

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024 Bc. KATEŘINA UTTENDORFSKÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Jaderný histon H2AX a jeho využití v biodozimetrii
Diplomová práce

2024

Bc. Kateřina Uttendorfská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Uttendorfská**
Osobní číslo: **C22380**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Jaderný histon H2AX a jeho využití v biodozimetrii**
Téma práce anglicky: **Nucleic Histone H2AX and its Use in Biodosimetry**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Teoretická část práce bude zahrnovat literární rešerši z oblasti problematiky jaderného histonu H2AX, jeho významu a funkce v buňce (v organismu) a dále se zejména zaměří na možnosti využití detekce jeho fosforylované formy γ H2AX pro oblast ionizujícího záření a biodozimetrie. Teoretická část poskytne výčet biodozimetrických metodik za účelem možnosti zhodnocení využitelnosti metody detekce γ H2AX v biodozimetrii.

Experimentální část:

V experimentální části budou metodou průtokové cytometrie analyzovány vzorky periferní krve *in vitro* a dále *in vivo* (zvířecí model myši) ozářené zdrojem ionizujícího záření gama (^{60}Co). Budou porovnány různé experimentální přístupy, jako je dávkový příkon, skladovací podmínky, aj. a bude vyhodnocen jejich vliv na stanovení γ H2AX za účelem zkvalitnění metodiky detekce γ H2AX pro účely biodozimetrie.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Pejchal J, Österreicher J, Zárybnická L, Šinkorová Z, Tichý A, Vávrová J. Biodozimetrické postupy. *Vojenské zdravotnické listy* 2010, 79(2):64-71.
2. Varvara PV, Karaolani G, Valavanis C, Stanc G, Tzaida O, Trihia H, Patapis P, Dimitroulis D, Perrea D. gamma-H2AX: A potential biomarker in breast cancer. *Tumour Biol.* 2019 Sep;41(9):1010428319878536.
3. RODRÍGUEZ-RUIZ ME, VANPOUILLE-BOX C, MELERO I, FORMENTI SC, DEMARIA S. Immunological Mechanisms Responsible for Radiation-Induced Abscopal Effect. *Trends Immunology* 2018 Aug;39(8):644-655.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Radovan Metelka, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **pplk. Mgr. Lenka Andrejsová, Ph.D.**
Fakulta vojenského zdravotnictví – Katedra radiobiologie

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlášení autora

Prohlašuji: Práci s názvem Jaderný histon H2AX a jeho využití v biodozimetrii 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 § 47 b 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Kateřina Uttendorfská v. r.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala za odborné vedení pplk. Mgr. Lenky Andrejsové, Ph.D., její rady, ochotu, a trpělivost během psaní diplomové práce. Poděkování bych také chtěla vyjádřit panu Ing. Radovanu Metelkovi, Ph.D. za jeho rady s psáním diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat pracovníkům katedry radiobiologie Univerzity Obrany v Hradci Králové za pomoc během působení v laboratoři a v neposlední řadě také své rodině a přátelům za trpělivost a podporu v období celého studia.

Anotace

Diplomová práce se zabývá jaderným histonem H2AX a jeho využitím v oblasti zpětného odhadu absorbované dávky ionizujícího záření (biodozimetrie). V rámci teoretické části jsou vysvětleny biologické účinky interakce ionizujícího záření s živou tkání a aktuálně využívané biodozimetrické přístupy. Experimentální část se zabývá testováním vytipovaných faktorů (dávkový příkon, inkubační podmínky potřebné pro transport krevního materiálu, vliv analyzátoru–průtokového cytometru), které mohou ovlivnit výsledné stanovení γ H2AX metodou průtokové cytometrie. V rámci diskuze jsou získaná data zhodnocena a jsou navržena řešení pro eliminaci vlivů jednotlivých faktorů.

Klíčová slova

Biodozimetrie, dávkový příkon, γ H2AX, inkubační podmínky, ionizující záření, průtoková cytometrie.

Annotation

The thesis deals with the nuclear histone H2AX and its application in the field of ionizing radiation absorbed dose estimation (biodosimetry). The theoretical part explains the biological effects of the interaction of ionizing radiation with living tissue and the currently used biodosimetric approaches. The experimental part deals with the testing of selected factors (dose rate, incubation conditions required for the transport of blood material, influence of the analyzer-flow cytometer) that can influence the final determination of γ H2AX by flow cytometry. In the discussion, the data obtained are evaluated and solutions are proposed to eliminate the influence of each factor.

Keywords

Biodosimetry, dose rate, γ H2AX, incubation conditions, ionizing radiation, flow cytometry.

Obsah

Seznam ilustrací.....	9
Seznam tabulek.....	11
Seznam zkratk.....	12
ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1. Ionizující záření.....	15
1.1.1. Typy ionizujícího záření.....	15
1.1.2. Buněčná odpověď na ionizující záření.....	17
1.1.3. Stochastické a deterministické účinky ionizujícího záření.....	20
1.2. Biodozimetrie.....	21
1.2.1. Biodozimetrické přístupy využívající periferní lymfocyty.....	22
1.2.2. Jaderný histon H2AX.....	23
1.2.3. Metody stanovení γ H2AX.....	26
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	31
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
3.1. Použitý materiál.....	32
3.1.1. Přístroje a pomůcky.....	32
3.1.2. Chemikálie.....	33
3.1.3. Biologický materiál.....	33
3.1.4. Zdroj záření.....	33
3.2. Test vlivu dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši in vivo...34	
3.2.1. Pracovní postup.....	34
3.3. Test vlivu rozdílných inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX in vitro 36	
3.3.1. Pracovní postup.....	36
4. Výsledky.....	39
4.1. Analýza vlivu dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši in vivo 39	
4.2. Analýza vlivu rozdílných inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX.....	43
4.2.1. Výsledky testu inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX 44	
4.2.2. Porovnání výsledků testů stanovení biodozimetrického ukazatele γ H2AX mezi dvěma analyzátoři BD FACS Aria II a BD FACSymphony™ A1.....	47
5. Diskuze.....	51
6. Závěr.....	59
7. Zdroje.....	61

Seznam ilustrací

Obrázek č. 1.: Druhy IZ a jejich pronikavost (UNEP, 2016)	16
Obrázek č. 2: Přímé poškození DNA vlivem IZ (Upraveno podle: USNRC).....	17
Obrázek č. 3: Radiolýza vody způsobená vlivem IZ (Upraveno podle: Kawamura a kol., 2018). Radiolýzou vzniknou vysoce reaktivní produkty, jako hydroxylový radikál (OH.), vodíkový radikál (H.), hydratovaný elektron (eaq) a v přítomnosti kyslíku peroxid vodíku (H ₂ O ₂), které reagují v sekundární reakci s biomolekulami.....	18
Obrázek č. 4: Osud buněk po ozáření (Upraveno podle: USNRC). 4A) zobrazuje úspěšnou reparaci buňky po vystavení IZ, kde nedochází k přenesení poškození na dceřinou buňku. 4B) znázorňuje buňku podléhající v důsledku ozáření smrti (apoptóza, případně nekróza). 4C) vyobrazuje poškozenou buňku vlivem IZ, která se dále replikuje a poškození přenáší na dceřiné buňky, které následně zanikají. 4D) vyobrazuje neúspěšnou reparaci (mutaci) buňky, která přechází na dceřiné (USNRC).	19
Obrázek č. 5: Graf znázorňující intenzitu projevu deterministických účinků na absorbované dávce záření (Upraveno podle: Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).	20
Obrázek č. 6: Graf znázorňující závislost projevu stochastického účinku na absorbované dávce IZ (Upraveno podle: Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).	21
Obrázek č. 7: Fosforylace H2AX během opravy DSB na DNA způsobené IZ (Wang a kol., 2015).....	24
Obrázek č. 8: Defosforylace γ H2AX, které se účastní PP2A, PP4, PP6 a WIP1 (Upraveno podle: Stope, 2021).	26
Obrázek č. 9: Snímky z fluorescenčního mikroskopu ložisek γ H2AX v lymfocytech (Raavi a kol., 2021). Snímek A vyobrazuje kontrolní lymfocyty, vedlejší snímek B zobrazuje dávku 0,1 Gy. Záběr C zachycuje dávku 0,5 Gy, zatímco D 2 Gy a poslední snímek E zobrazuje lymfocyty vystavené 2 Gy. Všechny jádra lymfocytů vystavené záření a vyobrazené na snímkách níže byly barveny DAPI (modrá barva).	27
Obrázek č. 10: Záznam z analýzy na průtokovém cytometru, kde byly analyzovány izolované lymfocyty ozářeny 5 Gy ⁶⁰ Co. Takto připravené lymfocyty byly inkubovány 30 minut při 37°C, vzaty k analýze (Upraveno podle: Raavi a kol., 2021). Snímky A vyobrazuje dot plot intenzity fluorescence γ H2AX u kontrolního vzorku, snímek B vyobrazuje histogram γ H2AX u stejného vzorku. Snímek C zobrazuje dot plot ozářeného vzorku 5 Gy. Snímek	

D vyobrazuje histogram γ H2AX ozářeného vzorku 5 Gy, na němž je vidět výrazné zvýšení intenzity fluorescence.	28
Obrázek č. 11: Stanovení γ H2AX metodou ELISA. Jamky jedné destičky jsou potažené dvěma různými zachycenými protilátkami, přičemž jedna je specifická pouze pro γ H2AX a druhá je schopná vázat veškeré H2A. Po inkubaci s proteinovým lyzátem dochází pomocí detekční protilátky k vazbě, tato protilátka je následně rozpoznána křenovou peroxidázou, která poskytuje signál (Upraveno podle: Ji a kol., 2017).	29
Obrázek č. 12: Stanovení γ H2AX metodou western blot. Na obrázku jsou extrakty z buněk ošetřených a neošetřených UV zářením a chromanem sodným a následně značených anti- γ H2AX (snímek A) a anti-H2AX (snímek B) (Cell Signaling Technology).	29
Obrázek č. 13: Možnosti detekce γ H2AX (Upraveno podle: Raavi a kol., 2021).....	30
Obrázek č. 14: Vymezení lymfocytární populace v periferní krvi myši na průtokovém cytometru BD FACS Aria II u ozářené myši č. 4 (dávkový příkon P1).....	39
Obrázek č. 15. Histogramy MFI γ H2AX-PE periferních lymfocytů u myší:13A) myš č. 2; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 2,7414787 Gy/min. 13B) myš č. 3; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 0,667614 Gy/min. 13C) myš č. 6; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 0,294075 Gy/min. 13D) myš č. 1 (negativní kontrola).....	40
Obrázek č. 16: Sloupcový graf průměrných hodnot MFI γ H2AX-PE periferních lymfocytů in vivo ozářených myší C57Bl6 (8 ks myší/skupina) 4 Gy dávkovými příkony P1= 2,7415 Gy/min (modrý sloupec), P2 = 0,6676 Gy/min (žlutý sloupec), P3 = 0,2941 Gy/min (tmavě zelený sloupec) a lymfocytů neozařených vzorků myší (světle zelený sloupec, negativní kontrola, 6 ks myší/skupina).....	42
Obrázek č. 17: Sloupcový graf průměrných hodnot míry fosforylace γ H2AX vyjádřených jako MFI-FITC u ozářených vzorků a neozařených vzorků porovnávající různé inkubační podmínky (seřazené č. 1 až č. 14) měřené na průtokovém cytometru BD FACS Aria II.	46
Obrázek č. 18: Sloupcové grafy porovnávající průměrné hodnoty MFI γ H2AX – FITC u lymfocytů získaných z lidské periferní krve. (18A) graf znázorňuje relativní hodnoty MFI γ H2AX – FITC na dvou analyzátoch, přičemž je jasně patrná odlišnost jejich měření, (18B) znázorňuje graf absolutních hodnot MFI γ H2AX- FITC získané z dvou analyzátorů (BD FACS II ARIA a BD FACSymphony), které se získaly vztažením relativních hodnot k vzorku č. 2 (negativní kontrola), přičemž je patrné, že došlo k eliminaci optického nastavení průtokových cytometrů a analyzátoch poskytují velmi podobné signály.	50

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozpis laboratorních zvířat - podmínky ozařování.....	34
Tabulka č. 2: Rozdělení inkubačních podmínek pro jednotlivé vzorky č.1 – č. 14.....	38
Tabulka č. 3.: Hodnoty MFI γ H2AX-PE čtyř skupin myší po ozáření 4 Gy in vivo různými dávkovými příkony P1, P2, P3 a negativní kontroly (NK, 0 Gy) získaná z průtokového cytometru BD FACS Aria II.....	41
Tabulka č. 4: Míra fosforylace H2AX lidských periferních krevních lymfocytů po in vitro ozáření 4 Gy vyjádřená hodnotou MFI-FITC u jednotlivých vzorků č. 1 – č. 14 vystavených různým inkubačním podmínkám (měřeno na průtokovém cytometru BD FACS Aria II).	45
Tabulka č. 5: Míra fosforylace H2AX lidských periferních krevních lymfocytů po in vitro ozáření 4 Gy vyjádřená hodnotou MFI-FITC u jednotlivých vzorků č. 1 – č. 14..	48
Tabulka č. 6: Relativní hodnoty MFI γ H2AX-FITC – absolutní hodnoty MFI periferních lidských lymfocytů in vivo ozářených 4 Gy a vystaveny různým. inkubačním podmínkám (vzorky č. 1 – č. 14) reaktivně vyhodnocené vzhledem k hodnotě MFI negativní kontroly (vzorek č. 3) pro cytometr BD ARIA II a BD FACSymphony.	49
Tabulka č. 7: Zhodnocení faktorů ovlivňujících stanovení fosforylované formy jaderného histonu H2AX s ohledem na jeho využití v biodozimetrii.	60

Seznam zkratek

53BP1	protein 1 vázající p53
ATB	antibiotika
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	Rad related proteinkináza
AVG	aritmetický průměr
CBMN	test mikrojader s blokáci cytokineze
CT	počítačová tomografie
DCA	dicentrická chromozomová analýza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA-PK	DNA dependentní proteinkináza
DSB	dvojně zlomy
FA	formaldehyd
FBS	fetální bovinní sérum
FC	průtoková cytometrie
HDAC4	histondeacetyláza 4
CHEK2	checkpoint kináza
IZ	ionizující záření
LD	letální dávka
LDR	míra deplece lymfocytů
LET	lineární přenos energie
MDC1	mediátor DNA poškození checkpoint protein 1
MFI	mean fluorescence intensity
MRN	komplex složený z Mre11, Rad50, Nbs1
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PBS	fosfátový pufr
PET	pozitronová emisní tomografie
RNF168	ring finger protein 168
RNF8	ubikvitin protein ligáza
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RTG	rentgenové záření
SDV	směrodatná odchylka

SSB	jednoduché zlomy
TGF β	transforming growth factor β
TIP60	histon acetyltransferáza
UHDR	ultra high dose rate

ÚVOD

Ionizující záření (IZ) je druh vysokoenergetického přenosu, který při interakci s biologickou tkání způsobuje její poškození prostřednictvím ionizace atomů a molekul. Mezi nejzávažnější poškození s největšími biologickými dopady patří dvojně zlomy na molekule DNA. Reparace tohoto typu poškození se účastní velké množství proteinů, včetně jaderného histonu H2AX. Jeho fosforylovaná forma (γ H2AX) se podílí na aktivaci kaskády proteinů vedoucích k reparaci poškození a zastavení buňky ve fázi G1/S.

Vzhledem ke skutečnosti, že fosforylace histonu se mění v závislosti na počtu dvojných zlomů DNA, respektive množství absorbovaného IZ, využívá se stanovení γ H2AX v rámci biodozimetrie. Cílem biodozimetrických stanovení je retrospektivní odhad absorbované dávky IZ, jejíž hodnota má vliv na prognózu a zvolený druh léčby ozářené osoby. V současnosti zavedené biodozimetrické postupy využívají jako zdroj informací k IZ citlivé lymfocyty získávané z periferní krve ozářených osob. Mezi zavedené metody patří krevní obraz, respektive stanovení periferních lymfocytů, test dicentrických chromozomů (DCA) a test mikrojader s blokací kineze (CBMN). Metody jsou mezinárodně standardizované, ale jejich hlavní nevýhodou jsou vysoké nároky na odborné zkušenosti personálu a dlouhá kultivační doba, která oddaluje čas zahájení adekvátní léčby. Při velkém počtu ozářených v důsledku radiační mimořádné události velkého rozsahu, jsou tyto přístupy vysoce neefektivní.

Tato diplomová práce se zabývá biodozimetrickou metodou stanovení fosforylované formy jaderného histonu H2AX ve spojení s průtokovou cytometrií. Jedná se o techniku relativně rychlou, která umožňuje stanovit velké množství vzorků v krátkém řasovém úseku. S ohledem na možnost zavedení této metodiky do reálné praxe se práce zaměřuje na parametry, které mohou výsledky stanovení γ H2AX ovlivnit. Vybrané parametry (dávkový příkon, podmínky transportu vzorku a typ přístroje při samotné analýze) testuje a diskutuje eliminaci jejich případného vlivu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

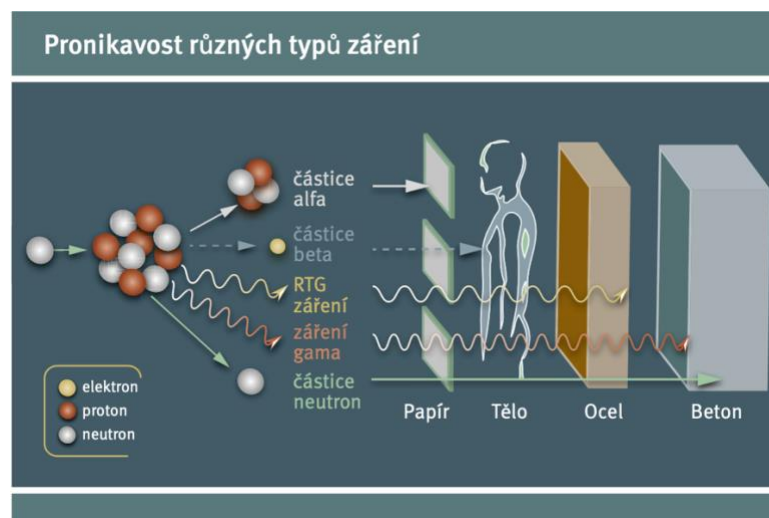
1.1. Ionizující záření

Ionizující záření je druh vysokoenergetického záření, které při průchodu prostředím ionizuje atomy (Australian radiation protection and nuclear safety agency), což znamená, že dochází k odtržení elektronů z elektronového obalu atomu, který obklopuje jádro (SÚJB, 2024). Toto vysokoenergetické záření dovede poškozovat DNA a způsobovat chemické změny v buňkách, pokud dochází k dlouhodobému vystavení záření. IZ pochází z přírodních zdrojů, přičemž jeden z nejznámějších radioaktivních prvků v přírodě je radon (NZIP, 2024), který se vyskytuje běžně v půdách a horninách. Dalším zdrojem IZ je kosmické záření, které se liší v důsledku geologických rozdílů. V některých částech planety může být expozice IZ až 200krát vyšší, než je celosvětový průměr (WHO, 2023). Posledním zdrojem jsou přístroje vytvořené lidmi, které slouží především k výrobě jaderné energie a léčebným účelům, jako je počítačová tomografie (CT) a rentgen (CDC, 2021).

1.1.1. Typy ionizujícího záření

Rozlišujeme různé typy IZ, jejichž vlastnosti a účinek na biologické látky se mezi sebou liší na základě odlišností jejich fyzikálních vlastností. Alfa záření je IZ, které je tvořeno částicemi odpovídajícími svým složením jádrům atomu hélia (L'Annunziata, 2007). Dosah tohoto záření ve vzduchu je řádově v milimetrech. Jako účinná ochrana proti částicím alfa slouží i obyčejný papír (Rosina a kol., 2021). Zdroje záření alfa jsou radionuklidy, jako uran 238, radium 226 a další členy přirozené rozpadové řady uranu, thoria a aktinia, jež se přirozeně vyskytují v horninách, půdě a vodě. Kromě přírodních zdrojů alfa záření jsou i uměle vytvořené zdroje. Jedná se o radioizotopy prvků, jako je plutonium, americium, curium a kalifornium, které zpravidla vznikají v jaderném reaktoru absorpcí neutronů různými radioizotopy uranu. Alfa částice mají mnohé využití, jedním z nich je využití americia 241 v detektorech kouře či využití plutonia 238 k výrobě tepla, které se přeměňuje na elektřinu (využití ve vesmírných sondách) (Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency). Beta částice se liší od alfa částic vyšší pronikavostí a jsou schopny vzduchem urazit až několik metrů. Mohou pronikat do lidské kůže (Collum, 2017), kde mohou způsobit popáleniny (USNRC, 2021). V porovnání s alfa částicemi je pro účel zastínění zapotřebí materiálu o vyšší hustotě, např. hliníku nebo plexiskla. Mezi typické beta zářiče patří stroncium 90, technecium 99, cesium 137, uhlík 14, síra 35 a tritium (Collum, 2017). Beta zářiče jsou využívány v lékařství, fluor 18 se

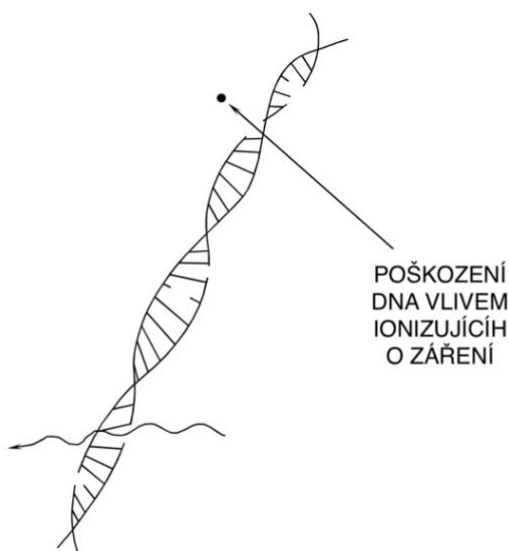
používá jako stopovací látka pro pozitronovou emisní tomografii (PET), tritium se využívá ve fosforeskujících svítidlech, která se využívají pro nouzová osvětlení (Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency, 2024). Gama záření je typem elektromagnetického vlnění, které má v rámci spektra nejmenší vlnovou délku (0,01 nm – 0,0001 nm), přičemž přenáší největší energii (Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency, 2024). Velmi často je vyzařováno společně s alfa částicemi či beta částicemi. K zastavení záření gama je zapotřebí velmi hustý materiál, jako je olovo či několik metrů betonu. Má schopnost prostupovat celým organismem a způsobovat tak na úrovni DNA poškození veškerých tkání (EPA, 2023). Příkladem gama zdroje je kobalt 60, který našel své využití ve sterilizaci lékařského vybavení v nemocnicích, v pasterizaci vybraných potravin ozařováním (Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency) a průmyslové radiografii (IAEA, 2024). Dalším příkladem IZ elektromagnetického charakteru je Roentgenovo záření (RTG), jehož vlnová délka se nachází v rozmezí 0,03 nm – 3 nm (NASA, 2023). RTG je využíván v medicíně jako diagnostická metoda (rentgen, výpočetní tomografie) (IAEA, 2024). Obrázek č. 1 ukazuje pronikavost různých druhů IZ různým materiálem (UNEP, 2016).



Obrázek č. 1.: Druhy IZ a jejich pronikavost (UNEP, 2016)

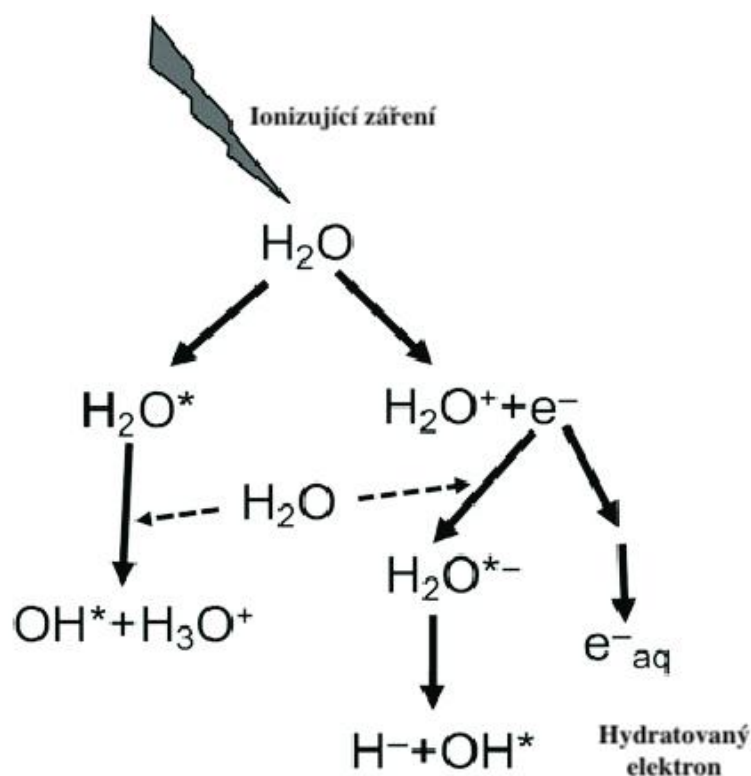
1.1.2. Buněčná odpověď na ionizující záření

Organismus jako celek je velmi citlivý vůči IZ. Vlivem ozáření dochází k ionizaci atomů a molekul, z nichž největší význam, z hlediska přežití a správné funkce jednotlivých buněk, má ionizace a poškození DNA. Působení IZ na DNA lze rozdělit na přímé a nepřímé. Přímými účinky IZ se rozumí, že dochází k přímému zasažení dané biomolekuly kvantem IZ, což vede k ionizaci a změně struktury (obrázek č. 2) (USNRC, 2024).



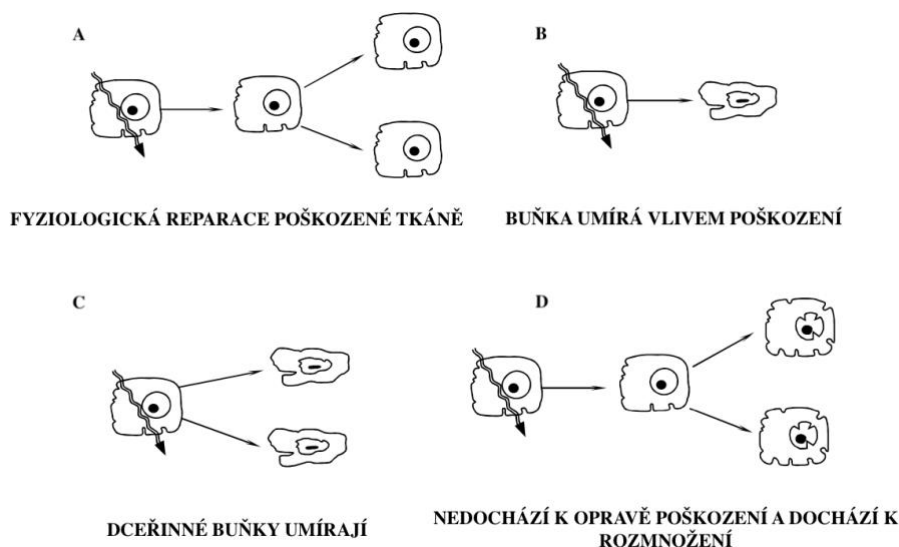
Obrázek č. 2: Přímé poškození DNA vlivem IZ (Upraveno podle: USNRC, 2024).

Při nepřímém účinku IZ v organismu hraje největší význam radiolýza vody (obrázek č. 3), která je v lidském organismu zastoupena z více jak 60 % (USNRC, 2019). Působením IZ na molekuly vody dochází ke vzniku radikálů (zejména vodíkových a hydroxylových), které jsou chemicky velmi aktivní a interagují a poškozují biomolekuly (včetně DNA) ve svém okolí (Rodríguez-Ruiz a kol., 2018; Havránková a kol., 2020).



Obrázek č. 3: Radiolýza vody způsobená vlivem IZ (Upraveno podle: Kawamura a kol., 2018). Radiolýzou vzniknou vysoce reaktivní produkty, jako hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), vodíkový radikál (H^{\cdot}), hydratovaný elektron (e^-_{aq}) a v přítomnosti kyslíku peroxid vodíku (H_2O_2), které reagují v sekundární reakci s biomolekulami.

Biologická odpověď buněk na IZ je různá. Záleží na typu tkáně, fázi buněčného cyklu buňky, a i absorbované dávce IZ (USNRC, 2024). Absorpce dávky o velikosti stovek Gy, vede k okamžitému rozpadu biomolekul či k denaturaci bílkovin. Buňka nekontrolovatelně zaniká procesem zvaným *nekróza*, čímž dochází k vyplavení organel do mezibuněčného prostoru a k poškození okolní tkáně (Khalid a Azimpouran, 2023). Zaniká-li buňka v důsledku nižších dávek (jednotky až desetiny Gy), jedná se většinou o řízenou (programovanou) buněčnou smrt, tzv. *apoptózu*, která nevede k poškození okolní tkáně (Elmore, 2007). Po poškození DNA jsou buňkou inicializovány *reparační mechanismy*, které mohou být buď 100 % úspěšné (buňka je opravena do původního stavu, nezaniká), nebo je v buňce vlivem chybné opravy pozměněna genetická informace (*mutace*), které následně může přejít i na dceřinou buňku. Mutace DNA může vést k indukci nádorového onemocnění (USNRC, 2024).



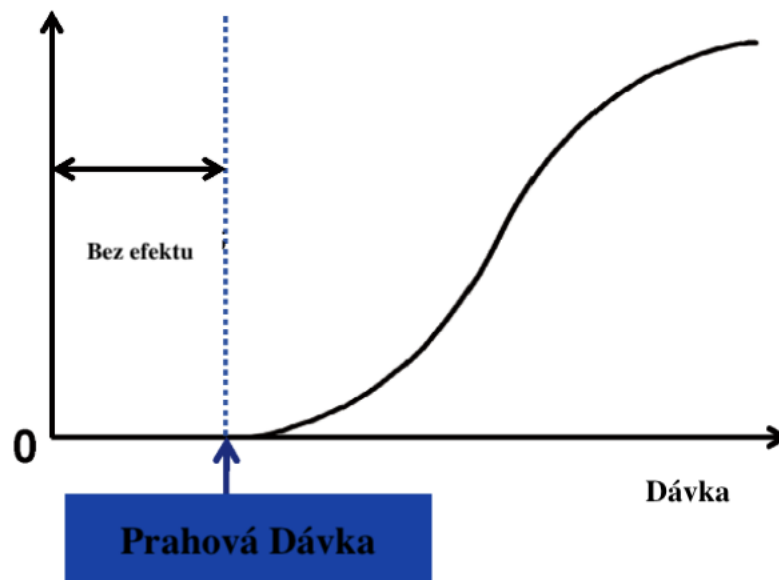
Obrázek č. 4: Osud buněk po ozáření (Upraveno podle: USNRC, 2024). 4 A) zobrazuje úspěšnou reparaci buňky po vystavení IZ, kde nedochází k přenesení poškození na dceřinou buňku. 4 B) znázorňuje buňku podléhající v důsledku ozáření smrti (apoptóza, případně nekróza). 4 C) vyobrazuje poškozenou buňku vlivem IZ, která se dále replikuje a poškození přenáší na dceřiné buňky, které následně zanikají. 4 D) vyobrazuje neúspěšnou reparaci (mutaci) buňky, která přechází na dceřiné (USNRC).

Přicházející IZ může poškodit jakoukoliv část buňky. Nejdůležitějším a nejrozsáhlejším poškozením vlivem záření je poškození nukleové kyseliny (genotoxicita). IZ poškozuje DNA, tak, že dochází ke zlomům mezi cukernou složkou a fosfátovou složku nukleotidu a ke změně bazí (není zachována komplementarita bazí) (Mavragani a kol., 2019).

Mezi základní typy poškození vlivem IZ patří jednoduché (single strand break, SSB) a dvojité zlomy (double strand break, DSB) této molekuly. U SSB dochází ke zlomu pouze na jednom vlákně DNA, přičemž je vysoká pravděpodobnost, že zlom bude opraven pomocí DNA ligázy. Dvojité zlomy vzniklé na DNA jsou považovány za nejzávažnější léze, které mohou vzniknout na DNA. Poškozena jsou obě vlákna DNA, tudíž oprava je náročnější a je větší pravděpodobnost, že buňka zanikne apoptózou (Borrego-Soto a kol., 2015; Mavragani a kol., 2019). Chybná reparace DSB může vést k mutacím a posléze ke karcinogenezi. Na opravě DSB se podílí histon γ H2AX, který atakuje zlom na DNA a pozastavuje buňku ve fázi před replikací, aby mohlo dojít k opravě zlomů (Li a kol., 2022).

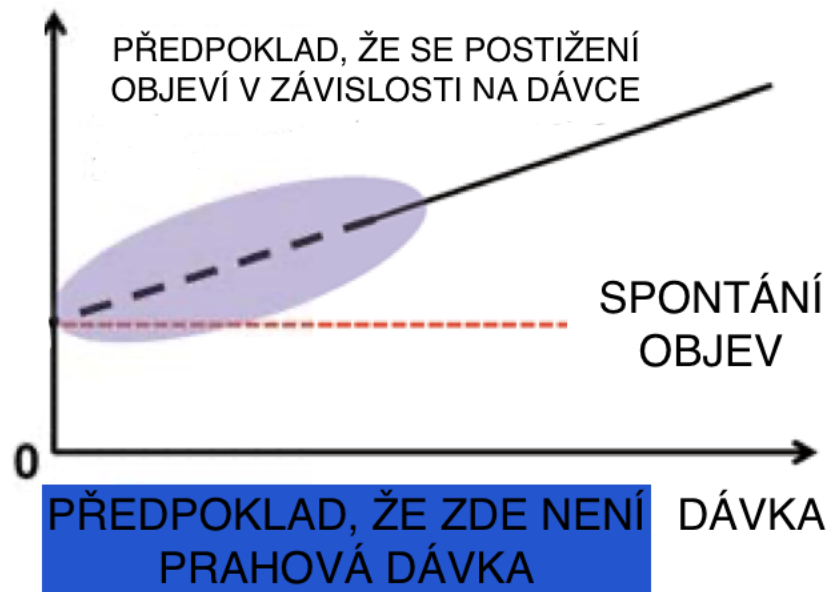
1.1.3. Stochastické a deterministické účinky ionizujícího záření

Různé tkáně v organismus disponují rozdílnou vnímavostí vůči IZ, tedy různou radiosenzitivitou. Mezi tkáně s nejvyšší radiosenzitivitou patří lymfatická tkáň, kostní dřeň, pohlavní žlázy, střevo, a naopak relativně nejnižší radiosenzitivitu má nervová a svalová tkáň. Účinky IZ poté můžeme rozdělit na deterministické a stochastické účinky (Rosina a kol., 2021). Deterministické účinky jsou takové účinky vznikající v důsledku zániku nadměrného množství buněk, které se projeví, pokud je překročena hranice prahové dávky. Mezi deterministické účinky je řazena např. akutní nemoc z ozáření či radiační dermatitida. Expozice pod prahovou dávkou nezpůsobuje žádné účinky, jak vyobrazuje obrázek č. 5 (Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).



Obrázek č. 5: Graf znázorňující intenzitu projevu deterministických účinků na absorbované dávce záření (Upraveno podle: Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).

Stochastické účinky jsou účinky, jež nelze se 100 % jistotou předpovědět. Tyto účinky jsou na rozdíl od deterministických, bezprahové, což znamená, že zde nemusí docházet k překročení určité prahové dávky, aby došlo k rozvoji stochastického účinku (obrázek č. 6). Příkladem stochastických následků je např. rozvoj leukémie nebo jiné různé typy zhoubných nádorů (Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).



Obrázek č. 6: Graf znázorňující závislost projevu stochastického účinku na absorbované dávce IZ (Upraveno podle: Ministry of the Environment, Government of Japan, 2021).

1.2. Biodozimetrie

Je-li jedinec vystaven působení IZ, lze k odhadu absorbované dávky obecně využít tři přístupů:

- 1) Fyzikální rekonstrukce, což znamená, že dochází k měření radiační expozice pomocí detekčních zařízení, včetně osobních dozimetrů (REMM, 2024).
- 2) klinické hodnocení, založené na výpočtu absorbované dávky v cílové nádorové tkáni s využitím zobrazovacích nástrojů k měření relativní distribuce radioaktivity, což lze provádět před nebo po radioterapii (Gulec a kol., 2022; Sproull a kol., 2017)
- 3) biologickou dozimetrii (biodozimetrii), která využívá biologických ukazatelů, jejich stanovení by mělo vést ke zpětnému odhadu obdržené dávky IZ (Sproull a kol., 2017).

Světová zdravotnická orgnaizace (WHO) definuje pojem biodozimetrie jako „laboratorní nebo klinické metody používané k měření nebo odhadu dávky energie ionizujícího záření absorbované jednotlivcem. Biodozimetrické nástroje měří dávku na vnitřní orgány a tkáně v důsledku vnějšího ozáření a vnitřní kontaminace“ (WHO, 2024).

Jako základní biologický materiál pro účely biodozimetrie je využívána periferní krev. Z obecného pohledu je krev tekutá tkáň, která je součástí vnitřního prostředí organismu (Mourek, 2012). Skládá se z krevní plazmy tvořící zhruba 60 % celkového objemu a krevních elementů, jako jsou erytrocyty, leukocyty a trombocyty (Dean, 2005). Pro biodozimetrické účely je využívána nejen díky své snadné dostupnosti, ale také skutečnosti, že cirkuluje napříč všemi tkáněmi a má tak největší vypovídající hodnotu i v případě parciálního (částečného) ozáření. Navíc periferní lymfocyty jsou vysoce citlivé k IZ a kostní dřeň, která je zdrojem krevních elementů (hematopoéza), patří mezi tkáně s nejnižší prahovou dávkou vzhledem k indukci deterministických účinků IZ (Langmeier, 2009 Han a kol., 2019; Sun a kol., 2020). Ke statisticky signifikantnímu poklesu leukocytů, zejména lymfocytů, dochází již při dávce homogenního celotělového záření 0,5 Gy. Významnou lymfopenii lze detekovat již po 6–24 hodinách po ozáření (Han a kol., 2019), přičemž lymfocyty v periferní krvi reagují na IZ indukci programované buněčné smrti (apoptózy) (Giovanetti a kol., 2021). Studie Heylmann a kolektiv z roku 2021 potvrdila, že lymfoidní linie je daleko citlivější k IZ než myeloidní řada (Heylmann a kol., 2021).

1.2.1. Biodozimetrické přístupy využívající periferní lymfocyty

V rámci biodozimetrie existuje několik standardně zavedených metod vycházejících ze stanovení změn na úrovni izolovaných periferních lymfocytů. Jedná se o dicentrickou chromozomovou analýzu (DCA), detekci mikrojader s blokáci cytokineze (CBMN) a stanovení míry deplece lymfocytů (LDR) (Swartz a kol., 2014).

Míra deplece lymfocytů je biodozimetrický test, který využívá absolutní počet lymfocytů získaný v době od ozáření, přičemž absolutní počet lymfocytů se získá ze součtu všech typů cirkulujících lymfocytů. Deplece lymfocytů (lymfopenie) přímo souvisí s absorbovanou dávkou IZ, pokud dochází k ozáření 2-4 Gy, úbytek se projevuje v rozmezí 4-6 dnů. Po vystavení dávky 4-6 Gy, se lymfopenie projevuje za 2-4 dny (REMM, 2024). Absorbovaná dávka se dříve vypočítávala z průměrného měření krevního obrazu každé 2 až 3 hodiny, aby došlo k vytvoření křivky, ale nyní stačí pouze dvě stanovení počtu lymfocytů k odhadnutí dávky. Pokud je možné provést pouze jedno stanovení počtu lymfocytů v periferní krvi, tak se míra deplece porovnává se stanovenou hodnotou z fyziologického rozmezí počtu lymfocytů vypočtené pro danou populaci, jelikož se fyziologické hodnoty lymfocytů liší v závislosti na mnoha faktorech (pohlaví, věk, rasa apod.) (Sullivan a kol., 2013).

Dicentrická chromozomová analýza je považována za zlatý standard v biodozimetrii, jelikož dicentrické chromozomy jsou specifické po expozici IZ. Dicentrické chromozomy jsou velmi nestabilní tělíska (Lee, Jin a kol., 2019). Vlivem DSB dochází k aktivaci mechanismů oprav buněčného poškození, avšak chybná reparace může vést k vzniku dicentrických chromozomů (Jeong a kol., 2022). Test je založen na principu mikroskopické detekce dicentrických chromozomů barvenými fluorescenční barvivem. Samostatná inkubace je dlouhá 48 hodin. Test DCA byl využit během jaderných havárií v Černobylu (1986) a Tokaimuře (1999) (Vijayalakshmi a kol., 2023). Tato metoda vyžaduje odborné hodnotitele pro identifikaci chromozomálních abnormalit, k získání spolehlivých výsledků je zapotřebí alespoň dvou hodnotitelů. Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) stanovuje hodnocení alespoň 500 buněk nebo 100 dicentrických chromozomů (Jeong a kol., 2022).

Test stanovení mikrojaderního prostřednictvím blokace cytokineze využívá izolované periferní mononukleární buňky (směs buněk lymfocytární a monocyto-makrofágové řady). Test je založen na principu detekce mikrojaderní vznikající v důsledku chromozomových zlomů vzniklých vlivem IZ, přičemž dochází k využití blokátoru (cytochalasin B) zastavující první buněčné dělení, čímž dochází k tvorbě dvoujaderných lymfocytů. Během testu dochází k počítání mikrojaderní ve dvoujaderných buňkách (lymfocytech), které vznikly přidáním cytochalasinu B, blokátor cytokineze prvního dělení buněčné cyklu, přičemž kultivace je dlouhá 72 hodin (Sioen a kol., 2020). Zdravé lymfocyty vytváří dvoujaderné buňky a poškozené lymfocyty vytvářejí mikrojádra obsahující chromozomální fragmenty (Bertucci a kol., 2023). Mikrojádra jsou mimojaderná tělíska vznikající v důsledku chromozomových zlomů (Vijayalakshmi a kol., 2023). Kromě záření, může ovlivnit přítomnost mikrojaderní také expozice mutagenům, životní prostředí, věk, pohlaví (Lee a kol., 2023).

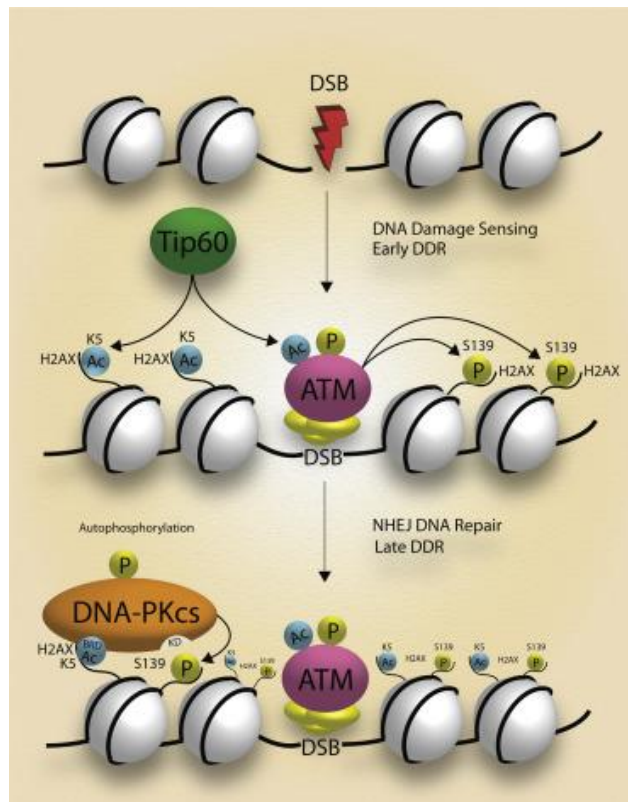
Další možností v biodozimetrii je stanovení míry fosforylace jaderného histonu H2AX (γ H2AX) (Horn a kol., 2011), které může být realizováno několika různými metodami. Parametry, které mohou ovlivnit výsledky tohoto metodologického přístupu jsou předmětem experimentální části této diplomové práce.

1.2.2. Jaderný histon H2AX

Molekula H2AX je jaderným histonem z rodiny H2A, jehož procentuální zastoupení z celkového H2A v buňce činí 2-25 % (Varvara a kol., 2019). H2A se řadí do podrodin, H2A1-H2A2, H2AZ a H2AX, přičemž právě poslední zmíněný histon H2AX je exprimovaný

v celém genomu (délka 142 AMK). Na rozdíl od ostatních histonů z rodiny H2A je tento histon H2AX delší o C-konec (Ohnishi a kol., 2017). Gen pro H2AX se nachází na 11 chromozomu (11q23.3) (Uniprot, 2024).

Vzhledem ke skutečnosti, že se podílí na opravě DSB DNA (Redon a kol., 2012), jedná se o důležitý biomarker při monitorování hladiny dávky IZ. S cílem opravit DSB acetyluje histoacetyltransferaza (Tip 60) a histondeacetylaza (HDAC4) chromatin, čímž dochází k rozvolnění struktury DNA (Řezáčová a kol., 2011). Dvojně zlomy na DNA jsou rozpoznány komplexem MRN (složený z molekul MRE11, Rad50 a NBS1), který způsobuje aktivaci tří důležitých kináz, a to ataxia telangiectasia proteinkinazy (ATM), AT a Rad related proteinkinazy (ATR) a DNA-dependentní proteinkinazy (DNA-PK), které katalyzují fosforylaci histonu H2AX na serinu 139 (vzniká tzv. γ H2AX) na C konci v místě vzniku DSB a v jeho okolí (Varvara a kol., 2019). Molekula ATM aktivuje a následně fosforyluje proteiny v místě vzniku DSB (Beaton a kol., 2015; Ohnishi a kol., 2017). Komplex MRN funguje jako senzor pro vyhledávání DSB a stabilizuje volné konce DNA. Vzniklé γ H2AX společně s ATM a mediátorem poškození DNA proteinem 1 (MDC1) zesilují signál DSB podél celého jádra.



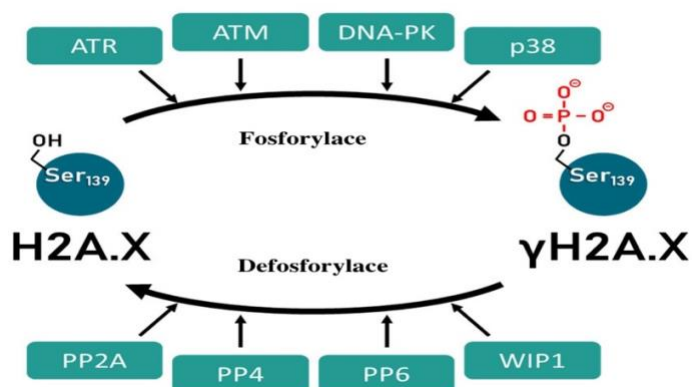
Obrázek č. 7: Fosforylace H2AX během opravy DSB na DNA způsobené IZ (Wang a kol., 2015)

Několik minut po vzniku DSB dochází k přiléhání tisíce molekul histonu H2AX na dvojně zlomy a dochází k jejich fosforylaci za vzniku γ H2AX (Zastko a kol., 2021).

Ubikvitované ligázy RNF8 a RNF168 vytváří polyubikvitovaný řetězec na MRN a γ H2AX, což umožňuje vazbu proteinů MDC1 a 53BP1, čímž se aktivuje checkpoint kináza (CHEK2), která způsobuje, že dochází k aktivaci proteinu p53 a následně k zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/S. Tím je umožněna oprava DSB na DNA před replikací, a to buď homologní rekombinací nebo nehomologním spojováním konců (Li a kol., 2022). Molekuly histonu H2AX nacházející se proximálně od léze jsou fosforylovány. MDC1 je protein, který podporuje vazbu dalších molekul z komplexu MRN, tato interakce způsobuje, že dochází k aktivaci DNA-dependentní kinázy, což vede k fosforylaci dalších histonů H2AX za vzniku γ H2AX. MDC1 pomocí domény BCRT zabraňuje defosforylaci a zároveň podporuje komplex MRN, aktivní ATM a další proteiny, které se podílejí na fosforylaci histonu, což způsobuje, že se fosforylovaný histon šíří od prvotního DSB, čímž dochází k vytvoření většího množství γ H2AX (Ohnishi a kol., 2017).

Vrchol fosforylace H2AX nastává hodinu po ozáření (Wilkins a Beaton-Green, 2023). Po úspěšné reparaci následně dochází ke zpětnému procesu, tedy, defosforylaci γ H2AX. Přibližně po 3 hodinách od ozáření dochází k poklesu γ H2AX až o 50 % jeho maximálních hodnot, avšak značná část γ H2AX může být detekovatelná i 6 hodin od indukce DSB (Nazarov a kol., 2003). Jsou známy dva mechanismy, jak k defosforylaci γ H2AX po reparaci dochází, a to buď přímá defosforylace γ H2AX pomocí fosfatáz nebo nahrazení (výměna) γ H2AX molekulou H2AX (Firsanov a kol., 2011). Předpokládá se, že v savčích buňkách je za obnovu histonu zodpovědný enzym fosfatáza 2 A (PP2A), který se řadí do rodiny PPP (fosfoproteiny), jehož enzymy jsou zodpovědné za defosforylaci serinu a threoninu (Mariano a kol., 2023; Zastko a kol., 2021). Doposud se však neví jistě, zda k tomu dochází *in situ*, nebo nejprve musí dojít k odstranění γ H2AX z chromatinu. Na rozdíl od savčích buněk kvasinky mají komplex histon H2A fosfatázy (HTP-C), který má aktivní podjednotku Pph3, které je až z 60 % podobná PP2A. U kvasinek defosforylace probíhá tak, že z chromatinu je nejprve odstraněn γ H2AX (Kinner a kol., 2008). Na samotnou defosforylaci γ H2AX se podílejí proteinové fosfatázy 2 A (PP2A), proteinové fosfatázy 4 (PP4), proteinové fosfatázy 6 (PP6) a p53 indukované fosfatázy 1 divokého typu (WIP1) (obrázek č. 8) (Stope, 2021), p38 MAPK jsou mitogenem aktivované proteinkinázy reagující na stresové podněty, účastní se apoptózy a dalších buněčných pochodů (Martínez-Limón a kol., 2020). Calyculin A se jeví jako vhodný inhibitor, který poskytne čas pro transport vzorku do příslušné laboratoře, jelikož defosforylace γ H2AX probíhá 1-2 hodiny po ozáření (Scarpato a kol., 2013). Studie Sharma a kolektiv z roku 2015 ukazuje, že s prodlužujícím se časem po ozáření dochází k postupnému klesání foků γ H2AX. Studie se zabývala kinetikou γ H2AX 30 minut, 2 hodiny, 4 hodiny, 7 hodin a 24 hodiny po ozáření,

přičemž nejmenší množství foků měly vzorky, které byly inkubovány 24 hodin, avšak jejich práce nevyužila žádného inhibitoru defosforylace (Sharma a kol., 2015).



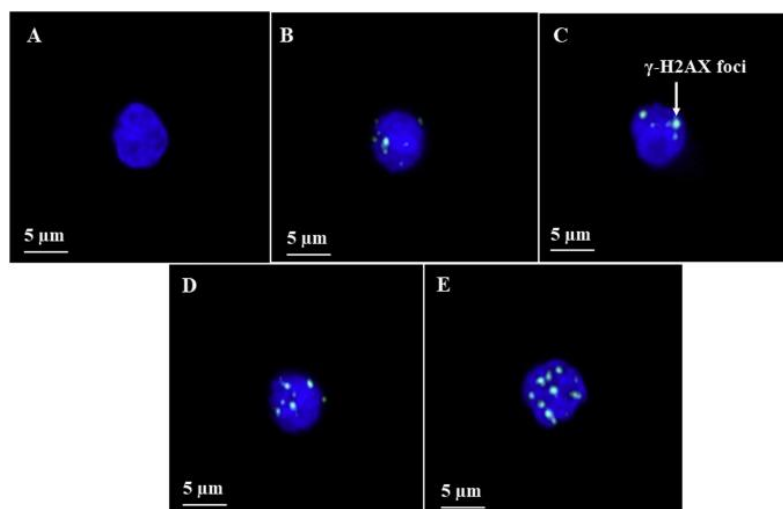
Obrázek č. 8: Defosforylace γ H2AX, které se účastní PP2A, PP4, PP6 a WIP1 (Upraveno podle: Stope, 2021).

1.2.3. Metody stanovení γ H2AX

K detekci γ H2AX se obecně využívají imunofluorescenční metody založené na reakci protilátky konjugované s fluorochromem a fosforylované formy histonu H2AX, tj. γ H2AX (Zhao a kol., 2022). K jeho stanovení je využíváno několika metodologických přístupů.

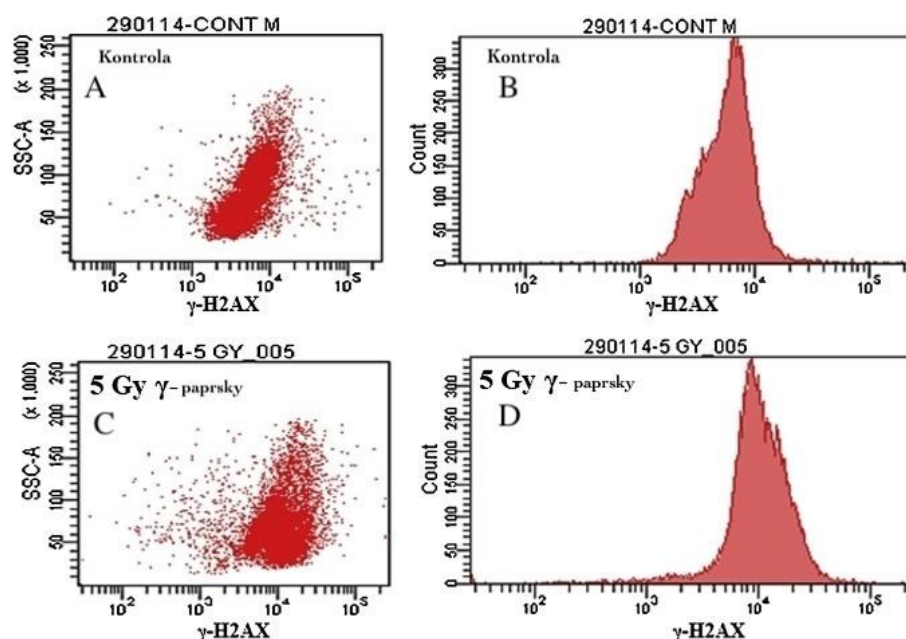
Mikroskopické stanovení γ H2AX je standardně zavedenou metodou, která je velmi oblíbená a široce využívaná ke studiu poškození DNA nízkými dávkami IZ, například u pacientů po celotělovém CT (Sakane a kol., 2020). Minimální detekovatelná dávka je 0,02 Gy (Raavi a kol., 2021). Metoda je založena na fixaci buněk na podložní sklíčko pomocí paraformaldehydu či methanolu, permeabilizaci cytoplazmatické membrány Tritonem X-100 a blokaci nespecifických vazebných míst prostřednictvím BSA. Dalším krokem je použití primární specifické monoklonální protilátky proti γ H2AX a sekundární protilátky značené fluorescenční látkou. Takto značené γ H2AX lze detekovat pod konfokálním či epifluorescenčním mikroskopem při 60 až 100násobném zvětšení. Jsou pozorovány foky, které odpovídají γ H2AX na DSB. Tato metoda je vhodná pro dávky do 4 Gy, vzhledem k možnosti překryvu ložisek γ H2AX v buňkách při vyšších dávkách nad 4 Gy. V rámci jednoho DSB se může objevit více foků a je známo, že množství foků roste s dávkou záření lineárně. Metoda je časově náročná na vyhodnocení (Raavi a kol., 2021).

Mikroskopické hodnocení γ H2AX je možné stanovit i na buňkách různých tkání, nikoliv výhradně na periferních lymfocytech. Díky této skutečnosti může tato metoda na základě detekce tvorby ložisek v různých tkání pomoci k rozlišení celotělového ozáření od parciálního ozáření (Lee a kol., 2022; Raavi a kol., 2021).



Obrázek č. 9: Snímky z fluorescenčního mikroskopu ložisek γ H2AX v lymfocytech (Raavi a kol., 2021). Snímek A vyobrazuje kontrolní lymfocyty, vedlejší snímek B zobrazuje dávku 0,1 Gy. Záběr C zachycuje dávku 0,5 Gy, zatímco D 2 Gy a poslední snímek E zobrazuje lymfocyty vystavené 2 Gy. Všechny jádra lymfocytů vystavené záření a vyobrazené na snímkách níže byly barveny DAPI (modrá barva).

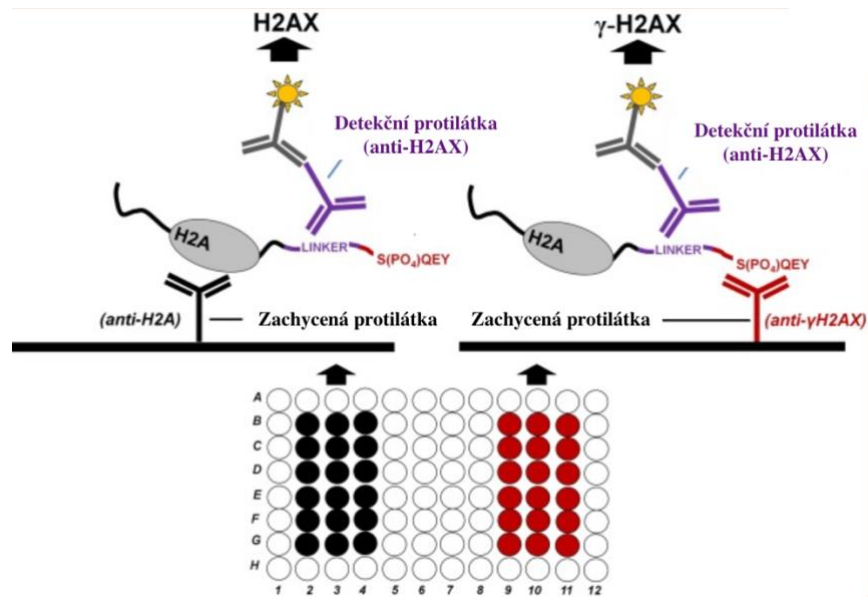
Stanovení γ H2AX metodou **průtokové cytometrie** je alternativou k mikroskopickému stanovení. K analýze je využívána buněčná suspenze periferních lymfocytů. Výstupní informací na průtokovém cytometru je medián intenzity fluorescence (MFI) buněčné populace pozitivních na γ H2AX. Velkou výhodou průtokové cytometrie je možnost analýzy většího množství buněk v krátkém časovém intervalu (značení a analýza trvá cca 3 hodiny). Citlivost je nižší než u mikroskopického hodnocení, a to díky tomu, že výstupní data udávají pouze relativní informaci v porovnání s mikroskopií, kde získáváme absolutní data o přesném počtu ložisek γ H2AX v buňkách. Minimální detekovatelná dávka v průtokové cytometrii je 0,25 Gy (Wanotayan a kol., 2022; Khan a kol., 2018; Raavi a kol., 2021). Minimální rozsah dávek však není v tomto případě omezen splýváním foků, a proto lze detekovat i dávky nad 4 Gy (Wanotayan a kol., 2022). Příklad analýzy γ H2AX na průtokovém cytometru znázorňuje obrázek č. 5 (Raavi a kol., 2021).



Obrázek č. 10: Záznam z analýzy na průtokovém cytometru, kde byly analyzovány izolované lymfocyty ozářeny 5 Gy ^{60}Co . Takto připravené lymfocyty byly inkubovány 30 minut při 37 °C, vzaty k analýze. Snímky A vyobrazuje dot plot intenzity fluorescence γH2AX u kontrolního vzorku, snímek B vyobrazuje histogram γH2AX u stejného vzorku. Snímek C zobrazuje dot plot ozářeného vzorku 5 Gy. Snímek D vyobrazuje histogram γH2AX ozářeného vzorku 5 Gy, na němž je vidět výrazné zvýšení intenzity fluorescence (Upraveno podle: Raavi a kol., 2021).

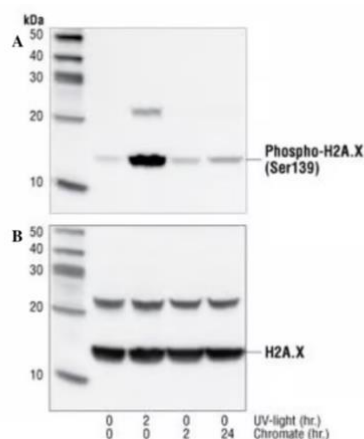
Technika **zobrazovací průtokové cytometrie** stanovení γH2AX je kombinací výhod mikroskopie a průtokového cytometru, která umožňuje velmi rychlé a přesné měření γH2AX . Tato metodika je velice vhodná, vzhledem k rychlosti a přesnosti metody (Durdik a kol., 2015; Wanotayan a kol., 2022). Zobrazovací průtoková cytometrie umožňuje analyzovat několik tisíc buněk na jeden vzorek v krátkém časovém intervalu a poskytnout velmi kvalitní snímky při vysoké průtokové rychlosti (Lee, Wang a kol., 2019).

ELISA stanovení γH2AX je citlivou a rychlou metodou (výsledky jsou získány do 24 hodin), kterou lze také využít k detekci γH2AX (Ramadhani a kol., 2023). Kromě měření γH2AX dochází k současnému měření celkového H2AX, což slouží jako vnitřní kontrola potvrzující, že jakákoliv detekce signálu je doopravdy dána zvýšením hladiny γH2AX a nejedná se o chybu při přípravě vzorku. Pokud byl vzorek vystaven IZ, dochází ke zvyšování poměru γH2AX a H2AX (Ji a kol., 2017).

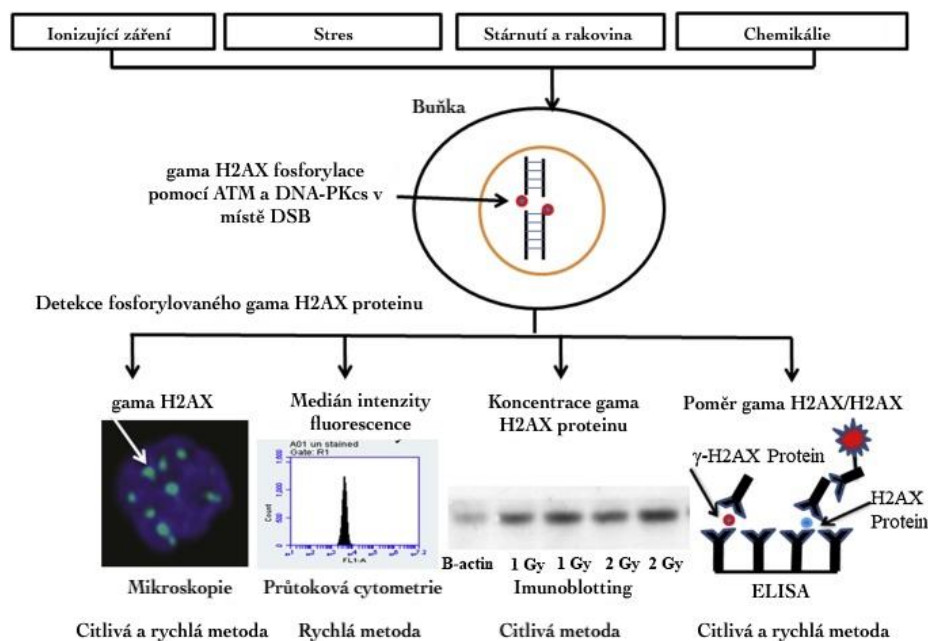


Obrázek č. 11: Stanovení γ H2AX metodou ELISA. Jamky jedné destičky jsou potažené dvěma různými zachycenými protilátkami, přičemž jedna je specifická pouze pro γ H2AX a druhá je schopná vázat veškeré H2A. Po inkubaci s proteinovým lyzátem dochází pomocí detekční protilátky k vazbě, tato protilátka je následně rozpoznána křenovou peroxidázou, která poskytuje signál (Upraveno podle: Ji a kol., 2017).

Stanovení γ H2AX pomocí **metody western blot** je založeno na detekci ubikvitovaných forem γ H2AX, vzhledem k tomu, že během fosforylace dochází k ubikvitinaci proteinů pomocí MDC1. Dochází k přenesení proteinu na membránu, kde následně dochází ke značení proteinu protilátkou (Luczak a Zhitkovich, 2019). Tato technika má nižší citlivost než mikroskopie. Čas analýzy je výrazně delší než u všech výše zmíněných metod. Jako kontrolu lze využít beta aktin (Raavi a kol., 2021).



Obrázek č. 12: Stanovení γ H2AX metodou western blot. Na obrázku jsou extrakty z buněk ošetřených a neošetřených UV zářením a chromanem sodným a následně značených anti- γ H2AX (snímek A) a anti-H2AX (snímek B) (Cell Signaling Technology).



Obrázek č. 13: Možnosti detekce γ H2AX. Souhrn základních metod, kterými lze detekovat a stanovit γ H2AX ukazuje obrázek č. 12 (Upraveno podle: Raavi a kol., 2021).

Mezi inovativní techniky stanovení γ H2AX patří **kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)**. Tato metoda je založena na separaci γ H2AX na koloně a následné detekci pomocí hmotnostního spektrometru. LC-MS/MS umožňuje detekci γ H2AX po vystavení nízkým dávkám (Zhao a kol., 2022). Výstupem z analýze jsou píky s přesným retenčním časem vztažené ke kontrole (Matsuda a kol., 2015).

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- 1) Vytipovat a otestovat parametry, které mohou ovlivnit výsledky stanovení γ H2AX.
- 2) Experimentálně stanovit nejvhodnější způsob uchovávání lidského krevního vzorku pro analýzu γ H2AX.
- 3) Na základě literární rešerše a získaných experimentální dat zhodnotit využití stanovení fosforylované formy jaderného histonu H2AX v biodozimetrii.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použitý materiál

3.1.1. Přístroje a pomůcky

Ledovač (GB1540; Brema Ice Makers; Itálie)

Centrifuga (Hettich Universal 32 R; Schoeller Instrument; Německo)

Chladnička (311-320L Innova Concept; Fagor; Česká Republika)

Vodní lázeň (TW8; Julabo; Německo)

Průtokový cytometr (BD FACS Aria II; BD Biosciences; Česká Republika)

Průtokový cytometr (BD FACSymphony™ A1; BD Biosciences; Česká Republika)

Vortex (Bio Vortex V1; Biosan; Česká Republika)

Klec typu IIL pro myši, konvenční (UNO; Holandsko)

Podestýlka do klece pro myši (Tapvei; USA)

Udržovací krmná směs pro zvířata (Altromin, Německo)

Software DIVA

Mikropipety (Transferpette S; BDL Česká Republika), sterilní špičky (Eppendorf; Německo), sérologické jednorázové pipety sterilní (TPP; Švýcarsko), pipetovací nástavec ACCU-JET S (BRAND; Německo), sterilní jehly (Chirana T Injecta; Česká Republika), sterilní injekční stříkačky (Chirana T Injecta; Česká Republika), sterilní skleněné zkumavky s lithium heparinem (BD Vacutainer; Česká Republika), zkumavky se štíhlým dnem (Sarstedt; Německo) faxové zkumavky (BD Vacutainer; Česká Republika), Pasteurovy pipety (P-LAB; Česká Republika), hliníková fólie (P-LAB; Česká Republika), nůžky (MEDIN, Česká Republika), pinzeta (P-LAB; Česká Republika), 50 ml zkumavky (TPP, Švýcarsko), 24 a 96 jamkové mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko).

3.1.2. Chemikálie

Ethanol (Penta; Česká Republika)

Formaldehyd 4 % (CARL ROTH; Německo)

0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich; Česká Republika)

Promývací roztok (připravené smícháním fosfátového pufru a 4 % fetálním bovinním sérem)

Fosfátový pufr (PBS; Carl Roth; Německo)

Fetální bovinní sérum FBS (GIBCO; USA)

Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI) s přidavkem 10 % FBS a 0,05 % ATB-penicilin 50 UI/ml a streptomycin 50 µg/ml (GIBCO; USA)

50 % ledový ethanol v PBS

γH2AX-PE (BD Biosciences; Česká Republika)

γH2AX-FITC (Sigma-Aldrich; Česká Republika)

Calyculin A (Sigma Aldrich; Česká Republika)

3.1.3. Biologický materiál

1) Laboratorní myši C57BI6 (samice, váha 18-20 g, stáří 6–8 týdnů). Původ pokusných zvířat: Velaz, s.r.o., Dědinská 893/29, 161 00 Praha 6- Ruzyně, RČH CZ 21760118. Chov zvířat probíhal ve zvlášť vyčleněné místnosti, kde byla zvířata umístěna v chovných nádobách v doporučeném počtu s vždy čerstvou podestýlkou. Průběžně byl kontrolován jejich stav a po celou dobu byla krmena a napájena čerstvou vodou neomezeně. Před experimentem byla zvířata aklimatizována, aby došlo ke snížení rizika vlivu stresu na výsledky experimentu. Experiment byl schválen etickou komisí pod jednacím číslem č.j. 4284/2021-MZE-18134.

2) Periferní krev byla odebrána do zkumavky s lithium heparinem od dárců dle etické komise (číslo 202403 P14). Číslo etické komise: 202403 P14

3.1.4. Zdroj záření

CHISOCOBALT ⁶⁰Co (Chisocobalt, Chirana Technik, Rožnov pod Radhoštěm, Česká Republika)

3.2. Test vlivu dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši *in vivo*

Experiment se zabývá vlivem dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši *in vivo*. Tři skupiny zvířat (myši C57BI6) byly vystavena účinku vnějšímu celotělovému gama ozáření (^{60}Co) o stejné dávce, ale jiném dávkovém příkonu (2,7414787 Gy/min, 0,667614 Gy/min, 0,294075 Gy/min). Různé hodnoty dávkového příkonu byly zajištěny různou vzdáleností ozařovaných zvířat od zdroje záření. Míra fosforylace jaderného histonu H2AX byla stanovena v čase 1 hodinu po ozáření metodou průtokové cytometrie.

3.2.1. Pracovní postup

1) Laboratorní zvířata (myši C57BI6) v celkovém počtu 30 ks byla rozdělena do čtyř skupiny, z nich tři skupiny obsahovaly osm myší a čtvrtá skupina obsahovala šest myší. Za účelem homogenního celotělového ozáření byla vystavena vnějšímu celotělovému gama záření o dávkových příkonech: 2,7414787 Gy/min, 0,667614 Gy/min, 0,294075 Gy/min dle tabulky č. 1. Čtvrtá skupina myší byla ponechána bez ozáření, jako negativní kontrola.

Dávka záření	Počet myší	Dávkový příkon	Čas ozařování	Vzdálenost od zdroje
4 Gy	8 ks	2,7415 Gy / min	1 min 28 vteřin	50 cm
4 Gy	8 ks	0,6676 Gy / min	5 min 59 vteřin	100 cm
4 Gy	8 ks	0,2941 Gy / min	13 min 36 vteřin	150 cm
0 Gy	6 ks	--	--	--

Tabulka č. 1: Rozpis laboratorních zvířat-podmínky ozařování.

- 2) Laboratorní zvířata (myši C57BI6) byla uvedena do narkózy v parách Isoflurinu (Vetpharma), euthanázíe byla provedena krční dislokací. Krev byla odebrána intrakardiálně do zkumavky s lithium heparinem do hodiny po ozáření.
- 3) 100 μ l intrakardiálně odebrané krve bylo přeneseno do zkumavky se štíhlým dnem, bylo přidáno 65 μ l 4 % formaldehydu a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě. Posléze byl přidán 1 ml 0,1 % Tritonu X-100 a inkubováno při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Po inkubaci byly přidány 3 ml vychlazeného promývacího roztoku, který byl připraven smícháním fosfátového pufru se 4 % fetálním bovinním sérem, zkumavky byly centrifugovány (1600 ot., 5 minut, 8 °C). Roztok nad sedimentem byl odsátý a následně byl přidán 1 ml ledového 50 % ethanolu. Inkubace probíhala 10 minut na ledu. Po inkubaci byly vzorky ještě dvakrát promyty, nejprve 3 ml promývacího roztoku a poté 1 ml promývacího roztoku, přičemž po každém promytí následovala centrifugace (1600 ot., 5 minut, 8 °C) a odsátí roztoku nad sedimentem.
- 4) Po poslední centrifugaci byl roztok nad sedimentem odsátý na 100 μ l. Takto připravené vzorky se mohly značit protilátkou konjugovanou s fykoerytrinem (anti- γ H2AX-PE). Protilátka konjugovaná s PE byla ředěna 1:1 (k 5 μ l bylo přidáno 5 μ l promývacího roztoku). Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μ l anti- γ H2AX-PE. Následně došlo k inkubaci na ledu po dobu 60 minut v temnu. Po inkubaci byly vzorky dvakrát promyty 1 ml promývacího roztoku a centrifugovány (1600 ot., 5 minut, 8 °C). Kapalina nad sedimentem byla odsátá na objem alespoň 300 μ l.
- 5) Před měřením na průtokovém cytometru došlo k protřepání suspenzí na vortexu. Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Aria II a vyhodnoceny pomocí software DIVA.

3.3. Test vlivu rozdílných inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX *in vitro*

Experiment se zabývá studiem vlivu různých inkubačních podmínek na biodozimetrický ukazatel γ H2AX v lidské periferní krvi *in vitro*. Celkem 14 krevních vzorků od každého dárce bylo vystaveno *in vitro* účinkům gama záření (^{60}Co) o dávce 4 Gy, případně 0 Gy (negativní kontrola). Vzorky byly následně kultivovány za různých inkubačních podmínek (teplota, čas, stabilizační činidlo). Po ukončení experimentu byla v každém vzorku stanovena míra fosforylace jaderného histonu H2AX metodou průtokové cytometrie a získaná data byla vzájemně porovnána se vzorkem inkubovaným 30 minut při laboratorní teplotě bez stabilizačního činidla, u kterého se předpokládá nejvyšší exprese γ H2AX (pozitivní kontrola). Veškerá měření byla realizována simultánně na dvou cytometrických analyzátoch za účelem posouzení vlivu analyzátoru na dosažené výsledky.

3.3.1. Pracovní postup

- 1) Krev od čtyř dárců byla odebrána intravenózně do zkumavky s lithium heparinem.
- 2) Krev byla ředěna RPMI médiem v poměru 1:2 a napipetovaná do mikrotitračních destiček.
- 3) Mikrotitrační destičky s naředěnou krví byly vystaveny vnějšímu ozáření (^{60}Co) 4 Gy. Po ozáření byla krev daná do příslušných inkubačních podmínek (teplota, čas, stabilizační činidlo), včetně krve neozářené (negativní kontrola).
- 4) K části vzorků bylo přidáno 10 μl 1nM calyculinu A. Takto připravené vzorky se umístily do příslušných inkubačních podmínek, jež byly teplota (20°-25 °C; 0 °C; 4 °C) a čas (30 minut; 24 hodin), jak ukazuje tabulka č. 2.
- 5) Do zkumavky se štíhlým dnem bylo přeneseno 100 μl krve. Následně se ke krvi přidalo 65 μl 4 % formaldehydu a nechalo se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byl přidán 1 ml 0,1 % Tritonu X-100 a nechalo se inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci došlo k přidání 3 ml vychlazeného promývacího roztoku a zkumavky byly centrifugovány (1600 ot., 5 minut, 8 °C). Roztok nad sedimentem byl odsátý a byl přidán 1 ml ledového 50 % ethanolu a inkubovalo se 10 minut na ledu. Následovaly dva kroky promývání, nejprve s 3 ml promývacího roztoku a posléze s 1 ml promývacího roztoku, přičemž po každém promytí následovala centrifugace (1600 ot., 5 minut, 8 °C) a odsátí roztoku nad sedimentem. Po poslední centrifugaci došlo k odsátí objemu na 100 μl . Vzorky 1 a 2 byly značeny 30 minut po vystavení vnějšímu ozáření (^{60}Co), ostatní až 24 hodin. Vzorky byly značeny protilátkou

konjugovanou s FITC (anti- γ H2AX-FITC). Ke každému vzorku bylo přidáno 10 μ l anti- γ H2AX-FITC. Následně došlo k inkubaci na ledu po dobu 60 minut v temnu. Po inkubaci byly vzorky dvakrát promyty 1 ml promývacího roztoku a centrifugovány (1600 ot., 5 minut, 8 °C). Roztok nad sedimentem byl odsátý na objem alespoň 300 μ l.

6) Před měřením na FC došlo k protřepání na vortexu.

A. Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Aria II a vyhodnoceny pomocí software DIVA.

B. Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACSymphony™ A1 a vyhodnoceny pomocí software DIVA.

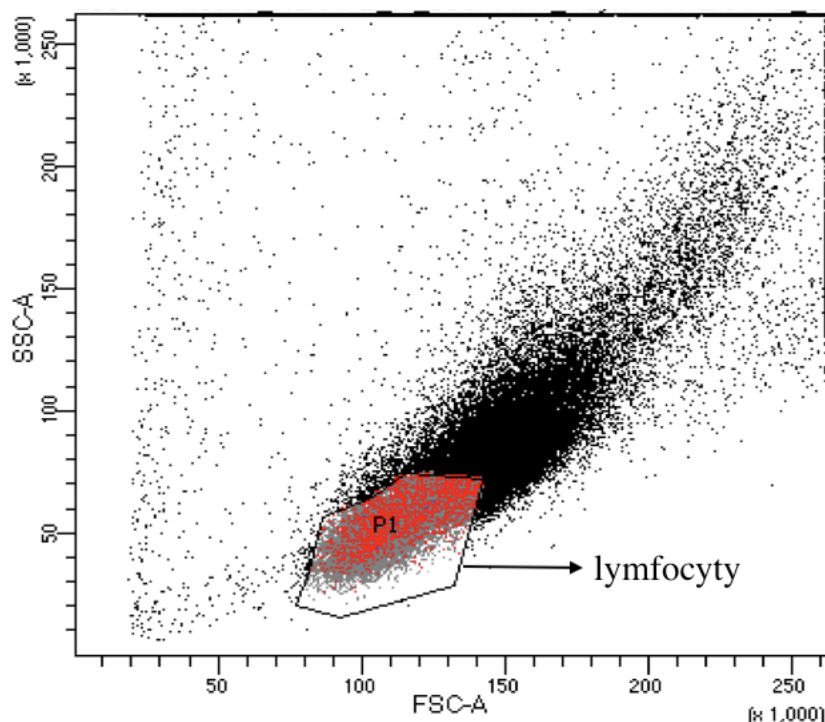
VZOREK Č.	1 (pozitivní kontrola)	2 (negativní kontrola)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4 Gy	X		X	X			X	X			X	X		
0 Gy		X			X	X			X	X			X	X
30 min	X	X												
24 hod			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BEZ INHIBITORU	X	X	X		X		X		X		X		X	
1 nM CAL A				X		X		X		X		X		X
RT (20-25 °C)	X	X									X	X	X	X
LED (0 °C)			X	X	X	X								
LEDNICE (4 °C)							X	X	X	X				

Tabulka č. 2: Rozdělení inkubačních podmínek pro jednotlivé vzorky č.1 – č. 14.

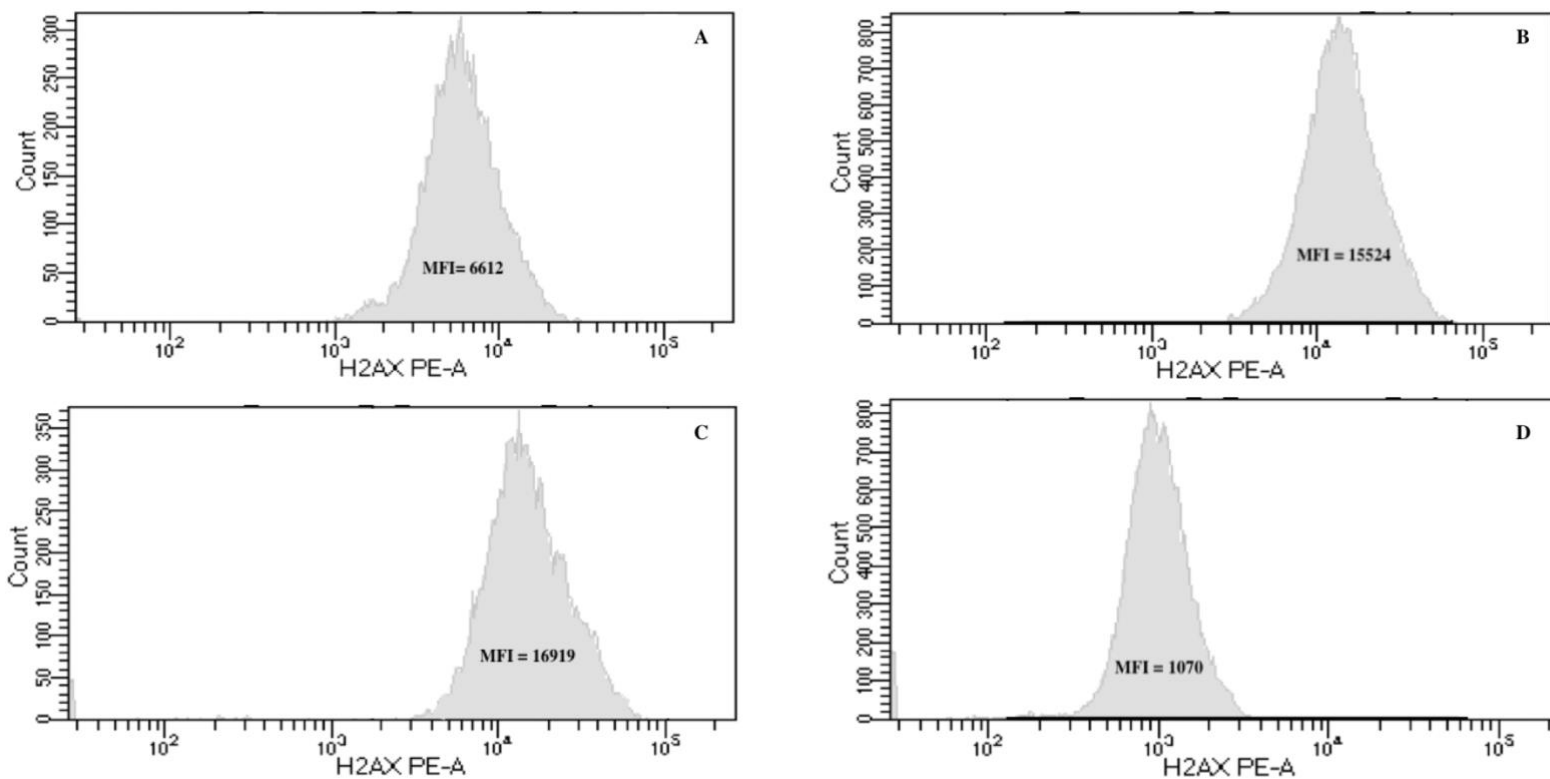
4. Výsledky

4.1. Analýza vlivu dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši *in vivo*

Cílem experimentu byla analýza vlivu dávkového příkonu na biodozimetrický ukazatel γ H2AX u myši *in vivo*. Laboratorní myši byly vystaveny vnějšímu celotělovému ozáření (^{60}Co) o třech různých dávkových příkonech a míra exprese γ H2AX-PE byla analyzována 1 hodinu po ozáření metodou průtokové cytometrie. Výsledky z průtokového cytometru byly vyhodnoceny pomocí software DIVA. Na základě analýzy velikosti (forward scatter, FSC) a vnitřní struktury buněk (side scatter, SSC) byla vymezena populace lymfocytů (lymfogate), obrázek č. 14, u které byla následně stanovena střední hodnota intenzity fluorescence (MFI – Mean Fluorescence Intensity) γ H2AX u lymfocytů na jednoparametrovém histogramu. Příklady z analýzy zobrazuje obrázek č. 15.



Obrázek č. 14: Vymezení lymfocytární populace v periferní krvi myši na průtokovém cytometru BD FACS Aria II u ozářené myši č. 4 (dávkový příkon P1).

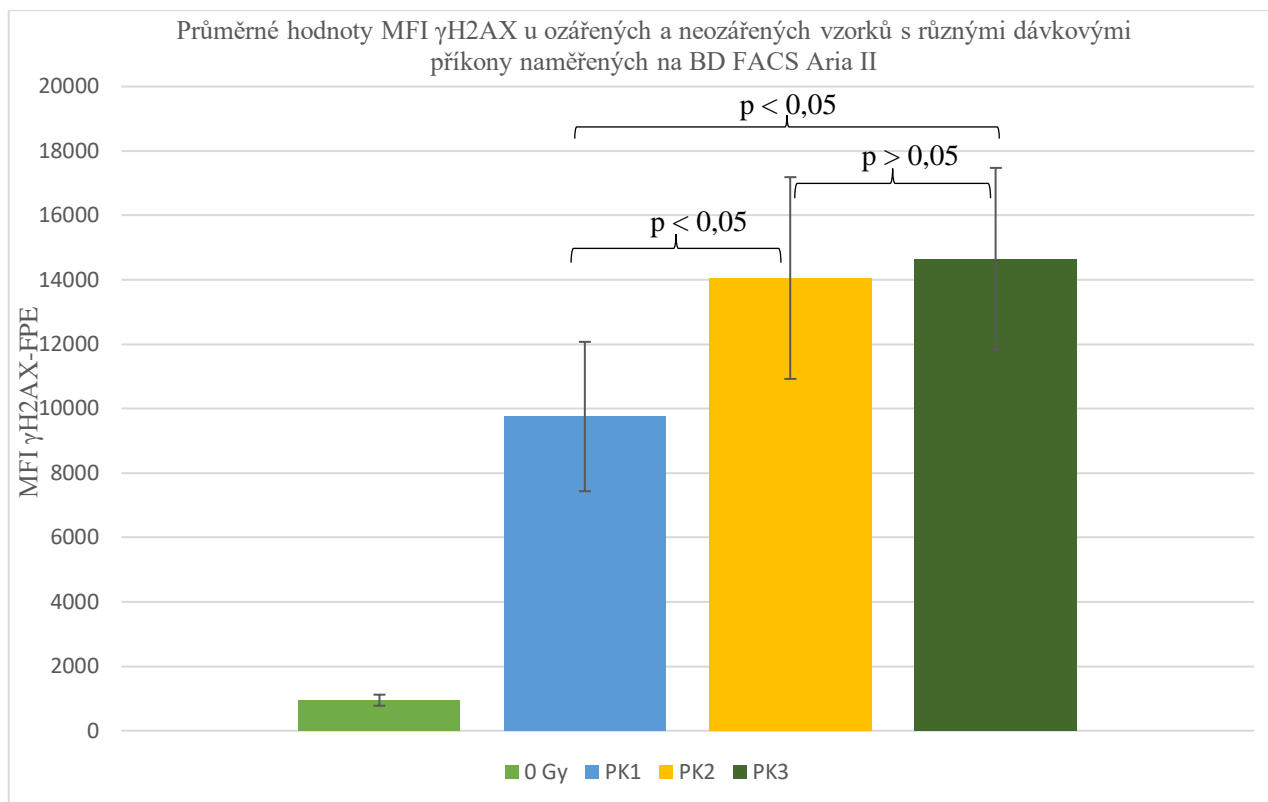


Obrázek č. 15. Histogramy MFI γ H2AX-PE periferních lymfocytů u myši: 13A) myš č. 2; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 2,7414787 Gy/min. 13B) myš č. 3; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 0,667614 Gy/min. 13C) myš č. 6; in vivo 1 hodinu po ozáření 4 Gy, dávkový příkon: 0,294075 Gy/min. 13D) myš č. 1 (negativní kontrola).

dávkový příkon (Gy/min)	P1 (2,7415)	P2 (0,6676)	P3 (0,2941)	NK (0,0)
č. vzorku	MFI (γ H2AX-PE)			
1 (P1, P2, P3, NK)	6888	20066	15879	883
2 (P1, P2, P3, NK)	6612	14567	11740	765
3 (P1, P2, P3, NK)	8350	15524	14991	1070
4 (P1, P2, P3, NK)	12914	12691	9948	995
5 (P1, P2, P3, NK)	12034	15749	13104	774
6 (P1, P2, P3, NK)	9866	12428	16919	1200
7 (P1, P2, P3, NK)	10125	10297	16350	--
8 (P1, P2, P3, NK)	11251	11119	18279	--
AVG	9755	14055	14651	948
SDV	2319	3132	2823	172

Tabulka č. 3.: Hodnoty MFI γ H2AX-PE čtyř skupin myši po ozáření 4 Gy in vivo různými dávkovými příkony P1, P2, P3 a negativní kontroly (NK, 0 Gy) získaná z průtokového cytometru BD FACS Aria II.

Různý dávkový příkon zvyšoval hodnotu MFI γ H2AX-PE. Dávkový příkon P1, který byl v porovnání s P2 a P3, nejmenší, avšak míra fosforylace γ H2AX je nejnižší (AVG MFI = 9755), oproti tomu, dávkové příkony P2 a P3, jež byly téměř totožné (tabulka č. 3) vykazovaly velmi podobnou míru fosforylace γ H2AX (AVG MFI γ H2AX P2 = 14055; AVG MFI γ H2AX P3 = 14651). Tudiž lze říct, že dávkový příkon má významný vliv na míru fosforylace γ H2AX, jak ukazuje obrázek č. 16, na kterém je vyobrazen sloupcový graf znázorňující průměrnou hodnotu MFI γ H2AX-PE u rozdílných dávkových příkonů (P1, P2, P3) a negativní kontroly.



Obrázek č. 16: Sloupcový graf průměrných hodnot MFI γ H2AX-PE periferních lymfocytů *in vivo* ozářených myší C57BL/6 (8 ks myší/skupina) 4 Gy dávkovými příkony P1= 2,7415 Gy/min (modrý sloupec), P2 = 0,6676 Gy/min (žlutý sloupec), P3 = 0,2941 Gy/min (tmavě zelený sloupec) a lymfocytů neozářených vzorků myší (světle zelený sloupec, negativní kontrola, 6 ks myší/skupina)

4.2. Analýza vlivu rozdílných inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX

Na lidské periferní krvi 4 dárců byl testováno vliv rozdílných inkubačních podmínek na biodozimetrický ukazatel γ H2AX po ozáření *in vitro*. Celkem 14 vzorků (získaných ředěním krve) od každého dárce bylo vystaveno *in vitro* vnějšímu gama záření (^{60}Co). Dávka gama záření činila 4 Gy, popřípadě 0 Gy u negativních kontrol. Po ozáření byly vzorky vystaveny různým inkubačním podmínkám, jimiž byl čas, teplota a stabilizační činidlo. Jako stabilizační činidlo byl využit calyculin A v koncentraci 1 nM. Veškeré vzorky byly inkubovány s protilátkou konjugovanou s FITC (anti- γ H2AX-FITC) v temnu po dobu 60 minut a poté vzaty k analýze na FC. Výsledky z FC byly vyhodnoceny pomocí software DIVA, kde byl výsledkem medián intenzity fluorescence (MFI γ H2AX-FITC) na lymfocytární populaci. Získané hodnoty MFI byly porovnávány se vzorkem, který byl inkubován 30 minut při laboratorní teplotě bez stabilizačního činidla (calyculin A), jež by měl mít největší hodnotu MFI γ H2AX (pozitivní kontrola).

(4.2.1.) Prvním cílem bylo vyhodnotit a určit nejlepší inkubační podmínky

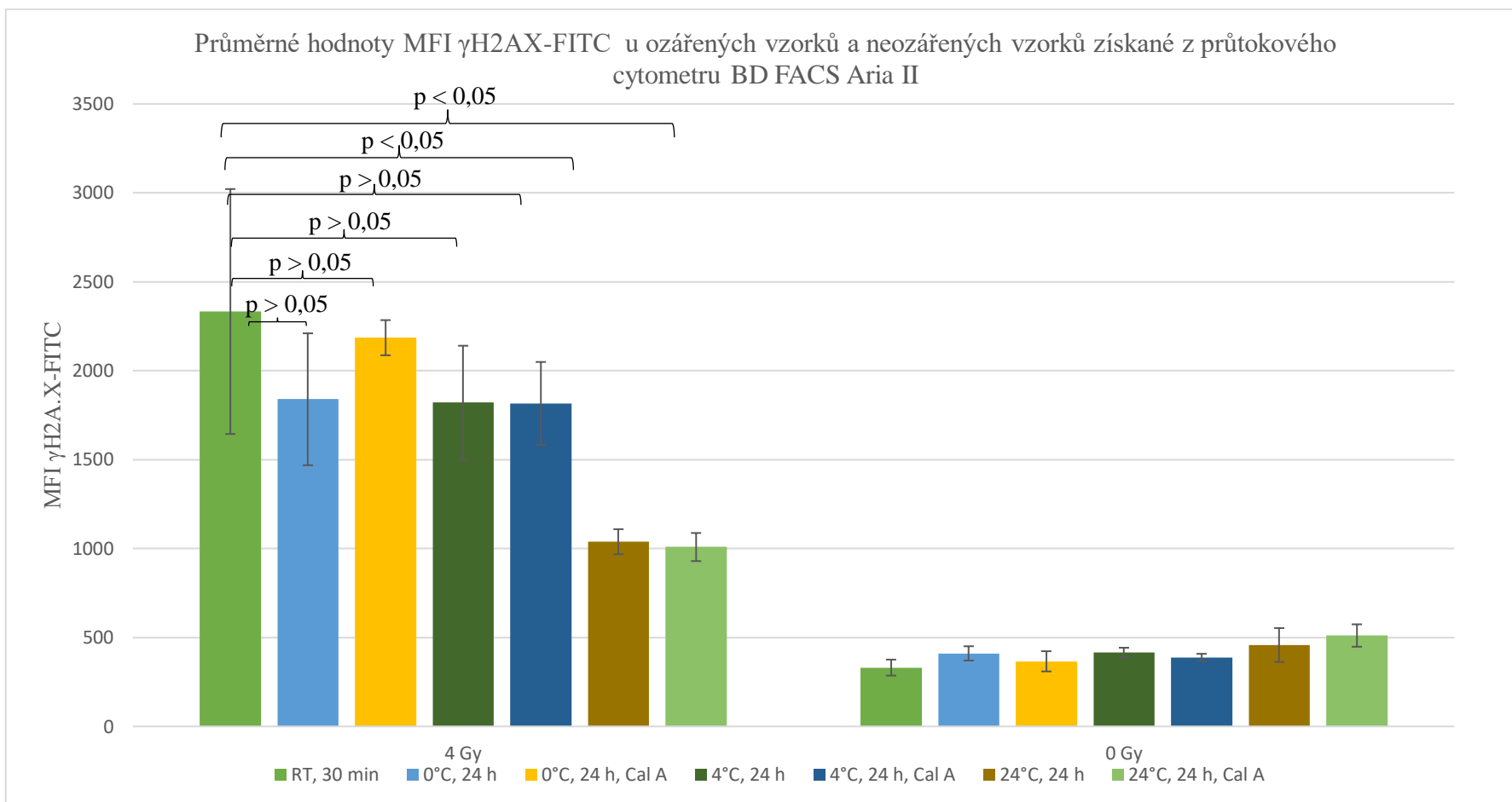
(4.2.2.) Všechny vzorky byly měřeny na dvou analyzátořech, a to na BD FACS Aria II a BD FACSymphony™ A1 za účelem statistického zhodnocení odlišnosti analýzy na různých průtokových cytometrech.

4.2.1. Výsledky testu inkubačních podmínek krve na biodozimetrický ukazatel γ H2AX

Cílem experimentu bylo porovnat vliv rozdílných inkubačních podmínek na biodozimetrický ukazatel γ H2AX. V tomto experimentu byly porovnávány rozdílné inkubační podmínky krve (čas inkubace: 30 minut, 24 hodin), teplota (0 °C, laboratorní teplota RT, 5 °C) a ne/přítomnost stabilizačního činidla (10 μ l 1nM calyculin A). Dosažené výsledky shrnuje tabulka č. 4. V tabulce jsou vidět průměrné hodnoty jednotlivých inkubačních podmínek, které následně byly vloženy do grafu společně se směrodatnou odchylkou. Inkubační podmínky, které byly testovány, byly statisticky vyhodnoceny vzhledem k pozitivní kontrole (vzorek č. 1). Obrázek č. 17 vyobrazuje sloupcový graf s průměrnými hodnotami γ H2AX MFI-FITC u lymfocytů izolovaných z periferní lidské krve se stejnou absorbovanou dávkou, která činila 4 Gy, zároveň lze v grafu vidět MFI γ H2AX u neozářených lymfocytů. Z uvedených dat vyplývá, že vzorky č. 2 – č. 5 nejsou vzhledem k vzorku č. 1 signifikantně odlišné, zatímco u vzorků č. 6 a č. 7 byl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl.

ARIA II	MFI γ H2AX-FITC													
č. vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
č. dárce														
1	2472	364	1318	2205	432	364	2216	1937	415	415	960	934	356	565
2	1342	273	1863	2125	396	445	1438	1476	387	368	1126	1092	565	566
3	2585	317	1999	2096	362	312	1862	1858	412	376	1012	1060	403	450
4	2931	368	2178	2317	453	344	1766	1993	451	392	1057	949	507	464
AVG	2333	331	1840	2186	411	366	1821	1816	416	388	1039	1009	458	511
SDV	689	45	371	99	40	57	320	233	26	21	70	79	95	63

Tabulka č. 4: Míra fosforylace H2AX lidských periferních krevních lymfocytů po in vitro ozáření 4 Gy vyjádřená hodnotou MFI-FITC u jednotlivých vzorků č. 1 – č. 14 vystavených různým inkubačním podmínkám (měřeno na průtokovém cytometru BD FACS Aria II).



Obrázek č. 17: Sloupcový graf průměrných hodnot míry fosforylace γ H2AX vyjádřených jako MFI-FITC u ozářených vzorků a neozářených vzorků porovnávající různé inkubační podmínky (seřazené č. 1 až č. 14) měřené na průtokovém cytometru BD FACS Aria II.

4.2.2. Porovnání výsledků testů stanovení biodozimetrického ukazatele γ H2AX mezi dvěma analyzátory BD FACS Aria II a BD FACSymphony™ A1

Cílem experimentu bylo porovnání výsledků stanovení biodozimetrického ukazatele γ H2AX mezi dvěma analyzátory, a to BD FACS Aria II a BD FACSymphony™ A1. Všechny vzorky (14 vzorků/dárce) byly zpracovány a následně rozděleny na dvě poloviny, z nichž každá byla analyzována na jiném cytometru.

Tabulka č. 5 ukazuje absolutní hodnoty MFI získané z analyzátoru BD FACSymphony™ A1 pro vzorky č. 1 – č. 14 od 4 dárců. Tabulka č. 6 zobrazuje průměrné hodnoty MFI γ H2AX relativně vztažené k hodnotám negativní kontroly (vzorek č. 2) u obou analyzátorů (BD FACS Aria II a BD FACSymphony™ A1).

Grafické zobrazení srovnání absolutních hodnot a relativních hodnot MFI-FITC u obou analyzátorů zobrazuje obrázek č. 18.

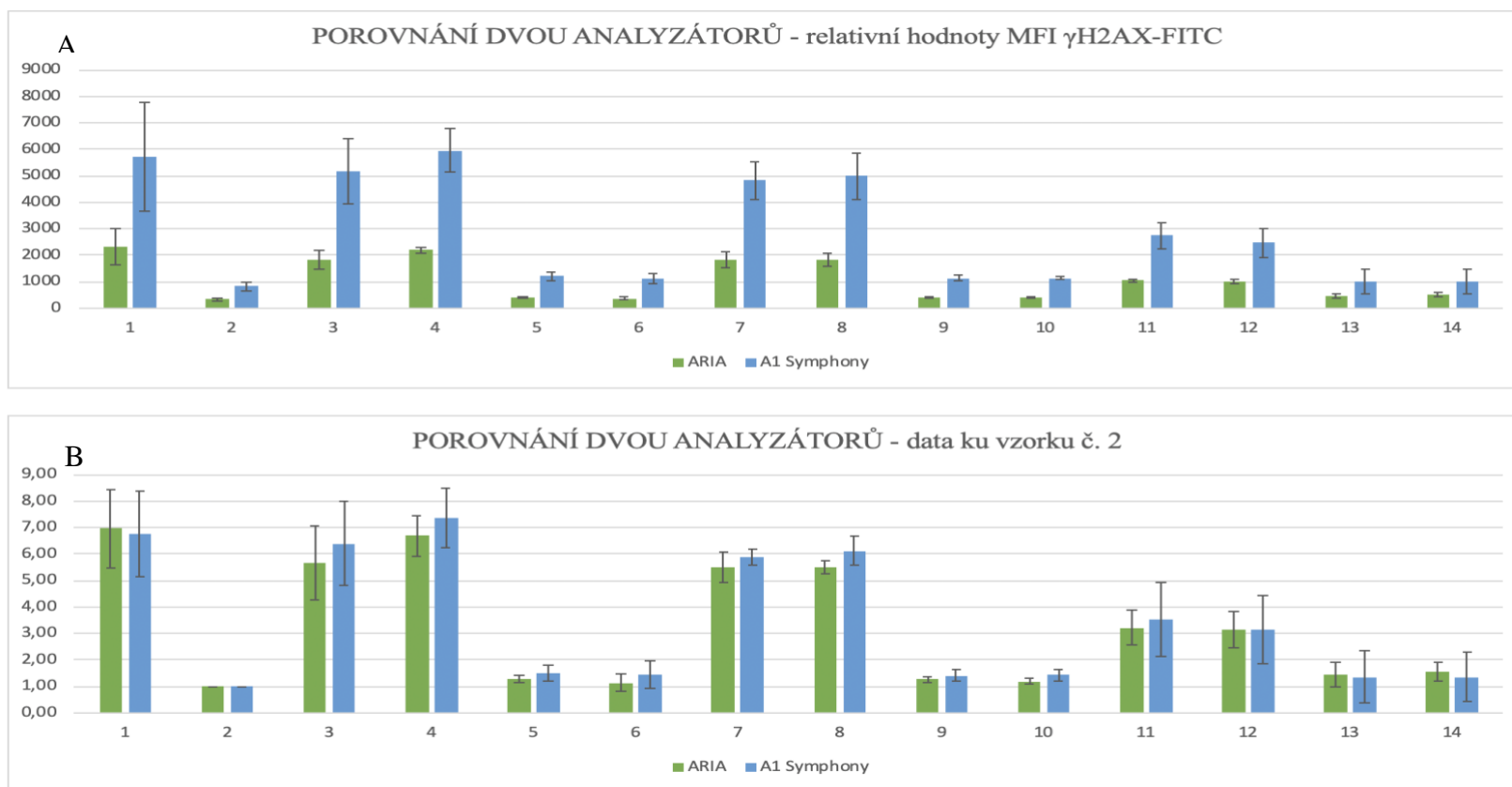
Ze získaných dat vyplývá, že absolutní hodnota MFI u shodných vzorků se u jednotlivých analyzátorů liší v souvislosti s nastavením optického systému přístroje (obrázek č. 18 A). Vliv analyzátoru lze eliminovat relativním vyhodnocením dat vzhledem k negativní kontrole, viz obrázek č. 18 B.

A1 Symphony	MFI γ H2AX-FITC													
č. vzorku	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
č. dárce														
1	6010	829	3557	5178	1089	911	4974	4807	1025	1148	2326	1736	697	672
2	2746	617	4864	5378	1138	1356	3752	3897	1058	1081	3468	3086	1724	1707
3	6782	950	5786	6295	1143	1061	5190	5280	1273	1139	2596	2576	735	800
4	7286	883	6465	6943	1439	1134	5335	5997	1196	1194	2614	2455	902	878
AVG	5706	820	5168	5949	1202	1116	4813	4995	1138	1141	2751	2463	1015	1014
SDV	2042	144	1259	822	160	185	723	881	117	46	496	557	481	470

Tabulka č. 5: Míra fosforylace H2AX lidských periferních krevních lymfocytů po in vitro ozáření 4 Gy vyjádřená hodnotou MFI-FITC u jednotlivých vzorků č. 1–č. 14.

analyzátor	ARIA II			A1 Symphony
č. vzorku	MFI (γ H2AX-FITC) / dárce č. 1 - 4			
	AVG	SDV	AVG	SDV
1	6,96	1,49	6,77	1,63
2	1	0	1	0
3	5,67	1,41	6,4	1,59
4	6,69	0,77	7,36	1,14
5	1,25	0,14	1,5	0,29
6	1,14	0,33	1,42	0,52
7	5,51	0,59	5,9	0,29
8	5,5	0,24	6,12	0,55
9	1,27	0,12	1,41	0,21
10	1,18	0,12	1,42	0,23
11	3,21	0,65	3,53	1,4
12	3,12	0,69	3,15	1,27
13	1,42	0,46	1,36	0,96
14	1,58	0,35	1,35	0,95

Tabulka č. 6: Relativní hodnoty MFI γ H2AX-FITC – absolutní hodnoty MFI periferních lidských lymfocytů *in vivo* ozářených 4 Gy a vystaveny různým inkubačním podmínkám (vzorky č. 1 – č. 14) relativně vyhodnocené vzhledem k hodnotě MFI negativní kontroly (vzorek č. 3) pro cytometr BD ARIA II a BD FACSymphony.



Obrázek č. 18: Sloupcové grafy porovnávající průměrné hodnoty MFI γ H2AX – FITC u lymfocytů získaných z lidské periferní krve. (18 A) graf znázorňuje relativní hodnoty MFI γ H2AX – FITC na dvou analyzátorech, přičemž je jasně patrná odlišnost jejich měření, (18 B) znázorňuje graf absolutních hodnot MFI γ H2AX-FITC získané z dvou analyzátorů (BD FACS II ARIA a BD FACSymphony), které se získaly vztahením relativních hodnot k vzorku č. 2 (negativní kontrola), přičemž je patrné, že došlo k eliminaci optického nastavení průtokových cytometrů a analyzátoři poskytují velmi podobné signály.

5. Diskuze

Jaderný histon H2AX je součástí rodiny histonů, který se podílí na stavbě oktameru nukleozomu (Redon a kol., 2012). Hlavní úloha H2AX spočívá ve vlastní fosforylaci, které se účastní důležité kinázy za vzniku fosforylované formy histonu H2AX, tj. γ H2AX (Varvara a kol., 2019). Vlivem IZ dochází k poškození vlákna DNA (Borrego-Soto a kol. 2015; Mavragani a kol., 2019), které jsou v různé míře reparovatelné. Ve snaze opravit DSB dochází k fosforylaci H2AX. γ H2AX následně aktivuje kaskádu reakcí vedoucí k opravě DSB (jež se účastní mnoho dalších proteinů) vzniklých na vlákně DNA vlivem vnějších činitelů (Zastko a kol., 2021; Redon a kol., 2012). Buněčný cyklus se za pomoci γ H2AX zastavuje ve fázi G1/S, aby buňka získala čas k opravě DSB před replikací (Li a kol., 2022). Z tohoto důvodu našlo stanovení fosforylované formy jaderného histonu H2AX své využití v biodozimetrii, která využívá biologických ukazatelů pro zpětnou rekonstrukci vystavené dávky IZ (REMM, 2024).

Stanovení γ H2AX se řadí mezi biodozimetrické metody, obdobně jako stanovení počtu lymfocytů v periferní krvi tři dny po ozáření, test DCA nebo test CBMN s blokadou cytokineze (Herate a Sabatier, 2020). V důsledku ozáření indukují apoptózu a jejich pokles koreluje s obdrženou dávkou záření (Swartz a kol., 2014). Je však známo, že lymfocytární subpopulace mají rozdílnou citlivost k IZ. Nejvíce radiosenzitivními buňkami jsou B-lymfocyty, následně T-lymfocyty a přirození zabíječi (NK buňky). Naopak makrofágy a dendritické buňky se jeví jako méně radiosenzitivní (Heylmann a kol., 2021). Stanovení absolutního, popřípadě relativního množství lymfocytů v periferní krvi lze považovat za metodu, kterou lze realizovat v jakékoliv laboratoři s hemoanalyzátozem a bez speciálního zaškolení pracovníků. Nicméně za zlatý standard biodozimetrie je dodnes považován test DCA. Test dicentrických chromozomů byl zpočátku jediným dostupným biodozimetrickým ukazatelem, který se velmi často využívá k rekonstrukci dávky u profesně ozářených osob (Lee a kol., 2023). Využit byl například i u patnácti respondentů, kteří se nacházeli v Černobyli v období její havárie. V době, kdy docházelo k odběrům krve byli pacienti již léčeni na akutní nemoc z ozáření (Salassidis a kol., 1994). Dle současného moderního náhledu na biodozimetrii je nejvhodnějším postupem společné využití dvou a více metod pro zjištění vystavené dávky IZ. Každá z metod má své omezení v oblasti citlivosti nebo časové náročnosti, a proto se jejich vzájemná kombinace jeví jako ideální řešení (IAEA, 2024).

Testování těchto metod a jejich mezilaboratorní porovnání se aktuálně zabývá mezinárodní asociace Realizing the European Network in Biodosimetry (RENEB, 2024). Asociace byla

založena v roce 2017 a jejím hlavním úkolem je příprava na jaderné havárie, radiační ochrana a výzkum v této oblasti (RENEB, 2020). Do současné doby proběhlo stanovení neznámých vzorků a porovnání výsledků z analýz mezi partnerskými institucemi Francie, Německa, Norska, Portugalska, Itálie, Španělska, Bulharska, Řecka, Belgie, Spojeného Království a České Republiky (Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta, katedra radiobiologie) právě v oblasti metodik DCA, CBMN a γ H2AX metodou mikroskopie (Port a kol., 2023).

Chceme-li porovnat uplatitelnost metodik v praxi (použití v případě hromadné radiační mimořádné události s ozářením velkého počtu osob) je třeba říci, že významnou výhodou metodik DCA a CBMN je skutečnost, že detekované změny přetrvávají v organizmu po dlouhou dobu. Vystavenou dávku lze odhadnout i s odstupem několika let od expozice (Petrovová a Svoboda, 2019). Výsledky stanovení tedy nejsou tolik závislé na čase odběru krevního vzorku po ozáření. Oproti tomu nevýhodou je dlouhá kultivační doba v porovnání s γ H2AX (Wilkins a Beaton-Green, 2023). Během DCA se provádí 48 hodinová kultivace a vyhodnocení vyžaduje dlouhodobou praxi. U CBMN je nutná 72 hodinová kultivační doba, ale vyhodnocení je výrazně jednodušší v porovnání s DCA (Lee a kol., 2023). U metodik CBMN a γ H2AX je třeba brát v úvahu, že indukce měřených parametrů může být ovlivněna také věkem, oxidačním stresem, životním prostředím a expozicí mutagenům každého jedince. Tyto faktory mohou zvyšovat množství výše uvedených ukazatelů (Bertucci a kol., 2023; Lee a kol., 2023). Metoda detekce γ H2AX je pak nevýhodná zejména vzhledem k nutnosti odebrat krevní vzorek do 2 hodin po ozáření a transportovat jej co nejrychleji do laboratoře. V důsledku opravy DSB na DNA a defosforylace histonu, totiž hladina γ H2AX v řádu hodin klesá (Stope, 2021; Petrovová a Svoboda, 2019). Kultivační podmínky spojené s transportem vzorku, proto hrají při samotném stanovení významnou roli. Samotné mikroskopické zpracování je pak náročné na čas a je limitované horní hranicí dávky 4 Gy (Raavi a kol., 2021). Využití γ H2AX jako biodozimetrického ukazatele a jeho stanovení metodou průtokové cytometrie se jeví, vzhledem k ostatním metodikám, jako nejrychlejší alternativa ke stanovení absorbované dávky IZ. Nicméně existuje řada faktorů, které mohou míru fosforylace histonu H2AX ovlivnit. Některé z nich byly vybrány a testovány v rámci této diplomové práce.

V rámci diplomové práce byly vytipovány parametry, u kterých byl testován vliv na konečné stanovení jaderného histonu H2AX. Testovanými parametry byly: dávkový příkon IZ, inkubační podmínky a typ (model) analyzátoru (průtokového cytometru).

Vliv dávkového příkonu byl testován *in vivo* na myším modelu detekcí biodozimetrického ukazatele histonu γ H2AX. Tři skupiny zvířat byly vystaveny homogennímu celotělovému gama ozáření o dávce 4 Gy. Této dávky bylo u každé skupiny dosaženo prostřednictvím jiného dávkového příkonu a různé doby ozařování. Z dosažených dat vyplývá, že ačkoliv byla absorbovaná dávka u všech zvířat shodná, při nejvyšším testovaném dávkovém příkonu (2,74 Gy/min) byla míra fosforylace jaderného histonu H2AX signifikantně nižší ($p < 0,0001$) než u druhých dvou skupin s dávkovými příkony 0,67 Gy/min a 0,29 Gy/min, mezi kterými signifikantní rozdíl zjištěn nebyl ($p > 0,05$). Lidské lymfocyty, jakožto jedni z nejvíce radiosenzitivních krevních buněk, byli vystaveny dávkám 0,400 Gy/min a dávkám 0,015 Gy/min, přičemž výsledky naznačovali, že došlo až k vyšší produkci γ H2AX ložisek o 40 % u dávkového příkonu 0,400 Gy/min, oproti 0,015 Gy/min (Nair a kol., 2019). Je prokázáno, že různé dávkové příkony mohou mít při ozařování živé tkáně zcela rozdílné biologické dopady. V rámci České republiky jsme všichni vystavováni přirozeným zdrojům IZ (přirozené pozadí), jejichž hodnota se pohybuje v rozmezí 0,02 – 0,22 μ Gy/h (SURO). Pro představu, legislativně daný limit pro ozáření běžného obyvatele v ČR (do limitu se nezapočítává přírodní pozadí a lékařské ozáření) dle vyhlášky č. 422/2016 Sb. je 1 mSv/rok, respektive 1 mGy/rok pro gama záření. Pojem „velmi nízké dávky“ označuje hodnoty kumulativní dávky do 10 μ Gy (odpovídá dávce obdržené při běžném RTG vyšetření). Jako „nízké dávky záření“ jsou označovány hodnoty v rozmezí 10-100 mGy (celotělového CT vyšetření je 14-21 mGy), případně dávkový příkon menší než 6 mGy/h (OSN, 2024).

Z literatury vyplývá, že nízké dávkové příkony 0,1-1 Gy/h (1,7-17 mGy/min) mohou prokazovat pozitivní účinek na velké množství biologických procesů, jako jen např. dlouhověkost, což bylo prokázáno na myších, veverkách a morčatech. Dalším pozitivním účinkem je účinek na mitochondrie (Kostyuk a kol., 2022). Vlivem nízkých dávek dochází k zvýšení oxidačního stresu, což vede ke zvýšené produkci ROS. Bylo prokázáno, že tato zvýšená produkce má pozitivní účinek na imunitní systém a metabolismu, jelikož nadměrná produkce ROS vede ke zvýšení produkce antioxidační aktivity, což může být použito jako vhodná terapie nemocí, jež jsou způsobeny oxidačním poškozením biomolekul (Ristow a Schmeisser, 2014). Současně tento nízký rozsah dávkového příkonu může u určitých typů nádoru zvýšit jejich radiosenzitivitu při následném ozáření vyššími dávkami IZ v rámci radioterapie (Sgouros a kol., 2007). Mezi negativní účinky nízkých dávek patří karcinogeneze, šedý zákal, srdeční onemocnění a mohou mít nežádoucí dopad na psychickou rovnováhu jedince (Tang a kol., 2017). UNSCEAR dále definuje „střední dávky“, jako dávky, které se

pohybují v rozmezí 100 mGy až 1 Gy, přičemž při dávce 1 Gy a výše již dochází k rozvoji akutní nemoci z ozáření (CDC, 2024). Tyto dávky například obdrželi pracovníci provádějící sanační práce v Černobyli. Dávky nad 1 Gy jsou označovány jako „dávky vysoké“ (OSN, 2024). Vysoké dávky a vysoké dávkové příkony jsou standardně využívány v případě konvenční radioterapie nádorů (10-100 Sv/h).

V roce 2014 ovšem popsali Favaudon a kolektiv protektivní vliv vysokého dávkového příkonu (nad 40 Sv/s) na nenádorové tkáně. Tento UHDR (ultra high dose rate) nespouští TGF β dependentní fibrogenní mechanismus, a tedy nevede k radiací indukované apoptóze hladkosvalových buněk, přičemž kinetika úbytku nádorových buněk zůstává stejná. Tento objev se stal základem pro rozvoj nové metody, tzv. FLASH terapie, využívající UHDR v rámci radioterapie (Vítek, 2023; Romano a kol., 2022). Námi testovaná kumulativní dávka 4 Gy patří mezi dávky vysoké. V případě myšího modelu se však jedná o dávku výrazně nižší, než je hodnota jejich 50 % letální dávky (LD_{50/30} myši C57BI6 je rovna 5,4 Gy, nepublikovaná data katedry radiobiologie), zatímco u člověka jde o hodnotu 4,5 Gy (U.S. Department, 2016). Z hlediska dávkového příkonu patří všechny tři testované příkony také do dávek vysokých. Nižších dávkových příkonů nebylo možné na pracovišti z technických důvodů dosáhnout. I přesto byly zaznamenány signifikantní rozdíly. Paradoxně u zvířat ozářených nejvyšším dávkovým příkonem byla prokázána menší míra exprese γ H2AX, a tedy pravděpodobně menší poškození DNA. Výsledky studie Turner a kolektiv z roku 2015 potvrzuje opačný trend u myší vystavených celotělovému záření RTG paprsky o různých dávkách a dávkových příkonech, přičemž jeden dávkový příkon se řadil mezi HDR (1,03 Gy/min) a druhý mezi LDR (0,31 cGy/min). Vyšší míra exprese γ H2AX byla prokázána u HDR bez ohledu na celkovou absorbovanou dávku 1,1 Gy; 2,2 Gy; 4,4 Gy).

Metoda detekce γ H2AX, bez ohledu na to, zda se jedná o mikroskopii nebo průtokovou cytometrii, je významně limitovaná časem odběru krevního vzorku po ozáření, protože v rámci reparačních mechanismů DSB DNA exprese γ H2AX dosahuje svého vrcholu v rozmezí 30-60 minut po ozáření. Soudobé kalibrační křivky jsou proto sestaveny pro dobu 2 hodiny po ozáření, kdy lze ještě v dostatečné míře H2AX detekovat a současně je to doba reálně dosažitelná pro odběr vzorků u ozářených osob (Moquet a kol. 2023). Vhodné inkubační podmínky, které by zajistily možnost efektivně analyzovat vzorek například v čase 24 hodin po ozáření (doba nutná pro sběr vzorků v případě radiační mimořádné události a transport do laboratoře), jsou proto nezbytné pro efektivní použití stanovení γ H2AX jako biodozimetrického ukazatele při radiační

mimořádné události. V rámci našeho experimentu byly testovány inkubační podmínky: teplota (0 °C, RT; 4 °C), přítomnost/nepřítomnost inhibitoru fosfatázy-calyculinu A. Periferní krev 4 dárců byla *in vitro* vystavena gama záření (4 Gy) a vzorky byly inkubovány za daných podmínek po dobu 24 hodin. Výsledky exprese γ H2AX byly porovnány s negativní kontrolou (neozářená krev) a s krví ozářenou a analyzovanou v čase 30 minut po ozáření (RT). Z výsledků je patrné, že jak teplota 0 °C, tak samotný calyculin A, vedly k omezení defosforylace γ H2AX po dobu 24 hodin. Jako nejvhodnější se však jeví spojení těchto dvou faktorů, tedy inkubace při 0 °C s 1 nM calyculinem A. Teplota blízká 0 °C, která významně redukuje buněčné enzymatické procesy, společně s calyculinem A, který funguje jako inhibitor fosfatázy (Zastko a kol., 2021), inhibovaly úspěšně defosforylaci γ H2AX.

Již dříve bylo prokázáno, že calyculin A funguje účinně již při 1-10 nM koncentracích, kdy stabilizuje hladinu γ H2AX v lidských lymfocytech po dobu 2 hodinou, a to při nízkých dávkách, které se běžně využívají v diagnostice. V našem experimentu jsme prokázali efektivitu tohoto inhibitoru i při dávkách vysokých, a to po dobu 24 hodin. Zdrojem vysoce toxické látky calyculinu A je japonská mořská houba *Discodermia calyx*. Sama mořská houba calyculin A ve svém organismu detoxikuje fosforylací za vzniku fosfocalyculinu A za přítomnosti symbionta *Candidatus Entotheonela* sp. (Jomori a kol., 2021). Toxicita calyculinu A produkovaným mořskou houbou obecně je dána inhibiční aktivitou vůči fosfoproteinům, čímž zabraňuje defosforylaci serinu/threoninu (Mariano a kol., 2023; Jomori a kol., 2021).

Vzhledem ke skutečnosti, že výstupem cytometrického stanovení je relativní informace o střední fluorescenci (MFI) analyzované populace buněk, je třeba si uvědomit, že hodnota MFI může být ovlivněna nejen mírou exprese γ H2AX, ale také nastavením přístroje (změna napětí na laserech v čase), a že se může významně lišit i mezi jednotlivými analyzátoři. Porovnávali-li data v rámci jednoho experimentu uskutečněného v jedno časové období je tento vliv zanedbatelný. V případě přípravy kalibrační křivky (dávková závislost exprese γ H2AX) pro biodozimetrické účely a následné stanovování „slepých vzorků“ za účelem zpětného odhadu absorbované dávky, je třeba vnější vlivy na MFI eliminovat či kompenzovat. V rámci této diplomové práce jsme porovnávali dva analyzátoři, BD FACSymphonyTMA1 a BD FACSARIA II. Bylo pozorováno, že analyzátoři měří rozdílné hodnoty MFI γ H2AX-FITC, proto bylo provedeno relativní vyhodnocení ku negativní kontrole, čímž došlo úspěšně k eliminaci vlivu rozdílného nastavení optiky každého analyzátoři. Statisticky byl následně

vyhodnocen rozdíl mezi dvěma soubory (všech 14 vzorků s různými inkubačními podmínkami) hodnot MFI γ H2AX-FITC a bylo prokázáno, že nebyl signifikantní rozdíl mezi analyzátory.

Ke stanovení míry fosforylace je zapotřebí fluorochromů. V rámci diplomové práce byly využity dva fluorochromy PE a FITC. PE neboli fykoerytrin je barvivo ze skupiny fykobilinproteinů, který se nachází u sinic, skrytěk (kryptomonády) a ruduch (červené řasy). Je více druhů PE, nejprozkoumanější je R-PE, přičemž nachází vzhledem ke svému výborným fluorescenčním vlastnostem užití v imunoanalýze, průtokové cytometrii, buněčné biologii a fluorescenční mikroskopii (Tan a kol., 2023). R-PE tvoří velký komplex a je charakteristický vysokou fluorescencí, je velmi často využíván ke konjugaci se specifickými monoklonálními a polyklonálními protilátkami ve FC (Bohacova a kol., 2021). Konjugace protilátky s fluorochromem probíhá v poměru 1:1 (Zhou a kol., 2009). Emisní maximum se pohybuje v 576 nm a fluorescence je červeno-oranžová (Merck Millipore; BD Biosciences). FITC neboli fluorescein-5-isothiokyanát je barvivo, které má své užití v mikroskopii v diagnostice v lékařství (Merck Millipore). FITC se váže na protein tak, že hledá volnou primární aminoskupinu, se kterou vytvoří kovalentní amidovou vazbu, primární amin aminoskupiny interaguje s elektrofilním uhlíkem isothiokyanátové skupiny a dochází k tvorbě vazby FITC na protein (AAT Bioquest, 2024). FITC je charakteristické malou nescifickou vazbou k biologickým tkáním. Je prokázáno, že více fluoresceinů se může vázat na jednu IgG protilátku třikrát až pětkrát, než dojde ke změně vazebné afinity (Brelje a kol., 2002). Emisní maximum FITC je 520 nm a fluorescence je žluto-zelená (Merck Millipore; BD Biosciences). Dalším možným fluorochromem vhodným k využití během průtokové cytometrie je allophycocyanin (APC) (ThermoFisherScientific), ale většina studií je prováděna za pomoci fluorochromů, jako je PE a FITC.

Veškeré biodozimetrické metody vychází z předpokladu homogenního celotělového ozáření a kalibrační křivky jsou vypracovány pro gama nebo energeticky adekvátní RTG zdroj záření. Nicméně v reálně praxi je homogenní celotělové ozáření viditelné velmi zřídka a většina radiačních událostí vede spíše k parciálnímu ozáření, kdy je významně ozářena pouze určitá část organismu (Horn a kol., 2011). Ovšem i v případě, že obdržené záření je distribuované nehomogenně, je pravděpodobné, že se jeho účinky budou projevovat i na neozářených částech organismu (Pazzaglia a kol., 2022). Ačkoliv oba případy vystavení IZ mohou vést k rozvoji akutního radiačního syndromu (REMM, Lamkowski a kol., 2014), mají osoby s parciálním ozářením výrazně vyšší šanci na přežití, a proto je tento fakt nutnou součástí anamnézy

a z hlediska třídění pacientů radiačních mimořádných událostí je velmi významný (Valente a kol., 2015). Na studii 34 pacientů, kteří byli v rámci CT vyšetření vystaveni nehomogennímu ozáření organismu, bylo u 16 z nich metodou DCA prokázáno, že dicentrické chromozomy indukované tímto parciálním ozářením, nevykazovaly typické Poissonovo rozdělení pravděpodobnosti, jako vzorky ozářené homogenně (Neronova a Aleksanin, 2022). Stanovení jaderného histonu γ H2AX metodou průtokové je z hlediska posouzení homogenity ozáření relativně snadné. Je-li organismu ozářen homogenně, je v rámci analýzy dat dobře detekovatelná jedna populace lymfocytů a typického Gaussonova rozdělení. Dojde-li k parciálnímu ozáření, nalezneme v krevních vzorcích 2 hodiny po ozáření snadno odlišitelné minimálně 2 populace lymfocytů – ozářené (vysoké MFI) a neozářené (MFI odpovídající negativní kontrole) (Havelek a kol., 2011).

Dalšími parametry, které nebyly testovány v rámci diplomové práce a ovlivňují konečné stanovení histonu γ H2AX jsou: metodika, typ záření, oxidační stres, fluorochromy. Množství γ H2AX ale také ovlivňují jiný činitelé, jako UV záření, nízké pH, teplo (Schütz a kol., 2021), hypoxie (Williamson a kol., 2020). Dalším vlivem, který může výrazně zvyšovat tvorbu γ H2AX v buňkách, je vystavení chemickým látkám (Raavi a kol., 2021). Vystavení se chemickým látkám, jako jsou aromatické aminy, které se využívají k výrobě barviv a pigmentů, je důležitý faktor, který vede k rozvoji rakoviny močového měchýře. Tyto chemické látky s kombinací oxidačního stresu, vedly ke zvýšení γ H2AX v buňkách močového měchýře (Suzuki a kol., 2024). Výrazný vliv má oxidační stres, který podporuje stárnutí organismu a snižuje schopnost reparace DNA, což se projevuje jako trvale přítomné γ H2AX (Řezáčová a kol., 2011). Zvýšené množství γ H2AX bylo pozorováno u pacientů s věkem vyšším 50 let, jednalo se o skupinu lidí, která byla vystavena opakovaným nízkým dávkám IZ (Khan a kol., 2018). Množství fosforylované formy histonu H2AX stoupá se zvyšujícím se množstvím senescentních buněk, takže se dá říct, že γ H2AX funguje do určité míry jako ukazatel stáří (Schütz a kol., 2021). Využití fosforylovaného histonu bylo prokázáno u transformace fyziologická tkáň v maligní, jako je karcinom prsu (Palla a kol., 2017; Varvara a kol., 2019), osteosarkom a melanom (Řezáčová a kol., 2011). Také druh IZ (alfa, beta, gama, RTG) má vliv na konečném stanovení γ H2AX. Existuje více druhů záření, jako jsou alfa částice, beta částice, se kterými nebylo provedeno velké množství studií, rentgenové záření a γ záření. V některých studiích bylo využito kontaminace radionuklidy a byla sledována odpověď γ H2AX. Studie Shuryak a kolektiv z roku 2021 vykazuje korelaci mezi vdechnutým ^{137}Cs s množstvím γ H2AX, přičemž množství lze přepočítat na dávku záření, avšak je nutno znát

farmakokinetiku radionuklidu a dobu od pozření/vdechnutí. Vnitřní kontaminace radionuklidu poškozují DNA velmi podobně jako vnější ozáření, i když zde je výpočet absorbované dávky komplikovanější (Schumann a kol., 2022). Indukci γ H2AX u lymfocytů prostřednictvím alfa částic prokázala studie z roku 2022. Bylo prokázáno, že alfa částice indukují 1,5krát větší foky než gama paprsky o stejné energii (Lee a kol., 2022). Působení RTG paprsků na indukci γ H2AX bylo prokázáno na lidských hematopoetických CD34⁺ kmenových buňkách metodou fluorescenční mikroskopie (Sioen a kol., 2023). V souvislosti s rozvojem radioterapie pomocí rychlených nabitých částic (Tingenelli a Durante, 2020) byl zkoumán vliv IZ na množství fosforylovaného histonu γ H2AX s ohledem na různý lineární přenos energie (LET): 13-100 keV/ μ m. Buňky vystaveny záření o nižším LET vykazovaly malé homogenně rozložené foky γ H2AX, oproti buňkám, které byly vystaveny LET 60keV/ μ m a více. Zde došlo k tvorbě větších foků γ H2AX v buňce podél dráhy částic (Oike a kol., 2023). Obecně nejvyšší LET vykazují alfa částice, pohybuje se v rozmezí 50-200 keV/ μ m (Murshed, 2019). V rámci diplomové práce byly využity paprsky gama a ozařovač ⁶⁰Co. LET gama paprsků ⁶⁰Co je 0,2 keV/ μ m (Murshed, 2019).

V rámci diplomové práce byly stanoveny faktory, které mohou ovlivnit finální stanovení γ H2AX. Ve výsledku bylo zjištěno, že jsou parametry (faktory), které lze a některé nelze ovlivnit. Během diplomové práce došlo k testování námi vytipovaných parametrů, jako je dávkový příkon, inkubační podmínky a volba analyzátorů. Z hlediska biodozimetrického využití γ H2AX je dávkový příkon významný faktor, a je možné, že pro různé rozsahy příkonu by bylo vhodnější mít různé kalibrační křivky. Z hlediska transportu krevního vzorku navrhuje jako nejvhodnější inkubační podmínky 0 °C; 4 °C po dobu 24 hodin za využití stabilizátoru calyculinu A, tudíž lze říct, že vliv transportu krevního vzorku je možné také eliminovat. Z hlediska analyzátoru je nutné měření na stejných analyzátorech (příprava kalibrační křivky) nebo výsledky relativně vyhodnotit k neozářené krvi, tudíž lze říct, že vliv analyzátoru lze eliminovat.

6. Závěr

Fosforlyovaná forma jaderného histonu H2AX (γ H2AX) patří mezi biodozimetrické ukazatele absorbované dávky ionizujícího záření. V rámci diplomové práce byla hodnocena využitelnost metody detekce γ H2AX metodou průtokové cytometrie.

Byly vytipovány parametry, které mohou výsledky stanovení γ H2AX ovlivnit. Mezi faktory, které nelze předvídat, řadíme biologické náležitosti každého jedince, jako je jeho věk, životní styl či předešla expozice mutagenům. Mezi veličiny fyzikální, které mohou ovlivnit výsledky analýzy, patří například dávkový příkon ionizujícího záření, typ analyzátorů (průtokového cytometru) či inkubační podmínky vzorku před analýzou. Tyto faktory jsme testovaly s cílem návrhu nejvhodnějšího způsobu eliminace jejich případného vlivu.

Dávkový příkon je významný faktor. Bylo prokázáno, že při stejné absorbované dávce vykazují vzorky vystavené různým dávkovým příkonům signifikantní rozdíl v míře exprese γ H2AX. V rámci biodozimetrie je tedy nezbytné mít k dispozici kalibrační křivky pro jednotlivé dávkové příkony.

Hlavní nevýhodou využití γ H2AX jako biodozimetrického ukazatele je však skutečnost, že vrcholu fosforylace dosahuje 30-60 minut po ozáření a následně klesá. To je problematické nejen z hlediska nutnosti včasného odběru, ale i transportu krevního vzorku do příslušné laboratoře k analýze. V rámci této diplomové práce bylo prokázáno, že pro zachování intenzity signálu i 24 hodin po ozáření je vhodné vzorek krve transportovat v teplotě blízké 0 °C v přítomnosti stabilizačního činidla.

Vzhledem ke skutečnosti, že výstupní informací stanovení γ H2AX průtokovou cytometrií je relativní hodnota míry fluorescence fluorochromu konjugovaného s protilátkou, je zřejmé, že výběr fluorochromu, stejně jako individuální technické nastavení optického systému každého jednotlivého analyzátoru, ovlivňuje hodnotu naměřených dat. V rámci eliminace tohoto vlivu je vhodné použít fluorochrom PE, který je díky své velikosti s protilátkou konjugován ve stálém poměru 1:1. Vliv analyzátoru lze pak eliminovat tvorbou kalibrační křivky na stejném analyzátoru, popřípadě vztahením hodnoty ozářeného vzorku k hodnotám negativní kontroly.

Zhodnocení možného využití detekce γ H2AX jako biodozimetrického ukazatele metodou průtokové cytometrie vychází z výhod, respektive nevýhod, jaké tato metoda s sebou nese. Jaderný histon γ H2AX vznikající ve struktuře DNA v důsledku působení IZ je vhodným

biodozimetrickým ukazatelem pro rekonstrukci absorbované dávky, obdobně jako mezinárodně standardizované metody: DCA, CBMN a stanovení lymfocytů v periferní krvi. Oproti těmto biodozimetrickým technikám, které jsou časově náročné, je stanovení γ H2AX metodou průtokové cytometrie metodou rychlou, a tedy vhodnou v případě nutnosti stanovení velkého množství vzorků v krátkém čase. Diskutovaný vliv časného poklesu detekovaného ukazatele řeší tato diplomová práce návrhem inkubačních podmínek pro zpracování krve po odběru. I přesto existují faktory, které eliminovat nelze, a které je nutno zohlednit při interpretaci získaných dat. Tyto faktory shrnuje tabulka č. 7.

Faktor	Vliv na míru fosforylace H2AX a využití v rámci biodozimetrie	Řešení
Dávkový příkon	ANO Míra fosforylace se mění s dávkovým příkonem	Sestavení kalibračních křivek s ohledem na různé dávkové příkony
Typ (druh) IZ (alfa, beta, gama, ...)	ANO Míra fosforylace se mění s typem IZ	Sestavení kalibračních křivek s ohledem na různé druhy IZ
Analyzátor	ANO Nastavení přístroje ovlivňuje intenzitu měřeného signálu	Eliminace vlivu analýzou negativní kontroly (neozářené krve)
Čas odběru	ANO Míra fosforylace kulminuje v čase 30–60 minut po ozáření a poté klesá	Odběr nutno realizovat do 2 hodin po ozáření
Doba nutná pro transport krve	ANO Míra fosforylace kulminuje v čase 30–60 minut po ozáření a poté klesá	Zajištění inkubačních podmínek (5 °C; 0 °C; stabilizátor)
Doba nutná pro provedení analýzy	NE	Výsledky lze získat do 4 hodin od odběru krevního vzorku
Erudice personálu	NE	Metoda je snadná na analýzu i vyhodnocení
Cena	NE	Finančně nevýznamná
Věk, životní styl, expozice mutagenům, oxidační stres	ANO	Vliv faktorů nelze eliminovat, pouze je třeba zahrnout je v rámci interpretace výsledků
Homogenní/parciální ozáření	ANO	Metoda je výhodná pro určení (ne)homogenity ozáření
Fluorochromy	ANO	Využití PE jako vhodného fluorochromu

Tabulka č. 7: Zhodnocení faktorů ovlivňujících stanovení fosforylované formy jaderného histonu H2AX s ohledem na jeho využití v biodozimetrii.

7. Zdroje

1. ABCAM. Data analysis in flow cytometry. Poslední úprava 21.7.2023. Dostupné z: <https://www.abcam.com/en-cz>. Citováno [2024-04-10].
2. AUSTRALIAN GOVERNMENT. Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency. *What is ionising radiation*. Online. Dostupné z: <https://www.arpsa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/ionising-radiation>. Citováno [2024-02-05]
3. AUSTRALIAN GOVERNMENT. Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency. *Alpha particles*. Online. Dostupné z: <https://www.arpsa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/ionising-radiation/alpha-particles>. Citováno [2024-04-16].
4. AUSTRALIAN GOVERNMENT. Australian Radiation Protection and Nuclear Safety Agency. *Beta Particles*. Online. Dostupné z: <https://www.arpsa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/ionising-radiation/beta-particles>. Citováno [2024-04-16].
5. BD Biosciences. BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-H2AX (pS139). Dostupné z: <https://wwwbdbiosciences.com/ja-jp/products/reagents/flow-cytometry-reagents/research-reagents/single-color-antibodies-ruo/pe-mouse-anti-h2ax-ps139.562377>. Citováno [2024-02-22].
6. BEATO, Miguel; WRIGHT, Roni H a VICENT, Guillermo P. DNA damage and gene transcription: accident or necessity? Online. *Cell Research*. 2015, roč. 25, č. 7, s. 769-770. ISSN 1001-0602. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/cr.2015.71>.
7. BERTUCCI, Antonella; WILKINS, Ruth C.; LACHAPPELLE, Sylvie; TURNER, Helen C.; BRENNER, David J. et al. Comparison of Isolated Lymphocyte and Whole Blood-Based CBMN Assays for Radiation Triage. Online. *Cytogenetic and Genome Research*. S. 1-11. ISSN 1424-8581. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000533488>
8. BOHACOVA, Pavla; KOSSL, Jan; HAJKOVA, Michaela; HERMANKOVA, Barbora; HOLAN, Vladimir et al. Difference between mitogen-stimulated B and T cells in nonspecific binding of R-phycoerythrin-conjugated antibodies. Online. *Journal of Immunological Methods*. 2021, roč. 493. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113013>.
9. BORREGO-SOTO, Gissela; ORTIZ-LÓPEZ, Rocío a ROJAS-MARTÍNEZ, Augusto. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer. Online. *Genetics and Molecular Biology*. 2015, roč. 38, č. 4, s. 420-432. ISSN 1678-4685. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150019>.

10. BUJOLD, K.; HAUER-JENSEN, M.; DONINI, O.; RUMAGE, A.; HARTMAN, D. et al. Citrulline as a Biomarker for Gastrointestinal-Acute Radiation Syndrome: Species Differences and Experimental Condition Effects. Online. *Radiation Research*. 2016, roč. 186, č. 1, s. 71-78. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RR14305.1>.
11. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Radiation Emergencies. Acute Radiation Syndrome: A Facts Sheet for Clinicians. Naposledny aktualizováno 7.5.2019. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/emergencies/arsphysicianfactsheet.htm>. Citováno [2024-03-13].
12. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Radiation Emergencies. Ionizing Radiation. Dostupné z: https://www.cdc.gov/nceh/radiation/ionizing_radiation.html. Citováno [2024-04-16].
13. Cell Signaling Technology. Histone H2A.X Antibody #2595. Online. Dostupné z: <https://www.cellsignal.com/product/productDetail.jsp?productId=2595>. Citováno [2024-04-09].
14. CLARK BRELJE, T.; WESSENDORF, Martin W. a SORENSON, Robert L. Multicolor Laser Scanning Confocal Immunofluorescence Microscopy: Practical Application and Limitations. Online. In: *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. Methods in Cell Biology. Elsevier, 2002, 165-249e. ISBN 9780124802773. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(02\)70006-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(02)70006-X).
15. COLLUM, Bill. *Nuclear facilities: a designer's guide*. Duxford, United Kingdom: Woodhead Publishing, [2016]. ISBN 978-0-08-101938-2.
16. DAINIAK, Nicholas a ALBANESE, Joseph. Medical management of acute radiation syndrome. Online. *Journal of Radiological Protection*. 2022, roč. 42, č. 3. ISSN 0952-4746. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1361-6498/ac7d18>.
17. DEAN, L. Blood Groups and Red Cell Antigen [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Chapter 1, Blood and cells it contains. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/>
18. DESOUKY, Omar; DING, Nan a ZHOU, Guangming. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. Online. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2015, roč. 8, č. 2, s. 247-254. ISSN 16878507. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.03.003>.
19. DÖRR, Harald a MEINEKE, Viktor. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure-therapeutic principles. Online. *BMC Medicine*. 2011, roč. 9, č. 1. ISSN 1741-7015. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-126>.

20. DURDIK, Matus; KOSIK, Pavol; GURSKY, Jan; VOKALOVA, Lenka; MARKOVA, Eva et al. Imaging flow cytometry as a sensitive tool to detect low-dose-induced DNA damage by analyzing 53 BP 1 and γ H2AX foci in human lymphocytes. Online. *Cytometry Part A*. 2015, roč. 87, č. 12, s. 1070-1078. ISSN 1552-4922. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22731>.
21. ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Online. *Toxicologic Pathology*. 2007, roč. 35, č. 4, s. 495-516. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
22. EPA. United States Environmental Protection Agency. Radiation Protection. Radiation Basics. Poslední úprava 18.7.2023. Dostupné z: <https://www.epa.gov/radiation/radiation-basics>. Citováno [2024-02-05].
23. FAVAUDON, Vincent; CAPLIER, Laura; MONCEAU, Virginie; POUZOULET, Frédéric; SAYARATH, Mano et al. Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice. Online. *Science Translational Medicine*. 2014, roč. 6, č. 245. ISSN 1946-6234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008973>.
24. GIOVANETTI, Anna; MARCONI, Raffaella; AWAD, Noha; ABUZIED, Hala; AGAMY, Neveen et al. Validation of a biomarker tool capable of measuring the absorbed dose soon after exposure to ionizing radiation. Online. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87173-3>.
25. Government of Canada. Health Effect of the Chernobyl Accident. Naposledy aktualizováno 2022. Dostupné z: <https://www.cnsccsn.gc.ca/eng/resources/health/health-effects-chernobyl-accident/>. Citováno [2024-03-18].
26. GULEC, Seza A. a MCGORON, Anthony J. Radiomicrosphere Dosimetry: Principles and Current State of the Art. Online. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2022, roč. 52, č. 2, s. 215-228. ISSN 00012998. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2021.12.009>.
27. HAN, Xiaoliang; SUN, Fengtao; ZHANG, Ying; WANG, Jinyan; LIU, Qingguo et al. Correction: The protective effect of propofol on ionizing radiation-induced hematopoietic system damage in mice. Online. *RSC Advances*. 2019, roč. 9, č. 65, s. 37739-37739. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C9RA90086A>.
28. HAVELEK, Radim; ŘEZÁČOVÁ, Martina; ŠINKOROVÁ, Zuzana; ZÁRYBNICKÁ, Lenka; TICHÝ, Aleš et al. Phosphorylation of histone H2AX as an indicator of received dose of gamma radiation after whole-body irradiation of rats. Online. *Acta Veterinaria Brno*. 2011, roč. 80, č. 1, s. 113-118. ISSN 0001-7213. Dostupné z: <https://doi.org/10.2754/avb201180010113>.

29. HAVRÁNKOVÁ, Renata (ed.). *Klinická radiobiologie*. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-4098-0.
30. HERATE, C. a SABATIER, L. Retrospective biodosimetry techniques: Focus on cytogenetics assays for individuals exposed to ionizing radiation. Online. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2020, roč. 783. ISSN 13835742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.108287>.
31. HERZENBERG, Leonore A; TUNG, James; MOORE, Wayne A; HERZENBERG, Leonard A a PARKS, David R. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. Online. *Nature Immunology*. 2006, roč. 7, č. 7, s. 681-685. ISSN 1529-2908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>.
32. HEYLMANN D, PONATH V, KINDLER T, KAINA B. Comparison of DNA repair and radiosensitivity of different blood cell populations. *Sci Rep*. 2021 Jan 28;11(1):2478. doi: 10.1038/s41598-021-81058-1. PMID: 33510180; PMCID: PMC7843614.
33. HORN, Simon; BARNARD, Stephen; ROTHKAMM, Kai a SANTOS, Janine. Gamma-H2AX-Based Dose Estimation for Whole and Partial Body Radiation Exposure. Online. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 9. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025113>.
34. IAEA. International Atomic Energy Agency. Radiation Protection of Patients. X-rays. Dostupné z: <https://www.iaea.org/resources/rpop/patients-and-public/x-rays>. Citováno [2024-02-05].
35. IAEA. International Atomic Energy Agency. Industrial radiography. Dostupné z: <https://www.iaea.org/topics/industrial-radiography>. Citováno [2024-04-16].
36. ICCS. International Clinical Cytometry Society. What is MFI and how is it calculated? Dostupné z: https://www.cytometry.org/web/q_view.php?id=152&filter=Analysis%20Techniques. Citováno [2024-04-10].
37. JEONG, Soo Kyung; OH, Su Jung; KIM, Song-Hyun; JANG, Seungsoo; KANG, Yeong-Rok et al. Dicentric chromosome assay using a deep learning-based automated system. Online. *Scientific Reports*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25856-1>.
38. JI, Jiuping; ZHANG, Yiping; REDON, Christophe E.; REINHOLD, William C.; CHEN, Alice P. et al. Phosphorylated fraction of H2AX as a measurement for DNA damage in cancer cells and potential applications of a novel assay. Online. *PLOS ONE*. 2017, roč. 12, č. 2. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171582>.

39. JOHANSSON, Pegah; FASTH, Anders; EK, Torben a HAMMARSTEN, Ola. Validation of a flow cytometry-based detection of γ -H2AX, to measure DNA damage for clinical applications. Online. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2017, roč. 92, č. 6, s. 534-540. ISSN 1552-4949. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21374>.
40. JOMORI, Takahiro; MATSUDA, Kenichi; EGAMI, Yoko; ABE, Ikuro; TAKAI, Akira et al. Insights into phosphatase-activated chemical defense in a marine sponge holobiont. Online. *RSC Chemical Biology*. 2021, roč. 2, č. 6, s. 1600-1607. ISSN 2633-0679. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D1CB00163A>.
41. KAWAMURA, Kasumi; QI, Fei a KOBAYASHI, Junya. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. Online. *Journal of Radiation Research*. 2018, roč. 59, č. suppl_2, s. ii91-ii97. ISSN 0449-3060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jrr/trx091>.
42. KHALID, Nebeeha a AZIMPOURAN, Mahzad. Necrosis. Online. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>. [cit. 2024-04-08].
43. KHAN, Kainat; TEWARI, Shikha; AWASTHI, Namrata Punit; MISHRA, Surendra Prasad; AGARWAL, Gaurav Raj et al. Flow cytometric detection of gamma-H2AX to evaluate DNA damage by low dose diagnostic irradiation. Online. *Medical Hypotheses*. 2018, roč. 115, s. 22-28. ISSN 03069877. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.03.016>.
44. KIANG, Juliann G.; WOODS, Akeylah K. a CANNON, Georgetta. Effects of Hemorrhage on Hematopoietic Cell Depletion after a Combined Injury with Radiation: Role of White Blood Cells and Red Blood Cells as Biomarkers. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, roč. 25, č. 5. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms25052988>.
45. KIM, Jae Ho; JENROW, Kenneth A. a BROWN, Stephen L. Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. Online. *Radiation Oncology Journal*. 2014, roč. 32, č. 3. ISSN 2234-1900. Dostupné z: <https://doi.org/10.3857/roj.2014.32.3.103>.
46. KINNER, A.; WU, W.; STAUDT, C. a ILIAKIS, G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. Online. *Nucleic Acids Research*. 2008, roč. 36, č. 17, s. 5678-5694. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn550>.

47. KOSTYUK, Svetlana V.; PROSKURNINA, Elena V.; KONKOVA, Marina S.; ABRAMOVA, Margarita S.; KALIANOV, Andrey A. et al. Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on the Expression of Mitochondria-Related Genes in Human Mesenchymal Stem Cells. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, roč. 23, č. 1. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms23010261>.
48. KRŽIŽKOVÁ, Věra. *Blood and blood components: hematopoiesis, selected methods used in cytology, histology, and hematology*. Prague: Karolinum Press, 2021. ISBN 978-80-246-4709-4.
49. L'ANNUNZIATA, Michael F. *Radioactivity: introduction and history*. Oxford: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-444-52715-8.
50. LANGMEIER, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
51. LAMKOWSKI, Andreas; FORCHERON, Fabien; AGAY, Diane; AHMED, Emad A.; DROUET, Michel et al. DNA Damage Focus Analysis in Blood Samples of Minipigs Reveals Acute Partial Body Irradiation. Online. *PLoS ONE*. 2014, roč. 9, č. 2. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087458>.
52. LEE, Ui-Seob; LEE, Dong-Hyun a KIM, Eun-Hee. Characterization of γ -H2AX foci formation under alpha particle and X-ray exposures for dose estimation. Online. *Scientific Reports*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07653-y>.
53. LEE, Younghyun; JIN, Young Woo; SEONG, Ki Moon; WILKINS, Ruth C. a JANG, Seongjae. Improving radiation dosimetry with an automated micronucleus scoring system: correction of automated scoring errors. Online. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2023, roč. 62, č. 3, s. 349-356. ISSN 0301-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00411-023-01030-7>.
54. LEE, Younghyun; JIN, Young Woo; WILKINS, Ruth C a JANG, Seongjae. Validation of the dicentric chromosome assay for radiation biological dosimetry in South Korea. Online. *Journal of Radiation Research*. 2019, roč. 60, č. 5, s. 555-563. ISSN 0449-3060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz039>.
55. LEE, Younghyun; WANG, Qi; SHURYAK, Igor; BRENNER, David J. a TURNER, Helen C. Development of a high-throughput γ -H2AX assay based on imaging flow cytometry. Online. *Radiation Oncology*. 2019, roč. 14, č. 1. ISSN 1748-717X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1344-7>.
56. LI, Weihong; ZHOU, Shixiang; JIA, Meng; LI, Xiaoxin; LI, Lin et al. Early Biomarkers Associated with P53 Signaling for Acute Radiation Injury. Online. *Life*. 2022, roč. 12, č. 1. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life12010099>.

57. LÓPEZ, Mario a MARTÍN, Margarita. Medical management of the acute radiation syndrome. Online. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2011, roč. 16, č. 4, s. 138-146. ISSN 15071367. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2011.05.001>.
58. LUCZAK, Michal W. a ZHITKOVICH, Anatoly. Monoubiquitinated γ -H2AX: Abundant product and specific biomarker for non-apoptotic DNA double-strand breaks. Online. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018, roč. 355, s. 238-246. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.07.007>.
59. MACIÀ I GARAU, Miquel; LUCAS CALDUCH, Anna a LÓPEZ, Enric Casanovas. Radiobiology of the acute radiation syndrome. Online. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2011, roč. 16, č. 4, s. 123-130. ISSN 15071367. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2011.06.001>.
60. MARIANO, Natasha C.; RUSIN, Scott F.; NASA, Isha a KETTENBACH, Arminja N. Inducible Protein Degradation as a Strategy to Identify Phosphoprotein Phosphatase 6 Substrates in RAS-Mutant Colorectal Cancer Cells. Online. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2023, roč. 22, č. 8. ISSN 15359476. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100614>.
61. MARIOTTI, Luca G.; PIROVANO, Giacomo; SAVAGE, Kienan I.; GHITA, Mihaela; OTTOLENGHI, Andrea et al. Use of the γ -H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures. Online. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 11. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079541>.
62. MARTÍNEZ-LIMÓN, Adrián; JOAQUIN, Manel; CABALLERO, María; POSAS, Francesc a DE NADAL, Eulàlia. The p38 Pathway: From Biology to Cancer Therapy. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 6. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>.
63. MATSUDA, Shun; IKURA, Tsuyoshi a MATSUDA, Tomonari. Absolute quantification of γ H2AX using liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, roč. 407, č. 18, s. 5521-5527. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8725-z>.
64. MAVRAGANI, Ifigeneia V.; NIKITAKI, Zacharenia; KALOSPYROS, Spyridon A. a GEORGAKILAS, Alexandros G. Ionizing Radiation and Complex DNA Damage: From Prediction to Detection Challenges and Biological Significance. Online. *Cancers*. 2019, roč. 11, č. 11. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/cancers11111789>.

65. Mikroskopie. Fluorescein-5-isothiokyanát (FITC). Merck Millipore. Dostupné z: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiQre7o7L6EAxWLif0HHbF6A_EQFnoECDgQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.merckmillipore.com%2FINTERSHOP%2Fweb%2FWFS%2FMerck-INTL-Site%2Ffr_FR%2F-%2FUSD%2FShowDocument-File%3FProductSKU%3DMDA_CHEM-124546%26DocumentId%3D201710.360.ProNet%26DocumentUID%3D227304349%26DocumentType%3DPI%26Language%3DCS%26Country%3DNF%26Origin%3DPDP&usq=AOvVaw2riRHbvhCTjrlngedk9xvW&opi=89978449. Citováno [2024-02-22].
66. Ministry of the Environment. Government of Japan. Deterministic Effects (Tissue Reactions) and Stochastic Effects. Naposledy aktualizováno v roce 2021. Dostupné z: <https://www.env.go.jp/en/chemi/rhm/basic-info/1st/03-01-04.html>. Citováno [2024-03-13].
67. Ministry of the Environment. Government of Japan. Prodromal Phase of Acute Radiation Syndrome and Exposure Doses. Naposledy aktualizováno 31.3.2021. Dostupné z: <https://www.env.go.jp/en/chemi/rhm/basic-info/1st/03-03-03.html>. Citováno [2024-03-18].
68. MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. vyd. Sestra (Grada). Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
69. MOQUET, Jayne; AINSBURY, Elizabeth; BALÁZS, Katalin; BARNARD, Stephen; HRISTOVA, Rositsa et al. RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: The Gamma-H2AX Foci Assay. Online. *Radiation Research*. 2023, roč. 199, č. 6. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00205.1>.
70. MURSHED, Hasan. Radiation Biology. Online. In: *Fundamentals of Radiation Oncology*. Elsevier, 2019, s. 57-87. ISBN 9780128141281. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814128-1.00003-9>.
71. NAIR, Shankari; ENGELBRECHT, Monique; MILES, Xanthene; NDIMBA, Roya; FISHER, Randall et al. The Impact of Dose Rate on DNA Double-Strand Break Formation and Repair in Human Lymphocytes Exposed to Fast Neutron Irradiation. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 21. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20215350>.
72. NASA. *Gamma Rays*. Online. Poslední úprava 4.8.2023. Dostupné z: https://science.nasa.gov/ems/12_gammarays/. Citováno [2024-02-05].

73. NAZAROV, I. B.; SMIRNOVA, A. N.; KRUTILINA, R. I.; SVETLOVA, M. P.; SOLOVJEVA, L. V. et al. Dephosphorylation of Histone γ -H2AX during Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells and its Inhibition by Calyculin A. Online. *Radiation Research*. 2003, roč. 160, č. 3, s. 309-317. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RR3043>.
74. NERONOVA, Elizaveta a ALEKSANIN, Sergei. Cytogenetic Effects in Patients after Computed Tomography Examination. Online. *Life*. 2022, roč. 12, č. 12. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life12121983>.
75. NZIP. Ionizující záření. Online. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/3236>. Citováno [2024-04-22].
76. OHNISHI, Takeo; MORI, Eiichiro a TAKAHASHI, Akihisa. γ H2AX. Online. In: SCHWAB, Manfred (ed.). *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, s. 1985-1989. ISBN 978-3-662-46874-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_2713.
77. OIKE, Takahiro; KAKOTI, Sangeeta; SAKAI, Makoto; MATSUMURA, Akihiko; OHNO, Tatsuya et al. Analysis of the relationship between LET, γ H2AX foci volume and cell killing effect of carbon ions using high-resolution imaging technology. Online. *Journal of Radiation Research*. 2023, roč. 64, č. 2, s. 335-344. ISSN 0449-3060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrac098>.
78. PALLA, Viktoria-Varvara; KARAOLANIS, Georgios; KATAFIGIOTIS, Ioannis; ANASTASIOU, Ioannis; PATAPIS, Paul et al. Gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? Online. *Tumor Biology*. 2017, roč. 39, č. 3. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1010428317695931>.
79. PAZZAGLIA, S.; EIDEMÜLLER, M.; LUMNICZKY, K.; MANCUSO, M.; RAMADAN, R. et al. Out-of-field effects: lessons learned from partial body exposure. Online. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2022, roč. 61, č. 4, s. 485-504. ISSN 0301-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00411-022-00988-0>
80. PETROVOVÁ, Markéta a SVOBODA, Marek. Methods of Classical and Molecular Cytogenetics Suitable for Biodosimetry of Persons with Professional Exposure to Carcinogens. Online. *Klinická Onkologie*. 2019, roč. 32, č. 4. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019270>.

81. PORT, M.; BARQUINERO, J-F.; ENDESFELDER, D.; MOQUET, J.; OESTREICHER, U. et al. RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: Inter-Assay Comparison of Eight Dosimetry Assays. Online. *Radiation Research*. 2023, roč. 199, č. 6. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RADE-22-00207.1>.
82. RAAVI, Venkateswarlu; PERUMAL, Venkatachalam a F.D. PAUL, Solomon. Potential application of γ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. Online. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2021, roč. 787. ISSN 13835742. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108350>.
83. Radiopaedia. Acute Radiation Syndrome. Naposledy aktualizováno 23.3. 2023. Dostupné z: <https://radiopaedia.org/articles/acute-radiation-syndrome>. Citováno [2024-03-18].
84. RAMADHANI, Dwi; TETRIANA, Devita; PURNAMI, Sofiati; SUVIFAN, Viria Agesti; KURNIA HASAN BASRI, In et al. γ -H2AX and phospho-ATM enzyme-linked immunosorbent assays as biodosimetry methods for radiation exposure assessment: a pilot study. Online. *Radiation Protection Dosimetry*. 2023, roč. 199, č. 19, s. 2383-2390. ISSN 0144-8420. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncad253>.
85. REDON, Christophe E.; WEYEMI, Urbain; PAREKH, Palak R.; HUANG, Dejun; BURRELL, Allison S. et al. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2012, roč. 1819, č. 7, s. 743-756. ISSN 18749399. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.02.021>.
86. RENEB. Realizing the European Network in Biodosimetry. About RENEB. Dostupné z: <https://www.reneb.net/about/>. Citováno [2024-02-20].
87. REMM. Radiation Emergency Medical Management. What You Need to Know About Biodosimetry: The Basics. Online. Dostupné z: <https://remm.hhs.gov/explainbiodosimetry.htm#useful>. Citováno [2024-03-31].
88. RISTOW, Michael a SCHMEISSER, Kathrin. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). Online. *Dose-Response*. 2014, roč. 12, č. 2. ISSN 1559-3258. Dostupné z: <https://doi.org/10.2203/dose-response.13-035.Ristow>.
89. RODRÍGUEZ-RUIZ, María E.; VANPOUILLE-BOX, Claire; MELERO, Ignacio; FORMENTI, Silvia Chiara a DEMARIA, Sandra. Immunological Mechanisms Responsible for Radiation-Induced Abscopal Effect. Online. *Trends in Immunology*. 2018, roč. 39, č. 8, s. 644-655. ISSN 14714906. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.06.001>.

90. ROMANO, Francesco; BAILAT, Claude; JORGE, Patrik Gonçalves; LERCH, Michael Lloyd Franz a DARAFSHEH, Arash. Ultra-high dose rate dosimetry: Challenges and opportunities for FLASH radiation therapy. Online. *Medical Physics*. 2022, roč. 49, č. 7, s. 4912-4932. ISSN 0094-2405. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mp.15649>.
91. ROSINA, Jozef; VRÁNOVÁ, Jana a KOLÁŘOVÁ, Hana. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2021. ISBN 978-80-271-2526-5.
92. ROTHKAMM, Kai; BARNARD, Stephen; AINSBURY, Elizabeth A.; AL-HAFIDH, Jenna; BARQUINERO, Joan-Francesc et al. Manual versus automated γ -H2AX foci analysis across five European laboratories: Can this assay be used for rapid biodosimetry in a large scale radiation accident? Online. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013, roč. 756, č. 1-2, s. 170-173. ISSN 13835718. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.04.012>.
93. ŘEZÁČOVÁ, Martina; HAVELEK, Radim; LUKÁŠOVÁ, Emilie a VÁVROVÁ, Jiřina. FOSFORILOVANÝ HISTON H2AX - NOVÝ INDIKÁTOR POŠKOZENÍ DNA. Online. *Chemické Listy*. 2011, roč. 2, č. 105, s. 108-113. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/289608327_Phosphorylation_of_histone_H2AX-A_novel_indicator_of_DNA_damage.
94. SALASSIDIS, K.; SCHMID, E.; PETER, R.U.; BRASELMANN, H. a BAUCHINGER, M. Dicentric and translocation analysis for retrospective dose estimation in humans exposed to ionising radiation during the Chernobyl nuclear power plant accident. Online. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1994, roč. 311, č. 1, s. 39-48. ISSN 00275107. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90071-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90071-X).
95. SAKANE, Hiroaki; ISHIDA, Mari; SHI, Lin; FUKUMOTO, Wataru; SAKAI, Chiemi et al. Biological Effects of Low-Dose Chest CT on Chromosomal DNA. Online. *Radiology*. 2020, roč. 295, č. 2, s. 439-445. ISSN 0033-8419. Dostupné z: <https://doi.org/10.1148/radiol.2020190389>.
96. SCARPATO, R.; CASTAGNA, S.; ALIOTTA, R.; AZZARA, A.; GHETTI, F. et al. Kinetics of nuclear phosphorylation (γ -H2AX) in human lymphocytes treated in vitro with UVB, bleomycin and mitomycin C. Online. *Mutagenesis*. 2013, roč. 28, č. 4, s. 465-473. ISSN 0267-8357. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/mutage/get024>.

97. SCHUMANN, S.; SCHERTHAN, H.; PFESTROFF, K.; SCHOOF, S.; PFESTROFF, A. et al. DNA damage and repair in peripheral blood mononuclear cells after internal ex vivo irradiation of patient blood with ¹³¹I. Online. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2022, roč. 49, č. 5, s. 1447-1455. ISSN 1619-7070. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00259-021-05605-8>.
98. SCHÜTZ, Clarissa S.; STOPE, Matthias B.; BEKESCHUS, Sander a LORENZINI, Antonello. H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine. Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021, roč. 2021, s. 1-18. ISSN 1942-0994. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2021/2060986>.
99. SGOUROS, G.; KNOX, S. J.; JOINER, M. C.; MORGAN, W. F. a KASSIS, A. I. MIRD Continuing Education: Bystander and Low Dose-Rate Effects. Online. *Journal of Nuclear Medicine*. 2007, roč. 48, č. 10, s. 1683-1691. ISSN 0161-5505. Dostupné z: <https://doi.org/10.2967/jnumed.105.028183>.
100. SHARMA, Preety M.; PONNAIYA, Brian; TAVERAS, Maria; SHURYAK, Igor; TURNER, Helen et al. High Throughput Measurement of γ H2AX DSB Repair Kinetics in a Healthy Human Population. Online. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 3. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121083>.
101. SHAYTAN, Alexey K; LANDSMAN, David a PANCHENKO, Anna R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A–H2B dimers. Online. *Current Opinion in Structural Biology*. 2015, roč. 32, s. 48-57. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.004>.
102. SHAYTAN, Alexey K.; ARMEEV, Grigoriy A.; GONCEARENCO, Alexander; ZHURKIN, Victor B.; LANDSMAN, David et al. Coupling between Histone Conformations and DNA Geometry in Nucleosomes on a Microsecond Timescale: Atomistic Insights into Nucleosome Functions. Online. *Journal of Molecular Biology*. 2016, roč. 428, č. 1, s. 221-237. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.004>.
103. SHURYAK, Igor; GHANDHI, Shanaz A.; TURNER, Helen C.; WEBER, Waylon; MELO, Dunstana et al. Dose and Dose-Rate Effects in a Mouse Model of Internal Exposure from ¹³⁷Cs. Part 2: Integration of Gamma-H2AX and Gene Expression Biomarkers for Retrospective Radiation Biodosimetry. Online. *Radiation Research*. 2021, roč. 196, č. 5. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RADE-20-00042.1>.

104. SIOEN, Simon; CLOET, Karlien; VRAL, Anne a BAEYENS, Ans. The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. Online. *Journal of Personalized Medicine*. 2020, roč. 10, č. 3. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm10030125>.
105. SPROULL, Mary T.; CAMPHAUSEN, Kevin A. a KOBLENTZ, Gregory D. Biodosimetry: A Future Tool for Medical Management of Radiological Emergencies. Online. *Health Security*. 2017, roč. 15, č. 6, s. 599-610. ISSN 2326-5094. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/hs.2017.0050>.
106. STOPE, Matthias. Phosphorylation of histone H2A.X as a DNA-associated biomarker (Review). Online. *World Academy of Sciences Journal*. 2021, roč. 3, č. 3. ISSN 2632-2900. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/wasj.2021.102>.
107. SUN, Lue; INABA, Yohei; KANZAKI, Norie; BEKAL, Mahesh; CHIDA, Koichi et al. Identification of Potential Biomarkers of Radiation Exposure in Blood Cells by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 3. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21030812>.
108. SULLIVAN, Julie M.; PRASANNA, Pataje G.S.; GRACE, Marcy B.; WATHEN, Lynne K.; WALLACE, Rodney L. et al. Assessment of Biodosimetry Methods for a Mass-Casualty Radiological Incident. Online. *Health Physics*. 2013, roč. 105, č. 6, s. 540-554. ISSN 0017-9078. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/HP.0b013e31829cf221>.
109. SÚJB. Státní úřad pro jadernou bezpečnost. Ionizující záření. Účinky a zdroje. Online. Dostupné z: https://sujb.gov.cz/fileadmin/sujb/docs/radiacni-ochrana/dokumenty/Radiation-InsidePart-Czech-Feb_2017-1.pdf. Citováno [2024-04-22].
110. SURO. Státní ústav radiační ochrany, v. v. i. Radiační ochrana. Biologické účinky ionizujícího záření. Dostupné z: <https://www.suro.cz/cz/radiacni-ochrana/biologicke-ucinky-ionizujiciho-zareni>. Citováno [2024-03-13].

111. SUZUKI, Shugo; GI, Min; KOMIYA, Masami; OBIKANE, Asuka; VACHIRAARUNWONG, Arpamas et al. Evaluation of the Mechanisms Involved in the Development of Bladder Toxicity following Exposure to Occupational Bladder Cancer Causative Chemicals Using DNA Adductome Analysis. Online. *Biomolecules*. 2024, roč. 14, č. 1. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom14010036>.
112. SWARTZ, Harold M.; WILLIAMS, Benjamin B. a FLOOD, Ann Barry. Overview of the principles and practice of biodosimetry. Online. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2014, roč. 53, č. 2, s. 221-232. ISSN 0301-634X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0522-0>.
113. TAN, Hui Teng; YUSOFF, Fatimah Md.; KHAW, Yam Sim; NOOR MAZLI, Nur Amirah Izyan; NAZARUDIN, Muhammad Farhan et al. A Review on a Hidden Gem: Phycoerythrin from Blue-Green Algae. Online. *Marine Drugs*. 2023, roč. 21, č. 1. ISSN 1660-3397. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/md21010028>.
114. TANG, Feng Ru; LOKE, Weng Keong a KHOO, Boo Cheong. Low-dose or low-dose-rate ionizing radiation-induced bioeffects in animal models. Online. *Journal of Radiation Research*. 2017, roč. 58, č. 2, s. 165-182. ISSN 0449-3060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jrr/rrw120>.
115. ThermoFisher Scientific. Allophycocyanin (APC). Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/allophycocyanin.html>. Citováno [2024-02-22].
116. TURNER, H. C.; SHURYAK, I.; TAVERAS, M.; BERTUCCI, A.; PERRIER, J. R. et al. Effect of Dose Rate on Residual γ -H2AX Levels and Frequency of Micronuclei in X-Irradiated Mouse Lymphocytes. Online. *Radiation Research*. 2015, roč. 183, č. 3, s. 315-324. ISSN 0033-7587. Dostupné z: <https://doi.org/10.1667/RR13860.1>.
117. UPRETI, DEEPAK; PATHAK, ALOK a KUNG, SAM K. P. Development of a standardized flow cytometric method to conduct longitudinal analyses of intracellular CD3 ζ expression in patients with head and neck cancer. Online. *Oncology Letters*. 2016, roč. 11, č. 3, s. 2199-2206. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4209>.
118. U.S. Department of Health and Human Services. REMM. Radiation Emergency Medical Management. Time Phase of Acute Radiation Syndrom (ARS) – Dose Range 4-6 Gy. Dostupné z: https://remm.hhs.gov/ars_timephases3.htm. Citováno [2024-03-18].

119. U.S. Department. Quick Reference Guide. Radiation Risk Information for Responders Following a Nuclear Detonation. 2016. Online. Dostupné z: <https://www.dhs.gov/sites/default/files/publications/Quick%20Reference%20Guide%20Final.pdf>. Citováno [2024-04-21].
120. U.S. Department of Health and Human Services. REMM. Radiation Emergency Medical Management. About Lymphocyte Depletion Kinetics. Online. Dostupné z: <https://remm.hhs.gov/aboutlymphocytedepletion.htm>. Citováno [2024-04-09].
121. UNEP. Radiation effects and sources. Program OSN pro ochranu životního prostředí. 2016. ISBN 978-92-807-3600-7.
122. *Uniprot*. Online. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P16104/entry> [citováno 2024-01-30]
123. USNRC. Biological Effect of Radiation. Dostupné z: <https://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/students/for-educators/09.pdf>. Citováno [2024-03-13].
124. USNRC. United States Nuclear Regulatory Commission. Protecting People and the Environment. Beta particles. Poslední úprava 9.3.2021. Dostupné z: <https://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/glossary/beta-particle.html>. Citováno [2024-02-05].
125. VALENTE, Marco; DENIS, Josiane; GRENIER, Nancy; ARVERS, Philippe; FOUCHER, Barbara et al. Revisiting Biomarkers of Total-Body and Partial-Body Exposure in a Baboon Model of Irradiation. Online. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 7. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132194>.
126. VARVARA, Palla Viktoria; KARAOLANIS, Georgios; VALAVANIS, Christos; STANC, Gabriela; TZAIDA, Olympia et al. Gamma-H2AX: A potential biomarker in breast cancer. Online. *Tumor Biology*. 2019, roč. 41, č. 9. ISSN 1010-4283. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1010428319878536>.
127. VÍTEK, Pavel. Flash radioterapie. Online. *Medical Tribune*. 2023. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/medicina/flash-radioterapie/>. Citováno [2024-04-21].
128. VIJAYALAKSHMI, J.; CHAURASIA, Rajesh Kumar; SRINIVAS, K. Satish; VIJAYALAKSHMI, K.; PAUL, Solomon F.D. et al. Establishment of ex vivo calibration curve for X-ray induced “dicentric + ring” and micronuclei in human peripheral lymphocytes for biodosimetry during radiological emergencies, and validation with dose blinded samples. Online. *Heliyon*. 2023, roč. 9, č. 6. ISSN 24058440. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17068>.

129. WANG, Li; XIE, Ling; RAMACHANDRAN, Srinivas; LEE, YuanYu; YAN, Zhen et al. Non-canonical Bromodomain within DNA-PKcs Promotes DNA Damage Response and Radioresistance through Recognizing an IR-Induced Acetyl-Lysine on H2AX. Online. *Chemistry & Biology*. 2015, roč. 22, č. 7, s. 849-861. ISSN 10745521. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.05.014>.
130. WANOTAYAN, Rujira; WONGSANIT, Sarinya; BOONSIRICHAJ, Kanokporn; SUKAPIROM, Kasama; BUPPAUNGKUL, Sakchai et al. Quantification of histone H2AX phosphorylation in white blood cells induced by ex vivo gamma irradiation of whole blood by both flow cytometry and foci counting as a dose estimation in rapid triage. Online. *PLOS ONE*. 2022, roč. 17, č. 3. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265643>.
131. WHO. World Health Organization. *Ionizing radiation and health effects*. Online. Poslední úprava 27.6.2023. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-and-health-effects>. [citováno 2024-02-05]
132. WHO. World Health Organization. *BioDoseNet*. Online. Dostupné z: <https://www.who.int/groups/biodosenet>. Citováno [2024-04-09].
133. WILLIAMSON, Josh; HUGHES, Ciara M.; BURKE, George a DAVISON, Gareth W. A combined γ -H2AX and 53BP1 approach to determine the DNA damage-repair response to exercise in hypoxia. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 2020, roč. 154, s. 9-17. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.026>.
134. WILKINS, Ruth C a BEATON-GREEN, Lindsay A. Development of high-throughput systems for biodosimetry. Online. *Radiation Protection Dosimetry*. 2023, roč. 199, č. 14, s. 1477-1484. ISSN 0144-8420. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncad060>.
135. YASHAVARDDHAN, M. H.; SHARMA, Ajay Kumar; CHAUDHARY, Pankaj; BAJAJ, Sania; SINGH, Sukhvir et al. Development of hematopoietic syndrome mice model for localized radiation exposure. Online. *Scientific Reports*. 2021, roč. 11, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80075-w>.
136. ZASTKO, Lucián; RAČKOVÁ, Anna; PETROVIČOVÁ, Petra; DURDÍK, Matúš; MÍŠEK, Jakub et al. Evaluation of Calyculin A Effect on γ H2AX/53BP1 Focus Formation and Apoptosis in Human Umbilical Cord Blood Lymphocytes. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 11. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22115470>.

137. ZHAO, Hongling; QU, Minmin; LI, Yuchen; WEN, Ke; XU, Hua et al. An estimate assay for low-level exposure to ionizing radiation based on mass spectrometry quantification of γ -H2AX in human peripheral blood lymphocytes. Online. *Frontiers in Public Health*. 2022, roč. 10. ISSN 2296-2565. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1031743>.
138. ZHOU, Ming; CAI, Chuner; LIU, Junxiu; WANG, Qing; WU, Weining et al. Optimization of IgG conjugation with R-phycoerythrin from *Porphyra yezoensis*. Online. *Journal of Applied Phycology*. 2010, roč. 22, č. 4, s. 459-464. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9479-9>.