375 MEDLINE®; ProQuest Natural Science Collection. ISSN 1899-5276, 1899-5276. DOI <http://dx.doi.org/10.17219/acem/58802>.

ZHANG, W., LUN, M.C., Alex Anh-Tu Nguyen and LI, C., 2017. X-Ray Luminescence Computed Tomography using a Focused X-Ray Beam. Ithaca: Cornell University Library, arXiv.org, Sep 28, ProQuest Central; ProQuest Technology Collection. DOI <http://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.22.11.116004>.