

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD**

**Radiačně indukované chromozomální poškození lidských  
periferních lymfocytů ozářených *in vitro***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**AUTOR PRÁCE:** Bc. Gabriela Vovková

**VEDOUcí PRÁCE:** RNDr. Jiří Handl, Ph.D.

**KONZULTANT:** kpt. Mgr. Marcela Milanová, Ph.D.

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**Radiation-induced chromosomal damage in human  
peripheral lymphocytes irradiated *in vitro***

MASTER THESIS

**AUTHOR:** Bc. Gabriela Vovková  
**SUPERVISOR:** RNDr. Jiří Handl, Ph.D.  
**CONSULTANT:** kpt. Mgr. Marcela Milanová, Ph.D.

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	<b>Bc. Gabriela Vovková</b>
Osobní číslo:	<b>C22400</b>
Studijní program:	<b>N0512A130006 Analýza biologických materiálů</b>
Téma práce:	<b>Radiačně indukované chromozomální poškození lidských periferních lymfocytů ozářených <i>in vitro</i></b>
Téma práce anglicky:	<b>Radiation-induced Chromosomal Damage in Human Peripheral Lymphocytes Irradiated <i>in vitro</i></b>
Zadávací katedra:	<b>Katedra biologických a biochemických věd</b>

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na charakterizaci ionizujícího záření včetně jeho interakce s lidským organismem, a to jak na buněčné úrovni, tak na molekulární úrovni. Shrňte zejména druhy poškození genetické informace, reakce buněk na poškození gama zářením a možnosti buněčné reparace.
2. V rámci teoretické části podrobněji popište chromozomální aberace, možnosti jejich indukce vlivem ionizujícího záření a důsledky jejich vzniku. Charakterizujte vznik a podobu dicentrických chromozomů a mikrojadér, jejich specifitu a citlivost, zhodnoťte výhody a nevýhody těchto dvou vybraných metod. Uveďte současné trendy v oblasti biologické dozimetrie se zaměřením na možnosti automatizace metod.

### Experimentální část

1. V rámci praktické části se zaměřte na hlavní cíl diplomové práce, kterým je analýza dicentrických chromozomů a mikrojadér indukovaných gama zářením v lymfocytech periferní krve *in vitro*. Experimenty by měly být prováděny následovně. V první fázi dojde k ozáření periferní krve v dávkovém rozmezí 0-5 Gy. Následuje inkubace s mitogeny stimulující lymfocyty k buněčnému dělení. Dělení lymfocytů je pomocí mitotických jedů zastaveno v požadované fázi mitózy, buňky jsou zafixovány, obarveny a mikroskopicky hodnoceny. Výsledky ze dvou různých cyto genetických analýz využijte pro sestavení kalibračních křivek pro retrospektivní odhad absorbované dávky gama záření. Pro ověření použitelnosti kalibračních křivek stanovte absorbovanou dávku vzorků ozářených neznámou dávkou.
2. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické vědecké databáze (*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Marcela Milanová, Ph.D.**  
FVZ, Univerzita obrany, Hradec Králové

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.

**prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Radiačně indukované chromozomální poškození lidských periferních lymfocytů ozářených *in vitro* 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 § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 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 09.05.2025

Bc. Gabriela Vovková 2025

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za vedení a vstřícný přístup při zpracování této práce. Zvláštní díky patří paní kpt. Mgr. Marcele Milanové, Ph.D. za možnost pracovat na Katedře radiobiologie, Vojenské lékařské fakulty v Hradci Králové, za odborný dohled, cenné rady a pomoc během práce a za obrovskou trpělivost.

## **ANOTACE**

Ionizující záření mění strukturu, funkci a syntézu nukleových kyselin, zejména dochází ke změnám molekuly DNA. Velmi závažný je vznik dvojitých zlomů v jaderné DNA. Počet dvojitých zlomů je přímo úměrný obdržené absorbované dávce. Kvantifikace těchto zlomů se využívá v biodozimetrických metodách. Mezi hlavní biodozimetrické metody patří analýza dicentrických chromozomů a analýza mikrojadern. Zlepšení, urychlení a automatické vyhodnocování těchto metod představuje budoucnost biologické dozimetrie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Ionizující záření, DNA, lymfocyty, dicentrický chromozom, mikrojádra, mikrojaderný test

## **TITLE**

Radiation-induced chromosomal damage in human peripheral lymphocytes irradiated *in vitro*

## **ANNOTATION**

Ionizing radiation changes the structure, functions and synthesis of nucleic acids, especially the DNA molecule. The formation of double breaks in DNA in the nucleus is very serious. The number of birefringences is directly proportional to the absorbed dose received. Quantification of these breaks is used by biodosimetric methods. The main biodosimetric methods include the analysis of dicentric chromosomes and the analysis of micronuclei. Improving, speeding up and automatically evaluating these methods is the future of biological dosimetry.

## **KEYWORDS**

Ionizing radiation, DNA, lymphocytes, dicentric chromosome, micronuclei, micronucleus test

# OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
ÚVOD .....	14
1 IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ A JEHO ZDROJE.....	15
2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ .....	18
2.1 Interakce ionizujícího záření s organismem .....	20
2.2 Struktura DNA a chromozomů .....	21
2.3 Chromozomové aberace .....	22
2.3.1 Kruhové chromozomy .....	24
2.3.2 Dicentrické chromozomy.....	24
2.3.3 Delece chromozomů .....	25
2.3.4 Fragmenty chromozomů .....	25
2.4 Interakce záření na molekulární úrovni .....	26
2.4.1 Poškození proteinů.....	26
2.4.2 Poškození DNA .....	26
2.4.3 Reparace DNA.....	27
2.4.4 Reparace jednoduchých zlomů .....	28
2.4.5 Reparace dvojitých zlomů .....	30
2.5 Interakce ionizujícího záření na buněčné úrovni .....	32
2.6 Buněčný cyklus.....	33
2.6.1 Mitóza .....	34
2.6.2 Buněčný cyklus po ozáření .....	35
2.6.3 Buněčná smrt .....	35
3 BIOLOGICKÁ DOZIMETRIE .....	38
3.1 Metody biologické dozimetrie .....	41
3.1.1 Analýza dicentrických chromozomů (DCA) .....	41
3.1.2 Mikrojaderný test (CBMN) .....	44
3.1.3 Analýza $\gamma$ H2AX.....	46
3.1.4 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) .....	48
3.1.5 Předčasná kondenzace chromozomů (PCC).....	49
3.1.6 Nové trendy v biodozimetrii .....	49
3.1.7 Zobrazovací systémy .....	51
3.1.8 Teorie kalibračních křivek v biodozimetrii .....	53
4 CÍLE PRÁCE.....	56
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	57
5.1 Seznam chemikálií, pomůcek a přístrojů .....	57

5.1.1	Chemikálie .....	57
5.1.2	Materiál a laboratorní potřeby .....	57
5.1.3	Přístrojové vybavení .....	57
5.1.4	Programové vybavení .....	58
5.2	Biologický materiál.....	58
5.3	Ozáření krevních vzorků.....	58
5.4	Příprava kultivačního média a roztoků .....	59
5.5	Analýza dicentrických chromozomů .....	60
5.5.1	Kultivace buněk .....	60
5.5.2	Fixace buněk .....	60
5.5.3	Příprava preparátu a barvení .....	61
5.5.4	Hodnocení preparátů .....	61
5.6	Mikrojaderný test (CBMN) .....	62
5.6.1	Fixace buněk .....	62
5.6.2	Příprava preparátu a barvení .....	62
5.6.3	Hodnocení preparátů .....	63
5.7	Analýza dat .....	64
6	VÝSLEDKY .....	65
6.1	Analýza mikrojadern pomocí klasické mikroskopie .....	65
6.2	Analýza mikrojadern pomocí Metaferu – automatický režim hodnocení .....	71
6.3	Analýza mikrojadern pomocí Metaferu – semiautomatický režim .....	75
6.4	Porovnání kalibračních křivek pro metodu CBMN – mikroskopicky, semiautomaticky a automaticky režim .....	80
6.5	Odečet slepých vzorků CBMN .....	81
6.6	Analýza dicentrických chromozomů pomocí klasické mikroskopie .....	84
6.7	Odečet slepých vzorků DCA .....	89
6.8	Vyhodnocení slepých vzorků.....	90
7	Diskuze .....	93
8	ZÁVĚR .....	101
9	REFERENCE.....	103

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Tvorba chromozomu do tvaru X při buněčném dělení.....	21
Obrázek 2: Karyotyp muže XY a ideogram lidského karyotypu ženy .....	22
Obrázek 3: Chromozomové aberace.....	23
Obrázek 4: Vznik dicentrického chromozomu a mikroskopické zobrazení dicentrického chromozomu .....	25
Obrázek 5: Znázornění PARP do procesu opravy .....	29
Obrázek 6: Cesty reparace zlomů v DNA .....	31
Obrázek 7: Buněčný cyklus .....	35
Obrázek 8: Graf kalibrační křivky metody CBMN .....	70
Obrázek 9: Graf kalibrační křivky metody CBMN pro automatický režim.....	75
Obrázek 10: Graf kalibrační řady CBMN semiautomatický odečet.....	79
Obrázek 11: Porovnání kalibračních křivek pro metodu CBMN pro mikroskopický, automatický a semiautomatický režim .....	80
Obrázek 12: Kalibrační křivka metody DCA .....	88
Tabulka 1: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN.....	67
Tabulka 2: Biodose Tool tabulka pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN.....	68
Tabulka 3: Koeficienty kalibrační křivky pro metodu CBMN.....	69
Tabulka 4: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN v režimu automatického odečtu .....	72
Tabulka 5: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku CBMN v režimu automatického odečtu .....	73
Tabulka 6: Tabulka koeficientů CBMN kalibrační křivky pro automatický režim.....	74
Tabulka 7: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN v režimu semiautomatického odečtu.....	76
Tabulka 8: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku CBMN v režimu semiautomatického odečtu.....	77
Tabulka 9: Koeficienty semiautomatického odečtu CBMN.....	78
Tabulka 10: Odečet slepých vzorků pro mikroskopický, semiautomatický a automatický režim .....	82
Tabulka 11: Odhadované dávky pro slepé vzorky.....	83
Tabulka 12: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu DCA .....	85
Tabulka 13: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku DCA .....	86
Tabulka 14: Tabulka koeficientů DCA kalibrační křivky pro mikroskopický odečet .....	87

Tabulka 15: DCA slepé vzorky mikroskopický režim .....	89
Tabulka 16: Odhad dávky slepých vzorků DCA .....	90
Tabulka 17: Odchylky slepého vzorku BS1 .....	90
Tabulka 18: Odchylky slepého vzorku BS2 .....	91
Tabulka 19: Odchylky slepého vzorku BS3 .....	91

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

APE1	5' AP endonukleáza
BER	excize báží ( <i>base excision repair</i> )
BN	binukleární buňky ( <i>binucleate cells</i> )
CA	chromozomová analýza ( <i>chromosome analysis</i> )
CCD	zařízení s vázanými náboji ( <i>charge-coupled device</i> )
CDK	cyklin dependentní kináza ( <i>cyclin-dependent kinase</i> )
CBMN assay)	mikrojaderný test se zástavou v cytokinezi (cytokinesis-block micronucleus assay)
DCA	analýza dicentrických chromozomů ( <i>dicentric chromosome analysis</i> )
DDR	reakce na poškození DNA ( <i>DNA damage response</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DSB	dvojitě zlomy ( <i>double strand breaks</i> )
EPR	elektronová paramagnetická rezonance (electron paramagnetic resonance)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ( <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
HR	homologní rekombinace ( <i>homologous recombination</i> )
H•	vodíkový radikál
IAEA	Mezinárodní agentura pro atomovou energii ( <i>International Atomic Energy Agency</i> )
ICRP	mezinárodní komise pro ochranu proti ionizujícímu záření (International Commission on Radiological Protection)
ISO	mezinárodní organizace pro normalizaci ( <i>International Organization for Standardization</i> )
IZ	ionizující záření
MN	mikrojádra ( <i>micronuclei</i> )
NER	excize nukleotidů ( <i>nucleotide excision repair</i> )
NEIL	DNA glykosyláza podobná endonukleáze ( <i>nei-like DNA glycosylase</i> )
NPB	nukleoplazmatický můstek ( <i>nucleoplasmic bridge</i> )
NHEJ	nehomologní spojování konců ( <i>nonhomologous end – joininig</i> )
OH•	hydroxylový radikál
OSL	opticky stimulovaná luminiscence ( <i>optically stimulated luminescence</i> )
PARP-1	poly(ADP-ribosa) polymeráza 1
PARP-2	poly(ADP-ribosa) polymeráza 2
PBMC	mononukleární buňky periferní krve ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PCNA	proliferální buněčný antigen ( <i>proliferating cell nuclear antigen</i> )
PCC	předčasná kondenzace chromozomů ( <i>premature chromosom condenzation</i> )

Pol $\beta$	polymeráza $\beta$
PKN	polynukleotidkináza
RBU	relativní biologická účinnost
RIS	radiačně indukované signály
RMS	radiační monitorovací síť
RNA	ribonukleová kyselina
RTG	rentgenové záření
SSB	jednoduchý zlom ( <i>single strand breaks</i> )
SÚJR	státní úřad pro jadernou bezpečnost
SÚRO	státní ústav radiační ochrany
OECD	Organizaci pro hospodářskou spolupráci a rozvoj ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
RENEB	Evropská síť biologické a retrospektivní fyzikální dozimetrie ( <i>Running the European Network of Biological and Retrospective Physical Dosimetry</i> )
FEN-1	Flap endonukleáza
UV	ultrafialové záření
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

## ÚVOD

V souvislosti s rostoucím využíváním ionizujícího záření v diagnostice, léčbě nemocí a riziku jeho zneužití se stává nezbytně nutné porozumět dopadům ionizujícího záření na lidský organismus, zvláště na genetickou stabilitu buněk. V oblasti radiobiologie a radiodiagnostiky zaujímá výzkum radiačně indukovaných chromozomálních poškození lidských periferních lymfocytů významné místo. Jedním z hlavních předmětů vědeckého zkoumání je zkoumání chromozomálních poškození, která mohou přímo ovlivnit genetický materiál a mít důsledky na stabilitu buněk.

Tato diplomová práce je zaměřena na radiačně indukované chromozomální poškození lidských periferních lymfocytů ozářených *in vitro*. Periferní lymfocyty jsou klíčové složky imunitního systému, které hrají významnou roli při odpovědi organismu na různé druhy stresů, a to včetně ionizujícího záření. Porozumění změnám v chromozomální struktuře změněných i nezměněných buněk po ozáření může poskytnout důležité informace o biologických účincích na organismus. Tato práce je zaměřena na systematickou cytogenetickou analýzu, přičemž hlavním zaměřením jsou dicentrické chromozomy a vznik mikrojader, které jsou indukovány v periferních lymfocytech po ozáření ionizujícím zářením *in vitro*. Cytogenetická analýza podrobně zkoumá vznik dicentrických chromozomů a mikrojader v závislosti na dávce ozáření.

V rámci praktické části diplomové práce bude sestrojena kalibrační křivka, která bude vyjadřovat vztah mezi absorbovanou dávkou ionizujícího záření a četností vybraného cytogenetického markeru (např. dicentrických chromozomů nebo mikrojader) v hodnocených buňkách. Tato křivka následně umožní retrospektivní odhad absorbované dávky u neznámých vzorků na základě zjištěného výskytu biologického poškození. Kalibrační křivka tak slouží jako klíčový nástroj kvantitativní biodozimetrie. Tato metodologie poskytne užitečný nástroj pro přesnější vyhodnocení expozice ozáření a měření biologické odezvy na danou dávku.

Cílem této diplomové práce bylo analyzovat rozsah a charakter radiačně indukovaných chromozomálních poškození periferních lymfocytů, s důrazem na vliv dávky a času expozice. Vědecké poznatky získané touto rešerší mohou přispět k hlubšímu porozumění biologických mechanismů, které stojí za radiačními účinky na genetický materiál buněk.

# 1 IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ A JEHO ZDROJE

Ionizující záření je označení pro druh záření, který má dostatek energie k ionizaci atomů nebo molekul, tedy k vytržení elektronu [1]. Excitovaný stav nastává tehdy, když atom nebo molekula absorbuje energii, která nestačí na ionizaci, ale postačuje ke zvýšení energetické hladiny elektronu. Při návratu z excitovaného stavu může být energie uvolněna například ve formě záření. Podle způsobu, jakým je energie uvolňována, lze záření rozdělit do dvou hlavních kategorií: částicové a elektromagnetické [2]. Částicový typ, též nazývaný korpuskulární záření, zahrnuje částice alfa, protony, deuterony, elektrony, pozitrony a neutrony [3]. Do elektromagnetického typu záření, jinak nazývaného fotonové záření, patří gama záření, rentgenové záření a do jisté míry i ultrafialové záření [1].

Formy ionizujícího záření je možné rozdělit do čtyř hlavních kategorií. Mezi částicový typ záření spadají částice **alfa** ( $\alpha$ ), **beta** ( $\beta$ ) a neutrony. Vyzáření dvou protonů a dvou neutronů tvoří podstatu alfa záření, zatímco vyzáření elektronů je podstatou beta záření. **Alfa částice** jsou kladně nabitě a skládají se ze dvou protonů a dvou neutronů, což tvoří jádro helia. Jedná se o záření tvořené částicemi s vysokou hmotností a malým dosahem. **Beta částice** jsou elektron ( $\beta^-$ ) nebo pozitron ( $\beta^+$ ) emitovaný při přechodu neutronu na proton nebo opačně. Beta částice jsou lehčí než alfa částice, mají tak větší dosah, ale nižší ionizační schopnost [1, 4]. Do elektromagnetického záření řadíme **gama záření** ( $\gamma$ ) a **rentgenové záření** (RTG). Gama záření je elektromagnetická vlna – foton s nulovou klidovou hmotností a bez náboje. Je velmi pronikavé a má velký dosah, lze ho zastavit pouze několika centimetry olova nebo betonu [3, 4]. Rentgenové záření je elektromagnetické vlnění s velmi krátkými vlnovými délkami a vysokými frekvencemi. Vlnové délky RTG záření odpovídají hodnotám od 10 nanometrů do 100 pikometrů [5]. RTG záření vzniká při přeměně energie rychle se pohybujících elektronů, které dopadají na povrch kovové elektrody, na energii elektromagnetického záření. Ve zdravotnictví se rentgenové záření využívá k lékařskému zobrazování [3, 4]. Gama záření je vysokoenergetické elektromagnetické záření, které vzniká deexcitací vybuzených hladin atomového jádra. Jedná se o proud fotonů s vysokou rychlostí a velkou energií. Elektromagnetické vlnění u gama záření má kratší vlnovou délku než RTG záření [6, 1]. Je ovšem mnohem pronikavější a v magnetickém ani elektrickém poli nedochází k jeho vychýlení. Nejvhodnější stínící materiály pro RTG jsou látky s vysokou hustotou a vysokým protonovým číslem. Nejčastěji se používá olovo, wolfram nebo uran. Rentgenové záření má podobné fyzikální vlastnosti jako gama záření – jedná se také o elektromagnetické vlnění s velmi krátkou

vlnovou délkou. Na rozdíl od gama záření však nevzniká při jaderných přeměnách, ale uměle, typicky v rentgenových trubcích. Vzniká při zpomalování rychlých elektronů dopadajících na kovový terč, kdy se jejich kinetická energie mění na elektromagnetické záření. Rentgenové záření má obvykle nižší energii než gama záření, ale stále dostatečně vysokou na to, aby ionizovalo látky [5].

Gama záření má silné ionizační účinky. Ne vždy existuje samostatně – jak je patrné z obrázku, je doprovázeno alfa a beta zářením [3]. Nejvhodnější stínící materiály pro gama záření jsou látky s vysokou hustotou a vysokým protonovým číslem. V praxi se uplatňují olověné kontejnery, zástěny z olověného plechu či tvarované olověné cihly. Čím vyšší je energie fotonů gama záření, tím silnější musí být vrstva stínícího materiálu pro účinnou ochranu [5].

Některé atomy jsou přirozeně stabilní, zatímco jiné, s nestabilním jádrem, podléhají spontánní přeměně a uvolňují energii ve formě záření. Takové atomy nazýváme radionuklidy [2]. Tato energie působí na okolní atomy a ionizuje je. Ionizující záření má takovou energii, že může odtrhnout elektrony z jejich oběžné dráhy kolem jádra atomu, čímž vznikají nabitě atomy, tedy ionty [3]. V současnosti je známo více než 2000 radionuklidů [1]. Doba, za kterou se množství určitého nestabilního radionuklidu přemění na polovinu, se nazývá poločas přeměny, nebo také poločas rozpadu [1, 4, 3].

V praxi je nejdůležitější vztah mezi dávkou absorbovaného ionizujícího záření a biologickým účinkem na tkáň. Dávka obdrženého záření může být způsobena řadou radionuklidů, které se nacházejí buď mimo tělo (zevní expozice), nebo ozařují zevnitř (vnitřní kontaminace), kdy se radionuklidy dostanou do těla vdechnutím, požitím nebo přes poraněnou kůži [3, 6]. Veličiny se vyjadřují různými způsoby v závislosti na tom, jaký objem těla a které části byly ozářeny, a také na tom, jaký typ záření se na expozici organismu podílel [3]. Základní fyzikální veličinou je absorbovaná dávka, která udává množství energie pohlcené jedním kilogramem tkáně. Tato dávka se vyjadřuje v jednotkách gray (Gy) [3, 7, 8]. Absorbovaná dávka však nezohledňuje biologický účinek různých druhů záření. Například stejná dávka alfa záření vyvolá větší poškození než stejná dávka beta částic nebo fotonového záření [3, 1, 4]. Proto se v radiobiologii používají další veličiny, jako je například ekvivalentní dávka a efektivní dávka. Ekvivalentní dávka zohledňuje typ záření pomocí tzv. radiačních váhových faktorů, a vyjadřuje se v jednotkách sievert (Sv). Efektivní dávka vyjadřuje celkové riziko pro organismus tím, že

zohledňuje jak typ záření, tak rozdílnou citlivost jednotlivých tkání pomocí tkáňových váhových faktorů, a udává se v jednotkách sievertch (Sv) [9, 10]

Důležitou veličinou je také aktivita radionuklidu, která udává počet radioaktivních přeměn daného radionuklidu za jednotku času. Jednotka aktivity záření je becquerel (Bq), přičemž 1 Bq odpovídá jedné jaderné přeměně za sekundu [3].

Přestože všechny druhy ionizujícího záření způsobují v buňkách ionizaci a excitaci molekul, každý z nich se liší mírou průniku a předáváním energie v závislosti na své energii a fyzikální povaze. U každého druhu ionizujícího záření dochází k odlišnému mechanismu interakce s hmotou [4]. Gama a RTG záření, protony, alfa i beta částice reagují nejdříve s elektrony ionizovaného prostoru. Neutrony a neutrální, nenabitě částice ionizují nejdříve s jádry molekul. Distribuce absorbované dávky je u jednotlivých druhů ionizujícího záření charakterizována lineárním přenosem energie (LET, *Linear Energy Transfer*) [11, 8, 12]. LET je definován jako množství energie, kterou ionizující částice předá tkáni na dráze jednoho mikrometru. Jeho hodnota je přímo úměrná ionizační hustotě neboli počtu iontových párů vzniklých na dráze ionizující částice [11, 13]. Velikost LET je nepřímo ovlivněna rychlostí částice a přímo jejím nábojem. Z tohoto důvodu mají alfa částice, protony a neutrony vysoké hodnoty LET, zatímco elektrony, RTG a gama záření jsou charakterizovány nízkými hodnotami LET [12, 13, 14]. Biologický účinek ionizujícího záření tedy závisí na hustotě a rozložení ionizací podél dráhy záření – záření s vysokým LET způsobuje koncentrovanější a vážnější poškození tkání než částice s nízkým LET, které má difúznější účinek [8, 11, 15].

Relativní biologická účinnost (RBU) vyjadřuje poměr potřebných dávek dvou druhů ionizujícího záření, které vyvolají stejný biologický efekt. Jinak řečeno, RBU je definována jako poměr dávky referenčního záření k dávce studovaného druhu ionizujícího záření, která vyvolá stejný účinek [4, 11, 14]. Jako referenčního ionizujícího záření se obvykle používá rentgenové záření s  $E_{\max}$  200–300 keV nebo gama záření  $^{60}\text{Co}$  nebo  $^{137}\text{Cs}$ . Slabé záření má hodnotu RBU rovno jedné, hustě ionizující záření má hodnoty RBU větší než 1. Relativní biologická účinnost lze vypočítat dle vzorce níže (Rovnice 1), kde  $D_{\text{ref}}$  znamená referenční dávku a  $D_{\text{test}}$  testovanou dávku [11, 14].

$$RBU = \frac{D_{\text{ref}}}{D_{\text{test}}}$$

Rovnice 1: Výpočet relativní biologické účinnosti

## 2 BIOLOGICKÉ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ

Ionizující záření negativně ovlivňuje buňky v organismu, a to na molekulární tak i na buněčné úrovni. Poškození je vícestupňový proces [1, 4, 16]. Podstatou biologického účinku záření je absorpce energie fotonu neboli částice v živém organismu. Tato energie se přemění v jinou formu energie zejména v kinetickou formu energie. Tento proces je fyzikální a na něj navazují další, které jsou s ním spjaté. Na proces fyzikální povahy navazuje fyzikálně – chemický proces. Důsledek fyzikálně-chemického procesu jsou chemické a poté i biologické změny důležitých makromolekul v buňce [1, 16, 4]. Ve fyzikální fázi dochází k absorpci ionizujícího záření atomy nebo molekulami, což vede ke vzniku excitovaných nebo ionizovaných částic. Následuje fyzikálně-chemická fáze, při níž vznikají mezimolekulární interakce spojené s přenosem absorbované energie. V této fázi vznikají reaktivní částice, především volné radikály. Chemická a biochemická fáze představuje proces, během něhož volné radikály reagují s biologicky významnými makromolekulami, zejména s nukleovými kyselinami a bílkovinami, čímž dochází k narušení jejich struktury a funkce. Biologická fáze je pak souhrnem komplexních dějů a interakcí produktů předchozích fází na různých úrovních organizace organismu – od molekulární až po systémovou. Účinky ionizujícího záření na organismus mají charakter lavinovitého vývoje poškození, kde primární zásah může vyvolat řetězec navazujících biologických reakcí a změn [4, 6, 16].

Atomy a molekuly organismu absorbují energii ve formě záření a následkem této absorpce vznikají volné radikály a reaktivní agens. S ohledem na podstatu ionizačního procesu se účinek ionizujícího záření dělí na přímo a nepřímo ionizující [16, 4]. Přímé ionizující účinky jsou způsobeny nabitými částicemi, které disponují dostatečnou kinetickou energií k tomu, aby při průchodu materiálem vyvolaly ionizaci atomů či molekul. Mezi tyto částice patří elektrony, protony, pozitrony, alfa a beta částice. Naproti tomu nepřímo ionizující záření ( $\gamma$ -záření, RTG) tvoří nenabité částice, které samy o sobě ionizaci nezpůsobují, avšak při interakci s prostředím vedou k uvolnění sekundárních nabitých částic, které následně způsobují ionizaci [6, 1].

Přijetím dávky ionizujícího záření dochází k chemickým změnám a k ovlivnění biologické aktivity biomolekul. Vzhledem k tomu, že biologické systémy jsou z velké části tvořeny vodou, je právě voda hlavním absorbentem záření. Radiolýza vody vede ke vzniku reaktivních částic, jako je hydroxylový radikál ( $\text{OH}\cdot$ ), vodíkový radikál ( $\text{H}\cdot$ ) a v přítomnosti kyslíku také peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [1, 16, 3]. Vzniklé reaktivní produkty vyvolávají sekundární chemické reakce,

což představuje nepřímý účinek ionizujícího záření. Kyslík se váže na poškozené oblasti, které byly zasaženy radikály, čímž zvyšuje rozsah poškození. Tento mechanismus má zásadní význam v radioterapii. Poškození biomolekul volnými radikály lze do určité míry omezit pomocí látek obsahujících thiolové skupiny – například aminokyselina cystein je schopna radikály vázat a snižovat jejich účinek až na polovinu [3, 4]. Na základě míry poškození a způsobu poškození lze účinky dělit na deterministické a stochastické [1, 3].

### Deterministické účinky

Tyto účinky se objevují až po překročení určité dávkové prahové hodnoty. V oblasti nízkých dávek se obvykle nevyskytují. Pravděpodobnost jejich výskytu závisí na intenzitě a velikosti dávky záření [1, 6, 4, 3]. Aby se projevil deterministické účinky, musí dojít k nenávratnému poškození velkého množství buněk. Mezi tyto účinky patří akutní radiační syndrom, poškození plodu, lokální poškození a pozdní nenádorové změny. Prahovou dávkou pro rozvoj Dávka akutní nemoci z ozáření je 1 Gy [4, 6, 3].

### Stochastické účinky

Stochastické účinky vznikají v důsledku poškození malého počtu buněk, typicky na úrovni DNA. Na rozdíl od deterministických účinků zde neexistuje dávkový práh – i velmi nízké dávky mohou vést k biologickým následkům. Čím vyšší je dávka záření, tím větší je pravděpodobnost vzniku těchto účinků. Mezi hlavní stochastické účinky patří vznik nádorových onemocnění a genetické mutace. Obecně se předpokládá lineární vztah mezi velikostí dávky a pravděpodobností vzniku účinku [1, 16, 4]. Existují dva typy mutací způsobených ionizujícím zářením. Prvním typem jsou genové mutace, které se projevují změnami v sekvenci kódujících aminokyselin. Druhým typem jsou mutace vznikající v důsledku poškození chromozomů. Mezi chromozomová poškození patří zlomy, chromozomové aberace, morfologické změny a změny v počtu chromozomů [4, 16]. Do chromozomových aberací patří změny velikosti, změna morfologie nebo počtu. Do této skupiny spadají dicentrické, acentrické nebo prstencové chromozomy. Ke vzniku aberací dochází jak u somatických, tak zárodečných buněk [1, 3]. Frekvence výskytu je úměrná obdržené dávce ionizujícího záření. Vznik acentrických a dicentrických chromozomů je letální pro buňku. Jejich počet v ozářených buňkách lymfocytů se používá ke zpětnému zjištění obdržené dávky [1, 4].

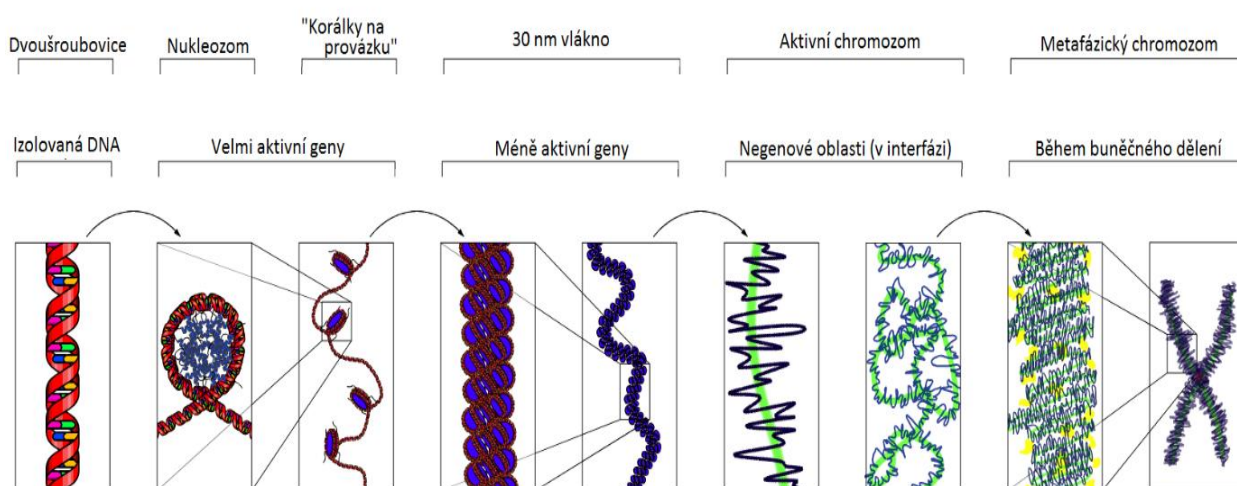
## 2.1 Interakce ionizujícího záření s organismem

Interakce ionizujícího záření s buňkami probíhá stejným fyzikálním mechanismem a podle stejných fyzikálních zákonů jako u neživé hmoty. Proces začíná předáním energie záření atomům a molekulám v živém organismu. Z biofyzikálního hlediska je třeba zdůraznit, že ve srovnání s jinými formami energie stačí ke vzniku poškození nebo i smrti velmi malé množství energie z ionizujícího záření. [6]. Vznik terčové teorie počítá s existencí citlivého terče uvnitř buňky. Podstatu dějů probíhajících v buňce po ozáření lze rozdělit do několika fází. První iniciální fází je fyzikální stadium. Fyzikální fáze je období kdy atomy a molekuly biologického systému absorbují záření. Další procesy jsou fyzikálně-chemické, chemické a biochemické. Během fyzikálně-chemického procesu dochází ke vzniku radikálů a reaktivních agens [16, 4, 6]. V chemické a biochemické fázi reagují mezi sebou přítomné radikály, které poškozují okolní biomolekuly. Na biochemickou fázi navazuje biologické stadium. Poškozené biomolekuly vyvolávají patologické změny ve fungování buňky. Pokud buňka ihned nezemře aktivuje se její komplexní buněčná odpověď na ozáření. V závislosti na rozsahu poškození a úspěšnosti opravy DNA je pak výsledek odpovědi buňky buď zotavení buňky, nádorová transformace nebo smrt buňky [16, 4].

Ionizující záření poškozují téměř všechny orgány v buňce. Klíčovou strukturou určující osud buňky je jaderná DNA. Záření působí zlomy dvoušroubovice, a to jak jednoduché, tak dvojité [16, 4, 13]. Jednoduché zlomy jednoho vlákna DNA (SSB, *single strand breaks*) dokáže buňka obvykle snadno opravit. Oprava dvojitých zlomů (DSB, *double strand breaks*) je však mnohem náročnější. S rostoucím počtem těchto poškození se zvyšuje i pravděpodobnost, že buňka nebude schopna opravu zvládnout a dojde k jejímu zničení [6, 13]. Kromě SSB a DSB vzniká po ozáření také poškození bází, křížové vazby DNA (DNA cross-link), lokální denaturace a další typy změn. Dochází rovněž k poškození proteinů a lipidů. Tyto molekuly se však v buňce vyskytují ve více kopiích než DNA, a proto jejich poškození obvykle nepředstavuje život ohrožující stav pro buňku [4, 16, 13]. Prokazatelný účinek na tyto molekuly lze očekávat až při vyšším poškození velkého procenta kopií. Změněná funkce DNA se následně odrazí ve fungování složitějších biologických struktur, a nakonec ovlivní i celkový stav organismu vystaveného ionizujícímu záření [16, 13].

## 2.2 Struktura DNA a chromozomů

Molekula DNA je přirozeně nestabilní, a proto je obklopena řadou proteinů, které zajišťují její uspořádání v jádře a zároveň ji chrání před škodlivými vlivy. V somatických buňkách člověka dosahuje délka DNA v nekondenzovaném stavu přibližně dvou metrů [17]. Uspořádání a struktura DNA a následná tvorba typického tvaru chromozomu je znázorněna v následujícím obrázku (Obrázek 1).



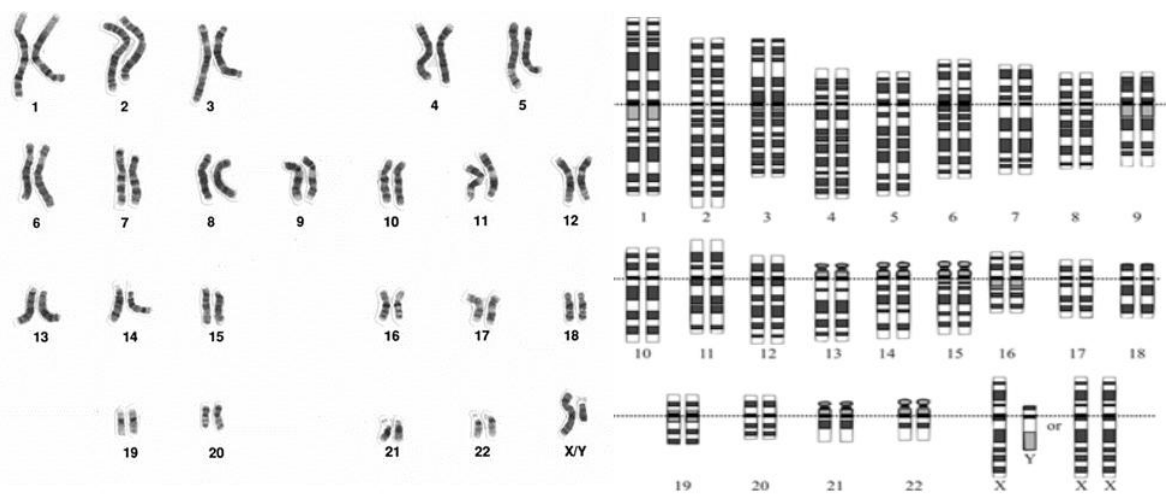
Obrázek 1: Tvorba chromozomu do tvaru X při buněčném dělení

Obrázek znázorňuje postupnou kondenzaci DNA od dvoušroubovice až po metafázický chromozom během buněčného dělení. DNA se nejprve navíjí kolem histonů do nukleozomů („korálky na provázku“), dále se zahušťuje do 30nm vlákna a vyšších struktur. V průběhu interfáze je chromatin částečně kondenzovaný, zatímco při dělení se zformuje do maximálně kondenzovaného metafázického chromozomu, viditelného pod mikroskopem. Tento proces umožňuje efektivní uspořádání a řízení genetické informace [17, 18].

U eukaryotických organismů je většina jaderné genetické informace uložena v chromozomech v buněčném jádře, zatímco menší část genomu se nachází v mitochondriích (a u rostlin i v chloroplastech). Na základě velikosti se chromozomy rozdělují do sedmi skupin označených písmeny A až G [17, 19]. Chromozom ve fázi metafáze buněčného dělení se skládá ze dvou chromatid, které jsou spojeny centromerou. Podle polohy centromery se chromozomy rozdělují na metacentrické (centromera je uprostřed, obě ramena jsou přibližně stejně dlouhá), submetacentrické (centromera je mírně posunuta od středu, ramena mají různou délku) a akrocentrické chromozomy (centromera je blízko jednoho konce a ramena jsou výrazně nestejně dlouhá) [4, 17]. Charakteristickým znakem chromozomů je pravidelné střídání oblastí heterochromatinu a euchromatinu podél jejich délky. Tyto rozdíly se po aplikaci cytogenetických barvicích metod projeví jako pruhování. V praxi se tento jev využívá ke

zkoumání strukturních i numerických aberací chromozomů. Nejmoderněji se s tímto přístupem pracuje například v molekulární metodě FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) [19].

Lidské buňky obsahují dvě sady chromozomů – jednu sadu od matky a druhou od otce. Celkem se v buňce nachází 23 párů chromozomů, z nichž 22 párů tvoří autozomy (číslované 1 až 22) a jeden pár jsou chromozomy pohlavní (XX u žen, XY u mužů) (Obrázek 2). Každý chromozom nese velké množství genů, které představují základní funkční jednotky dědičnosti [17].



Obrázek 2: Karyotyp muže XY (vlevo) a ideogram lidského karyotypu ženy (vpravo)


Obrázek zobrazuje lidský karyotyp – uspořádání chromozomů podle velikosti, tvaru a pruhození. Vlevo jsou chromozomy ve standardní metafázické podobě, vpravo s G-pruhozením, které umožňuje jejich přesnou identifikaci a detekci genetických změn, jako jsou delece, duplikace či translokace.

Správné spárování chromozomů je zásadní pro diagnostiku genetických poruch [17, 10, 20].

### 2.3 Chromozomové aberace

Chromozomové aberace vznikají v důsledku působení ionizujícího záření, které způsobuje poškození molekuly DNA, přičemž významnou roli hrají produkty radiolýzy vody. Ionizující záření vyvolá poruchy chromozomů, a to jak strukturní aberace, tak i změna jejich počtu neboli numerické aberace [1, 16, 17]. Strukturní aberace mohou postihnout jeden chromozom, jedná se o takzvané intrachromozomální aberace, nebo dva a více chromozomů, poté hovoříme o interchromozomálních aberacích, tyto aberace jsou znázorněny v obrázku níže (Obrázek 3). U numerických aberací u jednotlivých chromozomů se jedná o aneuploidie, pokud se numerické aberace týkají celých chromozomálních sad, hovoříme o polyploidii. Numerické aberace vedou ke kvantitativním odchylkám od normálního karyotypu, a jejich vznik způsobuje závažné syndromy [17, 19]. Syndromy jsou velmi závažné a většina z nich je neslučitelná

s životem. Dopad strukturních aberací není tak drastický jako u numerických, pokud ovšem dojde k zachování genetické informace, tedy pokud se jedná o balancované strukturní aberace. Závažnější jsou nebalancované strukturní aberace, kdy dojde ke ztrátě nebo získání genetického materiálu. Ovšem i balancované aberace mohou mít negativní vliv na zdraví člověka, dojde-li ke změně exprese genů v oblasti zlomu a následného znovu spojení DNA [4, 17, 19].

	Interchromozomální výměny	Intrachromozomální aberace zahrnující raménka <i>p</i> a <i>q</i>	Intrachromozomální aberace v rámci raménka <i>p</i> nebo <i>q</i>	Zlomy chromozomu (terminální delatace)
ASYMETRICKÉ	 <p>dicentrický chromozom</p>	 <p>kruhový (ring) chromozom</p>	 <p>intersticiální delece</p>	
SYMETRICKÉ	 <p>reciproká translokace</p>	 <p>pericentrická inverze</p>	 <p>paracentrická inverze</p>	

Obrázek 3: Chromozomové aberace

Aberace jsou rozděleny na asymetrické a symetrické podle ztráty nebo zachování genetického materiálu. Mezi asymetrické aberace patří dicentrické chromozomy, kruhové chromozomy, intersticiální delece a terminální zlomy chromozomů. Symetrické aberace zahrnují reciproké translokace a pericentrické a paracentrické inverze. Tyto strukturální změny jsou klíčové při hodnocení účinků ionizujícího záření, zejména v biodozimetrii [6].

Většinu lézí DNA dokáže buňka snadno a rychle opravit, pokud je poškozen pouze jeden řetězec DNA. Tento řetězec může být opraven pomocí druhého nepoškozeného řetězce, který slouží jako templát pro rekonstrukci DNA. Nově dosyntetizovaná DNA je tvořena na principu komplementarity bází [1, 4]. Při přerušení obou vláken DNA, což vede k vytvoření DSB, vznikají dvě hlavní rizika. Prvním je ztráta genetické informace následkem poškození konců DNA [13]. Druhým rizikem je nesprávné spojení chromozomálních fragmentů, které pocházejí z jednoho nebo více chromozomů. Pokusy o opravu DSB tedy mohou vést nejen k bodovým mutacím a mikrodelecím, ale i k intrachromozomálním inverzím a dalším chromozomálním aberacím, jako jsou translokace, dicentrické chromozomy, prstencové chromozomy a různé velikosti delecí. Vzhledem k závažnosti DSB a výše uvedeným komplikacím při jejich opravě

představují DSB zásadní typ radiačního poškození [13]. Na rozdíl od chemických látek ionizující záření způsobuje chromozomální aberace nezávisle na replikaci a fázi buněčného cyklu. Záření vyvolává přestavbu chromatinu, a to jak chromozomového, tak chromatidového typu [17]. Chromozomové aberace postihují obě chromatidy mitotického chromozomu. Tyto aberace se formují v G1 fázi na jedné chromatidě, a v S fázi se přenesou na druhou chromatidu. Aberace chromatidového typu mají svůj původ až v S/G2 fázi, přičemž v první mitóze zasahují jednu chromatidu. Při dalším cyklu buněk se chromatidové aberace přemění na chromozomové [6, 4]. Mezi nejvýznamnější strukturní aberace vzniklé při kontaktu s ionizujícím zářením patří prstencové chromozomy, dicentrické chromozomy, fragmenty, delece a inserce [16, 13].

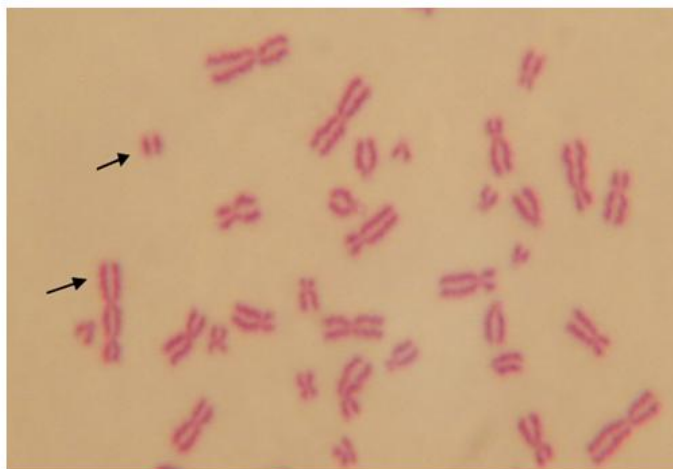
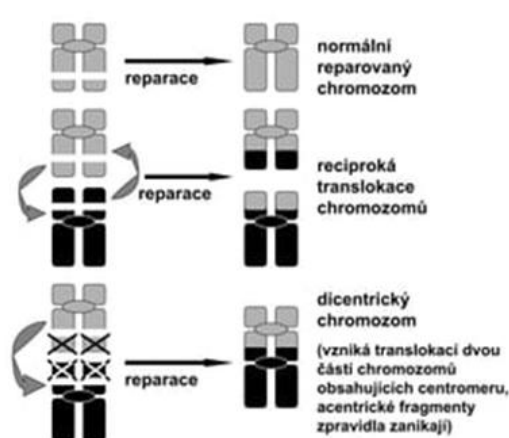
### **2.3.1 Kruhové chromozomy**

Kruhové neboli ring chromozomy vznikají cirkulací chromozomu a spojením krátkého a dlouhého raménka poté, co došlo k odlomení terminálních konců nebo k telemetrickému poškození vlivem ionizujícího záření. Přítomnost kruhového chromozomu je spojena se ztrátou genetické informace, protože vzniklé fragmenty se nepřenášejí do dceřiných buněk, a to díky absenci centromery, která je nezbytná pro správnou segregaci chromozomů během buněčného dělení [4, 17].

### **2.3.2 Dicentrické chromozomy**

Jsou stěžejní produkty v ozářených buňkách. Formuje se podobně jako kruhový chromozom. Rozdíl při formování dicentrického chromozomu spočívá v tom, že namísto jednoho chromozomu se zde účastní dva chromozomy [4]. Jedná se tedy o interchromozomální aberaci. Po deleci konců ramének p nebo q obou chromozomů přestávají být postižená raménka chráněna telomerami, což vede k jejich vzájemným interakcím. Bez této ochrany může docházet k nechtěnému spojování chromozomálních fragmentů, což zvyšuje riziko vzniku chromozomálních aberací [4, 11]. Chromozomy bez telomer vzájemně interagují a dochází ke spojení odhalených ramének obou chromozomů. Výsledný chromozom pak obsahuje dvě centromery. Vznik dicentrických chromozomů je detailně znázorněn v obrázku níže (Obrázek 4) Stejným způsobem mohou vznikat i vícecentrické chromozomy. Tyto multicentrické struktury jsou typicky výsledkem expozice buňky vyšší dávce ionizujícího záření, které způsobuje závažné strukturální změny chromozomů. Tato aberace může vést k narušení normálního rozdělení chromozomů během buněčného dělení, což má vážné důsledky pro genetickou stabilitu buňky [4, 17, 11]. Tyto aberace, stejně jako výskyt prstencových (ring)

chromozomů, vedou ke ztrátě genetické informace. Dicentrické chromozomy způsobují závažnější poruchy mitotického dělení a jejich přítomnost je proto pro buňku letální [1].



Obrázek 4: Vznik dicentrického chromozomu (vlevo) a mikroskopické zobrazení dicentrického chromozomu (vpravo)

Schematické znázornění opravy dvouřetězcových zlomů DNA. Při správné opravě vzniká neporušený chromozom. Chybná oprava může vést k reciproké translokaci (výměna částí mezi chromozomy), vzniku dicentrického chromozomu (s dvěma centromerami) a acentrických fragmentů (bez centromery), které jsou nestabilní a obvykle zanikají [6, 10].

### 2.3.3 Delece chromozomů

Delece chromozomu je proces, při kterém dochází ke ztrátě genetického materiálu. Chromozomové delece se objevují jako následek ozáření, ale také díky procesu začištění chromozomu při reparačních procesech DSB DNA. Díky reparačním procesům DNA vznikají jen malé delece, rozsáhlejší delece vznikají následkem záložních mechanismů reparační DNA [17, 19].

### 2.3.4 Fragmenty chromozomů

Při působení ionizujícího záření nebo chemických či mechanických vlivů se mohou z chromozomů odlomit krátké fragmenty chromatinu. Tyto fragmenty, které postrádají centromeru, nemohou být součástí buněčného cyklu. Vznikem těchto fragmentů dochází ke ztrátě genetické informace, což vede k letálním poruchám ve funkci genomu [4].

## **2.4 Interakce záření na molekulární úrovni**

Ionizující záření může poškodit všechny typy biomolekul. Z hlediska funkce buňky je však klíčové poškození proteinů, lipidů, RNA a zejména DNA. Ionizující záření mění strukturu, funkci a syntézu nukleových kyselin a proteinů. Ukazuje se, že existuje dávková závislost, kdy vyšší dávky záření vedou k poklesu replikační a transkripční aktivity DNA [16, 4]. Radiosenzitivita replikace je přibližně o řád vyšší než u transkripce, což je důsledkem většího odhalení DNA během replikace než při transkripci [16]. Poškození DNA může vést k její neschopnosti se replikačně obnovit, což následně způsobuje smrt buňky [6]. DNA je obklopena histony, bazickými nukleoproteiny, které se spojují do nukleozomů, tvořících základní jednotky chromatinu v chromozomech. Tyto proteiny poskytují určitou ochranu DNA před poškozením. I přesto existuje v buňce řada dalších reparačních mechanismů, které se aktivují v případě poškození DNA [16, 4].

### **2.4.1 Poškození proteinů**

Proteiny jsou stavební a výkonnou složkou buňky. Jejich poškození může mít pro buňku fatální následky. K fatálnímu poškození však dochází až při vysokých dávkách záření [3]. Jak již bylo zmíněno výše, proteiny se v buňce vyskytují v mnoha kopiích a na rozdíl od molekuly DNA u nich nedochází k odhalení či rozbalení struktur [16, 4]. Při neletálních dávkách záření zůstane v buňce dostatek nepoškozených kopií proteinů, které umožní přežití buňky v krizové situaci. Buňka následně odstraní nefunkční a poškozené proteiny pomocí hydrolýzy proteolytickými enzymy v proteazomech a nahradí je syntézou nových. Tímto se poškození proteinů liší od poškození DNA, které se přenáší do následující generace, pokud není správně opraveno [6]. Proteiny narušuje jak samotné záření, tak i ionty z radiolýzy vody. Následkem interakcí s ionty mohou proteiny změnit svou konformaci, což vede ke změně nebo úplné ztrátě jejich funkce [1]. Nebezpečné jsou i proteinové adukty na molekule DNA, které brání replikaci, transkripci a reparaci. Radiační poškození proteinů ovlivňuje buněčné procesy, které zprostředkovávají proteiny, ale i další biomolekuly, jako je DNA [1, 6].

### **2.4.2 Poškození DNA**

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) má v buňce i v radiobiologii unikátní postavení. U eukaryotních organismů se DNA vyskytuje nejen v jádře, ale i mimo něj v jiné formě než v jaderné DNA. Jaderná DNA je nositelkou genetické informace, na rozdíl od ostatních typů DNA v buňce. Jaderná DNA se, na rozdíl od početných mimojaderných DNA, nachází pouze

ve dvou kopiích, přičemž v haploidních gametách je přítomna jen v jedné kopii [4, 17]. Dojde-li k poškození jaderné DNA bez včasné opravy, může to vést ke ztrátě genetické informace. DNA vykazuje citlivost k nízkým dávkám ionizujícího záření. K narušení funkce genu nebo regulačního úseku totiž někdy postačuje i pouhá změna jedné báze v sekvenci. Mezi všemi možnými poškozeními biomolekul je poškození molekuly DNA nejzávažnější [3]. Poškození může mít pro buňku i celý organismus trvalé a nebezpečné následky, a to i v případě, že buňka přežije akutní fázi po ozáření [13]. Defekty genetické informace mohou vést k expresi proteinů s pozměněnou funkcí nebo zcela nefunkčních proteinů. Tyto poruchy se však projeví až po nakumulování značného množství poškozené DNA, což může trvat i desítky let [1, 16]. Z tohoto důvodu neopravené léze DNA představují pro buňku časovanou bombu. Na druhou stranu buňka disponuje reparačními mechanismy, které jsou schopné tyto léze DNA včas opravit [13].

Pro prevenci hromadění genotoxických poškození a odvrácení dysfunkce buňky si buňky vyvinuly komplexy odpovědí, které se při detekci poškození okamžitě aktivují [16, 13]. Poškozené nukleotidy a SSB DNA jsou velmi rychle reparovány za pomoci systémů excizní reparační (BER – base excision repair, NER – nucleotide excision repair) [16, 4, 21] DSB patří mezi letální poškození buňky a jejich oprava je komplikovaná. V případě nedokonalé opravy dojde ke vzniku mutací a k nestabilitě genomu [16].

### **2.4.3 Reparační DNA**

Reparační systémy buňky se nezaměřují pouze na poškození vyvolané ionizujícím zářením. Ve skutečnosti dochází k neustálému poškození DNA vlivem environmentálních faktorů i vnitrobuněčných procesů (metabolismus, replikace a transkripce) [16, 17]. Během jednoho reparačního cyklu se v DNA díky působení radikálů objeví až 5000 jednoduchých zlomů. Pouze z 1 % těchto zlomů vznikají DSB. Teoreticky může i jediný DSB vést ke smrti buňky, pokud zůstane neopraven [4].

Efektivita reparačních systémů buňky má zásadní vliv na osud ozářené buňky. Neúčinná reparační může vést ke smrti mnoha buněk a ke vzniku akutního poškození, což spadá mezi deterministické účinky záření. Nepřesná reparační způsobuje problémy ve stochastické oblasti [16, 3, 4].

## 2.4.4 Reparace jednoduchých zlomů

### 2.4.4.1 Excize bází

Poškozené báze a nesprávně spárované nukleotidy patří mezi snáze opravitelné léze DNA, protože postihují jen jeden řetězec [16]. Na chemicky modifikované báze (oxidované, alkylované atd.) se zaměřuje bázová excizní reparace. Ta neodstraňuje pouze abnormální báze, ale celé nukleotidy. Vzniklé mezery jsou následně zaplněny novými nukleotidy podle pravidel komplementarity bází v protilehlém nepoškozeném řetězci [16, 4, 21].

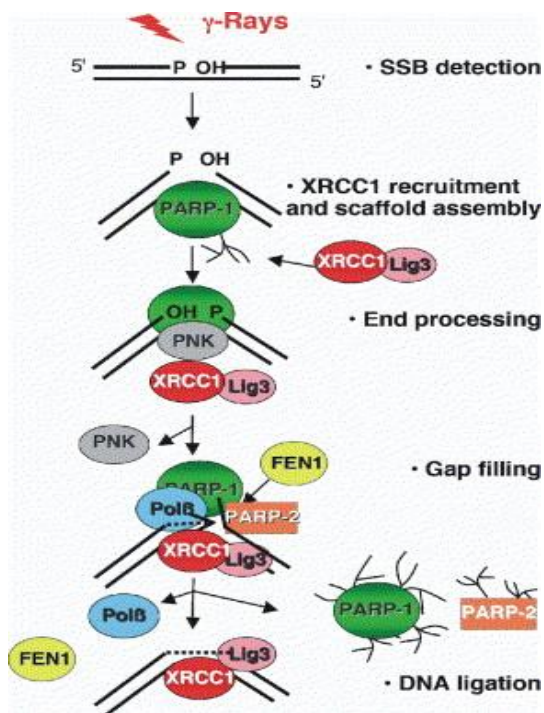
Reparace těchto zlomů probíhá za pomoci krátké nebo dlouhé BER (Base excision repair) cesty. BER opravuje poškození DNA způsobené deaminací, alkylací a oxidací [4, 22]. Toto poškození způsobuje malou deformaci dvoušroubovice. BER je iniciováno DNA glykosylázou, která rozpozná a odstraní poškozenou bázi, čímž zanechá volné abazické místo, které je následně zpracováno buď krátkou, nebo dlouhou cestou opravy [16]. Dnes je známo nejméně 11 různých savčích DNA glykosyláz [21]. BER chrání před rakovinou, stárnutím a neurodegenerací. Opravy pomocí BER probíhají jak v jádrech, tak i v mitochondriích [4]. Důležitým regulátorem je poly(ADP-ribosa) polymeráza 1 a poly(ADP-ribosa) polymeráza 2 (PARP-1 a PARP-2) [23, 24]. Tyto enzymy se podílejí na rozpoznání SSD v DNA. Poly(ADP-ribosyl)ace je okamžitá posttranslační modifikace histonů a jaderných proteinů závislá na poškození DNA. Tato posttranslační modifikace přispívá k přežití poškozených proliferujících buněk. Znázornění PARP cesty je ukázáno na obrázku (Obrázek 5). PARP tvoří rodinu 18 proteinů, kódovaných různými geny, které vykazují společnou katalytickou doménu [4, 21, 23].

PARP-1 (113kDa) a PARP-2 (62kDa) jsou oba zapojeny do snímání a signalizace zlomu DNA (SSBR) nebo opravy vyříznutí bází (BER) (Obrázek 5) [21, 23, 24, 25]. Po vazbě PARP-1 na poškozenou DNA tento enzym katalyzuje přenos ADP-ribóz získaných při štěpných reakcích NAD (nikotinamind adenin dinukleotid). Předpokládá se, že kovalentní automodifikace PARP-1 slouží k přivolání ostatních reparačních proteinů do poškozeného místa a tím k urychlení celého děje [21, 24].

PARP-2 (62 kDa) je jaderný protein, který se váže na zpracovanou DNA enzymem DNázou – 1. Jeho doména vázající se na DNA se liší od PARP-1. PARP-2 se zaměřuje na mezery v DNA ne na zářezy [16, 21, 25]. PARP-2 je protein, který zodpovídá až za 15% celkové aktivity PARP stimulované DNA poškozením. Od PARP-1 se liší zejména modifikacemi domény rozpoznávající zlomy. PARP-2 se podílí na modifikaci struktury

chromatinu, jeho hlavním cílem je histon H2B. PARP-2 spolupracuje s endonukleázou FEN1 při dlouhé variantě BER [21, 23, 24].

V první fázi je poškozená báze odštěpena v katalyzované reakci pomocí specifických DNA-glykosyláz, tato reakce vytvoří abazické místo v řetězci. Následuje štěpení 5'AP endonukleázou (APE1) dojde k odštěpení terminálního deoxyribóza-fosfátu a doplnění nukleotidu pomocí DNA polymerázy  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) [16, 23, 24]. Krom APE1 se zapojují i další enzymy, které se mohou podílet na úpravě a stříhání abazického místa. Mezi tyto enzymy patří třeba endonukleázy NEIL1 a NEIL 2 ve spolupráci s polynukleotidkinasou (PKN). Na konci cesty je řetězec zacelen komplexem proteinů XRCC1 a DNA ligázou III. Takto probíhá krátká varianta BER, při které dojde k odstranění a nahrazení pouze jednoho nukleotidu [16, 21, 22]. Krom krátké BER cesty opravy je i dlouhá cesta, při které po rozštěpení řetězce dojde k odstranění několika nukleotidů, a to pomocí komplexu zahrnující replikační faktor C (RF-C), proliferační buněčný antigen PCNA (proliferating cell nuclear antigen), polymerázy  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) a FEN-1 [26]. Replikační faktor C slouží k připojení PNCA na poškozenou část DNA. PNCA K tomuto komplexu je připojena polymeráza  $\beta$  a FEN-1 odštěpí polynukleotidový úsek, který je určený k nahrazení. Závěrečné spojení dlouhé varianty BER je katalyzováno DNA ligázou I [16, 21, 24].



Obrázek 5: Znárodnění PARP do procesu opravy

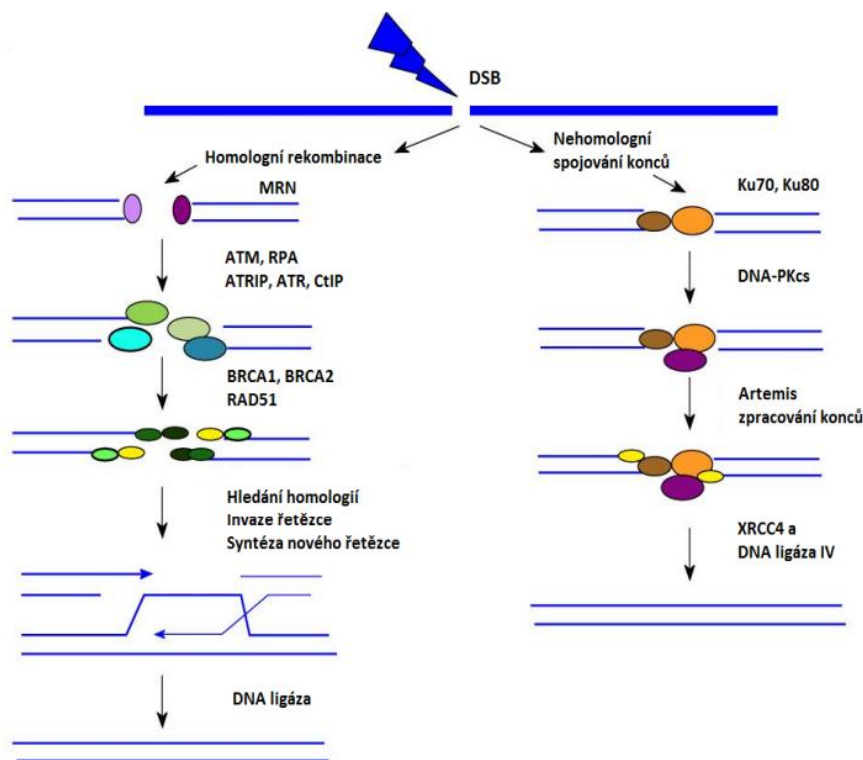
Oprava jednoduchých zlomů DNA (SSB) indukovaných  $\gamma$ -zářením: PARP-1 detekuje zlom a rekrutuje XRCC1-Lig3 komplex. Následuje zpracování konců enzymem PNK, doplnění chybějících bází polymerázou Pol $\beta$  za asistence PARP-2 a FEN1, a nakonec ligace DNA Lig3 [24].

#### **2.4.4.2 Excize nukleotidů**

Nukleotidová excizní reparace probíhá podobně jako BER reparace DNA s tím rozdílem, že při nukleotidové excizní reparaci (NER) dojde k vyštěpení většího úseku poškozeného řetězce [4, 27]. Nukleotidová excizní oprava neboli NER je hlavní cestou používanou savci k odstranění velkého množství lézí DNA [28, 22]. Tyto léze jsou vytvořené UV světlem, mutageny z enviromentálního prostředí a určitými chemoterapeutickými činidly. Nedostatek v nukleotidové excizní reparaci může vést k dědičné poruše xeroderma pigmentosum [4, 22]. NER je velmi komplexní děj, jehož jednotlivé kroky zahrnují až 20 různých proteinů, mezi klíčové produkty genů patří produkty genů XP [27, 28]. Dosud bylo rozpoznáno sedm odlišných skupin genů XP, které se podílejí na opravě poškozených úseků DNA. Tyto geny se označují XPA až XPG [29]. Ve spolupráci různých rodin proteinů NER dojde nejprve k rozeznání a označení poškozeného úseku DNA. Následně dojde k vystřížení až 30 nukleotidů z poškozeného místa. Po vystříhnutí poškozeného úseku DNA dojde k syntéze nového úseku [16, 27]. Exprese genů důležité pro syntézu proteinů účastnících se se NER je pod kontrolou proteinu p53. V odpovědi na poškození DNA jejich koncentrace v buňce stoupá [27, 28, 29].

#### **2.4.5 Reparace dvojitých zlomů**

Zatímco SSD DNA dokáže buňka snadno a rychle opravit, DSB jsou kvůli současnému zlomu obou řetězců na jednom místě molekuly DNA velmi složitě reparovány [16, 4, 22]. Při reparačním procesu molekuly DNA po poškození DSB převládají dva hlavní mechanismy. Prvním mechanismem opravy DSB je homologní rekombinace (HR), druhým je nehomologní spojování konců (NHEJ — non-homologous end joining) [16, 4, 28]. Tyto mechanismy se liší v tom, jak využívají homologní templát k rekonstrukci původní genetické informace (Obrázek 6). Nehomologní spojování konců je zodpovědné za opravu ve všech fázích buněčného cyklu, zatímco homologní rekombinace probíhá především v pozdní S fázi a v G2/M fázi buněčného cyklu. U eukaryotních organismů je běžnější využití nehomologního reparačního systému, zatímco jednoduché organismy, jako jsou např. kvasinky, využívají systém homologní reparační opravy [16, 4, 30].



Obrázek 6: Cesty reparace zlomů v DNA

Schéma oprav dvojitých zlomů DNA (DSB) pomocí homologní rekombinace (HR) a nehomologního spojování konců (NHEJ). HR využívá sesterskou chromatidu jako šablonu pro přesnou opravu, zatímco NHEJ spojuje konce přímo, rychleji, ale s vyšším rizikem chyb [16, 31].

Při nehomologním mechanismu spojování konců dochází k jednoduché ligaci volných konců DNA pomocí komplexu DNA ligázy IV. V případě radiačně indukovaných DSB dojde většinou ke spojení konců až po jejich předchozím začištění (začištění = na 3' konci řetězce DNA musí být OH skupina a na 5' konci fosfátový zbytek) [32]. Při mechanismu reparace cestou NHEJ je přesnost opravy nižší než u HR. Ionizující záření indukuje problematičtější DSB, jejichž konce nelze spojit bez začištění [4]. Často dochází k vzniku výrazně komplexních lézí a mnohočetných zlomů DNA, které představují výzvu pro reparační mechanismy. U ozářených buněk se nepřesnost NHEJ mechanismu výrazně zvyšuje a v podstatě vždy dojde k drobným změnám genetického materiálu. NHEJ účinně chrání buňky (s velkými genomy) před vznikem chromozomálních aberací, které vedou k buněčné smrti [28, 30, 32].

Odlišný mechanismus reparace DSB DNA je takzvaná homologní reparace, která využívá sekvence DNA nepoškozené sekvence DNA sesterské chromatidy [4, 22]. Resekční enzymy nejprve odstraní z DNA dlouhý úsek 5' řetězce v obou směrech od místa DSB. Na uvolněných koncích DNA se poté vytvoří dlouhé SSD přesahy 3' řetězců. Jeden z těchto přesahů se za pomoci reparačních proteinů vmezeří do homologní sekvence DNA sesterské chromatidy.

Tímto procesem je polymerázám zajištěn templát pro syntézu chybějícího poškozeného řetězce a tím i pro obnovu původní genetické informace [28]. Homologní rekombinace je mnohem složitější a pomalejší proces opravy DSB v DNA. Probíhá pouze v pozdní fázi S a v G2 fázi buněčného cyklu. Oproti nehomolognímu spojení konců (NHEJ) je, až na specifické výjimky, velmi přesným způsobem reparace molekuly DNA. Vyvstává však otázka: jak si buňka vybírá mezi NHEJ a HR [22]? Buňka si mezi NHEJ a HR vybírá hlavně podle fáze buněčného cyklu. HR (homologní rekombinace) probíhá jen tehdy, když má buňka k dispozici sesterskou chromatidu, tedy v pozdní S a G2 fázi. Je velmi přesná, ale pomalejší. NHEJ (nehomologní spojení konců) funguje v kterékoli fázi, hlavně v G1, kdy sesterská chromatida chybí. Je rychlejší, ale méně přesná. Rozhodování ovlivňují různé proteiny, které buď podpoří opravu cestou homologní rekombinace jako je např. BRCA1, nebo NHEJ (např. 53BP1) [22, 32].

## **2.5 Interakce ionizujícího záření na buněčné úrovni**

Pozměnění funkcí biomolekul, zvláště změny v DNA, se projeví jako změna ve fungování vyšších biologických celků, což může mít vliv i na stav celého organismu. Na buněčné úrovni se poruchy projevují okamžitou, mitotickou nebo opožděnou smrtí buněk. Odpověď buňky na ionizující záření a její osud závisí na mnoha faktorech: absorbované dávce záření, charakteru expozice, stavu buňky, mikroprostředí a schopnosti buňky opravit poškozenou DNA [16, 4, 17]. Při velmi vysokých dávkách záření, které poškozují celý buněčný obsah, dochází k okamžité smrti buněk nekrotického charakteru. K usmrcení buňky při takto vysokých dávkách obvykle dochází během interfáze. Nekróza začíná několik minut po ozáření a končí rozpadem buňky, což vede k rozvoji zánětu [1, 6].

V přeživších buňkách může přítomnost i malého množství defektů v DNA iniciovat komplexní buněčnou odpověď na ozáření, známou jako reakce na poškození DNA (DDR, Damage Response) [22]. Prvním úkolem této odpovědi je zablokování buněčného cyklu, čímž se buňce poskytne čas na opravu DNA. Ionizující záření může zastavit buněčný cyklus v G1, S nebo G2 fázi. Hlavní roli v procesu buněčné odpovědi hrají kontrolní body buněčného cyklu a protein p53 [16, 4]. Záření indukuje DNA léze, jejichž vznikem je aktivován protein p53, který stimuluje expresi dalšího proteinu p21 [16]. Tento proces vede k inhibici komplexů cyklinů s CDK kinázami (CDK2, CDK1 a CDK4/6). Výsledkem je dočasné zablokování buněčného cyklu v příslušném kontrolním bodě [16, 33]. Významnějším typem buněčné apoptózy je zánik vázaný na mitózu, tzv. mitotická smrt buňky, která vzniká v důsledku menších dávek

ionizujícího záření. Toto záření není dostatečné k vyvolání smrti buňky v interfázi, a poškození se neprojevuje okamžitě. V důsledku ozáření dochází k inhibici buněčného dělení. I když buňka nezanikne, není schopná pokračovat v mitóze [4, 28, 33]. Pokud je poškození menšího rázu, buňka vstoupí do mitózy jednou či dvakrát, než kompletně ztratí schopnost dalšího dělení. Nejnižší dávka způsobí vytvoření bloku v určité fázi mitotického cyklu, buňky se dále nedělí a je jim poskytnut čas na reparaci poškození. V případě neopravitelného poškození je u buňky vyvolána apoptóza [28].

## 2.6 Buněčný cyklus

Během života buňka prochází cyklem dělení, dokud její kapacita dělení není vyčerpána, což vede k vyvolání apoptózy neboli buněčné smrti. Produktem buněčného cyklu je vznik dceřiných buněk z mateřské buňky. Tento cyklus se periodicky opakuje, přičemž každá fáze má pro život buňky specifický význam [17, 19]. Buněčné dělení je přísně regulováno a buňka je při průchodu cyklem kontrolována v určitých fázích buněčného dělení. Tyto kontroly zajišťují, že k dělení dochází pouze tehdy, pokud buňka obdrží příslušné signály. Na konci fází, a někdy i během nich, jsou kontrolní body, kde se kontroluje DNA, organely a správný průběh cyklu [4, 17, 19]. Prostřednictvím kontrolních bodů se buňka chrání před nadměrnou proliferací, genomovou nestabilitou a nádorovým bujením. Délka cyklu se liší podle typu buněk a podmínek prostředí. Některé buňky, jako například nervové a svalové, téměř neprocházejí dělením, jiné projdou buněčným cyklem jednou ročně, mezi které patří buňky jaterní. Na rozdíl od těchto buněk, které proliferují jen zřídka, existují v těle buňky, které procházejí proliferací každý den (například výstelkové buňky střev nebo buňky v kostní dřeni) [17].

Proliferace buněk neboli cytokineze, je proces spojený se zdvojením jádra. Období buněčného cyklu, ve kterém se jádro buňky dělí, se označuje jako M fáze, která zahrnuje mitózu nebo meiózu, v závislosti na typu buněk. Pauza mezi M fázemi je nazývána interfází. Buňka v interfázi se nedělí, a tato fáze trvá většinu buněčného cyklu [4, 19]. Buňka, jenž se nachází v interfázi prochází několika etapami, aby se připravila na konečnou M fázi. Buňka se nejdříve nachází v  $G_0$  fázi, jedná se o klidovou fázi buňky (jen některé buňky jí prochází). Dále buňka prochází  $G_1$  fází neboli presyntetickou fází, v této fázi cyklu dojde ke zdvojení buněčné hmoty a probíhá zde syntéza RNA a histonů. Buňka je v přípravné fázi a připravuje se na syntézu DNA v navazující S fázi.  $G_1$  fáze je nejdelší a nejvariabilnější fází celého buněčného cyklu. V S fázi dochází ke zdvojnásobení DNA v buňce, přičemž každý chromozom se v tomto stádiu

vyskytuje dvakrát. Po dokončení replikace DNA se buňka dostává do G<sub>2</sub> fáze [6, 31]. V G<sub>2</sub> fázi dochází k syntéze proteinů potřebných pro vznik mitotického aparátu a ke zdvojení organel v buňce. Po ukončení této fáze je buňka připravena vstoupit do mitózy nebo meiózy. Po dokončení M fáze buňka může vstoupit do G<sub>0</sub>, klidové fáze po dělení [4, 6, 17].

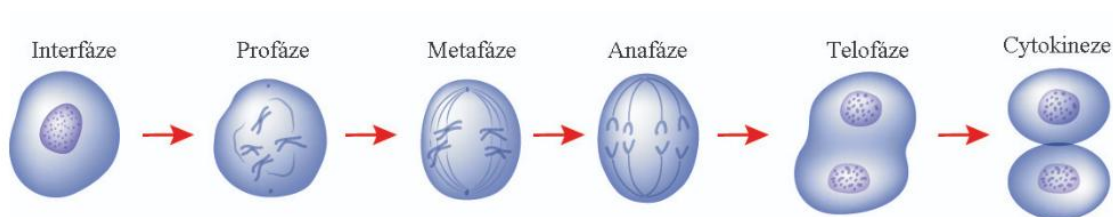
O urychlení, zpomalení nebo zastavení cyklu rozhodují tři hlavní kontrolní body. Klíčovou úlohu zde hrají cykliny, cyklin-dependentní kinázy (CDK) a inhibitory CDK [16]. První kontrolní bod buněčného dělení se nachází na přelomu fází G<sub>1</sub> a S. V tomto bodě buňka čeká na signály, které ji umožní pokračovat do S fáze. Průchod tímto bodem zprostředkovává hlavně kináza CDK4/6, cyklin D1 a proteiny z rodin p21 a p1, které jsou inhibitory CDK kináz. Komplex CDK4/6 zvyšuje expresi cyklinu E, který reaguje s CDK2 [28, 31, 34]. Touto interakcí se zprostředkovává přechod buňky do S fáze. Druhý kontrolní bod se nachází mezi G<sub>2</sub> a M fází. Na tomto kontrolním uzlu se kontroluje stav DNA po replikaci. Zde si buňka ověřuje, zda při zdvojení DNA nedošlo ke vzniku chyb v DNA a zda duplikace proběhla kompletně [16, 4, 28]. Na přechodu buňky do M fáze se podílí defosforylace komplexů cyklinů B a kináza CDK1. Poslední bod je mezi M fází do G<sub>1</sub> fází [34]. Na konci metafáze dojde k ověření správného připojení chromozomů k dělicímu vřeténku. Proces segregace chromozomů zahrnuje sérii molekulárních dějů, které začínají rozkladem cyklinu B [28, 31].

Při ozáření dochází v buňkách k poškození chromatinu a zástavě buněčného dělení. Během zástavy buněčného cyklu je buňce poskytnut čas na opravu DNA. Tato zástava může být dočasná nebo trvalá, pokud se oprava DNA neprovádí úspěšně (zejména při vyšších dávkách záření). V případě trvalé zástavy cyklu je u buňky vyvolána buněčná smrt [4, 6].

### **2.6.1 Mitóza**

Dělení eukaryotických somatických buněk, při kterém z mateřské buňky vznikají dvě dceřiné buňky s diploidním genomem a stejnou genetickou výbavou. Mitóza se dělí na 4 fáze (Obrázek 7). První fáze mitózy je profáze, během které dochází ke kondenzaci a zkracování chromozomů. Současně se v buňce tvoří dvě dělicí vřeténka na opačných pólech buňky. V průběhu tohoto procesu dochází k zániku jadérka a jaderného obalu (prometafáze) [17, 19]. Po profázi následuje metafáze, během které se zdvojené chromozomy srovnají do středu buňky a vytvoří takzvanou ekvatoriální rovinu. V anafázi se chromatidy oddělují a chromozomy začínají putovat k opačným pólům dělicího vřeténka, k nimž dosáhnou v konečné fázi, telofázi.

Chromozomy na opačných pólech se vrací do původního stavu, dekondenzují a znovu se tvoří jadérko. Dochází k postupné separaci pólů buňky pomocí kontraktálního prstence [4, 17].



Obrázek 7: Buněčný cyklus

Schéma mitózy zobrazující jednotlivé fáze buněčného dělení: interfáze, profáze, metafáze, anafáze, telofáze a cytokineze vedoucí ke vzniku dvou dceřiných buněk [19].

### 2.6.2 Buněčný cyklus po ozáření

Buněčný cyklus u eukaryotních buněk je regulován řadou cyklinů a cyklin-dependentních kináz (CDK). Specifické cykliny a CDK kontrolují průchod buněčného cyklu přes kontrolní body. Restrikční bod buněčného cyklu v G<sub>1</sub> fázi je řízen komplexem CDK4/6 a cykliny typu D, jako je cyklin D1, D2 a D3 [35]. V pozdní fázi G<sub>1</sub> je exprimován cyklin E a s Cdk2 tvoří komplex, který řídí přechod mezi G<sub>1</sub> a S fází [16, 31]. Posledním kontrolním bodem je přechod mezi G<sub>2</sub> a M fází, který je regulován komplexem CDK1, cyklinu A a cyklinu B. Aktivita CDK je u buněčného cyklu regulována řadou mechanismů. První stupeň regulace je vytvoření komplexu s partičním cyklinem. Druhou úrovní regulace CDK jsou posttranslační modifikace CDK, které buď zvýší, nebo sníží aktivitu. Třetí stupeň regulace je vazba inhibičních proteinů na komplexy cyklinů a cyklin-dependentních kináz [16, 28]. Kombinace všech tří stupňů regulace umožňuje adekvátní odpověď na různé podněty, které ovlivňují proliferaci buněk. Zástavu buněčného cyklu jako reakci buňky na genotoxický stres zprostředkovávají checkpoint kinázy [4, 35].

### 2.6.3 Buněčná smrt

Buněčná smrt neboli programovaná smrt buňky, je proces, při kterém buňka umírá specifickým a kontrolovaným způsobem, působením složité kaskády proteolytických enzymů, zvaných kaspázy, aniž by došlo k poškození okolních buněk. Apoptóza je aktivní proces, který spotřebovává ATP a je spojen s expresí specifických genů. Jedná se o postupný a vícestupňový proces, který je také označován jako buněčná sebevražda [17]. Signály k vyvolání buněčné smrti mohou přicházet jak od samotné buňky, tak z okolí, například od imunitního systému. U ozářených buněk je apoptóza vyvolána přítomností neopravitelných chyb v DNA [4, 6].

Ke spuštění programované smrti může dojít skrz receptory smrti stimulované cytoplazmatické membráně, jedná se o vnější dráhu apoptózy nebo z mitochondrií, tady hovoříme o vnitřní cestě [35]. Na signalizaci apoptózy se podílejí i další organely – endoplazmatické retikulum, lysozomy a buněčné jádro. Endoplazmatické retikulum uvolňuje  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu, lysozomy uvolňují lytické enzymy a buněčné jádro aktivuje protein p53, generuje reaktivní kyslíkové radikály a spouští proteinkinázy [28]. V případě poškození DNA hraje klíčovou roli protein p53, fungující jako buněčný „strážce genomu“. Pokud p53 vyhodnotí poškození jako závažné, spouští transkripci proapoptotických proteinů [33]. Tyto proapoptotické proteiny reagují s ostatními nitrobuněčnými signály, jako jsou  $\text{Ca}^{2+}$  a reaktivní kyslíkové radikály, a narušují permeabilitu mitochondriálních membrán. Tímto procesem dochází k bobtnání vnitřní mitochondriální membrány, prasknutí mitochondrií a uvolnění cytochromu c a dalších proteinů do cytoplazmy, čímž je podpořena apoptóza [4, 35]. Dále dochází k aktivaci kaspáz, které v buňce existují jako neaktivní prokaspázy. Vnější dráhou apoptózy aktivují prokaspázy, receptory navazující buněčnou smrt na povrchu buňky, čímž přecházejí do aktivní formy kaspáz. Aktivované kaspázy iniciují proteolytickou degradaci organel a dalších buněčných struktur, čímž spouštějí kaskádu dalších destrukčních enzymů [16, 28]. Tím přechází apoptóza do nevratné neboli ireverzibilní fáze. Fragmentaci podléhá i jaderná DNA a cytoskelet, tím dojde ke scvrkání buňky. Zároveň dojde i ke změně cytoplazmatické membrány, při kterém se na povrch přemístí fosfatidylserin. Fosfatidylserin na povrchu buňky vysílá tzv. eat-me signál, který označuje buňku pro eliminaci imunitním systémem. V konečné fázi se buňka rozpadá na tělíška, která jsou pohlcena makrofágy a buňkami v okolí [16, 35].

Apoptózu lze pozorovat jak při fyziologických, tak při patologických procesech organismu. Během apoptózy se organismus zbavuje nepotřebných buněk, infikovaných buněk i potenciálně škodlivých nádorových buněk, aniž by došlo k poškození okolní tkáně. Nádorové buňky se však apoptóze často vyhýbají a místo toho se nekontrolovatelně množí, což vede k nádorovému bujení [17, 35].

Alternativní cestou buněčné smrti je nekróza, ke které dochází v důsledku působení vnějších škodlivých faktorů, jako je infekce, mechanické či chemické poškození [17]. Hlavní rozdíl mezi apoptózou a nekrózou je že při nekróze se objem buňky zvětšuje, dojde k prasknutí cytoplazmatické membrány a vylití obsahu buňky do okolí [4]. Vylití obsahu buňky naruší funkce okolních buněk a může dojít ke vzniku zánětu. Nekróze podléhají buňky vystavené vysokým dávkám ionizujícího záření, které kromě poškození DNA poškodí i proteiny, a to

velmi závažným způsobem, protože proteiny se v buňce vyskytují v mnoha kopiích a jejich poškození je do jisté míry tolerováno [16, 4, 35].

### 3 BIOLOGICKÁ DOZIMETRIE

I přes negativní dopady, které má ionizující záření na lidský organismus, nám poskytuje mnoho významných přínosů. Jeho využití je široké a ovlivňuje mnoho aspektů lidské činnosti, zejména v oblastech zemědělství, průmyslu, medicíny a vědeckého výzkumu [16, 35]. Výzkum v oblasti radiobiologie a radiační ochrany neustále posunuje hranice poznání o interakcích ionizujícího záření s lidskými tkáněmi a pomáhá vyvíjet účinnější a bezpečnější metody využití ionizujícího záření v lékařství i v průmyslu [1, 7, 11]. Nicméně, s narůstajícím počtem rutinních klinických procedur, které zahrnují expozici ionizujícímu záření, je nezbytné pečlivě sledovat a omezovat rizika spojená s touto expozicí a zajistit bezpečnost a ochranu zdraví jednotlivců. Přestože většina radiačních poškození za posledních 50 let byly klasifikovány jako nehody, mělo by lidstvo být připraveno na možné teroristické zneužití ionizujícího záření nebo na zneužití jaderné energie [1, 16, 8].

Další organizace na mezinárodní úrovni je Mezinárodní komise radiologické ochrany (International Commission on Radiological Protection = ICRP) [36, 37]. Její založení bylo přijato na druhém mezinárodním radiologickém kongresu roku 1928. Tato organizace byla založena z důvodu rostoucích obav obyvatelstva z účinků ionizujícího záření pozorovaných v lékařské komunitě. ICRP z počátku publikovalo doporučení a rady ohledně radiační ochrany jako referáty ve vědeckých časopisech v oblasti medicíny a fyziky. Mezinárodní komise radiologické ochrany je nezávislou organizací, která poskytuje veřejnosti prospěch z vědy o ochraně proti ionizujícímu záření, a to jak poskytováním doporučení, tak i pokynů pro účinnou radiační ochranu. Jedná se o neziskovou organizaci. ICRP je komunita světově uznávaných odborníků v oboru radiační ochrany pocházejících z více než 30 zemí světa [37]. Struktura ICRP je tvořena hlavní komisí a vědeckým sekretariátem a čtyřmi výbory zabývajícími se dávkami záření, efekty záření, medicínou a aplikací záření. Jak už bylo zmíněno ICRP vydává doporučení v radiační ochraně ale odpovědnost za zpracování a stanovení konkrétních opatření a předpisů spadá na jednotlivé orgány radiační ochrany v každém státě samostatně. Za dobu svého působení vydala mezinárodní komise více než sto publikací týkajících se různých aspektů radiační ochrany. Mimo publikace ICRP vydává základní doporučení, která popisují systém radiační ochrany jako celek [37, 38].

Systém radiační ochrany České republiky zahrnuje provoz Radiační monitorovací sítě (RMS), kterou zřizuje Státní úřad pro jadernou bezpečnost (SÚJB). Ministerstvo zdravotnictví ve

spolupráci se SÚJB a Českou společností fyziků v medicíně vydává Národní radiologické standardy, jež slouží jako doporučené návody pro zavádění radiologických postupů na jednotlivých pracovištích. SÚJB je nezávislým ústředním orgánem státní správy a dozoru pro mírové využití jaderné energie a ionizujícího záření; jeho předsedu volí vláda České republiky [8, 10, 39].

Státní ústav radiační ochrany (SÚRO) je výzkumná instituce zaměřená na radiační ochranu v České republice. Jejím hlavním úkolem je zajištění činnosti radiační monitorovací sítě, která zahrnuje přibližně 50 kontinuálně měřících míst a dalších 184 měřících bodů, provádějících měření v čtvrtletních intervalech. SÚRO rovněž odpovídá za odbornou činnost, včetně analýzy mimořádných událostí a radiačních nehod. Kromě toho vede centrální databázi budov s vysokou koncentrací radonu v ovzduší a vyhledává tato riziková místa. V oblasti lékařských ozáření ústav zajišťuje nezávislé ověření zdrojů ionizujícího záření v rámci státního dozoru a vytváří metodiky a doporučení pro pracovníky. SÚRO také pořádá kurzy a zkoušky zaměřené na radiační ochranu [40].

Další organizace, jejichž cílem je výzkum a ochrana před ionizujícím zářením a také vzdělání v oboru radiologie fungují i v nadnárodním, a i celosvětovém měřítku.

Mezi takové organizace patří Mezinárodní agentury pro atomovou energii (IAEA, International Atomic Energy Agency,). Statut IAEA byl jednomyslně přijat zástupci 81 států roku 1956 během konference o statutu IAEA. Zřízení této organizace navrhl americký prezident Dwight D. Eisenhower roku 1953 na začátku svého funkčního období [8, 35]. Podmět pro vznik této instituce byly obavy a očekávání celého světa z využívání atomové energie. Česká republika se stala členem organizace IAEA roku 1993. IAEA organizace sídlí ve Vídni v Rakousku. Má také dvě regionální kanceláře, jednu v Torontu v Kanadě a druhou v Tokiu v Japonsku. Také dvě styčné kanceláře, jednu v New Yorku ve Spojených státech amerických a druhou v Ženevě ve Švýcarsku [10, 37]. IAEA provozuje specializované laboratoře pro jadernou technologii ve Vídni, Seiberdorfu a v Monaku. Portál IAEA NUCLEUS poskytuje přístup k více než stům vědeckým, technickým a regulačním zdrojům, včetně databází, aplikací, publikací a školicích materiálů. IAEA pořádá vědecké konference a vzdělávací akce [35, 10].

V případech, kdy není možné použít fyzikální nebo chemické metody pro měření dávky ionizujícího záření, například při podezření na radiační expozici nebo v situacích, kdy nejsou k dispozici standardní dozimetrické nástroje, se stále často uchylujeme k biologickým

metodám. Tyto metody využívají reakce živých organismů na radiační poškození a mohou poskytnout odhady o míře expozice na základě změn v buňkách nebo tkáních [35]. Tyto parametry zahrnují změny v krevním obrazu, výskyt chromozomových aberací, vznik mikrojader a další genetické indikátory poškození. Při vyhodnocování těchto parametrů je důležité znát jejich vztah k dávce záření, stejně jako k časovému intervalu od expozice [16, 11]. Jinými slovy, abychom mohli odhadnout dávku na základě těchto biologických markerů, potřebujeme znát, jak se mění v reakci na různé úrovně expozice a jak dlouho po expozici jsou tyto změny pozorovatelné. Kalibrace těchto biologických metod je klíčová pro přesné určení dávky ionizujícího záření [11, 35].

Biologická dozimetrie představuje klíčový nástroj pro posouzení expozice jednotlivců ionizujícímu záření a potenciálních biologických účinků této expozice na jejich organismus. Jedním z hlavních cílů této disciplíny je poskytnout spolehlivé informace o úrovni expozice, které mohou sloužit k určení dalších kroků v léčbě, monitorování a ochraně zdraví jednotlivců v rizikových pracovních prostředích [16, 4].

Metody biologické dozimetrie zahrnují analýzu biologických materiálů, jako jsou krevní vzorky nebo buňky, za účelem identifikace a kvantifikace poškození způsobeného zářením. Moderní technologie, jako jsou biodozimetrické metody založené na analýze buněčného genomu nebo biomarkerů expozice, přinášejí nové možnosti pro přesné a citlivé měření účinků ionizujícího záření [7, 11]. Pomocí metod biologické dozimetrie můžeme lépe porozumět účinkům záření na lidské buňky i organismus jako celek, což napomáhá při vytváření účinných strategií pro minimalizaci rizik spojených s expozicí ionizujícímu záření a zlepšení ochrany lidského zdraví [4, 7].

Při podezření na vystavení osob ionizujícímu záření se vyšetření provádí pomocí biodozimetrických metod. Změny v chromozomech umožňují detekci míry expozice. Byla prokázána souvislost mezi zvýšenou hladinou chromozomálních aberací po expozici genotoxickým faktorům a zvýšeným rizikem vzniku rakoviny [35]. Existuje celá řada biodozimetrických metod, jejichž výběr závisí na okolnostech dané situace – například na počtu ozářených osob, laboratorních podmínkách, senzitivnosti metody a časovém intervalu od expozice. Podle těchto podmínek volíme nejvhodnější metodu z dostupných biodozimetrických postupů [4, 7].

### 3.1 Metody biologické dozimetrie

Biodozimetrické metody představují klíčový nástroj v oblasti biologické dozimetrie, který umožňuje měřit a hodnotit expozici jednotlivců ionizujícímu záření na základě biologických ukazatelů [7]. Tyto metody se liší v závislosti na způsobu odběru vzorků a typu analýzy použité k detekci a kvantifikaci poškození způsobeného zářením. Mezi nejčastěji používané biodozimetrické metody patří cytogenetická analýza, analýza biomarkerů expozice a biofyzikální metody [35]. Každá z těchto metod má své vlastní výhody a omezení, a společně poskytují komplexní obraz expozice ionizujícímu záření a jeho možných biologických účinků na organismus [41].

Cytogenetické metody jsou v současnosti stavebním kamenem biodozimetrie, které se uplatňují zejména v případě, kdy není fyzikální dozimetr k dispozici nebo kdy se nedá použít [7]. Cytogenetické metody se tedy stávají jedinou dostupnou metodou k odhadu expozice dávky ionizujícího záření [35]. Cytogenetické metody hodnotí chromozomové aberace, jak kvalitativně, tak kvantitativně. Hodnoty z kvantitativní analýzy jsou vztaženy k absorbované referenční dávce dané kalibrační křivky. Tato kalibrační křivka je zkonstruována na základě expozice lymfocytů periferní krve *in vitro* dané kvalitě ionizujícího záření [7, 11]. Zralé lymfocyty jsou z pohledu radiobiologie považovány za nejvhodnější indikátor celotělové expozice zářením [11]. Z hlediska přesnosti detekce je důležité znát míru stability měřených parametrů. Cytogenetické aberace se proto dělí na nestabilní a stabilní. Nestabilní aberace jsou postupem času z organismu eliminovány. Mezi tyto aberace patří dicentrické a vícecetrické chromozomy. Stabilní aberace nejsou postupem času eliminovány, nebo je jejich eliminace velmi pomalá. Typickým příkladem stabilních aberací jsou translokace [7, 41].

#### 3.1.1 Analýza dicentrických chromozomů (DCA)

Dicentrický chromozom vzniká spojením dvou chromozomálních fragmentů, z nichž každý obsahuje jednu centromeru, čímž vzniká chromozom se dvěma centromerami. Zbylé části chromozomů lze detekovat v buněčném jádru. Při vyšších dávkách záření mohou podobným mechanismem vznikat také tricentrické nebo kvadricentrické chromozomy. V případě velmi vysoké expozice může dojít ke vzniku kruhového (ring) chromozomu [17, 35].

Dicentrické chromozomy představují hlavní typ chromozomových aberací sledovaných v biodozimetrii. Analýza dicentrických chromozomů (DCA) je považována za zlatý standard

v radiobiologii [11]. Její výhodou je vysoká specifita a schopnost spolehlivě odhadnout dávku obdrženého záření i několik měsíců po ozáření. Tato metoda je vhodná pro zpětný odhad nízkých dávek v řádu kolem 100 mGy, které mohou vést ke stochastickým onemocněním, jako je leukémie. Zároveň umožňuje přesné stanovení vyšších dávek nad 1 Gy, které mohou způsobit deterministické účinky, jenž se mohou projevit až po týdnech či měsících od expozice ionizujícímu záření [7, 42].

Spolehlivost a přesnost metody byla doložena dobrou korelací s absorbovanou dávkou měřenou pomocí fyzikálních metod. Počet dicentrických chromozomů v buňkách s časem klesá; byly zaznamenány rozdíly mezi daty získanými ihned po ozáření a daty získanými s ročním odstupem [4, 11, 35]. Pro tyto případy existují matematické modely a kalibrační křivky umožňující odhad dávky i v delším časovém horizontu. Mikroskopické vyhodnocování dicentrických chromozomů je však časově náročné – analýza přibližně 500 lymfocytů zabere jednomu člověku zhruba 8 hodin. V případě hromadných radiačních nehod by proto tato metoda byla bez automatizace analýzy prakticky nepoužitelná. [8, 43].

Tato metoda je zlatým standardem biodozimetrie. Patří mezi nejvhodnější a nejpoužívanější metody díky své specifitě, citlivosti a spolehlivosti. Frekvence dicentrických chromozomů je uznávána jako spolehlivý indikátor absorbované dávky [44, 45]. Výskyt všech typů chromozomálních aberací je dávkově závislý, přičemž DCA hodnotí pouze přítomnost dicentrických chromozomů. Výskyt ring chromozomů je méně častý, což při vyhodnocování vyžaduje vyšší počet analyzovaných buněk, a analýza je tak časově i finančně náročnější. Výskyt fragmentů chromozomů je srovnatelný s výskytem dicentrických chromozomů, jejich hodnocení je však zatíženo rizikem falešné interpretace buněčných struktur [46].

Metodu DCA provází řada omezení. K hlavním limitacím metody patří:

- **Laboratorní zázemí a rychlost analýzy:** Pro spolehlivé provedení analýzy je nezbytné adekvátní laboratorní vybavení, vyškolený personál a dodržení standardních postupů, což může ovlivnit časovou náročnost a přesnost výsledků [11, 19].
- **Nestabilita dicentrických chromozomů:** Dicentrické chromozomy jsou nestabilní strukturou, což znamená, že mohou být postupně eliminovány z populace buněk, což komplikuje analýzu v dlouhodobém horizontu [16].
- **Mitotický index:** Mitotický index, tedy podíl buněk vstupujících do mitózy, ovlivňuje schopnost detekovat dicentrické chromozomy. V buňkách s nízkým mitotickým indexem může být obtížnější identifikovat dostatečný počet mitotických buněk pro spolehlivou analýzu [1, 4].
- **Expozice vysokým dávkám ionizujícího záření:** Při expozici vysokým dávkám ionizujícího záření může být výskyt dicentrických chromozomů nápadně vyšší, ale rovněž může vést k zástavě buněčného dělení nebo buněčné smrti, což komplikuje kultivaci lymfocytů a omezí výtěžnost počtu mitotických buněk pro vyhodnocení [1].
- **Parciální a nehomogenní ozáření:** Při parciálním nebo nehomogenním ozáření není každá buňka vystavena stejné dávce záření, což může vést k vyšší variabilitě výsledků a znesnadňuje interpretaci frekvence aberací. Tato variabilita může maskovat vztah mezi dávkou a odpovědí [11].

Požadavky na laboratorní zázemí a nutnost vhodných podmínek, spolu s časovou prodlevou mezi získáním vzorku a získáním výsledků analýzy, činí z metody DCA méně vhodnou pro polní využití a pro situace, kdy je třeba analyzovat velký objem vzorků. První výsledky analýzy jsou obvykle dostupné až po třetím dni od získání vzorků, což zpožďuje rychlé rozhodování v krizových situacích, jako jsou například hromadné nehodové události nebo akutní radiologické incidenty. Tento časový faktor je jedním z důvodů, proč je DCA spíše metodou pro podrobné následné vyhodnocení než pro okamžité monitorování v terénu [46].

V současné době je možná automatizace téměř všech kroků, čímž dojde k zrychlení jednotlivých metodických kroků, ale urychlení kultivací a inkubací zatím není možné. K 48hodinové kultivaci je přičteno minimálně 24 hodin na zpracování vzorků, včetně finálního

kroku odečítání výsledků [46, 43]. Dicentrické chromozomy patří mezi nestabilní chromozomové aberace. Dicentrické chromozomy vykazují exponenciální pokles v čase způsobený buněčným obratem. Pokud dojde k odběru po několika týdnech po expozici je nutná korelace [11]. Optimální časové okno pro odběr vzorku k analýze dicentrických chromozomů je co nejdříve po expozici, ideálně během prvních 24 až 48 hodin, nejpozději však do 6 týdnů. Po překročení této doby může být frekvence dicentrických chromozomů podhodnocena v důsledku jejich nestability a postupné ztráty při buněčných děleních. Přesto lze výsledky upravit pomocí korekčních faktorů, které zohledňují časový odstup od expozice [47].

Při metodě DCA se hodnotí pouze malá část buněk, které jsou při zpracování vzorků v mitóze. Procento buněk zastavených v mitóze k celkovému počtu buněk je definováno jako mitotický index (MI) [11, 45]. Tento index se během DCA pohybuje kolem 3–8 %. Kalibrační křivky jsou vytvářeny *in vitro* expozicí lidských lymfocytů [6, 41, 44]. Dávky odhadnuté pomocí *in vitro* konstruované kalibrační křivky mohou být ve skutečnosti podhodnocené. *In vivo* křivky od pacientů s maligními nádory se postupem času stávají velmi důležité pro biodozimetrii a v budoucnu může pravděpodobně dojít k nahrazení *in vitro* konstruovaných křivek právě kalibračními křivky [11, 44].

### 3.1.2 Mikrojaderný test (CBMN)

Tato metoda byla vyvinuta Fenechem a Morleym v roce 1985. Principem testu je detekce malých acentrických chromozomálních fragmentů, které zůstanou během buněčného dělení mimo jádro [4]. Mikrojaderný test spočívá v pozorování fragmentovaného jaderného materiálu, tzv. mikrojadra, které vznikají působením genotoxických faktorů [4, 35].

Mikrojádra jsou morfologicky stejná, ale mnohem menší než hlavní buněčná jádra. Mikrojádra se objevují u stimulovaných lymfocytů k mitóze. Jejich počítání je jednodušší a rychlejší než vyhodnocování jiných testů [7, 11]. Výsledky tohoto testu se vyjadřují jako procento BN s mikrojádry nebo jako průměrný počet mikrojadra na BN. Byla navržena řada modifikací, z nichž jednou je automatizace pomocí analýzy obrazu, která umožňuje počítání mikrojadra v řádu tisíců buněk namísto stovek, čímž se zajistí vyšší statistická spolehlivost naměřených dat [46, 48]. Další modifikací je počítání mikrojadra pomocí průtokového cytometru namísto vyhodnocování pod fluorescenčním mikroskopem, což podstatně zvýší množství počítaných buněk [49].

U metody mikrojader se většinou používají barviva, jako 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), akridinová oranž nebo Giemsovo barvení. Mikrojádra mohou sloužit jako nepřímé indikátory chromozomálního poškození. Detekce mikrojader na rozdíl od jiných metod nevyžaduje vyškolený personál a je mnohem rychlejší [7, 11].

Při vyhodnocování mikrojader se postupuje podle několika kritérií. Hodnotí se velikost mikrojader, které jsou v rozmezí od 1/16 do 1/3 velikosti jádra buňky [4]. Části pod spodním rozmezím jsou obvykle artefakty, zatímco u větších objektů se může jednat o druhé dceřiné jádro. Dalším kritériem je pás cytoplazmy mezi mikrojádrém a buněčným jádrem. Pokud není možné rozlišit cytoplazmatický pás mezi jádrem a možným mikrojádrém, může se jednat pouze o výchlípek jaderné membrány [4, 7, 45]. Dalším kritériem je barvitelnost mikrojádra. Při odlišné barvitelnosti může dojít k záměně mikrojádra za fagosom [35, 45].

#### Mechanismus vzniku mikrojader

Jak bylo zmíněno výše, mikrojádra jsou mimojaderná tělíška, která vznikají v dělicích buňkách z acentrických fragmentů anebo celých chromozomů nebo chromatid, které zaostávají v anafázi buněčného dělení a nejsou součástí dceřiných jader v telofázi [35, 45]. Mikrojádra, která obsahují fragmenty chromozomů, mohou vznikat z přímého zlomu DSB DNA, konverze SSB DNA na DSB DNA po replikaci buňky nebo po inhibici syntézy DNA. Špatná oprava DSB může vést k asymetrickému uspořádání chromozomů za vzniku dicentrického chromozomu a acentrického fragmentu [4, 45]. Centromery dicentrických chromozomů jsou přitahovány často k opačným pólům buněk v anafázi buněčného dělení. Tento jev tak vytváří nukleoplazmatický můstek (NPB) mezi dvěma dceřinými jádry dělicí buňky a ze zaostávajícího acentrického fragmentu tak vzniká mikrojádro (MN) [8, 11, 45].

Mikrojádra obsahující celé chromozomy primárně vznikají v důsledku defektů v mechanismu segregace chromozomů. Tyto defekty mohou být způsobeny nedostatkem genů řídících buněčný cyklus, selháním dělicího vřeténka, poruchami proteinů kinetochoru, selháním jiných částí dělicího aparátu, poškozením chromozomových substruktur, mechanickým narušením nebo hypomethylací centromerické DNA [6, 17].

Osud mikrojader po jejich vytvoření v průběhu mitotického dělení může být různý. Buňka s mikrojádrém může být eliminována prostřednictvím apoptózy. Další možností je vypuzení

mikrojádra z buňky, pokud je jeho DNA vyhodnocena jako nefunkční nebo neschopná replikace [7, 35, 45].

Standardní *in vitro* mikrojaderný test (CBMN, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay) se obvykle provádí na lidských lymfocytech za pomoci cytochalasinu B, avšak tento test je možné přizpůsobit i různým buněčným liniím různého původu. V běžném postupu se k lidským lymfocytům přidává fytohemaglutinin jako kultivační médium, které stimuluje buňky k mitóze [8, 44, 45]. Po 44 hodinách kultivace se do kultur přidává cytochalasin B, což je inhibitor polymerace aktinu. Ten zablokuje cytokinezi, což umožní rozlišení mezi dvoujadernými buňkami (ty, které se během kultivace rozdělily) a mononukleárními buňkami [50]. Po 72 hodinách jsou buňky obarveny a přeneseny na mikroskopická sklíčka [11, 44].

Klíčovou výhodou CBMN testu je jeho schopnost detekovat jak klastogenní, tak aneugenní jevy, které vedou ke strukturním a numerickým aberacím chromozomů. Rozlišení mezi těmito dvěma typy poškození je možné i při nízkých dávkách expozice mutagenům [11, 51]. Citlivost CBMN testu po expozici ionizujícímu záření činí přibližně 0,2 Gy pro detekci mikrojadra (zahrnujících klastogenní i aneugenní jevy) a 0,1 Gy při použití pancentromerické FISH metody, která detekuje výhradně klastogenní poškození [7, 44].

CBMN test slouží jako citlivý indikátor chromozomálního poškození a svou citlivostí se minimálně vyrovná klasické chromozomové analýze metafázi. Ve srovnání s metodou DCA je vyhodnocování mikrojadra jednodušší, méně časově náročné a nevyžaduje rozsáhlé zaškolení personálu. Významnou výhodou CBMN testu je jeho vysoká statistická síla, která vychází z možnosti hodnotit větší počet buněk [44]. Dosažení vysokého počtu těchto buněk umožňuje blokace buněčného cyklu ve fázi cytokineze pomocí cytochalasinu B po dobu přibližně 48 hodin. Automatizace skórování mikrojadra dále zvyšuje objektivitu a reprodukovatelnost testu spolehlivost testu a přispívá k minimalizaci interindividuálních rozdílů při hodnocení chromozomálního poškození [46, 48].

### **3.1.3 Analýza $\gamma$ H2AX**

Dalším přístupem biologické dozimetrie je identifikace a sledování biomarkerů, především proteinů, které se aktivují v rané fázi buněčné odpovědi na expozici ionizujícímu záření. Jednou z nejrychlejších reakcí na vznik DSB DNA je fosforylace histonového proteinu H2AX [35, 42, 52]. Již několik sekund po expozici dochází k fosforylaci H2AX na serinovém zbytku v jeho

C-terminálním konci, čímž vzniká aktivovaná forma označovaná jako  $\gamma$ H2AX [8]. Za tuto fosforylaci jsou zodpovědné především tři kinázy: Ataxia telangiectasia mutated (ATM), DNA-dependentní protein kináza (DNA-PK) a Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) [35, 53]. ATM kináza je považována za hlavního iniciátora fosforylace H2AX při vzniku DSB DNA. ATR kináza reaguje primárně na SSB, zatímco DNA-PK se uplatňuje při reparačních procesech DSB, zejména v procesu nehomologního spojení konců DNA (NHEJ). Na odpovědi buňky na poškození DNA ionizujícím zářením se však podílí všechny tři kinázy [8, 53].

Počet molekul, které projdou fosforylací, lineárně roste se závažností poškození DNA. K nejvyšší tvorbě fosforylovaných molekul dochází přibližně 30 minut po expozici, poté jejich množství postupně klesá v důsledku aktivace buněčných reparačních mechanismů, které se snaží opravit vzniklé dvojité zlomy a obnovit původní strukturu DNA [13]. Díky této dynamice je analýza fosforylovaného proteinu  $\gamma$ H2AX považována za velmi užitečnou biodozimetrickou metodu. Umožňuje rychlou kategorizaci radiační dávky, zejména v mimořádných situacích. Tvorba  $\gamma$ H2AX představuje citlivou a rychlou odpověď na přítomnost DSB DNA. Je však důležité poznamenat, že vznik  $\gamma$ H2AX není výlučně spojen s poškozením způsobeným ionizujícím zářením – dochází k němu také během buněčného dělení nebo v průběhu apoptózy [8, 42]. Ložiska  $\gamma$ H2AX lze vizualizovat pomocí imunofluorescenčního barvení s vysoce specifickou protilátkou, která rozlišuje mezi nefosforylovanou H2AX a její fosforylovanou formou  $\gamma$ H2AX. Ke kvantitativnímu vyhodnocení se využívají metody jako fluorescenční mikroskopie kombinovaná s digitální obrazovou analýzou, průtoková cytometrie nebo western blot [53].

Mikroskopická metoda stanovení  $\gamma$ H2AX je stále považována za citlivou metodu, ale je velmi časově náročná a může být snadno ovlivněna subjektivní interpretací hodnotícího pracovníka [8, 7]. Tento problém, který ztěžuje reprodukovatelnost výsledků, vedl k vývoji řady programů pro automatickou nebo poloautomatickou kvantifikaci. Mezi tyto programy patří FindFoci, AutoFoci, CellProfiler a FociCounter, přičemž poslední zmíněné programy jsou víceúčelové, na rozdíl od předchozích dvou [52, 53]. Automatické odečítání ložisek  $\gamma$ H2AX může být obtížné vzhledem k nepravidelnosti a morfologii ložisek, která se při vysokých dávkách mohou překrývat [8, 53].

Analýza pomocí průtokové cytometrie nestanovuje počty ložisek  $\gamma$ H2AX, ale měří intenzitu fluorescence. Průtoková cytometrie (FC –  $\gamma$ H2AX) je jednoduchá a rychlá analýza, která

umožňuje stanovení vzorků, které není třeba dál upravovat po obarvení [13, 53]. Intenzita fluorescence je lineárně závislá na dávce obdrženého záření. FC –  $\gamma$ H2AX má nevýhodu oproti fluorescenční mikroskopii a tou je citlivost této metody. V oblasti nízkých dávek mohou do pozadí vyhodnocení vstoupit nepoškozené buňky. Publikace uvádí že analýza pomocí FC –  $\gamma$ H2AX je možná až od dávek 0,3 Gy jiné publikace uvádějí že dokonce až od 0,5 Gy [53].

### 3.1.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Tato metoda detekuje stabilní translokace. Používá se k analýze chromozomálních odchylek v mitotických buňkách, a i v nedělících se i v nedělících se buňkách v interfázi za použití DNA sond pro specifické chromozomové struktury [7, 44]. Podstatou této metody je hybridizace neradioaktivně značených DNA sond ke komplementárním úsekům cílové DNA chromozomů nebo buněčných jader v interfázi fixovaných na mikroskopickém preparátu [35]. Následná vizualizace a analýza se provádí pomocí fluorescenčních signálů pod fluorescenčním mikroskopem. SONDY jsou značeny buď přímo fluorochromy nebo nepřímo biotinem nebo digoxigeninem. V současné době se používají spíše přímo značené sondy [4, 44].

Identifikace fluorescenčního signálu je možná přímo pomocí fluorescenčního mikroskopu, citlivější je však analýza z mikroskopu vybaveného kamerou napojenou na počítač se speciálním programem používanou pro FISH metodu [8, 44]. Citlivost metody se tímto přístupem zvýší i o několik řádů. Obraz získaný na monitoru je kvalitnější než při sledování pouhým okem, navíc počítačový program dovoluje další úpravy obrazu [11, 35]. Počítačová analýza obrazů navíc umožňuje kvantitativní zpracování získaných dat, měření vzdáleností jednotlivých signálů a vytváření jednoho obrazu z více záznamů [11, 53].

Různé varianty FISH metody využívají možnost barevného rozlišení jednotlivých párů chromozomů. U multiplexové FISH metody jde o hybridizaci rozdílně značených sond s konkrétními chromozomy. Při multiplex metodě se používá směs DNA sond složených z velkého počtu fluorescenčně značených fragmentů chromozomů [4, 44]. Po hybridizaci fluoreskuje celý chromozom. Při značení specifickými sondami více než jedním fluoroforem je možné definovat celý karyotyp. Metoda je vhodná pro určení původu markerových chromozomů. Nevýhodou metody je nemožnost detekce intrachromozomových aberací [8, 45].

### 3.1.5 Předčasná kondenzace chromozomů (PCC)

Předčasná kondenzace chromozomů (Premature Chromosome Condensation, PCC) je metoda, která umožňuje pozorování chromozomů bez vyvolání kompletního procesu dělení buňky [17, 35]. Nedochozí zde k inkubaci lymfocytů a výsledek je k dispozici během 3 až 4 hodin. Poté co buňka vstoupí do mitózy, dojde ke kondenzaci chromatinu do chromozomů. PCC je metoda, která způsobuje kondenzaci chromatinu ještě před vstupem buňky do mitózy, proto ten název předčasná nebo předčasná kondenzace chromozomů [54]. Tato metoda se volí z důvodů, že ozářené buňky mohou být poškozeny až do té míry, že se ani při použití mitotických stimulantů do mitózy už nemůže dostat. PCC metoda se využívá pro detekci vysokých dávek ionizujícího záření. Rozlišujeme tři metodické postupy PCC: fúzní PCC, chemicky indikovaná PCC a rychlá analýza aberací interfázních chromozomů [35, 54].

### 3.1.6 Nové trendy v biodozimetrii

Nebezpečí havárií a zneužití jaderných zbraní v současnosti klade důraz na biologickou dozimetrii. V případě hromadné expozice velké části populace IZ případně důležitá úloha selekce ozářených a neozářených jedinců biologickým testům [55]. Tyto testy však doposud stíhají určité problémy. Mezi tyto komplikace patří časová náročnost, nízká senzitivita, výrazný pokles signálu s časem po ozáření nebo neschopnost zpracování vysokého kvanta vzorků v případě hromadných expozic. Pro tyto problémy jsou nezbytné účinnější a pokročilejší testovací metody založené na biomarkerech, jejichž kvalitativní změny umožní stanovit časovou intenzitu a interval od ozáření [42, 55]. Velké úsilí je věnováno k nalezení optimálních biomarkerů, které mohou poskytovat informace o efektivní dávce. Ideální radiační biomarker by měl poskytovat informace o obdržené dávce a měl by být nezávislý na enviromentální faktorech a dalších faktorech jako je kouření, léky, věk a podobně. Takový biomarker doposud není znám, ale již existují způsoby zpětného odhadu dávky spojením několika genetických a metabolických biomarkerů [35]. K těmto biomarkerům lze přidat i proteomické biomarkery krevní plazmy, které lze pozorovat po obdržení vysokých dávek v relativně krátkém čase po expozici [55].

#### Metabolomika v biologické dozimetrii

Metabolomika je rozvíjející se obor, jehož cílem je charakteristika změn koncentrací všech malých molekul ve vzorku. Mezi vzorky ideální pro analýzu metabolitů patří moč, krev, sliny,

plazma a podkožní tuk [42]. Aplikace nových metabolických technologií umožňuje hlubší pochopení v oblasti jako je toxikologie, fyziologie, a i proces vzniku onemocnění [42, 55]. Metabolomika navrhuje v současnosti relativní kvantitativní analýzu tisíců různých metabolitů ve vzorku pomocí citlivých a specifických metod jako je LC (kapalná chromatografie) nebo GC (plynová chromatografie) ve spojení MS (hmotnostním spektrometrem) [42]. IZ spouští složitou síť molekulárních a buněčných reakcí, které ovlivňují metabolické procesy. Tyto metabolity jsou potenciální biomarkery ideální pro radiační biologickou dozimetrii [35].

Biomarkery jsou biologické charakteristiky, které lze objektivně měřit a vyhodnocovat jako indikátory biologické odpovědi na expozici záření. Biomarkery, které mohou pomoci identifikovat exponované jedince, jsou kriticky důležité v případě hromadných expozicích [35]. Mezi biomarkery patří polyamidy jako je putrescin, spermidin a spermin. Jsou to alifatické polykationty přítomné ve všech buňkách, kde se váží na DNA, RNA a proteiny. Jsou organické polykationty s nízkou molekulovou hmotností, které zprostředkovávají důležité biologické procesy [55]. Polykationtová povaha polyaminů je důležitá pro jejich biologickou aktivitu a *in vivo* interakci s ostatními druhy molekul, jako jsou polyaniontové nukleové kyseliny a proteiny. Funkce polyaminů je jejich role v buněčném metabolismu, buněčné proliferaci a buněčné diferenciaci [35, 55].

#### Dozimetrie elektronovou paramagnetickou rezonancí (EPR)

Zubní dozimetrie za pomoci elektronové paramagnetické rezonance je velmi slibná metoda pro stanovení radiační dávky. V prvních počátcích této metody byla měření prováděna na izolovaných zubech, které se obvykle získaly přirozenou cestou (vypadnutí zubu) ale je znám i případ kdy byly zuby aktivně extrahovány [42, 49]. Možnost provést měření *in vivo* přímo v ústech pacienta je velmi atraktivní a náročný úkol. Je zde mnoho faktorů, které mohou ovlivnit měření. Také je zde nutné použít méně citlivé nízkofrekvenční EPR spektrometry než u *in vitro* metody [49, 56].

EPR měří radiačně indukované signály (RIS) ve vzorcích nehtů nebo zubů po expozici záření. Tyto signály jsou velmi stabilní a lze je považovat za optimální kandidáty pro využití v biologické dozimetrii. Využití zubní tkáně *in vivo* zvyšuje přesnost odhadu absorbované dávky zasaženého organismu. Tento fakt by mohl vést k využití této metody k třídění velkého počtu obětí při velkých radiačních expozicích [42, 49].

### 3.1.7 Zobrazovací systémy

#### Klasická mikroskopie

Klasická mikroskopie je vědecká disciplína, která se zabývá pozorováním a měřením malých předmětů pomocí zvětšovací techniky. Optické schéma běžného mikroskopu se skládá ze dvou optických prvků z objektivu a okuláru umístěných ve vzájemné konstantní vzdálenosti v takzvaném optickém intervalu. Mechanická konstrukce uspořádání mikroskopu je ovlivněna především typem vzorku, pro který je mikroskop určen a způsobem jeho osvětlení. Krom klasických mikroskopů, kdy je vzorek upevněn klasicky dole tak se vyrábí i invertované mikroskopy kdy je vzorek přikládán shora [4, 6].

V biologické dozimetrii se stále v laboratoři pro rutinní testování používá světelný mikroskop, který bývá někdy spojený s CCD kamerou. Při mikroskopické analýze je cytogenetická biodozimetrie velmi přesná metoda pro poskytnutí informace o obdržené dávce při malém počtu obětí. Vzhledem k náročnosti těchto testů v jejich základní formě, když jsou založené na mikroskopické analýze, se nehodí pro hromadnou expozici [35].

#### Zobrazovací průtokový cytometr

Zobrazovací průtokový cytometr (IFC) je nová technologie, která automaticky zobrazuje a analyzuje zpracované vzorky krve na markery radiačního poškození [8]. Používané biodozimetrické techniky založené na mikroskopu lze modifikovat pro použití IFC a změnit tak klasickou časově náročnou biodozimetrii na vysoce výkonnou biologickou dozimetrii. V minulosti proběhlo několik pokusů o to, jak přizpůsobit klasické biodozimetrické testy tradiční průtokové cytometrii. Pro přizpůsobení DCA byly vyvinuty nové metody pro přípravy vzorků, ve kterých byly chromozomy a centromery chromozomů fluorescenčně značeny [52, 49].

S novou technologií jako je zobrazovací průtokový cytometr je nyní možné řešit nevýhody tradiční průtokové cytometrie. Citlivost tradiční průtokové cytometrie nebyla dostatečná ke spolehlivé detekci k rozpoznání mezi mono a dicentrických chromozomů nebo k odlišení dicentrických chromozomů od chromozomových zbytků [8, 35]. Naproti tomu tradiční průtoková cytometrie zvyšuje propustnost mikronukleárního testu ve srovnání s klasickou mikroskopickou vyhodnocovací metodou. Jednou z hlavních nevýhod je že buňky vyžadují lýzu před samotnou analýzou, aby došlo k uvolnění jader a mikrojadern. Tímto postupem se

eliminuje možnost analýzy binukleárních buněk, jak je požadováno pro CBMN test pro kontrolu proliferace [53]. Další nevýhodou klasické průtokové cytometrie u mikrojaderného testu je stejně jako u analýzy DCA neschopnost odlišit MN od trosek a apoptotických těl od mrtvých nebo odumírajících buněk [35, 53].

Ze tří nejpoužívanějších testů v biodozimetrické analýze (analýza dicentrických chromozomů, CBMN a analýza  $\gamma$ H2AX) je nejsnáze adaptibilní test pro průtokovou cytometrii test  $\gamma$ H2AX. Zatímco se fluorescenčně značená ložiska  $\gamma$ H2AX hodnotí mikroskopicky, za pomoci průtokové cytometrie se měří relativní intenzita fluorescence signálu  $\gamma$ H2AX namísto počtu skórovaných ložisek [53]. Existuje řada omezení metody průtokové cytometrie  $\gamma$ H2AX jako je snížená citlivost, kdy malé změny signálu jsou hůře rozpoznatelné. Relativní exprese  $\gamma$ H2AX se ukázala jako užitečný a spolehlivý indikátor radiačního poškození DNA [35].

### Metafer

Automatická analýza obrazu v buňkách může usnadnit objektivní a rychlé měření genetického poškození v savcích a lidských buňkách. Tento postup byl opakovaně vyvíjen a testován v průběhu posledních desetiletí, ale žádný ze systému pro analýzu nebyl dostatečně robustní pro rutinní analýzu. Mezi nově požívané přístupy patří automatizovaný systém pro analýzu buněčných preparátů Metafer, vyvinutý společností MetaSystems [58]. Tento nástroj je široce využíván v oblasti biodozimetrie, pro detekci genetického poškození, jako jsou dicentrické chromozomy, mikrojádra ložiska  $\gamma$ H2AX, fluorescenční mikroskopie, karyotypizace a mnoho dalších analýz. Metafer využívá pokročilou analýzu obrazů k automatickému skenování a detekci relevantních buněčných objektů, což umožňuje rychlou a objektivní kvantifikaci. Systém je schopný pracovat s různými typy vzorků a preparátů a je oblíbený pro svou vysokou přesnost a efektivitu, což usnadňuje rutinní analýzu v laboratoři zabývající se biodozimetrií a genetickým poškozením. Pomocí systému Metafer probíhá automatické skenování snímků tak, že se snímek pohybuje vzhledem k pevnému objektivu mikroskopu ve vzorci pravidelného meandrovitého vzoru, aniž by došlo k vzniku mezer mezi skenovanými objekty [11, 43]. Z důvodu rychlosti se skenování provádí při co nejnižším optickém zvětšení, které stále umožňuje rozlišit požadované parametry pro hodnotící buňky. Každé pole je zachyceno a analyzováno na přítomnost analyzovaného objektu. Pokud jsou v zorném poli analyzovány požadované objekty, buňky nebo jádra, jsou dále analyzovány a uloženy v obrázkové galerii spolu s jejich pozicí a daty. Po naskenování může být obrazová galerie použita k prohlížení

detekovaných buněk, k vyloučení nesprávně identifikovaných a provádění případných oprav [11, 46, 43].

Analýza metafází a přítomnosti dicentrických chromozomů s použitím systému Metafer zahrnuje tři po sobě jdoucí kroky. První krokem je automatizované detekování metafází pomocí softwarového modulu MSearch [59]. Další krok je automatizované zachycení obrazu metafází ve vyšším zvětšení pro analýzu dicentrických chromozomů (63x nebo 100x zvětšení) za pomoci modulu AutoCapt. Posledním krokem je detekce dicentrických chromozomů na zachycených obrazech pomocí modulu DCScore [46, 48].

Stejně jako skórování metafází se dá Metafer použít na hodnocení binukleárních buněk a mikrojadér. Klasifikátor MSearch/Micronuclei automaticky identifikuje binukleární buňky. Skenování pro MN se provádí pomocí mikroskopu se zvětšením 10x. Algoritmus prahu objektu bere v úvahu přítomnost diskontinuit v pozadí obrazu [46, 59].

### 3.1.8 Teorie kalibračních křivek v biodozimetrii

Kalibrační křivka je v kontextu biologické dozimetrie předem stanovený vztah mezi absorbovanou dávkou ionizujícího záření a výnosem specifického biologického markeru expozice [60, 61]. Používá se k převodu pozorovaného výnosu aberací (např. frekvence dicentrických chromozomů v periferních krevních lymfocytech) na odhad absorbované dávky u jedince, u kterého je podezření na expozici ionizujícímu záření [11, 62]. K vytvoření kalibrační křivky se vzorky krve *in vitro* ozařují různými známými dávkami záření a následně se analyzuje výnos příslušných biologických markerů [61]. Získaná data se pak použijí k vytvoření matematického modelu popisujícího vztah mezi dávkou a účinkem [11].

Pro záření s nízkým LET se používá lineárně-kvadratický (LQ) model [11, 60].

$$Y = C + \alpha D + \beta D^2$$

Rovnice 2: Lineárně kvadratická rovnice

Pro záření s vysokým LET se naopak používá lineární (L) [11, 60].

$$Y = C + \alpha D$$

Rovnice 3: Lineární model rovnice

Kde:

- $Y$  představuje výnos aberací (průměrný počet aberací na buňku)
- $D$  představuje absorbovanou dávku.
- $C$  je konstantní člen a interpretuje se jako úroveň pozadí výskytu daného biologického ukazatele u neozářených jedinců.
- $\alpha$  (alfa) je koeficient lineární složky dávkové odezvy. Popisuje příspěvek k výnosu aberací, který je přímo úměrný dávce.
- $\beta$  (beta) je koeficient kvadratické složky dávkové odezvy (pouze u LQ modelu). Popisuje příspěvek k výnosu aberací, který je úměrný druhé mocnině dávky, což souvisí s interakcí dvou nebo více stop záření v buňce.

Cílem sestavení kalibrační křivky je vypočítat hodnoty koeficientů  $C$ ,  $\alpha$  a případně  $\beta$ , které nejlépe odpovídají experimentálním datům získaným z ozářených vzorků. K odhadu těchto koeficientů se běžně používá metoda maximální věrohodnosti [60, 61].

Hodnoty koeficientů kalibrační křivky tedy kvantifikují vztah mezi dávkou záření a indukovaným biologickým poškozením. Po změření výnosu aberací u neznámé expozice se pomocí těchto koeficientů a inverzní regrese z kalibrační křivky odhadne absorbovaná dávka [11, 60].

V kontextu kalibrační křivky v biologické dozimetrii,  $p$ -hodnota se objevuje při testování statistické významnosti koeficientů ( $C$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ) odvozených z modelu dávkové odezvy. Jinými slovy, testuje se nulová hypotéza, že koeficient je roven nule. Malá  $p$ -hodnota (obvykle menší než 0,05) poskytuje silný důkaz proti nulové hypotéze. V kontextu kalibrační křivky to znamená, že příslušný koeficient ( $C$ ,  $\alpha$  nebo  $\beta$ ) je statisticky významný a má skutečný vliv na modelovaný vztah mezi dávkou záření a výnosem aberací. Naopak, vysoká  $p$ -hodnota by naznačovala, že nemáme dostatek statistických důkazů k zamítnutí nulové hypotézy, a tedy že daný koeficient nemusí být statisticky významný [10, 63].

Index disperze, který představuje poměr rozptylu ( $\sigma^2$ ) a průměru ( $\bar{X}$ ) slouží ke kontrole, zda výsledná data odpovídají Poissonovu rozdělení, které se předpokládá u náhodného výskytu vzácných událostí, jakými jsou mikrojádra nebo chromozomální aberace. Pro Poissovo rozdělení je typické, že rozptyl a průměr jsou přibližně stejné, to znamená, že index disperze by měl být blízký 1. Pokud je index výrazně vyšší, hovoří se o nadměrné variabilitě, která naznačuje větší variabilitu, jedná se například o směsi vzorků s různou expozicí nebo

s biologickou odlišností mezi buňkami. Pokud je hodnota menší než 1 jedná se o nízkou variabilitu tedy o neobvykle rovnoměrné rozdělení [64, 9]

## 4 CÍLE PRÁCE

1. Vypracovat podle zadaného tématu literární přehled, ve kterém budou zhodnoceny poznatky publikované v odborné literatuře.
2. Kvantifikovat míru radiačního poškození v lymfocytech periferní krve ozářených *in vitro* v rozmezí dávek 0–5 Gy pomocí dvou cytogenetických metod a výsledky využít pro sestrojení kalibračních křivek pro retrospektivní odhad absorbované dávky gama záření. Dílčím cílem bylo využít k sestrojení kalibračních křivek naproti klasické mikroskopie také automatizovaný systém Metafer, pomocí něhož byly sestrojeny závislosti dávka odezva v manuálním, semiautomatickém a automatickém přístupu.
3. Verifikovat použitelnost vlastních kalibračních křivek k odhadu absorbované dávky u slepých vzorků ozářených neznámou dávkou.

## **5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **5.1 Seznam chemikálií, pomůcek a přístrojů**

#### **5.1.1 Chemikálie**

Médium RPMI 1640 (Gibco, USA)

Fetální bovinní sérum (FBS), (Gibco, USA)

Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, USA)

Fytohemaglutinin forma M (Gibco, USA)

Kolcemid 10 $\mu$ g/ml v PBS (Gibco, USA)

Cytochalasin B (Sigma-Aldrich, USA)

0,075 M roztok chloridu sodného (Gibco, USA)

Giemsa-Romanowski roztok (Penta, ČR)

Metanol, p. a. (Penta, ČR)

Kyselina octová, ledová (Penta, ČR)

Fyziologický roztok, 0,9% roztok NaCl (B.Braun, Německo)

Destilovaná voda

#### **5.1.2 Materiál a laboratorní potřeby**

Odběrové zkumavky Li-Heparin (Becton Dickinson, USA)

Kultivační nádoby T25 (P-LAB, ČR)

Serologické pipety (P-LAB, ČR)

Pasterovy pipety (P-LAB, ČR)

Mikroskopická skla podložní (P-LAB, ČR)

Zkumavky s víčkem 15 ml (Eppendorf)

Laboratorní sklo (zásobní lahve, barvicí nádoby, odměrný válec, kádinky)

#### **5.1.3 Přístrojové vybavení**

Automatický systém Metafer (MetaSystems; Německo)

CO<sub>2</sub> inkubátor pro buněčné kultury (Galaxy®170R, Německo)

Laminární box SafeFlow 1.2 (Biotech, USA)

Rotační míchadlo RM 5/200 (Glaswarenfabrik, Německo)

Světelný mikroskop (Olympus BX51, Japonsko)

Vodní lázeň (Biotech, ČR)

Vortex (Biotech, ČR)

Lednice s mrazákem – 20 °C (Bosch, Německo)

Zářič <sup>60</sup>Co Chisostat® (Chirana, ČR)

#### **5.1.4 Programové vybavení**

Microsoft® Excel® pro Microsoft 365 MSO (Version 2504 Build 16.0.18730.20122 (Microsoft Corporation, USA)

Neon verze 1.3 (MetaSystems; Německo)

Biodose Tool verze 3.6.1 (Hernández et al. 2023)

### **5.2 Biologický materiál**

Pro účely experimentální části této diplomové práce byla použita periferní nesrážlivá krev, jakožto vhodný zdroj buněčného materiálu pro cytogenetické analýzy. Získaná krev byla použita pro analýzu dicentrických chromozomů a mikrojaderný test. Krevní vzorky byly získány z Transfúzního centra Fakultní nemocnice Hradec Králové s povolením etické komise (202305 P05). Krev byla odebrána od zdravých dárců, mužů i žen mladších 50 let, kteří pravidelně neužívají žádné léky a nepodstupují žádnou léčbu.

### **5.3 Ozáření krevních vzorků**

Jako zdroj záření byl pro všechny experimenty použit kobaltový zdroj (<sup>60</sup>Co, Chirana)  $\gamma$ -záření s dávkovým příkonem 2,66 Gy.min<sup>-1</sup>. Kontrola dávkového příkonu kobaltového zdroje je prováděna jednou ročně pomocí dozimetru PTW-Unidos 1001 (sériové č. 11057, s ionizační komorou PTW TM 313, sériové číslo 0012; RPD Inc., Albertville, MN, USA).

Krevní vzorky (1ml) byly ozařovány gama zářením <sup>60</sup>Co v dávkách 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 2; 3; 4 a 5 Gy ze vzdálenosti 0,73 m na ozařovacím podstavci, ve vodorovné poloze do centra svazku

a tak, aby byla maximální vzdálenost do 5 cm od centrálního paprsku, kvůli zachování homogenity pole. Neozářené vzorky sloužily jako negativní kontrola.

Ihned po ozáření byly vzorky důkladně promíchány a inkubovány 60 minut za podmínek odpovídajících fyziologickému prostředí při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **5.4 Příprava kultivačního média a roztoků**

Při přípravě kultivačních médií bylo nezbytné vždy vypočítat požadované koncentrace jednotlivých složek a celkové potřebné objemy v závislosti na počtu vzorků a objemu média na jednu kulturu. Množství přidávaných reagentů (např. sérum, mitogen, antibiotika) musí být přesně odměřeno tak, aby byla zachována konzistence a správné podmínky pro růst buněk. Příprava probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu, aby se zabránilo kontaminaci.

Jako základní médium vhodné pro kultivaci PBMC (peripheral blood mononuclear cells) bylo použito médium RPMI 1640 s obsahem L-glutaminu a glukózy v koncentraci 2 g/l. Toto médium zajišťuje energetické potřeby buněk a obsahuje aminokyseliny a vitamíny nezbytné pro jejich růst. K základnímu médiu byla přidána směs antibiotik (penicilin-streptomycin, finální koncentrace 1 %), která slouží k prevenci kontaminace bakteriemi a plísněmi během kultivace. Pro zajištění optimálních podmínek a růstu buněk bylo do média přidáno fetální bovinní sérum (FBS) v koncentraci 10 %. Těsně před zahájením kultivace krevních vzorků byl do média přidán lektin fytohemaglutinin (PHA-M), který stimuluje buněčnou proliferaci. Finální koncentrace PHA-M činila 20 µg/ml média.

#### **Kolcemid**

Kolcemid (chemicky N-deacetyl-N-Methylkolchicin) je méně toxický derivát kolchicinu. Působí jako mitotický buněčný jed – zastavuje dělení buněk v metafázi tím, že zablokuje tvorbu dělicího vřeténka. Doporučená výsledná koncentrace kolcemidu v kultivačním médiu je 74 ng/ml.

#### **Cytochalasin B**

Cytochalasin B je mykotoxin, který narušuje polymeraci aktinu, čímž inhibuje cytokinezi a vede k tvorbě vícejaderných buněk. Doporučená výsledná koncentrace cytochalasinu B v kultivačním médiu činí 6 µg/ml.

## **Hypotonický roztok**

Jako hypotonický roztok byl použit komerčně dostupný 0,075 M roztok KCl. Ošetřením hypotonickým roztokem dochází k lýze buněčných membrán a umožňuje roztažení buněčných jader, což zlepšuje viditelnost chromozomů při mikroskopickém pozorování. Pro analýzu dicentrických chromozomů bylo potřeba hypotonický roztok předeřhát na 37 °C ve vodní lázni. Pro mikrojaderný test bylo naopak třeba roztok s dostatečným předstihem vychladit na 4 °C v lednici.

## **Fixační roztok**

Fixační roztok obsahující kyselinu octovou a metanol slouží k rychlé fixaci buněk a zabraňuje jejich rozpadu a degradaci chromozomů. To je důležité pro zachování chromozomální struktury a umožňuje následnou analýzu s co nejvyšší přesností. **Fixační roztok A** byl připraven smícháním metanolu s ledovou kyselinou octovou v poměru 3:1. **Fixační roztok B** byl připraven smícháním metanolu, ledové kyseliny octové a fyziologického roztoku v poměru 5:4:1. Oba fixační roztoky byly do použití uchovávány v mrazáku při -20 °C.

## **5.5 Analýza dicentrických chromozomů**

### **5.5.1 Kultivace buněk**

Do sterilních kultivačních lahví T25 bylo přidáno 8 ml připraveného kultivačního média a 800 µl ze vzorku ozářené krve. Celá suspenze byla důkladně promíchána, nádobky byly uzavřeny víčkem s filtrem a vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 hodinách byl do kultury přidán kolcemid tak, aby finální koncentrace v médiu byla 74 ng/ml. Kultury byly po přidání kolcemidu inkubovány dalších 24 hodin při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Celkový čas kultivace byl 48 hodin.

### **5.5.2 Fixace buněk**

Po uplynutí inkubační doby byly kultury přeneseny do zkumavek o objemu 15 ml a centrifugovány 3 min, 2000 ot./min. Poté byl opatrně odsán supernatant, peleta byla důkladně resuspendována na vortexu, případně pomocí pipety, a k buněčné suspenzi bylo pomalu po částech přidáno pasterovou pipetou 10 ml předem vytemperovaného hypotonického roztoku KCl (37 °C). Takto ošetřené vzorky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě.

Po uplynutí inkubační doby byly vzorky centrifugovány 3 min, 2000 ot./min, poté byl supernatant odsán, peleta byla důkladně resuspendována na vortexu, případně pomocí pipety, K buněčné suspenzi bylo za stálého míchání na vortexu velmi pomalu po kapkách přidáno 8 ml ledově vychlazeného fixačního roztoku A a poté byly vzorky centrifugovány 3 min, 2000 ot./min. Tento krok byl za stejných podmínek opakován ještě dvakrát. Po třetí fixaci je odsán supernatant tak, aby bylo ponecháno 250–300 µl fixačního roztoku nad peletou buněk. Peleta byla důkladně resuspendována a takto fixované buňky byly do přípravy preparátů uchovávány při 4 °C v lednici nebo na ledu.

### **5.5.3 Příprava preparátu a barvení**

Pro přípravu preparátu byla použita klasická podložní borosilikátová skla se zábrusem. Skla byla důkladně odmaštěna ponořením do metanolu na 15 minut, následně byla opláchnuta studenou vodou a takto připravená skla byla skladována v destilované vodě s kapkou metanolu v lednici při 4 °C. Na předem připravená vychlazená skla bylo z výšky kápnuto 40 µl suspenze, což odpovídá přibližně 3 kapkám, které byly soustředěny do středu skla. Od každého vzorku byla kápnuta 2 skla pro zajištění dostatečného množství pozorovatelných metafází. Nakapaná skla byla popsána a ponechána na papírové podložce volně schnout na vzduchu při laboratorní teplotě ideálně do druhého dne. Po uschnutí byly preparáty obarveny ponořením do 5% roztoku Giemsa-Romanowski (95 ml deionizovaná voda a 5 ml roztoku Giemsa) na 6–8 minut. Poté byla skla opláchnuta pod studenou tekoucí vodou a uložena na podložku do svislé polohy do úplného uschnutí.

### **5.5.4 Hodnocení preparátů**

Připravené a usušené preparáty byly hodnoceny pomocí klasického světelného mikroskopu za použití imerzního objektivu po zvětšení 1000x a imerzního oleje, který zajišťuje vyšší rozlišovací schopnost oproti objektivům určeným pro vodní imerzi. Pro správné hodnocení byly vybírány pouze buňky nacházející se v metafázi, s jasně rozpoznatelnou a kompletní chromozomální sadou obsahující 46 chromozomů. Z hodnocení byly vyloučeny překrývající se metafáze, nekompletní metafáze nebo metafáze obsahující s překrývajícími se chromozomy, jejichž struktura nebyla dostatečně rozlišitelná. Za dicentrické chromozomy byly považovány pouze ty, které měly dvě zřetelně identifikovatelné centromery propojené chromatinem v rámci jednoho chromozomu a odpovídající počet telomer. Pro kalibrační křivku dávkové odpovědi

bylo analyzováno minimálně 1000 metafází na dávku, zatímco pro odhad obdržené dávky se standardně hodnotilo 300 metafází.

## **5.6 Mikrojaderný test (CBMN)**

Do sterilních kultivačních lahví T25 bylo přidáno 8 ml připraveného kultivačního média a 800  $\mu$ l ze vzorku ozářené krve. Celá suspenze byla důkladně promíchána, nádobky byly uzavřeny víčkem s filtrem a vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Po 24 hodinách byl do kultury přidán Cytochalasin B tak, aby finální koncentrace v médiu byla 6  $\mu$ g/ml. Kultury byly po přidání Cytochalasinu B inkubovány dalších 48 hodin při 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Celkový čas kultivace byl 72 hodin.

### **5.6.1 Fixace buněk**

Po uplynutí doby inkubace byly kultury přeneseny do zkumavek o objemu 15 ml a centrifugovány po dobu 3 minut při 2000 ot./min. Poté byl opatrně odsán supernatant, peleta byla důkladně resuspendována na vortexu nebo pomocí pipety. K buněčné suspenzi bylo pomalu přidáno po částech 10 ml vychlazeného hypotonického roztoku KCl. Následně byly vzorky ihned centrifugovány po dobu 3 minut při 2000 ot./min. Po odsátí supernatantu byla peleta opět důkladně resuspendována. K buněčné suspenzi bylo za stálého míchání na vortexu velmi pomalu, po kapkách, přidáno 8 ml ledově vychlazeného fixačního roztoku B. Poté byly vzorky opět centrifugovány po dobu 3 minut při 2000 ot./min. Supernatant byl opět odsán a peleta byla důkladně resuspendována. K buněčné suspenzi bylo pomalu, po kapkách, přidáno 8 ml ledově vychlazeného fixačního roztoku A. Poté byly vzorky opět centrifugovány po dobu 3 minut při 2000 ot./min. Tento krok s fixačním roztokem A byl opakován ještě jednou. Po třetí fixaci byl supernatant odsán tak, aby nad peletou buněk zůstalo 250–300  $\mu$ l fixačního roztoku. Peleta byla důkladně resuspendována a takto fixované buňky byly uchovávány při 4 °C v lednici nebo na ledu až do přípravy preparátů.

### **5.6.2 Příprava preparátu a barvení**

Pro přípravu preparátu byla použita klasická podložní skla z borosilikátového skla se zábrusem. Skla byla důkladně odmaštěna ponořením do metanolu na 15 minut, následně opláchnuta studenou vodou. Takto připravená skla byla uchovávána v destilované vodě s kapkou metanolu v lednici při 4 °C. Na předem připravená vychlazená skla bylo z výšky kápnuto 40  $\mu$ l suspenze, což odpovídá přibližně 3 kapkám, které byly soustředěny do středu skla. Pro každý vzorek byla

použita dvě skla, aby bylo zajištěno dostatečné množství pozorovatelných binukleárních buněk. Nakapaná skla byla popsána a ponechána na papírové podložce volně schnout na vzduchu při laboratorní teplotě, ideálně do druhého dne. Po uschnutí byly preparáty obarveny ponořením do 5% roztoku Giemsa-Romanowski (95 ml deionizované vody a 5 ml roztoku Giemsa) po dobu 6–8 minut. Poté byla skla opláchnuta pod studenou tekoucí vodou a uložena na podložku do svislé polohy, dokud zcela neuschla.

### **5.6.3 Hodnocení preparátů**

Preparáty určené pro analýzu mikrojader byly po zaschnutí hodnoceny pomocí klasického světelného mikroskopu za použití imerzního objektivu (zvětšení 1000×) a imerzního oleje. Pro správné vyhodnocení byly hodnoceny výhradně dvoujaderné BN, vzniklé blokací cytokineze cytochalazinem B. Za mikrojádra byly považovány pouze morfologicky dobře definované struktury, které měly jasně ohraničený obrys, nacházely se v cytoplazmě BN buňky, byly menší než hlavní jádra (v rozmezí 1/16 až 1/3 průměru hlavního jádra), měly podobnou intenzitu zbarvení a nebyly s hlavními jádry ve fyzickém kontaktu či překryvu. Mikrojádra musela být umístěna v dostatečné vzdálenosti od hlavního jádra, přičemž nebyly započítány pupeny nebo výčnělky z hlavního jádra. Pro účely konstrukce kalibrační křivky bylo hodnoceno minimálně 1000 BN buněk na dávku. Pro odhad obdržené dávky stačilo vyhodnocení 300–500 BN buněk.

Vedle klasické mikroskopické analýzy byla mikrojádra hodnocena také pomocí automatizovaného systému Metafer (MetaSystems) ve třech režimech hodnocení: manuálním, semiautomatickém a automatickém. Připravené preparáty byly umístěny do uchycovacího rámečku mechanického stolku. Po výběru příslušného klasifikátoru MSearch/MetaCyte, výběru správného objektivu (objektiv s 10x zvětšením) a nastavení parametrů pro skenování (oblast skla, počet událostí, nastavení vyhodnocovacího grafu, režim, atd) bylo spuštěno automatické skenování. Systém, využívající pokročilý algoritmus, automaticky vyhledával BN buňky a identifikoval přítomnost mikrojader na základě definovaných morfologických a velikostních kritérií. Výstupem analýzy byla galerie snímků BN buněk s označenými mikrojádry, které byly následně hodnoceny hodnotitelkou. V manuálním režimu bylo hodnocení snímků v galerii provedeno ručně, kde hodnotitelka prováděla veškerou analýzu a rozhodovala o zařazení mikrojader. V semiautomatickém režimu systém automaticky vyhledával BN buňky a označoval struktury, které odpovídaly definovaným kritériím mikrojader. Konečné rozhodnutí o zařazení mikrojader však bylo provedeno hodnotitelkou, která kontrolovala automaticky

označené buňky. Plně automatický režim umožnil kompletní vyhodnocení bez zásahu obsluhy, přičemž výsledky byly následně podrobeny validaci kvůli riziku falešné identifikace artefaktů. Tato metodika umožnila efektivní a standardizované zpracování dat s vysokou přesností při hodnocení mikrojader.

## **5.7 Analýza dat**

Pro analýzu experimentálních dat byla využita kombinace softwarových nástrojů vhodných jak pro základní zpracování, tak i pro specializovanou biodozimetrickou interpretaci. Základní shromažďování, třídění a vizualizace dat byly prováděny v prostředí Microsoft Excel, který umožňuje efektivní manipulaci s datovými sadami a tvorbu přehledných tabulek a grafů. Pro biodozimetrické vyhodnocení byl použit specializovaný nástroj Biodose Tools, jenž poskytuje pokročilé funkce pro kvantitativní analýzu biologických účinků ionizujícího záření. Tento nástroj umožňuje generování dávkově-účinkových křivek pro vybrané cytogenetické ukazatele, výpočet odhadů absorbovaných dávek včetně 95 % intervalů spolehlivosti a také určení klíčových statistických parametrů, jako jsou směrodatné odchylky, rozptyl pozadí či koeficienty regrese. Při výpočtech byl použit model Poissonovy regrese s kvadratickou složkou pro analýzu vztahu mezi cytogenetickými změnami a absorbovanou dávkou. Pro účely konstrukce kalibrační křivky bylo analyzováno 1000 metafází na dávku, což zajišťuje vysokou statistickou spolehlivost výsledků. Pro odhady slepých dávek bylo hodnoceno 300 metafází na vzorek, a to jak v rámci analýzy dicentrických chromozomů, tak i v testu mikrojader. Tato metodika umožňuje přesné a spolehlivé stanovení rozsahu ozáření u jednotlivých biologických vzorků.

## 6 VÝSLEDKY

V experimentální části této diplomové práce byla získána data ze vzorků *in vitro* ozářené periferní krve, zpracované v souladu s metodickým postupem uvedenými kapitole 5.3. Na základě těchto dat byly sestrojeny kalibrační křivky závislosti počtu mikrojader na dávce ionizujícího záření, přičemž pro každý režim hodnocení – manuální, semiautomatický a plně automatický – byla vytvořena samostatná kalibrační řada.

Vedle klasického manuálního mikroskopického hodnocení byly preparáty analyzovány také pomocí automatizovaného systému Metafer, který oproti klasické mikroskopii přináší výrazné zrychlení a zefektivnění celého procesu hodnocení mikrojader. Mezi testovanými přístupy byl zvolen také semiautomatický režim, kombinující výhody automatického rozpoznávání s korekcí hodnotitelem. Porovnání těchto tří režimů, jejich přesnosti, použitelnosti a výstupních kalibračních křivek bylo hlavním cílem této studie. Výsledky ukázaly odlišnosti mezi přístupy vyhodnocování, přičemž byly diskutovány výhody a limity každého z nich. V druhé části experimentu byla vyhodnocena kalibrační křivka pro výskyt dicentrických chromozomů v manuálním režimu pomocí klasické mikroskopie, která sloužila jako referenční cytogenetická metoda. Ověření použitelnosti všech vytvořených kalibračních křivek bylo provedeno zpětným odhadem dávky u slepých vzorků, jejichž skutečná expozice byla známá pouze zpracovateli. Úspěšnost zpětného výpočtu potvrdila vhodnost navržených metod pro retrospektivní biodozimetrii a jejich potenciál pro praktické využití v případě radiačních událostí.

### 6.1 Analýza mikrojader pomocí klasické mikroskopie

V rámci hodnocení frekvence mikrojader byl prvním krokem manuální přístup založený na klasické mikroskopii. Mikrojádra byla kvantifikována v BN lymfocytech periferní krve, která byla ozářena dávkami 0; 0,6; 0,8 ;1; 2; 3; 4 a 5 Gy. Negativní kontrolu představovaly neozářené vzorky (0 Gy). Začátek inkubační doby byl pro všechny vzorky a experimenty stejný, tedy v intervalu 60 minut po expozici ionizujícímu záření z důvodu zajištění potřebného času k inicializaci buněčných odpovědí na ionizující záření. Pro každý dávkový bod bylo manuálně vyhodnoceno 2000 BN buněk, s výjimkou dávky 0,6 Gy, kde z důvodu nedostatku požadovaných buněk bylo počítáno pouze 1000 BN (Tabulka 1).

U každé BN buňky byl zaznamenán výskyt mikrojadra a dále byla sledována distribuce podle počtu mikrojadra – tedy počet buněk s jedním, dvěma a více mikrojadry. Z těchto dat byly vypočteny celkové počty mikrojadra vztažené na 1000 BN buněk a současně byl zaznamenán počet buněk bez nálezu mikrojadra (MN-). Za pozitivní BN buňku (MN+) byla považována každá BN buňka, která obsahovala alespoň jedno mikrojadro. Veškeré údaje byly systematicky zaznamenávány do hodnotící tabulky pro další analýzu.

Kalibrační křivka byla sestrojena z osmi bodů, tj. dávek 0; 0,6; 0,8 ;1; 2; 3; 4 a 5 Gy. Pro všechny dávky bylo počítáno 2000 BN buněk, s výjimkou dávky 0,6 kde z důvodu nedostatku požadovaných buněk bylo počítáno pouze 1000 BN buněk. Při detekci mikrojadra se standardně hodnotí 1000 BN pro zajištění dostatečně reprezentativního vzorku (doporučení IAEA). Tento počet umožňuje detekovat i nízké frekvence výskytu mikrojadra a zajišťuje potřebnou přesnost bez nadměrného prodlužování analýzy. Data z tabulky č.1 byla nadále vložena do programu Biodose Tools [60]. Pomocí programu byla sestrojena kalibrační křivka lineárně-kvadratické závislosti počtu mikrojadra na dávce záření a vypočítání příslušných parametrů pro každou dávku. Data z programu Biodose Tools jsou podrobně zpracována v tabulce níže (Tabulka 2).

Pro každou analyzovanou dávku záření ( $D$  v jednotkách Gray–Gy) byly zaznamenány následující parametry: celkový počet hodnocených buněk (BN celkem), počet buněk pozitivních (BN MN+) a negativních na přítomnost mikrojadra (BN MN-), distribuce výskytu mikrojadra dle četnosti (C0–C8), celkový počet mikrojadra (MN celkem) a počet mikrojadra přepočtený na 1000 buněk (MN/1000).

Tabulka 1: Hodnoty pro sestavení kalibrační křivky pro metodu CBMN

Tato tabulka uvádí data použitá pro konstrukci křivky dávkové odezvy pro  $\gamma$ -záření. Data pocházejí z cytogenetických výsledků získaných z krevních vzorků ozářených  $\gamma$ -zářením. Pro každou analyzovanou dávku (D v Gy) jsou uvedeny následující údaje: počet analyzovaných buněk (BN celkem), počet buněk pozitivních a negativních na přítomnost mikrojader (BN MN+, BN MN-), distribuce

DÁVKA	Typ odečítání:	BN MN+	BN MN-	BN celkem	distribuce MN									celkem MN	celkem MN/1000 BN
					0	1	2	3	4	5	6	7	$\geq 8$		
0.0	Mikro.	0	2000	2000	2000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.6		16	984	1000	984	15	1	0	0	0	0	0	0	17	17
0.8		42	1958	2000	1958	40	2	0	0	0	0	0	0	44	22
1.0		57	1943	2000	1943	53	3	1	0	0	0	0	0	62	31
2.0		295	1705	2000	1705	266	29	0	0	0	0	0	0	324	162
3.0		465	1535	2000	1535	386	74	4	1	0	0	0	0	550	275
4.0		617	1383	2000	1383	481	123	13	0	0	0	0	0	766	383
5.0		878	1122	2000	1122	544	256	66	12	0	0	0	0	1302	651

Výsledky potvrdily trend dávkové závislosti – s rostoucí dávkou ionizujícího záření narůstá počet buněk s mikrojádry a celkový počet mikrojader. Zatímco při nulové dávce nebyla pozorována žádná mikrojádra, při dávce 5 Gy bylo zaznamenáno 878 pozitivních buněk a celkem 1302 mikrojader, což odpovídá hodnotě 651 mikrojader na 1000 BN. Tento trend potvrzuje předpoklad o nelineární biologické odezvě, kdy dochází k prudkému nárůstu genetického poškození při vyšších dávkách záření. Distribuce mikrojader mezi buňkami je navíc s rostoucí dávkou stále širší – od jednotlivých případů až po buňky obsahující 5 nebo více mikrojader, což je indikátorem těžkého poškození genomu [65]. Při nulové dávce (0 Gy) nebyly detekovány žádné aberace a všechny buňky byly nepoškozené, což není běžné vzhledem k tomu, že při 1000 BN je přirozené pozadí přibližně 20 mikrojader. [10, 66].

Tabulka 2: Biodose Tool tabulka pro sestavení kalibrační křivky pro metodu CBMN

Tabulka zachycuje výsledky biodozimetrické analýzy, při níž byly hodnoceny mikrojádra v buňkách po expozici různým dávkám ionizujícího záření. Pro každou dávku (D, vyjádřenou v jednotkách Gray) byl zaznamenán počet analyzovaných buněk (N) a celkový počet detekovaných aberací (X). Dále je uvedena distribuce buněk podle počtu poškození (C0 až C5), tedy kolik buněk obsahovalo 0, 1, 2 atd. mikrojader. Na základě těchto dat byly vypočítány klíčové statistické ukazatele: průměrný počet aberací na buňku (mean), rozptyl (var), index disperze ( $DI = \text{var}/\text{mean}$ ), který porovnává rozptyl s průměrem a slouží ke kontrole shody s Poissonovým rozdělením.

Dávka (Gy)	Počet buněk (N)	Počet mikrojader (X)	C0	C1	C2	C3	C4	C5	Průměr (mean)	Rozptyl (var)	Index disperze (DI)
0,0	2000	0,0	2000	0	0	0	0	0	0,00	0,00	0,00
0,6	1000	17,0	984	15	1	0	0	0	0,02	0,02	1,10
0,8	2000	44,0	1958	40	2	0	0	0	0,02	0,02	1,07
1,0	2000	62,0	1943	53	3	1	0	0	0,03	0,04	1,16
2,0	2000	324,0	1705	266	29	0	0	0	0,16	0,16	1,02
3,0	2000	550,0	1535	386	74	4	0	0	0,28	0,29	1,06
4,0	2000	766,0	1383	481	123	13	0	0	0,38	0,40	1,04
5,0	2000	1302,0	1122	544	256	66	12	0	0,65	0,75	1,16

Při nízkých dávkách (0,6–1,0 Gy) byl pozorován pouze velmi nízký počet mikrojader, přičemž hodnota indexu disperze se pohybovala kolem 1. Tento výsledek je v souladu s nulovou hypotézou, že počet poškozených buněk sleduje Poissonovo rozdělení [31, 60, 61]. Se zvyšující se dávkou (2–5 Gy) roste, jak průměrný počet mikrojader, tak i jejich rozptyl. Přesto však index disperze zůstává relativně blízko hodnoty 1 (1,02–1,16), což naznačuje, že i při vyšších dávkách odpovídá rozdělení poškození přibližně Poissonovu rozdělení. U vyšších dávek může dojít k naddisperzi (>1). Tato analýza potvrzuje spolehlivost mikrojaderného testu při stanovování absorbované dávky a poskytuje pevný základ pro tvorbu tabulky regresní parametrů a následné kalibrační křivky (Obrázek 8) [67].

Tabulka 3: Koeficienty kalibrační křivky pro metodu CBMN

Tabulka uvádí odhady parametrů regresní rovnice (Rovnice 2), která popisuje vztah mezi absorbovanou dávkou ionizujícího záření (D) a frekvencí detekovaných aberací (mikrojader) ve vyšetřovaných buňkách. Koeficient C představuje základní hladinu aberací bez expozice záření neboli pozadí. Koeficient  $\alpha$  odpovídá lineárnímu nárůstu aberací s dávkou. Koeficient  $\beta$  charakterizuje kvadratický (nelineární) vztah mezi dávkou a efektem. Hodnota p-value určuje statistickou významnost každého parametru [67].

Parametr	Odhad (estimate)	Směrodatná chyba (std.error)	Statistika (statistic)	p-hodnota (p.value)
C	$3,32 \times 10^{-7}$	$7,30 \times 10^{-3}$	$4,55 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^0$
$\alpha$	$1,84 \times 10^{-2}$	$9,36 \times 10^{-3}$	$1,97 \times 10^0$	$2,12 \times 10^1$
$\beta$	$2,21 \times 10^{-2}$	$1,99 \times 10^{-3}$	$1,11 \times 10^1$	$2,05 \times 10^{-4}$

Na základě získaných dat z jednotlivých dávkových bodů byla pomocí nástroje sestavena kalibrační křivka vyjadřující závislost průměrného počtu mikrojader na 1000 binukleárních buněk (MN/1000 BN) na absorbované dávce záření. Hodnoty byly získány z analýzy 2000 BN buněk pro každý dávkový bod, přičemž každá dávka byla hodnocena samostatně a nezávisle. Pro sestavení křivky byla použita metoda lineárně-kvadratického (LQ) regresního modelu ve tvaru:

$$Y = 3,32 \times 10^{-7} + 1,84 \times 10^{-2} \times D + 2,21 \times 10^{-2} \times D^2$$

Rovnice 4: Dosazené hodnoty z CBMN mikroskopického odečtu

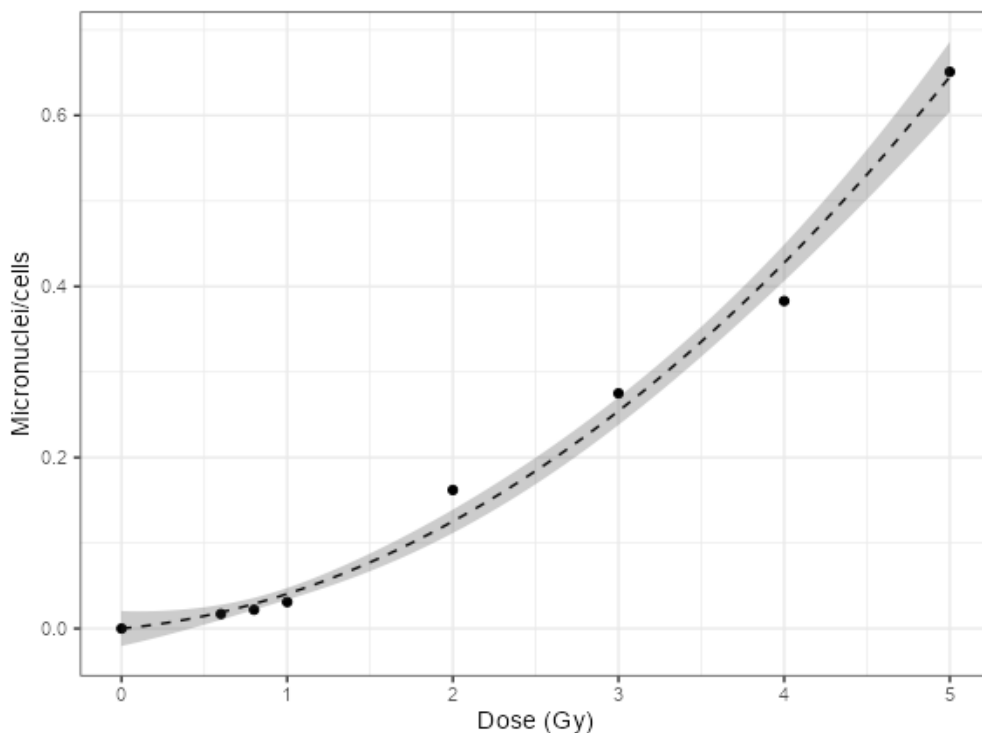
Hodnota koeficientu C je velmi nízká  $3,32 \times 10^{-7}$  což odpovídá očekávání nulového nebo minimálního výskytu aberací v neozářených buňkách [68].

Koeficient  $\alpha$  je statisticky nevýznamný  $p=0,212$  což naznačuje, že samotný lineární vztah nemusí být dostatečný k popsání změn. Obecně platí, že hranice statistické významnosti je  $p<0,05$ . To znamená, že pokud je p-hodnota menší než 0,05, považujeme výsledek za statisticky významný, tj. existuje méně než 5% pravděpodobnost, že by daný výsledek vznikl náhodou [10, 68].

Koeficient  $\beta$  je statisticky vysoce významný  $p = 2,05 \times 10^{-4}$ , což potvrzuje, že závislost frekvence aberací na dávce je výrazně nelineární, což je v souladu s výsledky studie [69].

Hodnota p nižší než 0,05 znamená, že koeficient je statisticky významný. Statisticky významný je teda na hladině významnosti 0,05 pouze kvadratický koeficient  $\beta$  [68, 69].

Vzhledem k tomu, že koeficient alfa je statisticky nevýznamný a koeficient beta je statisticky významný, můžeme usuzovat, že vztah mezi počtem přítomnosti mikrojaderných buněk a dávkou záření je spíše kvadratický než lineární, jak je také vidět v grafu (Obrázek 8).



Obrázek 8: Graf kalibrační křivky metody CBMN

Graf znázorňuje dávkovou odezvu v mikrojaderném testu, konkrétně závislost počtu mikrojaderných buněk na absorbované dávce ionizujícího záření (v jednotkách Gray – Gy). Na vodorovné ose je uvedena dávka (Dose, Gy), na svislé ose je znázorněn průměrný počet mikrojaderných buněk (Micronuclei/cells).

Kalibrační křivka znázorňuje kvadraticky-lineární závislost mezi absorbovanou dávkou ionizujícího záření a četností mikrojaderných buněk. V oblasti nízkých dávek (0–1 Gy) je nárůst mírný a téměř lineární, což odpovídá přímé biologické odezvě bez výrazné kumulace poškození. V oblasti středních dávek (1–3 Gy) začíná být patrný nelineární – kvadratický nárůst, který odráží zvyšující se biologickou odezvu organismu na narůstající dávky záření. Vysoké dávky (3–5 Gy) se již projevují prudkým nárůstem výskytu aberací, což ukazuje na dominanci kvadratické složky rovnice a zvýšenou míru poškození DNA. Vývoj křivky má typicky konvexní charakter, a proto je tento matematický model široce používán v oblasti biodozimetrie pro odhad absorbované dávky u osob, u nichž není k dispozici fyzikální dozimetr [67].

Interval spolehlivosti (šedé pásmo) ukazuje relativně nízkou míru nejistoty v oblasti 1–4 Gy, zatímco ve vyšší dávkové oblasti (nad 4 Gy) je patrný nárůst variability. To může souviset

s biologickým nasycením odezvy nebo vyšší chybovostí při detekci mikrojadern ve velmi poškozených buňkách. K přesnému využití v oblasti vysokých dávek (>4 Gy) by bylo vhodné provést dodatečnou validaci nebo zvýšit počet analyzovaných buněk.

## **6.2 Analýza mikrojadern pomocí Metaferu – automatický režim hodnocení**

Pro automatický přístup byly zvoleny stejné vzorky jako pro mikroskopický režim hodnocení mikrojadern. Pro analýzu mikrojadern byl využit automatický skenovací systém Metafer. Tabulka 4 uvádí výsledky CBMN testu, který byl proveden s využitím automatizovaného obrazu a softwarového vyhodnocení. V rámci kalibrační řady bylo vyhodnoceno deset dávkových bodů v rozsahu od 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ;1; 2; 3; 4 a 5 Gy. Pro každou dávku je uveden celkový počet analyzovaných binukleárních buněk, z toho počet buněk obsahujících mikrojadra (BN MN+) a počet buněk bez mikrojadern (BN MN-). Dále je uvedena distribuce výskytu mikrojadern – tedy počet buněk obsahujících přesně 0, 1, 2 až  $\geq 8$  mikrojadern. Součet těchto distribučních hodnot odpovídá celkovému počtu hodnocených BN buněk pro danou dávku. Kromě toho tabulka obsahuje absolutní počet detekovaných mikrojadern (MN celkem) a jejich relativní výskyt vztažený na 1000 BN buněk (MN/1000 BN). Uvedené údaje slouží jako základ pro konstrukci kalibrační křivky, která popisuje vztah mezi velikostí absorbované dávky a mírou cytogenetického poškození. Data z automatického skórování buněk jsou podrobně zpracována v následující tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 4: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN v režimu automatického odečtu

Tabulka zobrazuje výsledky automatizovaného screeningu mikrojadern pomocí CBMN testu v závislosti na absorbované dávce ionizujícího záření (v jednotkách Gy). Pro každou dávku je uveden počet analyzovaných binukleárních buněk (BN), z toho počet buněk obsahujících mikrojadra (MN+) a bez mikrojadern (MN-), dále celkový počet BN buněk (BN celkem). Sloupce označené jako „distribuce MN“ udávají počet binukleárních buněk obsahujících přesně 0, 1, 2, ...,  $\geq 8$  mikrojadern. Součet těchto hodnot odpovídá celkovému počtu BN buněk pro danou dávku. Sloupec „celkem MN“ udává absolutní počet detekovaných mikrojadern napříč všemi analyzovanými buňkami. Sloupec „celkem MN/1000 BN“ pak reprezentuje frekvenci mikrojadern přepočtenou na 1000 BN buněk, což je běžná metrika pro biodozimetrickou kalibraci.

DÁVKA	Typ odečítání:	BN MN+	BN MN-	BN celkem	distribuce MN									celkem MN	celkem MN/1000 BN
					0	1	2	3	4	5	6	7	$\geq 8$		
0,0	Auto	148	1252	1400	1252	114	24	7	2	1	0	0	0	196	140
0,2		194	2107	2307	2107	172	20	1	0	1	0	0	0	220	95
0,4		116	778	894	778	106	10	0	0	0	0	0	0	126	141
0,6		85	975	1060	975	72	10	3	0	0	0	0	0	101	95
0,8		101	818	919	818	83	15	3	0	0	0	0	0	122	133
1,0		212	1450	1662	1450	181	27	4	0	0	0	0	0	247	149
2,0		686	2338	3024	2338	587	91	7	1	0	0	0	0	794	263
3,0		305	757	1062	757	249	53	2	0	1	0	0	0	366	345
4,0		263	527	790	527	198	52	9	2	2	0	0	0	347	439
5,0		221	246	467	246	149	56	13	2	1	0	0	0	313	670

Z výsledků je patrný nárůst počtu mikrojadern závislý na zvyšující se dávce záření, což odpovídá typickému dávkovému efektu [71]. Například při 0 Gy (neozářený kontrolní vzorek) připadá 140 mikrojadern na 1000 buněk, zatímco při dávce 5 Gy již bylo detekováno 670 mikrojadern na 1000 buněk. Nárůst je zpočátku pozvolný, ale od dávky 2 Gy je znatelný prudký vzestup, což naznačuje nelineární (kvadratickou) závislost mezi dávkou a biologickou odezvou [72]. Tato odezva je potvrzena nejen růstem průměrného počtu mikrojadern, ale také rozšířením distribuce – u vyšších dávek se objevují buňky s více než 3 mikrojadry, což je u nízkých dávek prakticky nepozorovatelné. Při vyhodnocení negativního kontrolního vzorku automatickým režimem byla zjištěna výrazná odchylka od očekávaných hodnot. Zatímco v negativní kontrole se pohybuje počet mikrojadern v rozmezí 3–20 na 1000 hodnocených buněk [72, 73]. Systém detekoval 140 mikrojadern na 1000 buněk, což značně přesahuje očekávané rozmezí. Tato odchylka může být způsobena chybnou interpretací artefaktů nebo jinými technickými faktory automatického rozpoznávání. Podrobnější přehled výsledků včetně statistického rozboru je uveden v následující tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku CBMN v režimu automatického odečtu

Tabulka představuje výsledky automatického odečtu mikrojadern pomocí systému Metafer v rámci CBMN testu, a to po expozici různým dávkám ionizujícího záření. Pro každou dávku je zaznamenán počet analyzovaných binukleárních buněk, celkový počet detekovaných mikrojadern a jejich rozložení podle počtu mikrojadern na buňku. Dále jsou uvedeny základní statistické ukazatele: průměrný počet mikrojadern na buňku (mean), rozptyl (var) a index disperze (DI).

Dávka (Gy)	Počet buněk (N)	Počet mikrojadern (X)	C0	C1	C2	C3	C4	C5	Průměr (mean)	Rozptyl (var)	Index disperze (DI)
0,0	1400	196	1252	114	24	7	2	1	0,14	0,22	1,54
0,2	2301	220	2107	172	20	1	0	1	0,10	0,12	1,20
0,4	894	126	778	106	10	0	0	0	0,14	0,14	1,02
0,6	1060	101	975	72	10	3	0	0	0,10	0,12	1,28
0,8	919	122	818	83	15	3	0	0	0,13	0,17	1,26
1,0	1662	247	1450	181	27	4	0	0	0,15	0,17	1,17
2,0	3024	794	2338	587	91	7	1	0	0,26	0,27	1,04
3,0	1062	366	757	249	53	2	0	1	0,34	0,36	1,03
4,0	790	347	527	198	52	9	2	2	0,44	0,53	1,20
5,0	467	313	246	149	56	13	2	1	0,67	0,72	1,08

Z výsledků je zřejmé, že automatický systém Metafer v režimu hodnocení poskytuje konzistentní a spolehlivé výsledky. Výrazně lepší výkonnost vykazuje zejména při vyšších dávkách záření (od 2 Gy výše), kde je výskyt mikrojadern výraznější v porovnání s nižšími dávkami, u nichž je četnost mikrojadern nízká a výsledky mohou být ovlivněny vyšším statistickým rozptylem. V tomto dávkovém rozmezí 2–5 Gy jsou hodnoty průměrného počtu mikrojadern i rozptylu relativně vyrovnané a indexy disperze (DI) se pohybují blízko hodnotě 1, což svědčí o dobré shodě s Poissonovým rozdělením. Tato stabilita dat je dále podpořena nízkými až zápornými hodnotami u-testu, které potvrzují homogenitu a konzistenci odečtů v uvedeném dávkovém rozsahu [68].

Naopak u negativní kontroly (0 Gy) a nízkých dávek (do 1 Gy) byly zaznamenány výrazné odchylky. Nejvýraznější je u-hodnota 9,94 při 0 Gy, která ukazuje na vysokou overdisperzi – tedy, že počet zjištěných mikrojadern je výrazně vyšší, než by odpovídalo náhodnému výskytu. Podobně zvýšené u-hodnoty byly zaznamenány i u dávek 0,6 Gy ( $u = 2,59$ ) a 0,8 Gy ( $u = 1,98$ ). Tento výsledek může být způsoben nesprávnou identifikací mikrojadern systémem Metafer, kdy dochází k zaměnění jiných buněčných struktur za mikrojádra – například apoptotických tělísek, barvicích artefaktů nebo fragmentů chromatinu. Problémy může způsobit i kvalita preparátu (rozmazání, špatné zaostření, kontrast).

Z těchto výsledků vyplývá, že automatický režim hodnocení pomocí Metaferu je efektivní a spolehlivý zejména při vyšším biologickém poškození, ale v oblastech nízké expozice vyžaduje doplnění odbornou ruční kontrolou. Zejména u negativních vzorků nebo velmi nízkých dávek hrozí riziko falešně pozitivních nálezů, které mohou významně ovlivnit závěry biodozimetrické analýzy. Proto je v praxi nejvhodnější kombinovat výhody automatizace (rychlost, standardizace) s ruční verifikací podezřelých nebo hraničních výsledků [73]. Na základě dat z automatického odečtu byla vygenerována tabulka koeficientů (Tabulka 6).

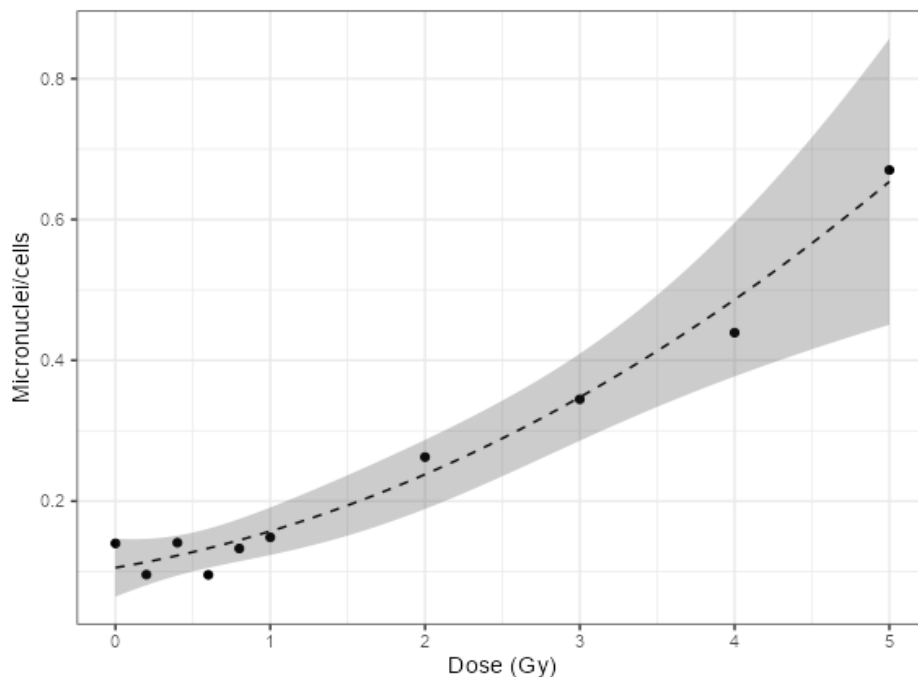
Tabulka 6: Tabulka koeficientů CBMN kalibrační křivky pro automatický režim  
 Tabulka představuje výsledky regresní analýzy pro model dávkové závislosti biologického efektu ve tvaru  $Y = C + \alpha D + \beta D^2$ , kde  $Y$  označuje biologický účinek,  $D$  je absorbovaná dávka záření ve Grayích a  $C$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  jsou koeficienty modelu. Sloupec „estimate“ obsahuje odhadnuté hodnoty těchto koeficientů, „std. error“ uvádí jejich směrodatné chyby, které udávají míru nejistoty v odhadu. Hodnota „statistic“ vyjadřuje výsledek t-testu (poměr odhadu a směrodatné chyby) a „p.value“ udává pravděpodobnost, že daný koeficient není statisticky významný.

Parametr	Odhad (estimate)	Směrodatná chyba (std.error)	Statistika (statistic)	p-hodnota (p.value)
<b>C</b>	0,1055	0,01471	7,169	0,0003645
<b><math>\alpha</math></b>	0,0373	0,0244	1,529	0,3403
<b><math>\beta</math></b>	0,01447	0,006605	2,191	0,1292

$$Y = 0,1055 + 0,0373 \times D + 0,01447 \times D^2$$

Rovnice 5: Dosazené hodnoty z CBMN automatického odečtu

Výsledky regresní analýzy poskytují odhady parametrů kvadratického modelu závislosti biologické odezvy na dávce záření. Konstantní člen ( $C$ ) má hodnotu 0,1055 a je statisticky vysoce významný ( $p = 0,0004$ ), což znamená, že i bez expozice záření existuje určitá základní úroveň biologického poškození, pravděpodobně odrážející přirozené pozadí nebo jiné neionizující vlivy. Lineární koeficient ( $\alpha$ ) má hodnotu 0,0373, avšak jeho p-hodnota 0,3403 ukazuje, že se statisticky významně neliší od nuly, a tedy nelze s jistotou tvrdit, že samotné zvyšování dávky v lineárním vztahu významně ovlivňuje sledovaný efekt. Podobně kvadratický koeficient ( $\beta$ ) s hodnotou 0,01447 má p-hodnotu 0,1292, což znamená, že není statisticky významný na běžné hladině významnosti ( $p < 0,05$ ), ale naznačuje možný trend, který by mohl být potvrzen při větším vzorku dat. Tabulka koeficientů slouží jako podklad pro vznik grafu automatického odečtu mikrojadern (Obrázek 9)



Obrázek 9: Graf kalibrační křivky metody CBMN pro automatický režim

Graf znázorňuje dávkovou odezvu závislost počtu mikrojader na buňku na absorbované dávce ionizujícího záření (v Gy). Na vodorovné ose je uvedena dávka (Dose, Gy), na svislé ose je znázorněn průměrný počet mikrojader na buňku (Micronuclei/cells).

Křivka má konvexní tvar, což potvrzuje nelineární (kvadratickou) závislost biologického účinku na dávce. Tato závislost odpovídá očekávání – při nízkých dávkách je nárůst počtu mikrojader pozvolný, zatímco při vyšších dávkách dochází k prudkému zvýšení poškození [10].

Je patrné, že v oblasti 1–4 Gy je interval spolehlivosti poměrně úzký, což naznačuje vysokou konzistenci a spolehlivost měření. Naopak ve vyšších dávkách (nad 4 Gy) dochází k výraznému nárůstu variability, což může být důsledkem biologického nasycení odezvy nebo zvýšené chybovosti při detekci mikrojader ve výrazně poškozených buňkách. Pro přesnější kvantifikaci v této dávkové oblasti by bylo vhodné zvýšit počet hodnocených buněk nebo provést dodatečnou validaci modelu.

### 6.3 Analýza mikrojader pomocí Metaferu – semiautomatický režim

Pro semiautomatický přístup byly zvoleny stejné vzorky jako pro mikroskopický režim hodnocení mikrojader. Tabulka 4 uvádí výsledky CBMN testu, který byl proveden s využitím automatizovaného skenování a následného softwarového vyhodnocení. Po automatickém vyhodnocení však do procesu vstupuje operátor, který provádí manuální úpravy: kontroluje,

vyhazuje nebo potvrzuje, zda systém správně identifikoval a označil buňky s mikrojádry. V rámci kalibrační řady bylo vyhodnoceno deset dávkových bodů v rozsahu od 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ;1; 2; 3; 4 a 5 Gy. Pro každou dávku je uveden celkový počet analyzovaných BN, z toho počet buněk obsahujících mikrojádra (BN MN+) a počet buněk bez mikrojader (BN MN-). Dále je uvedena distribuce výskytu mikrojader, tedy počet buněk obsahujících přesně 0, 1, 2 až  $\geq 8$  mikrojader. Součet těchto distribučních hodnot odpovídá celkovému počtu hodnocených BN buněk pro danou dávku. Kromě toho tabulka obsahuje absolutní počet detekovaných mikrojader (MN celkem) a jejich relativní výskyt vztažený na 1000 BN buněk (MN/1000 BN). Uvedené údaje slouží jako základ pro konstrukci kalibrační křivky, která popisuje vztah mezi velikostí absorbované dávky a mírou cytogenetického poškození [74, 75]. Data ze semiautomatického odečtu jsou podrobně zpracována v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu CBMN v režimu semiautomatického odečtu

Tabulka zachycuje výsledky semiautomatického odečtu mikrojader v BN buňkách po expozici různým dávkám ionizujícího záření (v rozsahu 0,0–5,0 Gy). Pro každou dávku je uveden počet buněk obsahujících mikrojádra (BN MN+) a počet bez mikrojader (BN MN-), z čehož je vypočítán celkový počet binukleárních buněk (BN celkem). Následuje distribuce mikrojader, tedy které obsahují 0, 1, 2, 3 atd. mikrojader, a to až po hodnotu  $\geq 8$ . Dále je uveden celkový počet mikrojader napočítaných ve všech buňkách (celkem MN) a přepočtený průměrný počet mikrojader na 1000 BN buněk (celkem MN/1000 BN), což je kvantitativní ukazatel pro vyjádření biologické odezvy.

DÁVKA (Gy)	Typ odečítání:	BN MN+	BN MN-	BN celkem	distribuce MN									celkem MN	celkem MN/1000 BN
					0	1	2	3	4	5	6	7	$\geq 8$		
0,0	Semiauto	2	1398	1400	1398	2	0	0	0	0	0	0	0	2	1
0,2		5	1087	1092	1087	5	0	0	0	0	0	0	0	5	5
0,4		12	882	894	882	12	0	0	0	0	0	0	0	12	13
0,6		17	1043	1060	1043	16	1	0	0	0	0	0	0	18	17
0,8		21	898	919	898	18	3	0	0	0	0	0	0	24	26
1,0		22	980	1002	980	20	2	0	0	0	0	0	0	24	24
2,0		144	880	1024	880	127	16	1	0	0	0	0	0	162	158
3,0		276	786	1062	786	229	45	2	0	0	0	0	0	325	306
4,0		288	502	790	502	188	86	13	1	0	0	0	0	403	510
5,0		208	259	467	259	124	65	16	3	0	0	0	0	314	672

Výsledky ukazují, že s rostoucí dávkou záření dochází ke zvyšování počtu mikrojader na buňku. Zatímco při nulové dávce byla zaznamenána pouze 2 mikrojádra (1 mikrojádru na 1000 buněk), při dávce 5,0 Gy bylo detekováno již 314 mikrojader, což odpovídá 672 mikrojádřům na 1000 buněk. Tento nárůst je důkazem dávkově závislé indukce mikrojader, která reflektuje narůstající míru genetického poškození s rostoucí dávkou ionizujícího záření. Výsledky jsou

v souladu s předpokladem kvadratického vztahu mezi dávkou a biologickým účinkem, což lze dále využít k tvorbě kalibrační křivky pro biodozimetrii [67]. Tabulka č.7 byla vložena do programu Biodose Tools (Tabulka 8).

Tabulka 8: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku CBMN v režimu semiautomatického odečtu

Tabulka uvádí souhrnné výsledky cytokinezi blokovaného mikrojaderného testu (CBMN), provedeného na lidských BN buňkách po expozici různé dávce ionizujícího záření (D, v Gy). Pro každou dávku je uveden počet analyzovaných buněk (N), celkový počet detekovaných mikrojader (X), distribuce buněk podle počtu mikrojader (C0–C5), průměrný počet mikrojader na buňku (mean), rozptyl (var), index disperze (DI) a hodnota u-testu (u).

Dávka (Gy)	Počet buněk (N)	Počet mikrojader (X)	C0	C1	C2	C3	C4	C5	Průměr (mean)	Rozptyl (var)	Index disperze (DI)
0,0	1400	2	1398	2	0	0	0	0	0,00	0,00	1,00
0,2	1092	5	1087	5	0	0	0	0	0,00	0,00	1,00
0,4	894	12	882	12	0	0	0	0	0,01	0,01	0,99
0,6	1060	18	1043	16	1	0	0	0	0,02	0,02	1,12
0,8	919	24	898	18	3	0	0	0	0,03	0,03	1,23
1,0	1002	24	980	20	2	0	0	0	0,02	0,03	1,14
2,0	1024	162	880	127	16	1	0	0	0,16	0,17	1,08
3,0	1062	325	786	229	45	2	0	0	0,31	0,31	1,01
4,0	790	403	502	188	86	13	1	0	0,51	0,58	1,14
5,0	467	314	259	124	65	16	3	0	0,67	0,78	1,16

Výsledky ukazují jasnou dávkovou závislost: s rostoucí dávkou záření roste průměrný počet mikrojader na buňku (od 0,00 při 0 Gy až po 0,67 při 5 Gy). Tento trend potvrzuje biologickou odezvu buněk na genotoxický stres způsobený zářením [10]. Ve většině případů se DI pohybuje kolem hodnoty 1 (např. 1,01–1,23), což znamená, že data neprokazují výraznou overdisperzi ani underdisperzi [10, 67]. Výjimkou je dávka 0,8 Gy (DI = 1,23), kde je rozptyl lehce zvýšený. Z dat v této tabulce byly dále zpracovány koeficienty (Tabulka 9).

Tabulka 9: Koeficienty semiautomatického odečtu CBMN

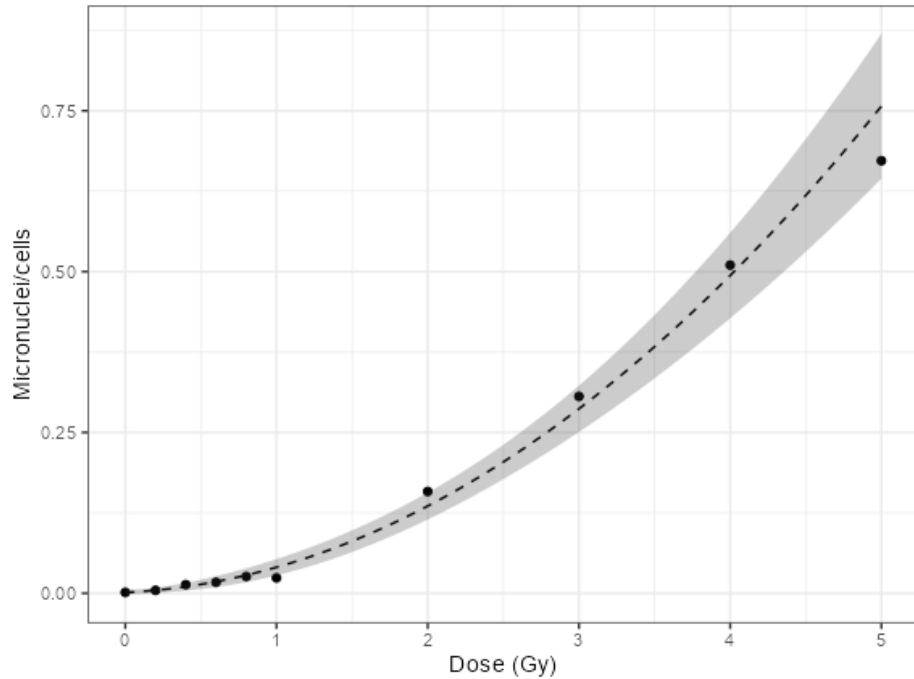
Tabulka představuje výsledky regresní analýzy pro model dávkové závislosti biologického efektu ve tvaru  $Y = C + \alpha D + \beta D^2$  kde  $Y$  označuje biologický účinek,  $D$  je absorbovaná dávka záření ve Grayích a  $C$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  jsou koeficienty modelu. Sloupec „estimate“ obsahuje odhadnuté hodnoty těchto koeficientů, „std.error“ uvádí jejich směrodatné chyby, které udávají míru nejistoty v odhadu. Hodnota „statistic“ vyjadřuje výsledek t-testu (poměr odhadu a směrodatné chyby) a „p.value“ udává pravděpodobnost, že daný koeficient není statisticky významný.

Parametr	Odhad (estimate)	Směrodatná chyba (std. error)	Testovací statistika (statistic)	p-hodnota (p-value)
C	0,0678	0,0466	1,455	0,378
$\alpha$	-0,01975	0,03971	-0,4975	1,268
$\beta$	0,02269	0,007468	3,038	0,03779

$$Y = 0,0678 - 0,01975 \times D + 0,02269 \times D^2$$

Rovnice 6: Dosazené hodnoty z CBMN semiautomatického odečtu

Výsledky ukazují, že konstanta  $C$ , která reprezentuje základní frekvenci mikrojadér bez expozice, má hodnotu 0,0678, avšak její p-hodnota 0,378 ukazuje, že není statisticky významná. Lineární koeficient  $\alpha$  dosáhl hodnoty  $-0,01975$  s velmi vysokou p-hodnotou (1,268), což naznačuje, že přímý lineární vztah mezi dávkou a výskytem mikrojadér nebyl v tomto případě prokázán. Naproti tomu kvadratický koeficient  $\beta$ , který dosáhl hodnoty 0,02269, byl statisticky významný ( $p = 0,03779$ ). To potvrzuje, že mezi dávkou a výskytem mikrojadér existuje významná nelineární (kvadratická) závislost, která je typická pro biodozimetrické odezvy na ionizující záření. Data koeficientů jsou podkladem pro vytvoření grafu závislosti počtu mikrojadér v buňce na dávce (Obrázek 10).



Obrázek 10: Graf kalibrační řady CBMN semiautomatický odečet

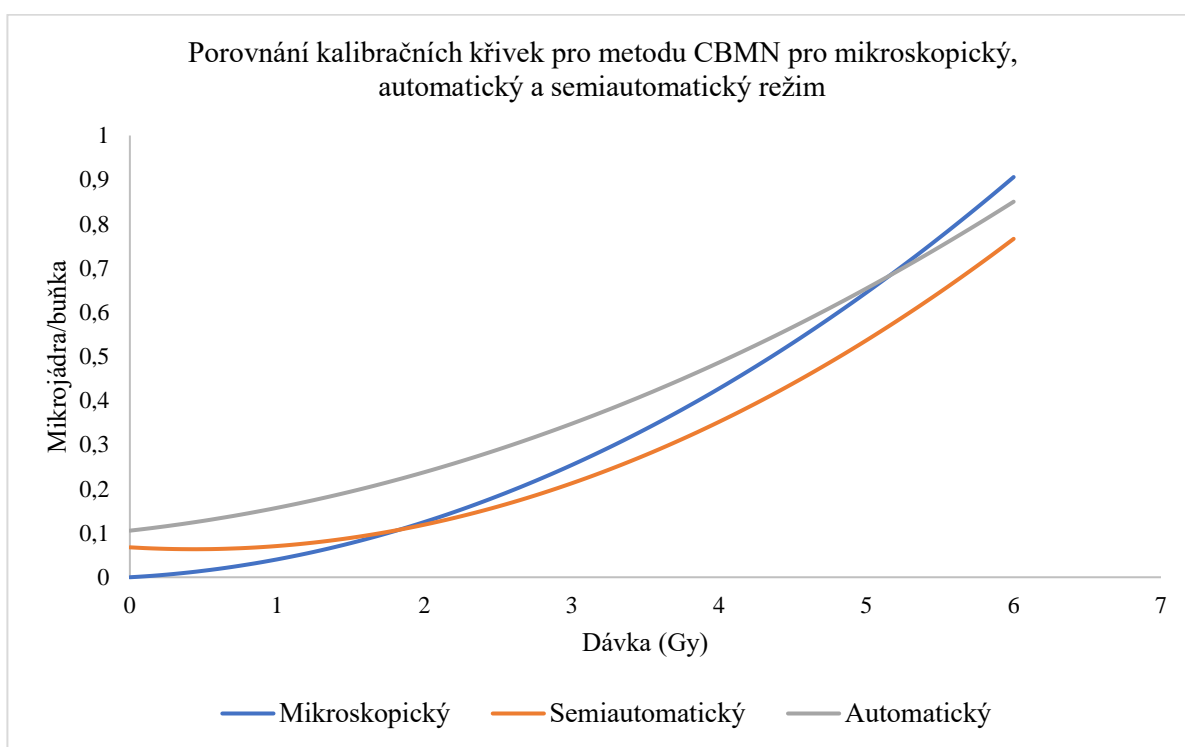
Graf znázorňuje dávkovou odezvu v závislosti počtu mikrojadern na buňku na absorbované dávce ionizujícího záření (v jednotkách Gray – Gy). Na vodorovné ose je uvedena dávka (Dose, Gy), na svislé ose je znázorněn průměrný počet mikrojadern na buňku (Micronuclei/cells).

Celkově graf potvrzuje výsledky regresní analýzy: výskyt mikrojadern roste s dávkou nelineárně, což je v souladu s kvadratickým modelem. Nejvyšší frekvence mikrojadern je patrná kolem dávky 5 Gy, kde se hodnota blíží 0,75 mikrojadern na buňku, zatímco v kontrolní skupině bez ozáření je téměř nulová. Tento průběh potvrzuje, že semiautomatický přístup je schopen spolehlivě zachytit biologickou odpověď na záření.

Šedé pásmo kolem této křivky znázorňuje 95% interval spolehlivosti, který udává rozsah, ve kterém se s danou pravděpodobností nachází skutečná hodnota závislé proměnné. V porovnání s plně automatickým režimem je patrné, že interval spolehlivosti je zde výrazně užší v celém sledovaném dávkovém rozsahu, zejména v oblasti 2–4 Gy, což svědčí o vyšší přesnosti a nižší variabilitě výsledků. Tato skutečnost potvrzuje přínos manuální validace, která v rámci semiautomatického režimu umožňuje korigovat chybné rozpoznání mikrojadern a tím zvyšovat věrohodnost a stabilitu dat. Mírné rozšíření intervalu nad 4 Gy může být přičítáno biologickému nasycení nebo zvýšené variabilitě v odezvě buněk na vysoké dávky záření, avšak celkově zůstává model velmi dobře prediktivní i v této oblasti.

## 6.4 Porovnání kalibračních křivek pro metodu CBMN – mikroskopicky, semiautomaticky a automaticky režim

Graf znázorňuje porovnání kalibračních křivek pro metodu CBMN. Cílem bylo zjistit, jak se jednotlivé přístupy liší hodnocení frekvence mikrojadern a jak ovlivňují tvar kalibrační křivky, která slouží jako podklad pro dávkové odhady v biodozimetrii. U každé dávky byla analýza mikrojadern provedena ve třech režimech hodnocení: mikroskopickém (ručně), semiautomatickém a automatickém, přičemž každý využívá různou míru softwarové asistence při detekci mikrojadern.



Obrázek 11: Porovnání kalibračních křivek pro metodu CBMN pro mikroskopický, automatický a semiautomatický režim

Graf zobrazuje kalibrační křivky tří různých přístupů ke skórování mikrojadern v CBMN testu: mikroskopického (ručního), semiautomatického a plně automatického. Na ose X je dávka ionizujícího záření (v Gy), zatímco osa Y znázorňuje relativní frekvenci mikrojadern na buňku (mikrojadra/buňka).

Z grafu tedy vyplývá, že všechny tři metody sledují obdobný kvadratický trend, avšak liší se zejména v oblasti nízkých dávek, kde je klíčová přesnost detekce. Mikroskopická metoda zůstává zlatým standardem, semiautomatický přístup pomocí Metaferu přináší srovnatelnou přesnost s vyšší efektivitou a automatická metoda je vhodná pro rychlé orientační třídění vzorků, ačkoliv je náchylnější k chybám při nízké expozici [78].

Z grafu je patrné, že všechny tři režimy vykazují nárůst frekvence mikrojadern na buňku se zvyšující se dávkou záření, což potvrzuje dávkově závislou odezvu metody CBMN. **Mikroskopický režim** (modrá křivka) má nejvyšší citlivost při vyšších dávkách, zatímco **semiautomatický režim** (oranžová křivka) vykazuje celkově nižší výskyt mikrojadern, zejména při vyšších dávkách, což může souviset s nižší schopností softwaru rozlišit mikrojadra od jiných struktur. **Automatický režim** (šedá křivka) zprvu nadhodnocuje výskyt mikrojadern při nízkých dávkách, ale při vyšších dávkách se přibližuje mikroskopickému režimu. Výsledky ukazují, že plně automatizovaný režim může vést k falešně vyšším hodnotám v oblasti nízkých dávek, zatímco manuální hodnocení pomocí klasické mikroskopie zůstává nej přesnější, zejména pro účely přesné biodozimetrie

## 6.5 Odečet slepých vzorků CBMN

V rámci CBMN testu je klíčovou součástí každého hodnocení také analýza slepých negativních kontrolních vzorků. Tyto vzorky neprošly žádnou expozicí ionizujícím zářením a slouží k určení tzv. pozadí výskytu mikrojadern, tedy jejich přirozené četnosti bez účinku záření [67, 65].

Kromě slepých neozářených vzorků se v rámci validace a standardizace CBMN testu často používají i tzv. slepé ozářené vzorky. Tyto vzorky jsou předem ozářeny známou dávkou ionizujícího záření, avšak informace o konkrétní dávce není poskytnuta osobě provádějící analýzu. Hlavním cílem tohoto postupu je ověření přesnosti, reprodukovatelnosti a objektivity odečtu, ať už se jedná o ruční, semiautomatický nebo plně automatický přístup [79, 80]. Výsledky získané z těchto vzorků se následně porovnávají s referenční kalibrační křivkou, přičemž rozdíl mezi reálnou a odhadnutou dávkou poskytuje cenné informace o kvalitě celé metodiky (Tabulka 10). Tento přístup je běžně využíván jak při mezilaboratorních porovnáních, tak i při interním ověřování výkonnosti systému. V případě automatizovaných systémů navíc slepé ozářené vzorky umožňují testovat algoritmy rozpoznávání mikrojadern v podmínkách blížících se reálným scénářům [79].

Tabulka 10: Odečet slepých vzorků pro mikroskopický, semiautomatický a automatický režim  
 Název vzorku – kód označující slepý vzorek. BS1 je negativní kontrola (neozářený), BS2 a BS3 jsou slepé ozářené vzorky. Typ odečítání – metoda hodnocení: mikroskopický (ručně), semiautomatický (kombinace software + ruční kontrola), automatický (zcela bez lidského zásahu). BN MN+ – počet binukleárních buněk obsahujících alespoň jedno mikrojádro. BN MN– – počet binukleárních buněk bez mikrojadern. BN celkem – celkový počet binukleárních buněk analyzovaných v daném vzorku.  
 Distribuce MN (C0–C≥8) – rozložení podle počtu mikrojadern v jednotlivých buňkách

BS vzorky	Typ odečítání	BN MN+	BN MN-	BN celkem	distribuce MN									celkem MN	celkem MN/1000 BN
					0	1	2	3	4	5	6	7	≥ 8		
BS1	Mikroskopický	0	300	300	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BS2	Mikroskopický	62	238	300	238	62	0	0	0	0	0	0	0	62	207
BS3	Mikroskopický	86	214	300	214	73	9	4	0	0	0	0	0	103	343
BS1	Semiauto.	2	316	318	316	2	0	0	0	0	0	0	0	2	6
BS2	Semiauto.	137	700	837	700	116	20	1	0	0	0	0	0	159	190
BS3	Semiauto.	269	462	731	462	179	77	11	1	1	0	0	0	375	513
BS1	Auto	12	306	318	306	11	1	0	0	0	0	0	0	13	41
BS2	Auto	150	688	837	688	123	24	2	1	0	0	0	0	181	216
BS3	Auto	225	506	731	506	179	37	8	1	0	0	0	0	281	384

V rámci kontroly kvality a validace odečtových metod byly analyzovány tři slepé vzorky (BS1–BS3) pomocí mikroskopického, semiautomatického a plně automatického hodnocení CBMN testu. Vzorek BS1 sloužil jako negativní kontrola bez předpokládané expozice zářením. U ručního mikroskopického hodnocení nebylo zaznamenáno žádné mikrojádro (0 MN/1000 BN), což potvrzuje vysokou specifitu a preciznost manuální analýzy. Semiautomatický přístup detekoval 2 mikrojadra (6 MN/1000 BN), zatímco plně automatický systém zaznamenal 13 mikrojadern (41 MN/1000 BN). Tento výsledek odráží známou tendenci automatických systémů k mírnému nadhodnocení bazální frekvence mikrojadern, často v důsledku chybných interpretací artefaktů nebo jaderných fragmentů.

U slepých vzorků BS2 a BS3, které byly ozářeny, byl pozorován očekávaný nárůst frekvence mikrojadern. Mikroskopické hodnocení zaznamenalo u BS2 62 mikrojadern (207 MN/1000 BN) a u BS3 103 mikrojadern (343 MN/1000 BN). Semiautomatický odečet vykázal vyšší hodnoty: 159 MN (190 MN/1000 BN) u BS2 a 375 MN (513 MN/1000 BN) u BS3. Automatický odečet vykázal u těchto vzorků opět vyšší hodnoty: 181 MN (216 MN/1000 BN) u BS2 a 281 MN (384 MN/1000 BN) u BS3. Zajímavé je, že zatímco automatická metoda měla u BS2 vyšší výsledek

než semiautomatická, u BS3 tomu bylo naopak – což poukazuje na možný vliv kvality preparátu, denzity buněk či kontrastu mikrojader.

Celkově výsledky potvrzují, že mikroskopické hodnocení vykazuje nejnižší výskyt falešných nálezů. Semiautomatický přístup kombinuje efektivitu s přesností, přičemž výsledky jsou ve velmi dobré shodě s ručním hodnocením. Automatický systém vykazuje vyšší rozptyl a zvýšené hodnoty pozadí, což může být problematické při hodnocení nízkých dávek, ale přesto dobře odlišuje mezi negativními a ozářenými vzorky, což je důležité pro rychlé třídění v nouzových situacích.

Tabulka 11: Odhadované dávky pro slepé vzorky

Pro slepé vzorky BS1–BS3 byly na základě kalibračních křivek vypočteny nízké, odhadované a vysoké hodnoty absorbované dávky záření (Gy). Tyto odhady byly získány zvláště pro každou z metod hodnocení – mikroskopickou, semiautomatickou a automatickou. Tato tříúrovňová interpretace (nízká – střední – vysoká) vyjadřuje interval spolehlivosti nebo rozptyl možného dávkového odhadu podle rozptylu výsledků CBMN testu.

Typ odečtu	Odhad dávky (Gy)
<b>Mikroskopický BS1</b>	0,000 (0,000–0,776)
<b>Mikroskopický BS2</b>	2,668 (2,283–3,054)
<b>Mikroskopický BS3</b>	3,545 (3,147–3,942)
<b>Semiautomatický BS1</b>	0,266 (0,000–0,624)
<b>Semiautomatický BS2</b>	2,405 (2,160–2,650)
<b>Semiautomatický BS3</b>	4,080 (3,771–4,390)
<b>Automatický BS1</b>	0,000 (0,000–0,000)
<b>Automatický BS2</b>	1,761 (1,225–2,297)
<b>Automatický BS3</b>	3,287 (2,772–3,802)

U mikroskopického a automatického hodnocení byla dávka správně odhadnuta jako nulová (0 Gy), čímž obě metody potvrdily svou schopnost správně identifikovat neozářený vzorek. U semiautomatického hodnocení však byl výsledek mírně posunut – odhad se pohyboval mezi 0,266 a 0,624 Gy. Tato odchylka může být způsobena falešně pozitivními mikrojádry, která byla detekována i v kontrolním vzorku.

Mikroskopická metoda odhadla dávku BS2 v rozmezí 2,283–3,054 Gy, přičemž střední hodnota činila 2,668 Gy. Semiautomatická metoda dosáhla velmi podobného výsledku (2,405 Gy), s odchylkou  $\pm 0,245$ . Naopak automatická metoda měla nižší odhad v rozmezí 1,225–2,297 Gy, což značí podhodnocení skutečné dávky. To může být důsledkem nižší schopnosti automatického systému detekovat slabě zřetelná mikrojádra, zejména při středních dávkách.

U vzorku BS3, který simuloval vyšší ozáření, mikroskopická metoda odhadla dávku v rozsahu 3,147–3,942 Gy. Semiautomatické hodnocení poskytlo nejvyšší odhad (až 4,39 Gy), zatímco automatická metoda dala nižší výsledek (2,772–3,802 Gy). Z toho vyplývá, že semiautomatická metoda je nejcitlivější a zaznamenává nejvyšší četnost mikrojadér, zatímco automatické skórování může při vyšších dávkách dávku mírně podhodnocovat, pravděpodobně kvůli ztrátě přehlednosti v buněčné morfologii nebo překryvu mikrojadér.

## **6.6 Analýza dicentrických chromozomů pomocí klasické mikroskopie**

DCA je jednou z mála metod, které umožňují odhalit i částečnou tělesnou expozici, což ji činí zvláště cennou při radiačních nehodách s nerovnoměrným ozářením. Metoda byla standardizována Mezinárodní organizací pro normalizaci (ISO), přičemž každá laboratoř musí stanovit vlastní kalibrační křivky, protože výsledky se mohou mezi jednotlivými pracovišti lišit. Rozdíly mezi jednotlivými laboratořemi při provádění DCA vznikají především z důvodu rozdílných podmínek kultivace, použitých metodik, přístrojového vybavení a odbornosti personálu. Kalibrační křivky, které slouží k převodu počtu dicentrických aberací na odhad absorbované dávky, jsou velmi citlivé na tyto podmínky.

V metodě DCA je klíčovým krokem počítání počtu dicentrických chromozomů ve vybraném souboru mitotických buněk. Standardní protokol Mezinárodní agentury pro atomovou energii (IAEA) doporučuje analyzovat minimálně 500 až 1000 mitóz, ideálně však 1000 buněk, zejména při nízkých dávkách expozice, kdy je výskyt aberací vzácný [10]. Počet buněk volený k analýze přímo ovlivňuje statistickou sílu a přesnost odhadu absorbované dávky. Čím nižší je frekvence dicentrických chromozomů tím více buněk je potřeba analyzovat, aby bylo možné výsledek považovat za spolehlivý. Počet dicentrických chromozomů se zaznamenává pro každou analyzovanou buňku (Tabulka 12), přičemž data se následně použijí k výpočtu průměrné frekvence aberací, indexu disperze a k odhadu dávky pomocí kalibrační křivky (Tabulka 13). Přesnost metody DCA tedy zásadně závisí na počtu analyzovaných buněk a kvalitě mikroskopického odečtu.

Tabulka 12: Hodnoty pro sestrojení kalibrační křivky pro metodu DCA

Kalibrační tabulka pro metodu DCA (Dicentric Chromosome Assay) slouží k zaznamenání frekvence výskytu dicentrických chromozomů v mitotických buňkách po expozici různým dávkám ionizujícího záření. První sloupec tabulky udává dávku záření v jednotkách Gray (Gy), po které následují počty buněk s dicentri (DC+), bez dicentri (DC-) a celkový počet hodnocených buněk (DC celkem). Další část tabulky obsahuje distribuci dicentrických chromozomů (0 až  $\geq 8$  na buňku) – tedy rozdělení podle toho, kolik dicentrických aberací bylo nalezeno v jednotlivých buňkách. Poslední dva sloupce představují celkový počet nalezených dicentrických chromozomů (celkem DCA) a jejich relativní frekvenci přepočtenou na 1000 buněk (DCA/1000 BN), která se používá jako hlavní parametr pro konstrukci kalibrační křivky.

DÁVKA (Gy)	Typ odečítání	DC+	DC-	DC celkem	distribuce DC									celkem DCA	celem DCA/1000 BN
					0	1	2	3	4	5	6	7	$\geq 8$		
0,0	mikroskopicky	0	1000	1000	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,2		8	992	1000	992	8	0	0	0	0	0	0	0	8	8
0,4		20	980	1000	980	20	0	0	0	0	0	0	0	20	20
0,6		17	533	550	533	17	0	0	0	0	0	0	0	17	31
0,8		42	958	1000	958	42	0	0	0	0	0	0	0	42	42
1,0		42	558	600	558	42	0	0	0	0	0	0	0	42	70
2,0		154	846	1000	846	146	7	1	0	0	0	0	0	163	163
3,0		133	531	664	531	122	10	1	0	0	0	0	0	145	218
4,0		46	60	106	60	36	8	2	0	0	0	0	0	58	547
5,0		173	170	343	170	116	45	10	2	0	0	0	0	244	711

Tabulka jasně ukazuje vzrůstající trend s rostoucí dávkou – od nulové frekvence dicentrických chromozomů při 0 Gy po hodnoty přes 700 dicentrických chromozomů na 1000 buněk při 5 Gy. Tento nárůst je typicky nelineární, a je využíván při zpětném odhadu neznámé dávky záření na základě biologického účinku. Distribuce dicentrických chromozomů navíc poskytuje informace o rovnoměrnosti ozáření, přičemž nadměrný výskyt vícečetných aberací může naznačovat nehomogenní nebo částečnou expozici. Kalibrační tabulka tak představuje klíčový nástroj pro biologickou dozimetrii, standardizaci výsledků a srovnávání mezi laboratořemi [10, 65].

Tabulka 13: Biodose Tool vygenerovaná tabulka pro kalibrační křivku DCA

Tabulka shrnuje výsledky DCA získané při dávkách ionizujícího záření v rozmezí 0,0 až 5,0 Gy. Každý řádek zahrnuje následující údaje: počet analyzovaných mitotických buněk (N), celkový počet nalezených dicentrických chromozomů (X), distribuci buněk podle počtu dicentrů (C0–C5), průměrný počet dicentrů na buňku (mean), rozptyl (var) a index disperze (DI).

Dávka (Gy)	Počet buněk (N)	Počet mikrojadér (X)	C0 (0 MN)	C1	C2	C3	C4	C5	Průměr (mean)	Rozptyl (var)	Index disperze (DI)
0,0	1000	0.0	1000	0	0	0	0	0	0,0	0,0	1,0
0,2	1000	8.0	992	8	0	0	0	0	0,01	0,01	0,99
0,4	1000	20.0	980	20	0	0	0	0	0,02	0,02	0,98
0,6	550	17.0	533	17	0	0	0	0	0,03	0,03	0,97
0,8	1000	42.0	958	42	0	0	0	0	0,04	0,04	0,96
1,0	600	42.0	558	42	0	0	0	0	0,07	0,07	0,93
2,0	1000	163.0	846	146	7	0	0	0	0,16	0,16	0,93
3,0	664	145.0	531	122	10	1	0	0	0,22	0,21	0,96
4,0	106	58.0	60	36	8	2	0	0	0,55	0,52	0,94
5,0	343	244.0	170	116	45	10	2	0	0,71	0,71	1,0

Výsledky ukazují, že v negativní kontrole (0,0 Gy) nebyl nalezen žádný dicentrický chromozom, což odpovídá očekávanému nulovému biologickému pozadí [10]. S rostoucí dávkou se počet dicentrických aberací výrazně zvyšuje – například při 2,0 Gy bylo detekováno 163 dicentriků a při 5,0 Gy již 244 dicentriků, což odpovídá 711 dicentriků na 1000 buněk.

Průměrný počet dicentrických chromozomů na buňku i rozptyl postupně narůstají, což je typickým znakem radiačního poškození DNA. Index disperze (DI) se u všech dávek pohybuje blízko hodnoty 1, což znamená, že distribuce dicentrických chromozomů v buňkách odpovídá Poissonovu rozdělení – tedy že dicentrické chromozomy vznikají náhodně a nezávisle v jednotlivých buňkách, což je očekávané u homogenního ozáření [81]. Tato tabulka byla vložena do Biodose Tools a z ní byly vypočítány parametry (Tabulka 14) z dat v tabulce je pak v programu vytvořen graf kalibrační křivky DCA (Obrázek 12).

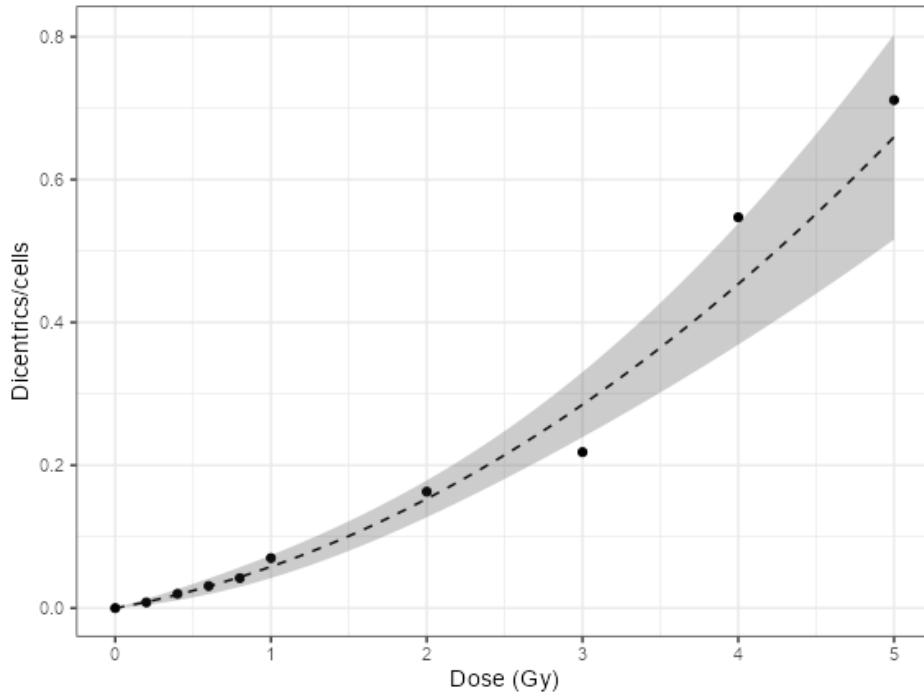
Tabulka 14: Tabulka koeficientů DCA kalibrační křivky pro mikroskopický odečet

Parametr	Odhad (estimate)	Směrodatná chyba (std. error)	Statistika (statistic)	p-hodnota (p.value)
<b>C</b>	$1,839 \times 10^{-12}$	$2,989 \times 10^{-7}$	$6,152 \times 10^{-6}$	2,000
<b><math>\alpha</math></b>	$3,957 \times 10^{-2}$	$7,974 \times 10^{-3}$	4,962	$3,266 \times 10^{-3}$
<b><math>\beta</math></b>	$1,847 \times 10^{-2}$	$3,136 \times 10^{-3}$	5,889	$1,213 \times 10^{-3}$

$$Y = 1,839 \times 10^{-12} + 0,03957 \times D + 0,01847 \times D^2$$

Rovnice 7: Dosazené hodnoty z DCA mikroskopický odečet

Hodnota konstanty C byla stanovena jako  $1,839 \times 10^{-12}$ , což je prakticky nulová hodnota, odpovídající očekávané absenci dicentrických aberací u neozářených vzorků. Tento parametr však nebyl statisticky významný ( $p = 2,000$ ). Lineární koeficient  $\alpha$  byl odhadnut na  $3,957 \times 10^{-2}$  a jeho statistická významnost ( $p = 0,003266$ ) ukazuje, že počet dicentrických chromozomů roste lineárně se zvyšující se dávkou v počátečním dávkovém rozmezí. Kvadratický koeficient  $\beta$ , s hodnotou  $1,847 \times 10^{-2}$ , byl rovněž statisticky vysoce významný ( $p = 0,001213$ ), což potvrzuje, že při vyšších dávkách dochází k urychlenému nárůstu výskytu dicentrických aberací. Tyto výsledky svědčí o tom, že model přesně popisuje biologickou odezvu buněk na ionizující záření, přičemž růst počtu dicentrických chromozomů je nejprve lineární a následně kvadratický. Významnost lineárního i kvadratického členu plně odpovídá známým biologickým mechanismům poškození DNA působením záření [10, 81].



Obrázek 12: Kalibrační křivka metody DCA

V grafu je znázorněna kalibrační křivka získaná metodou DCA která vyjadřuje závislost mezi dávkou ionizujícího záření (osa X, v jednotkách Gy) a průměrným počtem dicentrických chromozomů na jednu mitotickou buňku (osa Y).

Z grafu je patrný kvadratický růst počtu dicentrických chromozomů s rostoucí dávkou, což odpovídá známým biologickým mechanismům účinku ionizujícího záření – při vyšších dávkách dochází k výraznému nárůstu chromozomových aberací. Tento vztah je využíván pro zpětný odhad absorbované dávky v případě neznámé expozice, například po radiačních nehodách. Přesnost modelu je potvrzena těsným přilnutím dat k regresní křivce a relativně úzkým intervalem spolehlivosti. Graf tedy představuje klíčový nástroj pro biologickou dozimetrickou kalibraci a následné dávkové odhady pomocí DCA [9, 64].

Interval spolehlivosti je nejpřesnější v oblasti 1–3 Gy, kde jsou hodnoty modelu i experimentálních dat v dobré shodě a rozptyl minimální. V oblasti vysokých dávek (nad 4 Gy) dochází k rozšíření intervalu, což indikuje nárůst variability ve výskytu dicentrických chromozomů, pravděpodobně v důsledku stochastických biologických efektů nebo omezeného počtu analyzovaných buněk v těchto dávkách. Přesto si model zachovává vysokou prediktivní hodnotu a poskytuje spolehlivý podklad pro odhad dávky záření v rámci cytogenetické biodozimetrie.

## 6.7 Odečet slepých vzorků DCA

V rámci validace a zajištění kvality analýzy se v metodě DCA běžně používají tzv. slepé vzorky. Jedná se o preparáty, které jsou označeny kódem bez znalosti jejich skutečné dávky ozáření u osoby provádějící hodnocení. Tento přístup simuluje reálné podmínky krizového biologického třídění, kdy pracovník neví, zda analyzovaný vzorek pochází od ozářené osoby či nikoliv. Slepé vzorky mohou být buď neozářené (negativní kontroly), nebo uměle ozářené známou dávkou a následně zpracované standardním způsobem, čímž umožňují nezávislé ověření přesnosti odečtu.

Za účelem ověření přesnosti, validity a specificity cytogenetického hodnocení byly analyzovány tři slepé vzorky označené jako BS1 až BS3 metodou mikroskopického odečtu dicentrických chromozomů (Tabulka 15). Vzorek BS1 sloužil jako negativní kontrola – nebyl vystaven ionizujícímu záření, což se potvrdilo i výsledkem analýzy: nebyl detekován žádný dicentrický chromozom ve vzorku 1000 buněk, čímž byla potvrzena vysoká specificita ruční analýzy. Naproti tomu vzorky BS2 a BS3 představovaly neznámé ozářené vzorky, jejichž hodnocení odhalilo významný výskyt chromozomových aberací svědčící o předchozí expozici ionizujícímu záření.

Tabulka 15: DCA slepé vzorky mikroskopický režim  
V rámci kontroly přesnosti a validity byly analyzovány tři slepé vzorky (BS1–BS3) pomocí mikroskopického odečtu DCA.

DÁVKA (Gy)	Typ odečítání	DC+	DC-	DC celkem	distribuce DC								celkem DCA	celkem DCA/1000 BN	
					0	1	2	3	4	5	6	7			≥ 8
BS1	Mikroskopický	0	300	300	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BS2	Mikroskopický	62	238	300	238	62	0	0	0	0	0	0	0	62	207
BS3	Mikroskopický	86	214	300	214	73	9	4	0	0	0	0	0	103	343

Ve vzorku BS2 bylo nalezeno celkem 62 buněk s alespoň jedním dicentrickým chromozomem z celkových 300 hodnocených (207 DCA/1000 buněk), přičemž všechny obsahovaly právě jednu aberaci. U vzorku BS3 byl výskyt dicentrických chromozomů ještě vyšší – 86 pozitivních buněk z 300 (343 DCA/1000 buněk), přičemž část buněk obsahovala více než jeden dicentrický chromozom: 73 buněk mělo jeden, 9 mělo dva a 4 buňky dokonce tři dicentrické chromozomy. Tento výsledek dokládá dávkově závislý nárůst genetického poškození, a současně i to, že metoda DCA umožňuje nejen kvantifikaci celkové aberace, ale také hodnocení distribuce dicentrických chromozomů mezi buňkami. Tabulka naměřených slepých vzorků byla vložena

do Biodose Tools a následně z těchto dat byly vypočítány přepokládané dávky (**Chyba! Nenašel jsem zdroj odkazů.**).

Tabulka 16: Odhad dávky slepých vzorků DCA

Typ odečtu	Odhad dávky (Gy)
Mikroskopický BS1 (DCA)	0,000 (0,000–0,287)
Mikroskopický BS2 (DCA)	2,442 (1,984–2,991)
Mikroskopický BS3 (DCA)	3,371 (2,862–4,057)

## 6.8 Vyhodnocení slepých vzorků

Po doměření slepých vzorků a vytvoření odhadů obdržovaných dávek byla zjištěna skutečná hodnota záření, které slepé vzorky obdržely. Vzorek BS1 byl negativní vzorek neobdržel žádnou dávku Gy. U tohoto vzorku došlo ke shodě ve všech odečtech, a to jak pro odečet mikrojader, tak pro odečet dicentrických chromozomů za použití všech přístupů odečtů. V tabulce níže jsou znázorněny odchylky režimů od reálné dávky (Tabulka 17)

Tabulka 17: Odchylky slepého vzorku BS1

Metoda a test	Nízký odhad (Gy)	Odhadovaná dávka (Gy)	Vysoký odhad (Gy)	Odchylka od reálné dávky (0 Gy)
CBMN – Mikroskopie	0,000	0,000	0,287	0,000
CBMN – Semiautomat.	0,000	0,266	0,624	0,266
CBMN – Automat	0,000	0,000	0,000	0,000
DCA – Mikroskopie	0,000	0,000	0,000	0,000

Vzorek BS2 byl ozářen dávkou 1,8 Gy. Zde došlo k velkým odchylkám, které jsou podrobně zpracovány v následující tabulce (Tabulka 18).

Tabulka 18: Odchylyky slepého vzorku BS2

V tabulce jsou znázorněny přístupy odečtu aberací, Nízký odhad (Gy), Odhadovaná dávka (Gy), Vysoký odhad (Gy) a odchylka od reálné dávky ozáření.

Metoda a test	Nízký odhad (Gy)	Odhadovaná dávka (Gy)	Vysoký odhad (Gy)	Odchylka od reálné dávky (1,8 Gy)
<b>CBMN – Mikroskopie</b>	2,283	2,668	3,054	+0,868 Gy
<b>CBMN – Semiautomat</b>	2,16	2,405	2,65	+0,605 Gy
<b>CBMN – Automat</b>	1,225	1,761	2,297	-0,039 Gy
<b>DCA – Mikroskopie</b>	1,984	2,442	2,991	+0,642 Gy

Při hodnocení slepého vzorku BS2, který byl vystaven reálné dávce 1,8 Gy, byly zjištěny odchylky v odhadovaných dávkách mezi mikroskopickým a semiautomatickým odečtem v rámci CBMN testu. Mikroskopický odečet poskytl střední odhad 2,668 Gy, zatímco semiautomatický odečet odhadoval dávku na 2,405 Gy. Obě metody tedy nadhodnotily skutečnou dávku, přičemž mikroskopický odečet vykazoval větší odchylku.

V obou případech, kdy došlo k zásahu pracovníka do hodnocení došlo k nadhodnocení dávky na rozdíl od automatického přístupu, který v tomto případě dávku určil správně. Vzorek BS3 byl ozářen dávkou 3,6 Gy. Odchylyky naměřených hodnot od reálné obdržené dávky jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 19).

Tabulka 19: Odchylyky slepého vzorku BS3

V tabulce jsou znázorněny přístupy odečtu aberací, Nízký odhad (Gy), Odhadovaná dávka (Gy), Vysoký odhad (Gy) a odchylka od reálné dávky ozáření.

Metoda a test	Nízký odhad (Gy)	Střední odhad (Gy)	Vysoký odhad (Gy)	Odchylka od reálné dávky (Gy)
<b>CBMN – Mikroskopie</b>	2,862	3,371	4,057	-0,229
<b>CBMN – Semiautomat</b>	3,771	4,08	4,39	0,48
<b>CBMN – Automat</b>	2,772	3,287	3,802	-0,313
<b>DCA – Mikroskopie</b>	2,862	3,371	4,057	-0,229

Nejlepší shodu s reálnou dávkou poskytla CBMN metoda mikroskopicky a zároveň také DCA mikroskopicky, obě s odchylkou -0,229 Gy. Tento výsledek potvrzuje, že ruční hodnocení může být velmi přesné, pokud je prováděno zkušeným hodnotitelem a za přísně kontrolovaných laboratorních podmínek [82].

Naopak CBMN automatický odečet vykázal větší podhodnocení dávky  $-0,313$  Gy, pravděpodobně v důsledku striktního nastavení algoritmu, který může některé atypické mikrojaderné struktury vynechat. CBMN semiautomatický odečet poskytl nejvyšší odhad s kladnou odchylkou  $+0,480$  Gy, což může být způsobeno přítomností lidského faktoru při manuálním dohledu nad automatickým rozpoznáváním. V praxi může docházet ke kumulaci mírných nadhodnocení jednotlivých událostí, které následně zvyšují výsledný dávkový odhad [78].

## 7 DISKUZE

Cytogenetické metody, zejména dicentrická analýza chromozomů a mikrojaderný test, patří mezi klíčové nástroje biodozimetrie sloužící k retrospektivnímu odhadu absorbované dávky ionizujícího záření. Vzhledem k tomu, že *in vivo* sledování účinků záření u lidí je velmi omezené, *in vitro* model představuje zásadní roli při vývoji a standardizaci metod kvantifikace radiačního poškození [10, 65].

Dílním cílem této práce bylo hodnocení a kvantifikace poškození DNA indukované ionizujícím zářením *in vitro* v lidských periferních lymfocytech za použití dvou cytogenetických metod: CBMN a DCA. Tyto metody jsou založené na odlišném principu detekce genetického poškození a umožňují detailní sledování účinků ionizujícího záření na genom na buněčné úrovni. V této práci byla pozornost zaměřena na *in vitro* model lidských periferních lymfocytů, který je vzhledem ke své dostupnosti a vysoké radiosenzitivitě považován za ideální systém pro studium radiačního poškození u člověka. Experimentální protokoly byly navrženy tak, aby umožnily přesné porovnání výsledků CBMN a DCA metod v podmínkách simulujících reálné ozáření. Výsledky získané pomocí obou metod byly následně vzájemně porovnány a hodnoceny s ohledem na citlivost, dynamický rozsah a praktickou využitelnost v kontextu retrospektivního odhadu absorbované dávky u ozářených osob. Toto komplexní srovnání umožnilo vyhodnotit silné a slabé stránky obou metod a přispívá k lepšímu porozumění jejich aplikačním možnostem v biologické dozimetrické praxi.

Pro účely použití těchto metod v biodozimetrii je nezbytné vypracování přesné kalibrační křivky, která kvantifikuje vztah mezi absorbovanou dávkou a frekvencí detekovaných aberací (dicentrických chromozomů nebo mikrojader). Vytvoření kalibrační křivky *in vitro* zahrnuje ozáření vzorků lidské krve známými dávkami záření, následné kultivace lymfocytů, jejich zpracování standardizovaným protokolem a analýzu biologické odpovědi [10]. Tvorba vlastní kalibrační křivky je nezbytná vzhledem k odlišnostem v laboratorních postupech. Na vlastní kalibrační křivky a postupy je kladen velký důraz, což je i zdůrazněno v rámci mezinárodních mezilaboratorních porovnaní, například v rámci projektu RENEB [87].

V této práci byly metodami CBMN a DCA vytvořeny kalibrační křivky *in vitro* v lidských periferních lymfocytech a jejich parametry byly následně porovnány s výsledky publikovanými v odborné literatuře.

Pro kvantifikaci chromozomální nestability indukované  $\gamma$ -zářením byl v této práci použit CBMN. Mikrojádra jsou známým produktem neopravených nebo chybně opravených dvojitých zlomů DNA procesem NHEJ, přičemž jejich četnost silně koreluje s dávkou a kvalitou záření [89]. V této práci byla vytvořena kalibrační křivka CBMN testu pro lidské periferní lymfocyty ozářené  $\gamma$ -zářením v dávkovém rozmezí 0–5 Gy. Výsledky ukázaly klasický lineárně-kvadratický trend odpovídající obecně popisovanému vztahu mezi dávkou a frekvencí mikrojadra [67, 77]. Tento model zohledňuje přímé poškození způsobené jednotlivými ionizačními událostmi (lineární složka) i efekty interakcí (kvadratická složka) [9].

Manuální mikroskopický odečet CBMN testu poskytl v této práci údaje dobře kopírující lineárně-kvadratický vztah mezi dávkou záření a frekvencí mikrojadra. Hodnoty ukazovaly mírné nadhodnocení odhadu dávky, zejména v rozmezí 1–3 Gy. Tento jev je v souladu s literaturou, kde manuální odečet trpí subjektivitou a závislostí na zkušenostech hodnotitele [90]. Ve srovnání s mezinárodními daty [91] byla frekvence MN/1000 BN v této práci vyšší o cca 10–15 %. Tento trend je vysvětlitelný vyšší subjektivitou manuálního hodnocení a zařazením nepravých mikrojadra [84]. Studie Fenech (2000) potvrzuje, že při vysoké frekvenci mikrojadra může docházet k nesprávnému začlenění artefaktů, což vede ke zvýšenému počtu pozitivních buněk a tím k nadhodnocení dávky [65]. Ve vyšších dávkách (>3 Gy) se trend křivky blížil očekávaným hodnotám, což je v souladu s RENE B daty, kde bylo pozorováno, že manuální hodnocení lépe zachytí komplexní poškození. Nicméně tento přístup je zároveň spojen s vyšší mírou variability výsledků, a to kvůli subjektivnímu hodnocení pozorovatele a rozdílům v interpretaci atypických struktur v buněčných jádrech. Z toho plyne, že ačkoli manuální odečet přináší výhodu ve schopnosti odhalit detailní poškození, jeho využití vyžaduje vysokou standardizaci postupů a školení hodnotitelů pro minimalizaci meziosobní variability

Semiautomatický přístup poskytl výsledky velmi blízké literárním kalibračním křivkám, zejména v dávkovém rozmezí 0,5–4 Gy [91]. Hodnoty MN/1000 BN v této práci přesně odpovídaly hodnotám uvedeným v RENE B interlaboratorní studii pro  $\gamma$ -záření, přičemž odchylky nepřesáhly  $\pm 10$  % [85]. Při vyšších dávkách (>4 Gy) však došlo k mírnému podhodnocení počtu mikrojadra. Tento jev se u semiautomatického algoritmu vyskytuje v důsledku přehlížení mikrojadra v buňkách se zhoršenou morfologií [80].

Automatický odečet CBMN poskytl výsledky s nejlepší shodou v dávkovém rozmezí 0,2–3 Gy. Hodnoty MN/1000 BN byly v této oblasti prakticky identické s daty publikovanými v pracích

[87, 80]. Nicméně, při dávkách vyšších než 4 Gy bylo pozorováno mírné podhodnocení frekvence mikrojader o 10–15 %, což je v souladu se známou limitací automatizovaných systémů při hodnocení buněk s komplexním poškozením [80]. Tyto výsledky potvrzují, že automatizace je vhodná pro rychlý screening středních dávek, ale při vyšších dávkách je doporučeno doplnit analýzu ručním přehodnocením.

Slepé vzorky BS1, BS2 a BS3 byly hodnoceny všemi přístupy. Výsledky ukazují, že, mikroskopický odečet vedl k nadhodnocení dávky u BS2 o +0,868 Gy nad reálnou dávku 1,8 Gy, což je v souladu s tvrzením, že manuální metody mají tendenci nadhodnocovat vzorky [65]. Semiautomatický odečet vykázal pouze mírné průměrné nadhodnocení +0,605 Gy, potvrzující vyšší konzistenci výsledků u tohoto přístupu [77, 87]. Automatický odečet měl nejnížší průměrnou odchylku od reálné dávky (-0,039 Gy), což potvrzuje jeho vhodnost pro rychlé a přesné určení středních dávek [87, 80].

Automatický odečet vykázal nejnížší odchylku od reálné dávky mezi všemi analyzovanými přístupy. U slepého vzorku BS2 byla odhadnutá dávka 1,761 Gy při reálné dávce 1,8 Gy, což odpovídá odchylce pouze -0,039 Gy. Tento výsledek dokládá vysokou přesnost plně automatizovaného hodnocení zejména v rozsahu nízkých až středních dávek (1–3 Gy) [87, 80]. Podobné výsledky byly zaznamenány i ve studii Moquet et al. (2023), kde bylo potvrzeno, že moderní automatické systémy založené na obrazové analýze (např. Metafer) dosahují vysoké shody s manuálním odečtem v oblasti standardní biodozimetrie, s odchylkami menšími než  $\pm 0,1$  Gy u dávek pod 3 Gy [80]. Dále studie Port et al. (2023), která byla realizována v rámci evropského projektu RENEb (Realising the European Network of Biodosimetry), poukazuje na základní výhody využití automatizovaných přístupů v biodozimetrii. Jedním z hlavních přínosů je výrazné zvýšení propustnosti vzorků, což znamená, že je možné zpracovat a analyzovat větší množství preparátů v kratším čase. Další výhodou je standardizace výsledků mezi laboratořemi. Automatizované systémy využívají algoritmy pro detekci a klasifikaci chromozomálních aberací proto dochází k minimalizaci rozdílů mezi laboratořemi, které mohou vznikat v důsledku různých pracovních postupů nebo rozdílných zkušeností personálu. Díky automatizovaným přístupům se zvyšuje celková spolehlivost a srovnatelnost biodozimetrických metod na mezinárodní úrovni [87].

Výsledky testu CBMN testu ve studii Moquet et al. (2023) potvrdily, že volba metody odečtu zásadně ovlivňuje přesnost a reprodukovatelnost stanovení absorbované dávky. Mikroskopický

přístup vykázal nejvyšší přesnost a nejnižší míru falešných nálezů. U slepého vzorku BS1 nebylo zaznamenáno žádná mikrojadra, naopak automatický odečet detekoval 13 mikrojadra, což odráží tendenci k mírnému nadhodnocení v důsledku falešně pozitivních detekcí artefaktů. U ozářených vzorků BS2 a BS3 došlo u všech metod ke zvýšení frekvence mikrojadra, přičemž nejpřesnějšího odhadu dávky bylo dosaženo automatickým režimem. Například u vzorku BS2 byla automatem stanovená dávka 1,761 Gy při reálné dávce 1,8 Gy, s odchylkou pouhých - 0,039 Gy. Tento výsledek potvrzuje vhodnost automatického systému pro rychlý a spolehlivý screening zejména ve středních dávkách (1–3 Gy) [10, 80]. Semiautomatická metoda se ukázala jako efektivní kompromis. Kombinuje vysokou přesnost s výrazně vyšší efektivitou oproti ručnímu hodnocení. Odečet slepého vzorku BS3 pomocí semiautomatu dosáhl velmi dobré shody s referenční kalibrační křivkou, s maximální odchylkou do  $\pm 10\%$ , což odpovídá hodnotám uváděným v interlaboratorních studiích RENEB. Při vyšších dávkách (>4 Gy) došlo v případě plně automatického odečtu k mírnému podhodnocení, což je v souladu s literaturou a bývá vysvětlováno změnami morfologie buněk a neschopností algoritmu správně detekovat atypická mikrojadra. Mikroskopická a semiautomatická metoda si však i v tomto rozsahu zachovaly relativně vysokou přesnost [92, 96].

Celkově lze shrnout, že pro rutinní biodozimetrické využití CBMN testu je ideální semiautomatická metoda. Mikroskopický odečet zůstává zlatým standardem pro detailní analýzu, avšak časově náročným. Automatizace přináší výrazné zrychlení a je vhodná především při nutnosti rychlého screeningu větších populací, typicky v rámci mimořádných radiačních událostí.

Dicentrická analýza chromozomů (DCA) je považována za zlatý standard biodozimetrie díky své vysoké specifitě a prediktivní schopnosti ve vztahu mezi absorbovanou dávkou a počtem dicentrických chromozomů [10]. V této práci byla kalibrační křivka DCA vytvořena v dávkovém rozsahu 0–5 Gy a vykazovala očekávaný lineárně-kvadratický vztah mezi dávkou záření a frekvencí dicentrických aberací. Průběh kalibrační křivky DCA vytvořené v této práci přesně reflektoval trendy popsané v odborné literatuře. Výsledky ukazují charakteristickou lineárně-kvadratickou závislost frekvence dicentrických chromozomů na absorbované dávce ionizujícího záření, což je v souladu se základními biologickými principy radiačního poškození DNA. V oblasti nízkých dávek bylo zaznamenáno relativně nízké množství dicentrických chromozomů na 1000 buněk. Tento fakt je důkaz, že citlivost DCA k detekci nízkých dávek je omezená, přičemž spolehlivá detekce začíná kolem dávky 0,2 Gy [93] Pod touto hranicí může

být frekvence aberací blízká přirozenému pozadí, což ztěžuje odlišení ozářených vzorků od neozářených vzorků [94].

Ve středním dávkovém rozmezí bylo dosaženo lineárního nárůstu frekvence dicentrických chromozomů v přímé úměře k absorbované dávce. Výsledky v tomto rozsahu nevykazovaly žádné významné odchylky od kalibračních křivek publikovaných [95]. Toto dávkové rozmezí je považováno za optimální pro biodozimetrické použití DCA, protože zde dochází k nejpřesnějšímu a nejreprodukovatelnějšímu odhadu absorbovaných dávek [10].

Při vyšších dávkách nad 4 Gy byl pozorován mírný pokles frekvence dicentriků na buňku. Tento pokles je biologicky vysvětlitelný zvýšenou letalitou buněk – při vyšších dávkách ionizujícího záření dochází k masivnímu poškození DNA, což vede ke smrti buněk ještě před vstupem do mitózy, a tím k poklesu počtu detekovatelných dicentrických chromozomů. Tento jev je standardně zohledňován při interpretaci biodozimetrických výsledků, zejména u vážných radiačních expozic [86].

Vyhodnocení slepých vzorků metodou dicentrické analýzy chromozomů (DCA) bylo provedeno za účelem ověření správnosti vytvořené kalibrační křivky a validace výsledků dosažených v této práci. Celkem byly analyzovány tři slepé vzorky (BS1, BS2, BS3), k jejich odečtu byl použit mikroskopický přístup. Výsledky u neozářeného slepého vzorku BS1 prokázaly nulovou frekvenci dicentrických chromozomů mezi analyzovanými 300 buňkami. Tento nálezný je v souladu s očekáváním, že zdravá lidská populace vykazuje velmi nízké nebo nulové spontánní pozadí dicentrických chromozomů. Takový výsledek potvrzuje správné laboratorní postupy a odpovídá hodnotám uváděným v mezinárodních doporučeních [10, 86].

U slepého vzorku BS2, vystaveného reálné dávce 1,8 Gy, byla odhadnutá dávka pomocí DCA přibližně 2,442 Gy. Tento výsledek představuje odchylku +0,642 Gy, což svědčí o mírném nadhodnocení odhadu dávky. Podobné odchylky byly popsány i v literatuře a jsou připisovány biologické variabilitě jednotlivých buněk, subjektivnímu hodnocení vzhledu dicentriků a přirozeným statistickým fluktuacím při manuálním odečtu [86]. U slepého vzorku BS3, který byl vystaven dávce 3,6 Gy, byla odhadnutá dávka v rozmezí 3,371–4,057 Gy. Tato hodnota ukazuje na velmi dobrou přesnost odhadu s maximální odchylkou nepřesahující 15 %. Tento výsledek je v souladu s mezinárodně uznávanými standardy biodozimetrie, kde je akceptovatelná odchylka od reálné dávky  $\pm 20\%$  [10, 93].

Celkově lze konstatovat, že výsledky vyhodnocení slepých vzorků potvrzují spolehlivost metody DCA pro retrospektivní odhady dávek ionizujícího záření, zejména ve středních a vyšších dávkových rozmezech. Přesto je nutné mít na paměti, že i při správném laboratorním provedení může být metoda ovlivněna biologickou variabilitou a subjektivními faktory při hodnocení aberací.

Kalibrační křivky (frekvence mikrojadern vs. dávka) mají u všech tří hodnocených přístupů podobný průběh – s rostoucí dávkou přibývá mikrojadern a křivka se při vysokých dávkách postupně zplošťuje vlivem zpomalení buněčného dělení. Mezi metodami však existují rozdíly v detailech. Při nízkých dávkách okolo 0 Gy začínají manuální mikroskopické i semiautomatické hodnocení na velmi nízké výchozí frekvenci mikrojadern to odpovídá biologickému pozadí, zatímco plně automatická analýza má mírně vyšší počáteční hodnotu. Automatizované systémy totiž obvykle vykazují zvýšenou bazální frekvenci mikrojadern oproti ručnímu počítání, což je způsobeno falešnými nálezy – software může chybně vyhodnotit uvolněný jaderný materiál či artefakty barvení jako mikrojadern [76]. Tyto artefakty lidský pozorovatel většinou správně rozpozná a nezapočítá. Ve spodním dávkovém rozmezí (0–2 Gy) proto může plně automatická křivka ležet o něco výše (vyšší pozadí) než u manuální metody. Celkový nárůst mikrojadern s dávkou je v této nízké oblasti pozvolný a téměř lineární; drobné odchylky strmosti křivky u automatického počítání mohou nastat v důsledku nižší detekční efektivity (např. slabě obarvená mikrojadern mohou automatu unikát) [73, 76]. Moderní automatizované systémy však mají detekční účinnost již srovnatelnou s ručním hodnocením, takže při správné kalibraci je sklon křivky obdobný jako u mikroskopické metody [70, 76]. Ve středních dávkách (cca 2–4 Gy) dochází u všech metod k prudšímu nárůstu frekvence mikrojadern – data dobře sledují např. lineárně-kvadratický model závislosti [77]. Semiautomatická analýza v tomto rozmezí poskytuje výsledky prakticky totožné s ručním hodnocením, protože kombinace automatického vyhledávání a lidské kontroly zajišťuje jak vysokou citlivost, tak minimální počet falešných záznamů. Plně automatizované vyhodnocení také zaznamenává výrazný nárůst mikrojadern se stoupající dávkou, avšak může se objevit lehce odlišná křivka (např. mírně vyšší či nižší hodnoty) v závislosti na kvalitě preparátu a nastavení softwaru [51, 73, 76]. Při vysokých dávkách (~5–6 Gy) se křivky všech metod začínají ploštit. CBMN test zde naráží na biologický limit, kdy mnoho buněk již nedokončí dělení a frekvence mikrojadern se blíží maximu. Ruční a semiautomatické hodnocení stále detekují relativně vysoké počty mikrojadern (odpovídající dávce), zatímco plně automatickým přístupem může v této oblasti dojít k podhodnocení – např. z důvodu změněné morfologie buněk či překryvů, se

kterými má algoritmus potíže. Starší automatizované systémy měly při dávkách nad ~5 Gy omezenou spolehlivost (docházelo k podhodnocení mikrojadér) ale novější software již dokázal kvantifikovat mikrojadra i nad 5 Gy [10, 70, 76].

Celkově vzato jsou výsledné kalibrační křivky pro manuální a semiautomatický způsob hodnocení velmi konzistentní, zatímco plně automatická metoda dává srovnatelný trend s menšími odchylkami. Studie uvádějí, že rekonstrukce neznámé dávky zářením je pomocí automatického i ručního počítání stejně spolehlivá, přičemž semiautomatický přístup dosahuje přesnosti shodné s manuálním a zároveň eliminuje většinu chyb plné automatiky [51].

Mikroskopická analýza je považována za zlatý standard přesnosti – zkušený hodnotitel spolehlivě rozliší skutečná mikrojadra od artefaktů a získá validní údaj i z problematických preparátů nebo u vysokých dávek. Nevýhodou je nízká propustnost: manuální skórování 1000 buněk trvá okolo 2 hodin, což při potřebě analyzovat mnoho vzorků představuje značnou časovou zátěž a možnost únavy hodnotitele [51, 76]. Plně automatizovaná metoda naproti tomu výrazně zvyšuje rychlost a objektivitu hodnocení.

Automatizovaný systém dokáže prohledat řádově tisíce buněk za zlomek času oproti ruční práci (moderní *high-throughput* systémy zvládnou desítky tisíc buněk za hodinu). To je obrovská výhoda při hromadných screeningových akcích. Automatizace ale klade vysoké nároky na kvalitu preparátu (čistota, optimální hustota buněk apod.) pokud nejsou splněny, roste počet falešných detekcí. Nevýhodou plné automatiky je tak jisté riziko chyb: software může generovat falešně pozitivní mikrojadra (nadhodnocení pozadí) nebo naopak některá skutečná mikrojadra přehlédnout (jsou-li méně zřetelná) [51, 59, 73].

Semiautomatická metoda kombinuje to nejlepší z obou přístupů. Počítač provede předběžné vyhodnocení (nalezení binukleárních buněk a mikrojadér) přičemž konečné ověření je ponecháno na vyškoleném hodnotiteli. Tím se výrazně snižuje počet falešně pozitivních i negativních nálezů, a výstupy semiautomatického skórování jsou prakticky srovnatelné s manuálním hodnocením, při výrazně vyšší efektivitě práce. Ve srovnání s plnou automatikou sice zůstává určitá potřeba lidské práce, nicméně celkově jde o velmi efektivní kompromis. Semiautomatický postup zrychluje analýzu vzorků oproti čistě ruční metodě několikanásobně, aniž by obětoval přesnost, a představuje tak osvědčenou metodu hodnocení CBMN testu pro rutinní i výzkumné účely [51, 59, 73, 77].

Na základě výsledků této práce bylo možné porovnat citlivost, přesnost a praktičnost dvou hlavních cytogenetických metod používaných v biodozimetrii CBMN a DCA při manuálním mikroskopickém hodnocení.

Kalibrační křivka získaná metodou CBMN vykazoval v oblasti středních dávek 1 až 3 Gy mírné nadhodnocení frekvence mikrojadér na 1000 binukleárních buněk. Nadhodnocení v této oblasti je v důsledku subjektivního hodnocení a možnému zahrnutí nepravých mikrojadér. Tento jev je běžně popisován v literatuře, kde se upozorňuje na vyšší variabilitu manuálního odečtu CBMN zejména při vyšší frekvenci poškození [84, 85].

Kalibrační křivka hodnocená metodou DCA byla v celém rozsahu dávek 0–5 Gy stabilnější než CBMN. Ve středních dávkách byl pozorován plynulý lineární nárůst frekvence dicentrických chromozomů bez výraznějších odchylek. Ve vysokých dávkách došlo k mírnému poklesu v důsledku letality buněk [86].

Při analýze slepých vzorků byla patrná výraznější variabilita výsledků u CBMN. U slepého vzorku BS2 byla mikroskopickým odečtem CBMN metoda nadhodnocena o +0,868 Gy oproti reálné dávce 1,8 Gy. Naproti tomu při použití DCA byla u stejného vzorku odhadnutá dávka 2,442 Gy, tedy s menší odchylkou +0,642 Gy. Výsledky slepých vzorků BS3 rovněž ukazují vyšší konzistenci u DCA, kde odhadované dávky zůstaly v akceptovatelném rozmezí  $\pm 15\%$  od reálné expozice [10, 87, 88]. Z uvedených dat vyplývá, že DCA při manuálním mikroskopickém odečtu vykazuje vyšší přesnost a menší variabilitu v odhadu absorbovaných dávek ve srovnání s CBMN testem. Zatímco CBMN nabízí rychlejší vyhodnocení a je vhodný pro screening větších populací, jeho citlivost v oblasti nízkých a středních dávek je omezená subjektivitou hodnotitele a vyšší pravděpodobností zařazení artefaktů. Z těchto důvodů lze konstatovat, že pro přesný retrospektivní odhad dávky, zejména v oblasti 1–4 Gy, je při mikroskopickém odečtu metodou volby dicentrická chromozomová analýza (DCA). CBMN test je naproti tomu vhodnější jako doplňková nebo podpůrná metoda v případech, kde je kladen důraz na rychlost hodnocení a screeningové analýzy.

## 8 ZÁVĚR

Cytogenetické metody, konkrétně DCA a CBMN, potvrdily v této práci svou zásadní úlohu v oblasti biodozimetrie jako nástroje pro retrospektivní odhad absorbované dávky ionizujícího záření. Vzhledem k omezeným možnostem *in vivo* sledování radiačních účinků u lidí představují *in vitro* modely lidských periferních lymfocytů zásadní platformu pro vývoj a validaci biologických dozimetrických metod.

Obě použité metody umožnily detailní sledování radiačně indukovaného poškození DNA a byly využity k vytvoření vlastních kalibračních křivek v dávkovém rozmezí 0–5 Gy. Výsledky ukázaly, že frekvence mikrojader i dicentrických chromozomů s dávkou záření korelovala klasickým lineárně-kvadratickým trendem, v souladu s publikovanými studiemi.

Manuální mikroskopické hodnocení CBMN testu vedlo k mírnému nadhodnocení absorbované dávky, což je připisováno subjektivitě hodnocení a vyšší pravděpodobnosti zařazení nepravých mikrojader. Semiautomatický přístup prokázal vyšší konzistenci výsledků a snížení subjektivního zkreslení, i když při vyšších dávkách (>4 Gy) bylo pozorováno mírné podhodnocení. Automatický odečet dosáhl nejlepší shody s očekávanými hodnotami v oblasti středních dávek (0,2–3 Gy), avšak při vyšších dávkách opět docházelo k podhodnocení, pravděpodobně v důsledku obtížnější detekce vysoce poškozených buněk.

Vyhodnocení slepých vzorků BS1–BS3 potvrdilo tyto trendy. Mikroskopický odečet vedl k většímu nadhodnocení odhadované dávky, zatímco automatický přístup vykázal nejnižší odchylky, což podtrhuje jeho vhodnost pro rychlý a standardizovaný screening při hromadných radiačních událostech. Semiautomatické hodnocení se ukázalo jako kompromis mezi přesností a efektivitou.

DCA metoda poskytla velmi přesné odhady dávky, zejména ve středním dávkovém rozmezí. V oblasti nízkých dávek byla její citlivost omezená, což je známo i z literatury, a při velmi vysokých dávkách nad 4 Gy byl pozorován mírný pokles frekvence dicentrických chromozomů zřejmě v důsledku buněčné letality. Vyhodnocení slepých vzorků potvrdilo spolehlivost metody, kdy rozdíly od reálné dávky nepřesahovaly mezinárodně akceptované limity  $\pm 20\%$  [93].

Závěrem lze shrnout, že obě cytogenetické metody, CBMN i DCA, představují spolehlivé metody pro biodozimetrické analýzy. Automatizace CBMN přináší značné výhody v rychlosti a standardizaci, zatímco DCA zůstává podle porovnání ve výsledkové části nejspolehlivější metodou pro přesné stanovení středních až vyšších dávek. Pro rutinní použití v situacích hromadné expozice se jeví jako optimální kombinace automatického a semiautomatického přístupu s případným doplněním manuální kontroly u kritických vzorků.

## 9 REFERENCE

- [1] HAVRÁNKOVÁ, Renata. Biologické účinky ionizujícího záření. *Časopis lékařů českých* [online]. 2020, roč. 159, č. 7–8, s. 258–260 [cit. 2025-04-30]. ISSN 0008-7335.
- [2] ŘEZÁČOVÁ, M. a VÁVROVÁ, J. *Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření*. Hradec Králové: RNDr. František Skopec, CSc. – Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-82-6.
- [3] UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). *Ionizující záření: účinky a zdroje* [online]. Nairobi: Program OSN pro životní prostředí, 2016 [cit. 2025-04-30]. ISBN 978-92-807-3600-7. Dostupné z: [HYPERLINK "https://www.sujb.cz/fileadmin/sujb/docs/radiacni-ochrana/dokumenty/Radiation-InsidePart-Czech-Feb\\_20" \t "\\_new"](https://www.sujb.cz/fileadmin/sujb/docs/radiacni-ochrana/dokumenty/Radiation-InsidePart-Czech-Feb_20).
- [4] HAVRÁNKOVÁ, R., ed. *Klinická radiobiologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2020. 184 s. ISBN 978-80-247-4098-0.
- [5] HÁLA, J. Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie. Brno: Konvoj, 1998. ISBN 80-85615-56-8..
- [6] HAVRÁNKOVÁ, R., SKALICKÁ, Z. F., HAVRÁNEK, J., ZÖLZER, F. a KUNA, P. *Základy radiobiologie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, 2018. 77 s. ISBN 978-80-7394-696-8.
- [7] NEKULA, J. *Radiologie*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2001. ISBN 80-244-0259-9.
- [8] JJELIČOVÁ, M. *Elektrochemická detekce poškození DNA po gama ozáření*. Hradec Králové, 2020. Disertační práce. Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví.
- [9] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2011. ISBN 978-92-0-111010-7.
- [10] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies*. IAEA Human Health Series No. 46. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2011. ISBN 978-92-0-115310-1.
- [11] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies*. Vienna: IAEA, 2011. ISBN 978-92-0-111010-7.

- [12] PAUNESKU, T., STEVANOVIĆ, A., POPOVIĆ, J. a WOLOSCHAK, G. E. Effects of low dose and low dose rate low linear energy transfer radiation on animals – review of recent studies relevant for carcinogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, 2021, roč. 97, č. 6, s. 757–768. DOI: 10.1080/09553002.2020.1859155.
- [13] FALK, M. a HAUSMANN, M. Pokroky ve výzkumu poškození a reparace DNA v buňkách vystavených různým druhům ionizujícího záření v éře superrozlišovací optické mikroskopie. *Časopis lékařů českých*, 2020, roč. 159, s. 286–297. ISSN 0008-7335.
- [14] JONES, B. a HILL, M. A. Physical characteristics at the turnover-points of relative biological effect (RBE) with linear energy transfer (LET). *Physics in Medicine and Biology*, 2019, roč. 64, č. 22, s. 225010. DOI: 10.1088/1361-6560/ab52a5. PMID: 31665711.
- [15] NIEMANTSVERDIET, M., VAN GOETHEM, M. J., BRON, R., HOGWERF, W., BRANDENBURG, S., LANGENDIJK, J. A., VAN LUIJK, P. a COPPES, R. P. High and low LET radiation differentially induce normal tissue damage signals. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 2012, roč. 83, č. 4, s. 1291–1297. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.09.057. PMID: 22245200.
- [16] ŘEZÁČOVÁ, M. a VÁVROVÁ, J. *Molekulární mechanismy účinku ionizujícího záření*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-82-6.
- [17] ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-4072-9.
- [18] VEJL, Pavel a Sylva SKUPINOVÁ. *Cvičení z obecné genetiky*. 2. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2011. ISBN 978-80-213-0440-6
- [19] PASSARGE, E. *Barevný atlas genetiky*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-247-3099-8.
- [20] GENETIKA-BIOLOGIE.cz. Karyotyp člověka [online]. [cit. 2025-05-06]. Dostupné z: HYPERLINK "<http://www.genetika-biologie.cz/karyotyp-cloveka>."
- [21] KROKAN, H. E. a BJØRÅS, M. Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, roč. 5, č. 4, a012583. DOI: 10.1101/cshperspect.a012583.
- [22] CHATTERJEE, N. a WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2017, roč. 58, č. 5, s. 235–263. DOI: 10.1002/em.22087. PMID: 28485537. PMCID: PMC5474181.
- [23] MORALES, J., LI, L., FATTAH, F. J., DONG, Y., BEY, E. A., PATEL, M., GAO, J. a BOOTHMAN, D. A. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews in*

- Eukaryotic Gene Expression*, 2014, roč. 24, č. 1, s. 15–28. DOI: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2013006879.
- [24] CALDECOTT, K. W. DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends in Cell Biology*, 2022, roč. 32, č. 9, s. 733–745. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.04.010. PMID: 35643889.
- [25] HUBER, A., BAI, P., DE MURCIA, J. M. a DE MURCIA, G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amsterdam)*, 2004, roč. 3, č. 8–9, s. 1103–1108. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.06.002. PMID: 15279798.
- [26] WALLACE, S. S. Base excision repair: a critical player in many games. *DNA Repair (Amsterdam)*, 2014, roč. 19, s. 14–26. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.030. PMID: 24780558. PMCID: PMC4100245.
- [27] FAGBEMI, A. F., ORELLI, B. a SCHÄRER, O. D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amsterdam)*, 2011, roč. 10, č. 7, s. 722–729. DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.022. PMID: 21592868. PMCID: PMC3139800.
- [28] SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., UNSAL-KAÇMAZ, K. a LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, roč. 73, s. 39–85. DOI: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723. PMID: 15189136.
- [29] SCHÄRER, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, roč. 5, č. 10, a012609. DOI: 10.1101/cshperspect.a012609. PMID: 24086042. PMCID: PMC3783044.
- [30] PANNUNZIO, N. R., WATANABE, G. a LIEBER, M. R. Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, roč. 293, č. 27, s. 10512–10523. DOI: 10.1074/jbc.TM117.000374. PMID: 29247009. PMCID: PMC6036208.
- [31] JACKSON, S. P. a BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009, roč. 461, č. 7267, s. 1071–1078. DOI: 10.1038/nature08467. PMID: 19847258. PMCID: PMC2906700.
- [32] NATARAJAN, A. T. a PALITTI, F. DNA repair and chromosomal alterations. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2008, roč. 657, č. 1, s. 3–7. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.08.017. PMID: 18801460.
- [33] WILLIAMS, A. B. a SCHUMACHER, B. p53 in the DNA-damage-repair process. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2016, roč. 6, č. 5, a026070. DOI: 10.1101/cshperspect.a026070. PMID: 27048304. PMCID: PMC4852800.

- [34] PENG, G. a LIN, S. Y. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. *World Journal of Clinical Oncology*, 2011, roč. 2, č. 2, s. 73–79. DOI: 10.5306/wjco.v2.i2.73. PMID: 21603316. PMCID: PMC3095467.
- [35] BAATOUT, S. *Radiobiology Textbook*. Cham: Springer International Publishing, 2023. ISBN 978-3-031-18809-1.
- [36] JELIČOVÁ, M. *Elektrochemická detekce poškození DNA po gama ozáření*. Hradec Králové, 2020. Disertační práce. Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví.
- [37] KANG, K. W. History and organizations for radiological protection. *Journal of Korean Medical Science*, 2016, roč. 31, Suppl 1, s. S4–S5. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.S1.S4. PMID: 26908987. PMCID: PMC4756341.
- [38] INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP). The 2007 recommendations of the International Commission on Radiological Protection. *ICRP Publication 103. Annals of the ICRP*, 2007, roč. 37, č. 2–4, s. 1–332. DOI: 10.1016/j.icrp.2007.10.003. PMID: 18082557.
- [39] STÁTNÍ ÚŘAD PRO JADERNOU BEZPEČNOST (SÚJB). *Dokumenty a publikace* [online]. [cit. 2025-05-06]. Dostupné z: HYPERLINK "<https://sujb.gov.cz/dokumenty-a-publikace>".
- [40] STÁTNÍ ÚSTAV RADIAČNÍ OCHRANY (SURO), v. v. i. [online]. [cit. 2025-05-06]. Dostupné z: HYPERLINK <https://www.suro.cz/cz>.
- [41] PEJCHAL, J., ÖSTERREICHER, J., ZÁRYBNICKÁ, L., ŠINKOROVÁ, Z., TICHÝ, A. a VÁVROVÁ, J. Biodozimetrické postupy. *Vojenské zdravotnické listy*. Hradec Králové: Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií
- [42] KULTOVÁ, G., JELIČOVÁ, M., ČÍŽKOVÁ, J., ŠINKOROVÁ, Z. a TICHÝ, A. Biologická dozimetrie a moderní (-omické) metody. *Časopis lékařů českých*, 2020, roč. 159, č. 7–8. ISSN 1805-4420.
- [43] LEE, Y., KIM, S. H., LEE, Y. H., YANG, S. S., YOON, H. J., WILKINS, R. C. a JANG, S. Application of a semi-automated dicentric scoring system in triage and monitoring occupational radiation exposure. *Frontiers in Public Health*, 2022, roč. 10, čl. 1002501. DOI: 10.3389/fpubh.2022.1002501.
- [44] PETROVOVÁ, M. a SVOBODA, M. Methods of classical and molecular cytogenetics suitable for biodosimetry of persons with professional exposure to carcinogens [online]. *Klinická onkologie*, 2019, roč. 32, č. 4, s. 275–280. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019275>
- [45] MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P. V., DECORDER, I. a KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in

- human biomonitoring. *Biochimie*, 2006, roč. 88, č. 11, s. 1515–1531. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.07.004. PMID: 16919861.
- [46] ROSSNEROVÁ, A., ŠPATOVÁ, M., SCHUNCK, C. a ŠRÁM, R. J. Automated scoring of lymphocyte micronuclei by the MetaSystems Metafer image cytometry system and its application in studies of human mutagen sensitivity and biodosimetry of genotoxin exposure. *Mutagenesis*, 2011, roč. 26, č. 1, s. 169–175. DOI: 10.1093/mutage/geq057. PMID: 21164199.
- [47] U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. About Dicentric Chromosome Bioassay [online]. Radiation Emergency Medical Management (REMM), 2024 [cit. 2025-05-06]. Dostupné z: [HYPERLINK "https://remm.hhs.gov/aboutdicentrics.htm"](https://remm.hhs.gov/aboutdicentrics.htm).
- [48] VARGA, D., JOHANNES, T., JAINTA, S., SCHUSTER, S., SCHWARZ-BOEGER, U., KIECHLE, M., PATINO GARCIA, B. a VOGEL, W. An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis. *Mutagenesis*, 2004, roč. 19, č. 5, s. 391–397. DOI: 10.1093/mutage/geh047.
- [49] SIMON, S. L., BOUVILLE, A. a KLEINERMAN, R. Current use and future needs of biodosimetry in studies of long-term health risk following radiation exposure. *Health Physics*, 2010, roč. 98, č. 2, s. 109–117. DOI: 10.1097/HP.0b013e3181a86628. PMID: 20065672. PMCID: PMC2806653.
- [50] MINISSI, S., GUSTAVINO, B., DEGRASSI, F., TANZARELLA, C. a RIZZONI, M. Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 1999, roč. 14, č. 1, s. 43–49. DOI: 10.1093/mutage/14.1.43.
- [51] SOMMER, S., BURACZEWSKA, I. a KRUSZEWSKI, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, roč. 21, č. 4, čl. 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534. PMID: 32102335. PMCID: PMC7073234.
- [52] KULTOVÁ, G., TICHÝ, A., ŘEHŮLKOVÁ, H. a MYSLIVCOVÁ-FUČÍKOVÁ, A. The hunt for radiation biomarkers: current situation. *International Journal of Radiation Biology*, 2020, roč. 96, č. 3, s. 370–382. DOI: 10.1080/09553002.2020.1704909. PMID: 31829779.
- [53] WILKINS, R. C., RODRIGUES, M. A. a BEATON-GREEN, L. A. The Application of Imaging Flow Cytometry to High-Throughput Biodosimetry. *Genome Integrity*, 2017, roč. 8, čl. 7. DOI: 10.4103/2041-9414.198912. PMID: 28250914. PMCID: PMC5320785.
- [54] PRASANNA, P. G., HAMEL, C. J., ESCALADA, N. D., DUFFY, K. L. a BLAKELY, W. F. Biological dosimetry using human interphase peripheral blood lymphocytes. *Military Medicine*, 2002, roč. 167, č. 2 Suppl, s. 10–12. PMID: 11873484.

- [55] ROH, C. Metabolomics in radiation-induced biological dosimetry: A mini-review and a polyamine study. *Biomolecules*, 2018, roč. 8, č. 2, čl. 34. DOI: 10.3390/biom8020034. PMID: 29844258. PMCID: PMC6023017.
- [56] FLOOD, A. B., WILLIAMS, B. B., SCHREIBER, W., DU, G., WOOD, V. A., KMIEC, M. M., PETRYAKOV, S. V., DEMIDENKO, E., SWARTZ, H. M. a EPR CENTER TOOTH DOSIMETRY PROJECT TEAM. Advances in in vivo EPR tooth biodosimetry: Meeting the targets for initial triage following a large-scale radiation event. *Radiation Protection Dosimetry*, 2016, roč. 172, č. 1–3, s. 72–80. DOI: 10.1093/rpd/ncw165. PMID: 27421468. PMCID: PMC5225975.
- [57] SEED, T. M., XIAO, S., MANLEY, N., NIKOLICH-ZUGICH, J., PUGH, J., VAN DEN BRINK, M., HIRABAYASHI, Y., YASUTOMO, K., IWAMA, A., KOYASU, S., SHTEREV, I., SEMPOWSKI, G., MACCHIARINI, F., NAKACHI, K., KUNUGI, K. C., HAMMER, C. G. a DEWERD, L. A. An interlaboratory comparison of dosimetry for a multi-institutional radiobiological research project: Observations, problems, solutions, and lessons learned. *International Journal of Radiation Biology*, 2016, roč. 92, č. 2, s. 59–70. DOI: 10.3109/09553002.2015.1106024. PMID: 26857121. PMCID: PMC4976771.
- [58] ROMM, H., AINSBURY, E., BARNARD, S., BARRIOS, L., BARQUINERO, J. F., BEINKE, C., DEPERAS, M., GREGOIRE, E., KOIVISTOINEN, A., LINDHOLM, C., MOQUET, J., OESTREICHER, U., PUIG, R., ROTHKAMM, K., SOMMER, S., THIERENS, H., VANDERSICKEL, V., VRAL, A. a WOJCIK, A. Automatic scoring of dicentric chromosomes as a tool in large-scale radiation accidents. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2013, roč. 756, č. 1–2, s. 174–183. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.05.013. PMID: 23707243.
- [59] HUBER, R., KULKA, U., LÖRCH, T., BRASELMANN, H. a BAUCHINGER, M. Automated metaphase finding: an assessment of the efficiency of the METAFER2 system in a routine mutagenicity assay. *Mutation Research*, 1995, roč. 334, č. 1, s. 97–102. DOI: 10.1016/0165-1161(95)90035-7. PMID: 7528343.
- [60] HERNÁNDEZ, A., ENDESFELDER, D., EINBECK, J., PUIG, P., BENADJAOUD, M. A., HIGUERAS, M., AINSBURY, E., GRUEL, G., OESTREICHER, U., BARRIOS, L. a BARQUINERO, J. F. Biodose Tools: an R shiny application for biological dosimetry. *International Journal of Radiation Biology*, 2023, roč. 99, č. 9, s. 1378–1390. DOI: 10.1080/09553002.2023.2176564.
- [61] VIJAYALAKSHMI, J., CHAURASIA, R. K., SRINIVAS, K. S., VIJAYALAKSHMI, K., PAUL, S. F. D., BHAT, N. N. a SAPRA, B. K. Establishment of ex vivo calibration curve for X-ray induced "dicentric + ring" and micronuclei in human peripheral lymphocytes for biodosimetry during radiological emergencies. *Heliyon*, 2023, roč. 9, č. 6, e17068. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e17068. PMID: 37484390. PMCID: PMC10361230.
- [62] CHAURASIA, R. K., SHIRSATH, K. B., DESAI, U. N., BHAT, N. N. a SAPRA, B. K. Establishment of in vitro calibration curve for  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -rays induced phospho-53BP1 foci, rapid biodosimetry and initial triage, and comparative evaluations with  $\gamma\text{H2AX}$  and

cytogenetic assays. *Frontiers in Public Health*, 2022, roč. 10, čl. 845200. DOI: 10.3389/fpubh.2022.845200. PMID: 36003625. PMCID: PMC9393360.

- [63] UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION (UNSCEAR). *Sources and Effects of Ionizing Radiation: Report to the General Assembly with Scientific Annexes*. Vol. I: Annex B: Effects of radiation exposure of children. New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, 2008.
- [64] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment*. Technical Reports Series No. 405. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2001. ISBN 92-0-100401-6.
- [65] FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 2000, roč. 455, č. 1–2, s. 81–95. ISSN 0027-5107. DOI: 10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- [66] ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals [online]. Paris: OECD Publishing, 2016. [cit. 2025-05-06]. Dostupné z: HYPERLINK "<https://www.oecd.org/env/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en>".
- [67] FENECH, M., CROTT, L., SLADE, M., et al. The cytokinesis-block micronucleus assay: dose–response calibration curve, background frequency in the population, and dose estimation. *Mutation Research*, 2011, roč. 715, č. 1–2, s. 61–67. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.09.004.
- [68] FIELD, A. *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*. 5. vyd. London: SAGE Publications, 2018. ISBN 978-1-5264-1951-4.
- [69] RÖSSLER, U., BARNETT, R., STREFFER, C., et al. Statistical analysis in cytogenetic biodosimetry: overdispersion and model fitting. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2002, 41(2), 103–111. DOI: 10.1007/s00411-002-0147-3.
- [70] HUMAN, S., VAN DYK, E., et al. Automated Scoring of the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Metafer Imaging Software. *Radiation Protection Dosimetry*, 2013, vol. 155, no. 1, s. 28–35. DOI: 10.1093/rpd/ncs186.
- [71] BARNETT, R. M., BLUM, C., RÖSSLER, U. et al. Statistical Analysis in Cytogenetic Dosimetry: Distributions, Overdispersion, and the u-test. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2002, vol. 41, s. 103–111. DOI: 10.1007/s00411-002-0147-3.
- [72] ROSSNEROVÁ, A., SPATOVÁ, M., SCHUNCK, C., et al. Automated scoring of lymphocyte micronuclei by the MetaSystems Metafer image cytometry system and its application in studies of human mutagen sensitivity and biodosimetry of genotoxin exposure. *Mutagenesis*,.

- [73] LEE, H., KIM, J., PARK, J., et al. Improving radiation dosimetry with an automated micronucleus scoring system. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2023, vol. 62, s. 123–135. DOI: 10.1007/s00411-023-01030-7..
- [74] SEAGER, A. L., SHAH, U. K., BRÜSEHAFFER, K., et al. Recommendations, evaluation and validation of a semi-automated, fluorescent-based scoring protocol for micronucleus testing in human cells. *Mutagenesis*, 2014, vol. 29, no. 3, s. 155–164. DOI: 10.1093/muta.
- [75] METASYSTEMS. METAFER – Automatizovaný skener pro test mikronukleus. Altlussheim, Německo: MetaSystems, 2023. Dostupné z: [HYPERLINK https://metasystems-international.com/en/products/metafer/](https://metasystems-international.com/en/products/metafer/).
- [76] LYULKO, O. V., GARTY, G., RANDERS-PEHRSON, G., TURNER, H. C., SZOLC, B. a BRENNER, D. J. Fast image analysis for the micronucleus assay in a fully automated high-throughput biodosimetry system. *Radiation Research*, 2014, roč. 181, č. 2, s. 146–161. DOI: 10.1667/RR13441.1. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24502354. PMCID: PMC4011502.
- [77] VRAL, A., et al. Automated and manual scoring in the cytokinesis-block micronucleus assay: comparison and practical considerations. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2023, roč. 62, s. 413–425. DOI: 10.1007/s00411-023-01030-7.
- [78] BEINKE, C., PORT, M., RIECKE, A., RUF, C. G. a ABEND, M. Adaption of the Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay for Improved Triage Biodosimetry. *Radiation Research*, 2016, roč. 185, č. 5, s. 461–472. DOI: 10.1667/RR14294.1. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27092766.
- [79] DEPUYDT, J., BAEYENS, A., BARNARD, S., BEINKE, C., BENEDEK, A., BEUKES, P., a VRAL, A. RENEB intercomparison exercises analyzing micronuclei (Cytokinesis-block Micronucleus Assay). *International Journal of Radiation Biology*, 2016, roč. 93, č. 1, s. 36–47. DOI: 10.1080/09553002.2016.1206231.
- [80] MOQUET, J., et al. Evaluation of automated CBMN scoring. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2023. DOI: 10.1007/s00411-023-01030-7.
- [81] SULLIVAN, J. M., PRASANNA, P. G., GRACE, M. B., WATHEN, L. K., WALLACE, R. L., KOERNER, J. F. a COLEMAN, C. N. Assessment of biodosimetry methods for a mass-casualty radiological incident: medical response and management considerations. *Health Physics*, 2013, roč. 105, č. 6, s. 540–554. DOI: 10.1097/HP.0b013e31829cf221.
- [82] KIMURA, A., et al. Manual scoring with shortened 48-h cytokinesis block micronucleus assay in human lymphocytes for dose estimation. *Radiation Research*, 2023, roč. 199, č. 4, s. 408–416. DOI: 10.1667/RADE-22-00191.1.
- [83] PAJIC, J. a RAKIC, B. Re-evaluation of CBMN test reference values of persons continuously occupationally exposed to low doses of ionizing radiation in Serbia.

*Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2023, roč. 886, čl. 503583. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2023.50358.

- [84] FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Mutation Research Reviews*, 2007, roč. 627, č. 1, s. 3–14. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.01.001.
- [85] VRAL, A., ENDESFELDER, D., BALÁZS, K., BEINKE, C., CUCEU PETRENCI, C., FINOT, F., et al. RENE Inter-Laboratory Comparison 2021: The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Radiation Research*, 2023, roč. 199, č. 6, s. 571–582. DOI: 10.1667/RADE-22-00201.1.
- [86] EDWARDS, A. A., LLOYD, D. C., MOQUET, J. E. a AINSBURY, E. A. The relationship between chromosome aberrations and absorbed dose. *Mutation Research Reviews*, 2005, roč. 568, č. 1, s. 1–6. DOI: 10.1016/j.mrrev.2004.09.002.
- [87] PORT, M., BARQUINERO, J. F., ENDESFELDER, D., MOQUET, J., OESTREICHER, U., et al. RENE Inter-Assay Comparison of Eight Dosimetry Assays. *Radiation Research*, 2023, roč. 199, č. 6, s. 535–555. DOI: 10.1667/RADE-22-00207.1.
- [88] SANDGREN, D. J., SALTER, C. A., LEVINE, I. H., ROSS, J. A., LILLIS-HEARNE, P. K. a BLAKELY, W. F. Biodosimetry Assessment Tool (BAT) software-dose prediction algorithms. *Health Physics*, 2010, roč. 99, Suppl 5, s. S171–S183. DOI: 10.1097/HP.0b013e3181f0fe6c. PMID: 20938227.
- [89] WILLERS, H., DAHM-DAPHI, J. a POWELL, S. Repair of radiation damage to DNA. *British Journal of Cancer*, 2004, roč. 90, s. 1297–1301. DOI: [HYPERLINK "https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601729" \t "\\_new" 10.1038/sj.bjc.6601729](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601729) .
- [90] LEE, Y., et al. Improving radiation dosimetry with an automated micronucleus scoring system: Correction of automated scoring errors. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2023, roč. 62, s. 349–356. DOI: [HYPERLINK "https://doi.org/10.1007/s00411-023-01030" \t "\\_new" 10.1007/s00411-023-01030](https://doi.org/10.1007/s00411-023-01030) .
- [91] GRUEL, G., et al. International intercomparison on cytogenetic dosimetry. *Mutation Research Reviews*, 2017. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.06.001.
- [92] ENDESFELDER, D., OESTREICHER, U., BUCHER, M., BEINKE, C., SIEBENWIRTH, C., AINSBURY, E., MOQUET, J., GRUEL, G., GREGOIRE, E., MARTINEZ, J. S., VRAL, A., BAEYENS, A., VALENTE, M., MONTORO, A., TERZOUDI, G., TRIANTOPOULOU, S., PANTELIAS, A., MONTEIRO GIL, O., PRIETO, M. J., DOMENE, M. M., ZAFIROPOULOS. International intercomparison 2021: The Dicentric Chromosome Assay. *Radiation Research*, 2023, roč. 199, č. 6, s. 556–570. DOI: 10.1667/RADE-22-00202.1.
- [93] WILKINS, R. C., BEATON-GREEN, L. A., LACHAPPELLE, S., KUTZNER, B. C., FERRAROTTO, C., CHAUHAN, V., MARRO, L., LIVINGSTON, G. K., BOULAY GREENE, H. a FLEGAL, F. N. Evaluation of the annual Canadian biodosimetry network

intercomparisons. *International Journal of Radiation Biology*, 2015, roč. 91, č. 5, s. 443–451. DOI: 10.3109/09553002.2015.1012305.

- [94] LEE, Y., JIN, Y. W., WILKINS, R. C. a JANG, S. Validation of the dicentric chromosome assay for radiation biological dosimetry in South Korea. *Journal of Radiation Research*, 2019, roč. 60, č. 5, s. 555–563. DOI: 10.1093/jrr/rrz039. PMID: 31165147; PMCID: PMC6806015.
- [95] RÜHM, W., KOIVISTO, S. E., BÜLOW, A. D., et al. Establishment of a dose-response curve for X-ray-induced micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2016, roč. 55, č. 1, s. 59–66. DOI: 10.1007/s00411-015-0630-9.
- [96] ZWICK, M., VORONINA, A., STREFFER, A., et al. RENEB Inter-Laboratory Comparison 2021: The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Radiation Research*, 2023, roč. 199, č. 6, s. 571–582. DOI: 10.1667/RADE-22-00163.1.