

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Tereza Kopřivová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko – technologická

Modulace střevní sliznice vyvolané ionizujícím zářením pomocí  
keratinocytárního růstového faktoru

Bc. Tereza Kopřivová

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Kopřivová**  
Osobní číslo: **C17424**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Název tématu: **Modulace střevní sliznice vyvolané ionizujícím zářením pomocí keratinocytárního růstového faktoru**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### 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 ionizující záření (definice, klasifikace).
2. Uveďte vlivy ionizujícího záření na hmotu s náhledným dělení biologických účinků s důrazem na střevní sliznici.
3. Stručně vyjmenujte přehled a vlastnosti růstových faktorů použitelných při mitigaci radiačního poškození epiteliálních tkání.
4. Charakterizujte KGF-1 (mechanismus účinku, klinické využití, návaznost signálních drah).

#### Experimentální část:

1. Vyhodnoťte přežívání myši po téměř celotělovém ozáření (krytí hlavy) bez léčby a s léčbou růstovým faktorem KGF po ozáření 14, 15 a 16 Gy.
2. Vyhodnoťte vliv podání KGF na morfologické poškození jednotlivých částí tenkého (jejunum a ileum) a tlustého střeva (colon transversum) u tohoto modelu po ozáření 12 a 14 Gy.
3. Vyhodnoťte vliv podání KGF na změny v krevním obrazu u tohoto modelu po ozáření 12 a 14 Gy.
4. Zhodnoťte celkové experimentální výsledky a možnosti budoucího využití.

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 má 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. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. května 2019

Bc. Tereza Kopřivová

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi. Ph.D. et Ph.D. za cenné rady a poskytnutí znalostí při zpracování této diplomové práce. Především děkuji své rodinně a blízkým za psychickou a materiální podporu během celého období svého studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je zaměřena na modulaci poškození střevní sliznice pomocí keratinocytárního růstového faktoru. Keratinocytární růstový faktor (palifermin) je jedním z mála klinicky dostupných růstových faktorů a je indikován k zmírnění poškození dutiny ústní u pacientů podstupujících radioterapii v oblasti hlavy a krku. Do jaké míry tento faktor může ovlivnit poškození jiných částí gastrointestinálního traktu, pokud je podaný po ozáření, není známo. První část práce je věnována problematice ionizujícího záření a KGF. Experimentální část práce hodnotí účinky keratinocytárního růstového faktoru na přežívání a regeneraci střevní sliznice u samic myši kmene C57Bl/6J po ozáření potenciálně letálními dávkami při krytí hlavy. Závěrečná část obsahuje zhodnocení získaných dat.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ionizující záření, střevní sliznice, keratinocytární růstový faktor, palifermin

## **TITLE**

Modulation of damage of intestinal mucosa induced by ionizing radiation using keratinocyte growth factor

## **ANNOTATION**

The thesis is focused on modulation of intestinal damage by keratinocyte growth factor. Keratinocyte growth factor is one of the few clinically available growth factors and is indicated to alleviate damage of oral cavity in patients undergoing head and neck radiotherapy. The extent to which this factor may affect the damage of other parts of the gastrointestinal tract, if administered after irradiation, remains unknown. The first part is devoted to ionizing radiation and keratinocyte growth factor. The experimental part evaluates the effects of keratinocyte growth factor on the survival and regeneration of intestinal mucosa in female C57Bl/6J mice after irradiation by potentially lethal doses with head shielding. The final part evaluates the obtained data.

## **KEYWORDS**

Ionizing radiation, intestinal mucosa, keratinocyte growth factor, palifermin

# Obsah

## SEZNAM GRAFŮ

## SEZNAM TABULEK

## SEZNAM ZKRATEK

<b>ÚVOD</b> .....	15
<b>1 Teoretická část</b> .....	16
1.1 Ionizující záření .....	16
1.1.1 Vlastnosti a definice.....	16
1.1.2 Zdroje IZ.....	16
1.1.3 Typy IZ .....	20
1.1.4 Účinky IZ.....	21
1.2 Keratinocytární růstový faktor.....	32
1.2.1 Struktura.....	32
1.2.2 Receptory .....	32
1.2.3 Signální dráhy .....	33
1.2.4 Funkce KGF v radiobiologicky významných epiteliálních tkáních .....	33
1.2.5 Rekombinantní forma KGF .....	36
<b>2 Cíle diplomové práce</b> .....	38
<b>3 Experimentální část</b> .....	39
3.1 Experimentální zvířata.....	39
3.2 Zdroj záření.....	39
3.3 Postup ozařování experimentálních zvířat.....	39
3.4 Experimentální modely.....	40
3.4.1 Experimentální model I .....	40
3.4.2 Experimentální model II .....	41
3.5 Analýza krve.....	41
3.6 Odběr vzorků střeva.....	42
3.7 Zhotovení preparátů.....	42
3.7.1 Odvodnění preparátů a zalití do parafínu .....	42
3.7.2 Nanesení preparátu na podložní sklo .....	42
3.7.3 Odparafinování preparátu .....	43
3.7.4 Barvení preparátu hematoxylinem-eozinem.....	43



	3.7.5	Zamontování vzorků .....	45
	3.8	Hodnocení preparátů.....	46
	3.8.1	Počet viabilních krypt .....	46
	3.8.2	Měření délky klků a hloubky krypt.....	46
	3.9	Statistické zpracování dat .....	47
<b>4</b>		<b>Výsledky</b> .....	<b>48</b>
	4.1	Experimentální model I (vliv KGF na přežívání experimentálních zvířat) .....	48
	4.2	Experimentální model II .....	50
	4.2.1	Váha zvířat (vliv KGF na váhu zvířat) .....	50
	4.2.2	Duodenum.....	51
	4.2.3	Jejunum .....	54
	4.2.4	Ileum .....	57
	4.2.5	Colon transversum .....	60
	4.2.6	Krevní obraz .....	62
	4.2.7	Celkové zhodnocení signifikantních změn ve střevní sliznici.....	76
	4.2.8	Celkové zhodnocení signifikantních změn v krevním obraze .....	77
<b>5</b>		<b>Diskuze</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>		<b>Závěr</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>		<b>Seznam publikací</b> .....	<b>84</b>

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf č. 1</b> Přežívání myši po jednorázové expozici 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	48
<b>Graf č. 2</b> Přežívání myši po jednorázové expozici 15 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	49
<b>Graf č. 3</b> Přežívání myši po jednorázové expozici 16 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	49
<b>Graf č. 4</b> Váha experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF.....	50
<b>Graf č. 5</b> Počet viabilních krypt v duodenu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	51
<b>Graf č. 7</b> Délka klků v duodenu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	53
<b>Graf č. 8</b> Počet viabilních krypt v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	54
<b>Graf č. 9</b> Hloubka krypt v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	55
<b>Graf č. 10</b> Délka klků v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	56
<b>Graf č. 11</b> Počet viabilních krypt v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	57
<b>Graf č. 12</b> Hloubka krypt v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	58
<b>Graf č. 13</b> Délka klků v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	59
<b>Graf č. 14</b> Počet viabilních krypt v colon transversum experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	60
<b>Graf č. 15</b> Hloubka krypt v colon transversum experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	61
<b>Graf č. 16</b> Počet erytrocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	62

<b>Graf č. 17</b> Množství hemoglobinu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	63
<b>Graf č. 18</b> Hematokrit experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF.....	64
<b>Graf č. 19</b> Střední objem erytrocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	65
<b>Graf č. 20</b> Množství hemoglobinu v erytrocytech experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF.....	66
<b>Graf č. 21</b> Počet trombocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	67
<b>Graf č. 23</b> Střední objem trombocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	69
<b>Graf č. 24</b> Počet leukocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	70
<b>Graf č. 26</b> Počet monocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	72
<b>Graf č. 27</b> Počet neutrofilních granulocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	73
<b>Graf č. 28</b> Počet eosinofilů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF .....	74

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka č. 1</b> Přehled dopadů ANO a možnosti jejich léčby.....	24
<b>Tabulka č. 2</b> Klinické kožní projevy ANO.....	27
<b>Tabulka č. 3</b> Přehled testovaných látek ve farmakologické kombinaci při léčbě ANO.....	31
<b>Tabulka č. 4</b> Rozdělení laboratorních zvířat do skupin v prvním experimentu .....	40
<b>Tabulka č. 5.</b> Rozdělení laboratorních zvířat do skupin ve druhém experimentu.....	41
<b>Tabulka č. 6</b> Úseky odebraných tkání gastrointestinálního traktu .....	42
<b>Tabulce č. 7</b> Schéma průběhu odvodnění v tkáňovém procesoru.....	43
<b>Tabulka č. 8</b> Postup odparafinování ukrojených a na sklíčka natažených řezů. ....	44
<b>Tabulka č. 9</b> Složení zásobního roztoku Gillova hematoxylinu.....	44
<b>Tabulka č. 10</b> Schéma průběhu diferenciací vzorků.....	44
<b>Tabulka č. 11</b> Příprava kyselého alkoholu .....	45
<b>Tabulka č. 12</b> Postup odvodnění vzorků barvených eozinem .....	45
<b>Tabulka č. 13</b> Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při léčbě KGF oproti ozářené neléčené skupině v experimentálním modelu 2 .....	76
<b>Tabulka č. 14</b> Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při porovnání časného 2 dávkového a pozdního 3 dávkového režimu proti časné aplikaci 3 dávek KGF.....	77
<b>Tabulka č. 15</b> Signifikantní změny v krevním obraze pozorované při léčbě KGF oproti ozářené neléčené skupině v experimentálním modelu 2 .....	78
<b>Tabulka č. 16</b> Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při porovnání časného 2 dávkového a pozdního 3 dávkového režimu proti časné aplikaci 3 dávek KGF.....	78

## SEZNAM ZKRATEK

Am	americium ( <i>americium</i> )
ANO	akutní nemoc z ozáření (acute radiation syndrome)
ASD	akutní stresová porucha (acute stress disorder)
At	astat ( <i>astatine</i> )
ATI	alveolární epitelové buňky I typu (alveolar epithelial type I cell)
ATII	alveolární epitelové buňky II typu (alveolar epithelial type II cell)
Be	beryllium ( <i>beryllium</i> )
Bmi1	homolog B-lymfomu Mo-MLV inzerčního regionu 1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog)
C	uhlík ( <i>carboneum</i> )
CD	povrchový znak (cluster designation)
Cdk	cyklin dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous systém)
Co	kobalt ( <i>colbaltum</i> )
Cs	cesium ( <i>caesium</i> )
CSF	faktor stimulující kolonie (colony stimulating factor)
CT	výpočetní tomografie (computed tomography)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSS	dextran sulfát sodný (dextran sulfate sodium)
EBP $\alpha$	CCAAT / zesilující vázající protein alfa (CCAAT/enhancer binding protein alpha)
EBP $\delta$	CCAAT / zesilující vázající protein delta (CCAAT/enhancer binding protein delta)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
Er	erbium ( <i>erbium</i> )
ERK	extracelulární-signál rozpoznávající kináza (Extracellular signal-regulated kinase)
F	fluor ( <i>fluorine</i> )
FGF	fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
FGF-7	fibroblastový růstový faktor 7 (fibroblast growth factor 7)
FGFR2-IIIb	receptor keratinocytárního růstového faktoru (keratinocyte growth factor receptor)

Ga	gallium ( <i>gallium</i> )
G-CSF	faktor stimulující granulocytární kolonie (granulocyte colony stimulating factor)
GI	gastrointestinální (gastrointestinal)
GSH	glutathion (glutathione)
GvHD	reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
Gy	Gray
H	vodík ( <i>hydrogenium</i> )
He	helium ( <i>helium</i> )
Ho	holmium ( <i>holmium</i> )
I	jód ( <i>iodum</i> )
IEL	intraepitelové lymfocyty (intraepithelial lymphocyte)
IL-1 $\beta$	interleukin 1 beta
IL-3	interleukin 3
IL-6	interleukinu 6
IL-8	interleukin 8
IZ	ionizující záření (ionizing radiation)
K	draslík ( <i>potassium</i> )
KGF	keratinocytární růstový faktor (keratinocyte growth factor)
KGFR	receptor keratinocytárního růstového faktoru (keratinocyte growth factor receptor)
LET	lineární přenos energie (linear energy transfer)
Lgr5	receptor G-proteinu obsahující leucinové repetice 5 (leucine rich repeat containing G-protein coupled receptor 5)
Lrig1	leucinové repetice a domény podobné imunoglobulinům (leucine rich repeats and immunoglobulin like domains 1)
Lu	lutecium ( <i>lutetium</i> )
MEK	duální threonin a tyrosin rozpoznávací kináza (dual threonine and tyrosine recognition kinase)
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MSC	mezenchymální kmenová buňka (mesenchymal stem cell)
mTert	myší telomerázová reverzní transkriptáza (mouse telomerase reverse transcriptase)
O	kyslík ( <i>oxygenium</i> )
P	fosfor ( <i>phosphorus</i> )

PAK	aktivovaná kináza proteinem 21 (p21 activated kinase)
Pd	olovo ( <i>plumbum</i> )
pERK	serin/threonin selektivní protein kináza (serine/threonine-selective protein kinases)
PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
PLC $\gamma$	fosfolipáza C gama (Phosphoinositide phospholipase C gamma)
pMEK	serin/tyrosin/threonin kináza (serine/tyrosine/threonine kinase)
Pr	praseodym ( <i>praseodymium</i> )
PTSD	posttraumatická stresová porucha (posttraumatic stress disorder)
Pu	plutonium ( <i>plutonium</i> )
Ra	radon ( <i>radium</i> )
Re	rhenium ( <i>rhenium</i> )
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROS	reaktivní kyslíkové částice (reactive oxygen species)
Sm	samarium ( <i>samarium</i> )
SPECT	jedno-fotonová emisní výpočetní tomografie (single-photon emission computed tomography)
Sr	stroncium ( <i>strontium</i> )
Sv	Sievert
Tc	technecium ( <i>technetium</i> )
TCR $\sigma$	T buněčný receptor delta (T-cell receptor delta)
Th	thorium ( <i>thorium</i> )
Th2	TH2 lymfocyt (T-lymphocyte helper 2)
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
U	uran ( <i>uranium</i> )
w <sub>R</sub>	faktor radiační váhy (radiation weighting factor)
w <sub>T</sub>	tkáňový váhový faktor (tissue weighting factor)
Y	yttrium ( <i>yttrium</i> )

# ÚVOD

Ionizující záření na jedné straně přináší mnoho užitečného, zejména pokud je použito k diagnostickým a terapeutickým účelům, na druhou stranu představuje i hrozbu v podobě jaderných zbraní a radionukleárního terorismu. Je proto důležité pochopit jeho účinky na lidský organismus a nalézt vhodné prostředky, kterými by bylo možné jeho dopady eliminovat.

Diplomová práce je dělena na teoretickou a experimentální část. Teoretická část je zaměřena na problematiku ionizujícího záření, jeho zdrojů, druhů, účinků na buňku a lidský organismus a možnosti terapie poškození, ke kterým může dojít v rámci radiačních nehod či havárií. Rovněž je řešen keratinocytární růstový faktor, mechanismus jeho účinku a potenciál využití.

Experimentální část diplomové práce nejprve hodnotí účinky keratinocytárního růstového faktoru (KGF) na přežívání samic myší kmene C57Bl/6J po ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy při krytí hlavy. Následně je posouzen vliv tohoto faktoru na regeneraci jednotlivých částí gastrointestinálního traktu, včetně dvanácterníku (duodena), lačnicku (jejuna), kyčelníku (ilea) a příčného tračnicku (colon transversum), po ozáření dávkami 12 a 14 Gy. Na základě výsledků experimentu je vedena diskuze a učiněny závěry.



# 1 Teoretická část

## 1.1 Ionizující záření

### 1.1.1 Vlastnosti a definice

Ionizující záření (IZ) je forma záření, které po interakci s hmotou odstraňuje elektrony z elektronového obalu atomů a tím způsobuje jeho ionizaci. IZ existuje buď ve formě částic nebo elektromagnetického vlnění a jeho nejběžnější charakterizovaná jednotka je Gray (Gy), která kvantifikuje absorbovanou dávku IZ. Jednotka Gy je definována jako 1 Joule absorbované energie jedním kilogramem tkáně. Pro porovnání biologické účinnosti různých typů IZ vykazujících stejnou absorbovanou dávku se také používá jednotka nazývaná Sievert (Sv), která měří účinnou dávku záření. Zatímco 1 Gy rentgenového nebo  $\gamma$  záření se rovná 1 Sv, u částic s vyšší schopností ionizovat podél své dráhy letu, jako jsou proton nebo alfa částice, může být 1 Gy záření ekvivalentní 10–20 Sv (Bhattacharya a Asaithamby, 2016).

Všechny živé organismy jsou IZ permanentně vystaveny. Kromě diagnostických a terapeutických expozic je populace chronicky ozařovaná i zářením z přírodního pozadí. Přírozená radioaktivita v životním prostředí spolu s aplikací ve všeobecném lékařství tvoří největší část naakumulované průměrné dávky 2,4 mGy IZ za rok (Desouky *et al.*, 2015; Mortazavi a Mozdarani, 2012).

Z celoživotního hlediska jsou tyto dávky považovány za nízké a živé organismy jsou jim adaptovány. Jiná situace nastává v případě umělých zdrojů IZ. Ačkoliv se člověk naučil tyto zdroje používat ke svému užítku, v situacích, kdy nad nimi ztratí kontrolu, může významně narůst dávka, které je organizmus vystaven. Dávky vyšší, než přírodní pozadí mohou mít vážné dopady na zdraví ozářeného jedince.

### 1.1.2 Zdroje IZ

#### 1.1.2.1 Radionuklidy

Radionuklidy jsou atomy s nestabilním jádrem a vysokou mírou energie. Jako všechny energeticky nestabilní látky mají snahu dosáhnout stabilnějšího stavu s nižší energií. Uvolňují proto energii v různých podobách záření (Krebs a Dunphy, 2017). Radioaktivita radionuklidů je tedy emise IZ, která je výsledkem spontánního rozpadu nestabilních atomových jader nebo

jejich jaderných reakcí. Rychlost rozpadu a dezintegrace radionuklidu jsou přímo úměrné hmotnosti radionuklidu (L'Annunziata, 2012).

Expozice IZ z přirozeně vyskytujících se radionuklidů je nepřetržitý a nevyhnutelný děj. Z 340 izotopů běžně se vyskytujících prvků, včetně všech izotopů s atomovými čísly většími jak 83, je pouze 70 radioaktivních. Většina z těchto radionuklidů nemá vlivem nízkého izotopového nebo elementárního zastoupení signifikantní dopad. K přirozenému pozadí záření přispívají dva hlavní zdroje radionuklidů. Prvním z nich jsou primordiální radionuklidy, z nichž největší zastoupení má radon. Tento plyn se uvolňuje ze zemské kůry a kumuluje v nevětraných místnostech s nízkou protiradonovou ochranou. Další expozice zahrnuje především radionuklidy  $^{238}\text{U}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{232}\text{Th}$  a  $^{40}\text{K}$ , které jsou plošně přítomny ve všech geologických materiálech i lidském těle. Druhým zdrojem jsou tzv. sekundární radionuklidy jako  $^3\text{H}$ ,  $^7\text{Be}$  a  $^{14}\text{C}$  vznikající interakcí mezi částicemi kosmického záření a složkami atmosféry. Kosmické záření navíc samo přispívá k hodnotám přirozeného pozadí. Jeho intenzita se úměrně zvyšuje s nadmořskou šířkou a snižuje s hustotou atmosféry, kterou prochází. Obyvatelé polárních a horských oblastí, posádky letadel a pravidelní letečtí pasažéři proto absorbují vyšší dávky kosmického záření (Mortazavi a Mozdarani, 2012). Přirozené zdroje radionuklidů a působení kosmogenního záření přispívají asi z 80 % k celkové expozici IZ na člověka (Rangaswamy *et al.*, 2015; Hutchinson a Hutchinson, 1997).

Syntéza radionuklidu vyžaduje znalosti jaderných reakcí, které jsou důležité pro stanovení optimálního energetického rozsahu využitého při produkci požadovaného radionuklidu. Díky nim lze také vypočítat teoretickou výtěžnost radionuklidu a stanovit úroveň izotopových nečistot, které představují nebezpečí při terapeutické aplikaci (Syed, 2017).

### ***Terapie***

Použití radionuklidů činí nezastupitelný zdroj IZ v medicíně. Radionuklidy mohou být použity jako vnějšího zdroj IZ, kterým je organismus ozařován v rámci radioterapie, tzv. teleterapie. V případě použití jako vnitřního zdroje IZ, dochází k jejich aplikaci pro diagnostické nebo terapeutické účely. Pro účely teleterapie je pro svou dostupnost, rozpad na neradioaktivní nikl a generování kvant gama ozáření o vysoké energii, nejčastěji používán  $^{60}\text{Co}$ . Tento radionuklid byl rovněž zdrojem ozáření pokusných zvířat v rámci experimentální části diplomové práce. Jen zřídka se pro teleterapii používají jiného zdroje, jako je např.  $^{137}\text{Cs}$ .

Zavedením radionuklidu do organismu se zabývá nukleární medicína. Každá aplikace nicméně vyžaduje speciální typ radionuklidu, jehož výběr závisí na jeho rozpadovém řádu,

farmakokinetice, radiační dávce absorbované pacientem a její distribuci, eventuálně možnostmi efektivní detekce emitovaného záření. V případě radioterapie musí použitá dávka přímo směřovat proti maligní tkáni nebo zánětu. To je důvod, proč klinicky využívané radionuklidy vyzařují vysoce ionizující záření o krátkém dosahu. V tomto případě je vhodné použití zdrojů alfa anebo beta částic, Mezi klinicky využívané radionuklidy emitující alfa částice, patří hlavně  $^{211}\text{At}$  ( $T_{1/2} = 7,2$  h) a  $^{223}\text{Ra}$  ( $T_{1/2} = 11,4$  d). Zdrojem beta záření je například  $^{32}\text{P}$  ( $T_{1/2} = 14,3$  d),  $^{89}\text{Sr}$  ( $T_{1/2} = 50,5$  d),  $^{90}\text{Y}$  ( $T_{1/2} = 2,7$  d),  $^{131}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 8,0$  d),  $^{153}\text{Sm}$  ( $T_{1/2} = 1,9$  d),  $^{169}\text{Er}$  ( $T_{1/2} = 9,4$  d),  $^{177}\text{Lu}$  ( $T_{1/2} = 6,7$  d) a  $^{188}\text{Re}$  ( $T_{1/2} = 17,0$  h). S výjimkou syntetických radionuklidů  $^{211}\text{At}$ ,  $^{103}\text{Pd}$ ,  $^{90}\text{Y}$  a  $^{188}\text{Re}$  vznikají všechny ostatní uměle vytvořené radionuklidy ozářením a rozpadem svého prekursoru v jaderném reaktoru. Radionuklidy  $^{211}\text{At}$  a  $^{103}\text{Pd}$  jsou vytvářeny pomocí cyklotronu (Syed, 2017).

### ***Diagnostika***

Z diagnostického hlediska jsou vhodné radionuklidy s krátkou životností vyzařující gama záření. Nejčastěji jsou v radiodiagnostice využívané izotopy  $^{18}\text{F}$  ( $T_{1/2} = 110$  minut),  $^{99}\text{Tc}$  ( $T_{1/2} = 6$  h),  $^{123}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 13,2$  h),  $^{131}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 8,0$  d) a  $^{68}\text{Ga}$  ( $T_{1/2} = 68,3$  h; Syed, 2017). Pokud jde o dávku záření, k jejímu výpočtu je potřeba kompletní sada údajů rozpadového řádu. Při diagnostickém použití rentgenového záření, které je schopno produkovat jednotky až desítky MeV, je nutné, aby dávka IZ prostoupila maligní tkán v několika úhlech, a tak se zvýšil poměr dávky mezi nádorem a zdravou tkání (Behling, 2017).

Nukleární zobrazovací techniky jsou založeny na radioaktivním značení specifických molekulárních sond pomocí radioizotopů, díky čemuž mohou poskytnout pohled na morfologické funkční změny mnoha tkání a pozorovat specifické biochemické procesy v lidském těle. Použití přímého i nepřímého značení izotopů bifunkčními chelatačními činidly na bázi peptidů se používá pro zobrazení nádorových receptorů a jiných struktur se specifickou biologickou afinitou (Jeong *et al.*, 2016).

Vývoj nukleárních zobrazovacích sond vedl k vývoji molekulárních zobrazování technologií a to jedno-fotonové emisní výpočetní tomografie (SPECT) a pozitronové emisní tomografie (PET). Kombinovaný SPECT/CT je hybridní zobrazovací systém, který lokalizuje akumulované radionuklidy v lidských tkáních. Kombinovaná terapie a zobrazování SPECT/CT in vivo současně lokalizuje terapeutická léčiva, peptidy, geny nebo buňky prostřednictvím značených radionuklidů ale i fluorescenčním barvivem nebo kontrastními látkami (Jeong *et al.*, 2016).

### 1.1.2.2 Urychlovače částic

V současné době asi 2/3 pacientů s diagnostikovanou rakovinou podstupuje léčbu radioterapií. Většina těchto pacientů je léčena rentgenovým zářením, jehož zdrojem je rentgenka. Jedná se o trubici, ve které je vakuum a nejčastěji dvě elektrody. Mezi elektrodami je udržováno napětí, které urychluje elektrony uvolněné z katody. Jejich dopadem na wolframovou anodu vzniká pronikavé rentgenové záření. Napětí mezi elektrodami reguluje výslednou energii generovaného záření. Pro mamografii je vhodné tzv. měkké záření s energií okolo 16 keV, zatímco pro radiografii se používá tvrdší záření se 150 keV (Behling, 2017).

Další možností je ozařování proudem urychlených nabitých částic. Myšlenka terapeutického použití urychlených protonů byla původně navržena Robertem Wilsonem v roce 1946. Důvodem je příznivé rozložení distribuce ionizace podél dráhy nabitě částice, která ztrácí maximum své energie až těsně před koncem svého doletu. Celková absorbovaná dávka pacientem je tedy značně snížena použitím nabitých iontů, což sníží toxicitu léčby a umožňují eskalaci dávky do nádoru. Většina radiodiagnostických center používá protony nebo ionty  $^{12}\text{C}$ . Probíhá rovněž testování  $^4\text{He}$  a  $^{16}\text{O}$ , které jsou již v klinické fázi výzkumu. Urychlovače mohou být i zdrojem neutronů. Přes značné výhody částicové terapie, je jejich dosavadní aplikace stále omezena. Radioterapie částicemi je podstatně dražší než rentgenová léčba, kvůli investičním nákladům na pořízení technicky náročného zařízení (Durante *et al.*, 2019; Taheri a Pazirandeh, 2016).

Pouze cyklotronový urychlovač částic a jaderné reaktory s alespoň mírným tokem částic jsou schopny produkovat radionuklidy s tak dostatečně vysokou specifitou radioaktivity, aby jejich použití mělo praktický význam. Tyto dva způsoby syntézy se v praxi vzájemně doplňují, protože neprodukují izotopy stejného prvku. Zdrojem radionuklidů mohou být také systémových radionuklidových generátorů, ve kterých vznikají radionuklidy  $^{90}\text{Y}$  a  $^{188}\text{Re}$  (Dunn *et al.*, 2012).

### 1.1.2.3 Jaderné reaktory

Jaderné reaktory jsou pro lidstvo důležitým zdrojem energie a pro potřeby nukleární medicíny významným zdrojem radionuklidů. Mohou být ale také využity jako v rámci záchytne neutronové boronové radioterapie. Její princip spočívá v tom, že se pacientovi nejprve podá  $^{10}\text{B}$ . Ten je určitým způsobem upraven, aby byl preferenčně vychytáván nádorovými buňkami. Poté je ložisko ozářeno neutrony z jaderného reaktoru (nebo urychlovače). Z  $^{10}\text{B}$  vzniká  $^7\text{Li}$  a alfa částice působící na své blízké okolí. Tento druh terapie má zatím pouze experimentální charakter a jeho výsledky jsou vyhodnocovány (Moghaddasi a Bezak, 2018).

Jaderné reaktory na druhou stranu představují jedno z nejnebezpečnějších rizik pro člověka. Jak ukazují nehody ve Three Mile Island roku 1979, v Černobyli roku 1986 nebo Fukušimě 2011 může nekontrolovatelný únik radionuklidů mít závažné důsledky pro život ozářených jedinců nebo vést ke kontaminaci a ekologickému znehodnocení prostředí (Johnston, 2019).

### 1.1.3 Typy IZ

Ačkoliv má většina částic mikrosvěta duální částicově-vlnový charakter, z nomenklaturního hlediska jsou rozlišovány korpuskulární typ záření, jako jsou například nabitě částice alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) nebo neutrální neutrony ( $n^0$ ) a elektromagnetická (vlnová záření), které zastupuje gama ( $\gamma$ ) a rentgenové záření (X; Rana *et al.*, 2010).

#### 1.1.3.1 Částicové IZ

Alfa záření ( $\alpha$ ) tvoří masivní, nabitě částice, skládající se ze dvou protonů a neutronů, tedy jádra hélia. Vzhledem k jejich velikosti a náboji nemohou částice putovat příliš daleko. Ve vzduchu nedoletí dále než několik centimetrů a jsou zcela neschopné proniknout horními vrstvami epitelu pokožky nebo textilními látkami. Ve vnějším prostředí znamenají  $\alpha$  částice pouze zanedbatelné riziko. Problém však nastává, dojde-li k jejich akumulaci uvnitř tkání, kde některé vlivem dlouhého poločasu rozpadu setrvávají až několik let a mohou způsobit poškození přilehlých buněk. Svou omezenou schopností pronikat tkáněmi a potenciálním negativním dopadem mají  $\alpha$  částicové ionizační radioizotopy jen omezené terapeutické využití (Hagby *et al.*, 2009; Medalia, 2011).

Beta záření ( $\beta$ ) je popisováno jako rychle se pohybující elektrony. Elektrony mají negativní náboj a ve srovnání s alfa částicemi je jejich hmotnost 7 300 x menší. Vzhledem k jejich malé hmotnosti a menšímu náboji je méně pravděpodobné, že dojde k jejich interakci s hmotou a následné ztrátě jejich energie. Mohou proniknout až 1 cm do lidské tkáně, avšak zastavit je dokáže hliníkový plech o tloušťce několika milimetrů. Právě jejich schopnost proniknout hlouběji do měkké lidské tkáně jim dává přidanou hodnotu pro terapeutickou léčbu (Hart, 2006).

Neutronové záření ( $n^0$ ) zastupují částice s asi jednou čtvrtinou hmotnosti alfa částic. Neutrony jsou považovány za nepřímo ionizující částice. K nepřímé ionizaci dojde při zadržení neutronů uvnitř hmoty s následnou emitací gama záření anebo nabitých částic. Po emitaci dokáží putovat vzduchem, dokud nejsou absorbovány jinou látkou. Nejvyužívanějším zdrojem neutronů je jaderný reaktor (Simnad, 2001).

### 1.1.3.2 Elektromagnetické IZ

Uvolněná energie po rozpadu radioizotopu nebo zbrzdění nabitě částice v rentgenově přístroji se projeví v podobě gama, respektive rentgenových paprsků. Obě formy záření představují vysokoenergetické elektromagnetické vlnění, které se pohybují rychlostí světla na velké vzdálenosti a pronikají do různorodých materiálů. Na rozdíl od nabitých částic nepůsobí na hmotu, kterou ionizují, prostřednictvím svého pole. V ionizaci gama a rentgenového záření se uplatňují děje jako jsou fotoelektrický jev, Comptonův rozptyl a tvorba elektron-pozitronových párů (Dondelinger, 2012).

### 1.1.4 Účinky IZ

Účinky záření závisí na jednotlivých typech IZ, které svou energii přenáší na biologické tkáně. Lineární přenos energie (LET) je fyzikální veličina udávající hustotu přenesené energie na látku v dráze letu IZ. Je udávána v jednotkách kiloelektrovoltů na mikrometr [KeV/ $\mu\text{m}$ ]. Rentgenové paprsky, gama paprsky a beta částice jsou příklady řídké ionizujícího záření s nízkou hodnotou LET. Naopak neutrony, alfa částice a těžké ionty, patří mezi záření hustě ionizující záření s vysokou LET. Za účelem indukované smrti je hustě ionizující typ záření biologicky účinnější než řídké ionizující typ. Při zvolení stejné absorbované dávky u rozdílných druhů IZ se proto poškození tkáně hodnotí jeho relativní biologická účinnost (RBE; Vandersickel *et al.*, 2010; Scott, 2008; Kiang a Olabisi, 2019).

Absorpce IZ je charakterizována náhodnými interakcemi se složkami atomů nebo molekul v lidské tkáni. Dochází ke vzniku energetických depozičních drah, které jsou doprovázené produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS). V případě působení záření s nízkým LET dochází k ionizačním dějům v průběhu celé dráhy částic. U IZ s vysokým LET je distribuce ionizovaných molekul a ROS více heterogenní.

Vzniklé ROS jsou svými vlastnostmi podobné formám, které neustále vznikají během fyziologického oxidačního metabolismu. Při působení endogenních ROS vzniká denně asi  $1 \times 10^6$  DNA oxo-adtů v 1 buňce. Oproti tomu vlivem 1 mGy záření přírodního pozadí vzniká celkově v lidském těle  $5 \times 10^3$  defektů DNA za den. Indukované poškození DNA se úměrně zvyšuje s množstvím absorbované dávky. Buňky mají systémy, které umožňují reparaci i nejtěžších forem poškození DNA. Pokud ale tato reparace neproběhne správně, jejím následkem mohou být genetické změny, nebo buňka rozezná poškození jako neslučitelné se svojí fyziologickou funkcí a dojde k aktivaci apoptózy. Po ozáření buněk a tkání je potom výsledné poškození závislé nejen na prostorové distribuci zasažených buněk ale i na funkci

buněk jako celku. Biologická odezva organismu pak závisí na celkové dávce, jejím rozložení v těle a frekvenci expozice (Scott, 2008).

#### **1.1.4.1 Dělení biologických účinků**

Biologické účinky IZ jsou obecně děleny do dvou základních skupin a to na účinky stochastické a deterministické.

##### ***Stochastické účinky***

Na rozdíl od účinků deterministických se stochastické účinky objevují s časovým odstupem po expozici. Stochastické účinky se projeví jen na buňce, která byla ozářením sice modifikována, nikoli však usmrcena a následně mohla pokračovat ve svém buněčném cyklu. (Wild a Pitcher, 2001). Prahová dávka IZ není pro vznik stochastických účinků stanovena, a proto možné dopady v podobě rakovinného bujení a genetických změn nelze odlišit od jejich spontánního výskytu v populaci. Výskyt stochastických účinků je do určité míry na dávce IZ závislý. Dopady jsou ale hodnoceny pouze pravděpodobností výskytu změn, a nikoli potencionální závažností. Pravděpodobnost, že se po ozáření projeví poškození tkáně určitým způsobem, závisí na několika dalších radiologických faktorech, včetně LET.

Pro představu alfa částice, vzhledem k vysokému LET, poskytují za uraženou vzdálenost větší hustotu ionizační energie, než fotony či elektrony. Na jednotku absorbované dávky mají proto alfa částice vyšší pravděpodobnost poškození DNA a vyšší pravděpodobnost vzniku stochastických účinků. Pro zohlednění tohoto zásadního biologického vlivu se stanovil faktor radiační váhy ( $w_R$ ), aby se vzal v úvahu relativní účinek absorbované dávky, který lze pozorovat u různých typů IZ. Dalším důležitým faktorem je charakter ozařované tkáně. Odlišné tkáně obecně vykazují rozdílnou radiosenzitivitu z hlediska pravděpodobnosti vzniku stochastických účinků. Pro zohlednění tohoto jevu je pravděpodobnost výskytu stochastických účinků dále modifikována tkáňovým váhovým faktorem ( $w_T$ ). Jejich význam se projevuje hlavně v odvětví diagnostické nukleární medicíny, kde jsou dávky IZ obecně nízké. Stochastické účinky jsou také diskutovány v souvislosti s nízko-úrovňovými expozicemi, které se mohou vyskytovat v pracovním, diagnosticko-zdravotnickém nebo životním prostředí (Sgouros *et al.*, 2009; Chandna *et al.*, 2002).

##### ***Deterministické účinky***

Deterministické účinky jsou výsledkem takové expozice IZ, při které byl počet usmrcených buněk v tkáni natolik velký, že dojde ke ztrátě funkce orgánu či tkáně. Poškození

orgánu se neprojeví, pokud ozáření nedosáhne prahové hodnoty. Po jejím překročení dochází k projevení klinických symptomů, jejichž závažnost se zvyšuje se zvyšující se dávkou IZ (Wild a Pitcher, 2001). Prahová dávka je stanovena pro většinu onemocnění z ozáření. Již vystavení akutní dávce 1 Gy například vede k depresi kostní dřeně. Deterministické účinky často doprovází radioterapii. Ač je při ozařování z více směrů, frakcionací nebo použitím nabitých částic snaha selektivně ovlivnit nádorové onemocnění, dochází vždy k ozáření zdravé tkáně vysokými dávkami záření. S tím jsou také spojeny akutní a chronické nežádoucí účinky radioterapie (Petrinec *et al.*, 2019; Wild a Pitcher, 2001; De Ruysscher *et al.*, 2019).

#### **1.1.4.2 Akutní nemoc z ozáření**

Jedním z nejzávažnějších deterministických účinků je akutní radiační syndrom, též známý jako akutní nemoc z ozáření (ANO). ANO se objevuje po celotělovém ozáření nebo výrazném ozáření části těla dávkou vyšší než 1 Gy. Na dávky IZ jsou nejcitlivější buňky s vysokým replikačním potenciálem jako například buňky lymfohematopoetické řady nebo buňky střevních krypt. Právě na nich se akutní účinky z ozáření nejdříve projeví a podle radiosenzitivity buněk dojde k rozvoji klinických syndromů. V závislosti na absorbované dávce se příznaky ANO mohou projevit během dnů až týdnů od expozice IZ (Waselenko *et al.*, 2004).

Klinické složky ANO zahrnují hematopoetické, gastrointestinální a cerebrovaskulární syndromy (viz tabulka č.1). Každý syndrom může být rozdělen do 4 fází v pořadí prodromálního, latentního a manifestního období, následovaného rekonvalescencí nebo smrtí (Rojavin *et al.*, 2011).

#### **1.1.4.3 Fáze akutní nemoci z ozáření**

##### ***Prodromální fáze***

Prodromální fáze je nespecifická odezva organismu na ozáření. Prodromální fáze se obvykle projeví během prvních 48 hodin. Nejčastějšími symptomy jsou nevolnost, nechutenství, zvracení, únava, slabost, bolest hlavy a zvýšená teplota. Při vyšších potenciálně letálních dávkách nastupují průjmy, hypotenze, závratě, dezorientace, křeče a dochází k poruše vědomí (Dicarlo *et al.*, 2011).

Doba nástupu, intenzita symptomů a jejich skladba korelují s absorbovanou dávkou IZ. Pokud je dávka záření dostatečně nízká, pak prodromální fáze může nastat i bez pozdějšího nástupu manifestního období ANO (Siegel, 2009).



**Tabulka č. 1** Přehled dopadů ANO a možnosti jejich léčby (Bolus, 2001)

	Subklinické					
	rozmezí dávků	Rozmezí dávek s možností přežití			Letální rozpětí dávků	
<b>Akutní radiační dávka [Gy]</b>	0-1	1-2	2-6	6-10	10-50	50 a více
<b>Výskyt zvracení</b>	Žádné	5 % při 1 Gy, 50 % při 2 Gy	100 % při 3 Gy	100 %	100 %	100 %
<b>Doba nástupu zvracení</b>	-	3 hodiny	2 hodiny	1 hodina	do 30 minut	minuty
<b>Kritické období po expozici</b>	-	-	4-6 týdnů	4-6 týdnů	5-14 dní	1-14 dní
<b>Poškozený orgán</b>	Žádné	Kostní dřeň	Kostní dřeň	Kostní dřeň	GI trakt	CNS
<b>Zahájená léčba</b>	Celkový dohled	Hematologický a celkový dohled	Krevní transfúze, antibiotika, růstové faktory	Udržení homeostáze, nutnost zvážit transplantaci kostní dřeně	Infuzní terapie elektrolytů, symptomatická léčba	Sedativa, symptomatická léčba
<b>Cíl léčby</b>	Není nutný	Monitoring pacienta	Efektivní	Udržující léčba	Paliativní	Paliativní
<b>Prognóza</b>	Výborná	Výborná	Dobrá	Nejistá	Beznadějná	Beznadějná
<b>Incidence smrti</b>	Žádná	Žádná	0-80 %	80-100 %	100 %	100 %
<b>Příčina smrti</b>	-	-	Krvácení a infekce	Krvácení a infekce	Oběhový kolaps	Zástava dechu a edém mozku

### ***Latentní fáze***

V latentní fázi se symptomy zmírní nebo zcela vymizí. Délka trvání latentní fáze závisí především na velikosti dávky radiace. Po velmi vysoké expozici nemusí tato fáze nastat a prodromální období přejde volně ve fázi manifestní (Rojavin *et al.*, 2011).

### ***Manifestní fáze***

Manifestní fáze je charakterizována zjevnými symptomy ANO. V závislosti na absorbované dávce záření se manifestní fáze v různých orgánech/soustavách projeví jako syndrom hematopoetického systému, gastrointestinálního traktu, neurovaskulárního systému a/nebo kůže. Tato fáze může přetrvávat několik týdnů a může být obtížně zvládnutelná. V závislosti na dávce ozáření a kvalitě lékařského ošetření může pacient přežít nebo zemřít (Rojavin *et al.*, 2011).

#### **1.1.4.4 Syndromy akutní nemoci z ozáření**

##### ***Hematopoetický syndrom***

Hematopoetický syndrom je první orgánově specifický projev ANO, což je způsobeno vysokou radiosenzitivitou hematopoetického systému a citlivostí některých jeho složek. I u asymptomatických pacientů může expozice IZ způsobit změny v počtu buněk krevní řady. Kompletní selhání hematopoetického systému ale vyžaduje celoplošné ozáření a nevratné poškození dostatečného množství hematopoetických kmenových buněk tohoto systému (Dörr a Meinekke, 2011).

Prodromální fáze bývá u tohoto syndromu nejčastěji charakterizována nechutenstvím, nevolností, zvracením a letargií během 1 až 12 hodin po expozici, přičemž symptomy ustupují během 36 – 48 hodin. Po počátečních symptomech nastupuje bezpříznakové období, přičemž si postižený pacient může stěžovat na únavu. Prvním příznakem manifestace hematopoetického syndromu ANO je lymfopenie, následovaná neutropenií a trombocytopenií. Produkce buněk nezbytných pro zachování funkce imunitního systému se snižuje až do celkové pancytopenie. Zastavení ústupu kostní dřeně vyžaduje kvalitní léčbu, jako je substituce krevních elementů, podání kolonie stimulujících faktorů (CSF) a nasazení antibiotik proti případným infekcím (Skorga *et al.*, 2003).

##### ***Gastrointestinální syndrom***

Gastrointestinální trakt je poměrně citlivý na účinky IZ, a proto je gastrointestinální syndrom indukovaný radiací hlavní překážkou v radioterapii. Nejcitlivějším buňkami střevní sliznice jsou kmenové a progenitorové buňky nacházející se v Lieberkühnových kryptách. Pro identifikaci kmenových buněk lze použít několik ukazatelů, jako jsou například Bmi1, HopX, mTert, Lrig1 a Lgr5, z nichž pouze Lgr5+ kmenové buňky se nacházejí uvnitř sloupcovité základny krypty mezi Panetovými buňkami. Kmenové buňky Lgr5+ se dělí jednou za 14 dní,

díky čemuž je zajištěn přísun progenitorových buněk. Progenitory představují amplifikační kompartment krypt. Tyto buňky se rychle množí a generují diferencované buňky střeva, včetně Panetových buněk, které migrují do základny krypty, enterocytů, pohárkových a enteroendokrinních buněk, jež naopak migrují do klků a odlupují se do střevního lumen. Tento cyklus obnovy epitelových buněk trvá 3–5 dnů a vyskytuje se během celého průběhu dospělého života. Replikační potenciál a buněčný obrat střevní sliznice je vysoký, což z ní činí užitečný model při studiu reparačních mechanismů po ozáření (Gurley *et al.*, 2017).

Při gastrointestinálním syndromu dochází nejprve k úbytku kmenových a progenitorových buněk, což následně naruší přísun buněk do klků. Sliznice na tyto změny reaguje oploštěním buněk a zkrácením délky klků a krypt. Přežití pacientů závisí na rychlosti odumírání viabilních krypt a počtu reziduálních buněk, schopných regenerovat klky. Pokud je ztráta viabilních krypt vysoká, dochází k narušení slizniční bariéry. Do organismu se vstřebávají bakterie a toxiny ze střeva, a naopak unikají tekutiny. Gastrointestinální syndrom ANO se nejčastěji objevuje po ozáření dávkami vyššími než 6 Gy. V rozmezí dávek přibližně 6 – 8 Gy nastane po intenzivní prodromální fázi latentní období, které trvá 2 – 5 dnů. Poté následuje subakutní fáze v podobě průjmu a gastrointestinálního krvácení. Při dávce  $\geq 8 - 10$  Gy se gastrointestinální forma ANO již rozvine plně. Po období latence v tomto případě jsou přítomny přetrvávající průjmy, krev ve stolici, dehydratace a sepse. Při těchto dávkách IZ dochází k úmrtí pacientů během 2 týdnů po expozici (Ajakaiye *et al.*, 2012; Saha *et al.*, 2012).

### ***Neurovaskulární syndrom***

Neurovaskulárního syndromu se rozvíjí po ozáření vyššími než 25 – 30 Gy. Po ozáření takto vysokým dávkám dochází v rámci prodromální fáze rychle k rozvoji vysoké teploty ( $> 40$  °C), prostrace, ataxie, záchvatů křečí, dezorientace a hypotenzi. Takové symptomy sami predikují, že byl organismus exponován již smrtelné dávce záření. Období latence je krátké v rozsahu několika hodin. Patofyziologické procesy pak přispívají k neurovaskulárnímu kolapsu, včetně vaskulárního poškození, zánětu, edému mozku, zvýšené vaskulární permeability a perivaskulárního krvácení. Tyto změny se projevují těžkou šokovým stavem a imobilitou postupující ke kómatu. Stav obvykle během 24 až 48 hodin končí smrtí pacienta (Dainiak *et al.*, 2011).

### ***Kožní syndrom***

Kožní radiační syndrom ANO je termín používaný pro změny indukované v kůži ozářených jedinců. Stupeň poškození kůže způsobeného radiací závisí na typu a dávce (viz tabulka č. 2). Při vysokých dávkách může IZ v podstatě narušit strukturu kůže a její ochrannou funkci jako bariéry (Gerber *et al.*, 2015).

Akutní reakce začínají prodromy v podobě erytému a otoku. Poté následuje fáze latence. I zde intenzita prodromů a délka prodromální a latentní fáze korelují s dávkou IZ. Vlastní manifestace kožní formy ANO začíná během 1 – 4 týdnů po ozáření. Závažnost onemocnění může být rozdělena na stupnici 1 – 4 podle National Cancer Institutu. Změny stupně 1 zahrnují suchou deskvamaci s generalizovaným erytémem. Může nastat i pruritus, epilace, šupinatění a lokalizovaná depigmentace. Se stupněm 2 propukne prudký erytém nebo lokalizované ohnisko odlupující se epidermis. Přesáhne-li kumulativní dávka při radioterapii hodnotu 20 Gy, vyvinou se vlhké deskvamace v kožních záhybech. Při vlhké deskvamaci se epidermální vrstva ztrácí a hrozí riziko mikrobiální infekce. Stupeň 3 zobrazuje rozsáhlou vlhkou deskvamaci i mimo kožní záhyby. U stupně 4 nastupují ulcerace, krvácení a v některých případech i nekróza tkáně, která vede k ulceraci.

Pokud se akutní radiační dermatitis vyvine v rámci radioterapie, nastává začíná během 10 dnů obvykle reepitelizace. V závislosti na dávce se ale může doba obnovy epitelu prodloužit. Akutní radiační dermatitida se většinou plně zhojí nebo má jen mírné trvalé následky. Nejčastěji bývá popisováno přechodné vypadávání vlasů až jejich trvalá ztráta (Bray *et al.*, 2016).

**Tabulka č. 2** Klinické kožní projevy ANO (Bray *et al.*, 2016)

<b>Pozorované akutní reakce kůže</b>	<b>Radiační dávka (Gy)</b>	<b>Nástup projevů</b>
Přechodný erytém	2	Několik hodin
Slabý erytém a epilace	6–10	7–10 dní
Lokalizovaný erytém a hyperpigmentace	12–20	2–3 týdny
Suchá deskvamace	20–25	3–4 týdny
Vlhká deskvamace	30–40	4 a více týdnů
Ulcerace a fibróza	40 a více	6 a více týdnů

### ***Pozdní změny***

Pokud jedinec přežije akutní období, stále je jeho organismus ohrožen možnostmi rozvoje pozdních následků ozáření. Měsíce po expozici vykazují plíce a ledviny v důsledku akutního zánětu změny, které mohou vést k funkčnímu selhání. Nebezpečné jsou zejména stavy spojené s multiorgánovou dysfunkcí (Nyberg *et al.*, 2001). Rizikem jsou také chronické záněty spojované s rozvojem fibrózy nebo nekróz.

Kromě výše uvedených, se mohou vyskytnout i jiná poranění a latentní účinky. V případě internalizovaných radionuklidů může docházet ke specifickému poškození orgánů, uvnitř kterých se radionuklid akumuloval. Například radionuklidy, jako jsou nerozpustné Pu a Am, dokáží po inhalační expozici ještě dlouhou dobu setrvat v plicích a následně se hromadit v kostech. Mohou významně narušit fyziologii plicní tkáně, vyvolat akutní pneumonitis nebo fibrózu a narušit funkci kostní dřeně, čímž se zhorší hematopoetické funkce. Pozdní účinky, které mohou být výsledkem radiační expozice, zahrnují rovněž tvorbu šedého zákalu (Nyberg *et al.*, 2001).

### ***Psychologický dopad***

Intenzivní stresové situace vedou k neuropsychologickým změnám. U osob vystavených například jadernému výbuchu, prokázala psychologická analýza přímou souvislost se vznikem posttraumatického stresové poruchy (PTSD) nebo akutní stresové poruchy (ASD). Pacient s diagnostikovanou PTSD prožil traumatizující zážitek, který zahrnoval reálné riziko smrti anebo nebezpečí vážného poranění. Reakce jedince zahrnuje intenzivní strach, bezmoc a paniku. U těchto pacientů je dlouhodobě pozorován deficit paměti, pozornosti a poruchy sensor-motorických činností. Psychické trauma se pacientovi neustále vrací v podobě opakujících se rušivých úzkostných vzpomínek nebo snů. Hypervigilance a podrážděnost nepřestávají i přes snahu jednotlivců se vyhnout podnětům související s událostí. Reakce na oběti radiační nehody ze strany veřejnosti či dokonce nepřipraveného zdravotnického personálu je často intenzivní ostrakismus z obavy kontaminace, který zhoršuje následky psychologického dopadu (Landauer, 2002).

#### **1.1.4.5 Terapie akutní nemoci z ozáření**

V případě kombinovaných i základních radiačních poranění zůstává krevní transfuze, podání elektrolytů a tekutin, pobyt v aseptickém prostředí, selektivní dekontaminaci střev, antibiotická a antivirotická léčba, stále základem lékařského ošetření. Terapie ve formě pleiotropních nebo tkáňově specifických cytokinů tvoří první stupeň ochrany schopnou

předcházet nebo snižovat dopady ANO. Tato léčba následuje po ztrátě kmenových a progenitorových buněk následkem celotělového záření organismu dávkami 3 – 7 Gy. Podání hematopoetických růstových faktorů zmírňuje aplázii kostní dřeně a urychluje rekovalescenci (Hérodin *et al.*, 2005a; Reeves, 2010).

### ***Cytokiny***

Po expozici IZ lze pro zmírnění nebo eliminaci dopadů ANO na lidský organismus využít účinky mnoha cytokinů. Ty lze aplikovat před ozáření jako radioprotektiva nebo po expozici. V tomto případě jsou označovány jako radiomitigátory. Postup léčby zahrnuje kombinaci dvou nebo více farmak s cílem snížit jejich toxicitu při současném zachování nebo dokonce zlepšení celkového terapeutického výsledku. Přehled cytokinů nebo látek, které mohou produkci cytokinů nepřímo stimulovat je uveden v tabulce č. 3 (Hofer *et al.*, 2017).

### ***Terapie s využitím kmenových buněk***

Po ozáření vysokými dávkami záření, kdy je kostní dřeň ireverzibilně poškozena, je nutné přistoupit k alogenní transplantaci. Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk využívá buněk pocházejících z kostní dřeně, mobilizovaných periferních krevních buněk nebo buněk z pupečnickové krve. Transplantace může probíhat bez nebo s předběžným stupněm selekce buněk. Další možností je *ex vivo* stimulace kmenových a progenitorových buněk pomocí cytokinů. Průběh rekonvalescence po transplantaci se odvíjí od stupně histokompatibility štěpu a kombinace radiační toxicity. Nekompatibility štěpu by hypoteticky bylo možné obejít autologní transplantací. Zdrojem hematopoetických kmenových se při ní mohou stát kmenové buňky pocházejících z různých tkání, jako jsou játra nebo kosterní svalstvo. Ostatní mesenchymální kmenové buňky, jako například endoteliální buňky, by mohly být použity při léčbě poškození nehematopoetických orgánů (Hérodin *et al.*, 2005b).

### ***Terapie mezenchymálními kmenovými buňkami***

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní buňky se širokým uplatněním v lékařství. Mezi jejich biologicky významné funkce patří migrace s modulací chemotaxe dalších buněk, minimální reakce imunitním systémem a větší odolnost vůči IZ oproti hematopoetickým kmenovým buňkám. V závislosti na chemotaktických signálech, vstupují transplantované MSC do krevního oběhu a migrují do místa poškození. Infundované buňky napodobují reziduální pacientovi MSC, čímž zmírňují zánět, modulují alogenní imunitní odpověď a tvorbou řady cytokinů stimulují hematopoézu. MSC mají schopnost se diferencovat

do mnoha typů buněčných linií, včetně těch, které se nacházejí v nervovém systému, kůži, kostech, tuku, chrupavce, šlachách, srdečných a kosterních svalech a epitelu plic, střev či ledvin (Fukumoto, 2016).

### ***Terapie gastrointestinální formy akutní nemoci z ozáření***

Nejnovější pokrok v léčbě gastrointestinální formy ANO se ubírá směrem selektivní ochrany kmenových buněk střevní sliznice. Cílem je s využitím farmak potlačit apoptózu těchto buněk buďto inhibicí proteinu p53 nebo aktivací NF- $\kappa$ B. Další navržený přístup je založen na použití farmakologických inhibitorů cyklin-dependentních kináz (cdk). Princip zahrnuje indukci reverzibilního zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/S, po kterém následuje přeměna fyziologického stavu buňky na radiorezistentní stav (Saha *et al.*, 2012). Svoji roli by mohly sehrávat i MSC. Tyto buňky již byly použity v léčbě radiační kolitis u pacientů po radioterapii nádorů prostaty, u kterých došlo ke zmírnění bolesti, průjmu, krvácení, zánětu a fistulizace (Voswinkel *et al.*, 2013). Tyto buňky u zvířecích modelů rovněž podporují regeneraci buněk krypt, obnovu niche kmenových buněk a absorpční funkce střeva (Saha *et al.*, 2011; Fukumoto, 2016). Významné postavení mají také růstové faktory. Bylo prokázáno, že interleukin-11 nebo epidermální růstový faktor (EGF), mohou podporovat proliferaci kmenových buněk uvnitř střevních krypt (Saha *et al.*, 2011; Pejchal *et al.*, 2015). Další adeptem je také keratinocytární růstový faktor (Hérodin, 2005).

Tento růstový faktor je v popředí zájmu stávající diplomové práce. Do jaké míry tento růstový faktor a v jakých dávkových umožňuje mitigovat poškození střevní sliznice, není známo.

**Tabulka č. 3** Stručný přehled testovaných látek ve farmakologické kombinaci při léčbě ANO (Hofer *et al.*, 2017).

Látka/skupina látek	Hlavní účinky
Adenosin monofosfát	Stimulátor proliferace hematopoetických buněk
Alfa lipoidní kyselina	Antioxidant
AMD3100	Ovlivňuje migraci hematopoetických buněk
$\beta$ -glukan	Imunomodulátor, stimulátor hematopoézy
Captopril	Vasodilatátor
Erythropoetin (EPO)	Hematopoetický růstový faktor, stimulátor hematopoézy
Inhibitor glykogen syntetizující kinázy 3 (GSK-3)	Regulátor apoptózy
Granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF)	Hematopoetický růstový faktor, stimulátor hematopoézy
Granulocytární makrofágy stimulující faktor (GM-CSF)	Hematopoetický růstový faktor, stimulátor hematopoézy
Interleukin 1 (IL-1)	Cytokin, regulátor imunitní odpovědi, zánětu a hematopoézy
Interleukin 3 (IL-3)	Cytokin, regulátor produkce makrofágů a granulocytů
Interleukin 6 (IL-6)	Cytokin, stimulátor myelopoézy
Interleukin 11 (IL-11)	Cytokin, stimulátor hematopoézy a lymfopoézy
Růstový faktor megakaryocytu (MGDF)	Hematopoetický růstový faktor, stimulátor trombopoézy
Metformin	Antioxidant, modulátor syntézy buněk
Peptidoglykan	Imunomodulátor, stimulátor hematopoézy
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Modulátor proliferace hematopoetických buněk, protektor intestinální tkáně
Faktor kmenových buněk (SCF)	Hematopoetický růstový faktor
Faktor odvozených od stromálních buněk (SDF-1)	Chemokin, ovlivňuje migraci hematopoetických buněk
Trombopoetin (TPO)	Hematopoetický růstový faktor, stimulátor trombopoézy
Tumor nekrotizující faktor (TNF)	Modulátor zánětu
Vitamín E	Antioxidant



## 1.2 Keratinocytární růstový faktor

### 1.2.1 Struktura

KGF, také zvaný jako FGF-7, je specifický růstový faktor epitelálních buněk. KGF se skládá ze 194 aminokyselin a jeho velikost je 21 kDa. Je sekretován z fibroblastů a exprimován in vivo v dermis. Produkují ho také mezenchymální buňky v blízkosti epitelu mnoha orgánů, a to epidermis, výstelky dutiny ústní a gastrointestinálního epitelu, pankreatu, jater, plic, urotelia či prostatického epitelu. Poprvé byl identifikován roku 1989 v kondiciovaném médiu buněčné linie lidských embryonálních plicních fibroblastů jako monomerní protein (MacDonald *et al.*, 2002; Swedish Orphan Biovitrum AB, 2012).

KGF je řazen do rodiny skupině fibroblastových růstových faktorů (FGF). Tato klasifikace je podmíněna 30 – 45% podobností genetické sekvence kódující karboxylový konec s ostatními bílkovinami v této rodině (MacDonald *et al.*, 2002). FGF zahrnují skupinu strukturně příbuzných polypeptidických mitogenů, která se u obratlovců skládají z 22 členů. Všechny tyto faktory mají vysokou afinitu k heparinu i heparansulfátovým proteoglykanům a vyžadují heparansulfát k aktivaci jednoho ze čtyř transmembránových receptorů (FGFR1 – FGFR4), které zprostředkovávají jejich biologické účinky (Ulrich *et al.*, 2004). KGF působí nejen jako silný mitogen pro primární lidské keratinocyty, ale také podporuje buněčnou diferenciaci a chrání buňky před indukovanou apoptózou. Je zapojen do hojení ran in vivo, stimuluje migraci keratinocytů a indukuje reorganizaci aktinového cytoskeletu, čímž se zvyšuje motilita epitelálních buněk (Rotolo *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Receptory

Funkce KGF je zprostředkována jeho interakcí s receptorem keratinocytového růstového faktoru (KGFR/FGFR2). FGFR2 je protein ze skupiny tyrosinkinás. Jeho mRNA podléhá alternativnímu sestřihu vedoucímu k tvorbě dvou isoform, FGFR2-IIIb a FGFR2-IIIc (Ishibashi, 1998). Obě varianty vznikají alternativním sestřihem exonů 7, 8 a 9 a odlišují se v druhé polovině třetí domény, strukturně podobné imunoglobulinům, což zásadně ovlivňuje specifitu receptorů vůči ligandům. FGFR2-IIIb je exprimován v epitelálních buněčných liniích, a kromě KGF vykazuje rovněž afinitu FGF-10 a FGF-22 a v omezené míře i vůči FGF-1, FGF-3. Isoforma FGFR2-IIIc je produkována mezenchymálními i jinými neepitelálními buňkami a je receptorem FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-8, FGF-9, FGF-16, FGF-17, FGF-18, FGF-20, FGF-21 a FGF-23 (Keller *et al.*, 2004; Rotolo *et al.*, 2008;

Heinzle *et al.*, 2012). Isoforma FGFR2-IIIb podléhá dalšímu alternativnímu sestřihu, ke kterému dochází v sekvenci kódující intracytoplazmatický karboxylový konec. Existují tři varianty. Nejdelší je varianta C1, varianty C2 a C3 jsou oproti ní o 34, respektive 53 aminokyselin kratší. Tyto sekvenční rozdíly vedou k retenci tyrosinových zbytků, které mohou sloužit jako místa pro autofosforylaci receptoru KGFR a jako vazebná místa cytoplazmatických signálních proteinů. Například isoforma FGFR2 IIIb-C3 jako jediná neobsahuje vazebné místo pro signální fosfolipasu Cy (PLCy; Matsuda *et al.*, 2012).

### **1.2.3 Signální dráhy**

Vazbou KGF na FGFR2 dochází k autofosforylaci cytoplasmatické domény receptoru, a tím k aktivaci četných signálních drah. V souvislosti s KGF nebo FGFR2 bývá často spojována PLC, signální dráhy spojené s extracelulárním signálem regulovanými kinasami (ERK) nebo proteinovou kinasou B (Akt; Braun *et al.*, 2006). Jejich prostřednictvím je stimulována buněčná proliferace, je regulována reparace DNA, posilovány antioxidační mechanismy, a naopak je inhibován apoptotický účinek (Everett a Curiel, 2015).

### **1.2.4 Funkce KGF v radiobiologicky významných epiteliálních tkáních**

#### **1.2.4.1 Střevní sliznice**

Ve střevě se KGFR nachází na bazolaterální membráně diferencovaných enterocytů a buněk krypt (Yang *et al.*, 2002). KGF je exprimován T-lymfocyty disponujícími  $\gamma$  a  $\sigma$  receptory ( $\gamma\sigma$ T) ve slizniční vrstvě. KGF se podílí na regeneraci a změně morfologie epiteliální tkáně. Intestinální sliznice u transgenních myší postrádajících  $\gamma\delta$ T buňky vykazuje sníženou míru proliferace a abnormální diferenciaci, což může být způsobeno nedostatkem produkovaného KGF  $\gamma\delta$ T buňkami. Na druhou stranu je regulace růstu a diferenciaci gastrointestinálních buněk je komplexní děj ovlivněný mnoha faktory, včetně epidermálního růstového faktoru, růstového faktoru podobného inzulinu či glukagonu (Witherden *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001).

KGF funguje jako mitogenní růstový faktor střevních buněk. Tento účinek je zprostředkován převládající expresí KGF receptoru. KGF mRNA i jeho receptoru je přítomna v celé sliznici gastrointestinálního traktu u hlodavců i u člověka (Yang *et al.*, 2002). Zvýšená exprese KGFR je přímo úměrná zvýšené proliferaci epitelových buněk a výšce jednotlivých klků. Na provedené studii se po podání rekombinantního KGF u potkanů, kteří hladověli nebo měli nízké hladiny lumenální výživy, signifikantně zvýšila exprese mRNA KGFR v tenkém

střevě, jež korelovala s proliferací buněk. Zdá se tedy, že stimulace KGFR rozhoduje o mitogenní adaptaci střev. KGF také výrazně zvyšuje hladiny glutathionu (GSH) a antioxidační kapacitu GSH ve sliznici tenkého střeva (Yang *et al.*, 2002).

Expres KGF mRNA a KGF je zvýšena v oblasti lamina propria tenkého a tlustého střeva u pacientů s ulcerativní kolitidou a Crohnovou chorobou. Jeho exprese KGF zde koreluje se stupněm zánětu sliznice a odráží tak snahu sliznice regenerovat (Estivariz *et al.*, 2000). Vliv KGF na ovlivnění střevního zánětu byl studován zejména na myších modelech po aplikaci dextran sulfátu sodného (DSS). Tato látka ve střevní sliznici indukuje eroze, vředy, zánětlivý infiltrát a otok. Transgenních myší postrádajících  $\gamma\delta$ T lymfocyty trpí po podání DSS vyšší úrovní intestinálního zánětu a pozdní regenerací střevního epitelu (Keller *et al.*, 2004). Naopak u zvířat, kterým byl profylakticky podán KGF v dávce 5 – 10 mg/kg, došlo k výraznému zmírnění strukturálního poškození a zmírnění zánětu (Miceli *et al.*, 1999). Pokud začal být KGF podán až 4. den po indukci kolitis, 7. den došlo k snížení ztráty váhy a 12. den začala zvířata dokonce na váze přibývat (Egger *et al.*, 1999). Bylo rovněž pozorováno zlepšení funkcí nervového systému střeva (Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2003).

Ve vztahu k ionizujícímu záření byly účinky KGF studovány po celotělovém ozáření myší kmene C3H/SPF. KGF aplikovaný v dávce 1 mg/kg podaný intravenózně 3 po sobě následující dny (2 a 1 den před ozářením a 2 h po ozáření) zvýšil počet přežívajících krypt v duodenu, jejunu i ileu. Podobné výsledky byly pozorovány i po subkutánní aplikaci. KGF rovněž mírnil poškození navozené frakcionovaným režimem zaměřeným na oblast dutiny břišní (Khan *et al.*, 1997).

Ve vztahu k ionizujícímu záření byly účinky KGF studovány po celotělovém ozáření myší kmene C3H/SPF. KGF aplikovaný v dávce 1 mg/kg podaný intravenózně 3 po sobě následující dny (2 a 1 den před ozářením a 2 h po ozáření) zvýšil počet přežívajících krypt v duodenu, jejunu i ileu 4 den po celotělovém ozáření dávkou 12 Gy. Podobné výsledky byly pozorovány i po subkutánní aplikaci. KGF rovněž mírnil poškození navozené frakcionovaným režimem zaměřeným na oblast dutiny břišní (Khan *et al.*, 1997). Jako radioprotektivum byl KGF použit i v další studii. Farrel *et al.* (1998) aplikoval KGF v dávce 5 mg/kg myším kmene BDF<sub>1</sub> (2, 1 a 0 den) před celotělovým ozářením 12 Gy v kombinaci s transplantací kostní dřeně. U tohoto modelu došlo i signifikantnímu ovlivnění přežití stran gastrointestinální formy ANO.

#### 1.2.4.2 Plíce

V plicní tkáni je KGF produkován fibroblasty a hladkými svalovými buňkami cév. Interaguje se receptory, které jsou na povrchu alveolární pneumocytů II typu (APII) (King *et al.*, 2016). Za fyziologických podmínek se KGF účastní vývoje i zachování fyziologické funkce plic. V průběhu vývoje musí být exprese KGF pevně regulována. Transgenní myši se zvýšenou kontinuální produkcí KGF předčasně umírají z důvodu papilárních cystadenomů a zvětšení bronchiálního prostoru. Na druhou stranu transgenní myši s chybějícím FGFR2 umírají již v průběhu embryonálního vývoje kvůli zástavě větvení plicního stromu (Ray *et al.*, 2005). V postnatálním období fyziologická role souvisí s aktivací transkripčních faktorů, které regulují funkci lipogenních enzymů, jejichž prostřednictvím stimuluje syntézu mastných kyselin a fosfolipidů u APII. Celý proces lipogeneze je nezbytný pro syntézu surfaktantu (King *et al.*, 2016).

APII mají rovněž úzký vztah k regeneraci poškození. Tyto sice tvoří 60 % alveolárního epitelu, pokrývají však pouze 5 % povrchu. Zbývajících 95 % pokrývají alveolární pneumocyty I typu (API). Prakticky při všech typech poranění plic nastává hyperplázie APII a jejich diferenciaci směrem k API. APII lze tedy vnímat jako progenitory a buňky udržující homeostázu prostřednictvím obnovy epitelu (Wu *et al.*, 2012). Účinkem KGF na APII lze také vysvětlit jeho ochranné účinky. KGF stimuluje proliferaci, migraci i adhezi APII (King *et al.*, 2016). Při profylaktickém podání snižoval tento růstový faktor míru poškození indukovanou například hyperoxií, chemoterapií (bleomycinem), kyselinami nebo bakteriemi (Geiser, 2003; Portnoy *et al.*, 2014). Svoji roli při ochraně plicního parenchymu nicméně může sehrávat i přítomnost KGFR na povrchu alveolárních makrofágů. Jejich aktivací se snižuje jejich apoptóza a stoupá bakteriální clearance při pneumonii (Lee *et al.*, 2013).

KGF také vykazuje ochranné účinky vůči IZ. Brizel *et al.* (1996) podali 5 mg/kg KGF potkanům kmene Lewis/SPF intratracheálně ve 2 dávkách 72 a 48 h před oboustranným ozářením hrudníku dávkou 18 Gy. Ačkoliv u tohoto modelu nebyl pozorován vliv na mortalitu, došlo k významnému snížení rozsahu akutní pneumonitis a fibrotických změn 80 dní po ozáření. Chen *et al.* (2004) naopak aplikovali 5 a 15 mg/kg KGF potkanům kmene Fisher 10 min po dokončení frakcionovaného ozáření hrudníku 40 Gy (5 frakcí/5 dní). Zatímco obě dvě dávky KGF od 6. týdne snižovaly dechovou frekvenci ozářených zvířat, vliv na míru fibrotických změn v 6ti měsíčním intervalu byla zaznamenána pouze u vyšší dávky růstového faktoru.

### 1.2.4.3 Kůže

V kůži jsou hlavním zdrojem KGF v kůži jsou fibroblasty dermis. Minoritní úlohu zde sehrávají i  $\gamma\delta$ T-lymfocyty. Receptory FGFR2 jsou exprimovány na povrchu keratinocytů a melanocytů. Vzhledem k důležitosti KGF pro vývoj plic byly transgenní modely myší designovány pouze za účelem změny exprese KGF nebo jeho receptoru pouze na úrovni pokožky. Nadměrná exprese KGF u těchto modelů vyvolala hyperproliferaci keratinocytů a zbytnění epidermis. Vyřazení genu pro KGF vážné biologické dopady nevyvolalo. Srst myší, zejména samců, se jevila matně a mastně. Role KGF v pokožce je tedy do značné míry zastupitelná jinými růstovými faktory. Pokud byl však vyřazen gen pro KGFR2 byly přítomny výrazné změny, včetně atrofických změn, desorganizace a snížení míry proliferace keratinocytů, abnormality morfologie vlasových folikulů a úbytek ochlupení o 60 – 80 % (Werner, 1998). Tato zvířata rovněž trpí opožděným hojením kožních defektů (Keller *et al.*, 2004).

KGF je tedy spojována s hojením ran. Ačkoliv po poranění dochází pouze k minoritním změnám exprese receptorů, transkripce KGF mRNA v granulační tkáni roste více než 150ti násobně (Keller *et al.*, 2004). Účinek aplikace KGF na regeneraci poranění pokožky byl testován například při hojení popálenin u prasečího modelu. Ačkoliv KGF zvyšoval rychlost reepitelizace, celkový efekt nebyl příliš vysoký (Finch a Rubin, 2004). Podkožní podání tohoto růstový na druhou stranu přispívá k ochraně pokožky před UV zářením. Tento účinek není způsoben anti-apoptotickou aktivitou, ale syntézou nových proteinů (Braun *et al.*, 2006). Vzhledem k významu melaninu při ochraně kůže před účinky UV paprsků, svoji roli by zde mohl sehrávat vliv KGF na melanocyty. Jejich stimulací dochází k přesunu melanosomů směrem ke keratinocytům a ty jsou následně fagocytovány (Guo *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2003).

Co se týče ionizujícího záření, byla nalezena pouze jediná studie demonstrující vliv KGF na přežití a regeneraci vlasových folikulů u myší kmene BDF1. KGF byl podán podkožně v dávce 12,5 – 125  $\mu\text{g}/\text{myš}$  (Booth a Potten, 2000).

### 1.2.5 Rekombinantní forma KGF

Klinicky dostupnou formou KGF je palifermin. palifermin je produkován pomocí bakteriální expresního systému s využitím DNA rekombinantní technologie. Oproti endogennímu KGF je u něj odstranění prvních 23 N-terminálních aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je pouze 16,3 kDa. Palifermin se specificky váže na FGFR2b a exprimován v mnoha tkáních (Rzepecki *et al.*, 2009).

Palifermin má několik biologických funkcí, které převážně chrání epitelovou vrstvu sliznice a podporují její časnou regeneraci po poškození způsobeném ozářením a chemoterapií. Patří mezi ně inhibice apoptózy epitelových buněk, inhibice poškození DNA, vyšší produkce detoxikačních enzymů a snížení exprese prozánětlivých cytokinů. Dále podporuje migraci, proliferaci a diferenciaci epitelových buněk (Blijlevens a Sonis, 2007).

Palifermin je indikován u pacientů s hematologickými malignitami, kteří podstupují myeloablační léčbu s navazující transplantací hematopoetických kmenových buněk. U těchto pacientů snižuje výskyt, závažnost a trvání orální mukositivity (Blijlevens a Sonis, 2007). Další potenciální aplikace jsou zkoumány (Ellison *et al.*, 2011). V klinické praxi se nicméně palifermin aplikuje spíše výjimečně.

Z části je to způsobeno denním parenterálním podáváním léku. Prevence poškození a regenerace tkání je totiž závislá na správně načasovaném terapeutických dávek. Účinky při načasování paliferminu vůči terapii mohou být obecně rozděleny do tří kategorií. Pokud je podán před chemoterapií či ozářením dominují cytoprotektivními mechanismy zahrnující indukci detoxikačních enzymů a anti-apoptických faktorů. Při aplikaci jak před, tak bezprostředně po ozáření je modulován přirozený profil cytokinů, který posune rovnováhu směrem k protizánětlivému Th<sub>2</sub> profilu. Pokud je palifermin podán před, anebo bezprostředně po chemoradioterapii, je podporována regenerace tkáně stimulací proliferace, migrace, rozšíření a tvorbě těsných buněčných spojení (Kelly, 2009).

Dalším rizikem jeho aplikace při léčbě solidních epitelových malignit je skutečnost, že tato modifikovaná forma KGF může svým anti-apoptickým účinkem chránit nejen přirozený epitel, ale i nádor. U malignit, kde je velmi nízká exprese mRNA KGFR nebo je endogenní exprese tohoto faktoru činí nezávislé na exogenní podání KGF, může být dosaženo určité selektivity jeho působení směrem ke zdravým tkáním (Hille *et al.*, 2010).

## 2 Cíle diplomové práce

- a) Vyhodnotit vliv růstového faktoru KGF na přežívání myši C57Bl/6J po jednorázovém celotělovém ozáření při krytí hlavy dávkami 14, 15 a 16 Gy.
- b) Vyhodnotit vliv růstového faktoru KGF na poškození jednotlivých částí střevní sliznice (duodenum, jejunum, ileum a colon transversum) myši C57Bl/6J 6. den po jednorázovém celotělovém ozáření při krytí hlavy dávkami 12 a 14 Gy.
- c) Vyhodnotit vliv růstového faktoru KGF na změny v krevním obraze myši C57Bl/6J 6. den po jednorázovém celotělovém ozáření při krytí hlavy dávkami 12 a 14 Gy.
- d) Zhodnotit všechny získaných výsledky a možnosti jejich aplikace.

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Experimentální zvířata**

Pro experimenty byly zvoleny samice laboratorní myši kmene C57BL/6J (Velaz s.r.o., Únětice, Česká republika). Stáří jednotlivých zvířat bylo v rozmezí 12 a 16 týdnů a jejich váha se pohybovala od 18 do 23 g. Zvířata byla držena v akreditovaném viváriu v místnosti s regulovanou teplotou v rozmezí 20 – 24 °C. V místnosti byla udržována relativní vlhkost 40 – 60 % s pravidelnými intervaly osvětlení v době od 7:00 do 19:00. Jejich potravu představovalo krmivo DOS-2B (BIOPO spol. s.r.o., Brno, Česká republika). Myši měly rovněž v napáječce neustále k dispozici vodu z vodovodního řádu. Před zahájením samotného experimentu byla všechna zvířata adaptována na nové prostředí po dobu nejméně 15 dní. Veškerá práce a manipulace se zvířaty byla schválena etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové (Česká republika) a byla v souladu s platnou českou a evropskou legislativou pro zásady práce s laboratorními zvířaty.

### **3.2 Zdroj záření**

Zdrojem IZ byl kobaltový ozařovač ( $^{60}\text{Co}$ ) od společnosti Chirana (Praha, Česká republika). Revize příkonu zdroje probíhá jednou za rok pomocí dozimetru PTW-Unidos 1001 (výrobní/sériové číslo 11057) vybaveného ionizační komorou PTW TM 313 (výrobní/ sériové číslo 0012) od firmy RPD Inc. (Albertville, Minnesota, Spojené státy americké).

### **3.3 Postup ozařování experimentálních zvířat**

U prvního experimentálního modelu bylo provedeno ozáření zvířat s dávkovým příkonem 0,43 Gy/min ze vzdálenosti 1 metr (viz kapitola 3.4.1). Druhý experimentální model byl uskutečněn ze stejné vzdálenosti s dávkovým příkonem 0,29 Gy/min (viz kapitola 3.4.2).

Před ozářením byla laboratorní zvířata uvedena do stavu lehké narkózy pomocí intramuskulární aplikace směsi roztoku Rometaru o koncentraci 20 mg/ml (Spofa, Praha, Česká Republika), Narkomonu o koncentraci 50 mg/ml (Zentiva, Praha, Česká Republika) a fyziologického roztoku (B Braun Melsungen AG, Melsungen, Německo). Směs byla namíchána v poměru 1:3:12 (Rometar:Narkoman:fyziologický roztok) a následně aplikována v dávce 10 ml/kg k uvedení subjektů do lehké narkózy.

Pro samotné ozáření byla použita komůrka z plexiskla o délce 6,5 cm, šířce 3 cm a výšce 2,5 cm (VLA JEP, Hradec Králové, Česká republika). Pro další znehybnění a konzistentní



jednostranné zadopřední ozáření byla zvířata navíc fixována držátky okolo krku. Hlava i krk byla zvířatům kryta 10 cm vrstvou olova (Chirana, Praha, Česká Republika).

### 3.4 Experimentální modely

#### 3.4.1 Experimentální model I

Tento model zkoumal vliv růstového faktoru KGF (Orphan Biovitrum, Stockholm, Švédsko) na přežití experimentálních myší po jednorázovém ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy. Celkově bylo použito 100 laboratorních myší, které byly podle použité dávky IZ, dávky KGF nebo fyziologického roztoku rozděleny do 10 skupin (viz tabulka č. 4).

KGF byl aplikován ve třech odlišných množstvích, a to 1 a 5 mg/kg. KGF i fyziologický roztok byly jedincům aplikovány subkutánně v objemu 10 ml/kg váhy zvířete v intervalech 1, 24 a 48 hodin po ozáření. Přežívání bylo hodnoceno denně od ozáření do úmrtí posledního experimentálního zvířete.

**Tabulka č. 4** Rozdělení laboratorních zvířat do skupin v prvním experimentu

Číslo skupiny	Počet zvířat ve skupině	Dávka IZ [Gy]	Interval aplikace	Koncentrace použitého KGF [mg/kg]	Interval aplikace KGF po ozáření [hod]
			fyziologického roztoku po ozáření [hod]		
1	10	0	1, 24, 48	-	-
2	10	14	1, 24, 48	-	-
3	10	14	-	1,0	1, 24, 48
4	10	14	-	5,0	1, 24, 48
5	10	15	1, 24, 48	-	-
6	10	15	-	1,0	1, 24, 48
7	10	15	-	5,0	1, 24, 48
8	10	16	1, 24, 48	-	-
9	10	16	-	1,0	1, 24, 48
10	10	16	-	5,0	1, 24, 48

### 3.4.2 Experimentální model II

Na základě výsledků předešlého experimentu byla pro druhý model zvolena dávka 5 mg/kg KGF. Pro pokus bylo vybráno 63 laboratorních myší rozdělených do 9 skupin. Schéma experimentu je znázorněno v tabulce č.5. Kontrolní skupině (skupina 1) byla vystavena stejným podmínkám jako ostatní testované skupiny, s výjimkou kroku ozáření. Skupiny 2 – 5 byly jednorázově ozářeny dávkou 12 Gy s krytím hlavy. Skupiny 6 – 9 byly obdobným způsobem vystaveny dávce 14 Gy. Z důvodu odlišných schémat aplikace KGF nebyl kontrolním myším a zvířatům ozářeným a neléčeným aplikován fyziologický roztok. Odběr vzorků pro analýzu krevního obrazu a morfologických změn tenkého a tlustého střeva proběhl u tohoto modelu 6. den po ozáření po usmrcení zvířat cervikální dislokací.

**Tabulka č. 5.** Rozdělení laboratorních zvířat do skupin ve druhém experimentu

Číslo skupiny	Počet zvířat ve skupině	Dávka ozáření [Gy]	Počet dávek KGF	Doba podání KGF po expozici IZ [hod]
1	7	-	-	-
2	7	12	-	-
3	7	12	2	1, 24
4	7	12	3	1, 24, 48
5	7	12	3	24, 48, 72
6	7	14	-	-
7	7	14	2	1, 24
8	7	14	3	1, 24, 48
9	7	14	3	24, 48, 72

### 3.5 Analýza krve

Při pitvě byla myším punkcí odebrána krev z pravé komory. Krev byla odebrána sterilní heparinem (5000 MJ/ml; Zentiva) potaženou injekční jehlou o velikosti 21 G (Chirana T. Injecta a.s, Stará Turná, Slovenská republika) do 2ml stříkaček s obsahem 2 µl 80 MJ heparinu (Scanlab Systems, Praha, Česká republika). Vzorky krve byly následně vyhodnoceny v hematologické laboratoři katedry radiobiologie na hemoanalyzátoru ABX Pentra 60 C+ od firmy Trigón-Plus s.r.o. (Čestlice, Česká republika), kde byl v triplicátu experimentálně stanoven absolutní počet buněk krevního obrazu.

### 3.6 Odběr vzorků střeva

Pro histologické vyšetření gastrointestinálního traktu byla odebraná část duodena (dvanáctník), jejuna (lačník), ilea (kyčelník) a colon transversum (příčný tračník) podle přesně nadefinovaných parametrů uvedených v tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6** Úseky odebraných tkání gastrointestinálního traktu

Druh tkáně	Oblast odběru
duodenum	0,5 – 1 cm aborálním směrem od gastroduodenálního přechodu
jejunum	4 – 5 cm aborálním směrem od gastroduodenálního přechodu
ileum	1 – 2 cm orálním směrem od ileocekální chlopně
colon transversum	2 – 3 cm aborálním směrem od ileocekální chlopně

Po pitvě byly odebrané části gastrointestinálního traktu zafixovány v roztoku 10% neutrálního formalínu od firmy Bamed s.r.o. (Litvínovice, Česká republika). Po zafixování byly vzorky nakrájeny a upraveny na mikroskopické preparáty, které byly obarveny hematoxylinem a eozinem.

### 3.7 Zhotovení preparátů

#### 3.7.1 Odvodnění preparátů a zalití do parafínu

Zafixované části tenkého a tlustého střeva byly nejprve minimálně 1 hodinu promývány pod tekoucí vodou pro odstranění formalínu. Poté byly vzorky odvodněny pomocí lázní alkoholu (Kulich, Hradec Králové, Česká Republika) a xylenu (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika) a následně zality do parafínu (Paramix, Holice, Česká Republika). Tento proces probíhal v tkáňovém procesoru Leica TP1020 od firmy Leica (Wetzlar, Německo) za použití podtlaku. Doba setrvání vzorků v jednotlivých lázních a koncentrace použitých alkoholů jsou uvedeny v tabulce č. 7.

Vzorky byly po odvodnění zality do parafinových bločků. Z bločků byly odkrojeny minimálně 3 tenké řezy o tloušťce 5  $\mu$ m pomocí mikrotomu SM 2000R (Leica).

#### 3.7.2 Nanesení preparátu na podložní sklo

Nejprve byla podložní skla od firmy Bamed s.r.o. odmaštěna ethanolem. Poté na ně byl nakapán v rozsahu řezu 0,5% roztok želatiny (Bamed s.r.o.), na který byl nanesen tkáňový řez. Podložní skla byla dále položena na vyhřátou ploténku o teplotě 37 – 40 °C, aby se nadbytečný

parafín rozpustil a vzorek vyrovnal. Nadbytek želatiny byl následně slit a sklíčko necháno okapat. Pro odpaření přebytečné tekutiny a dosušení řezů byly preparáty následně umístěny do termostatu modelu Memmert BE 500 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Německo).

**Tabulce č. 7** Schéma průběhu odvodnění v tkáňovém procesoru

Číslo kroku	Obsah (ev. koncentrace) lázně	Doba lázně [hod.]
1	70% ethanol	1
2	70% ethanol	1
3	80% ethanol	2
4	90% ethanol	1
5	95% ethanol	1
6	95% ethanol	1,5
7	99% ethanol	3
8	xylén	1,5
9	xylén	1,5
10	xylén	1,5
11	parafín	4
12	parafín	5

### 3.7.3 Odparafinování preparátu

Následovalo obarvení preparátů, z kterých musel být nejprve odstraněn parafín. Podložní skla byla, podle postupu uvedeného v tabulce č. 8, umístěna do lázní xylenu a alkoholu.

### 3.7.4 Barvení preparátu hematoxylinem-eozinem

První krok barvení zahrnoval přípravu Gillova hematoxylinu (viz tabulka č. 9). Za stálého míchání byl v deionizované vodě (vyrobené přístrojem Aqual 29 od firmy Aqual s.r.o., Brno, Česká republika) nejprve rozpuštěn Hematoxylin (Merck, Kenilworth, New Jersey, Spojené státy americké), jodičnan draselný a síran hlinitý (obě látky od firmy Sigma-Aldrich, Missouri, Spojené státy americké). Do takto připravené směs byl vmíchán ethylenglykol a následně ledová kyselina octová (obě látky od firmy Sigma-Aldrich).

**Tabulka č. 8** Postup odparafinování ukrojených a na sklíčka natažených řezů.

Číslo kroku	Obsah a koncentrace lázně	Doba lázně [minuty]
1	xylen	10
2	xylen	10
3	xylen	10
4	96% ethanol	10
5	96% ethanol	10
6	70% ethanol	10
7	deionizovaná voda	5

**Tabulka č. 9** Složení zásobního roztoku Gillova hematoxylinu

Látka	Hmotnost/objem
hematoxylin	4 g
KIO <sub>3</sub>	0,4 g
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	35,2 g
deionizovaná voda	710 ml
ethylenglykol	250 ml
CH <sub>3</sub> COOH	40 ml

Do připraveného roztoku Gillova hematoxylinu byly vloženy preparáty a ponechány 3 minuty. Následně byly opláchnuty deionizovanou vodou a podle postupu v tabulce č. 10 byly vloženy do 70% roztoku ethanolu a diferencovány. Pro diferenciaci a zabarvení tkání do modra se vzorky vložily do roztoku kyselého alkoholu vyrobeného dle návodu v tabulce č. 11.

**Tabulka č. 10** Schéma průběhu diferenciaci vzorků

Číslo kroku	Obsah lázně	Doba lázně
1	70% ethanol	5 s
2	kyselý alkohol	5 s
3	kohoutková voda	20 min
4	deionizovaná voda	1 min

**Tabulka č. 11** Příprava kyselého alkoholu

<b>Látka</b>	<b>Objem</b>
ethanol	200 ml
37% HCl	7,5 ml
deionizovaná voda	900 ml

HCl byla dodána firmou Sigma-Aldrich

Po diferenciaci byly preparáty barveny po dobu 1 min 1% vodným roztokem eozinu (Merck) a následně opláchnuty deionizovanou vodou a odvodněny lázněmi alkoholu, acetonu (Sigma-Aldrich) a xyleny podle postupu uvedeného v tabulce č. 12.

**Tabulka č. 12** Postup odvodnění vzorků barvených eozinem

<b>Číslo kroku</b>	<b>Obsah lázně</b>	<b>Doba lázně</b>
<b>1</b>	deionizovaná voda	30 sec.
<b>2</b>	70% ethanol	2 min
<b>3</b>	80% ethanol	2 min
<b>4</b>	96% ethanol	2 min
<b>5</b>	aceton	2 min
<b>6</b>	xylene	5 min
<b>7</b>	xylene	5 min
<b>8</b>	xylene	5 min

### 3.7.5 Zamontování vzorků

Zamontování preparátu byl poslední krok před histologickým vyhodnocením vzorků. K jeho provedení bylo na preparát nakapáno montovací médium DPX (Sigma-Aldrich). Na médium bylo opatrně nanášeno krycí sklíčko (Bamed s.r.o) tak, aby byly z preparátu vytlačeny všechny bubliny. Zamontované vzorky byly vloženy do v termostatu a ponechány zaschnout.

### **3.8 Hodnocení preparátů**

Po obarvení preparátů hematoxylinem-eozinem následovalo vyhodnocení stavu střevní sliznice po ozáření.

Nejprve byly spočítány viabilní krypty ve všech preparátech duodena, jejuna, ilea a colon transversum. Poté bylo ve všech úsecích střeva provedeno měření výšky klků (s výjimkou colon transversum) a hloubky krypt.

Hodnocení vzorků bylo provedeno pomocí mikroskopu Olympus BX-51 (Olympus, Tokyo, Japonsko). Pro měření výšky klků a hloubky krypt byla navíc použita kamera Olympus DP-71 (Olympus).

#### **3.8.1 Počet viabilních krypt**

Z každé části tenkého a tlustého střeva (duodenum, jejunum, ileum a colon transversum) byly vyhotoveny na základě předchozích postupů minimálně 3 řezy. Pro hodnocení byly použity pouze ty, které vykazovaly v celém cirkulárním průřezu nenarušení kontinuity.

V jednotlivých řezech pak bylo provedeno počítání viabilních krypt při 320násobného zvětšení světelného mikroskopu. V tenkém střevě se o viabilní kryptu jednalo tehdy, bylo-li v kryptě nalezeno alespoň 10 a více buněk neapanethova typu (Witherse a Elkind, 1970).

V tlustém střevě byly za viabilní považovány krypty s 5 a více živými (neapoptotickými) buňkami v základně, jež nevykazovala kompenzační změny (pokles výšky enterocyty, oploštění jádra, ztráta kontinuity epitelové vrstvy).

Počet viabilních krypt byl vždy hodnocen ve 3 řezech v každé části střeva, ze kterých byl počítán průměr.

#### **3.8.2 Měření délky klků a hloubky krypt**

Délka klků byla měřena v příčném průřezu klku a představovala ji spojnice centra jeho základny a vrcholku. Samotné měření bylo provedeno při celkovém 160násobném zvětšení. Mikroskopické fotografie byly pořízeny pomocí programu CellSens Entry vyvinutého společností Olympus. Délka klků a hloubka byla poté změřena v programu určeného pro analýzu obrazu ImagePro verze 7.0 od společnosti Media Cybernetics Inc. (Rockville, Maryland, Spojené státy americké).

Pro analýzu délky klků byl u každého zvířete jeden optimální řez, kde byly pořízeny mikroskopické snímky 15 až 20 nejdelších klků. Výslednou hodnotu analýzy představoval u každého zvířete vždy průměr pouze 10 nejdelších klků.

Podobně jako u klků byly nejprve pořízeny mikroskopické snímky 15 až 20 největších krypt. Výslednou hodnotu analýzy představoval u každého zvířete vždy průměr pouze 10 nejdelších krypt.

### **3.9 Statistické zpracování dat**

Získaná data byla zanalyzována pomocí programu IBM SPSS Statistics verze 24 vyvinutého společností IBM (Armonk, New York, Spojené státy americké).

Přežívání zvířat bylo hodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy analýzy a *post hoc* log-rank testu pro určení rozdílů mezi jednotlivými skupinami následoval. Hodnota úrovně statistické významnosti byla stanovena na hladině  $p \leq 0,05$

Pro výpočet významnosti rozdílů mezi všemi skupinami byl zvolen Kruskal-Wallisův test s *post hoc* Mann-Whitneyho testem. Hodnota úrovně statistické významnosti byla stanovena na hladině  $p \leq 0,05$

V tabulkách jsou uvedeny průměry jednotlivých skupin  $\pm$  dvojnásobek směrodatné odchylky průměru skupiny.



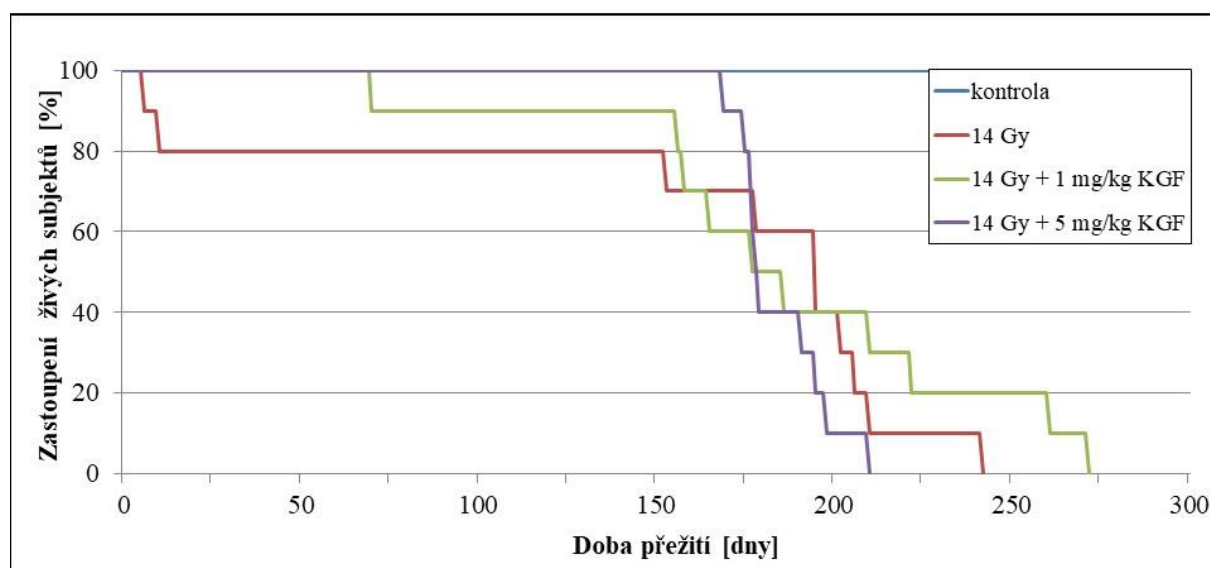
## 4 Výsledky

### 4.1 Experimentální model I (vliv KGF na přežívání experimentálních zvířat)

Přežívání zvířat po jednorázovém ozáření dávkami 14, 15 a 16 Gy s krytím hlavy bylo testováno na laboratorním kmenu C57B1/6J. Testovaná skupina činila 10 jedinců. Byla přítomna kontrolní neozářená (světle modrá křivka) a ozářená neléčená skupina (červená křivka), kterým byl subkutánně aplikován fyziologický roztok v intervalech 1, 24 a 48 h. KGF byl podán u dalších dvou skupin v dávce 1 mg/kg (zelená křivka) nebo 5 mg/kg (fialová křivka) tělesné hmotnosti v čase 1, 24 a 48 hodin po ozáření.

Ve srovnání s kontrolní skupinou došlo po ozáření 14 Gy k poklesu přežití u neléčené skupiny (medián = 195 dní,  $p < 0,001$ ) a skupiny léčené 1 mg/kg (medián = 177 dní,  $p < 0,001$ ) a 5 mg/kg KGF (medián = 178 dní,  $p < 0,001$ ). Mezi ozářenými skupinami signifikantní rozdíly nalezeny nebyly (graf č. 1).

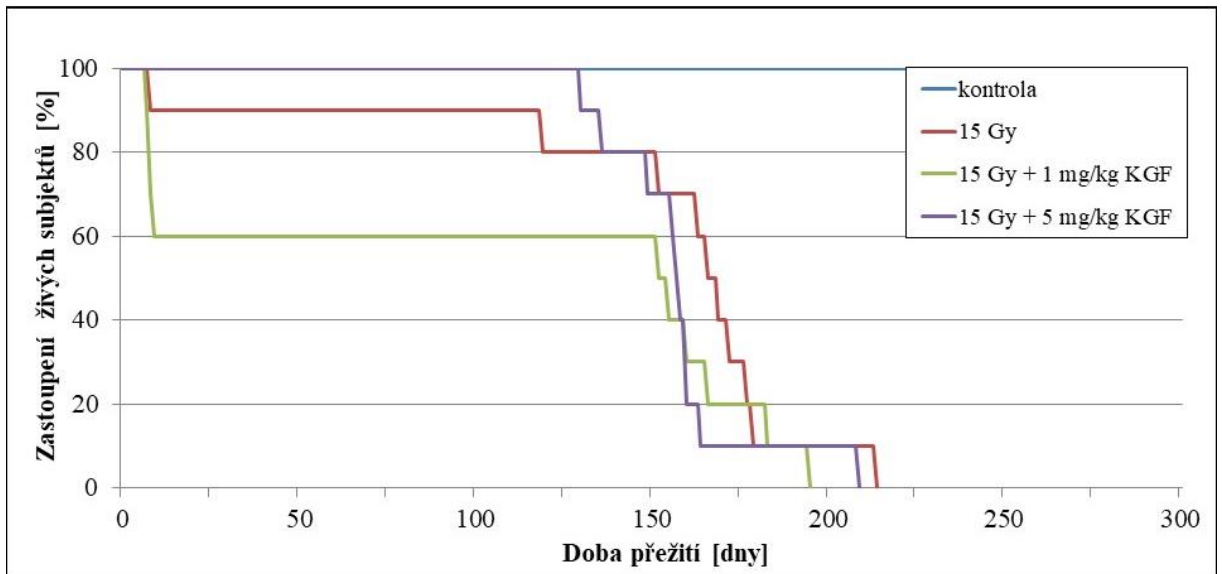
**Graf č. 1** Přežívání myši po jednorázové expozici 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



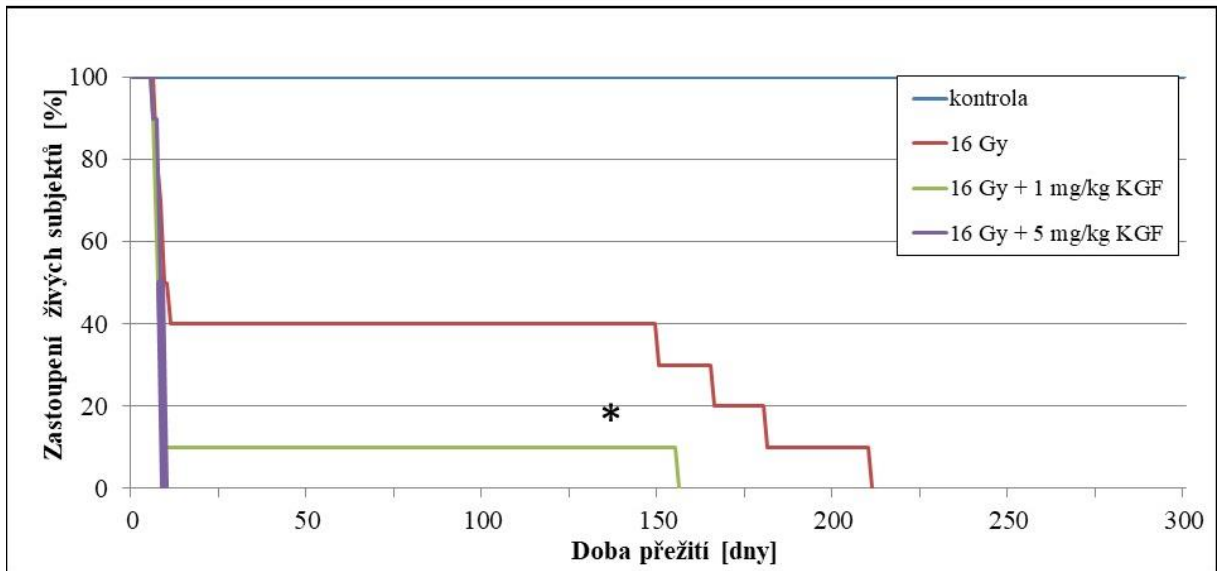
Dávka 15 Gy vedla k poklesu přežívání u všech tří skupin (medián = 163, 152, respektive 157 dní, všechna  $p < 0,001$ ). I zde rozdíly mezi ozářenými skupinami nalezeny nebyly (graf č. 2).

Ozáření 16 Gy výrazně snížilo dobu přežití rovněž u všech tří skupin (medián = 10, 8, respektive 8,5 dní, všechna  $p < 0,001$ ). Signifikantní rozdíl byl navíc nalezen při srovnání neléčené skupiny se skupinou, které byl podán KGF v dávce 1 mg/kg ( $p = 0,038$ ; graf č. 3)

**Graf č. 2** Přežívání myší po jednorázové expozici 15 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



**Graf č. 3** Přežívání myší po jednorázové expozici 16 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti ozářené neléčené skupině: \*  $p \leq 0,05$

## 4.2 Experimentální model II

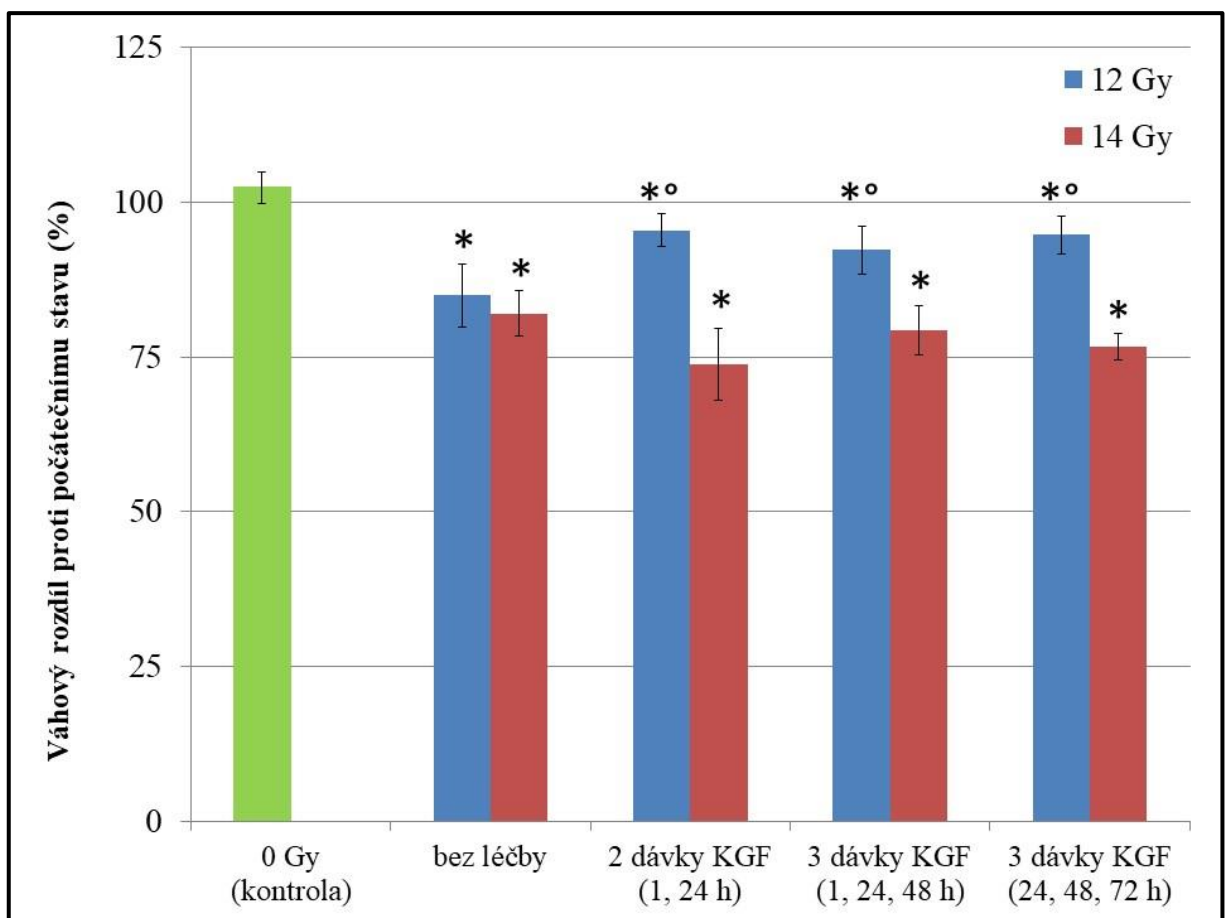
### 4.2.1 Váha zvířat (vliv KGF na váhu zvířat)

Po ozáření 12 a 14 Gy nastalo snížení váhy myši o 17 %, respektive 20 % (obě  $p = 0,001$ ).

Oproti neléčené skupině došlo po ozáření 12 Gy k signifikantním váhovému nárůstu o 12 % ( $p = 0,017$ ), 9 % ( $p = 0,026$ ) a 12 % ( $p = 0,007$ ) při léčbě 2, 3 časnými, respektive 3 pozdními dávkami KGF. Mezi léčenými skupinami významné rozdíly nalezeny nebyly.

Při ozáření dávkou 14 Gy nemělo použití růstového faktoru v žádném dávkovacím schématu vliv na váhu laboratorních myši. Nebyly také zaznamenány rozdíly mezi jednotlivými léčenými skupinami (graf č. 4).

**Graf č. 4** Váha experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

## 4.2.2 Duodenum

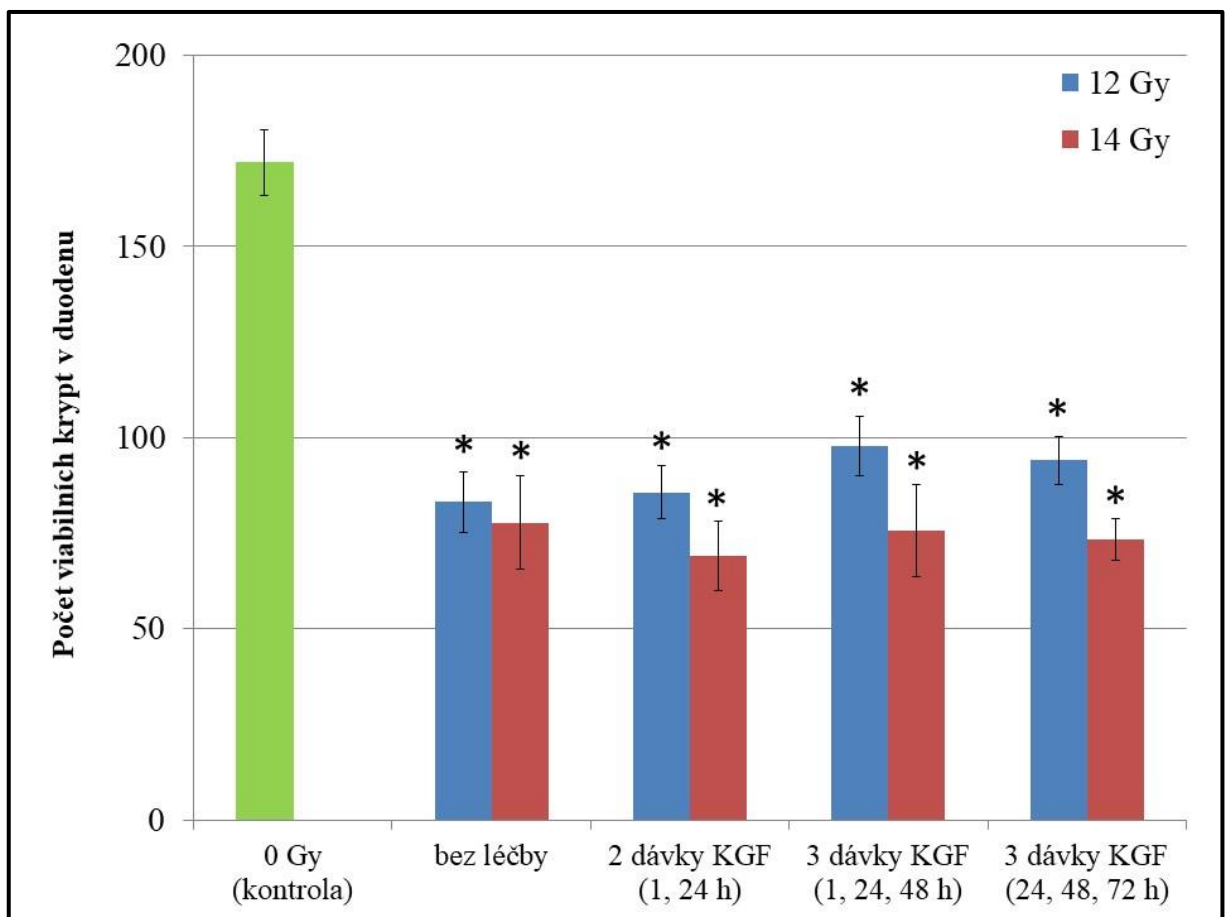
### 4.2.2.1 Vliv KGF na počet viabilních krypt

V duodenu došlo po expozici dávkou 12 a 14 Gy u neléčených skupin k úbytku počtu viabilních krypt o 52 %, respektive 55 % (obě  $p = 0,001$ ).

Ve srovnání s neléčenými skupinami nevykazovalo podání KGF jakýkoliv vliv.

Signifikantní změny nebyly rovněž nalezeny při porovnání jednotlivých aplikačních schémat mezi sebou při jednotlivých dávkách IZ (graf č. 5).

**Graf č. 5** Počet viabilních krypt v duodenu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

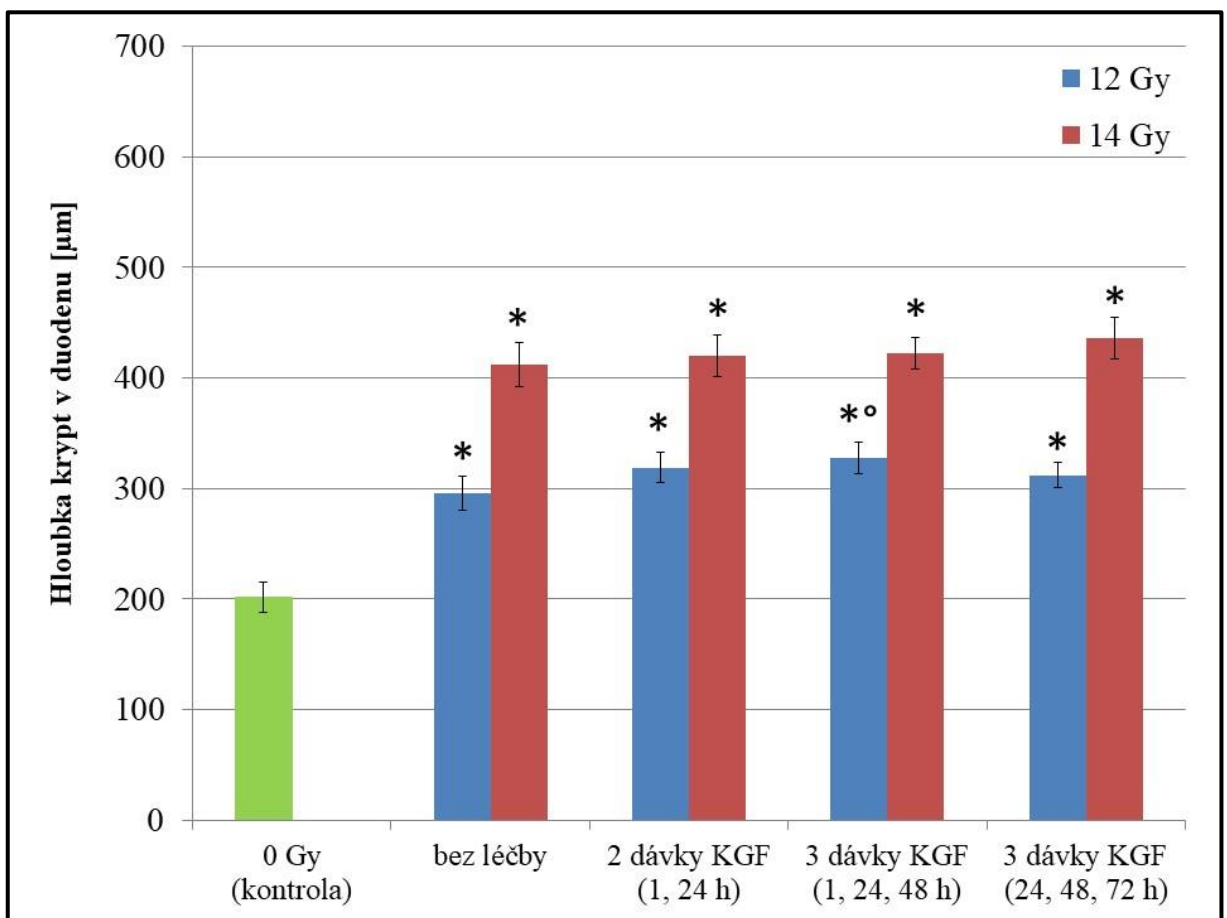
#### 4.2.2.2 Vliv KGF hloubku krypt

Hloubka krypt se po ozáření zvýšila o 47 % při 12 Gy ( $p < 0,001$ ) a o 104 % při 14 Gy ( $p < 0,001$ ).

Po ozáření 12 Gy způsobila aplikace 3 časných dávek KGF prodloužení o 11 % ( $p = 0,008$ ). Mezi léčenými skupinami významné rozdíly nalezeny nebyly.

Po ozáření 14 Gy nemělo podání KGF účinek a nebyly pozorovány jakékoliv signifikantní rozdíly mezi léčenými skupinami (graf č. 6).

**Graf č. 6** Hloubka krypt v duodenu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

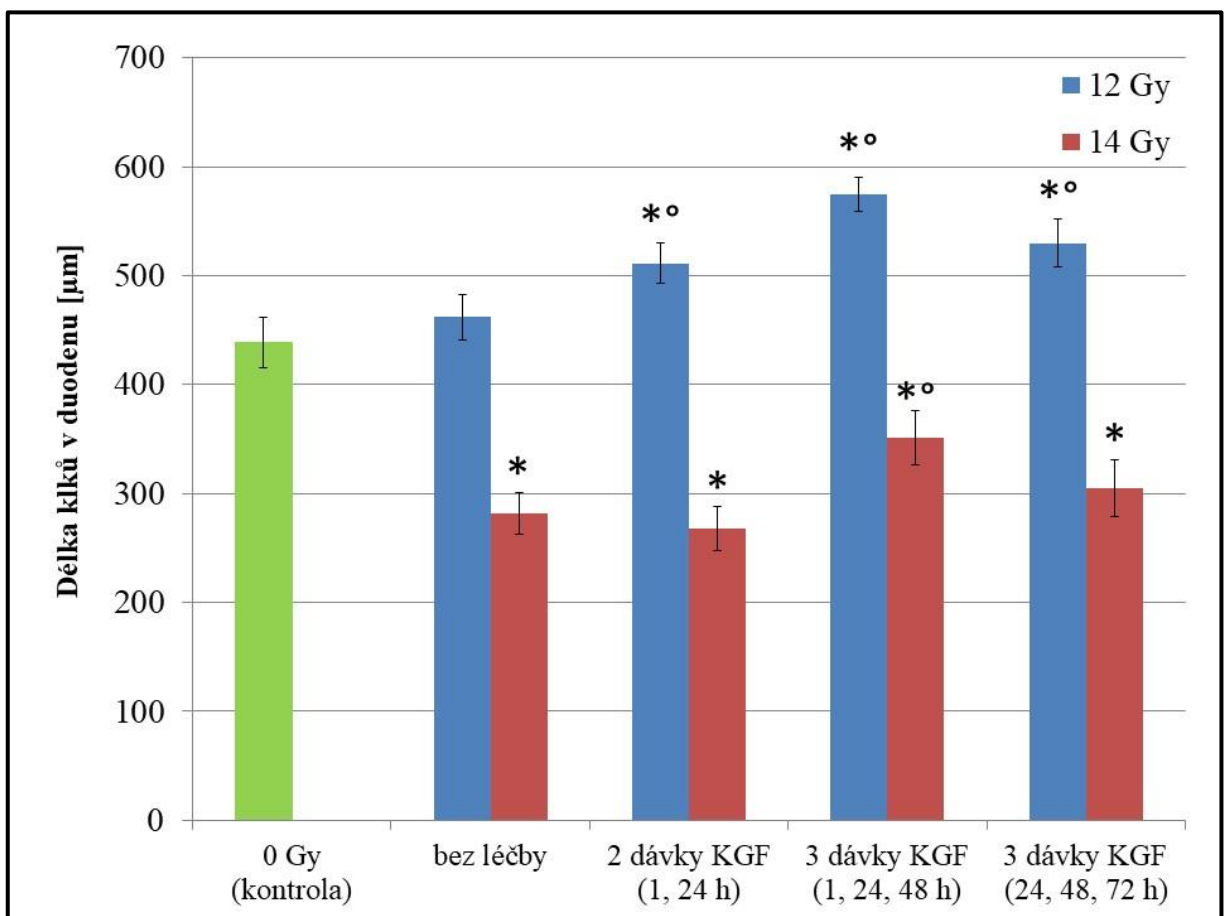
#### 4.2.2.3 Vliv KGF na délku klků

Jednorázová expozice 12 Gy nevyvolala u experimentálních zvířat statisticky významné změny hodnot. Zkrácení klků bylo proti kontrolní skupině pozorováno až při 14 Gy, a to o 28 % ( $p < 0,001$ ).

Při 12 Gy došlo oproti ozářeným neléčeným myším po léčbě 2, 3 časnými a 3 pozdními dávkami KGF k prodloužení délky klků o 11 % ( $p = 0,016$ ), 24 % ( $p < 0,001$ ) a 15 % (všechna  $p < 0,001$ ). Nejúčinnější bylo časně 3 dávkové schéma, které ve srovnání s 2 dávkami a 3 pozdními dávkami KGF vykazovalo o 12 % ( $p = 0,001$ ), respektive 8 % delší délku klků ( $p = 0,010$ ).

Po ozáření dávkou 14 Gy vyvolalo ve srovnání s ozářenými neléčenými zvířaty podání 3 časných dávek KGF 25% prodloužení klků ( $p = 0,003$ ). Tento režim vykazoval o 31 % vyšší účinnost ve srovnání s 2 dávkami růstového faktoru ( $p < 0,001$ ; graf č. 7).

**Graf č. 7** Délka klků v duodenu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

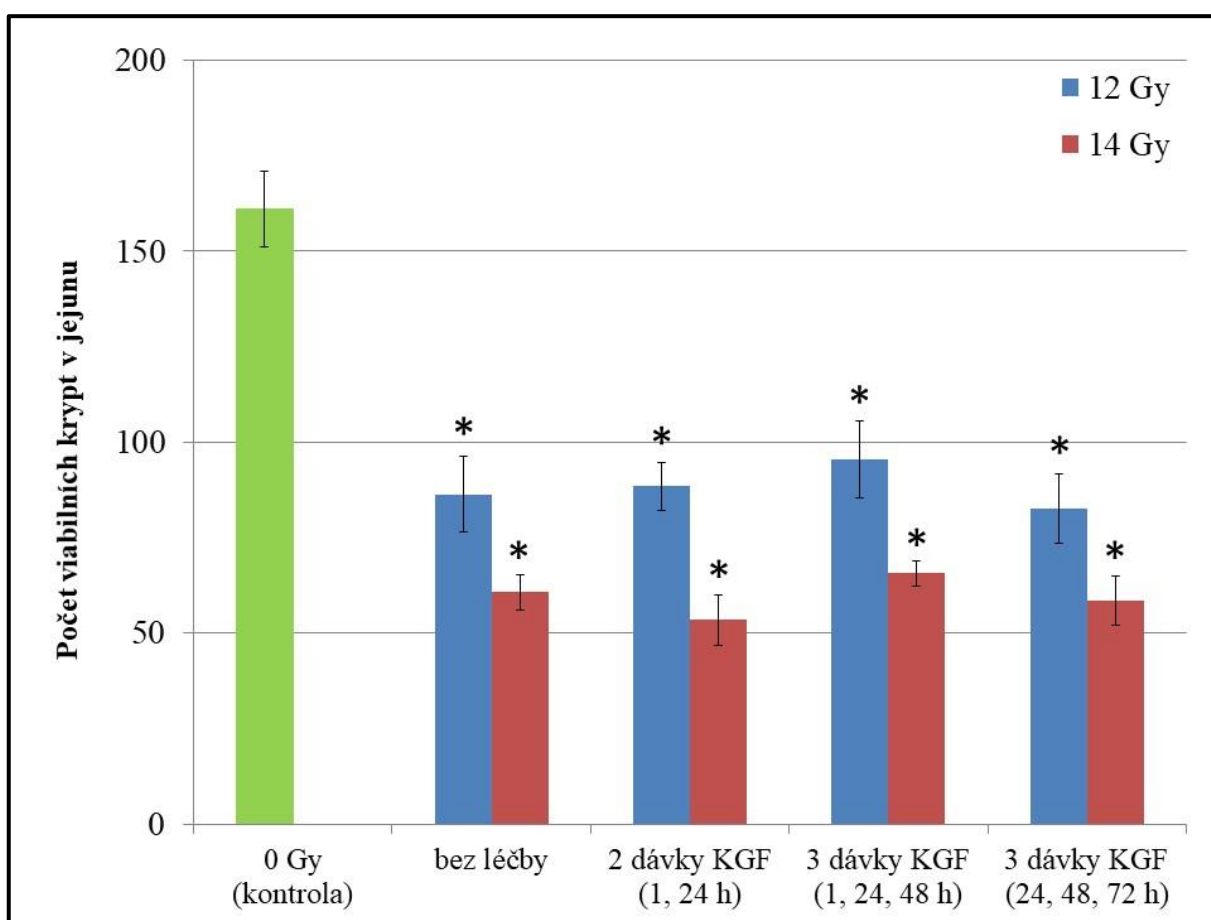
## 4.2.3 Jejunum

### 4.2.3.1 Vliv KGF na počet viabilních krypt

Ozáření v dávce 12 a 14 Gy způsobilo snížení počtu krypt o 46 %, respektive 62 % (obě  $p = 0,001$ ).

Oproti neléčeným skupinám nevedla aplikace KGF k významné změně tohoto parametru. Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl, kdy skupina léčená 3 časnými dávkami KGF byla po ozáření 14 Gy o 23 % účinnější než 2 dávkový režim ( $p = 0,022$ ; graf č. 8).

**Graf č. 8** Počet viabilních krypt v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

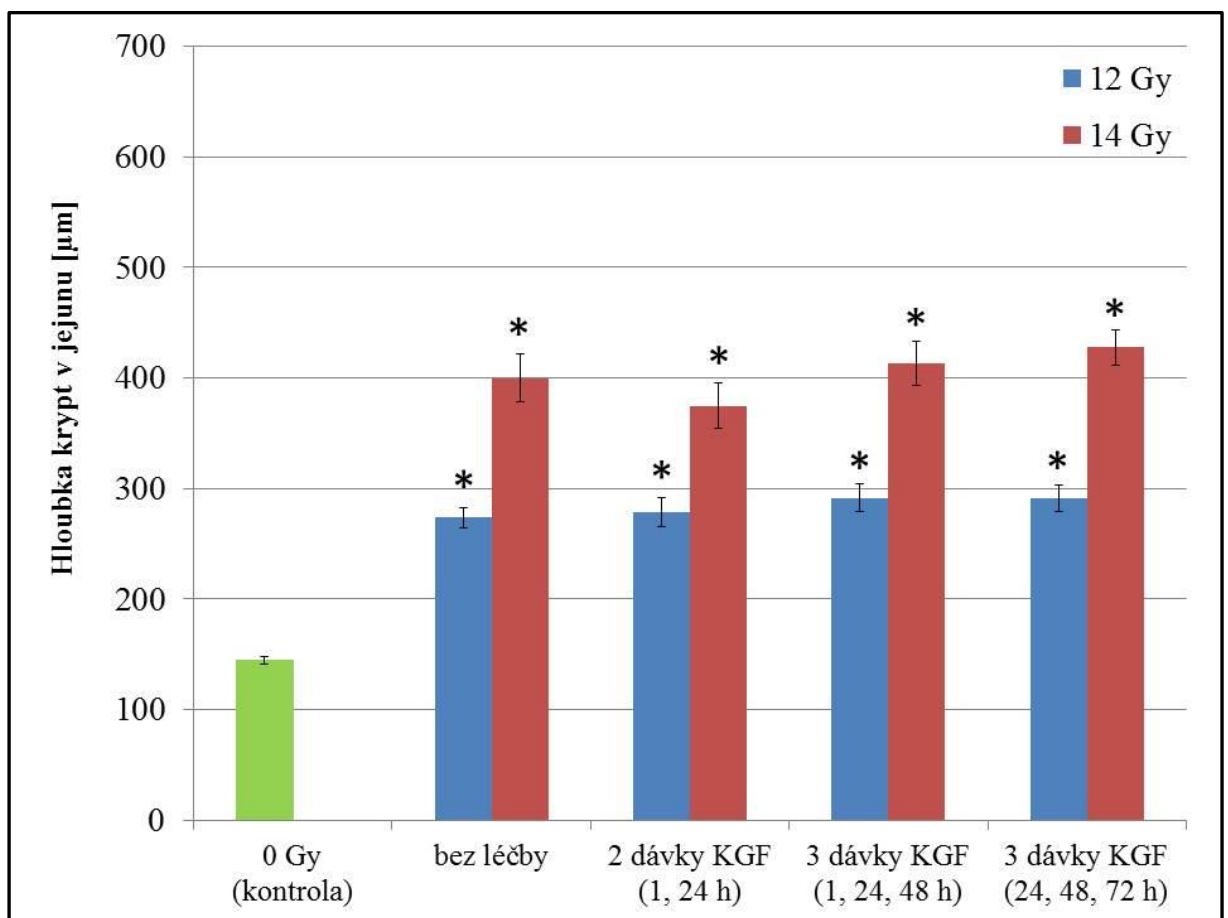
#### 4.2.3.2 Vliv KGF na hloubku krypt

V jejunu došlo po ozáření 12 a 14 Gy k prodloužení krypt o 89 %, respektive 177 % (obě  $p < 0,001$ ).

Ve srovnání s neléčenými skupinami nevykazovalo podání KGF jakýkoliv vliv.

Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl. Aplikace 3 pozdních dávek KGF po ozáření 14 Gy vykazovala o 14 % vyšší hodnotu ukazatele ( $p = 0,025$ ) ve srovnání s 2 dávkami růstového faktoru (graf č. 9).

**Graf č. 9** Hloubka krypt v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$



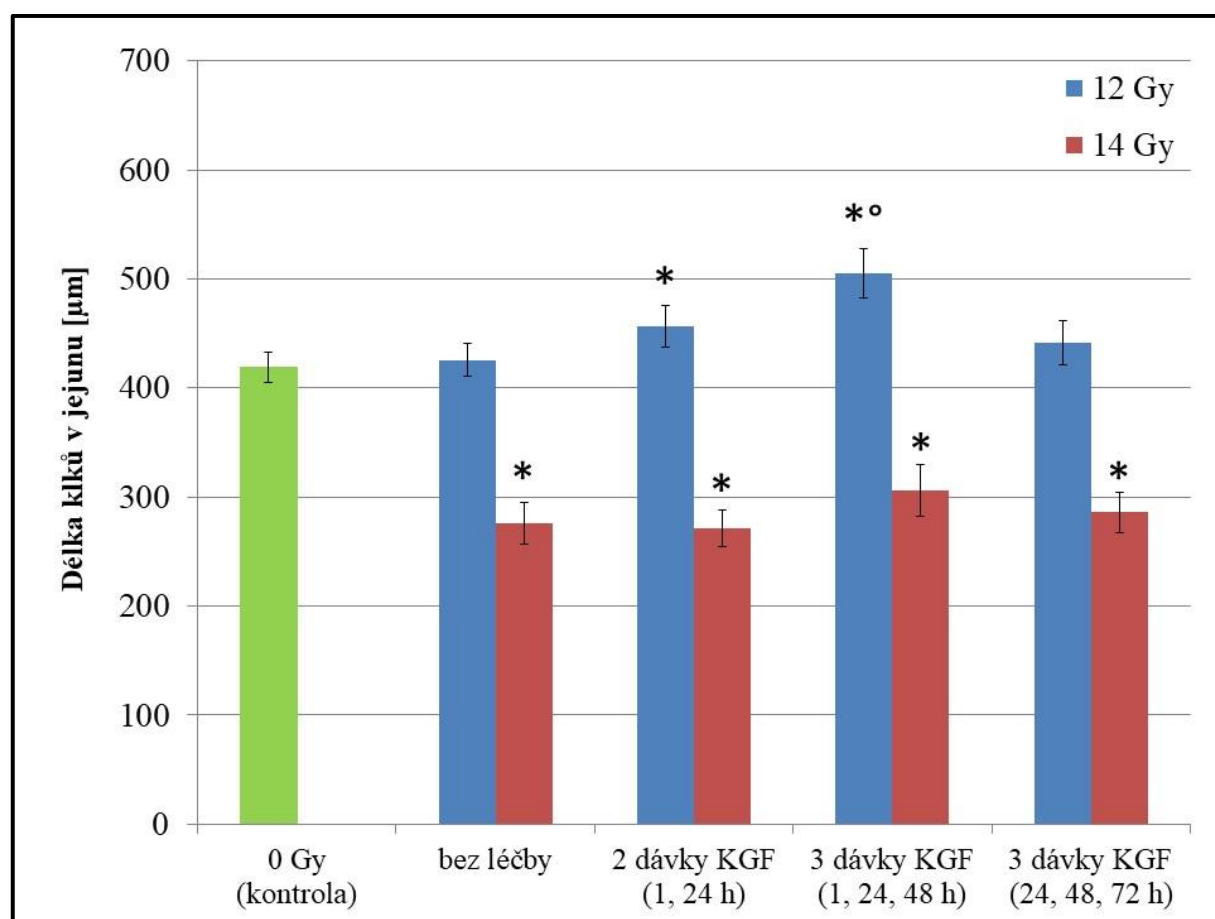
#### 4.2.3.3 Vliv KGF na délku klků

Jednorázová expozice 12 Gy nevedla k významné změně. Zkrácení klků bylo proti kontrolní skupině zaznamenáno až při dávce 14 Gy, při které se tento ukazatel snížil o 34 % ( $p < 0,001$ ).

Při 12 Gy došlo oproti ozářeným neléčeným myším léčbou 3 časnými dávkami KGF k 19% prodloužení délky klků ( $p < 0,001$ ). Tento režim byl ve srovnání s 2 dávkami a 3 pozdními dávkami růstového faktoru účinnější o 11 % ( $p = 0,023$ ), respektive 15 % ( $p = 0,001$ ).

Po ozáření 14 Gy nebyl vliv KGF na délku klků v jejunu zaznamenán. Významné rozdíly nebyly přítomny ani mezi léčenými skupinami (graf č. 10)

**Graf č. 10** Délka klků v jejunu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

#### 4.2.4 Ileum

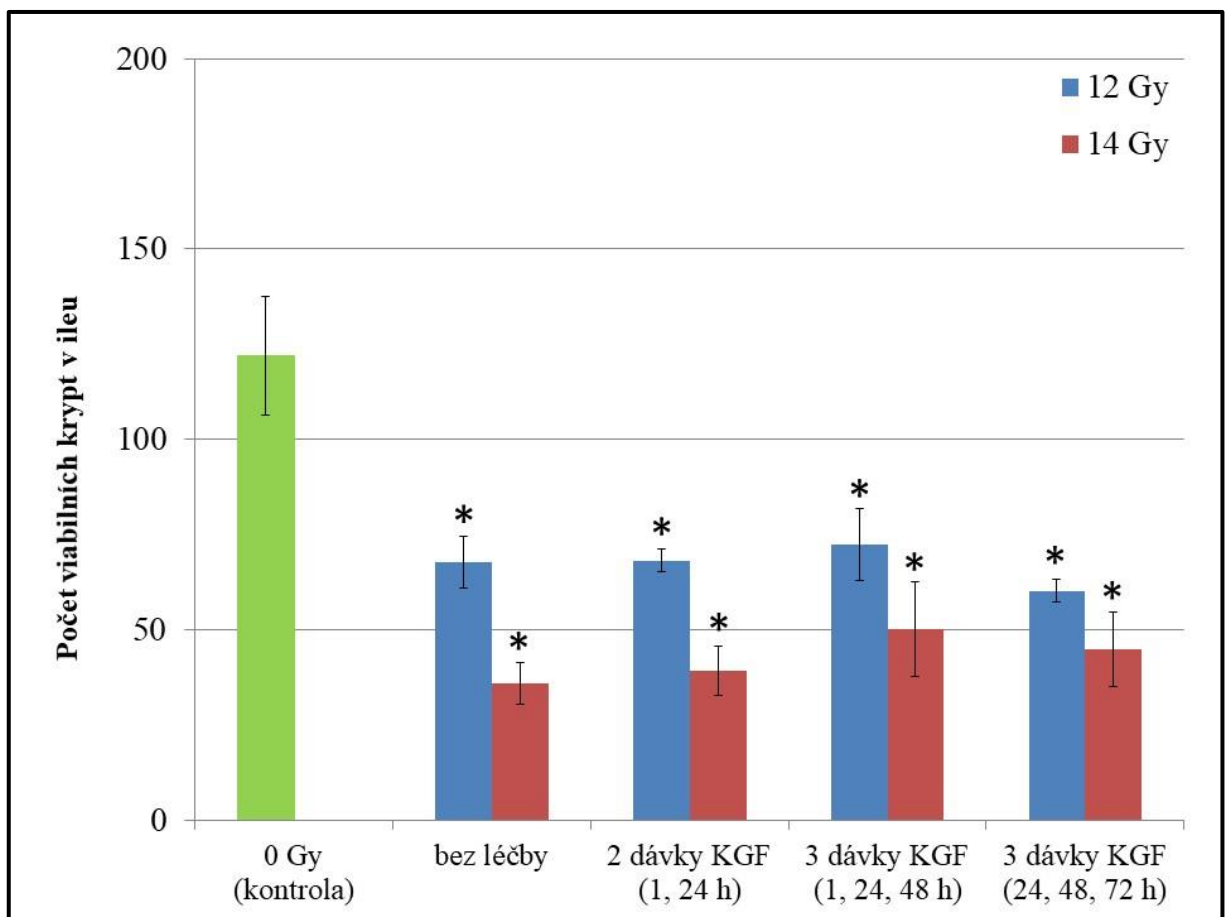
##### 4.2.4.1 Vliv KGF na počet viabilních krypt

Ve srovnání s kontrolní skupinou nastalo po ozáření dávkou 12 a 14 Gy signifikantní snížení počtu krypt o 45 %, respektive 71 % (obě  $p = 0,001$ ).

Aplikace KGF neprojevila oproti neléčené skupině významný rozdíl.

Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl. Aplikace 3 časných dávek po ozáření 12 Gy vykazovala o 20 % účinnější ( $p = 0,005$ ) ve srovnání s 3 pozdními KGF (graf č. 11).

**Graf č. 11** Počet viabilních krypt v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



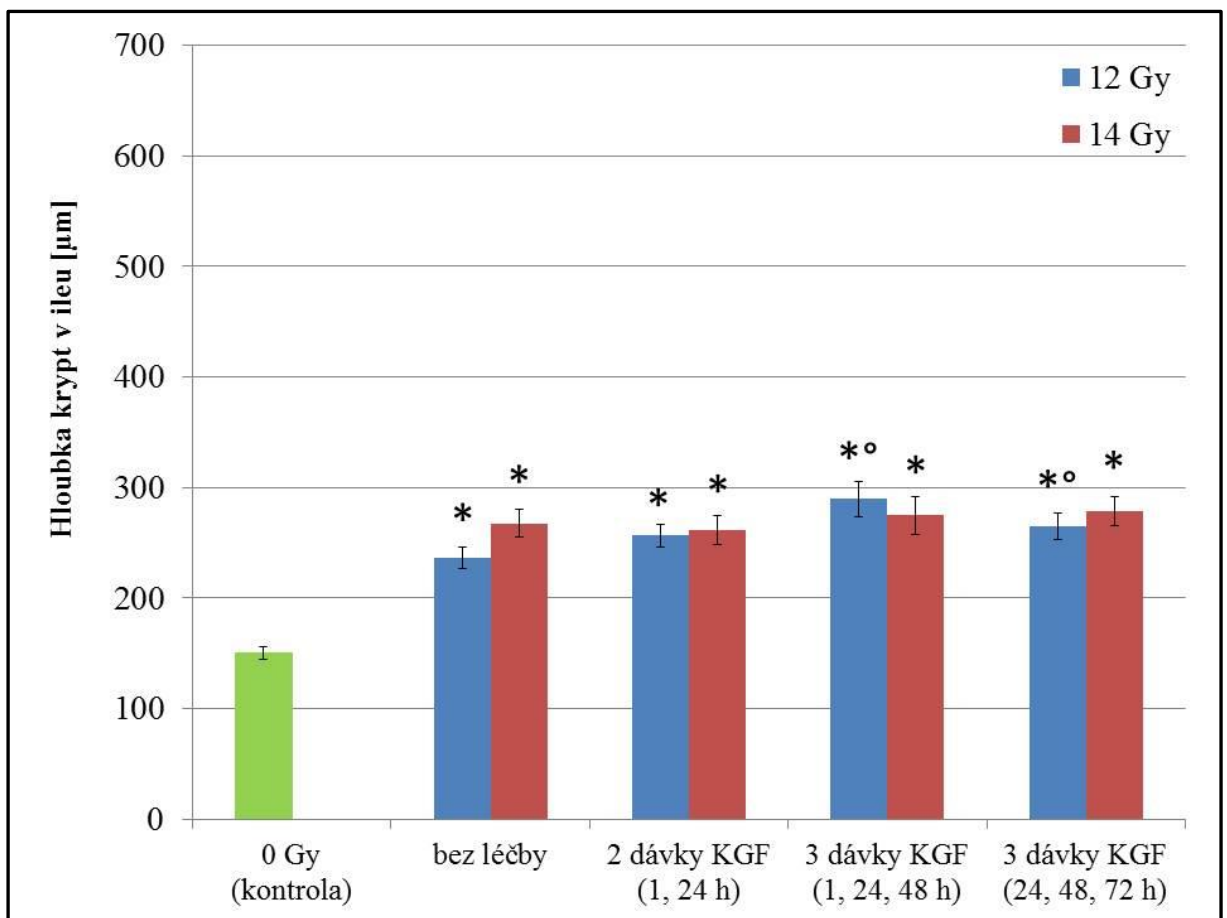
Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

#### 4.2.4.2 Vliv KGF na hloubku krypt v ileu

Po ozáření 12 a 14 Gy došlo k prodloužení hloubky krypt o 58 %, respektive 78 % (obě  $p < 0,001$ ).

Po ozáření 12 Gy došlo při podání 3 časných a 3 pozdních dávek KGF k 23% ( $p < 0,001$ ) a 12% nárůstu hlobky (obě  $p = 0,042$ ). Mezi léčenými skupinami významné rozdíly nalezeny nebyly. Mezi skupinami ozářenými 14 Gy nebyly také nalezeny signifikantní změny (graf č. 12).

**Graf č. 12** Hloubka krypt v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s kryptím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

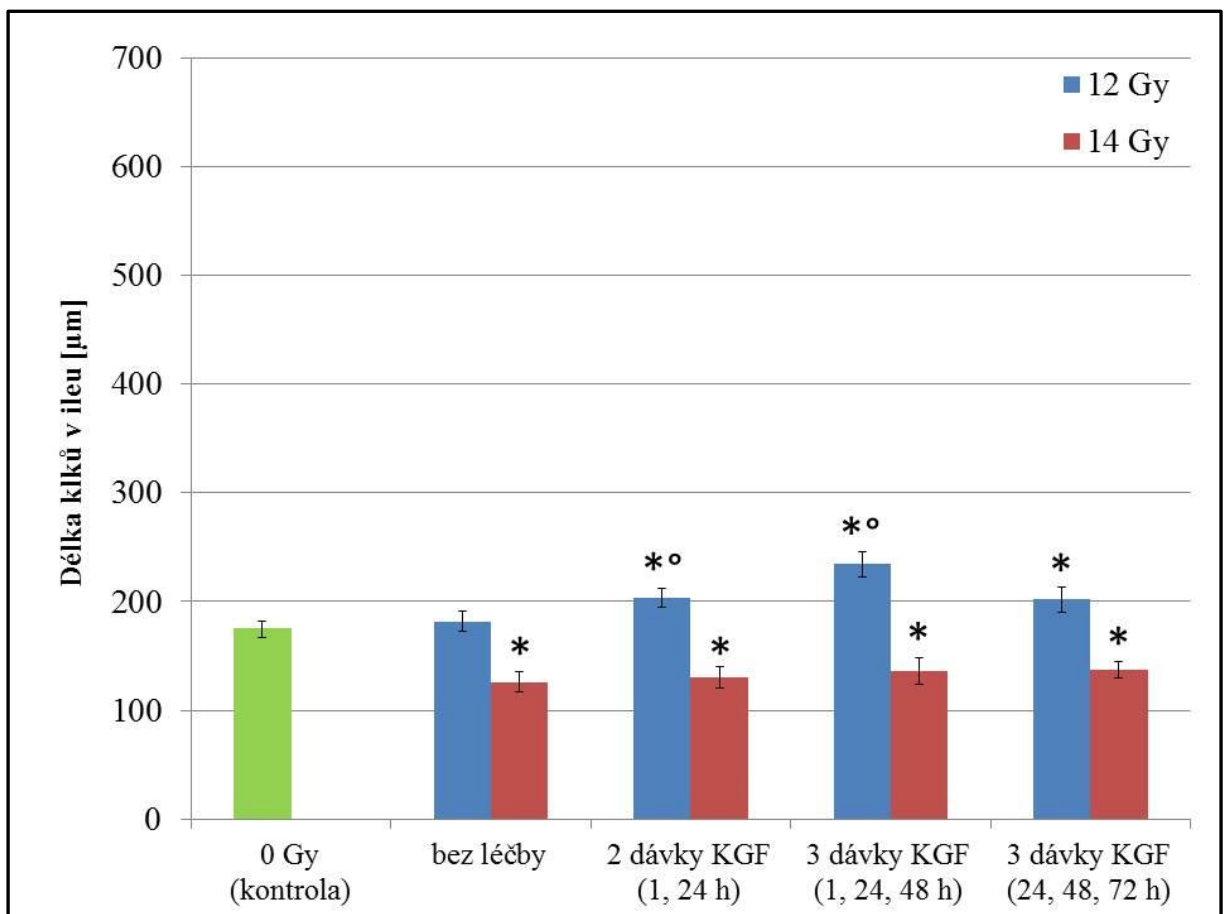
#### 4.2.4.3 Vliv KGF na délku klků

Jednorázová expozice 12 Gy nevedla k významné změně. Zkrácení klků bylo proti kontrolní skupině zaznamenáno po ozáření 14 Gy, kdy se tento ukazatel snížil o 28 % ( $p < 0,001$ ).

Při 12 Gy došlo oproti ozářené neléčené skupině léčbou 2 a 3 časnými dávkami KGF k 12% ( $p = 0,023$ ), respektive 29% prodloužení klků ( $p < 0,001$ ). Časný 3 dávkový režim byl ve srovnání s 2 dávkami a 3 pozdními dávkami růstového faktoru účinnější o 15 % ( $p = 0,013$ ), respektive 16 % ( $p = 0,001$ ).

Po ozáření 14 Gy nebyl mezi ozářenými skupinami jakýkoliv rozdíl zaznamenán (graf č. 13).

**Graf č. 13** Délka klků v ileu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

## 4.2.5 Colon transversum

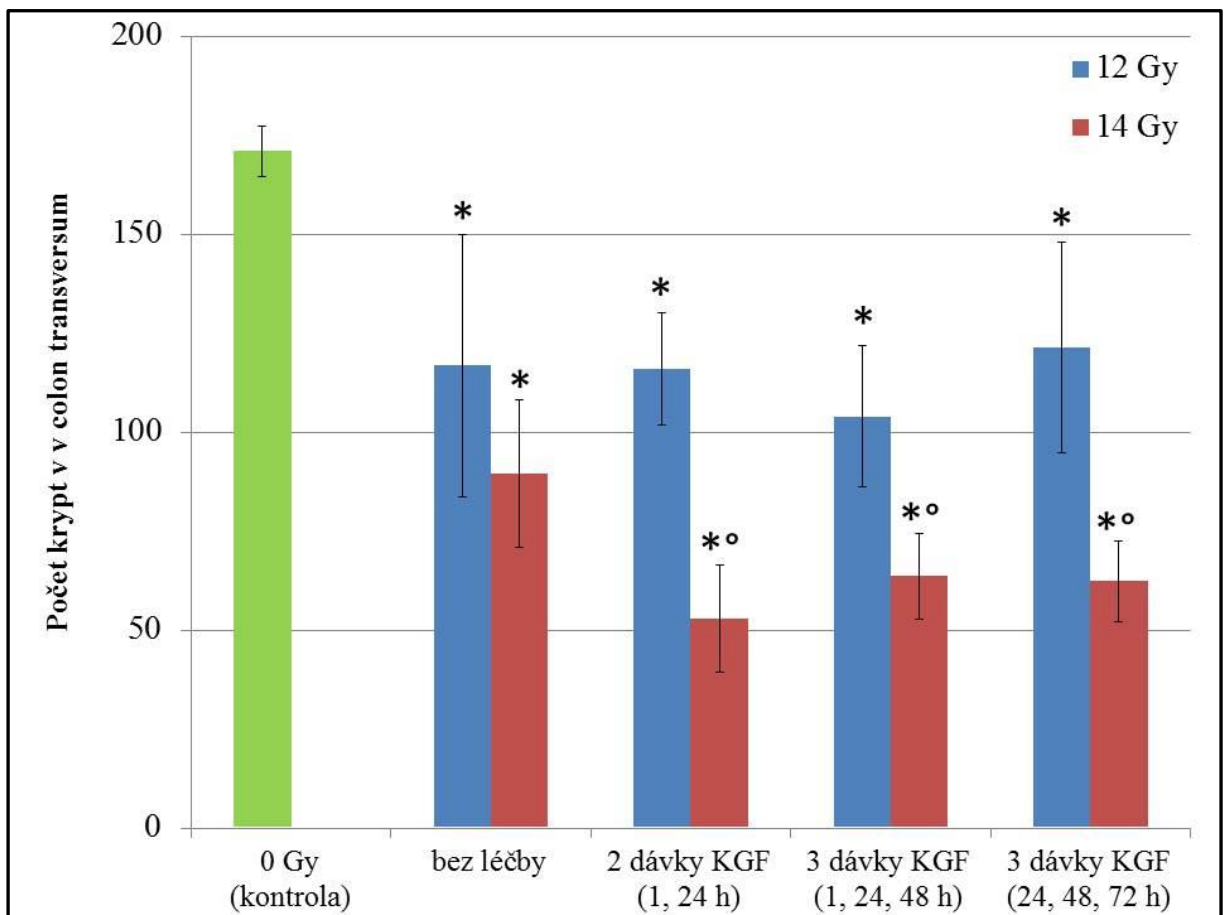
### 4.2.5.1 Vliv KGF na počet krypt

Po ozáření 12 a 14 Gy došlo k signifikantnímu 32% ( $p = 0,017$ ), respektive 48% ( $p = 0,001$ ) úbytku počtu viabilních krypt.

Vliv terapie na stav pozorovaný po ozáření 12 Gy zaznamenán nebyl. Rovněž nebyly pozorovány významné rozdíly mezi skupinami.

Při 14 Gy vedla terapie 2 a 3 časnými a 3 pozdními dávkami KGF oproti ozářené neléčené skupině k 41% ( $p = 0,015$ ), 29% ( $p = 0,026$ ), respektive 30 % ( $p = 0,008$ ) poklesu počtu krypt. Mezi léčenými skupinami významné rozdíly nebyly (graf č. 14).

**Graf č. 14** Počet viabilních krypt v colon transversum experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

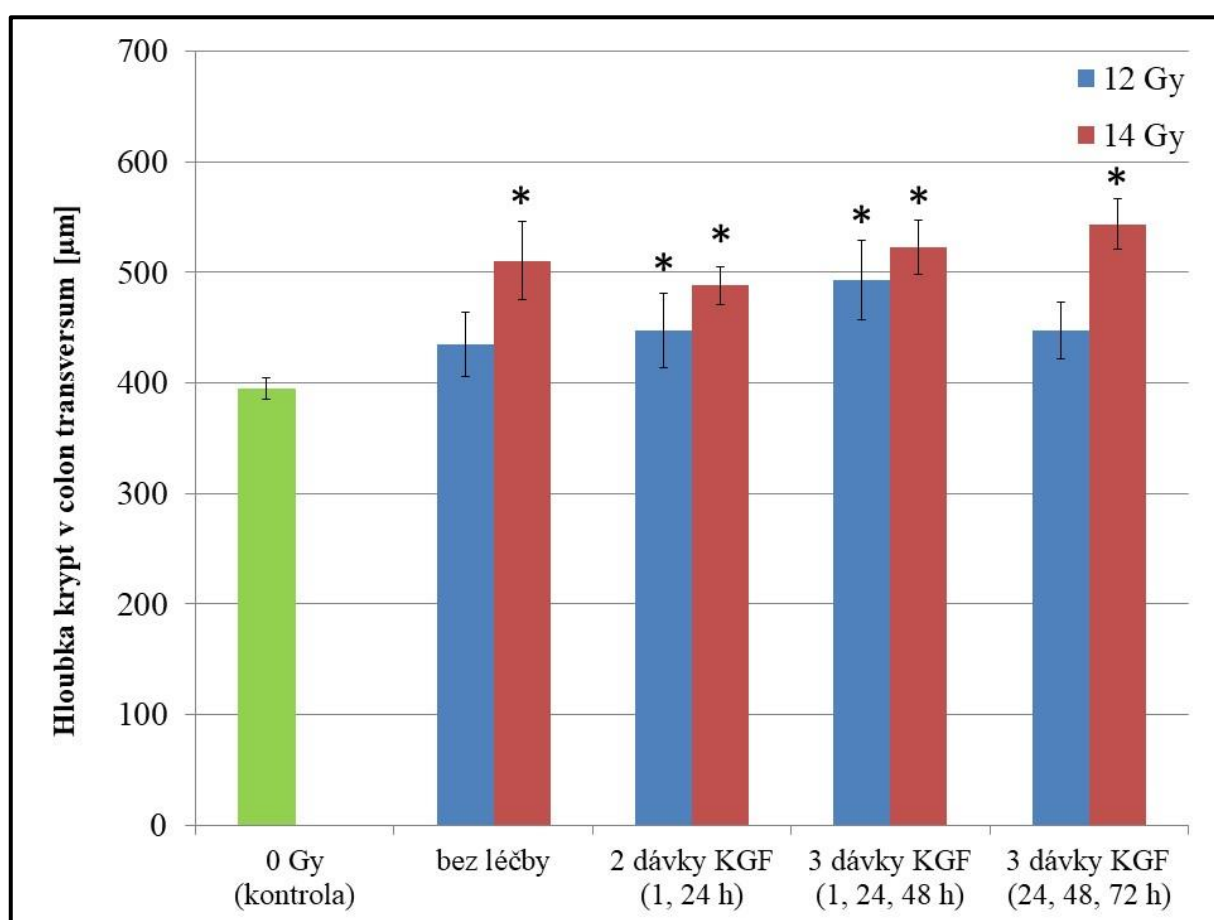
#### 4.2.5.2 Vliv KGF na hloubku krypt v colon transversum

Dávka 12 Gy nevedla k významné změně. Prodloužení krypt bylo proti kontrolní skupině patrné až po ozáření 14 Gy, kdy se tento ukazatel zvýšil o 29 % ( $p < 0,001$ ).

Oproti neléčeným skupinám nevedla aplikace KGF k významné změně tohoto parametru.

Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl, kdy skupina léčená 3 pozdními dávkami KGF byla o 11 % účinnější než 2dávkový režim ( $p = 0,047$ ; graf č. 8).

**Graf č. 15** Hloubka krypt v colon transversum experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

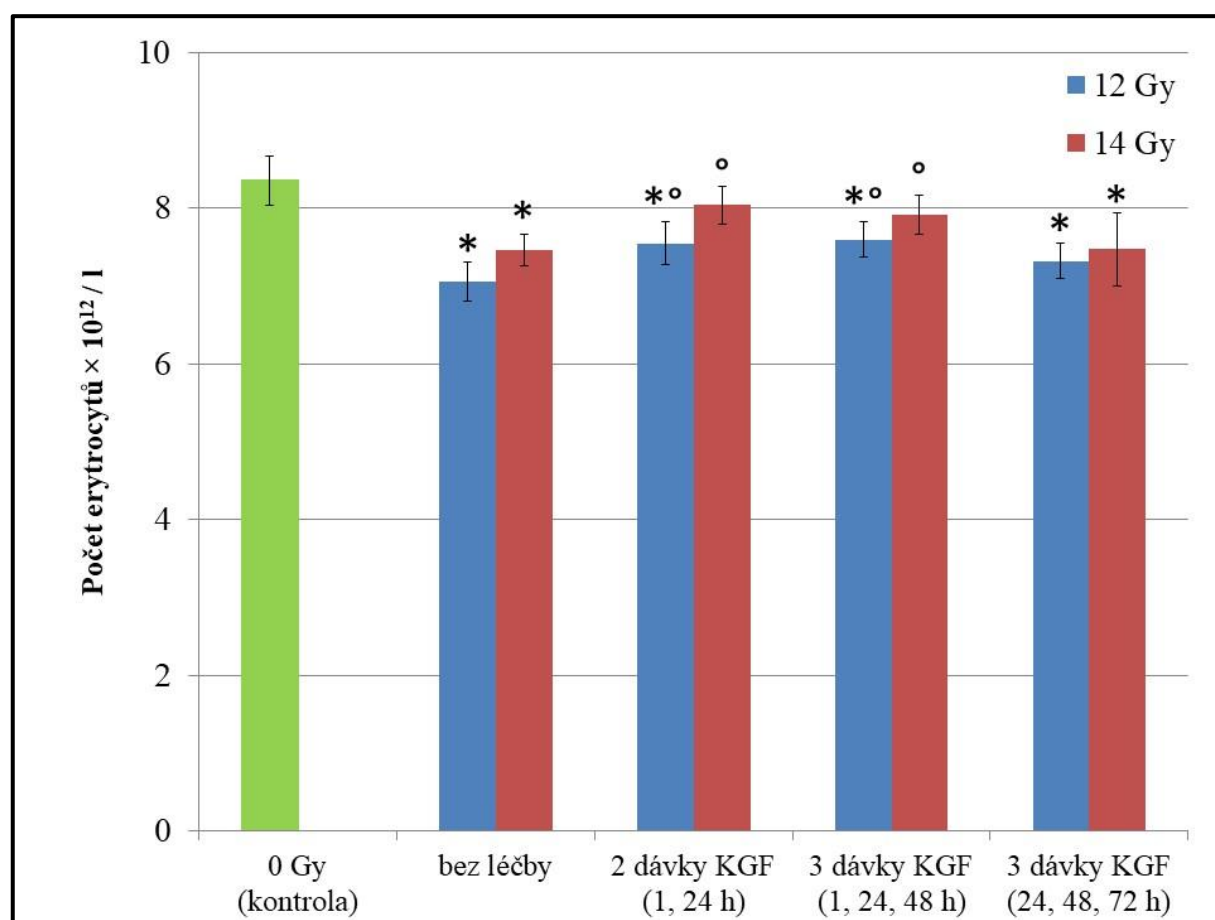
## 4.2.6 Krevní obraz

### 4.2.6.1 Vliv KGF na počet erytrocytů

Po ozáření došlo k poklesu počtu erytrocytů o 15 % při 12 Gy ( $p = 0,001$ ) a o 11 % při 14 Gy ( $p = 0,002$ ).

Množství těchto krevních buněk zaznamenalo ve srovnání s neléčenou skupinou vzestup při léčbě 2 (7 %,  $p = 0,038$ ) a 3 časnými dávkami KGF (8 %,  $p = 0,026$ ) po ozáření 12 Gy a při léčbě 2 (11 %,  $p = 0,022$ ) a 3 časnými dávkami KGF (8 %,  $p = 0,026$ ) po ozáření 14 Gy. Mezi léčenými skupinami nebyly významné rozdíly pozorovány (graf č. 16).

**Graf č. 16** Počet erytrocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

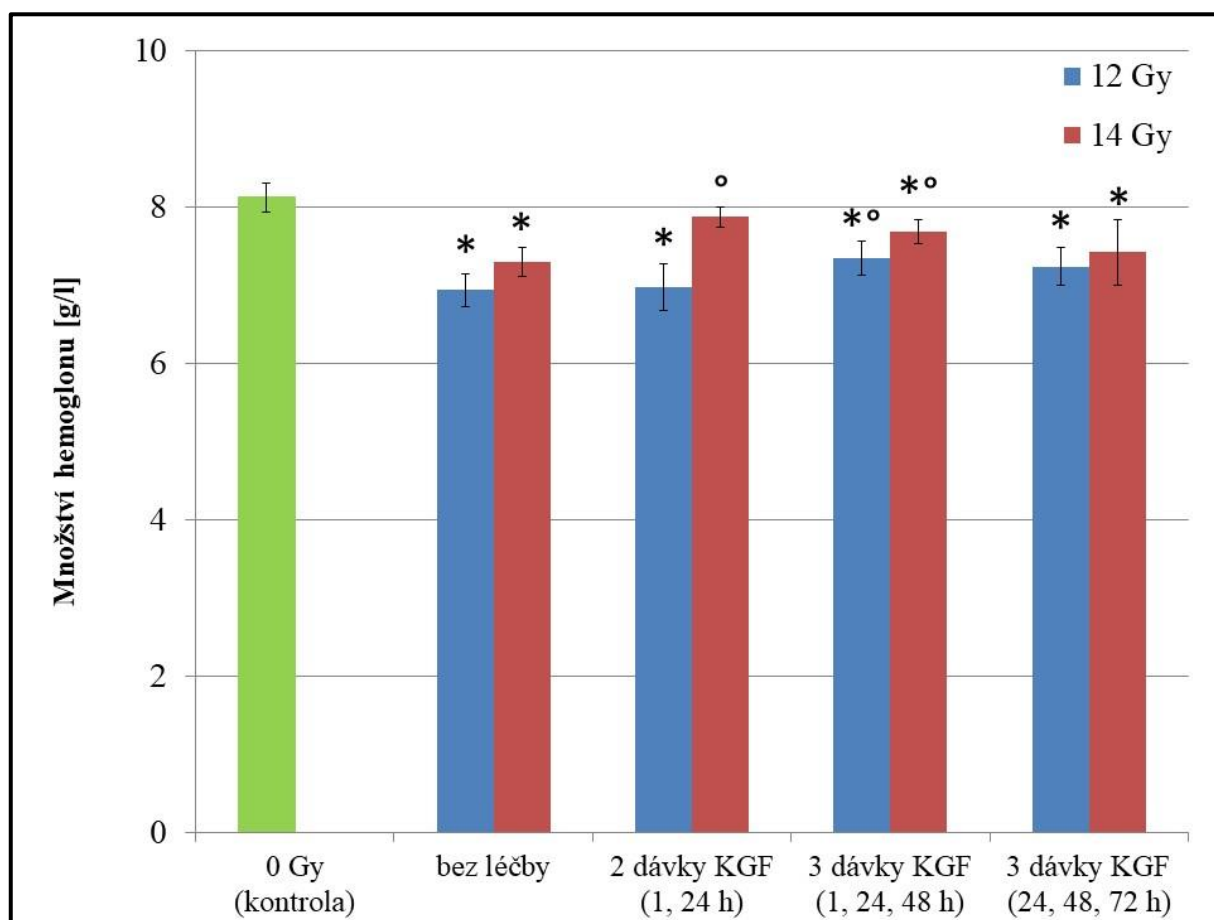
#### 4.2.6.2 Vliv KGF na množství hemoglobinu

Koncentrace hemoglobinu v krvi zaznamenala 14% a 10% (obě  $p = 0,001$ ) snížení po ozáření 12, respektive 14 Gy.

Oproti ozářené neléčené skupině se zvýšila hodnota tohoto ukazatele o 6 % ( $p = 0,038$ ) po ozáření 12 Gy při léčbě 3 časnými dávkami KGF a o 8 % ( $p = 0,001$ ) a 5 % ( $p = 0,017$ ) při 14 Gy po podání 2, respektive 3 časných dávek KGF.

Mezi léčenými skupinami rozdíly pozorovány nebyly (graf č. 17).

**Graf č. 17** Množství hemoglobinu experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$



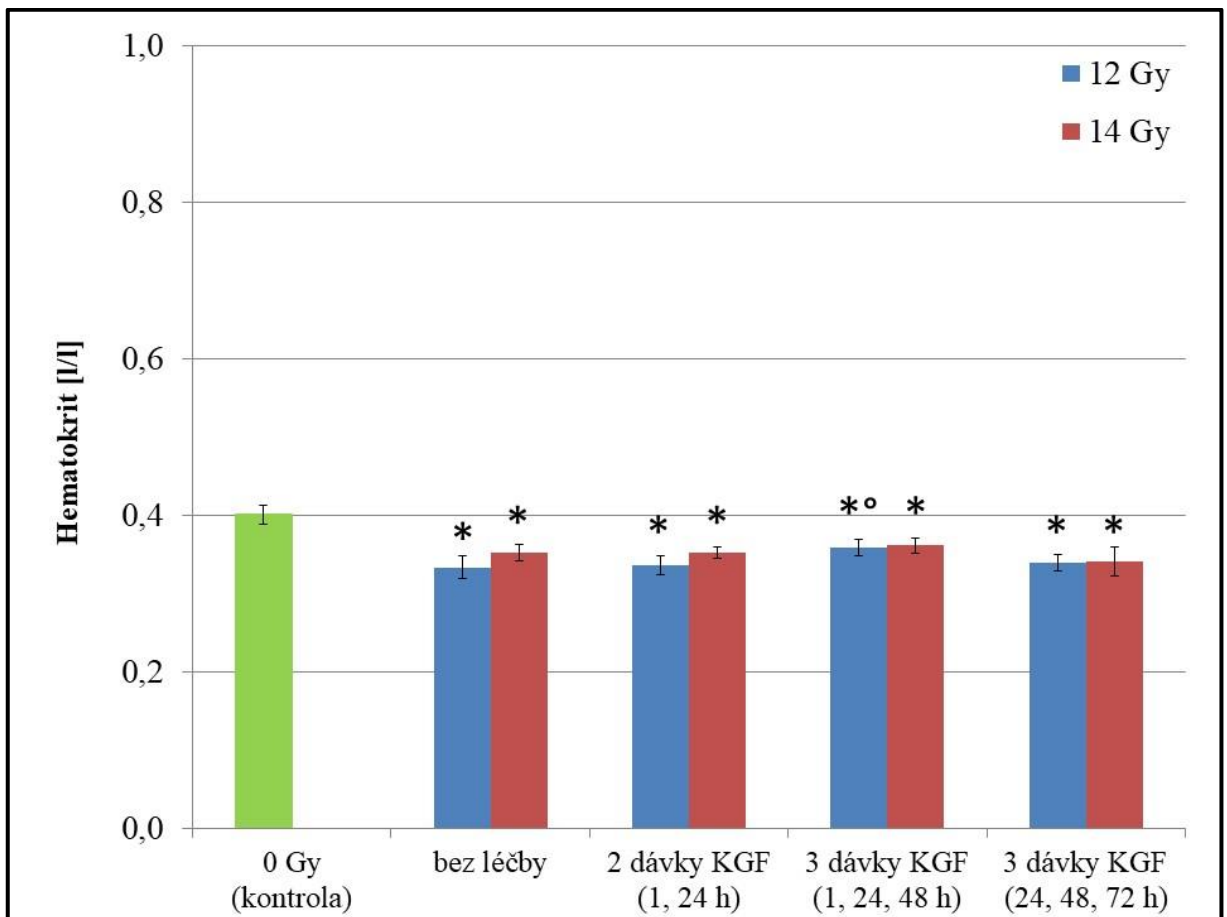
#### 4.2.6.3 Vliv KGF na hematokrit

Ve srovnání s neozářenou kontrolou klesl hematokrit myši klesl po ozáření 12 a 14 Gy o 17 %, respektive 12 % (obě  $p = 0,001$ ).

Oproti ozářené neléčeným skupinám se zvýšila hodnota tohoto ukazatele pouze při léčbě 3 časnými dávkami KGF po ozáření 12 Gy, a to o 8 % ( $p = 0,038$ ). Pokles hematokritu u tohoto dávkového režimu byl oproti 2 časnými dávkama a 3 pozdním dávkám o 7 % ( $p = 0,017$ ), respektive 6 % ( $p = 0,038$ ) nižší.

Při 14 Gy signifikantní rozdíly mezi ozářenými skupinami zaznamenány nebyly (graf č. 18).

**Graf č. 18** Hematokrit experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: <sup>o</sup>  $p \leq 0,05$

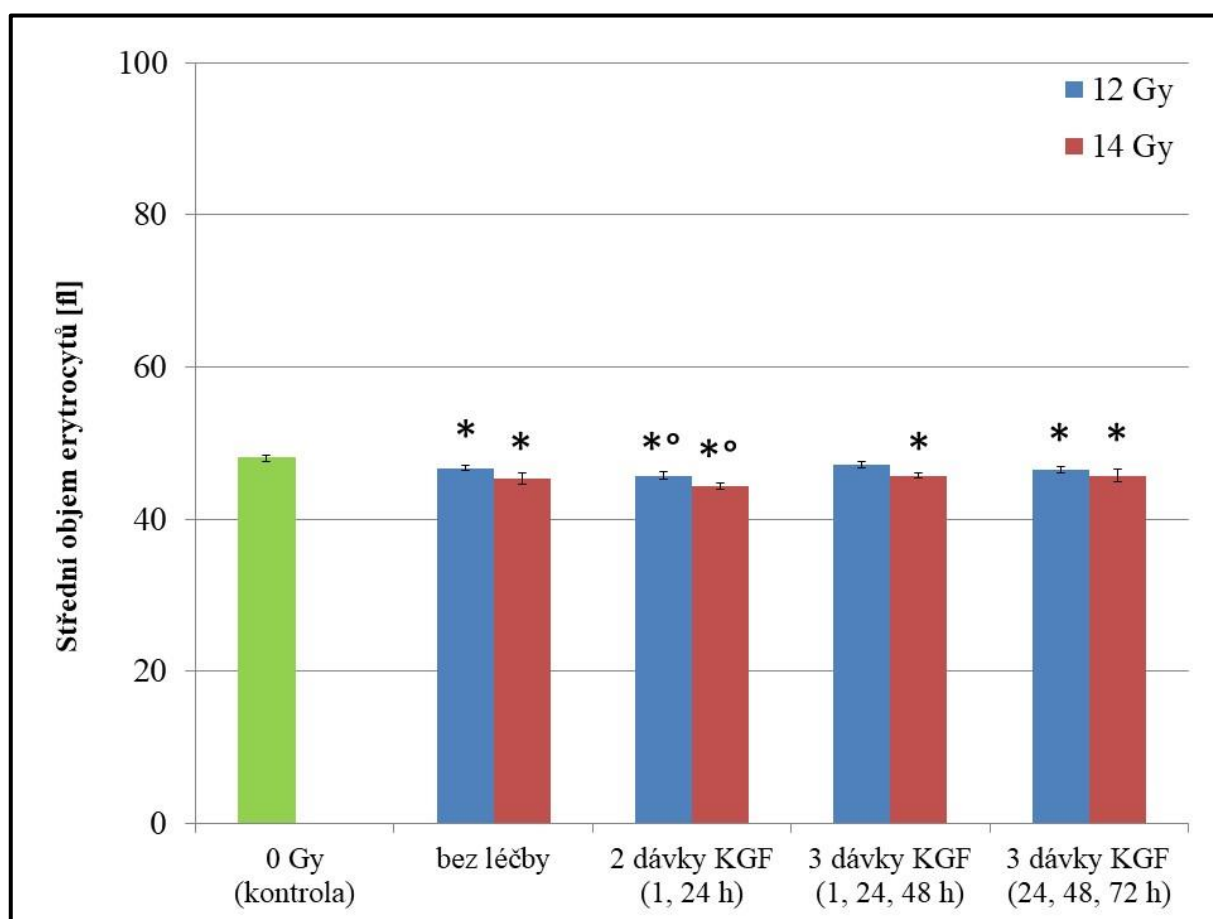
#### 4.2.6.4 Vliv KGF na střední objem erytrocytů

Ozáření 12 a 14 Gy signifikantně snížil střední objem erytrocytů o 3 % ( $p = 0,002$ ), respektive 6 % ( $p = 0,001$ ).

Při 12 Gy se snížila hodnota tohoto ukazatele po léčbě 2 časnými dávkami KGF o 2 % ve srovnání s neléčenou skupinou a o 3 % oproti 3 časným dávkám (obě  $p = 0,007$ ).

Po ozáření 14 Gy vykazoval tento parametr obdobný pokles po léčbě 2 časnými dávkami (2 %,  $p = 0,035$ ). U této skupiny byla hodnota středního objemu erytrocytů o 3 % nižší i ve srovnání s 3 časnými a 3 pozdními dávkami KGF ( $p = 0,002$  a  $0,014$ ; graf č. 19).

**Graf č. 19** Střední objem erytrocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

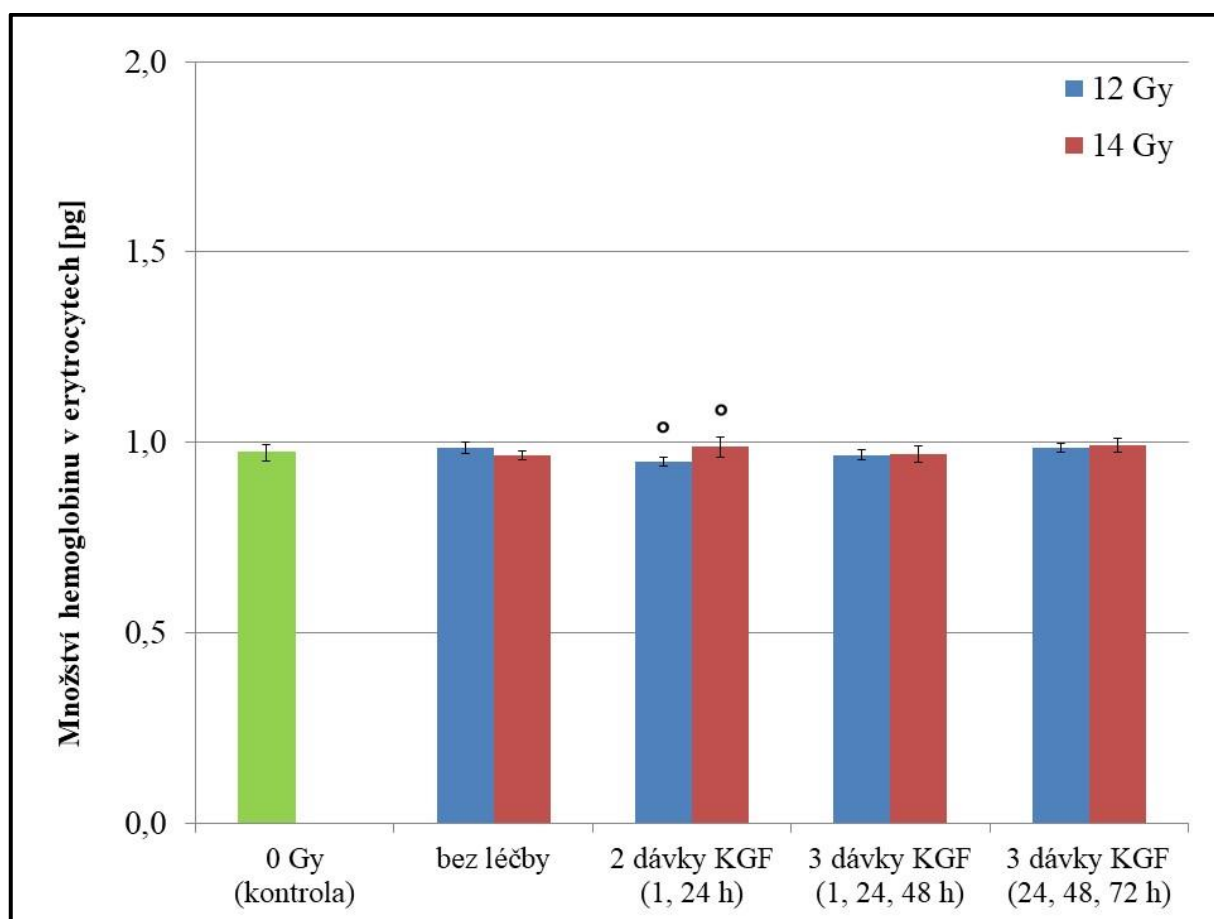
#### 4.2.6.5 Vliv KGF na množství hemoglobinu v erythrocytech

Oproti kontrolním skupinám nevyvolalo ozáření 12 a 14 Gy u testovaných zvířat změnu v množství hemoglobinu v erythrocytech.

V porovnání s ozářenými neléčenými skupinami byl signifikantní rozdíl pozorován pouze po aplikaci 2 časných dávek KGF, kdy se tento ukazatel snížil o 4 % při 12 Gy ( $p = 0,007$ ) a naopak zvýšil o 2 % při 14 Gy ( $p = 0,035$ ).

Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl, kdy skupina léčená 2 časnými dávkami růstového faktoru po ozáření 12 Gy vykazovala o 4 % vyšší pokles než skupina, které byly podány 3 pozdní dávky KGF ( $p = 0,004$ ; graf č. 20).

**Graf č. 20** Množství hemoglobinu v erythrocytech experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

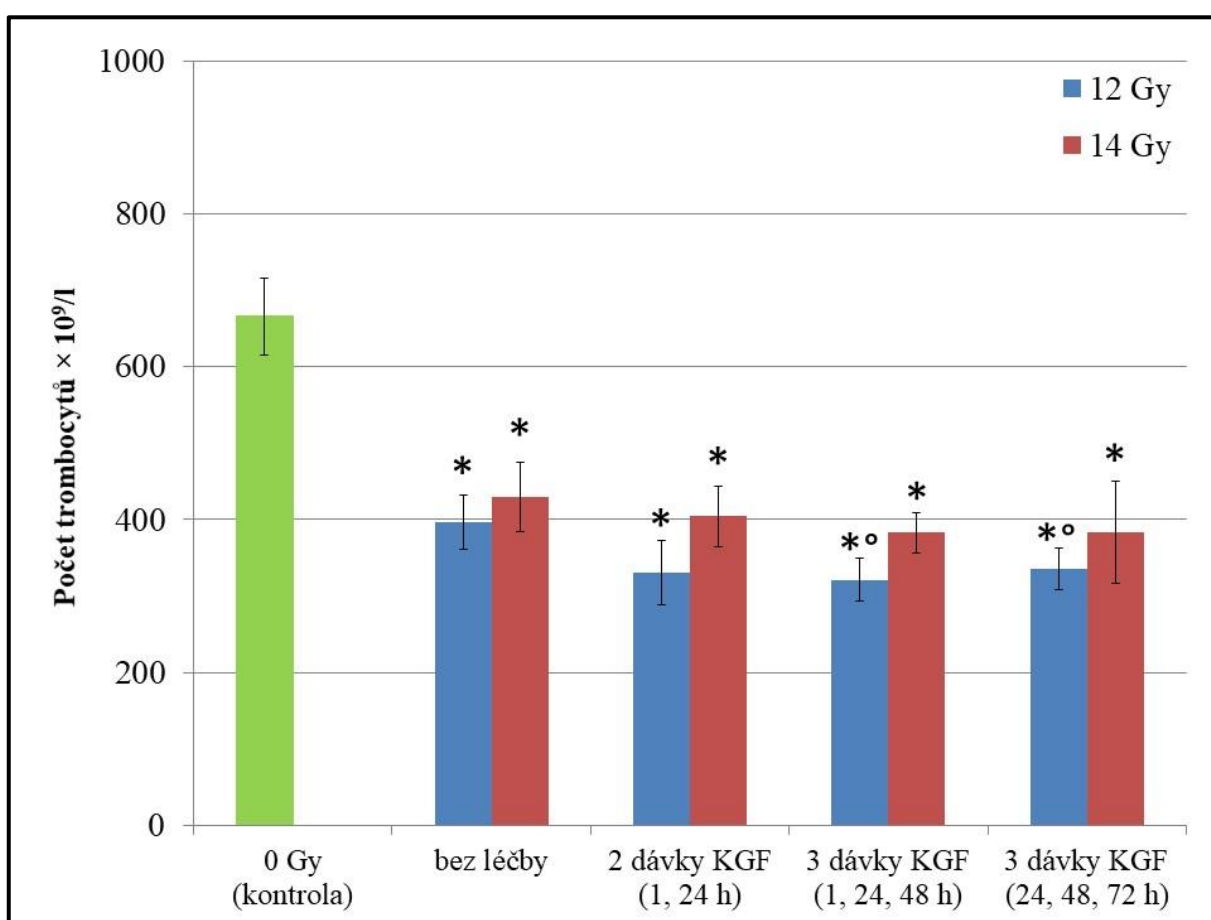
#### 4.2.6.6 Vliv KGF na počet trombocytů

Po ozáření 12 a 14 Gy nastal u laboratorních zvířat signifikantní pokles počtu trombocytů o 40 % a 36 % (obě  $p = 0,001$ ).

Léčba KGF vyvolala změny pouze po ozáření 12 Gy, kdy, na rozdíl od neléčených zvířat, tento ukazatel klesl po podání 3 časných a 3 pozdních dávek o dalších 19 % ( $p = 0,007$ ), respektive 15 % ( $p = 0,026$ ).

Mezi léčenými skupinami rozdíly pozorovány nebyly (graf č. 21).

**Graf č. 21** Počet trombocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

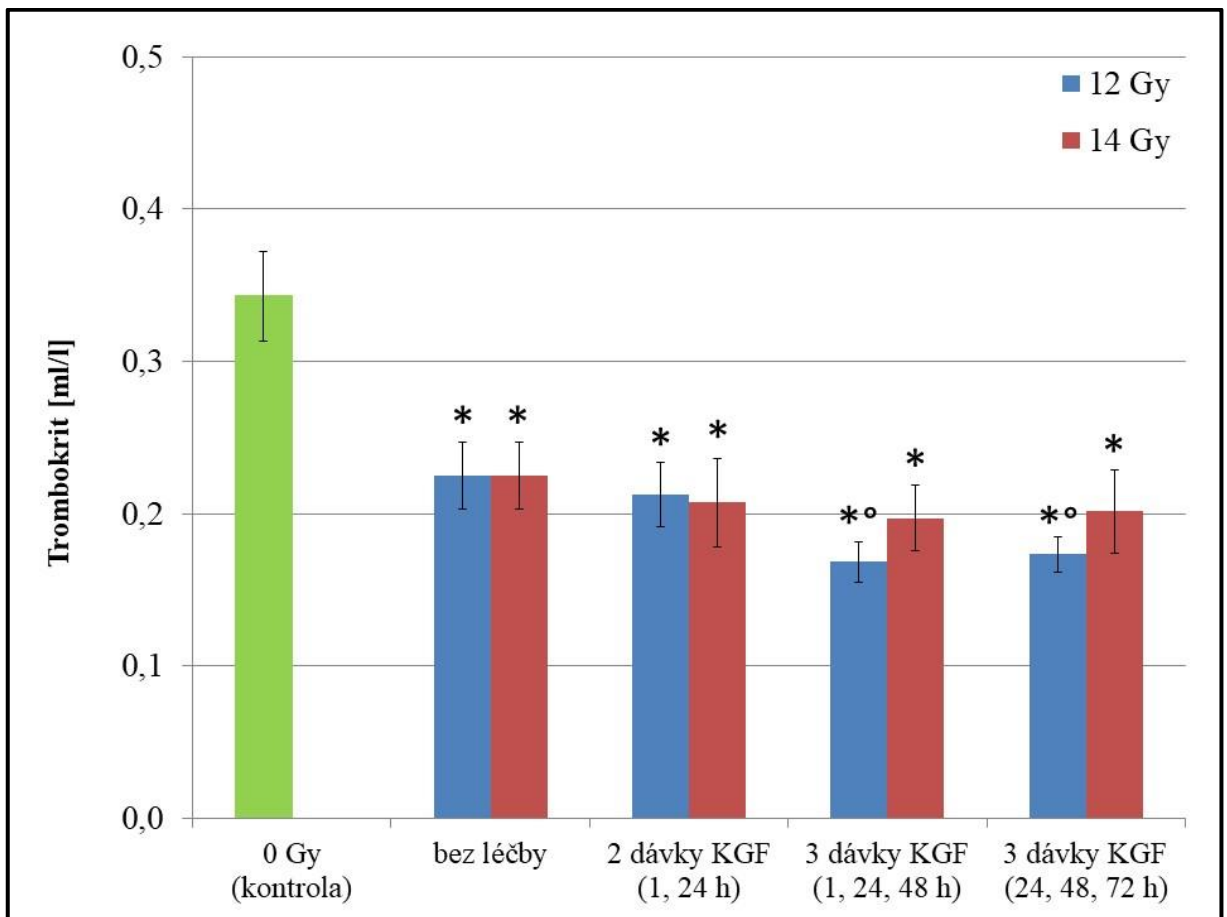
#### 4.2.6.7 Vliv KGF na trombokrit

Trombokrit vykazoval 66% a 34% pokles po ozáření dávkou 12, respektive 14 Gy (obě  $p = 0,001$ ).

Léčba KGF vyvolala, podobně jako v případě počtu trombocytů, změny pouze po ozáření 12 Gy. Na rozdíl od neléčených zvířat tento ukazatel klesl po podání 3 časných a 3 pozdních dávek o dalších 25 % ( $p = 0,002$ ), respektive 23 % ( $p = 0,002$ ). Obě tyto skupiny vykazovali statistickou odlišnost oproti časnému 2 dávkovému režimu (o 26 %, respektive 22 %, obě  $p = 0,004$ ).

Mezi skupinami ozářeními 14 Gy rozdíly pozorovány nebyly (graf č. 22).

**Graf č. 22** Trombokrit experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

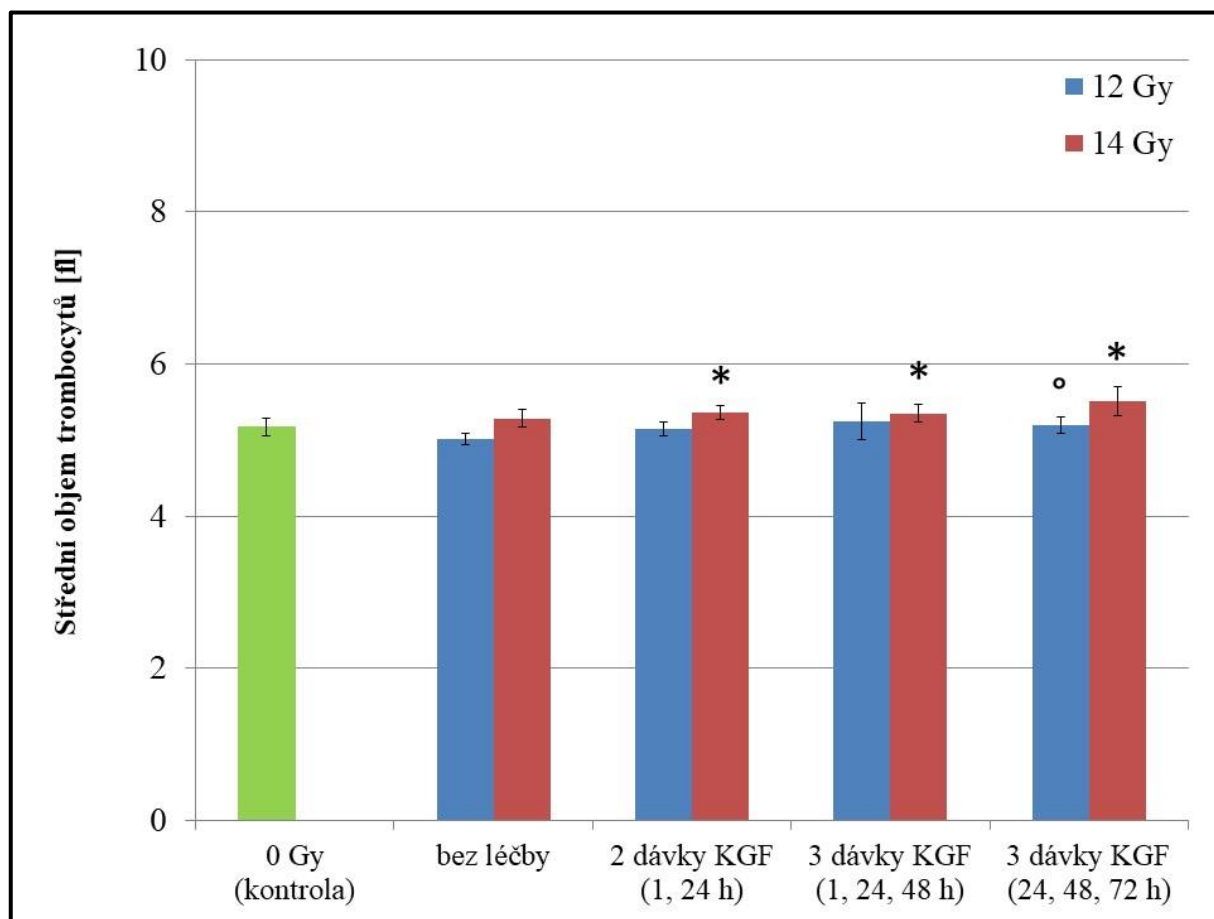
#### 4.2.6.8 Vliv KGF na střední objem trombocytů

Po ozáření dávkami 12 a 14 Gy nedošlo k signifikantní změně středního objemu trombocytů.

V porovnání k ozářeným neléčeným zvířatům lze nalést jediný signifikantní rozdíl po ozáření 12 Gy při použití 3 pozdních dávek KGF, kdy hodnota tohoto parametru vzrostla o 4 % ( $p = 0,026$ ).

Pokud bychom hodnotily léčené skupiny mezi sebou u jednotlivých dávek, rozdíly nalezeny nebyly (graf č. 23).

**Graf č. 23** Střední objem trombocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

Statisticky významný proti ozářené skupině bez léčby: °  $p \leq 0,05$

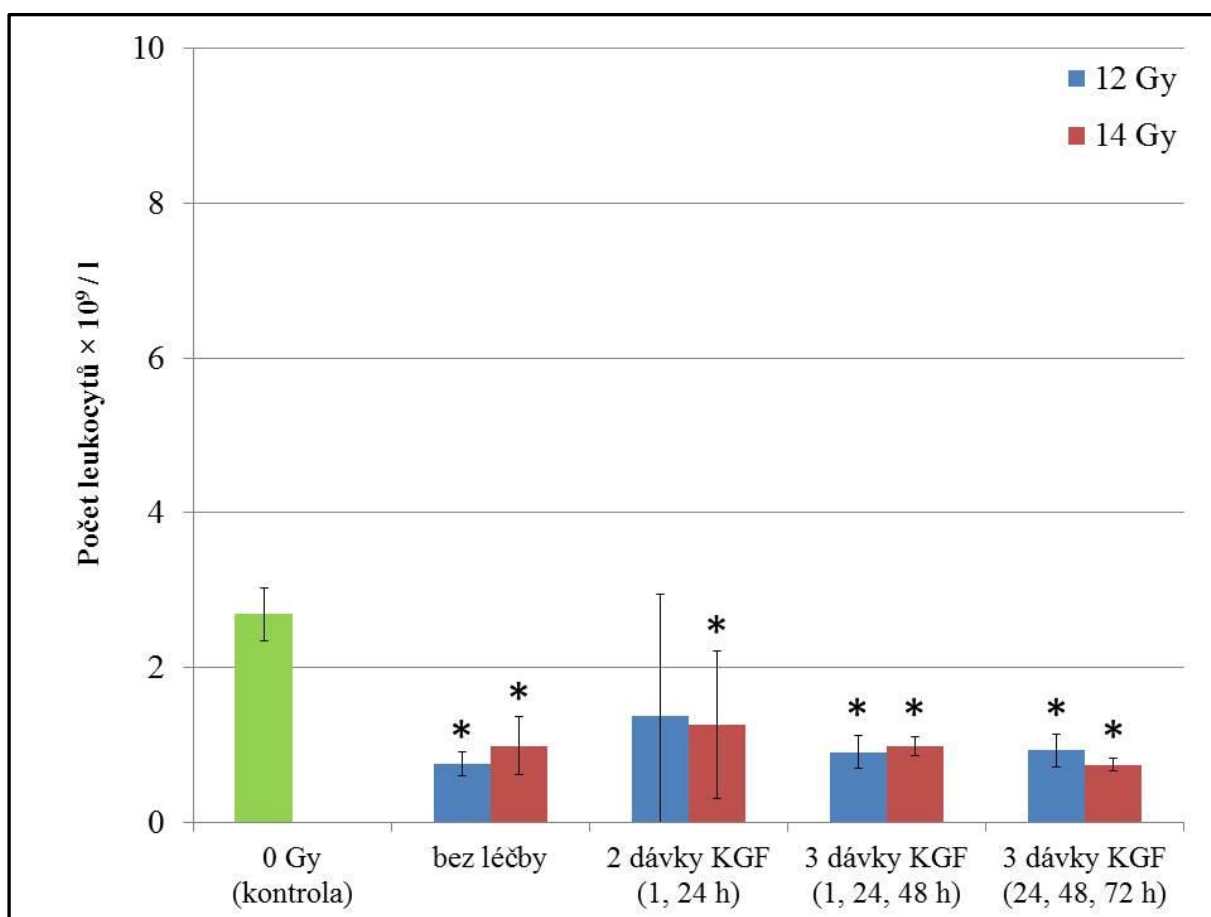
#### 4.2.6.9 Vliv KGF na počet leukocytů

Množství leukocytů kleslo po ozáření 12 a 14 Gy o 72 %, respektive 63 % (obě  $p = 0,001$ ).

Oproti neléčeným skupinám nevedla aplikace KGF k významné změně.

V rámci léčených skupin byl pozorován signifikantní rozdíl pouze mezi 3 časným a 3 pozdními dávkami KGF po ozáření 14 Gy. Časná léčba vedla k o 25 % nižšímu propadu počtu leukocytů ( $p = 0,026$ ; graf č. 24).

**Graf č. 24** Počet leukocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF

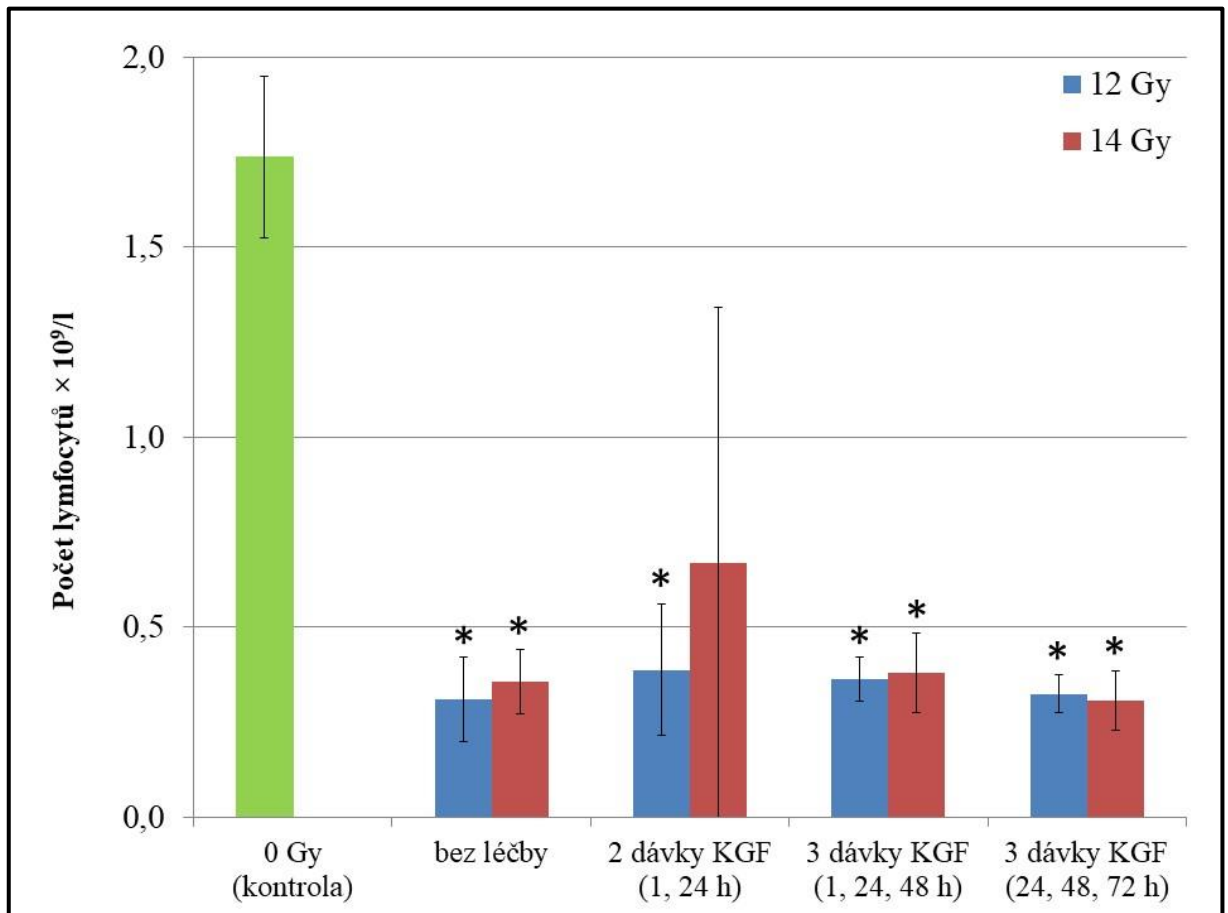


Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

#### 4.2.6.10 Vliv KGF počet lymfocytů

Počet lymfocytů zaznamenal 82% a 81% propad při dávce 12 a 14 Gy (obě  $p = 0,001$ ). Oproti neléčeným skupinám nevedla aplikace KGF k signifikantní změně. Mezi léčenými skupinami nebyl významný rozdíl pozorován (graf č. 25).

**Graf č. 25** Počet lymfocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$



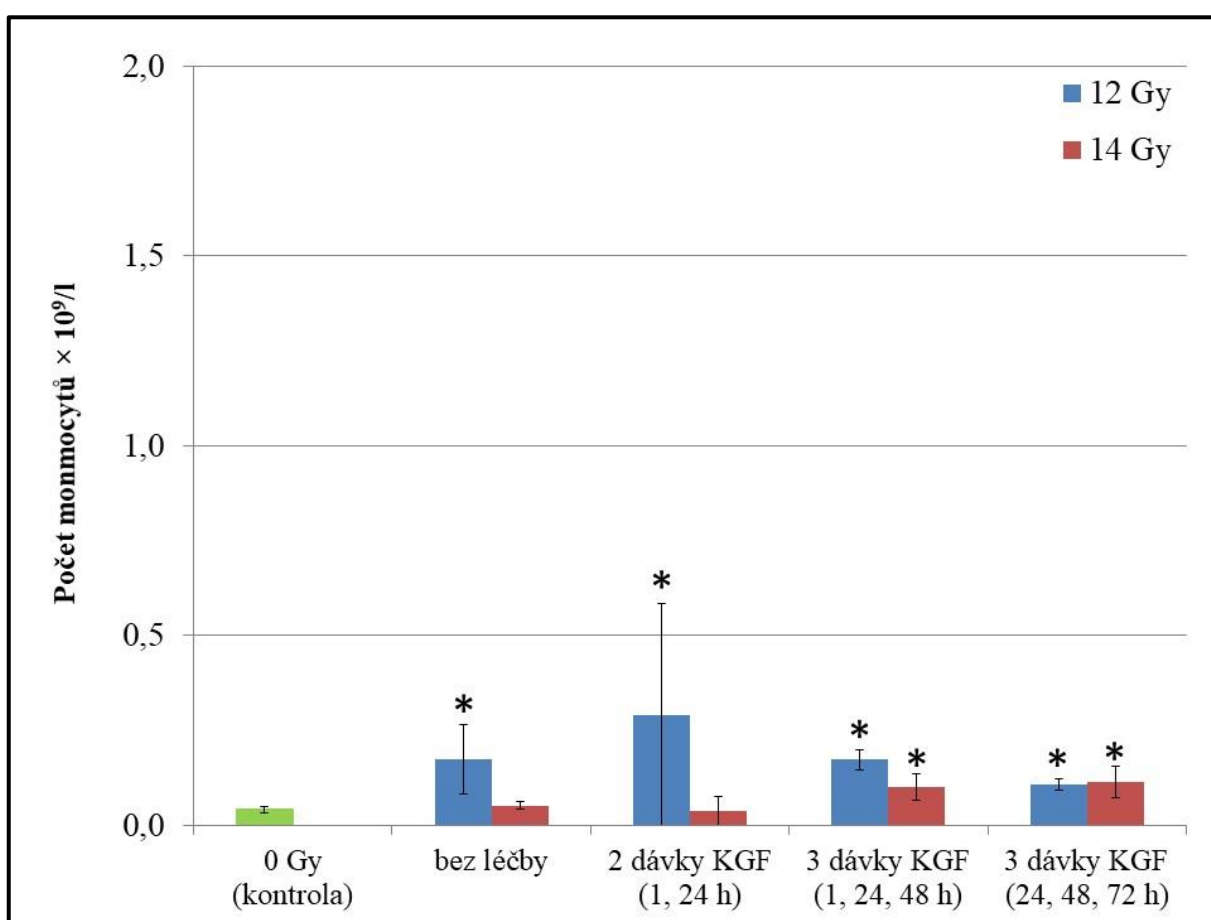
#### 4.2.6.11 Vliv KGF na počet monocytů

Oproti neozářené kontrole došlo po aplikaci 12 Gy ke značnému signifikantnímu nárůstu monocytů o 321 %. Naproti tomu dávka 14 Gy nevyvolala žádné početní změny hodnot.

Oproti ozářeným neléčeným skupinám nevykazovala aplikace KGF k signifikantní vliv.

Při zhodnocení léčených skupin mezi sebou byly nalezeny významné odlišnosti pouze při srovnání 3 časných a 3 pozdních dávek KGF při ozáření 12 Gy (61 % rozdíl,  $p = 0,002$ ) a mezi 2 časnými a 3 pozdními dávkami KGF při 14 Gy (300% rozdíl,  $p = 0,030$ ; graf č. 26).

**Graf č. 26** Počet monocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

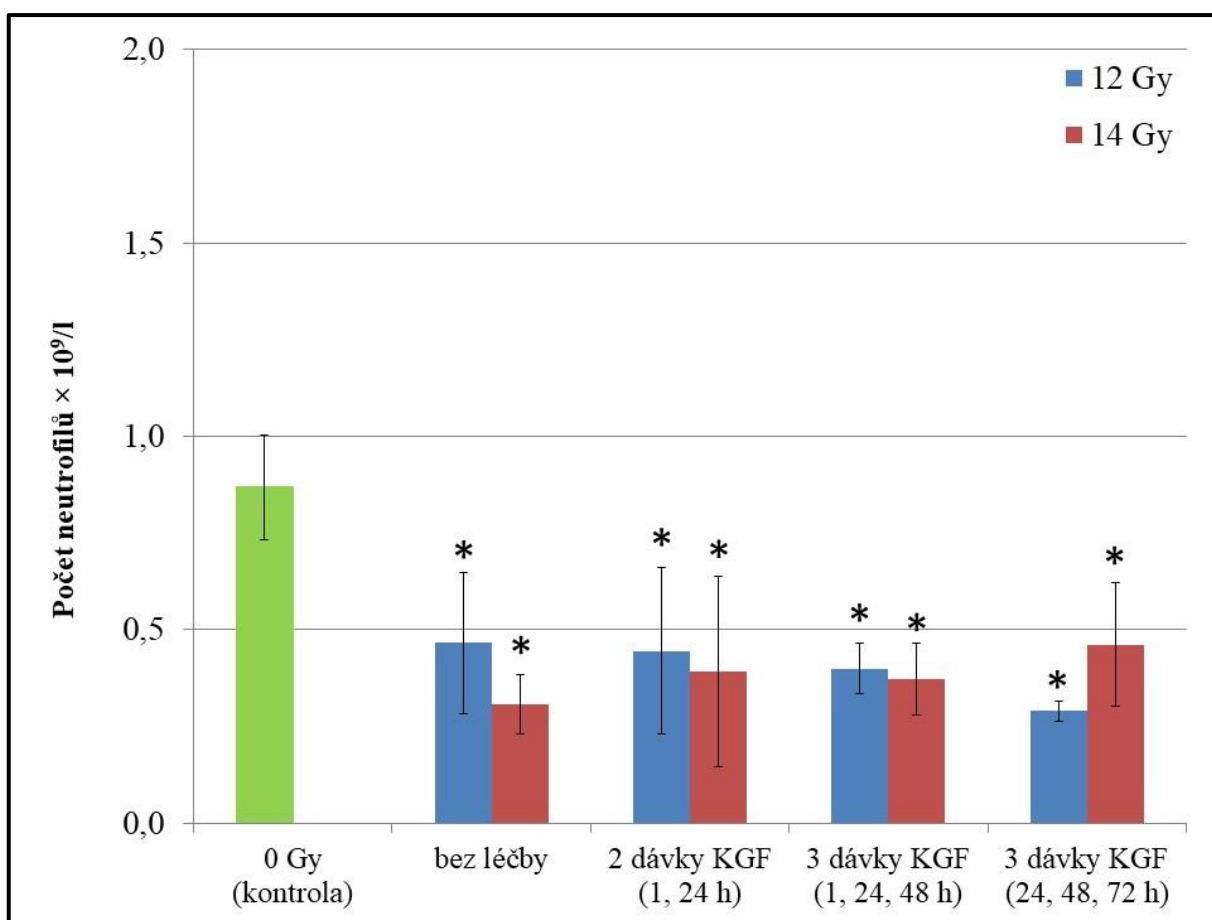
#### 4.2.6.12 Vliv KGF na počet neutrofilních granulocytů

Ozáření dávkami 12 a 14 Gy vyvolalo ve srovnání s kontrolou 46% ( $p = 0,038$ ), respektive 65% ( $p = 0,001$ ) pokles neutrofilů v krevním obraze experimentálních zvířat.

Léčba KGF u žádné z dávek vliv nevykazovala.

Mezi léčenými skupinami byl nalezen pouze jediný rozdíl. Časná aplikace 3 dávek KGF po ozáření 12 Gy snížila pokles o 38 % ( $p = 0,011$ ) oproti pozdnímu podání (graf č. 27).

**Graf č. 27** Počet neutrofilních granulocytů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

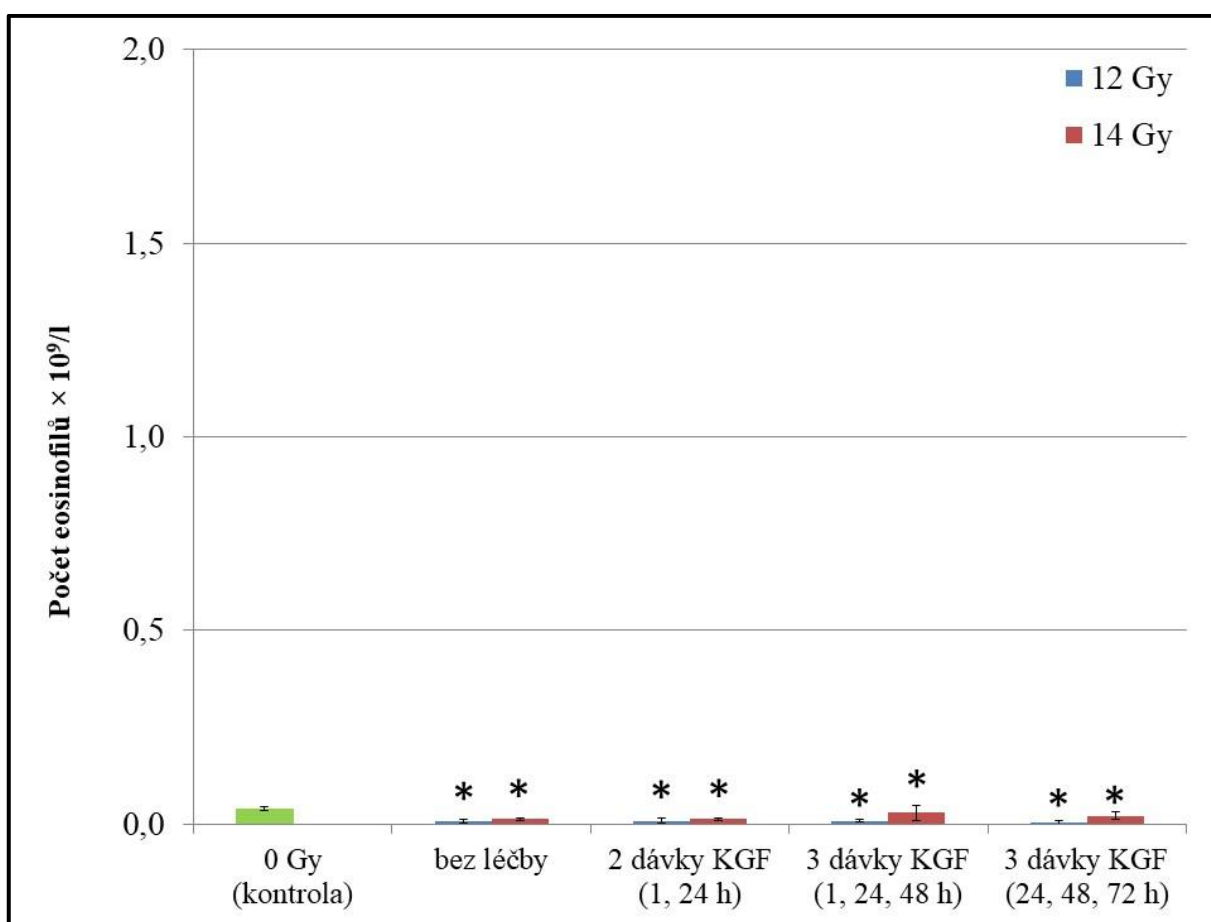
#### 4.2.6.13 Vliv KGF na počet eozinofilů

Signifikantní snížení počtu eozinofilů v krevním obraze bylo zaznamenáno po expozici 12 Gy (o 79 %,  $p = 0,001$ ) a 14 Gy (o 67 %,  $p = 0,001$ ).

Podání KGF u žádné z dávek vliv nevykazovalo.

Významné rozdíly nebyly nalezeny i mezi léčenými skupinami (graf č. 28).

**Graf č. 28** Počet eosinofilů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozařené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

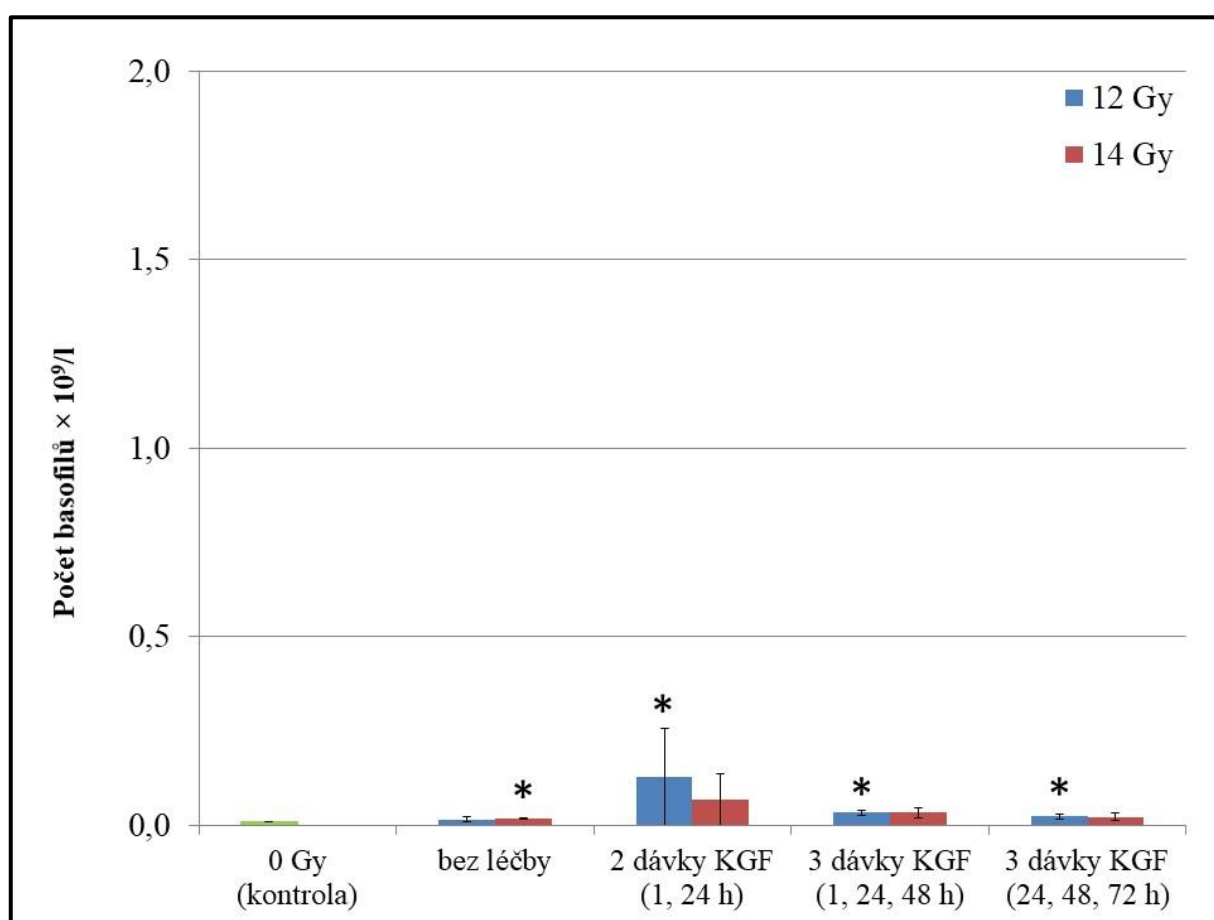
#### 4.2.6.14 Vliv KGF na počet basofilů

Dávka 12 Gy nevedla k významné změně. Nárůst basofilů proti kontrolní skupině byl patrný až po ozáření 14 Gy, kdy se tento ukazatel zvýšil o 83 % ( $p = 0,004$ ).

Oproti neléčeným skupinám nevedla aplikace KGF k významné změně.

Mezi léčenými skupinami byl pozorován jediný rozdíl, kdy skupina léčená 3 časnými dávkami KGF po ozáření 12 Gy zaznamenala o 50 % vyšší hodnotu tohoto krevního ukazatele ve srovnání s 3 pozdními dávkami růstového faktoru ( $p = 0,038$ ; graf č. 8).

**Graf č. 29** Počet basofilů experimentálních zvířat 6. den po jednorázovém ozáření dávkou 12 a 14 Gy s krytím hlavy v závislosti na podání KGF



Statisticky významný rozdíl proti neozářené kontrolní skupině: \*  $p \leq 0,05$

#### 4.2.7 Celkové zhodnocení signifikantních změn ve střevní sliznici

Tabulky č. 12 a 13 byly vytvořeny pro celkové zhodnocení účinku KGF aplikovaného v jednotlivých dávkovacích režimech na regeneraci střevní sliznice (tabulka č. 13) a zhodnocení účinnosti mezi sebou (tabulka č. 14)

Výsledné skóre regenerace bylo po ozáření dávkou 12 Gy 3, 6 a 3 po aplikaci 2 a 3 časných, respektive 3 pozdních dávek KGF.

Podání KGF po ozáření 14 Gy k pozitivním hodnotám skóre regenerace nepřispělo.

**Tabulka č. 13** Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při léčbě KGF oproti ozářené neléčené skupině v experimentálním modelu 2

ukazatel		skupina					
		12 Gy			14 Gy		
		2 D	3 D	3 DP	2 D	3 D	3 DP
váha		↑	↑	↑			
duodenum	počet krypt						
	hloubka krypt		↑				
	délka klků	↑	↑	↑		↑	
jejunum	počet krypt						
	hloubka krypt						
	délka klků		↑				
ileum	počet krypt						
	hloubka krypt		↑	↑			
colon	délka klků	↑	↑				
	počet krypt				↓	↓	↓
transversum	hloubka krypt						
<b>celkové skóre</b>		<b>3</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>

↑ signifikantní vzestup a ↓ signifikantní pokles proti ozářené neléčené skupině  
D – časný dávkový režim, DP – dávkový režim podaný s latencí

Časná aplikace 3 dávek KGF vykazovala nejvyšší účinnost, zejména při ozáření 12 Gy (tabulka č. 13).

**Tabulka č. 14** Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při porovnání časného 2 dávkového a pozdního 3 dávkového režimu proti časné aplikaci 3 dávek KGF

ukazatel		skupina			
		12 Gy		12 Gy	
		2 D	3 D <sub>P</sub>	2 D	3 D <sub>P</sub>
váha					
<b>duodenum</b>	počet krypt				
	hloubka krypt				
	délka klků	↓	↓	↓	
<b>jejunum</b>	počet krypt	↓			
	hloubka krypt				
	délka klků	↓	↓		
<b>ileum</b>	počet krypt		↓		
	hloubka krypt				
	délka klků	↓	↓		
<b>colon transversum</b>	počet				
	hloubka krypt				
<b>celkové skóre</b>		<b>-4</b>	<b>-4</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>

↓ signifikantní pokles proti ozářené skupině léčené 3 časnými dávkami KGF  
D – časný dávkový režim, D<sub>P</sub> – dávkový režim podaný s latencí

#### 4.2.8 Celkové zhodnocení signifikantních změn v krevním obraze

Tabulky č. 14 a 15 byly vytvořeny pro celkové zhodnocení účinku KGF aplikovaného v jednotlivých dávkovacích režimech na obnovu krevních elementů (tabulka č. 15) a zhodnocení účinnosti mezi sebou (tabulka č. 16).

Výsledné skóre regenerace bylo po aplikaci 2 a 3 časných, respektive 3 pozdních dávek KGF 1, 0, respektive -1 po ozáření dávkou 12 Gy a 1, 1, respektive 0 po ozáření 14 Gy.

Časná aplikace 3 dávek KGF vykazovalo vyšší účinnost jen při srovnání s pozdním podáním po ozáření 12 Gy (tabulka č. 16).

**Tabulka č. 15** Signifikantní změny v krevním obraze pozorované při léčbě KGF oproti ozářené neléčené skupině v experimentálním modelu 2

ukazatel	skupina					
	12 Gy			14 Gy		
	2 D	3 D	3 D <sub>P</sub>	2 D	3 D	3 D <sub>P</sub>
erythrocyty	↑	↑		↑	↑	
trombocyty		↓	↓			
lymfocyty						
monocyty						
neutrofilly						
eozinofily						
basofily						
<b>celkové skóre</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>

↑ signifikantní vzestup a ↓ signifikantní pokles proti ozářené neléčené skupině  
D – časný dávkový režim, D<sub>P</sub> – dávkový režim podaný s latencí

Hodnoceny jsou pouze počty jednotlivých krevních elementů

**Tabulka č. 16** Signifikantní změny střevních ukazatelů pozorované při porovnání časného 2 dávkového a pozdního 3 dávkového režimu proti časně aplikaci 3 dávek KGF

ukazatel	skupina			
	12 Gy		14 Gy	
	2 D	3 D <sub>P</sub>	2 D	3 D <sub>P</sub>
erythrocyty				
trombocyty				
lymfocyty				
monocyty		↓		
neutrofilly		↓		
eozinofily				
basofily		↓		
<b>celkové skóre</b>	<b>0</b>	<b>-3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

↓ signifikantní pokles proti ozářené skupině léčené 3 časnými dávkami KGF

D – časný dávkový režim, D<sub>P</sub> – dávkový režim podaný s latencí

Hodnoceny jsou pouze počty jednotlivých krevních elementů

## Diskuze

5 Úkolem diplomová práce bylo vyhodnotit možnosti modulace poškození střevní sliznice vyvolané ionizujícím zářením pomocí KGF. V experimentech byl použit KGF ve formě paliferminu. Palifermin je farmakum dostupné v humánní medicíně pod obchodním názvem Kepivance a je indikován za účelem protekce sliznice dutiny ústní před rozvojem mukositivity po myeloablativní chemoradioterapii u hematologických malignit (Radtke a Kolesar, 2005).

Oproti endogennímu KGF se tento polypeptid liší délkou řetězce, která je zkrácená o 23 N – terminálních aminokyselin. Díky této modifikaci je zvýšena stabilita molekuly a její poločas eliminace je prodloužen na 4,5 h (3,3 – 5,7 h; Rzepecki *et al.*, 2009). Palifermin se v epiteliálních tkáních váže na stejný receptor jako endogenní KGF, proto je mu možné přisuzovat srovnatelné biologické účinky, které zahrnují například posílení pevnosti epiteliální bariéry, stimulace buněčné proliferace, migrace, diferenciací a indukce enzymů, zapojených do detoxikace ROS (Yildirim *et al.*, 2010). Tyto účinky s nejvyšší pravděpodobností vysvětlují radioprotektivní účinky tohoto růstového faktoru vůči střevní sliznici, pokud je aplikován před ozářením (Farrel *et al.*, 1998; Khan *et al.*, 1997). Takový scénář podání je ale neuskutečnitelný v případě nenadálých radiačních nehod vedoucích k náhodnému ozáření jedince. Do jaké míry však může palifermin sloužit jako radiomitigátor podaný po ozáření, není známo.

Odpovědí na tuto otázku se zabývá stávající diplomová práce. V ní byly hodnoceny 2 experimentální modely. K oběma byly použity samice myši kmene C57Bl/6J ozářené vysokými dávkami IZ s krytím hlavy a části krku. Neozáření této části těla vede k zachování dostatečně velkého množství nepoškozené kostní dřeně a je tak zabráněno rozvoji potenciálně letálního hematopoetického syndromu ANO, které by jinak v případě celotělového ozáření muselo být řešeno (s různým stupněm úspěšnosti) transplantací kostní dřeně (Filip *et al.*, 2009; Pejchal *et al.*, 2015).

V rámci prvního experimentu byly myši ozářeny dávkami 14, 15 a 16 Gy. Odpovědí u neléčených zvířat byly křivky přežívání s bifazickým charakterem průběhu. V této skupině došlo k prvnímu poklesu přežívání 6. – 11. den po ozáření. Jeho načasování v kontextu velikosti použité dávky IZ koresponduje s rozvojem gastrointestinální formy ANO (Gong *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2008). Ve druhé fázi byla pozorována úmrtí 119. – 242. den. Ačkoliv u zvířat nebyla provedena pitva k určení příčiny úmrtí, je vysoce pravděpodobné, že tato úmrtí mohla souviset s poškozením další kritické epitelové orgánové soustavy – respiračního systému. Po expozici hrudníku dávce  $\geq 12$  Gy dochází u samic myši kmene



C57BL/6J k rozvoji radiačního poškození plic (Jackson *et al.*, 2016). Toto poškození probíhá pod obrazem akutní pneumonitis nebo plicní fibrózy. V závislosti na dávce IZ se akutní radiační pneumonitis obvykle rozvíjí 1 – 6 měsíců po ozáření. K manifestaci radiační fibrózy plicní tkáně naopak dochází v intervalu 6 – 24 měsíců (Lierova *et al.*, 2018).

Podání paliferminu neovlivnilo významně přežívání zvířat po ozáření 14 a 15 Gy. Signifikantní změna byla pozorována pouze při 16 Gy a podání paliferminu v dávce 1 mg/kg, kdy došlo k snížení mediánu přežití o 2 dny. Mechanismus, který by tento jev vysvětloval, zůstává neznámý. Dávka 16 Gy se zdá být vysoce letální ze stran gastrointestinální formy akutní nemoci z ozáření (Booth *et al.*, 2012; Paris *et al.*, 2001). Přežití organismu po ozáření střev potenciálně letálními dávkami IZ závisí ve vysoké míře na tom, zdali po období progresivních ztrát, charakterizované indukci apoptózy a zástavou cyklu, je zachováno dostatečné množství viabilních krypt, z nichž by se sliznice mohla začít regenerovat (Kim *et al.*, 2017). Zástava buněčného cyklu v počáteční fázi je důležitá pro reparaci DNA (Hashimoto *et al.*, 2012). Pokud by však podání nižší dávky na druhou stranu vedlo ke stimulaci cyklu, aniž by tento stav byl dostatečně kompenzován anti-apoptotickým působením, mohla by obnova proliferace u buněk s přetrvávajícím poškozením DNA buněčnou smrt naopak indukovat (Darzynkiewicz *et al.*, 2012).

Ačkoliv palifermin na přežívání ozářeného organismu celkově vliv spíše nevykazoval, negativní signifikantní nálezy při 1 mg/kg paliferminu a literální zdroje často testující právě 5 mg/kg (Chen *et al.*, 2004; Farrel *et al.*, 1998; Brizel *et al.*, 1996), vedly k použití vyšší dávky růstového faktoru v druhém experimentálním modelu. U tohoto modelu byly dávky IZ sníženy na 12 a 14 Gy. Vzhledem k exponenciálnímu charakteru křivek přežívání buněčných populací po ozáření, redukce dávky IZ zákonitě vede k zachování většího poolu kmenových buněk a progenitorů, jejichž přítomnost je pro fungování terapie růstovými faktory nezbytná (Herodin a Drouet, 2005).

Odběr vzorků byl proveden v intervalu 6 dní po expozici IZ. V tenkém střevě bylo možné v tomto období pozorovat úbytek krypt. Za účelem kompenzace dochází ve zbývajících kryptách k zvýšení mitotické aktivity (Pejchal *et al.*, 2015), což se u našeho modelu projevilo prodloužením délky krypt. V duodenu při ozáření 12 Gy byla produkce nových buněk natolik intenzivní, že se to odrazilo v povrchovém kompartmentu zvýšením délky klků. Při zvýšení dávky na 14 Gy histopatologické změny dále progredovaly. Úbytek krypt ve studovaném intervalu byl výraznější, přičemž dle míry procentuálního poklesu se u samic myši kmene C57Bl/6J radiosenzitivita jednotlivých částí tenkého střeva zvyšuje od duodena směrem k ileu. U zbývajících viabilních krypt se jejich hloubka dále zvýšila, nedokázala již ale produkcí

nových buněk zcela zajistit potřeby klků, a proto délka klků naopak klesla. Ztráta krypt v tlustém střevě (colon transversum) byla ve srovnání s ostatními částmi gastrointestinálního systému nejnižší. Rovněž kompenzatorní prodloužení jejich hloubky bylo možné pozorovat až po ozáření 14 Gy.

Tlusté střevo vykazovalo tedy ze všech studovaných částí trávicího traktu nejvyšší stupeň radiorezistence, což je v souladu s dalšími studii (Cai *et al.*, 1997; Saha *et al.*, 2012). Mechanismy podmiňující radiorezistenci buněk tlustého střeva nejsou doposud přesně známy. Souvisí však s mírou aktivace p53/p21 signální dráhy po poškození DNA a expresí anti-apoptotických genů (Gibson *et al.*, 2005; Harfouche a Martin, 2010; Merritt *et al.*, 1995). S morfologickými změnami jsou také spojeny změny funkčního stavu. Je například narušena peristaltika, kontraktilní vlny jsou značně nepravidelné, klesá reabsorpce konjugovaných žlučových kyselin, převažuje dysbalance ve střevní mikroflóře a vzniká průjem (Classen *et al.*, 1998). S tím také zřejmě souvisí váhový propad ozářených zvířat pozorovaný u našeho modelu.

Podání paliferminu vykazovalo efekt v závislosti na dávce a části gastrointestinálního systému. Po ozáření 12 Gy zaznamenala aplikace tohoto růstového faktoru nižší váhový úbytek. Regenerační účinky bylo možné pozorovat v tenkém střevě. Prodloužila se hloubka krypt i délka klků. Palifermin tedy stimuloval jak proliferaci, tak diferenciaci nově tvořených buněk. Vyšší účinnost byla v duodenu a ileu nežli v jejunu. Odlišný účinek vykazovala i rozdílná dávkovací schémata. Pro zhodnocení jejich celkového dopadu ve střevě byly vytvořeny tabulky č. 13 a 14. Obě tabulky ukazují, že nejefektivnějším dávkovacím schématem bylo podání 3 dávek paliferminu 1, 24 a 48 h po ozáření. Výraznější účinnost proti 2 dávkám (1 a 24 h) naznačuje, že s počtem aplikovaných dávek se terapeutický dopad paliferminu stupňuje. Do jaké míry by však podání > 3 dávek dokázalo regeneraci střevní sliznice dále podpořit, zůstává neobjasněno. Pokud je však 3 dávkový režim aplikovaný opožděně (24, 48 a 72 h), jeho efektivita se snižuje. V tenkém střevě byl nejvyšší nárůst počtu apoptotických buněk pozorován 3 – 6 h po ozáření (Potten a Grant, 1998). Aby bylo možné zachránit maximální množství kmenových a progenitorových buněk, je tedy nutné s aplikací paliferminu začít co nejdříve po ozáření. Regenerační účinky paliferminu měly ale také své limity.

Při ozáření 12 Gy morfometrická analýza nezaznamenala jakoukoliv změnu stavu sliznice tlustého střeva. Při nárůstu dávky na 14 Gy palifermin svoji účinnost v tenkém střevě prakticky ztrácí. V tlustém střevě navíc dochází ke snížení počtu viabilních krypt. Mechanismus, který by tento nálezný vysvětloval, není znám. V každém případě podání

paliferminu osobám, u kterých došlo k expozici gastrointestinálního traktu potenciálně letálními dávkami, se proto nejeví jako perspektivní.

Dalším cílem experimentální části bylo zhodnotit vliv paliferminu na změny krevního obrazu po ozáření. I přes krytí hlavy experimentálních zvířat, byla podstatná část kostní dřeně zasažena vysokými dávkami IZ. Ke změnám došlo ve všech krevních řadách. Nejzásadnější byly zaznamenány v počtu lymfocytů. Lymfocyty jsou obecně považovány za nejcitlivější buňky krevního oběhu (Dainiak *et al.*, 2002). Po expozici IZ následovaly ztráty eozinofilů, granulocytů, trombocytů a erytrocytů. S poklesem počtu trombocytů korelovalo i snížení celkového trombokritu. Úbytek erytrocytů se zase odrazil do hodnot hematokritu a koncentrace hemoglobinu v krvi. Na druhou stranu to, jakým mechanismem došlo k snížení středního objemu erytrocytů, není jisté. Svoji roli mohlo sehrávat narušení metabolismu železa (DeLoughery, 2017; Xie *et al.*, 2016) nebo jen dehydratace a narušení minerální homeostázy (Faucherre *et al.*, 2014). Oproti výše zmíněným populacím bylo naopak pozorováno zvýšení počtu monocytů 6. den po ozáření 12 Gy a basofilů při 14 Gy. Monocyty jsou krevní buňky, které po stimulaci vykazují mitotickou aktivitu. Tvorba a uvolňování faktorů ozářenými tkáněmi, mohla při nižší dávce stimulovat jejich proliferaci a vést k jejich taxi směrem do oběhu (Langstein *et al.*, 2000). Důvod zvýšení počtu basofilů není znám.

Aplikace paliferminu vykazovala významný vliv pouze na erytrocyty a trombocyty (viz tabulky č. 15 a 16). Časná aplikace 2 a 3 časných dávek paliferminu zvýšila produkci erytrocytů, což se odrazilo do dalších parametrů jako je množství hemoglobinu či hematokrit. Tento výsledek koreluje s nálezem Wilse *et al.* (2012), jež hodnotili vliv KGF (200 µg/kg, 6 dávek) na thymopoézu a krevní obraz makaků po autologní transplantaci kmenových buněk kostní dřeně. Na druhou stranu byla v této studii pozorována i akcelerace obnovy leukocytů a destiček. V této práci naopak počet trombocytů a trombokrit klesly po ozáření 12 Gy a po podání 3 časných i pozdní dávek paliferminu. Je tedy otázkou, jako roli hráli například faktory, jako je odlišnost zvířecího modelu, dávka záření nebo stav hydratace organismu.

## Závěr

6 Cílem experimentální části diplomové práce bylo zhodnotit účinky KGF (paliferminu) na změny vyvolané v gastrointestinálním traktu myši kmene C57Bl/6J po ozáření vysokými dávkami IZ s krytím hlavy. Za tímto účelem byly použity 2 experimentální modely.

V rámci prvního experimentu zaměřeného na přežívání zvířat byly hodnoceny 2 odlišné dávky růstového faktoru – 1 a 5 mg/kg. Z výsledků vyplývá, že podání paliferminu neovlivňuje přežívání zvířat po ozáření 14 a 15 Gy. Na přežívání měla vliv aplikace 1 mg/kg po expozici 16 Gy, kdy nastalo mírné, ale významné zhoršení.

V druhém experimentu byl hodnocen vliv paliferminu (5 mg/kg) na vlastní stav sliznice duodena, jejunu, ilea a colon transversum a krevní obraz. Tetovány byly 3 odlišné dávkovací režimy - 2 dávky (1, 24 h), 3 dávky (1, 24, 48h) a 3 dávek (24, 48, 72 h) po ozáření 12 a 14 Gy. Podání paliferminu vykazovalo pouze efekt na regeneraci tenkého střeva po ozáření 12 Gy, přičemž nejúčinnější se jeví podání 3 dávek 1, 24 a 48 h po expozici IZ. Při zvýšení dávky na 14 Gy palifermin svoji účinnost v tenkém střevě prakticky ztrácí, a naopak v tlustém střevě dochází k potenciaci nežádoucích účinků.

V krvi časná aplikace paliferminu podporuje obnovu erytrocytární řady, počet trombocytů může naopak snižovat.

Vzhledem k úzkému terapeutickému oknu a možnému zhoršení poškození, které bylo indukované IZ, se palifermin nejeví jako vhodný radiomitigátor.

## 7 Seznam publikací

AJAKAIYE, Michael A. et al. Recombinant Human MFG-E8 Attenuates Intestinal Injury and Mortality in Severe Whole Body Irradiation in Rats. *PLoS One* [online]. 2012, vol. 7, no. 10.

BEHLING, Rolf. Medical X-ray sources now and for the future, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment* [online]. 2017, vol. 873, s. 43-50. ISSN 0168-9002.

BHATTACHARYA, S. a A. ASAITHAMBY. Ionizing radiation and heart risks, *Seminars in Cell & Developmental Biology*[online]. 2016, vol.58, s. 14-25, ISSN 1084-9521.

BLIJLEVENS, N. a S. SONIS. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy – and radiotherapy-induced mucositis. *Annals of Oncology* [online]. 2007, vol. 18, no. 5, s. 817-26. ISSN 09237534.

BOLUS, N. E. Basic review of radiation biology and terminology. *Journal of Nuclear Medicine Technology* [online]. 2001, vol. 29, no. 2, s. 67-73; test 76-7. ISSN 00914916.

BOOTH, C a CS. POTTEN. Keratinocyte growth factor increases hair follicle survival following cytotoxic insult. *J Invest Dermatol* [online]. 2000, s.667-673.

BRAUN, Susanne et al. Keratinocyte growth factor protects epidermis and hair follicles from cell death induced by UV irradiation, chemotherapeutic or cytotoxic agents. *Journal of Cell Science* [online]. 2006, vol. 119, no. 23, s. 4841-4849. ISSN 0021-9533, 0021-9533.

BRAY, F. N. et al. Acute and Chronic Cutaneous Reactions to Ionizing Radiation Therapy. *Dermatology and Therapy* [online]. 2016, vol. 6, no. 2, s. 185-206. ISSN 21938210.

BRIZEL, DM a ES YI. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation-and bleomycin-induced lung injury and mortality. *The American journal of pathology* [online]. 1996, s.1963-1970.

CAI, W. B. et al. Differential survival of murine small and large intestinal crypts following ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* [online]. 1997, vol. 71, no. 2, s. 145-155. ISSN 0955-3002, 0955-3002.

CLASSEN, J. et al. Radiation-induced gastrointestinal toxicity. *Strahlenther. Oncology* [online]. 1998, vol. 174, no.3, s. 82–84.

DAINIAC, Nicholas et al. First global consensus for evidence-based management of the hematopoietic syndrome resulting from exposure to ionizing radiation. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* [online]. 2011, vol. 5, no. 3, s. 202-212.

DAINIAC, Nicholas et al. Literature Review and Global Consensus on Management of Acute Radiation Syndrome Affecting Nonhematopoietic Organ Systems. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* [online]. 2011, vol. 5, no. 3, s. 183-201. ISSN 19357893.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew et al. DNA damage signaling assessed in individual cells in relation to the cell cycle phase and induction of apoptosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2012, vol. 49, no. 5-6, s. 199-217.

DE RUYSSCHER, Dirk et al. Radiotherapy toxicity (Primer). *Nature Reviews: Disease Primers* [online]. 2019.

DELOUGHERY, Thomas G. Iron Deficiency Anemia. *The Medical Clinics of North America* [online]. 2017, vol. 101, no. 2, s. 319-332.

DESOUKY, O., DING, N. a G. ZHOU. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* [online]. 2015, vol. 8, no. 2, s. 247-254. ISSN 1687-8507.

DICARLO, Andrea L. et al. Radiation Injury After a Nuclear Detonation: Medical Consequences and the Need for Scarce Resources Allocation. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness* [online]. 2011, vol. 5, s. S32-S44. ISSN 19357893.

DONDELINGER, Robert M. THE FUNDAMENTALS OF: Radiation. *Biomedical Instrumentation & Technology* [online]. 2012, vol. 46, no. 3, s. 219-223. ISSN 08998205.

DÖRR, H. a V. MEINEKE. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure – therapeutic principles. *BMC Medicine* [online]. 2011, vol. 9, s. 126.

DUNN, William L., KENNETH, J. a K. SHULTIS. 2 - The Basis of Monte Carlo, Editor(s): William L. Dunn, J. Kenneth Shultis, Exploring Monte Carlo Methods, Elsevier [online]. 2012, s. 21-46. ISBN 9780444515759.

EGGER, Bernhard et al. Keratinocyte growth factor ameliorates dextran sodium sulfate colitis in mice. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 1999, vol. 44, no. 4, s. 836-44. ISSN 01632116.

ELLISON, Cynthia A. et al. Role of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) in Palifermin-Mediated Immune Modulation and Protection from Acute Murine Graft-Versus-Host Disease. *Journal of Clinical Immunology* [online]. 2011, vol. 31, no. 3, s. 406-13. ISSN 02719142.

ESTIVARIZ, F. et al. Regulation of keratinocyte growth factor (KGF) and KGF receptor mRNAs by nutrient intake and KGF administration in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 2000, vol. 45, no. 4, s. 736-43. ISSN 01632116.

EVERETT, W. H. a D. T. CURIEL. Gene therapy for radioprotection. *Cancer Gene Therapy* [online]. 2015, vol. 22, no. 4, s. 172-180. ISSN 09291903.

FARRELL, C. L. et al. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Research* [online]. 1998, vol. 58, no. 5, s. 933-939. ISSN 0008-5472, 0008-5472.

FAUCHERRE, Adèle et al. Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematologica* [online]. 2014, vol. 99, no. 1, s. 70-75.

FILIP, Stanislav et al. Homing of lin<sup>sup(-)</sup>/CD117<sup>sup(+)</sup> hematopoietic stem cells. *Transfusion and Apheresis Science* [online]. 2009, vol. 41, no. 3, s. 183-190. ISSN 1473-0502, 1473-0502.

FINCH, P.W a J.S. RUBIN. *Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair* [online]. 2004, s.69-136.

FUKUMOTO, Risaku. Mesenchymal stem cell therapy for acute radiation syndrome. *Military Medical Research* [online]. 2016, vol. 3.

GEISER, Thomas. Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach. *Swiss Medical Weekly* [online]. 2003, vol. 133, no. 43-44, s. 586-590. ISSN 1424-7860, 1424-7860.

GERBER, Scott A. et al. Interleukin-12 Preserves the Cutaneous Physical and Immunological Barrier after Radiation Exposure. *Radiation Research* [online]. 2015, vol. 183, no. 1, s. 72-81. ISSN 00337587.

GIBSON, Michael A., John E. CARLSON a Scott E. SCHLARBAUM. Possible DNA preservation from plant fossils in the Claiborne Formation (middle Eocene) of west Tennessee. *Abstracts with Programs - Geological Society of America* [online]. 2005, vol. 37, no. 2, s. 4. ISSN 0016-7592, 0016-7592.

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.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B., K. VENKOVA a K. CONNOLLY. Efficacy of repifermin (keratinocyte growth factor-2) against abnormalities in gastrointestinal mucosal transport in a murine model of colitis. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2003, vol. 55, no. 1, s. 67-75. ISSN 0022-3573, 0022-3573.

GUO, D., ZHANG. J a X. HUANG. A new Rac/PAK/GC/cGMP signaling pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry* [online]. 2010, vol. 334, no. 1-2, s. 99-103. ISSN 03008177.



GURLEY, Kay E. et al. Synergy between Prkdc and Trp53 regulates stem cell proliferation and GI-ARS after irradiation. *Cell Death and Differentiation* [online]. 2017, vol. 24, no. 11, s. 1853-1860. ISSN 13509047.

HAGBY, Moti et al. Health implications of radiological terrorism: Perspectives from Israel. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* [online]. 2009, vol. 2, no. 2, s. 117-123. ISSN 09742700.

HALEY, E. M. a Y. KIM. The role of basic fibroblast growth factor in glioblastoma multiforme and glioblastoma stem cells and in their in vitro culture. *Cancer Letters* [online]. 2014, vol. 346, no. 1, s. 1-5. ISSN 03043835.

HARFOUCHE, Ghida a Michèle T. MARTIN. Response of normal stem cells to ionizing radiation: a balance between homeostasis and genomic stability. *Mutation Research* [online]. 2010, vol. 704, no. 1-3, s. 167-174. ISSN 0027-5107, 0027-5107.

HART, Sarah. Ionising radiation: promoting safety for patients, visitors and staff. *Nursing Standard (through 2013)* [online]. 2006, vol. 20, no. 47, s. 47-57, ISSN 00296570.

HASHIMOTO, T. et al. Preferential Fas-mediated apoptotic execution at G1 phase: the resistance of mitotic cells to the cell death. *Cell Death and Disease* [online]. 2012, vol. 3, s. 8.

HEINZLE, Christine et al. Differential Effects of Polymorphic Alleles of FGF Receptor 4 on Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Research* [online]. 2012, vol. 72, no. 22, s. 5767-5777. ISSN 0008-5472, 0008-5472.

HÉRODIN, F. a M. DROUET. Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. *Experimental Hematology* [online]. 2005, vol. 33, no. 10, s. 1071-1080. ISSN 0301-472X, 0301-472X.<sup>A</sup>

HÉRODIN, Francis et al. Which place for stem cell therapy in the treatment of acute radiation syndrome?. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* [online]. 2005, vol. 43, no. 4, s. 223-7. ISSN 02398508.<sup>B</sup>

HILLE, Andrea et al. Effect of tumour-cell-derived or recombinant keratinocyte growth factor (KGF) on proliferation and radioresponse of human epithelial tumour cells (HNSCC) and normal keratinocytes in vitro. *Radiation and Environmental Biophysics* [online]. 2010, vol. 49, no. 2, s. 261-70. ISSN 0301-634X.

HOFER, Michal et al. Combining Pharmacological Countermeasures to Attenuate the Acute Radiation Syndrome-A Concise Review. *Molecules* [online]. 2017, vol. 22, no. 5, s. 834.

HUTCHISON, S. G. a F. I. HUTCHISON. Radioactivity in everyday life. *Journal of Chemical Education* [online]. 1997, vol. 74, no. 5, s. 501-505. ISSN 00219584.

CHANDNA, Sudhir et al. Low-dose radiation hypersensitivity in human tumor cell lines: effects of cell-cell contact and nutritional deprivation. *Radiation Research* [online]. 2002, vol. 157, no. 5, s. 516-525. ISSN 0033-7587, 0033-7587.

*Chemistry And Metallurgy Research Building Replacement Project At Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico. Part 17 of 27* [online]. 2003 ProQuest Central; ProQuest Natural Science Collection.

CHEN, L et al. The protective effect of recombinant human keratinocyte growth factor on radiation-induced pulmonary toxicity in rats. *International journal of radiation oncology, biology, physics* [online]. 2004, s.1520-1529.

ISHIBASHI, Toshio et al. Keratinocyte growth factor and its receptor messenger RNA expression in nasal mucosa and nasal polyps. *The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* [online]. 1998, vol. 107, no. 10, s. 885-90. ISSN 00034894.

JACKSON, Isabel L. et al. Pathophysiological mechanisms underlying phenotypic differences in pulmonary radioresponse. *Scientific Reports* [online]. 2016, vol. 6, s. 36579.

JEONG, Hwan-Jeong et al. Development of Drugs and Technology for Radiation Theragnosis, Nuclear Engineering and Technolog [online]. 2016, vol 48, no. 3, s. 597-607. ISSN 1738-5733.

Johnstonarchive. JOHNSTON, Robert. *Johnston's archive* [online]. 2014 Dostupné z: <http://www.johnstonsarchive.net/nuclear/radevents/index.html#2>

K.P.A. MacDonald a G. R. HILL. Keratinocyte Growth Factor (KGF) in Hematology and Oncology. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2002, vol. 8, no. 5, s. 395-403. ISSN 13816128.

KELLY, Ryan Michael. *Developing novel strategies to enhance thymic recovery and T cell reconstitution following bone marrow transplantation*. Ann Arbor: University of Minnesota [online]. 2009, Order No. 3358623. ISBN 9781109171020.

KHAN, W. B. et al. Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor. *Radiation Research* [online]. 1997, vol. 148, no. 3, s. 248-253.

KIANG, J. G. a A. O. OLABISI. Radiation: a poly-traumatic hit leading to multi-organ injury. *Cell & Bioscience* [online]. 2019, vol. 9.

KIM, Joong Sun et al. Silibinin attenuates radiation-induced intestinal fibrosis and reverses epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* [online]. 2017, vol. 8, no. 41, s. 69386-69397.

KING, George et al. What is the identity of fibroblast-pneumocyte factor?. *Pediatric Research* [online]. 2016, vol. 80, no. 6, s. 768-776. ISSN 00313998.

KREBS, S a M. DUNPHY, Chapter 17 - Role of nuclear medicine in diagnosis and management of hepatopancreatobiliary disease, *Surgery of the Liver, Biliary Tract and Pancreas*. [online]. 2017, vol.2, no.6, s. 285-315. ISBN 9780323340625.

LANDAUER, Michael R. Physiological and psychological impact of low-level radiation: An overview. *Military Medicine* [online]. 2002, vol. 167, no. 2, s. 141-2. ISSN 00264075.

LANGSTEIN, J. et al. Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2000, vol. 273, no. 1, s. 117-122. ISSN 0006-291X, 0006-291X.

L'ANNUNZIATA, Michael F. Chapter 1 - Radiation Physics and Radionuclide Decay, Handbook of Radioactivity Analysis (Third Edition), Academic Press [online]. 2012, s. 1-162. ISBN 9780123848734. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384873-4.00001-3>.

LEE, Jae W. et al. Therapeutic Effects of Human Mesenchymal Stem Cells in Ex Vivo Human Lungs Injured with Live Bacteria. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2013, vol. 187, no. 7, s. 751-60. ISSN 1073449X.

LEE, Kang Kyoo et al. Recombinant human epidermal growth factor accelerates recovery of mouse small intestinal mucosa after radiation damage. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* [online]. 2008, vol. 71, no. 4, s. 1230-1235. ISSN 0360-3016, 0360-3016.

LIEROVA, Anna et al. Cytokines and radiation-induced pulmonary injuries. *Journal of Radiation Research* [online]. 2018, vol. 59, no. 6, s. 709-753.

Marco Durante, Alexander Golubev, Woo-Yoon Park, Christina Trautmann, Applied nuclear physics at the new high-energy particle accelerator facilities, *Physics Reports* [online]. 2019, vol. 800, s. 1-37. ISSN 0370-1573.

MATSUDA, Y., UEDA, J. a T. ISHIWATA. Fibroblast Growth Factor Receptor 2: Expression, Roles, and Potential As a Novel Molecular Target for Colorectal Cancer. *Pathology Research International* [online]. 2012, ISSN 20908091.

MEDALIA, Jonathan. THE JAPANESE NUCLEAR INCIDENT: TECHNICAL ASPECTS. *Current Politics and Economics of Northern and Western Asia* [online]. 2011, vol. 20, no. 4, s. 675-694. ISSN 21585865.

MERRITT, A. J. et al. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *Journal of Cell Science* [online]. 1995, vol. 108 ( Pt 6), s. 2261-2271. ISSN 0021-9533, 0021-9533.

MICELI, R. et al. Efficacy of keratinocyte growth factor-2 in dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 1999, vol. 290, no. 1, s. 464-471. ISSN 0022-3565, 0022-3565.

MOGHADDASI, Leyla a Eva BEZAK. Geant4 beam model for boron neutron capture therapy: investigation of neutron dose components. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine* [online]. 2018, vol. 41, no. 1, s. 129-141. ISSN 01589938.

MORTAZAVI, S. M. J. a H. MOZDARANI. Is it time to shed some light on the black box of health policies regarding the inhabitants of the high background radiation areas of Ramsar?. *Iranian Journal of Radiation Research* [online]. 2012, vol. 10, no. 3, s. 111-116. ISSN 17284554.

NYBERG, A., STRICKLIN, D. a Å. SELLSTRÖM. Mass Casualties and Health Care Following the Release of Toxic Chemicals or Radioactive Material-Contribution of Modern Biotechnology. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2011, vol. 8, no. 12, s. 4521-49. ISSN 1661-7827.

PARIS, Francois et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* [online]. 2001, vol. 293, no. 5528, s. 293-7. ISSN 00368075.

PEJCHAL, Jaroslav et al. Attenuation of radiation-induced gastrointestinal damage by epidermal growth factor and bone marrow transplantation in mice. *International Journal of Radiation Biology* [online]. 2015, vol. 91, no. 9, s. 703-714.

PETRINEC, B., ŠOŠTARIĆ, M. a D. BABIĆ. The role of physics in radioecology and radiotoxicology. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju* [online]. 2019, vol. 70, no. 1, s. 3-13. ISSN 00041254.

PORTNOY, J., CURRAN-EVERETT, D. a R. J. MASON. Keratinocyte Growth Factor Stimulates Alveolar Type II Cell Proliferation through the Extracellular Signal-Regulated Kinase and Phosphatidylinositol 3-OH Kinase Pathways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 2004, vol. 30, no. 6, s. 901-7. ISSN 10441549.

POTTEN, C. S. a H. K. GRANT. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *British Journal of Cancer* [online]. 1998, vol. 78, no. 8, s. 993-1003. ISSN 0007-0920, 0007-0920.

RADTKE, Michelle L. a Jill M. KOLESAR. Palifermin (Kepivance(TM)) for the treatment of oral mucositis in patients with hematologic malignancies requiring hematopoietic stem cell support. *Journal of Oncology Pharmacy Practice* [online]. 2005, vol. 11, no. 3, s. 121-5. ISSN 10781552.

RANA, Sudha et al. Radiation-induced biomarkers for the detection and assessment of absorbed radiation doses. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* [online]. 2010, vol. 2, no. 3, s. 189-196. ISSN 09764879.

RANGASWAMY, D. et al. Measurement of terrestrial gamma radiation dose and evaluation of annual effective dose in Shimoga District of Karnataka State, India. *Radiation Protection and Environment* [online]. 2015, vol. 38, no. 4. ISSN 09720464.

RAY, P. Protection of Epithelial Cells by Keratinocyte Growth Factor Signaling. *Proceedings of the American Thoracic Society* [online]. 2005, vol. 2, no. 3, s. 221-225. ISSN 1546-3222.

REEVES, Glen I, M.D., M.P.H. Medical Implications of Enhanced Radiation Weapons. *Military Medicine* [online]. 2010, vol. 175, no. 12, s. 964-70. ISSN 00264075.

ROJAVIN, Yuri et al. Civilian nuclear incidents: An overview of historical, medical, and scientific aspects. *Journal of Emergencies, Trauma and Shock* [online]. 2011, vol. 4, no. 2, s. 260-272. ISSN 09742700.

ROTOLO, Sabrina et al. Silencing of Keratinocyte Growth Factor Receptor Restores 5-Fluorouracil and Tamoxifen Efficacy on Responsive Cancer Cells. *PLoS One* [online]. 2008, vol. 3, no. 6.

RZEPECKI, Piotr et al. Pharmacotherapy of Oral Mucositis with Palifermin. *Clinical Medicine. Therapeutics* [online]. 2009, vol. 1, s. 333.

SAHA S., BHANJA P., KABARRITI R., LIU L., ALFIERI A. A a C.GUHA. Bone marrow stromal cell transplantation mitigates radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PLoS One* [online]. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0024072

SAHA, Subhrajit et al. TLR9 Agonist Protects Mice from Radiation-Induced Gastrointestinal Syndrome. *PLoS One* [online]. 2012, vol. 7, no. 1.

SCOTT, Bobby R. Low-dose radiation risk extrapolation fallacy associated with the linear-no-threshold model. *Human and Experimental Toxicology* [online]. 2008, vol. 27, no. 2, s. 163-8. ISSN 09603271.

SCOTT, Glynis et al. The Proteinase-Activated Receptor-2 Mediates Phagocytosis in a Rho-Dependent Manner in Human Keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* [online]. 2003, vol. 121, no. 3, s. 529-41. ISSN 0022202X.

SGOUROS, George et al. MIRDC Commentary: Proposed Name for a Dosimetry Unit Applicable to Deterministic Biological Effects-The Barendsen (Bd). *The Journal of Nuclear Medicine* [online]. 2009, vol. 50, no. 3, s. 485-7. ISSN 01615505.

SIEGEL, David. Preparation for Terrorist Threats: Radiation Injury. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* [online]. 2009, vol. 10, no. 3, s. 136-139. ISSN 15228401.

SIMNAD, M.T. Nuclear Reactors: Shielding Materials. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology (Second Edition)* [online]. 2001 s.6377-6384 DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-08-043152-6/01128-1>.

SKORGA, Phyllis et al. Caring for victims of nuclear and radiological terrorism. *Nurse Practitioner* [online]. 2003, vol. 28, no. 2, s. 24-41. ISSN 03611817.

SYED, MQaim. *Nuclear data for medical applications: An overview of present status and future needs* [online]. 2017

TAHERI, A. a A.PAZIRANDEH. Measurements of the thermal neutron flux for an accelerator-based photoneutron source. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine* [online]. 2016, vol. 39, no. 4, s. 857-862. ISSN 01589938.

ULRICH A. et al. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *European Journal of Cell Biology* [online]. 2004, vol. 83, no. 11, s. 607-12. ISSN 01719335.

VAN DE VOORDE, M. et al. Radiochemical processing of nuclear-reactor-produced radiolanthanides for medical applications, *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2019, vol. 382, s. 103-125. ISSN 0010-8545.

VANDERSICKEL, Veerle et al. The radiosensitizing effect of Ku70/80 knockdown in MCF10A cells irradiated with X-rays and p(66)+Be(40) neutrons. *Radiation Oncology* [online]. 2010, vol. 5, s. 30.

VOSWINKEL, Jan et al. Gastro-intestinal autoimmunity: preclinical experiences and successful therapy of fistulizing bowel diseases and gut Graft versus host disease by mesenchymal stromal cells. *Immunologic Research* [online]. 2013, vol. 56, no. 2-3, s. 241-8. ISSN 0257277X.

WASELENKO, Jamie K. et al. Medical Management of the Acute Radiation Syndrome: Recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Annals of Internal Medicine* [online]. 2004, vol. 140, no. 12, s. 1037-1051. ISSN 00034819.

WERNER, S. *Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes*. *Werner* [online]. 1998, s.153-165.

WILDE, P. a E. M. PITCHER. Radiation hazards for the patient in cardiological procedures. *Heart* [online]. 2001, vol. 85, no. 2, s. 127. ISSN 13556037.

WILS, Evert-Jan et al. Keratinocyte growth factor and stem cell factor to improve thymopoiesis after autologous CD34+ cell transplantation in rhesus macaques. *Biology of Blood and Marrow*



*Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* [online]. 2012, vol. 18, no. 1, s. 55-65.

WITHERDEN, D. A. et al. A role for epithelial gamma[delta] T cells in tissue repair. *Springer Seminars in Immunopathology* [online]. 2000, vol. 22, no. 3, s. 265-281. ISSN 03444325.

WU, Y. et al. Restoration of alveolar type II cell function contributes to simvastatin-induced attenuation of lung ischemia-reperfusion injury. *International Journal of Molecular Medicine* [online]. 2012, vol. 30, no. 6, s. 1294. ISSN 11073756.

XIE, Li-hua et al. Mechanisms of an increased level of serum iron in gamma-irradiated mice. *Radiation and Environmental Biophysics* [online]. 2016, vol. 55, no. 1, s. 81-88.

YANG, Hua et al. Keratinocyte growth factor stimulates the recovery of epithelial structure and function in a mouse model of total parenteral nutrition. *JPEN, Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* [online]. 2002, vol. 26, no. 6, s. 333-40; discussion 340-1. ISSN 01486071.

YANG, Shuxia et al. Human surfactant protein A suppresses T cell-dependent inflammation and attenuates the manifestations of idiopathic pneumonia syndrome in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* [online]. 2001, vol. 24, no. 5, s. 527-36. ISSN 10441549.

YILDIRIM, Ali Ö. et al. Palifermin Induces Alveolar Maintenance Programs in Emphysematous Mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2010, vol. 181, no. 7, s. 705-17. ISSN 1073449X.