

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

KORELACE BUNĚČNÉHO CYKLU A PRIMÁRNÍ ŘASINKY
PO ÚČINKU IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ

Bc. Dana-Victoria Vásquezová

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Dana-Victoria Vásquezová**
Osobní číslo: **C17458**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Korelace buněčného cyklu a primární řasinky po účinku ionizujícího záření**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části bude popsán současný stav problematiky, regulace buněčného cyklu, vliv ionizujícího záření na primární řasinku a buněčný cyklus, odpověď buněk na ionizující záření.

Experimentální část:

Stanovení dávkové závislosti účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněčné linie fibroblastů.

S vybranými vhodnými dávkami záření bude sledována dynamika jejich působení v čase, indukci změn v buněčném cyklu pomocí měření obsahu DNA v buňkách za využití průtokové cytometrie.

Analýza změn primární řasinky v důsledku efektu dávek záření pomocí imunofluorescence.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Karel Královec, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Alžběta Filipová, Ph.D.**
Fakulta vojenského zdravotnictví – Katedra radio-
biologie
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 Praze dne

Dana-Victoria Vásquezová

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Alžbětě Filipové, Ph.D. za podnětné rady, ochotu a pomoc při vytváření této diplomové práce, dále také plk. gšt. doc. MVDr. Zuzaně Šinkorové, Ph.D. za pomoc při vyhodnocování výsledků a umožnění provedení práce na pracovišti katedry radiobiologie. Dále bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce RNDr. Karlu Královcovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky k této práci. Mé poděkování patří taktéž mé rodině a blízkým za podporu a pochopení po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá cytoskeletálními změnami, které zde reprezentuje primární řasinka, v buňce po jejím ovlivnění ionizujícím zářením. Zejména analyzuje výskyt a velikost primární řasinky v souvislosti s různě vysokými dávkami ionizujícího záření, prozkoumává míru proliferace a viability buněk v souvislosti s ozářením a také zkoumá změny v buněčném cyklu, které se po ovlivnění uskutečnily. Vyhodnocení probíhala na základě výsledku WST-1 testů, imunofluorescenčního barvení a analýzy buněčného cyklu na průtokovém cytometru u ozářených buněk se srovnáním v neozářenou kontrolou.

KLÍČOVÁ SLOVA

primární řasinka, ionizující záření, buněčný cyklus, radiorezistence, imunofluorescenční barvení, proliferace buněk

TITLE

Correlation of the cell cycle and primary cilia after exposure to ionizing radiation.

ANNOTATION

This thesis deals with cytoskeletal changes in the cell after its influence with ionizing radiation. In particular, it analyzes the occurrence and size of primary cilia in connection with variously high doses of ionizing radiation, examines the rate of cell proliferation and death in connection with irradiation, and also examines the changes in the cell cycle that have occurred after exposure. Evaluations were based on the results of the WST-1 test, immunofluorescence microscopy, and cell cycle analysis on a flow cytometer in irradiated cells compared to an unaffected control.

KEYWORDS

primary cilia, ionizing radiation, cell cycle, immunofluorescence microscopy, cell proliferation

OBSAH

1.1.	Seznam zkratk	9
1.2.	Seznam ilustrací a tabulek.....	10
1.3.	Seznam grafů.....	11
2.	Úvod	12
3.	Cíle diplomové práce.....	13
4.	Teoretická část.....	14
4.1.	Buněčný cyklus	14
4.2.	Regulace buněčného cyklu.....	14
4.2.1.	Kontrolní body buněčného cyklu	16
4.2.2.	Regulátory buněčného cyklu	18
4.3.	Primární řasinka	19
4.3.1.	Stavba primární řasinky.....	20
4.3.2.	Primární řasinka a buněčný cyklus.....	23
4.3.3.	Funkce primární řasinky.....	25
4.3.4.	Primární řasinka a signální dráhy	26
4.3.4.1.	Dráha Hedgehog.....	26
4.4.	Vliv ionizujícího záření na primární řasinku a buněčný cyklus.....	27
4.4.1.	Co je to ionizující záření.....	27
4.4.2.	Účinky ionizujícího záření na buňku.....	27
4.4.3.	Účinek ionizujícího záření na buněčný cyklus.....	29
4.4.4.	Odpověď buněk na ionizující záření	30
4.4.5.	Primární řasinka a ionizující záření.....	32
5.	Praktická část.....	34
5.1.	Metodika a materiál.....	34
5.2.	Buněčné linie a jejich kultivace	34
5.2.1.	IMR-90	34

5.2.2.	NHLF.....	34
5.3.	Provedené testy	34
5.3.1.	WST-1	35
5.3.2.	Imunofluorescenční barvení buněk	35
5.3.3.	Analýza buněčného cyklu.....	36
5.4.	Ozařování	37
5.5.	Statistické zpracování dat.....	37
6.	Výsledky experimentů.....	38
6.1.	Vyhodnocení změn u buněčné linie plicních fibroblastů IMR-90 po ozáření	38
6.1.1.	Analýza primární řasinky po ozáření	39
6.1.1.1.	Změna četnosti primární řasinky	39
6.1.1.2.	Změny velikosti primární řasinky	43
6.1.2.	Dávková závislost účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněk.....	47
6.1.3.	Změny v buněčném cyklu	49
6.2.	Vyhodnocení změn buněčné linie NHLF po ozáření.....	52
6.2.1.	Analýza cytoskeletálních změn	53
6.2.1.1.	Změna četnosti primární řasinky	53
6.2.1.2.	Změny velikosti primární řasinky	56
6.2.2.	Dávková závislost účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněk.....	58
7.	Diskuze	61
8.	Závěr.....	66
9.	Bibliografie.....	67

1.1. Seznam zkratek

ASRS	adaptivní odpovědi na přežití (Adaptive survival responses)
ATM	ataxia-telangiectasia mutovaná kináza
BCC	byzocelulární karcinomy
CDK	cyklin-dependentní proteinové kinázy
CKI	inhibiční proteiny cyklin-dependentních proteinových kináz
COPD	chronická obstrukční nemoc plic
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DDR	síť signalizačních faktorů opravujících DNA (DNA damage response)
DHh	signální dráha Desert hedgehog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's médium s GlutaMAXem
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSB	dvouřetězcové zlomy DNA (Double-Strand Breaks)
GliRs	Gli repressor forms (GliRs)
Hh	signální dráha Hedgehog
HR	homologní rekombinace
IFT	mechanismus intraflagelárního transportu
IHh	signální dráha Indian hedgehog
IZ	ionizující záření
LDH	laktátdehydrogenáza
NHEJ	nehomologní koncové spojení
NHEJ	nehomologní spojování konců DNA
Notch	signální dráha Notch
PBS	fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku – radikály
SSB	jednořetězcové zlomy DNA (Single-Strand Breaks)
Wnt	Wingless/Int-1 signalizační dráha

1.2. Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek č. 1: Schématické znázornění eukaryotického buněčného cyklu včetně znázornění jednotlivých kontrolních uzlů a jejich příslušných zaměření.	15
Obrázek č. 2: Časová osa exprese cyklinů během buněčného cyklu:	18
Obrázek č. 3: Uspořádání primární řasinky.	21
Obrázek č. 4: Porovnání řezu motilní a primární řasinkou.).....	23
Obrázek č. 5: Schématické znázornění cyklu primární řasinky a současně cyklu buněčného.....	24
Obrázek č. 6: Schématické znázornění významných procesů a jejich časové posloupnosti po účincích ionizujícího záření na tkáň.	28
Obrázek č. 7: Přehled signálních transdukčních cest poškození DNA.	32

1.3. Seznam grafů

Graf č. 1: IMR-90 s primární řasinkou 24 hodin po ozáření.	41
Graf č. 2: IMR-90 s primární řasinkou 48 hodin po ozáření.	42
Graf č. 3: IMR-90 s primární řasinkou 24 hodin po ozáření.	43
Graf č. 4: Délka primárních řasinek 24 hodin po ozáření u IMR-90.....	44
Graf č. 5: Délka primárních řasinek 48 hodin po ozáření u IMR-90.....	45
Graf č. 6: Délka primárních řasinek 72 hodin po ozáření u IMR-90.....	46
Graf č. 7: Viabilita a proliferace IMR-90 24 hodin po ozáření.	47
Graf č. 8: Viabilita a proliferace IMR-90 48 hodin po ozáření.	48
Graf č. 9: Viabilita a proliferace IMR-90 72 hodin po ozáření.	49
Graf č. 10: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 24hodinové inkubaci.....	51
Graf č. 11: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 48hodinové inkubaci.....	51
Graf č. 12: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 72hodinové inkubaci.....	52
Graf č. 13: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 24 hodin po ozáření.	54
Graf č. 14: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 48 hodin po ozáření.	55
Graf č. 15: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 72 hodin po ozáření.	56
Graf č. 16: Délka primárních řasinek NHLF po 24hodinové inkubaci.	57
Graf č. 17: Viabilita a proliferace NHLF 24 hodin po ozáření.....	58
Graf č. 18: Viabilita a proliferace NHLF 48 hodin po ozáření.....	59
Graf č. 19: Viabilita a proliferace NHLF 72 hodin po ozáření.....	60

2. ÚVOD

Základní stavební jednotka všech organismů, buňka, má mnoho způsobů, kterými reaguje na své okolní prostředí, a kterými si zjišťuje informace o okolním prostředí. Mezi základní mechanismy komunikace s okolím patří membránová spojení, adhezivní proteiny, iontové kanály a řada receptorů membránových i nitrobuněčných. Jako další speciální druh komunikace po některé fáze buněčného cyklu buňka disponuje primární řasinkou.

Primární řasinka coby jedinečná sensorická buněčná organela je velmi důležitou součástí těchto komunikačních procesů. Napomáhá udržovat buněčnou homeostázu, čímž zajišťuje optimální podmínky pro život buňky. Její přítomnost na povrchu buňky není trvalá, vyskytuje se pouze v klidové fázi G1 (G0) a na počátku S fáze buněčného cyklu, naopak s příchodem G2 fáze je (zpětně) resorbována. Vyrůstá na konci mitózy téměř u všech buněk jako dlouhý tenký výrůstek z bazálního tělíska, na které se přeměnila mateřská centriola. Primární řasinka má velký potenciál zodpovědět otázky, v jakém stavu se buňka nachází či jak moc je poškozená po nejrůznějších chemických nebo fyzikálních ovlivněních. Dále může nabídnout odpovědi na otázky spojené s mezibuněčnou komunikací nebo jednotlivými buněčnými pochody.

Tato diplomová práce zkoumá především funkční změny cytoskeletu reprezentovaného primární řasinkou, protože se jedná o velmi signifikantní ukazatel stavu buňky. Jak reaguje řasinka na různě vysoké hladiny ionizujícího záření? Koreluje její délka s velikostí absorbované dávky? Existuje i po ozařování vztah mezi fází buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází, a mezi výskytem primární řasinky?

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem mé diplomové práce je zhodnotit výskyt a velikost primární řasinky v souvislosti s různě vysokými dávkami ionizujícího záření v porovnání s neozářenou kontrolou. Dílčím cílem této diplomové práce je analyzovat dávkovou závislost účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněk a stejně tak zhodnotit indukci změn v buněčném cyklu pomocí měření obsahu DNA v jádře buněk za využití průtokové cytometrie.

4. TEORETICKÁ ČÁST

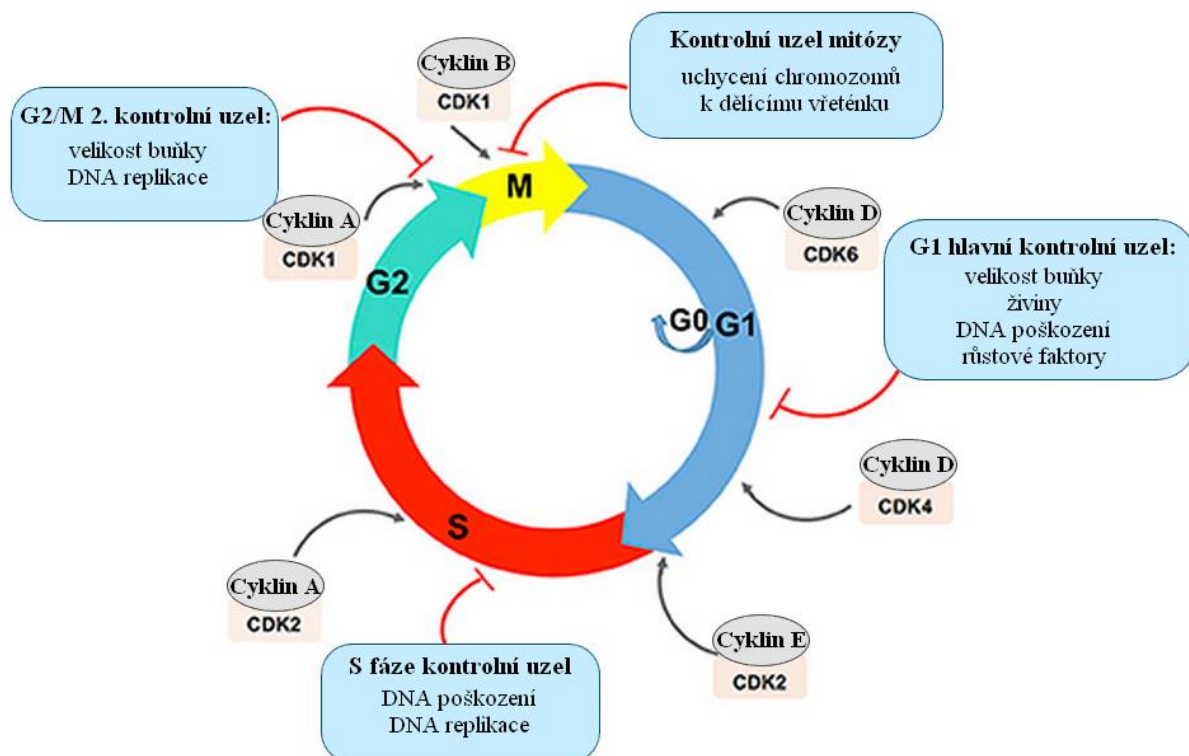
4.1. Buněčný cyklus

Pro zachování organismu životaschopného a vitálního je potřeba buněčná obměna, protože buňky nejsou nesmrtelné. Jednotlivé buňky nejsou nesmrtelné a jejich dostatek se zajišťuje novými a novými generacemi dceřiných totožných buněk s buňkami předchozí generace. Každým generačním cyklem, jak se nazývá jeden buněčný cyklus, na jehož konci se z jedné buňky vytvoří dvě buňky totožné dceřiné, se tedy stavební jednotka každého organismu obnovuje. DNA v každém chromozomu je potřeba věrně zreplikovat a tyto zreplikované chromozomy následně přesně rozdělit do dceřiných buněk, aby byla zachována jejich funkčnost. Délka generačního cyklu má velice rozdílnou délku. Toto obnovování již probíhá miliardy let a dává vzniknout jedinečným živočichům a rostlinám.

Buněčný cyklus je posloupnost událostí, při níž jsou buněčné složky zdvojnásobeny a následně přesně rozděleny do dvou dceřiných buněk. Cyklicky se opakuje a trvá od jednoho buněčného dělení k buněčnému dělení následujícímu (Bišová, 2018; Barnum, 2014).

4.2. Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus se skládá ze čtyř po sobě jdoucích částí, jak je patrné na obrázku č. 1, kde jsou jednotlivé části označeny barevnými šipkami. Začíná G1 fází, růstovou přípravnou fází (grow), pokračuje S fází, tzv. syntetickou fází, dále druhou růstovou fází G2 a uzavírá jej mitotická M fáze (Bišová, 2018; Barnum, 2014).



Obrázek č. 1: Schématické znázornění eukaryotického buněčného cyklu včetně znázornění jednotlivých kontrolních uzlů a jejich příslušných zaměření. Komplexy Cyklin-CDK jsou řízeny prostřednictvím kontrolních bodů, jejichž úlohou je zabránit tomu, aby buňka postupovala do další fáze, není-li to dovoleno - jsou umístěny před šipkou označující odpovídající fázi buněčného cyklu. Upraveno podle (El-Aouar Filho, 2017)

V průběhu růstové přípravné fáze G1 (modrá šipka) si buňka nashromáždí dostatečné energetické rezervy, které může použít pro syntézu RNA, proteinů a enzymů (Bišová, 2018; Schafer, 2016; Barnum, 2014). Růstová fáze trvá od chvíle, kdy je buňka po mitóze schopná samostatně fungovat, a končí v momentě zahájení replikace DNA pro příští buněčnou generaci. Zpravidla G1 fáze trvá nejdelší dobu ze všech fází buněčného cyklu. G0 fáze je takzvaná klidová fáze. Tato fáze probíhá ve chvíli, když buňka reverzibilně ustoupí z cyklu dělení v reakci například na vysokou koncentraci buněk v okolí nebo expozici mitogenům. Stejně tak buňky mohou nevratně vystoupit z buněčného cyklu a vstoupit do klidové G0 fáze v případě diferenciaci nebo senescence. Právě proto, se většina buněk v lidském těle nachází v klidové fázi G0. Do tohoto stádia se nevratně stahují například neurony, myocyty nebo epiteliální buňky kůže. Buňky mohou do fáze G0 vstoupit také reverzibilně. Takto vratně se do G0 fáze dostávají například

hepatocyty, dále buňky folikulů štítné žlázy, anebo také gliové buňky. Aktivně proliferující buňky jsou umístěny zejména v částech sebe obnovujících se tkání, jako je epitel a kostní dřev (Schafer, 2016; Williams, 2012).

Následuje fáze S (červená šipka na obrázku č. 1), takzvaná fáze syntézy DNA. Při této části buněčného cyklu dochází k replikaci jaderné DNA, množství DNA se zdvojnásobí. Jeho množství naroste z $2n$ na $4n$. K určení množství DNA v jádře se používá pojem ploidie. Ploidie značí počet homologních sad chromozomů v buňce. Není u všech organismů stejná. Lidské buňky jsou v zásadě diploidní, což znamená, že obsahují 2 sady chromozomů, jednu od matky a druhou od otce, ale některé lidské buňky jsou haploidní, obsahují jen jednu sadu chromozomů - $1n$. Jsou to buňky pohlavní. V živočišné a rostlinné říši nejsou výjimkou ani polyploidie různého typu (El-Aouar Filho, 2017; Schafer, 2016; Williams, 2012).

Při druhé přípravné fázi G2 (modrozelená šipka) se buňka připravuje na vstup do mitózy. Této fázi se také říká premitotická. Důležitá je kontrola S fáze, zda proběhla správně, jestli je replikace úplná a jádro v pořádku. Případně probíhají postreplikační opravy. V této části buněčného cyklu také buňka více roste, některé orgány se zdvojují a tvoří se další struktury nezbytné pro rozdělení buňky. Na konci G2 fáze začíná kondenzace chromatinu (El-Aouar Filho, 2017; Schafer, 2016; Williams, 2012).

Ve fázi M neboli mitóze (žlutá šipka) se duplikované chromozomy rozdělí společně s buněčnými organelami a buňka se rozdělí na dvě shodné dceřiné buňky nové generace. Mitóza se skládá z profáze, metafáze, anafáze a telofáze (Bišová, 2018; El-Aouar Filho, 2017; Schafer, 2016; Williams, 2012).

4.2.1. Kontrolní body buněčného cyklu

Vzhledem k nezbytnosti identifikace a eliminace nepřiměřeně proliferujících buněk existují regulátory buněčného cyklu ovlivňující dělení buněk a buněčnou smrt. Kromě těchto elementárních funkcí tyto mechanismy také udržují správnost a úplnost dílčích událostí při buněčném cyklu a pomáhají dodržovat jejich náležité pořadí. Tyto dílčí funkce provádějí regulátory buněčného cyklu na základě informací z extracelulárního a intracelulárního prostředí. Jednotlivé kontrolní uzly, ve kterých regulační mechanismy působí, se vyskytují jednak na přelomu fáze G1 a S, dále v S fázi a také během fáze G2 a M fáze. V případě, že zjistí chybu, tak dráhy kontrolního uzlu přenesou signál do efektorů, které mohou regulovat progresi buněčného cyklu, dokud nebude problém vyřešen. Alternativou opravy je podstoupení apoptózy v případě, že

je poškození moc významné, než aby bylo opraveno, anebo pokud buňka neumí DNA sama opravit (El-Aouar Filho, 2017; King, 1998; Williams, 2012).

Hlavním rozhodovacím kontrolním bodem pro buňku je bezpochyby kontrolní uzel v G1 fázi. Je to primární body, ve kterém se buňka musí rozhodnout, zda se má nebo nemá dělit. Projde-li buňka G1 kontrolním bodem do S fáze, nenávratně se zaváže, že se rozdělí, že projde všemi fázemi a nenastane-li nevratný problém jako například poškozená DNA, vytvoří se z ní dvě nové dceřiné buňky. Kontroluje se zde několik parametrů. Zejména velikost. Je dostatečná pro rozdělení a vytvoření dvou buněk? Dále potom živiny. Jsou energetické zásoby a živiny dostatečné pro tento náročný proces dělení? Molekulární signály. Dostává buňka z okolí pozitivní signály, například růstové faktory od buněk sousedních? A nakonec DNA. Není porušená nebo jinak poškozená? Buňka nesplňující tyto požadavky nebude postupovat do S fáze. Může napravit svůj stav a provést sérii oprav, anebo vyčkat na zlepšení podmínek v G0 fázi, aby mohla dělení provést později (OpenStax CNX, 2015; Barnum, 2014; Lim, 2013).

V druhém kontrolním bodě, který probíhá v G2 fázi se opět zkontroluje množství živin a proteinových rezerv. Nejdůležitější úlohou tohoto bodu je zajistit, aby byly všechny chromozomy replikovány a aby tato DNA nebyla poškozená. Zjistí-li mechanismy tohoto bodu problémy s DNA, buněčný cyklus okamžitě zastaví, aby buňka mohla replikaci dokončit anebo se pokusila opravit poškozenou DNA. V případě nenapravitelného poškození může buňka provést apoptózu nebo programovanou buněčnou smrt. Tento mechanismus je důležitý zejména pro prevenci rakoviny, nekontrolovatelného buněčného dělení, protože poškozená DNA není přenesena na novou generaci buněk (OpenStax CNX, 2015; Barnum, 2014; Lim, 2013).

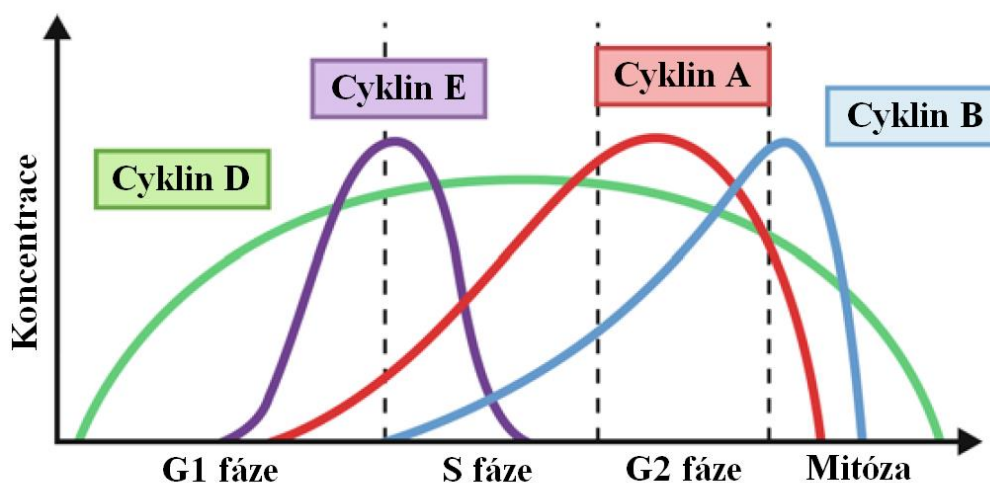
Kontrolní bod nacházející se v M fázi, ve fázi, kde probíhá mitóza, má za úkol zkontrolovat průběh mitózy a její správně provedené zakončení. Činí tak v anafázi. Najde-li tento buněčný mechanismus nějaké nesrovnalosti, například špatné připojení kinetochoru chromozomu k dělicímu vřeténku, buněčný cyklus přeruší a spustí reparační procesy anebo zahájí programovanou buněčnou smrt (Ullmann; Bernhard, 1995; OpenStax CNX, 2015).

Kontrolní body v G1 a G2 fázi mají tedy za úkol prověřit mimo jiné velikost buněk. Bylo zjištěno, že velikost dceřiných buněk a stav výživy ovlivňuje progresi buněčného cyklu, v případě větších buněk se proces zrychlí a naopak. Jedním z možných mechanismů je hodnocení translace proteinu. Množství ribosomální hmoty ukazující translační aktivitu by měla korelovat s velikostí

buňky, takže se předpokládá existence mechanismu zjišťujícího, jak velké množství ribosomální hmoty se nahromadilo (Barnum, 2014).

4.2.2. Regulátory buněčného cyklu

Samotný buněčný cyklus je řízen aktivitou komplexů skládajících se z cyklinů A, B, D a E, které jsou navázány na cyklin-dependentní proteinové kinázy (CDK). Cyklin dependentní kinázy jsou skupina serinových a threoninových kináz a jejich regulátorů cyklinů (El-Aouar Filho, 2017; Williams, 2012). Lidský genom kóduje celkem 20 CDK a 29 genů různých cyklinů, ze kterých se 9 CDK buněčného cyklu plně neúčastní. (Malumbres, 2009) Tvorba a aktivita komplexů cyklin-CDK je regulovaná syntézou cyklinů a jejich degradací během progresu buněčného cyklu, dále stavem fosforylace CDK anebo vazbou CDK inhibičních proteinů (CKI) na komplexy cyklin-CDK. Množství exprimovaných cyklinů v závislosti na buněčném cyklu lze najít na časové ose exprese cyklinů během buněčného cyklu znázorněné na obrázku č. 2 (Williams, 2012; El-Aouar Filho, 2017; Lim, 2013; Barnum, 2014).



Obrázek 2: Časová osa exprese cyklinů během buněčného cyklu: Jednotlivé cykliny jsou exprimovány v různých stádiích během buněčného cyklu. Protože různé CDK vyžadují pro fungování specifické cykliny, je to způsob regulace aktivity CDK během buněčného cyklu. Například cyklin E je produkován v pozdní fázi G1 a na začátku S fáze. Upraveno podle (Stauffer, 2018)

Cykliny typu D aktivují CDK4 a CDK 6, které jsou zapotřebí pro vstup buněk do fáze G1. (El-Aouar Filho, 2017; Williams, 2012) Například zastavení v G1 fázi je možné působením skupiny Ink4 [INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) a INK4D (p19)] CKI, které inhibují

CDK4 a CDK6, nebo také pomocí skupiny inhibitorů Cip / Kip (p21, p27, p57) potlačujících aktivitu CDK2 (Williams, 2012; Lim, 2013; Barnum, 2014).

Komplexy cyklin D-CDK4, cyklin D-CDK6 a cyklin E-CDK2 řídí postup G1 přes takzvaný restriční bod, který zavazuje buňku dokončit cyklus. (Williams, 2012) Mezi mitotické cykliny patří například cyklin B. Na počátku G1 fáze je neměřitelný, ale v průběhu celé interfáze je syntetizován, následně aktivuje CDK 1 a jako komplex cyklin B-CDK1 umožňuje vstup buňky do mitózy (El-Aouar Filho, 2017; Lim, 2013; Barnum, 2014).

Cyklin A a cyklin E v komplexu s CDK2 hrají zásadní roli v přechodu z fáze G1 do S. Pro vstup buňky do syntetické fáze je totiž přítomnost tohoto komplexu klíčový. V případě zrušení ověřovacích mechanismů buněčného cyklu hrozí nekontrolovaná buněčná maligní proliferace (El-Aouar Filho, 2017; Williams, 2012; Lim, 2013; Barnum, 2014).

Skupina cyklinů CDK a CKI ovšem nemá význam jen v případě řízení buněčného cyklu. Úzká součinnost těchto látek je prokázána také u transkripce, metabolismu, samo obnovení kmenových buněk, neurální funkce, epigenetická regulace a spermatogeneze. Dokonce některé z těchto úkolů provádějí samostatně, bez vytvoření CDK-cyklinového komplexu nebo kinázové aktivity (Lim, 2013).

4.3. Primární řasinka

Buňka má několik speciálních způsobů, jakými komunikuje a jak vnímá své okolí. Zpracování extracelulárních signálů je důležité pro správný stav a život buňky i celého organismu. Zajištěním a udržováním buněčné homeostázy si buňka obstarává optimální podmínky pro život. Jedním takovým způsobem, jak identifikovat signály z okolního prostředí je přítomnost primární řasinky. Primární řasinka je mimořádná sensorická struktura buňky, která je složená z mikrotubul, a vyskytuje se téměř na všech lidských buňkách. Jako bazální tělísko primární řasince slouží mateřský centriol. Jedná se o organelu v současné době bouřlivě prozkoumávanou a citovanou ve všech možných oborech zabývajících se nejen lidskými buňkami, protože nabízí odpovědi na celou řadu otázek spojených nejen s mezibuněčnou komunikací, buněčnými pochody a stavem buňky.

Není tomu ovšem tak dávno, co se centrální řasinka po desetiletích, kdy byla považována za pozůstatek evoluce bez jakýchkoliv funkcí, dostala do centra pozornosti. Švýcarský vědec K. W. Zimmermann poprvé při pozorování savčích buněk rozpoznal primární řasinky a dal jim název centrální bičíky. Primární řasinku zařadil do skupiny nepohyblivých řasinek. V roce

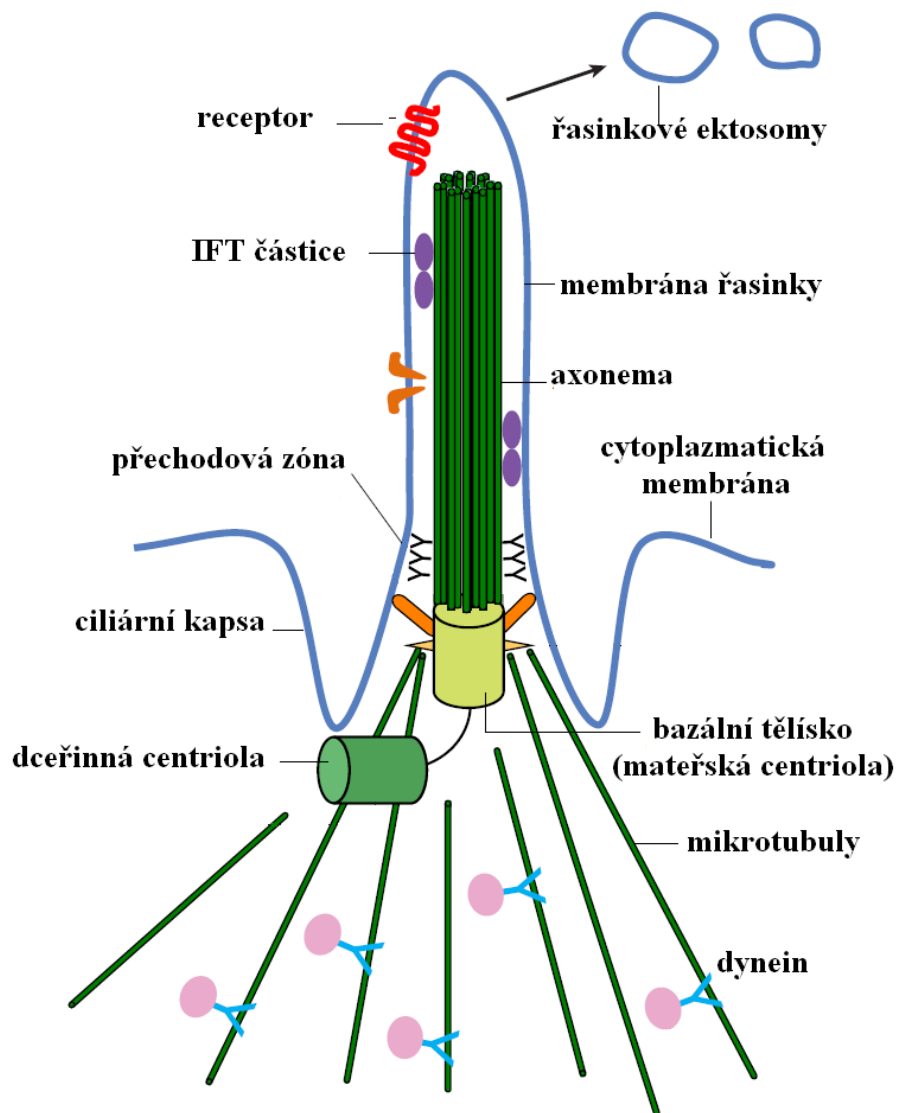
1898 vědci Henneguy a Lenhossék zjistili, že mitotická aktivita buněk úzce souvisí a je závislá na přítomnosti primární řasinky na povrchu buňky. Díky tomuto objevu byla představena teorie vzájemné závislosti buněčného cyklu a primární řasinkou, která stále platí. Primární řasinky byla znovuobjevena v druhé polovině 20. století v éře elektronových mikroskopů. Za své jméno, jenž používáme doposud, vděčí americkému vědci Sorokinovi, který název primární řasinka použil poprvé v roce 1968 (Dvořák, 2015; Wheway, 2018; Filipová, 2017).

Ovšem teprve v roce 2003 bylo zjištěno u myši, že proteiny potřebné pro primární řasinku jsou nezbytné pro funkci signální dráhy Hedgehog, čímž byla prokázána její důležitost při přenosu impulsu. Nyní je jasné, že většina signálních drah obratlovců funguje za pomoci primární řasinky. Tato pozoruhodná organela bývá nazývána buněčnou anténou, je důležitá během vývoje organismů, zásadní roli hraje také při embryogenezi, organogenezi, tumorigenezi, napomáhá funkci senzoričkových neuronů, funkci ledvin a další (Garcia-Gonzalo, 2012; Dvořák, 2015; Wheway, 2018; Kim, 2014; Sengupta, 2017).

Primární řasinka je klíčová pro odhalení způsobu buněčné komunikace a buněčné senzoriky. Tato jedinečná organela totiž může být faktorem, díky němuž budeme schopni předpovídat stav poškození buňky po různých formách ovlivnění. Například po poškození ionizujícím zářením, čemuž se věnuje tato práce.

4.3.1. Stavba primární řasinky

Jedná se o jedinečnou senzoričkovou organelu podobnou bičíku nebo anténce vyčnívající z povrchu buněčné membrány. Tato unikátní solitární struktura má tvar podlouhlého tenkého výběžku. Řasinky obratlovců se dělí na dvě skupiny. A to na pohyblivé neboli motilní řasinky a nepohyblivé, kam patří primární řasinka (Goetz, 2010; Dvořák, 2015; Kim, 2014; Pazour, 2003). Rozměry primární řasinky jsou zhruba 2-10 μm do délky a až 200-300 nm do šířky (Filipová, 2017).



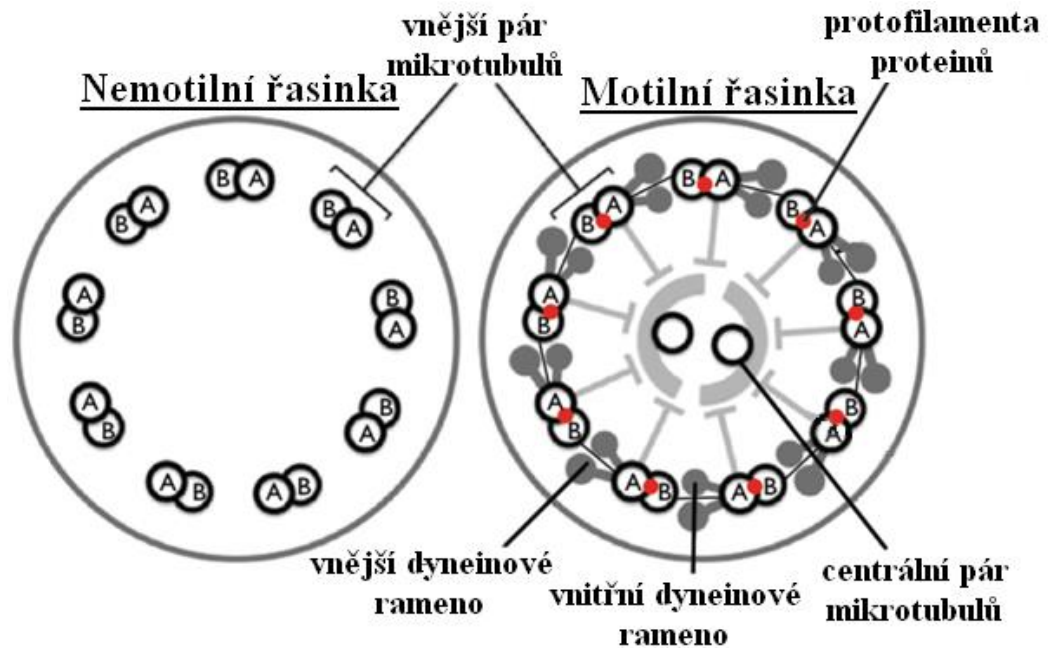
Obrázek 3: Uspořádání primární řasinky. Zobrazena celá struktura včetně klíčových součástí. Upraveno podle (Wang, 2018)

Tělo primární řasinky je tvořeno axonemou, což je spojení mikrotubulárních struktur opouzdřených formou plazmatické membrány na povrchu. Axonema se skládá z α -tubulinu. Bazální tělísko je formováno z mateřské centrioly, starší ze dvou centriol v centrozomu, na kterou je napojena centriola dceřinná, jak můžeme pozorovat na obrázku č. 3, což je pro primární řasinku charakteristické. Bazální tělísko se skládá z γ -tubulinu. Na povrchu buňky se vyskytuje zpravidla jedna primární řasinky, přestože byly již pozorovány případy jejich zvýšeného počtu. Jedná se o situaci zmnoženého centriolu, řasinky takto vzniklé mají podobnou délku a

většinou vyrůstají ze společné ciliární kapsy. Vícečetné řasinky se velmi často vyskytují u ciliopatií, u nádorů popřípadě po ozáření (Kim, 2014; Dvořák, 2015; Filipová, 2017).

Spodní část primární řasinky je obklopená kapsou řasinky, ve které je umístěné bazální tělísko s přechodovými vlákny, které spojují mikrotubuly bazálního tělíska s ciliární membránou. Řasinková kapsa vyznačená na obrázku č. 3, v některých publikacích nazvaná řasinková prohlubeň, je hluboká invaginace o cytoplasmatické membrány buňky. Přechodová zóna je místo mezi bazálním tělískem a axonemou primární řasinky. Zde se mikrotubuly diferencují v axonemu primární řasinky z centriolu nebo bazálního tělíska, devět mikrotubulárních tripletů se tu stává duplety. Toto místo je charakteristické přítomností tzv. Y spojení (Whewey, 2018; Dvořák, 2015; Garcia-Gonzalo, 2012).

U motilních (sekundárních) řasinek se axonemy skládají z devíti svazků zdvojených mikrotubulů rozmístěných kolem centrální dvojice mikrotubulů, jak je patrné na obrázku č. 4. Tato dvojice umožňuje pohyb bičíku. Pobyhlivé řasinky mají konfiguraci 9+2. Nacházejí se například na buňkách lemujících epitel dýchacích cest anebo u spermii. Oproti tomu primární řasinka nese konfiguraci 9+0, centrální pár mikrotubulů uvnitř jí chybí. Povrch axonemy je potažen ciliární membránou, která buňce umožňuje reagovat na vnější stimuly a regulační proteiny v bazálním tělísku, přechodová zóna a distální oblasti kontrolují signalizační kaskádu (Goetz, 2010; Dvořák, 2015; Kim, 2014; Pazour, 2003; Whewey, 2018).



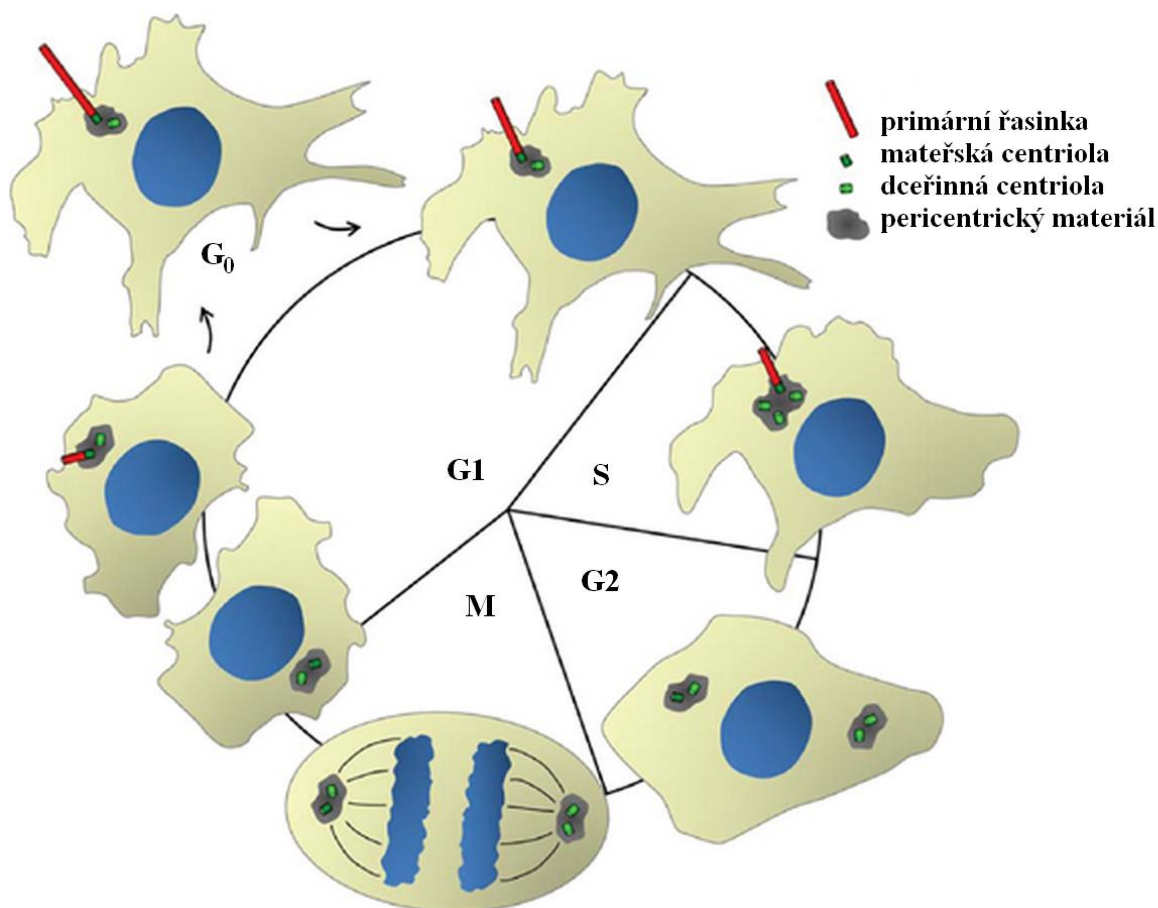
Obrázek 4: Porovnání řezu motilní a primární řasinkou. Motilní řasinka (vpravo) je tvořena 9 páry mikrotubulů po vnějším obvodu a jedním párem ve svém centru. Oproti tomu primární řasinka (vlevo) se skládá jen z 9 párů mikrotubulů po svém obvodu. Upraveno podle: (Loucks, 2016)

4.3.2. Primární řasinka a buněčný cyklus

Primární řasinky nejsou na povrchu buněk přítomné po celou dobu buněčného cyklu. Naopak se jedná o celkem dynamický děj, protože se mezi sebou střídají fáze růstu primární řasinky a poté její zpětná resorpce, která se nazývá deciliace. (Dvořák, 2015; Garcia-Gonzalo, 2012) Zpětná resorpce primární řasinky je nutná, protože bazální tělísko nacházející se na základně primární řasinky je odvozené od centrozomu. Resorpce primární řasinky probíhá z důvodu uvolnění centrioly, protože centrozom má klíčovou funkci v nukleaci mitotického vřetenka během dělení buněk. Z tohoto důvodu se mikrotubuly primární řasinky cyklicky depolymerují. Je-li buňka v akutním stresu, může se řasinka i odlomit, a uvolněný mateřský centriol a centrozom se může přesunout k jádru buňky. Názorné schéma růstu a zániku primární řasinky je naznačené na obrázku č. 5 (Kim, 2014; Wheway, 2018; Dvořák, 2015).

Ve chvíli, kdy je ukončena mitóza se centrozom dostává k povrchu buňky, kde vzniká nukleační centrum řasinky přeměnou jednoho mateřského centriolu na bazální tělísko. K tvorbě primární řasinky je způsobilý jen ten mateřský centriol, který je zralý. (Dvořák, 2015) Růst primární řasinky, neboli ciliogeneze, začíná napojením distálního konce mateřské centrioly k vezikulu a zajišťují jej přechodná vlákna. Po ukotvení vyvstane pupen ohýbající membránu,

dalším růstem se mění v axonemu, ale jeho bázi zůstane odlišná struktura a vytvoří přechodnou zónu. Centriol a bazální tělísko vycházejí z jedné mikrotubulární struktury, které se cyklicky střídají podle fáze buněčného cyklu. Buďto je ukotvena v cytoplasmatické membráně a slouží jako místo vzniku primární řasinky, anebo po zdvojení buňky v jejím centru zajišťuje mitotické vřeténko (Kim, 2014; Garcia-Gonzalo, 2012; Dvořák, 2015).



Obrázek 5: Schématické znázornění cyklu primární řasinky a současně cyklu buněčného.

Upraveno podle (Pedersen, 2012)

Chvilce resorpce primární řasinky je podmíněná typem buněk. U části buněk zaniká primární řasinka ve chvíli přechodu z G0 fáze do G1, u jiných typů buněk zaniká řasinka v S fázi. Existují také buňky, které primární řasinku resorbují až na přechodu z G2 fáze do mitózy. Rozpuštění primární řasinky participuje Aurora kináza A, polo-like kináza A (Plk1), Disheveled2, TcTex-1 a Pitchfork. Část regulačních proteinů buněčného cyklu má také regulační účinek na cyklus primární řasinky. Například Aurora kináza A způsobující rozklad primární řasinky se

současně podílí na regulaci buněčného cyklu. Tato kináza se účastní separace chromozomů a na uspořádání mitotického vřeténka. Její aktivita je největší na přelomu G2 a M fáze buněčného cyklu. V případě nedostatečné sekrece Aurora kináz může způsobit tato nedostatečnost aneuploidii a následnou buněčnou smrt v důsledku mitotické katastrofy (Dvořák, 2015).

Určité bílkoviny IFT, kterým byla dříve přisouzena pouze důležitost při dopravě proteinů uvnitř řasinky, mají funkci i při ovládní buněčného cyklu. Třeba protein IFT27, který je důležitou složkou IFT, zřejmě může limitovat průběh buněčného cyklu. A to přesně v momentě, než je primární řasinka rozpuštěna a centriol může být upotřeben k buněčnému cyklu (Dvořák, 2015; Kim, 2014).

Dalším příkladem bílkovin IFT, které ovlivňují buněčný cyklus, může být protein IFT88. Jedná se o bílkovinu, která je esenciální složka IFT, její nedostatek vyvolává rozpouštění primární řasinky a posun S fází buněčného cyklu. Expresí proteinu IFT88 naopak znemožňuje vstup buňky do S fáze a navozuje apoptózu (Dvořák, 2015; Kim, 2014).

4.3.3. Funkce primární řasinky

Receptory primární řasinky umožňují detekci specifických ligandů, růstových faktorů (EGF, PDGF, morfogenů (Hedgehog, Wnt, Notch), hormonů a dalších biologicky aktivních látek. Stejně tak se v ní vyskytují i dráhy planární buněčné polarity. (Dvořák, 2011) Mechanismus intraflagelárního transportu (IFT) je způsob dvousměrného přenosu bílkovin podél mikrotubulů axonemy řasinky. Intraflagelární transport je zprostředkován velkými proteinovými komplexy (IFT-A a IFT-B), ze kterých je většina nezbytná pro přenos strukturních i signalizačních molekul uvnitř řasinek. Tento mechanismus je podobný zprostředkovanému transportu látek kinesinem podél mikrotubulů z centra do periferie buňky. (Sengupta, 2017; Goetz, 2010; Dvořák, 2015) Udržení a správná funkce IFT je nutné pro tvorbu a zachování naprosté většiny bičíků a řasinek. (Dvořák, 2015) V případě nedostatku nebo poruše tvorby primárních řasinek se rozvíjí ciliopatie, onemocnění s nejrůznějšími projevy, způsobené zejména mutací genů kódujících proteiny primární řasinky, kterých se v buňce nachází velké množství. Podle posledních odhadů se jejich počet u obratlovců pohybuje okolo 1000 druhů proteinů, což dává tušit jejich strukturní komplexnost a různorodost účinků těchto bílkovin. Nicméně u naprosté většiny proteinů dosud není známá jejich funkce (Dvořák, 2015; Wheway, 2018; Kim, 2014).

Primární řasinky rostou za podobných principů založených na IFT. Kromě několika výjimek ji najdeme téměř u všech typů buněk obratlovců. Mají na starosti buněčné smyslové vnímání okolí,

přenos environmentálních signálů a podílejí se na udržování buněčné homeostázy (Goetz, 2010; Dvořák, 2015; Kim, 2014; Pazour, 2003; Sengupta, 2017).

Některé typy finálně diferenciovanych buněk na svém povrchu primární řasinku neexprimují, ale ve většině případů k jejímu růstu na povrchu dochází. Primární řasinku nenalezneme na povrchu červených krvinek, adipocytů, hepatocytů a buněk acinů pankreatu. Ve vědeckých člancích se objevilo několik názorů, proč tomu tak je. Jedním z nich je rozdílný výskyt primárních řasinek sekrečních buněk kvůli velikosti apikálního povrchu cytoplasmatické membrány. Další možné vysvětlení je přítomnost primární řasinky jen u buněk, které disponují velkým diferenciačním potenciálem. (Dvořák, 2015; Filipová, 2017)

4.3.4. Primární řasinka a signální dráhy

4.3.4.1. Dráha Hedgehog

Signální dráha Hedgehog (Hh) řídí růst a přežití buněk, je elementární při embryonálním vývoji, protože je elementární při diferenciaci embryonálních buněk. V případě její nedostatečnosti vznikají vývojové vady a naopak při její hyperaktivaci se mohou projevit byzocelulární karcinomy (BCC) a další druhy rakoviny. Důležitost signalizace Hh je pro lidskou rakovinu zřejmá. Výzkumy prokázaly, že obratlovci mají tři geny Hh, a to Sonic hedgehog (SHh), Desert hedgehog (DHh) a Indian hedgehog (IHh). Tyto geny kódují stejnojmenné sekreční proteiny, které patří mezi morfogeny. (Varjosalo, 2008; Yang, 2010)

Velká část proteinů a dalších molekul, která zajišťuje fungování a existenci primární řasinky, je současně spojená i se signální dráhou Hedgehog, což je jedna z hlavních signalizačních drah u obratlovců vůbec. Signální mechanismy Hh jsou napříč druhy velmi podobné. Mutace v genech, ve kterých jsou zakódovány důležité komponenty úzce spjaté s ciliogenezí, intraflagelárním transportem a dalšími procesy často přímo ovlivňují Hh signalizaci. Již bylo prokázáno, že Hh signalizace je závislá na IFT primární řasinky. (Goetz, 2010; Varjosalo, 2008)

Podle genetických studií IFT proteiny působí v jádře Sonic Hedgehog dráhy společně s membránovými receptory proteinů PTCH1 a PTCH2, SMO a Gli transkripčními faktory. Jejich role je velmi komplexní nejen díky složitému řešení Hh dráhy. Pohyb Hh signálních meziproductů dovnitř a ven z primární řasinky je usnadněn IFT proteiny. Ztráta IFT proteinů podněcuje snížení exprese PTC1 a akumulaci Gli na vrcholku řasinky. (Yang, 2010; Goetz, 2010; Whewey, 2018)

SMO a PTC receptor se vzájemně ovlivňují. SMO je signální převodník Hh dráhy, pokud ligandy Hh chybí, tak PTC receptor inhibuje SMO signalizaci. Molekuly Gli jsou přeměněny na potlačené formy, takzvané Gli repressor forms (GliRs), které zastavují Hh signální cestu. Transkripční faktory Gli, které fungují jako efekторы dráhy), se nachází na vrcholku primární řasinky a fungují jako receptory nebo aktivátory Hh signalizace. Naopak v přítomnosti Hh PTC není schopný inhibovat SMO. SMO po určitých konformačních změnách je převedený do primární řasinky. (Goetz, 2010; Dvořák, 2015; Yang, 2010)

K chybě signální dráhy Hh může dojít mutací genů SMO, PTC nebo Gli transkripčních faktorů, ale také strukturním nebo funkčním defektem primární řasinky. (Dvořák, 2015) Role primární řasinky v transdukci signální dráhy Hedgehog je tedy velmi složitá a velmi záleží, zda bude řasinka působit jako pozitivní nebo negativní regulátor Hh signální dráhy. (Wheway, 2018)

4.4. Vliv ionizujícího záření na primární řasinku a buněčný cyklus

4.4.1. Co je to ionizující záření

Ionizující záření (IZ) je proud částic (elektrony, pozitrony, protony, alfa a beta částice, fotony), které má oproti neionizujícímu záření dostatek kinetické energie k tomu, aby vytvořilo z původně elektricky neutrálních atomů iontové páry. Jedná se tedy o přenos energie, který způsobuje ionizaci. (Crick, 2016; Souparno, 2016; Švec, 2005)

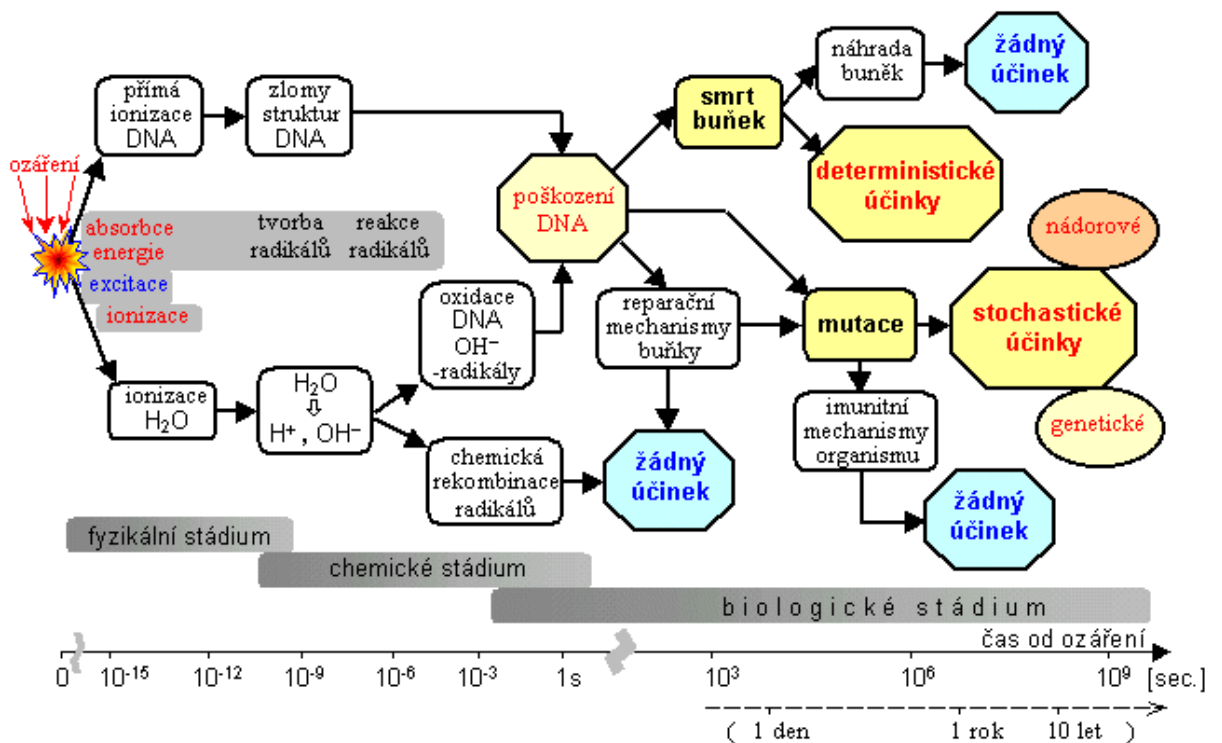
Základní veličinou, která charakterizuje působení záření na látku, je absorbovaná dávka vyjádřena jednotkou gray (Gy), která má rozměr $J.kg^{-1}$. Znamená, že jeden kilogram ozářené látky absorbuje energii o velikosti 1 joule. Pro srovnání biologické účinnosti různých typů IZ, která mají stejnou absorbovanou dávku, se zavedla jednotka s názvem sievert (Sv), která popisuje efektivní dávku. (Crick, 2016; Souparno, 2016; Švec, 2005)

4.4.2. Účinky ionizujícího záření na buňku

Když jsou buňky vystaveny ionizujícímu záření, spustí komplexní reakci, která může zahrnovat zastavení či zpomalení buněčného cyklu v G1 a v G2 fázi, apoptózu nebo opravu DNA. Velmi záleží na míře a typu buněčného poškození, jakou cestou se buňka po ozáření vydá. (Teyssier, 1999)

Jedním z nejvíce škodlivých důsledků expozice ionizujícímu záření je poškození DNA. Dráha nabitě částice (elektronu nebo ionu) může projít skrz a ionizovat DNA přímo (přímý účinek)

nebo může ionizovat okolní molekuly vody. Ionizované molekuly vody mají za následek vytvoření vysoce reaktivních OH radikálů, které mohou reagovat s DNA jako cílovou molekulou (takzvaný nepřímý účinek). Další radikály odvozené od molekuly vody, například kyslíkové (ROS) nebo H₂O₂ nejsou tolik zodpovědné za závažné poškození DNA, ale mají jiné negativní důsledky. (Maier, 2016) Většina lézí DNA způsobených ionizujícím zářením je sice poškození bází, ale ionizující záření v jádře indukuje také DNA zlomy, konkrétněji přerušeni fosfodiesterové vazby v hlavním DNA řetězci. Tyto zlomy mohou být jednořetězcové nebo dvouřetězcové. Jednořetězcové zlomy – Single-Strand Breaks (SSB) jsou zlomy, kdy si DNA zachová druhé vlákno, které je klíčové pro reparaci. Druhým typem jsou dvouřetězcové zlomy – Double-Strand Breaks (DSB). Zmíněné dvouvláknové zlomy obecně patří k jedněm z nejzávažnějších poškození dvoušroubovice vůbec. Můžou dokonce vést až k buněčné smrti. Zlomy SSB a DSB se buňkách nevyskytují jen v případě vystavení buňky ionizujícímu záření, ale také v případě interakce buněk s reaktivními formy kyslíku generovaných chybami buněčného metabolismu anebo při využití chemoterapeutických látek. Absorbovaná dávka o velikosti 1 Gy indukuje zhruba 1000 jednovláknových a 35 dvouvláknových zlomů DNA dvoušroubovice v buňce in vitro. (Davis, 2013; Souparno, 2016) Dále může poškození způsobit i zesíťování DNA neboli spojení



Obrázek 6: Schématické znázornění významných procesů a jejich časové posloupnosti po účincích ionizujícího záření na tkáň. (Ullmann)

dvou nukleotidů stejného vlákna nebo opačných vláken kovalentní vazbou. Takové poškození může narušit replikaci, transkripci nebo může dokonce vést k buněčné smrti. (Maier, 2016)

Na obrázku č. 6 je schematicky znázorněné rozdělení účinků ionizujícího záření na fyzikální, chemické a biologické stádium v průběhu času od ozáření a pomocí šipek jsou zde také naznačené vztahy mezi jednotlivými druhy procesů způsobených ozářeními. Jednotlivé události na sebe navazující jsou také umístěné na logaritmickou časovou osu.

Expozice IZ vede k vyšší produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), tyto radikály mohou poškodit nukleové kyseliny, proteiny a lipidy a vedou k oxidativnímu stresu. Nadměrná produkce ROS vede k různým onemocněním. Radiační expozice ovlivňuje i další buněčné orgány, jako jsou například mitochondrie. Byly detekovány změny velikosti a funkce v genové a proteinové expresi, čili platí, že IZ indukuje poškození jak jaderné, tak i extranukleární DNA a to dvěma mechanismy. Jednak přímým ukládáním energie, ale také nadměrnou produkcí ROS, které způsobují oxidační stres buněk a omezují buněčnou proliferaci. Nezřídka se také stane, že nadměrná produkce ROS také indukuje buněčnou smrt nebo apoptózu. (Souparno, 2016)

4.4.3. Účinek ionizujícího záření na buněčný cyklus

Citlivost buněk na záření neboli jejich radiosenzitivita se liší pro jednotlivé fáze buněčného cyklu. Nejcitlivější jsou buňky na ozáření, pokud se zrovná nacházejí v pozdní fázi G1 a premitotické G2 fázi, protože právě v tento okamžik mohou kontrolní body cyklus zastavit. Menší citlivost buňky vykazují v M fázi a přechodu mezi fází G1 a S, nejmenší je přisuzována buňkám nacházejícím se v G0 fázi (Ullmann).

Samotné ozáření mění rychlost postupu G1, S a G2 fáze. Zastavení buňky ve fázi G1 řídí protein p53, který má zvýšenou expresi po ozáření. Protein p53 působí jako transkripční faktor a reguluje expresi několika složek, které jsou zapojené do drah regulujících postup buněčným cyklem. V následku na p53 se vyplaví také inhibitory CDK kináz, zejména p21WAF1/CIP1, což ještě více cyklus zpomalí. Tento protein p21 má schopnost inhibovat více CDK najednou, ovšem nejcitlivější je na G1/S cykliny. Co se týče S fáze, tak zde se setkáváme se zpomalením, které je způsobené radiosenzitivitou buněk zejména v případě vyšších dávek záření, a to více než 5 Gy. Začátek replikace DNA bývá odložen stejně jako jeho syntetizování. Poškození DNA je přeměněno na intracelulární signály pro zastavení cyklu. Proteiny ATM a DNA-dependentní protein kináza (DNA-PK), které poškození DNA aktivuje, mají možnost inhibovat progresi buněčného cyklu expresí proteinu p53. Zástava a prodloužení G2 fáze buněčného cyklu bylo

pozorované téměř u všech eukaryotických buněk ovlivněných ozáření. Toto prodloužení je způsobeno zejména modulací aktivity komplexu cyklinu B1 a proteinu p34, a to jejich sníženou expresí. Pokles syntézy cyklinu B1 a p34 je řízen na úrovni akumulace mRNA a proteinu. Stejně tak tento krok ovlivňuje fosforylace kinázy cdc2 prostřednictvím ATM závislé dráhy. (Bernhard, 1995; Teyssier, 1999; Maity, 1994; Li, 2018)

Hlavní funkcí zástavy cyklu v G1 fázi by mohla být eliminace buněk, které by mohly obsahovat poškozenou DNA. Naopak zástava cyklu v G2 fázi je důležitá hlavně pro ochranu buněk před smrtí. (Teyssier, 1999; Maity, 1994)

4.4.4. Odpověď buněk na ionizující záření

Přerušení dvou vláken DNA, takzvaný dvouvláknový zlom, zahajuje signální kaskádu, která zabezpečuje opravení poškození anebo dočasně či trvalé zastavení buněčného cyklu, eventuálně vyvolání buněčné smrti. Je-li buňka vystavena záření s vysokou dávkou a nestíhá opravu DNA, reaguje na ozáření buněčnou smrtí z důvodu dvouvláknových zlomů. Její reakce záleží na velkém množství faktorů, jako například na typu buňky, proliferační aktivitě a stavu p53. Je-li protein p53 funkční, dojde ke zvýšení sekrece p21, který inhibuje proliferaci a buňky se hromadí ve fázi G1. Normální fibroblasty buňky zůstávají v G1 fázi a dochází u nich k předčasnému stárnutí. V případě velmi nízké dávky ionizace se buňky v G1 fázi zdržují přechodně a jakmile poškozenou DNA opraví, tak pokračují v dalším dělení. (Vávrová, 2018; Souparno, 2016)

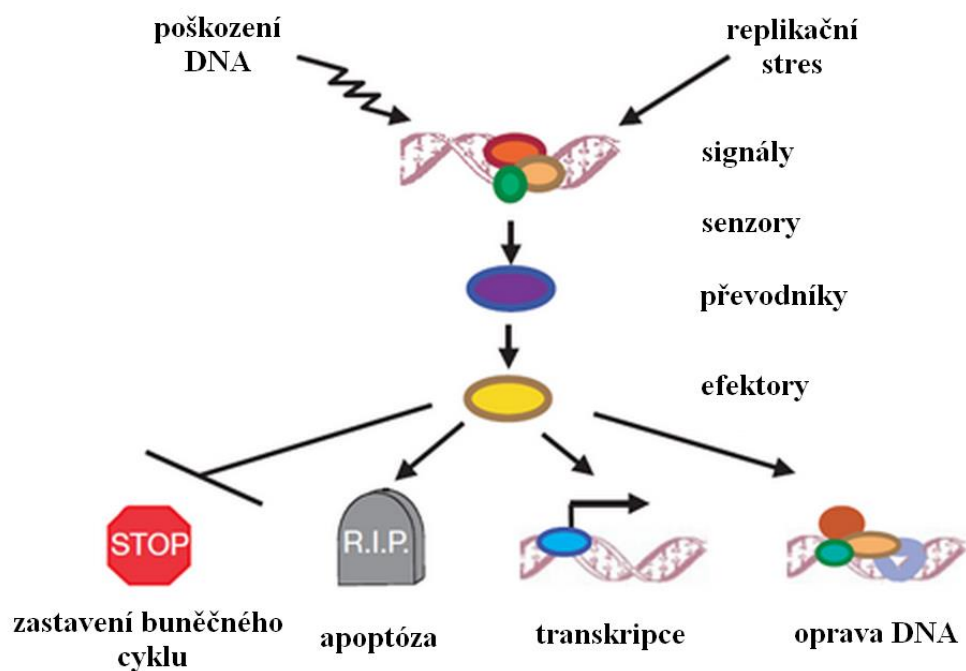
Špatná nebo neúplná oprava DSB může vést ke stárnutí buňky, dále k účinkům cytotoxickým, mutagenním a karcinogenním způsobené například indukovanými chromozomovými aberacemi. Nejen proto je důležité, aby buňky disponovaly rychlou sofistikovanou a účinnou možností reparace. Existují dva hlavní mechanismy opravy DSB. První možností je nehomologní koncové spojení (NHEJ) a druhá varianta je homologní rekombinace (HR) (Souparno, 2016) (Davis, 2013; Ullmann).

NHEJ na rozdíl od HR nepotřebuje přítomnost homologního templátu pro opravu DNA, ale je také mnohem více náchylné k chybám. NHEJ probíhá v několika krocích. Nejprve se rozpozná vlastní konec zlomu, ten stabilizuje se NHEJ komplexem, poté se přemostí DNA zlomové konce a zajistí se jejich stabilita, následně se se konce zlomů upraví a finálně ligují k sobě a komplex NHEJ se rozpouští. (Souparno, 2016; Davis, 2013; Ullmann)

Homologní rekombinace sestává z řady vzájemně propojených drah, které fungují jak při opravách DSB, tak při opravách mezibodových křížových vazeb (ICL) a DNA mezer.

Je to metabolický proces, který můžeme najít napříč všemi formami života. Pomáhá také při replikaci DNA regenerací zastavených nebo poškozených DNA vidlic a pro udržování telomer. HR má velmi nízkou chybovost, opravená DNA je věrná původní dvoušroubovici. Může také proběhnout ve všech fázích buněčného cyklu, ale HR se vyskytuje převážně v pozdních fázích S a G2 fáze. (Souparno, 2016; Li, 2008; Li, 2018)

Jako reakci na DNA zlomy buňky iniciují řadu signálních drah. Například se jedná o signalizaci v reakci na poškozenou DNA, kterou zprostředkovává rodina fosfatidyinositolových-3kináz (PI3K), dalších fosfatidyinositolových-3 příbuzných kináz PIKK, ATM, ATR a DNA dependentní kinázy (DNA-PK). Pro signalizaci poškození DNA způsobené DSB hraje klíčovou roli ATM. Na opravě DSB se DNA-PK přímo podílí prostřednictvím NHEJ. V lidském genomu se nachází předloha pro velké množství proteinů, které ve spolupráci s regulátory buněčného cyklu pomáhají s reparací DNA. Jedná se o bílkoviny spolupracující s regulátory buněčného cyklu, které zajišťují zachování životadárné dvoušroubovice bez chyb. Zmíněná komplexní síť signalizačních faktorů se nazývá DNA damage response, DDR. Tento systém pomáhá s opravou DNA zlomů, dále umožňuje zrušení pozastavení buněčného cyklu, má možnost transkripční a post-transkripční aktivace širokého spektra genů, a za určitých okolností může indukovat programovanou buněčnou smrt. Správná oprava DNA poškození a aktivace této signalizace je velmi důležitá pro prevenci genomické nestability. (Souparno, 2016; Davis, 2013; Johnson, 2016; Li, 2018)



Obrázek 7: Přehled signálních transdukčních cest poškození DNA. Šipky představují aktivující události, kolmé konce představují inhibiční události. Zastavení buněčného cyklu je znázorněné stopkou, apoptóza náhrobkem. DNA šroubovice s šípkou značí transkripci indukovanou poškozením a DNA šroubovice s barevnými podjednotkami znamená opravu indukovanou poškozením. Upraveno podle (Zhou, 2000)

4.4.5. Primární řasinka a ionizující záření

Ionizující záření o rozdílné intenzitě má tedy velmi široké druhy působení na buňku a jednotlivé buněčné struktury. Neovlivňuje jen řetězec DNA, ale také jednotlivé buňky, jejich metabolismus postupování buněčným cyklem, a v neposlední řadě ovlivňuje také růst a zánik primární řasinky, což úzce souvisí se změnami buněčného cyklu. V této části diplomové práce bude popsáno, jak konkrétně ovlivňuje dávka ionizujícího záření samotnou primární řasinku.

Vystavení buněčné linie hTERT-RPE1 (hunam telomerase-immortalized, retinal-pigmented epithelial cells) ionizujícímu záření s dávkou o velikosti 5 Gy vedlo podle nedávné studie k amplifikaci centrosomů, bylo možné v závislosti na dávce také pozorovat vyšší počet centriolů a vícečetné primární řasinky se společnou ciliární kapsou. (Dvořák, 2015)

Podle (Filipová, 2015) se u buněčné linie myoblastů C2C12 objevovala vyšší míra vícečetných řasinek z většího počtu bazálních tělísek po ozáření dávkami 10 a 20 Gy. Zároveň se

zvýšil výskyt primární řasinky u ozářených buněk oproti neozářeným kontrolám. Ovlivnění buněk ozářením také způsobilo snížení proliferace a životaschopnosti buněk, kterému odpovídalo zastavení buněčného cyklu. (Filipová, 2015)

Podle několika studií se liší biologické účinky ionizujícího záření nízkých dávek od účinků dávek vysokých. Reakce buněk indukovaná nízkými dávkami ionizujícího záření, která je následována druhou vyšší dávkou záření, se nazývá adaptivní odezva (adaptive response, AR). Tato odpověď zahrnuje aktivaci mnoha druhů signálních drah. Bylo dokázáno, že buňka odpovídá na radiaci za pomoci genů spojených s opravou DNA, stresovou odpovědí, změnou buněčného cyklu a apoptózou. Dalšími mechanismy adaptivní odezvy je také antioxidační obranné mechanismy a aktivaci DNA oprav. (Zhou, 2000; Filipová, 2017)

Buňky si také vyvinuly takzvané adaptivní odpovědi na přežití (ASRS). Jsou pozorovány, pokud se buňky po opakovaných nízkých dávkách expozice vystaví vysoké dávce cytotoxického nebo genotoxického agens. Například ionizujícího záření. Konkrétně lidské normální fibroblasty (mj. v této diplomové práci zkoumaná buněčná linie IMR-90 a další, např. GM2936B, GM2937A, AG2603) a fibroblasty náchylné k rakovině nebo neoplastické (U1-Mel, HEp-2, HTB-152) byly nejprve aktivovány nízkými dávkami 0,05-10 cGy za den po dobu 4 dní a následně 5. den experimentu ovlivněny vysokou dávkou 290-450 cGy. Buněk přežilo více než dvakrát tolik než v případě bez adaptování nízkými dávkami. Nicméně tyto výsledky nebyly pozorovány u ostatních lidských normálních buněk a buněk neoplastických a nádorových. Dá se tedy předpokládat, že adaptovat se na ionizující záření mohou pouze určité lidské buňky. Zejména ty, které mohou indukovat opravy DNA a radiorezistenci. Síla ASRS koreluje se zvýšenými hodnotami PCNA, cyklinu D1 a cyklinu A. (Boothman, 1996)

5. PRAKTICKÁ ČÁST

5.1. Metodika a materiál

V této kapitole je uvedeno, jaké metodiky byly zvoleny. Jsou zde popsány také výhody jednotlivých vybraných analýz. Nachází se zde i seznam a popis buněčných linií, které byly pro experimenty zvoleny, včetně způsobů jejich kultivace. Najdeme zde přesný postup jednotlivých analýz a také způsob zpracování dat, která byla jednotlivými měřeními získána.

5.2. Buněčné linie a jejich kultivace

Jakožto univerzální zástupci buněčných linií byly pro provedené pokusy vybrány dva druhy základních buněk vaziva. Zvolena byla linie IMR-90 jako zástupce fetálních plicních fibroblastů a linie NHLF, což je buněčná linie dospělých plicních fibroblastů.

5.2.1. IMR-90

Buněčná linie lidských plicních fibroblastů, které byly izolované z buněčné tkáně v 16. týdnu těhotenství (ATCC, USA). Buněčná linie IMR-90 byla kultivována v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium s GlutaMAXem, Gibco, UK), do kterého bylo přidáno 10 % Fetálního bovinního séra (FBS, ThermoFisher Scientific, UK) a 1 % roztoku penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, USA), při 37 °C/5 % CO₂.

5.2.2. NHLF

Buněčná linie lidských plicních fibroblastů izolovaných z tkáně dospělých pacientů bez astmatu, chronické obstrukční nemoci plic (COPD) a cystické fibrózy (Thermo Fisher Scientific, UK). NHLF byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium s GlutaMAXem, Gibco, UK) s přidáním 10% Fetálního bovinního séra (FBS, ThermoFisher Scientific, UK) a 1% roztoku penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, USA) při 37 °C/5 % CO₂.

5.3. Provedené testy

Pro zjištění viability a proliferace ozářených buněk a buněčné kontroly byl použit jednoduchý a efektivní test WST-1. Informace o procentuálním rozdělení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu poskytla analýza buněčného cyklu na průtokovém cytometru. Jednotlivé počty primárních řasinek a jejich délka byla zjištěna pomocí imunofluorescence.

5.3.1. WST-1

Test buněčné proliferace, viability a cytotoxicity buněk se nazývá WST-1 (Roche, Švýcarsko). K analýze buněčné suspenze využívá tetrazoliovou sůl (4-[3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzensulfonát), která reaguje s mitochondriální sukcinát-tetrazoliovou dehydrogenázou za vzniku formazanového barviva. Absorbance vzniklého formazanu je po tříhodinové inkubaci při 37 °C spektrofotometricky měřitelná při vlnové délce 440 nm a ukazuje počet metabolicky aktivních živých buněk v testované kultuře (BioVision, 2018) (Ngamwongsatit, 2008)

U obou použitých buněčných linií byl proveden WST-1 test (Roche, Švýcarsko) pro zjištění buněčné viability a proliferace. Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo nasazeno $3,5 \times 10^3$ buněk IMR-90 ve 100 μ l média a následně byla po inkubaci dlouhé 24 hodin destička ozářena jednotlivými dávkami – 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Linie NHLF byla nasazena do jednotlivých jamek o větší koncentraci buněk na jamku a to 5×10^3 ve 100 μ l média. Po inkubaci dlouhé 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin bylo do všech jamek napipetováno 10 μ l činidla WST-1. Konečné měření absorbance při vlnové délce 440 nm proběhlo po tříhodinové inkubaci v 5% CO₂ při 37 °C na spektrometru Paradigm microplate reader (Becman Coulter, USA).

5.3.2. Imunofluorescenční barvení buněk

Pro detekci výskytu primární řasinky bylo provedeno imunofluorescenční barvení buněk. Jádra buněk jsou obarvena modře pomocí DAPI, zeleně je nabarveno bazální tělísko tvořeno gamma tubulinem a červeně se barví axonema primární řasinky, která je tvořena alfa tubulinem.

Na krycí sklíčka položená na dno 6-jamkové destičky byly nanесeny 2 ml buněčné suspenze obsahující $1,5 \times 10^5$ NHLF nebo IMR-90. Destička byla inkubována 24 hodin o teplotě 37 °C v 5% CO₂. Potom byla ozářena dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy a inkubována 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin o teplotě 37 °C v 5% CO₂. Při samotném imunofluorescenčním barvení byly buňky nejprve řádně 3x promyty fosfátovým pufrem (PBS, Sigma Aldrich, USA), poté fixovány ponořením do 4% paraformaldehydu (Sigma Aldrich, USA) na 10 minut při laboratorní teplotě. Po důkladném opláchnutí v PBS byla buněčná membrána permeabilizována 0,5% roztokem Tritonu X-100 (Sigma Aldrich, USA) v PBS po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po důkladném opláchnutí PBS byla provedena blokáce nespecifických míst v buněčném jádře 20minutovou inkubací 0,5% kozím blokačním sérem (Jackson ImmunoResearch, UK). Po odpipetování blokačního séra byla sklíčka inkubována 60 minut při laboratorní teplotě s roztokem primárních protilátek. Byly použity primární protilátky Acetylated- α Tubulin (1:800, Sigma Aldrich, USA) a Anti- γ -Tubulin (1:300,

Sigma, Aldrich, USA). Poté byla sklíčka 3x opláchnuta PBS a inkubována 45 minut ve tmě při laboratorní teplotě v roztoku sekundárních protilátek Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')₂ (1:300, Jackson ImmunoResearch, UK) a Anti-Myší IgG F(ab')₂ fragment–Cy3 protilátkou (1:300, Sigma Aldrich, USA). Po následném důkladném oplachu PBS byla sklíčka inkubována 5 minut ve tmě roztokem Dapi (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1:5000, Sigma Aldrich, USA) Když byl proveden finální důkladný oplach v PBS, tak se sklíčka opatrně jehlou přiklopila na kapku montovacího média ProLong® Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher, USA) na podložním sklíčku obarvenou stranou dovnitř. Montovací médium se nechalo ztuhnout minimálně 24 hodin při teplotě 4 °C.

Nabarvená sklíčka byla prohlížena ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse (Praha, Česká republika) za použití imerzního oleje a objektivu se zvětšením 60x. Focena byla v programu NIS-Elements, oficiálního programu společnosti Nikon.

Průměrná délka primární řasinky byla vypočítána ze všech odečtených primárních řasinek u veškerých experimentů. Její délka byla měřena v programu ImageJ v μm .

5.3.3. Analýza buněčného cyklu

Jako velmi výkonná moderní a citlivá laboratorní metoda byla pro analýzu buněčného cyklu zvolena průtoková cytometrie. Tato flexibilní metoda umožňuje specifické stanovení velkého množství parametrů jednotlivých částic a změření jejich kvantitativních i kvalitativních vlastností v krátkém časovém intervalu. Velkým pozitivem analýzy průtokovým cytometrem je možnost měřit každou jednotlivou částici nebo buňku. Nejedná se tedy o získávání průměrných hodnot měřeného vzorku. Při průchodu průtokovým cytometrem vzorek postupně prochází třemi hlavními částmi přístroje, a to nejprve fluidním systémem, kde se částice seřadí v roztoku jedna za druhou, aby mohly být měřeny jednotlivě, což je zajištěno hydrodynamickou fokuzací, dále optickým systémem, ve kterém excitační optika částici ozáří monochromatickým světlem a sběrná optika zachytí vzorkem emitované fluorescenční záření, které usměrní na vrstvu příslušných fotonásobičů a fotodiod, kde je rozhraní mezi optickým systémem a systémem, jenž převede světelný signál na měřitelný elektrický impuls a podle nastavené prahové hodnoty ho uloží do datového diagramu. (Marinov, 2008; Šinkorová, 2008; Burpee, 2018; Chapman, 2000; Nolan, 2013; Jahan-Tigh, 2012)

Kromě stanovení relativního obsahu buněčné DNA umožňuje průtoková cytometrie též identifikaci rozdělení buněk do jednotlivých fází buněčného cyklu. V proliferující buněčné populaci lze najít 4 fáze – G1, S (fáze syntézy DNA), G2 a M (mitóza). Fáze G2 a M mají ovšem shodný obsah DNA a tudíž je nelze jen na základě koncentrace nukleové kyseliny rozlišit. (Nunez, 2001)

Jednotlivé fáze buněčného cyklu byly stanoveny u ozářených buněk 24 hodin inkubovaných v termostatu při teplotě 37 °C v 5% CO₂ dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy oproti neozářeným buňkám jako kontrole. Po inkubaci dlouhé 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin od ozáření byly buňky převedeny do buněčné suspenze pětiminutovým působením trypsinu (Penta Chemicals Unlimited, ČR), následně dvakrát promyty vychlazeným PBS (4° C) a fixovány a permeabilizovány přidáním 70% ethanolu (Penta Chemicals Unlimited, ČR) minimálně na 60 minut. Následně byly označeny propidiem jodidem (PI) přidáním Vindelova roztoku (1 ml 1M TRIS-pH 8, 1 mg RNAzy, 60 mg NaCl, 5 mg PI, doplněno do 100 ml deionizovanou vodou) při inkubaci alespoň 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Suspenze buněk byla následně změřena na průtokovém cytometru CyAn ADP od firmy Beckman Coulter (USA). Při zpracování dat byly odstraněny dublety, multiplety a agregáty, které by znepresňovaly měření a následně byla provedena analýza v programu Multicycle AV (Phoenix Flow Systems, USA), byly vytvořeny histogramy pro fluoresceční signál propidium jodidu ve zvoleném fluorescenčním kanálu.

5.4. Ozařování

Jako zdroj IZ byl použit γ -zářič ⁶⁰CO (Chirana, Česká republika). Tento γ -zářič má příkon 1,44 Gy /min. Ozařování buněk probíhalo v ionizační komoře Dosemeter PTW Unidos 1001, která má sériové číslo 11057 a dále také v ionizační komoře PTW TM 313 se sériovým číslem 0012 (RPD Inc., USA). Buňky byly ozařovány ve vzdálenosti 1 m od zářiče. Po ozáření dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy byly buňky v 37 °C a 5% CO₂ inkubovány 24 hodin, 48 hodin anebo 72 hodin a následně zpracovávány pro následnou analýzu.

5.5. Statistické zpracování dat

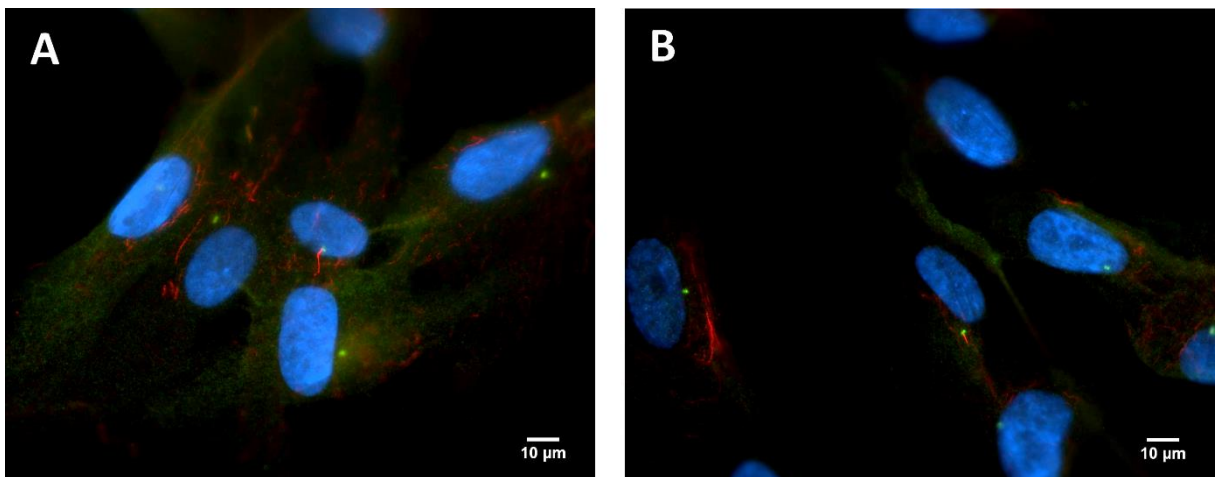
Získaná data byla zpracována v programu GraphPad InStat verze 3 (GraphPad Software, USA). Naměřené hodnoty byly zkoumány pomocí one way ANOVA a Tukey *post hoc* testu provedeného ze tří na sobě nezávislých pokusů. Úroveň statistické významnosti byla stanovena pro hodnotu $p \leq 0,05$.

6. VÝSLEDKY EXPERIMENTŮ

Vyhodnocování výskytu a velikosti primární řasinky bylo uskutečněno pomocí několika experimentů, které byly provedeny *in vitro*. Experimenty proběhly za účelem zkoumání vzájemného stavu různě vysokých dávek ionizujícího záření působícího na buněčné linie IMR-90 a NHLF.

6.1. Vyhodnocení změn u buněčné linie plicních fibroblastů IMR-90 po ozáření

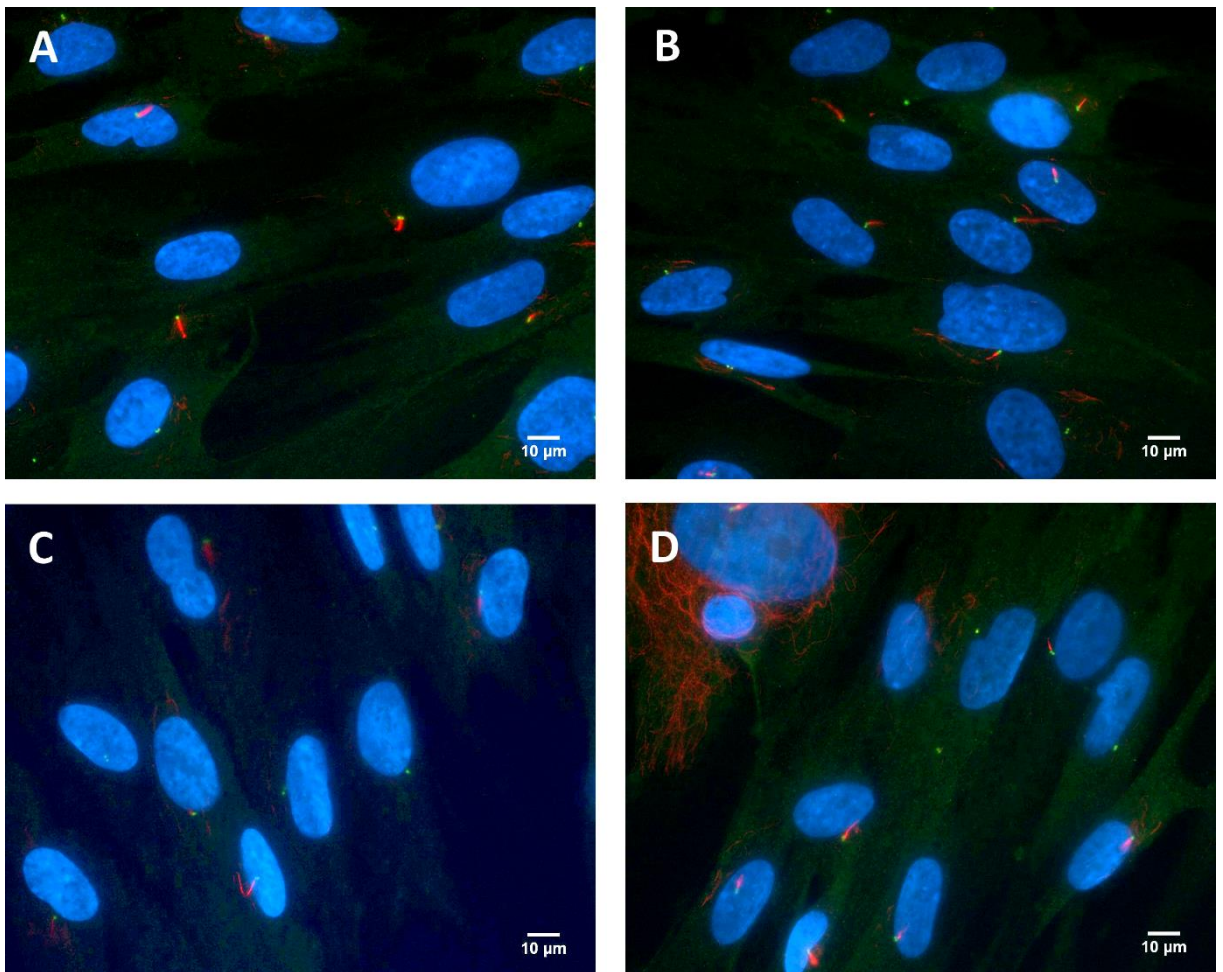
Cytoskeletální změny indukované ionizujícím zářením byly sledovány na základě změn primární řasinky, coby jedinečné sensorické organely, která se v buňce vyskytuje jen za určitých předpokladů a v určitých fázích buněčného cyklu. Další provedenou analýzou bylo měření buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Podle změřeného množství DNA v jádře, bylo stanoveno, v jakém buněčném cyklu se buňky nacházejí. Dále byl proveden WST-1 test hodnotící proliferaci a viabilitu buněk po ozáření.



Obrázek 8: Reprezentativní fotografie buněčné linie IMR-90 na fotografiích A a B po 24hodinové inkubaci a ovlivnění dávkou 10 Gy.

Měření byla provedena u buněčné linie plicních fibroblastů IMR-90 *in vitro*. IMR-90 byly inkubovány 24 hodin a poté ozářeny dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy a následně po intervalech 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin byla analyzována frekvence primární řasinky, proliferace a viabilita a fáze buněčného cyklu. Ozářené buňky byly porovnány s neozářenou kontrolou.

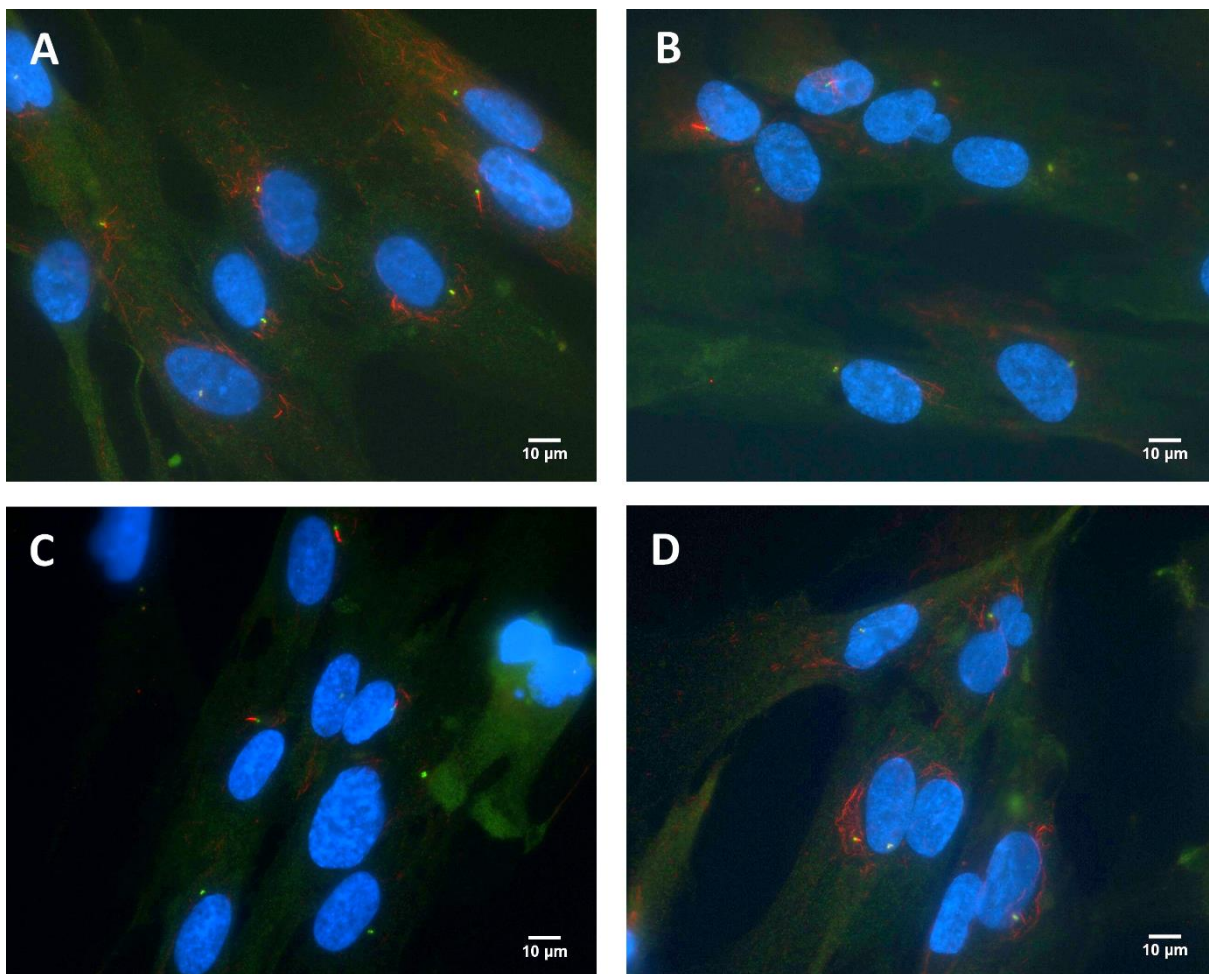
6.1.1. Analýza primární řasinky po ozáření



Obrázek 9: Reprezentativní fotografie buněčné linie IMR-90 na fotografiích A, B, C a D po 48hodinové inkubaci a ovlivnění 2 Gy .

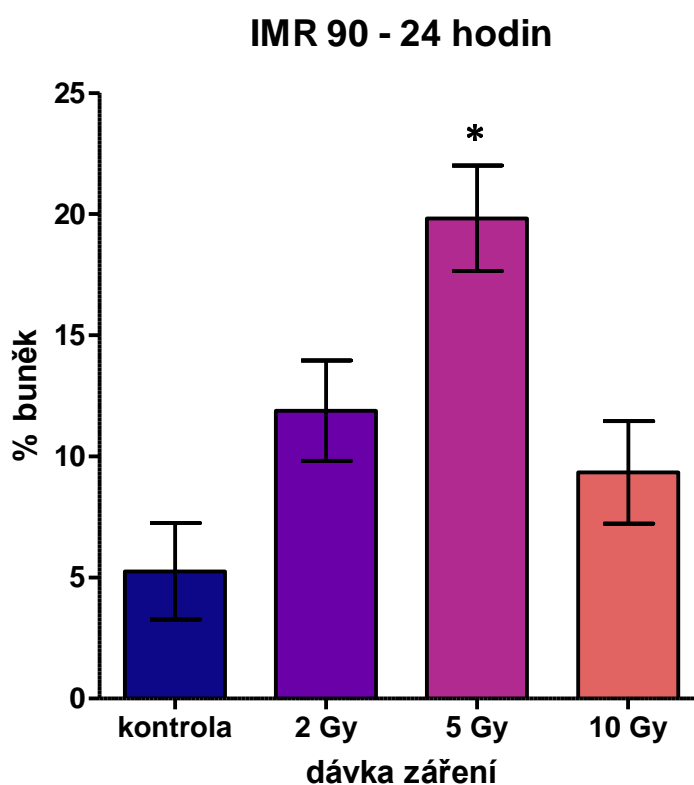
6.1.1.1. Změna četnosti primární řasinky

Primární řasinka byla na imunofluorescenčně obarvených preparátech odečítána na třech na sobě nezávislých experimentech. Jednotlivé dávky ozáření činily 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy, byly porovnávány mezi sebou a také s neozářenou kontrolou. Reprezentativní fotografie imunochemicky obarvené buněčné linie IMR-90 jsou zobrazeny na obrázku číslo 8, 9 a 10.

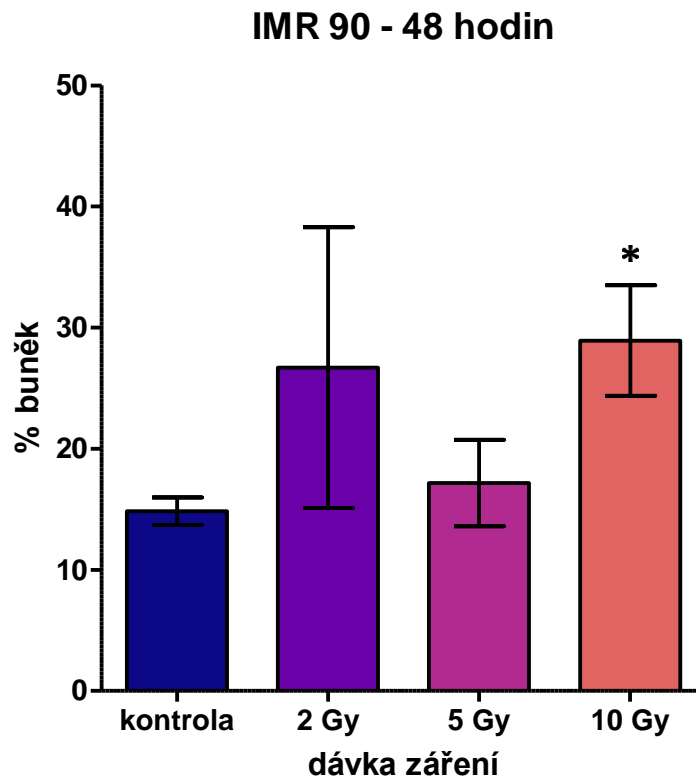


Obrázek 10: Reprezentativní fotografie buněčné linie IMR-90. Na fotografii A se nachází reprezentativní fotografie buněčné linie IMR-90 neozářené kontroly s délkou inkubace 24 hodin. Na fotografii B je také IMR-90, která byla ozářena dávkou 2 Gy a byla inkubována 24 hodin. Na fotkách C a D jsou vyfoceny buněčné linie IMR-90, které byly ozářeny 2 Gy a inkubovány 72 hodin.

Buněčná linie IMR-90 byla ozářena dávkami 2 Gy , 5 Gy a 10 Gy . Primární řasinka byla detekována 24h, 48h a 72h po ozáření. Na grafu číslo 1 se nachází porovnání dat četnosti primární řasinky z prvních experimentů, kdy byla ovlivňována buněčná linie IMR - 90 jednotlivými dávkami záření. Naše výsledky ukazují, že u buněk ozářených dávkou 2 Gy a kultivovaných 24 hodin po ozáření došlo ke zvýšení počtu buněk s primární řasinkou na 11,88 % oproti kontrole, kde primární řasinku exprimovalo 5,25 % buněk. Po ozáření dávkou 5 Gy se procento buněk s primární řasinkou zvýšilo na nejvyšší hodnotu u této délky inkubace a to na 19,82 % buněk. V případě nejvyšší ozařované dávky 10 Gy se řasinka vyskytovala u 9,34 % buněk, což je nejnižší množství ze sledovaných dávek záření.



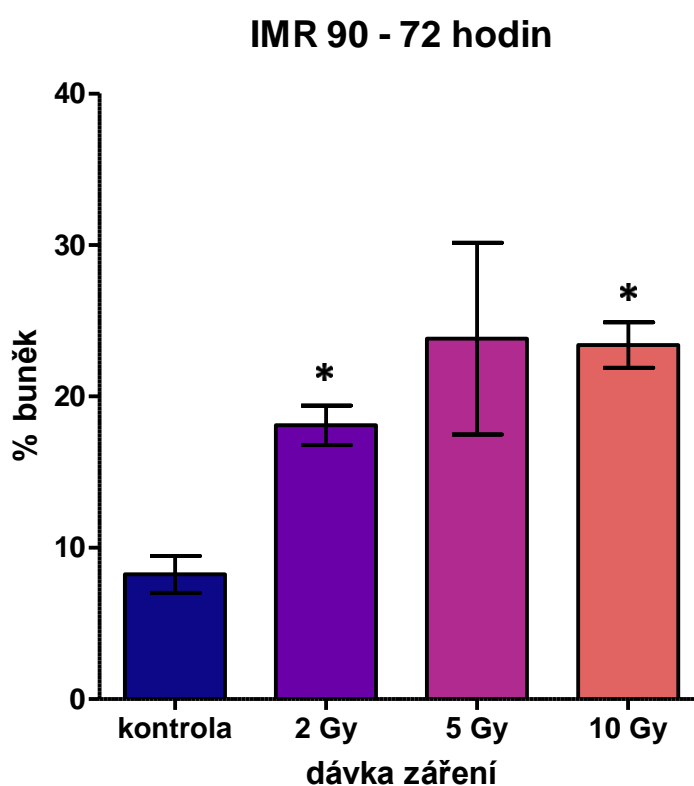
Graf č. 1: Procentuální zastoupení buněk IMR-90 s primární řasinkou 24 hodin po ozáření 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$.



Graf č. 2: Procentuální zastoupení buněk IMR-90 s primární řasinkou 24 hodin po ozáření 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$.

Při dalším pokusu s buněčnou linií IMR-90 a délkou inkubace 48 hodin byly naměřeny následující hodnoty zobrazené na grafu číslo 2. U kontrolního neovlivněného vzorku se řasinka vyskytovala u 14,83 % měřených buněk, což bylo nejméně ze všech měření. Nejnižší počet řasinek byl exprimován na povrchu buněk ovlivněných 5 Gy a to u 17,17 %. Nejvíce buněk s primární řasinkou bylo detekováno u buněk ovlivněných 10 Gy, kde se procento výskytu vyšplhalo na 28,92 %. Druhá nejvyšší hodnota procentuálního výskytu primární řasinky byla 26,7 %. Tato vysoká hodnota byla detekována u buněk ovlivněných 2 Gy. Jak je vidět, naměřené hodnoty jsou znatelně vyšší, někde více než dvojnásobné než u inkubace 24hodinové.

Na následujícím grafu číslo 3. je znázorněn výskyt primární řasinky u buněk IMR-90 po inkubaci 72 hodin. Pro kontrolní buňky IMR-90 byl detekován výskyt primární řasinky v 8,24 % případů. Nejvyšší hodnota byla tentokrát naměřena u dávky 5 Gy, a to 23,81 %. Druhá nejvyšší hodnota, jen o něco málo nižší než u dávky 5 Gy - 23,39 % buněk s primární řasinkou naměřená pro ovlivnění 10 Gy. Nejnižší dávka 2 Gy při 72hodinové inkubaci indukovala 18,08 % buněk s detekovanou primární řasinkou.



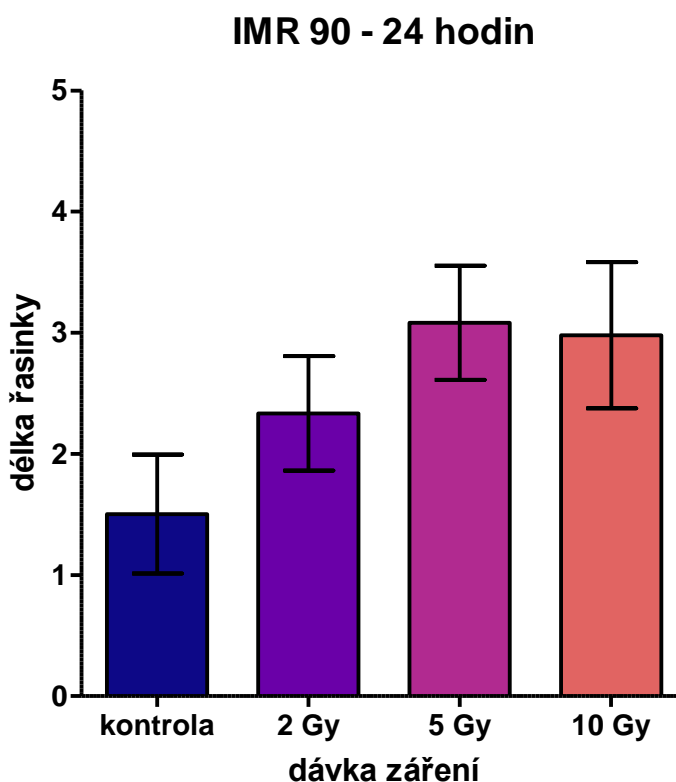
Graf č. 3: Procentuální zastoupení buněk IMR-90 s primární řasinkou 24 hodin po ozáření 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$.

6.1.1.2. Změny velikosti primární řasinky

Průměrná délka primární řasinky byla vypočítána jako průměr ze všech detekovaných primárních řasinek u jednotlivých experimentů, které se lišily velikostí dávky (2 Gy, 5 Gy anebo 10 Gy) a délkou inkubace 24, 48 a 72 hodin po ovlivnění ionizujícím zářením. Stejně jako

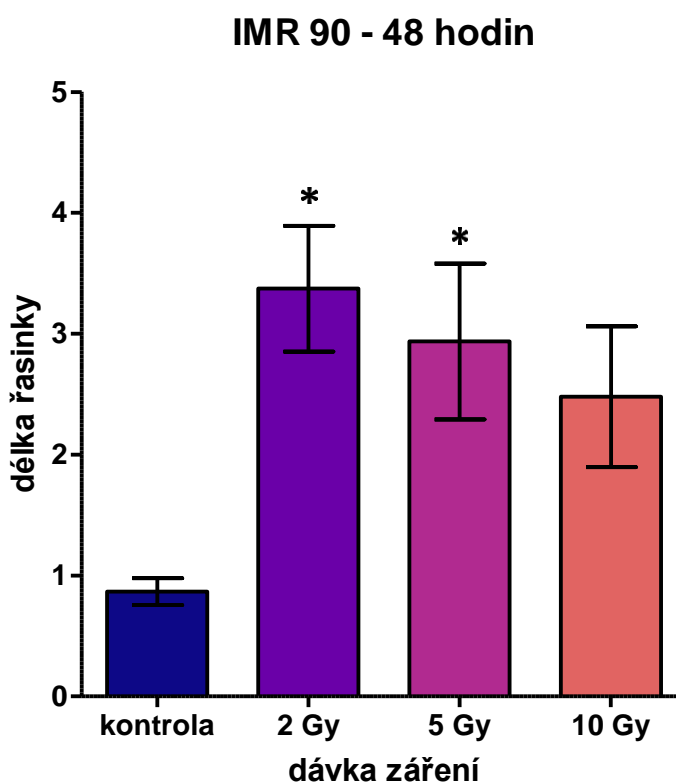
při zkoumání výskytu primární řasinky byly jednotlivé experimenty prováděny nezávisle na sobě a porovnávány s neozářenou kontrolou, u které všechny kroky kromě ozařování byly provedeny stejně. Délka primární řasinky byla měřena v programu ImageJ.

Na následujícím grafu číslo 4 je vidět grafické znázornění délky primární řasinky vztažené k jednotlivým velikostem dávek pro inkubaci dlouhou 24 hodin a buněčnou linii IMR-90. Nejkratší primární řasinky s průměrnou délkou 1,5 μm byly naměřeny u kontrolního neovlivněného vzorku. O něco delší průměrná délka se vyskytla u 2 Gy. Tady její hodnota činila 2,33 μm . Další malé zvýšení průměrné délky primárních řasinek u buněčné linie IMR-90 bylo detekováno u ovlivnění absorbovanou dávkou 10 Gy. Průměrná délka zde dosahovala 2,98 μm , což je jen o necelý mikrometr více než u dávky 2 Gy. Nejdelší průměrná délka detekovaných primárních řasinek byla zaznamenána u buněk, které byly ovlivněny 5 Gy. Hodnota u tohoto ovlivnění činila 3,08 μm . Rozdíly mezi jednotlivými dávkami nejsou signifikantní.



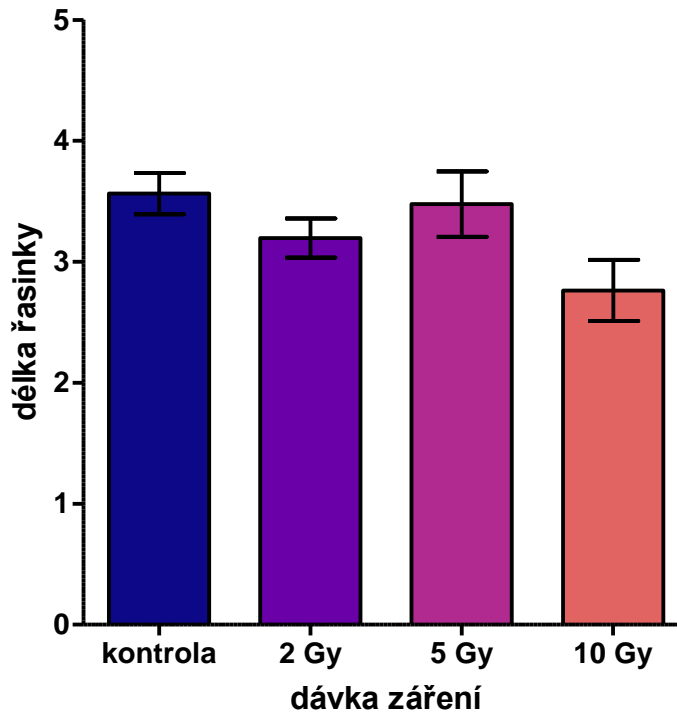
Graf č. 4: Délka primárních řasinek 24 hodin po ozáření u IMR-90. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

Na uvedeném grafu číslo 5 je znázorněno, jak se lišily průměrné délky primárních řasinek u buněk IMR-90 po ovlivnění a inkubaci, která trvala 48 hodin. Při této délce inkubace byly hodnoty průměrné délky primární řasinky ze všech tří pokusů s rozdílnou délkou inkubace nejvyrovnanější. Rozdíl mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou hodnotou činil pouze 0,8 μm . Nejdelší primární řasinky byly detekovány u kontrolního vzorku buněk IMR-90. Průměrná délka zde nabyla hodnoty 3,56 μm . V případě buněk ovlivněných dávkou 5 Gy se průměrná délka vyšplhala na 3,47 μm , což je nejvyšší hodnota mezi buňkami ovlivněnými ionizujícím zářením. Linie IMR-90 ozářená absorbovanou dávkou 2 Gy exprimovala řasinky o průměrné délce 3,19 μm . A naposled nejmenší průměrná délka řasinek se vyskytovala u ovlivnění dávkou 10 Gy.



Graf č. 5: Délka primárních řasinek 48 hodin po ozáření u IMR-90. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

IMR 90 - 72 hodin



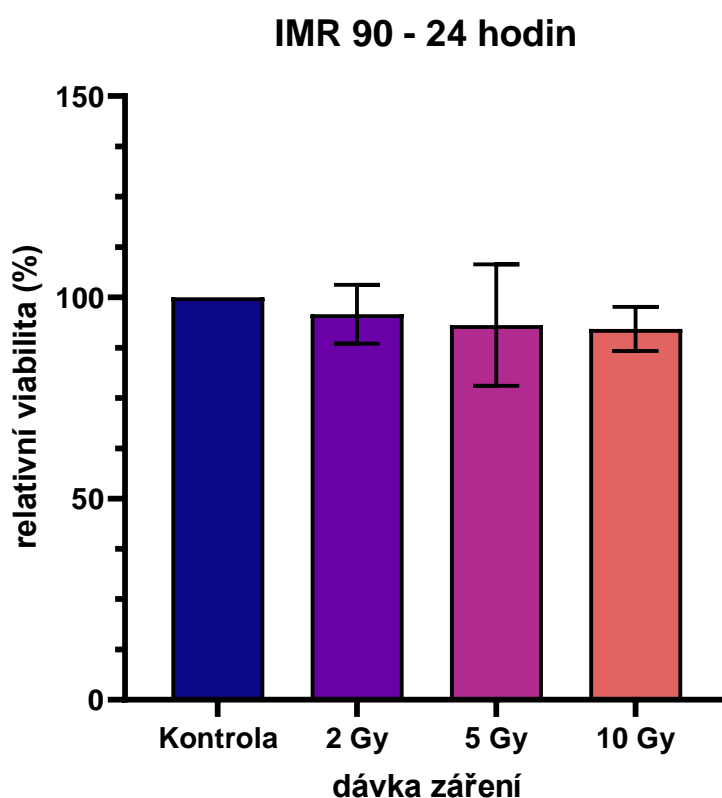
Graf č. 6: Délka primárních řasinek 72 hodin po ozáření u IMR-90. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

Na předcházejícím grafu číslo 6 je zanesená průměrná délka primární řasinky u buněk, které byly po ozáření inkubovány 72 hodin. Buněčná linie IMR-90 při této nejdelší inkubaci měla nejdelší primární řasinky u neovlivněné kontroly. Zde průměrná hodnota vyšla 3,56 μm . Druhé nejdelší řasinky byly detekovány u buněk ovlivněných dávkou 5 Gy, průměrná délka u nich dosáhla 3,48 μm . Buňky ozářené 2 Gy měly řasinku dlouhou v průměru 3,19 μm a buňky ovlivněné dávkou o velikosti 10 Gy vytvořily nejkratší řasinky ze 72hodinové inkubace, a to řasinky dlouhé v průměru 2,76 μm . U experimentů měřících délku primární řasinky, které byly provedeny na buněčné linii IMR-90, nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly.

6.1.2. Dávková závislost účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněk

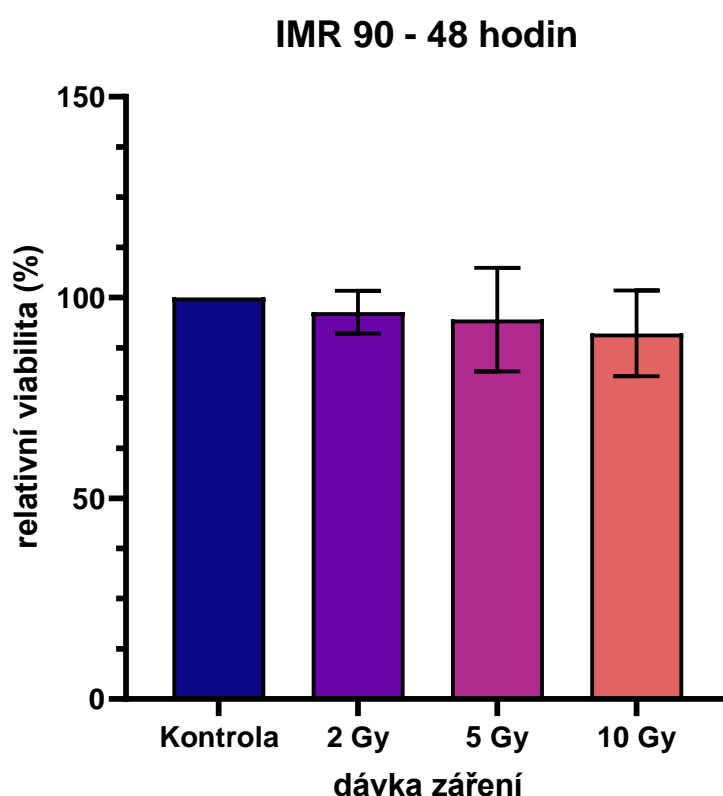
Pro detekci buněčné viability a proliferace byl použit WST-1 test, který ukazuje počet metabolicky aktivních buněk přítomných v analyzovaném médiu ve srovnání s neozářenou kontrolou, která byla kultivována za normálních podmínek bez působení ionizujícího záření.

Jak je znázorněné na grafu číslo 7, proliferace a viabilita buněčné linie IMR-90, která byla inkubovaná 24 hodin po ozáření, klesla při absorbované dávce 2 Gy oproti neovlivněné kontrole na 95,8 %. Při ozáření buněčné linie IMR-90 inkubované 24 hodin od ovlivnění dávkou 5 Gy se při porovnání s neozářenými buňkami snížila na 93,11 % proliferujících a viabilních fibroblastů. Při absorbované dávce 10 Gy bylo detekováno pouze 92,16 % fibroblastů vykazujících známky proliferace a viability. V této analýze byla detekovaná nesignifikantní souvislost mezi zvýšenou absorbovanou dávkou ionizujícího záření a snižováním proliferace a viability buněk záření vystaveným.



Graf č. 7: Viabilita a proliferace IMR-90 24 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

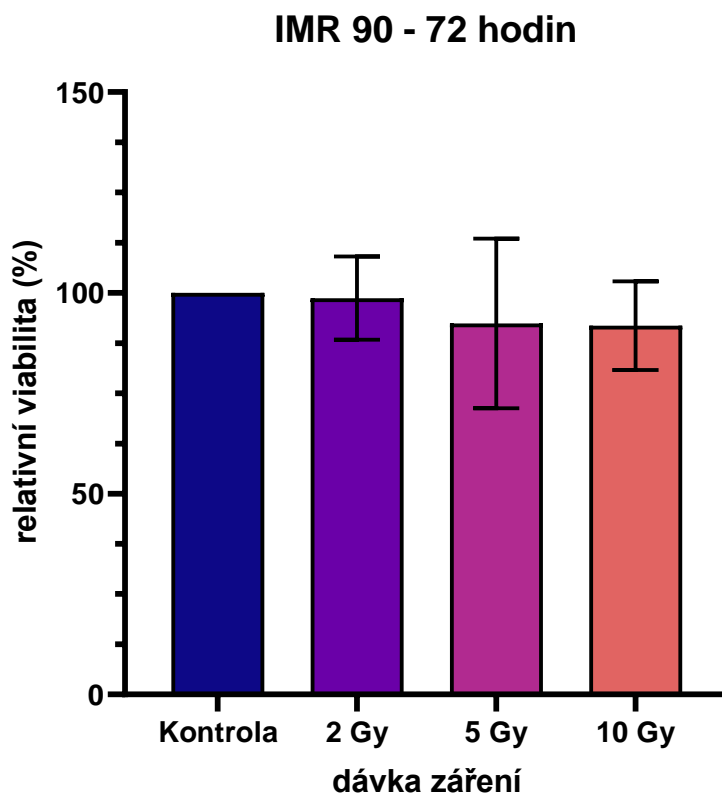
U buněčné linie IMR-90, jež byla inkubována 48 hodin od ozáření, klesla viabilita a proliferace u buněk ozářených 2 Gy oproti kontrole na 96,37 %. Grafické znázornění je uvedené na grafu číslo 8. Po 48hodinové inkubaci a absorbované dávce 5 Gy bylo detekováno 94,5 % buněk IMR 90 proliferujících a viabilních. V následujícím experimentu došlo k dalšímu snížení viability a proliferace u fibroblastů, které byly kultivovány 48hodin a ozářeny dávkou 10 Gy . U těchto buněk se procento viabilních a proliferujících buněk snížilo na 91,07 % oproti neozářené kontrole.



Graf č. 8: Viabilita a proliferace IMR-90 48 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

V případě buněčné linie IMR-90 ozářené 2 Gy , která byla inkubovaná 72 hodin po ozáření, bylo množství proliferujících a viabilních buněk sníženo na 98,67 % oproti neozářeným buňkám. IMR-90, které byly ovlivněny absorbovanou dávkou 5 Gy a následně inkubovány 72 hodin, došlo k poklesu viability a proliferace na celkových 92,4 % oproti kontrolnímu vzorku. Při následujícím

experimentu u stejné buněčné linie byl pozorován další pokles proliferace a viability. Tyto buňky byly inkubované 72 hodin po ozáření dávkou 10 Gy. Oproti kontrolní neozářené kontrole fibroblastů se viabilita a proliferace snížila na 91, 85 % (graf č. 9). U experimentů viability a proliferace provedených na buněčné linii IMR-90 nebyly rozdíly mezi jednotlivými experimenty statisticky významné. U experimentů, ve kterých byla měřena délka primární řasinky buněčné linie NHLF, nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly.

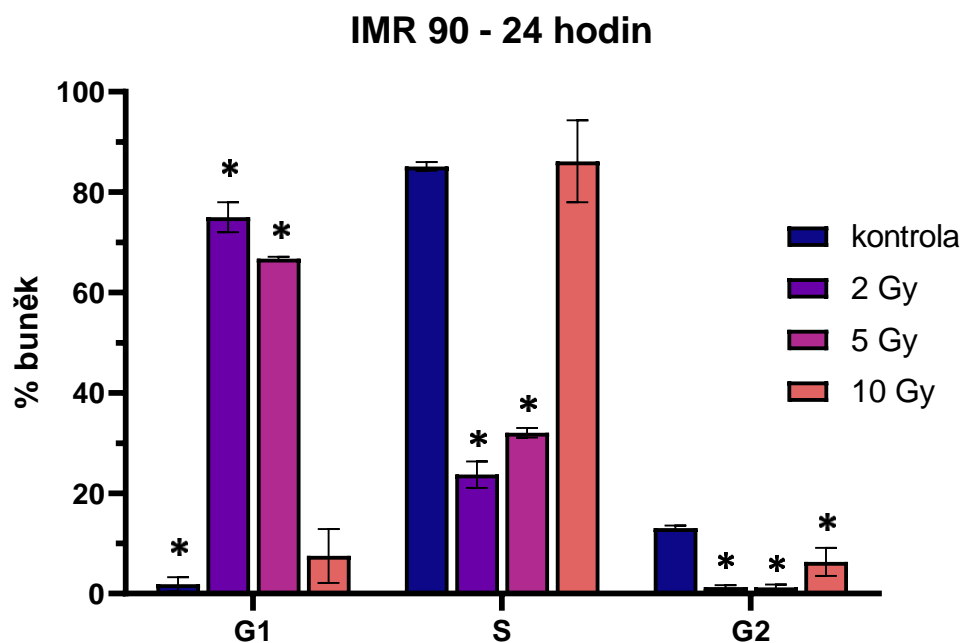


Graf č. 9: Viabilita a proliferace IMR-90 72 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

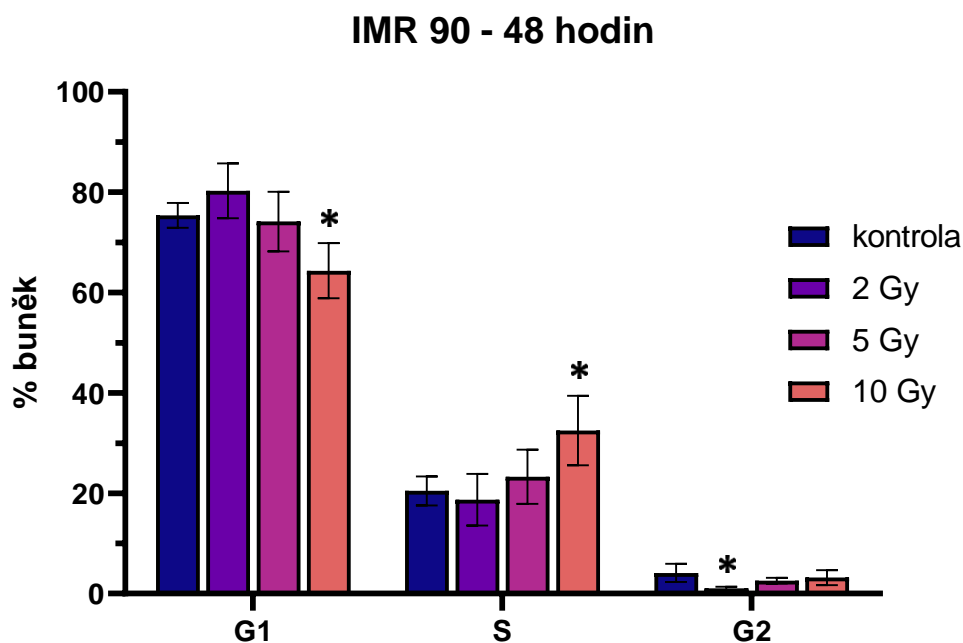
6.1.3. Změny v buněčném cyklu

Analýza změn v buněčném cyklu byla sledována s využitím průtokové cytometrie u buněčné linie IMR-90 ozářené 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy, které byly proměřeny za 24 hodin, 48 hodin a 72 hodin po ozáření ionizujícím zářením. Naměřená data byla porovnávána s neozářenou kontrolou, která nebyla ozářena.

Změny v buněčném cyklu buněčné linie IMR-90 jsou znázorněny na grafu číslo 10 po inkubaci dlouhé 24 hodin, na grafu číslo 11 po inkubaci 48hodinové a na grafu číslo 12 jsou vidět výsledky po inkubaci, která trvala 72 hodin. Signifikantní rozdíly byly naměřeny mezi všemi fázemi buněčného cyklu ve všech délkách inkubace. Při nejkratší 24hodinové inkubaci se u kontrolního vzorku nacházelo 1,85 % buněk v G1 fázi, signifikantní zvýšení 85,12 % buněk v S fázi a 13,03 % buněk v G2 fázi. Při inkubaci 48 hodin se buňky vyskytovaly ze 75,39 % v G1 fázi, 20,48 % bylo v S fázi a zbylých 4,13 % v G2 fázi. Kontrolní vzorek buněk měl buňky po 72hodinové inkubaci v 78,26 % v G1 fázi, 18,84 buněk v S fázi a 2,9 % buněk v G2 fázi. Ovlivnění dávkou 2 Gy změnilo hodnoty buněk inkubovaných 24 hodin na 75 % buněk v G1 fázi, 23,71 % buněk v S fázi a 1,28 % buněk v G2 fázi. Při inkubaci 48 hodin bylo naměřeno 80,27 % buněk v G1 fázi, 18,71 % buněk v S fázi a 1,02 % buněk v G2 fázi. Signifikantní zvýšení inkubace na 72 hodin přineslo výsledky 76,68 % buněk v G1 fázi, 21,6 % buněk v S fázi a 1,72 % buněk v G2 fázi. Změna dávky záření na 5 Gy ovlivnila buňky tak, že se při 24hodinové inkubaci v G1 fázi vyskytovalo 66,71 % buněk, v S fázi 32,06 % buněk a v G2 fázi 1,23 % buněk. Při inkubaci 48 hodin bylo ve fázi G1 74,15 % buněk, ve fázi S 23,29 % buněk a ve fázi G2 10,76 % buněk. Inkubace 72 hodin měla buňky rozdělené na 66,37 % buněk v G1 fázi, 20,06 % buněk v S fázi a zbylých 13,57 % buněk v G2 fázi. Nejvyšší absorbovaná dávka 10 Gy zachytila po inkubaci 24 hodin 7,51 % buněk v G1 fázi, 86,15 % buněk v S fázi a 6,34 % buněk v G2 fázi. Inkubace 48 hodin přinesla 64,34 % buněk v G1 fázi, 32,47 % buněk v S fázi a 3,18 % buněk v G2 fázi. Nejdelší inkubace, která trvala 72 hodin, změnila naměřené hodnoty na 62,94 % buněk v G1 fázi, 35,28% buněk v S fázi a 1,77 % buněk v G2 fázi.

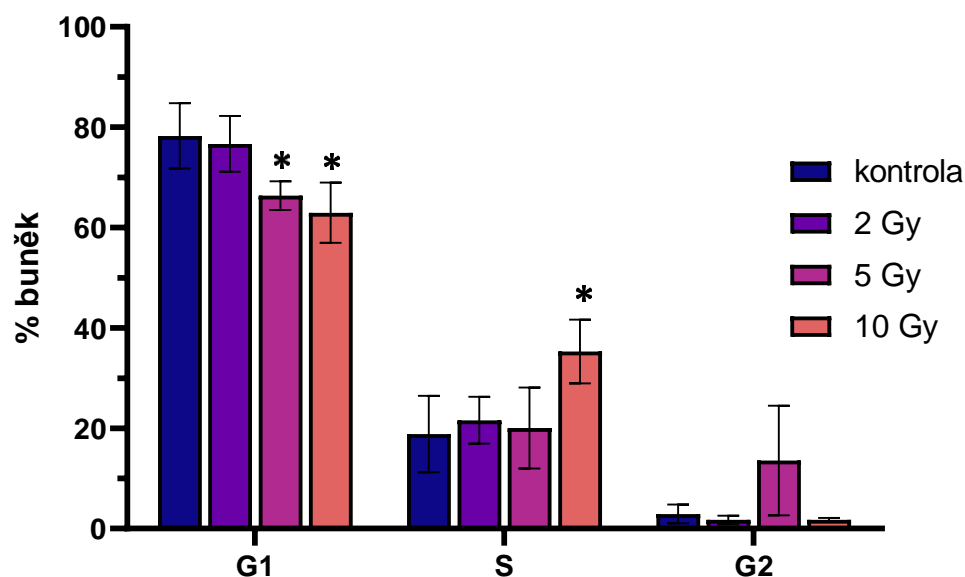


Graf č. 10: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 24hodinové inkubaci. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.



Graf č. 11: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 48hodinové inkubaci. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

IMR 90 - 72 hodin



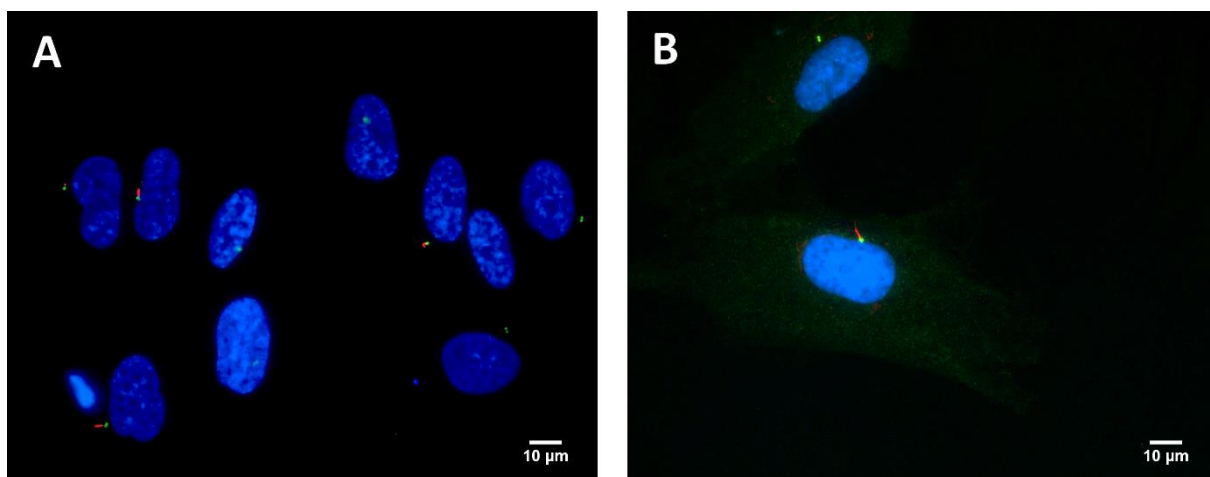
Graf č. 12: Analýza buněčného cyklu u IMR-90 po 72hodinové inkubaci. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p < 0,05.

6.2. Vyhodnocení změn buněčné linie NHLF po ozáření

Změny cytoskeletu buňky, které způsobilo ionizující záření, byly sledovány za pomoci transformace primární řasinky, která je známá jako senzorická organela vyskytující se v buňkách jen v určitých fázích buněčného cyklu. Primární řasinka se vyskytuje pouze v G1, G₀ a S fázi. Jednotlivé analýzy byly vykonány na buněčných liniích plicních fibroblastů NHLF in vitro. Tato buněčná linie byla inkubována 24 hodin a poté ozářena dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy a byla porovnávána s neozářenou kontrolou. Změny primární řasinky byly sledovány 24 hodin po ozáření.

6.2.1. Analýza cytoskeletálních změn

Změny cytoskeletu buňky po ovlivnění ionizujícím zářením o různých dávkách byly sledovány zejména pomocí změn primární řasinky. Sledována byla hlavně její délka a výskyt. Následně byl proveden WST-1 test, který sleduje proliferaci a viabilitu buněk po ozáření jednotlivými dávkami.



Obrázek 11: Reprezentativní fotografie buněčné linie NHLF s primární řasinkou detekovanou pomocí imunofluorescenčního barvení. Červeně se obarvila axonema primární řasinky, která je tvořena alfa tubulinem a zeleně se barví bazální tělísko tvořené gamma tubulinem. Jádra buněk byla nabarvena modře pomocí DAPI. (A) Buněčná linie NHLF kontrolní vzorek po inkubaci 24 hodin. (B) NHLF ovlivněné 5 Gy po 24hodinové inkubaci.

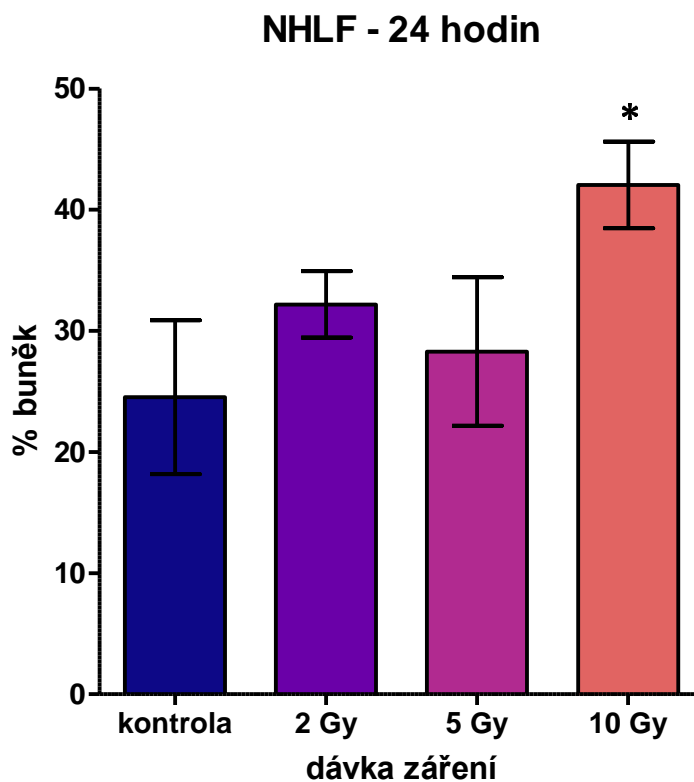
Všechny analýzy byly provedeny u buněčné linie NHLF *in vitro*. Buněčná linie byla inkubována 24 hodin a následně ozářena dávkami 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Na obrázku číslo 11 jsou reprezentativní fotografie imunochemicky obarvené buněčné linie NHLF.

6.2.1.1. Změna četnosti primární řasinky

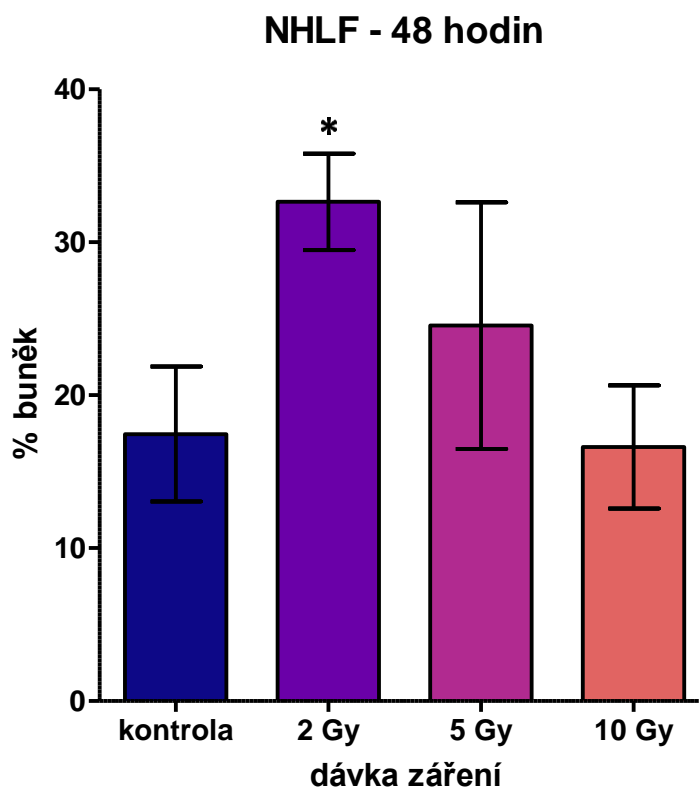
Na jednotlivých preparátech, které byly imunofluorescenčně obarveny byla primární řasinka odečítána opakovaně při třech experimentech na sobě nezávislých. Jednotlivé absorbované dávky ionizujícího záření, kterými byly buňky ovlivněny, měly velikost 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Tyto pokusy byly porovnávány nejen mezi sebou, ale také s neovlivněnou kontrolou, která měla jinak stejné podmínky pro růst jako ovlivněné buňky.

Na grafu číslo 13 se nachází přehled jednotlivých zastoupení buněk s primární řasinkou po jednotlivých dávkách záření. Největší hodnoty byly naměřeny po ozáření 10 Gy.

Primární řasinky se průměrně vyskytovaly u 42,04 % buněk NHLF. Druhá nejvyšší hodnota byla nalezena u velikosti ozáření 2 Gy, kde se průměrný výskyt řasinky vyšplhal na 32,19 %. U absorbované dávky 5 Gy se řasinka vyskytovala u 28,29 % případů, oproti kontrole, kde byla detekována jen u 24,53 % buněk.

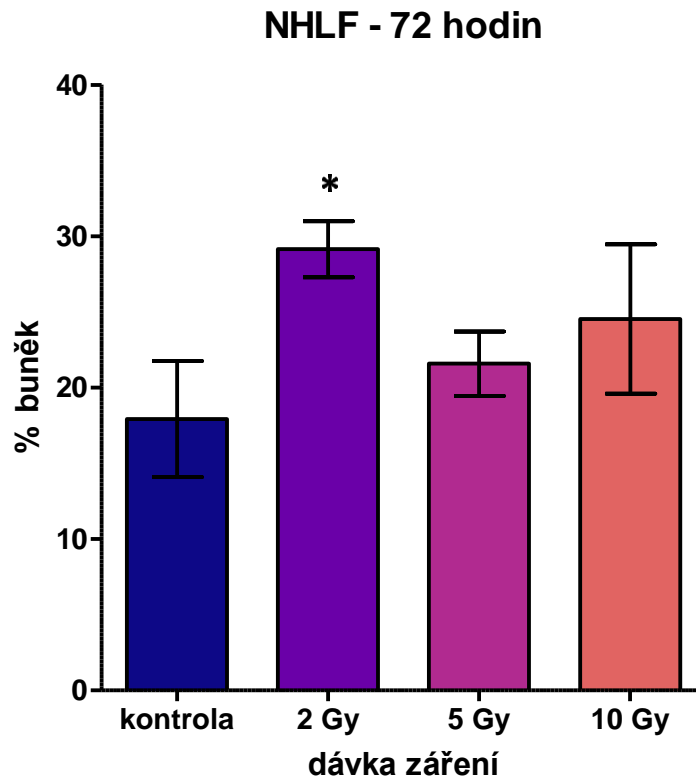


Graf č. 13: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 24 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. * $p \leq 0,05$.



Graf č. 14: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 48 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

V případě prodloužení inkubace na 48 hodin buněčné linie NHLF se výsledky změnily, což může být pozorováno na grafu číslo 14. Nejvyšších hodnot dosáhly buňky ozářené 2 Gy. U těchto buněk se řasinka vyskytovala ve 32,65 % případů. U buněk ovlivněných 5 Gy byla řasinka objevena u 24,56 % buněk, což je druhá nejvyšší naměřená hodnota pro tuto délku inkubace. Hodnoty výskytu u kontrolních buněk a dávky 10 Gy se zásadně nelišily. U kontrolních buněk byly řasinky prokázány v 17,46 % a u ovlivnění o velikosti 10 Gy byla naměřená hodnota 16,61 %.

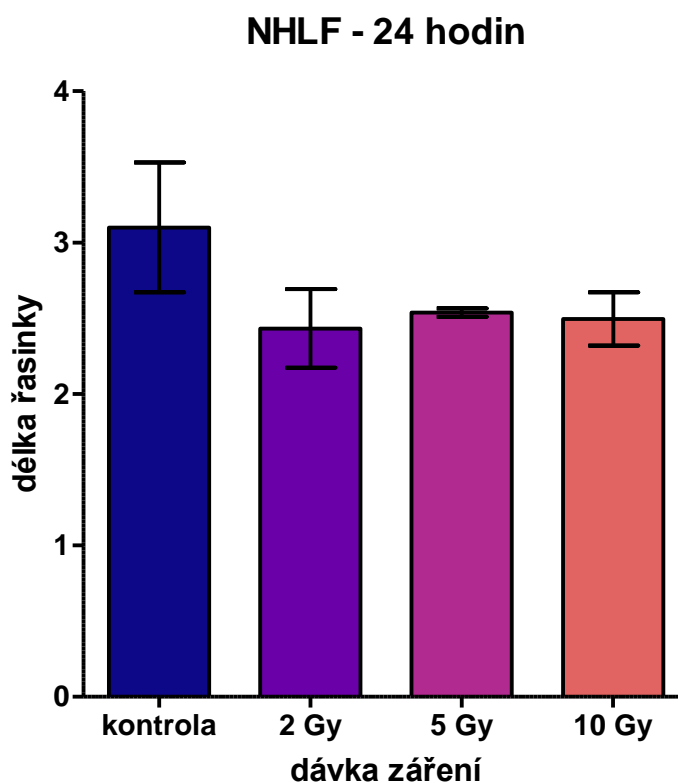


Graf č. 15: Buňky NHLF s výskytem primární řasinky 72 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3). Statisticky významný rozdíl byl stanoven pomocí GraphPad InStat v3. *p ≤ 0,05.

Poslední z této série pokusů byly experimenty s délkou inkubace 72 hodin, které jsou uvedené v grafu číslo 15. V tomto případě se nejvyšší naměřené hodnoty týkaly ozáření dávkou 2 Gy, u kterých se řasinka vyskytovala u 29,14 % buněk. Druhá nejvyšší hodnota výskytu primární řasinky se vyskytovala u 10 Gy a činila 24,53 %. U buněk, které byly ovlivněny 5 Gy byla řasinka naměřena u 21,58 % buněk. Nejmenší procentuální výskyt primární řasinky byl zjištěn u kontrolní neozářené skupiny, kde se řasinky vyskytovaly u 17,92 % buněk.

6.2.1.2. Změny velikosti primární řasinky

Při zjišťování velikosti primárních řasinek byly nejprve jednotlivé délky řasinek v rámci jednoho experimentu s určitou absorbovanou dávkou (2 Gy, 5 Gy a 10 Gy) a délkou inkubace (24 hodin, 48 hodin a 72 hodin) zprůměrovány a porovnávány s neovlivněnou kontrolou, která byla inkubována ve stejných podmínkách a pěstována shodně. Všechny experimenty byly provedeny *in vitro* a nezávisle na sobě. Délka primární řasinky byla měřena za pomoci programu ImageJ.

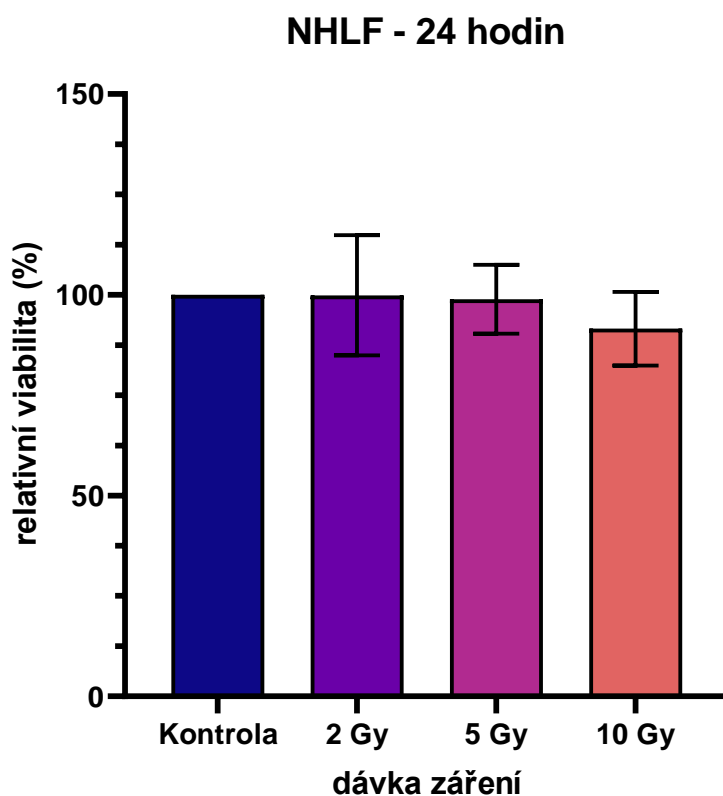


Graf č. 16: Délka primárních řasinek NHLF po 24hodinové inkubaci. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

Na grafu číslo 16 je znázorněné, jak se měnila průměrná délka primární řasinky u buněčné linie NHLF po 24hodinové inkubaci. Nejdelší řasinky byly detekovány na povrchu kontrolních neozářených buněk. Zde se jejich průměrná délka vyšplhala na 3,1 μm. U buněk ozářených 5 Gy byla průměrná délka nalezených řasinek 2,54 μm. Buněčná linie NHLF ozářená dávkou 10 Gy měla primární řasinky průměrnou délku 2,5 μm a buňky ovlivněné dávkou 2 Gy exprimovala řasinky o průměrné délce 2,43 μm.

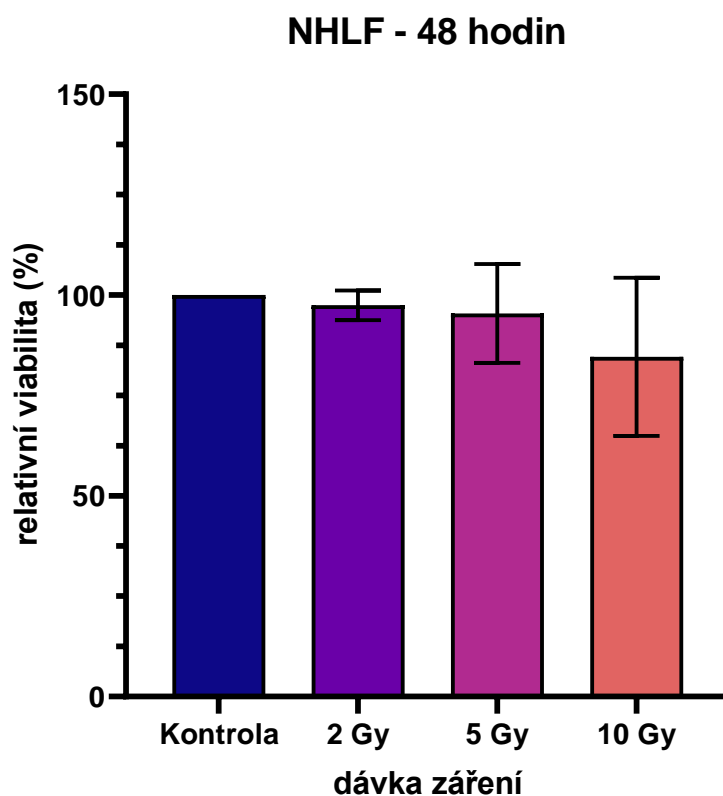
6.2.2. Dávková závislost účinku ionizujícího záření na proliferaci a smrt buněk

Detekce buněčné viability a buněčné proliferace byla provedena za pomoci analýzy WST-1 testu, který má schopnost ukázat míru životnosti buněk a jejich schopnost proliferovat ve srovnání s neozářenou kontrolou.



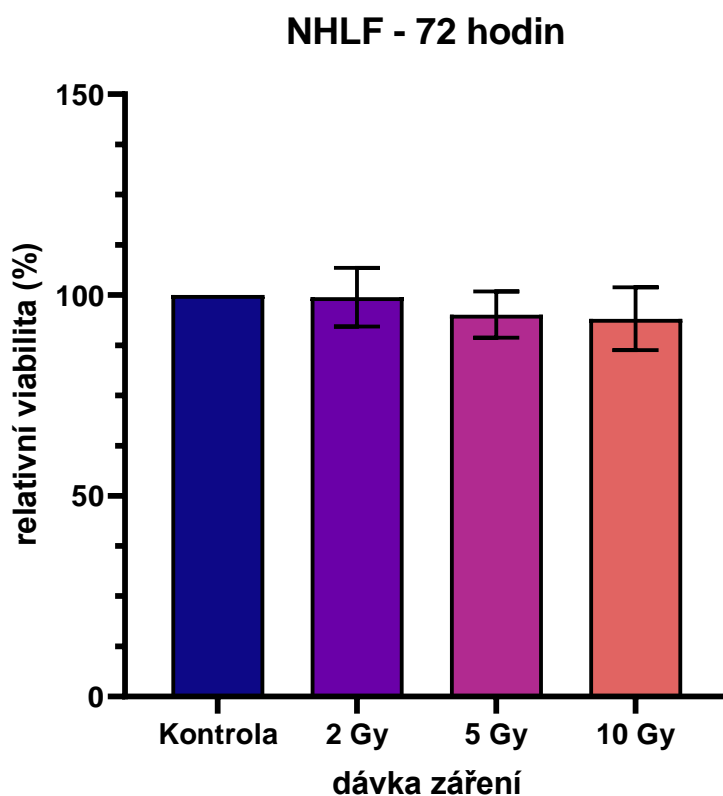
Graf č. 17: Viabilita a proliferace NHLF 24 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

U NHLF při ozáření 2 Gy po uplynutí inkubace dlouhé 24 hodin proliferace a viabilita měřených fibroblastů klesla na 99,89 % oproti kontrole inkubované za normálních podmínek bez ozáření. V dalším experimentu stejná linie při ozáření 5 Gy vykazuje míru proliferace a viability 98,9 % po inkubaci 24 hodin oproti neovlivněné kontrole fibroblastů. U buněk, které absorbovaly dávku 10 Gy a následně byly inkubovány 72 hodin, se proliferace a viabilita snížila na 91,58 % oproti zdravé kontrole (graf č. 17).



Graf č. 18: Viabilita a proliferace NHLF 48 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

U experimentu s buňkami NHLF inkubovanými 48 hodin se při jejich expozici záření o velikosti 2 Gy projevilo snížení proliferace a viability buněk na 97,45 % oproti buňkám neozářeným. Dále bylo změřeno snížení množství proliferujících a viabilních buněk na 95,39 % při vystavení linie dávce 5 Gy a následné inkubaci 48 hodin. Pouze 84,57 % buněk bylo vyhodnoceno jako buňky proliferující a viabilní při experimentu na buněčné linii NHLF, která byla ovlivněna dávkou 10 Gy a analyzována 48 hodin po ozáření (graf č. 18).



Graf č. 19: Viabilita a proliferace NHLF 72 hodin po ozáření. Výsledky pro dané hodnoty jsou vyjádřeny aritmetickým průměrem tří na sobě nezávislých experimentů, střední chyba průměru (SEM; n=3).

Buněčná linie NHLF při ozáření dávkou 2 Gy jevila proliferaci a viabilitu 99,54 % v porovnání s neozářenou kontrolou po inkubaci 72 hodin. V případě ozáření buněk 5 Gy a stejně dlouhé době inkubace vyšla hodnota proliferujících a viabilních buněk 95,11 % oproti kontrolním buňkám. Při ozáření buněčné linie nejvyšší hodnotou dávky provedených pokusů, a to 10 Gy, se viabilita a proliferace snížila na 94,09 % oproti buňkám, které byly kontrolní. V tomto předchozím experimentu byla použita buněčná linie NHLF a inkubace trvala 72 hodin od ozáření (graf č. 19). Rozdíly u experimentů viability a proliferace u buněčné linie NHLF nebyly statisticky významné.

7. DISKUZE

Buňka je jedinečná struktura, která disponuje velmi efektivními a specifickými způsoby, jak interaguje se svým okolím. Komunikace s extracelulárním prostředím je nezbytná pro její správné fungování a fyziologický stav. Primární řasinku je možné chápat jako fyzikálně-chemický senzor, který má biologickou funkci vnímat a zhodnocovat signály extracelulárního prostředí, aby byla v buňce zajištěna homeostáza. Dále se primární řasinka, někdy též nazývaná buněčná anténa, účastní embryogeneze, organogeneze, tumorigeneze a napomáhá funkci sensorických neuronů, ledvin a dalších. Jedná se o jedinečnou cytoskeletární, mikrotubulární strukturu, což je důvod dalšího výzkumu.

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit změny v cytoskeletu buňky reprezentovaných primární řasinkou po ovlivnění ionizujícím zářením. V experimentech byly použity dvě buněčné linie IMR-90 a NHLF. IMR-90, linie lidských plicních fibroblastů izolovaných z buněčné tkáně plodu v 16. týdnu těhotenství. A NHLF, linie lidských plicních fibroblastů izolovaných z tkáně zdravých dospělých pacientů. Tyto buněčné linie byly zvoleny pro předpoklad cytoskeletálních změn v podobě primární řasinky po expozici ionizujícímu záření. Lidské fibroblasty jsou navíc velmi univerzální, je u nich přítomna primární řasinka a jejich reakce na ozařování bývají podobné jako u jiných buněčných linií. (Filipová, 2015; Kim, 2011; Goetz, 2010; Dvořák, 2015)

Experimenty věnující se radiobiologii hodnotí radiosenzitivitu a radiorezistenci buněk. Ta se s rozdílným typem buněk zásadně liší. Nezáleží tady jen na druhu buněk, a zda je buněčná linie normální nebo nádorová, ale také na konkrétní linii a jejím stáří. Například některé linie krvetvorných buněk jsou znatelně radiosenzitivní, zatímco nádorové linie jsou senzitivní méně. Pro určení radiosenzitivity v *in vitro* podmínkách se využívá několik jednoduchých testů. Jedním z nich je WST-1 test, kdy buněčná suspenze, konkrétně mitochondriální dehydrogenáza, reaguje s tetrazoliovou solí za vzniku formazanového barviva, které je snadné spektrofotometricky detekovat. Změna naměřené absorbance je přímo úměrná změně množství metabolicky aktivních buněk ve vzorku. Dále můžeme zmínit jednoduchý cytochemický test hladiny laktátdehydrogenázy (LDH), která se z cytoplazmy buněk do extracelulárního prostředí uvolňuje v případě buněčného poškození. (Goetz, 2010; Filipová, 2017; Shimada, 2017; Johnson, 2016; Ngamwongsatit, 2008)

Podle (Bluwstein, 2013) jsou plicní fibroblasty schopné odolávat vysokým dávkám ionizujícího záření a také jsou schopné zabránit apoptóze, která může být ozářením indukována. V provedených *in vitro* experimentech na buněčné kultuře IMR-90 bylo zjištěno, že záření

významně neovlivňuje viabilitu a proliferaci buněk. Při provedení testu WST-1 byly rozdíly počtu proliferujících a viabilních buněk s rozdílnou absorbovanou dávkou ionizujícího záření velmi nízké. Buněčná linie IMR-90 je tedy vyhodnocena jako radiorezistentní dle provedených WST-1 testů viability a proliferace a také měření buněčného cyklu, které se této linii věnovaly. U buněčné linie NHLF jsou výsledky srovnání proliferace a viability mezi ozářenými a neozářenými buňkami velmi podobné. Rozdíly mezi relativními počty viabilních a proliferujících buněk poklesly ze 100 % na 91,58 % u inkubace 24 hodin, na 84,57 % u inkubace 48 hodin a na 94,09 % u inkubace dlouhé 72 hodin. Buněčná linie NHLF je proto také hodnocena jako radiorezistentní. U buněčné linie NHLF však procento viabilních a proliferujících buněk klesalo se zvyšující se dávkou rychleji. Například u NHLF, velikosti dávky 10 Gy a délky inkubace 48 hodin viabilita klesla na 84,57 % na rozdíl od IMR-90, kde při stejných podmínkách viabilita činila 91,1 %.

Nepatrné změny viability a proliferace buněk, které byly vyvolané zářením, mohou být vysvětleny velmi komplexním reagováním buněk na jednotlivé dávky. Ionizující záření indukuje poškození DNA dvoušroubovice a dalších struktur, prostřednictvím kyslíkových nebo OH radikálů vytvořených ozářením. Nejčastějším poškozením DNA jsou jednovláčkové nebo dvouvláčkové zlomy, které je potřeba opravit. Nezvádne-li buňka opravit DNA dostatečně rychle a správně, dojde k programované buněčné smrti neboli apoptóze. Tento stav je aktivně řízen vnější nebo vnitřní cestou a samotná buňka se po aktivaci proteáz a endonukleáz rozpadne na apoptická tělíčka, která jsou následně fagocytována. (Souparno, 2016; Filipová, 2017) Začne-li buňka poškozenou DNA opravovat za pomoci DNA damage response, které mají možnost transkripční a post-transkripční aktivace širokého spektra genů, může dojít k pozastavení buněčného cyklu, než se DNA opraví. Jeli-opravena může se do buněčného cyklu opět vrátit a pokračovat v něm. (Maier, 2016; Davis, 2013) Podle (Zhao, 2015) byla při pokusech na fibroblastech IMR-90 ovlivněných nízkými dávkami zjištěna u této buněčné linie adaptivní odpověď, protože vystavení záření nemělo žádný vliv na náročné změny proteinu p53.

U epiteliálních buněk hTERT.RPEI byla zjištěna přímá souvislost mezi absorbovanou dávkou ionizujícího záření a výskytem primární řasinky. Při inkubaci 24 hodin byla v případě dávky 1 Gy zvýšena o 17,7 % a u 5 Gy o 19,7 %. Biologické účinky ozáření na jiné orgány buňky jsou zatím neznámé. Nicméně výsledky naznačují, že poškození DNA je spouštěčem ciliogeneze, přestože funkce řasinky indukované IZ je neznámá. (Shimada, 2017)

DNA damage response a faktory ciliogeneze fungují za složité souhry. Podskupina faktorů DDR a ciliogeneze má dvojí roli při udržení genomické integrity fyziologických procesů primární řasinky. Vypadá to, že tato dualita pramení z nutnosti buňky regulovat duplikaci centrozomů a integritu mitotického vřeténka, a současně některé proteiny DDR se lokalizují v centrozomu. (Johnson, 2016)

Experiment měření buněčného cyklu ukázal, že buňky IMR-90 se bez ozáření nejvíce vyskytovaly v S a poté v G2 fázi buněčného cyklu (S fáze 85,12 %, G2 fáze 13,03 %) po 24hodinové inkubaci. Naopak po ozáření dávkou 2 Gy a 5 Gy se buňky nacházely v G1 fázi (2 Gy 75 %, 5 Gy 66,71 %). V S fázi se nejvíce buněk vyskytovalo u ozáření dávkou 5 Gy, což bylo více než u ozáření dávkou 2 Gy. Pouze 1,23 % buněk vyskytovalo v G2 fázi buněčného cyklu. Tyto data korelují s počty primární řasinky, protože její největší výskyt se objevil u ozáření dávkou 5 Gy (19,8 %) a následně u ozáření 2 Gy (11,88 %). U ozáření 2 Gy je patrné zkrácení primární řasinky. Naopak u ozáření dávkou 10 Gy je nejnižší procento buněk v G1 a G2 fázi buněčného cyklu a nejvíce buněk se nachází v S fázi, což koreluje s výskytem primární řasinky. Její výskyt po ozáření 10 Gy se oproti 5 Gy snížil o více než 10,4 %. Expozice ionizujícímu záření obecně v buňkách stimuluje ciliogenezi (Shimada, 2017). V normálních buňkách je syntéza a tvorba primární řasinky regulována během postupu buněčného cyklu. Primární řasinka je přítomná v G₀, G1 fázi a S fázi, ale je resorbovaná před mitózou. Tato resorpce ovlivňuje náchylnost buněk k vlivu vnějších signálů na receptory spojené s primárními řasinkami (Plotnikova, 2009).

Dalším poznatkem je ciliární zkrácení během postupu z G2 fáze do M fáze, které může být způsobeno změnou dostupnosti buněk k růstovým faktorům, které používají receptory nacházející se na řasince (Plotnikova, 2009). Délka primární řasinky závisí na buněčném cyklu, jak bylo dokázáno v experimentech u buněčné linie NIH-3T3 a dalších (Kim, 2011; Miyoshi, 2011). Délka primární řasinky se může změnit například v případě renálního poranění, ovlivnění léčbou lithiem, po podání interleukinu 1 β , po podání nízké koncentrace taxolu, po 24hodinovém hladovění a dalších. (Miyoshi, 2011; Dvořák, 2015; Filipová, 2017). Délka primární řasinky je také ovlivněna dynamikou aktinových vláken a mikrotubulů prostřednictvím hladin rozpustného tubulinu v cytosolu dostupném pro prodloužení primárních řasinek. Rozpustný tubulin, hladina Ca²⁺ a cAMP hrají nejdůležitější roli v regulaci délky primární řasinky (Miyoshi, 2011). U buněčné linie IMR-90 odpovídá délka primární řasinky fázi buněčného cyklu buněk – po ozáření došlo k prodloužení primárních řasinek.

U buněčné linie NHLF při 24hodinové inkubaci se nejdelší primární řasinky nacházely u neozářené kontroly, na rozdíl od IMR-90, kde nejdelší primární řasinky byly detekovány u ozáření 5 Gy. U dalších hodnot průměrných délek u vzorků buněk ovlivněných 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy byly naměřeny velice podobné hodnoty. Průměrná délka primární řasinky mezi jednotlivými dávkami se při inkubaci 24 hodin po ozáření tedy výrazně nelišila. Souvislost mezi mírou ozáření a délkou primární řasinky nebyla pozorována. Délka primární řasinky závisí na buněčném cyklu, jak bylo dokázáno v experimentech u buněčné linie NIH-3T3 a dalších (Kim, 2011) (Miyoshi, 2011). Délka primární řasinky se může změnit například v případě renálního poranění, ovlivnění léčbou lithinem a dalších. Je také ovlivněna dynamikou aktinových vláken a mikrotubulů prostřednictvím hladin rozpustného tubulinu v cytosolu dostupném pro prodloužení primárních řasinek. Rozpustný tubulin, hladina Ca^{2+} a cAMP hrají nejdůležitější roli v regulaci řasinkové délky (Miyoshi, 2011) .

Ozáření dávkou 2 a 5 Gy se velmi významně zvýšilo procento buněk vyskytujících se v G1 fázi, což můžeme potvrdit experimentem výskytu primární řasinky, pro buňky IMR-90 se zvýšilo procento výskytu primární řasinky na povrchu jádra.

Stejně tak korelují i hodnoty u ozáření 10 Gy , kdy se snížilo procento buněk s primární řasinkou v poměru k ozáření 2 a 5 Gy . Viabilita a proliferace se zvyšující se dávkou ionizujícího záření mírně klesala u všech délek inkubace před měřením.

Oproti tomu u buněčné linie NHLF bylo největší procento primárních řasinek detekováno po 24hodinové inkubaci u ozáření dávkou 10 Gy, nikoliv 5 Gy jak tomu bylo u IMR 90. Dále hodnota buněk s primární řasinkou byla vyšší u ozáření 2 Gy než u ozáření 5 Gy, což bylo u IMR-90 opačně.

V případě inkubační doby 48 hodin jsou u buněčné linie IMR-90 výsledky o poznání jiné. V závislosti na dávkové řadě záření se hodnoty rozdělení v jednotlivých buněčných cyklech moc neměnily, pouze minimálně v případě nejvyšší absorbované dávky 10 Gy. Délka primární řasinky klesá společně se zvyšující se dávkou ionizujícího záření a koreluje se změnou v buněčném cyklu. Kontrolní vzorek se nachází v G1 fázi, což může být způsobeno dlouhou inkubací. Naopak buněčná linie NHLF má největší výskyt primární řasinky u ovlivnění 2 Gy, a sestupný trend počtu řasinek se zvyšující se dávkou ozáření. Podle (Rodemann, 1991) ionizující záření působící na fibroblasty indukuje jejich předčasnou diferenciaci na terminální postmitotické buňky. Délka řasinky u inkubační doby 48 hodin byla nejvyšší u dávky 2 Gy a se zvyšující se dávkou na 5 Gy

a 10 Gy postupně u buněčné linie IMR-90 klesala, což může být způsobeno zvyšujícím se návratem buněk do S fáze buněčného cyklu.

Kontrolní neozářená skupina se nachází v G1 fázi buněčného cyklu, Naopak buněčná linie NHLF má největší výskyt primární řasinky u ovlivnění 2 Gy, a sestupný trend počtu řasinek se zvyšující se dávkou ozáření. Podle (Rodemann, 1991) ionizující záření působící na fibroblasty indukuje jejich předčasnou diferenciaci na terminální postmitotické buňky.

Dle (Filipová, 2015) u myeloblastů C2C12 byly po ozáření pozorovány vícečetné primární řasinky. Po ozáření dávkami, které vyvolaly zastavení buněčného cyklu ve fázi G2 (20 Gy), byly exprimovány nejvíce. Naopak po ozáření dávkou nižší (6 Gy) byly pozorovány pouze jednotlivé primární řasinky na buňce. Stejně tak byly vícečetné řasinky detekovány po třídní inkubaci a dávce 10 a 20 Gy. V našich experimentech nebyly pozorovány vícečetné řasinky ani po ozáření dávkou 10 Gy.

Po uplynutí 72 hodin po ozáření se většina buněk vyskytovala v G1 fázi buněčného cyklu i v případě neozářené kontroly, se zvyšující se dávkou záření výskyt buněk v G1 fázi buněčného cyklu klesal. V G1 fázi by se řasinky měly prodloužit, což je patrné na jejich měření délky, což souhlasí s předpokladem, že jsou primární řasinky nejdelší ve fázích G₀ a G1, protože řasinky jsou v porovnání s kratší dobou inkubace zhruba 1,5x delší. V případě 5 Gy se také výrazně zvýšilo procento buněk ve fázi G2, což je v rozporu s výsledkem měření řasinky, u kterého se procento buněk s primární řasinkou vyšplhalo na 23,8 %, což je nejvíce pro tuto inkubační dobu. V S fázi se nejvíce buňky vyskytovaly po ozáření dávkou 10 Gy, kde činila 35 %, jinak nebyly rozdíly mezi počty řasinek u jednotlivých ozáření větší než 20 %. Dále můžeme pozorovat větší část buněk v G2 fázi po ozáření 5 Gy, což koreluje s počty buněk s primární řasinkou a jejich délkou.

Buněčná linie NHLF měla nejvíce buněk s primární řasinkou v případě ovlivnění 2 Gy, téměř o 10% více než IMR-90 při stejné dávce záření. Stejně tak kontrolní neozářená skupina NHLF obsahovala více buněk s vytvořenou primární řasinkou než neozářená skupina buněk IMR-90.

8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit cytoskeletární změny buňky pomocí buněčné organely primární řasinky po jejím ovlivnění ionizujícím zářením. Hodnocena byla zejména její délka a četnost výskytu po ovlivnění různě velkými dávkami ionizujícího záření. Dále byla provedena analýza buněčného cyklu, který s výskytem primární řasinky koresponduje. Použita byla metoda průtokové cytometrie a následná kvantifikace DNA v jádře buněk. V dalším experimentu byla také měřena proliferace a viabilita buněk po ovlivnění různě vysokými dávkami ionizujícího záření pomocí WST-1 testu.

Provedenými experimenty bylo zjištěno, že buněčné linie normálních lidských fibroblastů IMR-90 a NHLF jsou radiorezistentní. Důvodem je, že jejich viabilita a proliferace nebyla působením ionizujícího záření významně snížena. Primární řasinka buněčných linií IMR-90 a NHLF reagovala velmi komplexně na různé dávky ionizujícího záření. Byly použity dávky o velikosti 2 Gy, 5 Gy a 10 Gy. Bylo potvrzeno, že i u ozářených buněčných linií můžeme pozorovat vztah mezi výskytem primární řasinky a buněčným cyklem. Délky primárních řasinek korelují s fází buněčného cyklu, ve kterém se buňky nacházejí. Kratší primární řasinky nalezneme na začátku G1 fáze a v druhé polovině S fáze. Naopak delší řasinky jsou pozorovatelné u buněk, které se vyskytují v G₀ a druhé polovině G1 fáze. Mezi délkou primární řasinky a velikostí dávky, která na ovlivněné buňky působila, nebyla nalezena žádná významná souvislost.

Výsledkem této práce bylo zjištění vztahů, které se týkají reakcí dvou buněčných linií normálních lidských fibroblastů reprezentovaných primární řasinkou na ionizující záření. Souvislost mezi ozářením a primární řasinkou se mnoho výzkumných prací nevěnuje, z tohoto důvodu je práce jedinečná. Do budoucna by bylo záhodno prozkoumat vztah mezi délkou primárních řasinek a velikostí dávek záření, stejně tak zvýšit míru ozařování například na 20-40 Gy. Další možností budoucího výzkumu je zjišťování změn primární řasinky v souvislosti s délkou ozářením, nejen velikostí dávky ionizujícího záření. Vědecky přínosné by také mohlo být detailnější prozkoumání vztahu mezi buněčným cyklem a délkou primárních řasinek u ostatních buněčných linií.

Primární řasinka je biosenzor chemických a mechanických podnětů z okolního prostředí buňky a je proto velmi důležité poznat její možnosti a popsat reakce na nejrůznější podněty. Tato zjištění nám totiž mohou otevřít dveře k jejímu terapeutickému využití.

9. BIBLIOGRAFIE

BARNUM, Kevin a Matthew O'CONNELL, 2014. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Cell Cycle Control*. 2014. New York, NY: Springer New York, **2014**, 29-40. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2. ISBN 978-1-4939-0887-5.

BERNHARD, Eric J., Amit MAITY, Ruth J. MUSCHEL a W. Gillies MCKENNA, 1995. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. *Radiation and Environmental Biophysics*. vol. 34. **34**(2), 79-83. DOI: 10.1007/BF01275210. ISSN 0301-634X.

BIOVISION, , 2018. Ready-to-use Cell Proliferation Reagent: WST-1. *BioVision Incorporated: Life Science SOURCE* [online]. Milpitas, California: BioVision [cit. 2019-12-29].

BIŠOVÁ, Kateřina, 2018. *Jak se dělí buňky*. 1. Praha: Středisko společných činností AV ČR. ISBN 2464-6245.

BLUWSTEIN, A., N. KUMAR, K. LÉGER, J. TRAENKLE, J. van OOSTRUM, H. REHRAUER, M. BAUDIS a M. O. HOTTIGER, 2013. *PKC signaling prevents irradiation-induced apoptosis of primary human fibroblasts*. vol. 4. **4**(2), 498-498. DOI: 10.1038/cddis.2013.15. ISSN 2041-4889.

BOOTHMAN, David A., Mark MEYERS, Eric ODEGAARD a Meizhi WANG, 1996. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. vol. 358. **358**(2), 143-153. DOI: 10.1016/S0027-5107(96)00115-7. ISSN 00275107.

BURPEE, A. a P. NOBES, 2018. Applied Cytometry: Flow Cytometry. *Applied Cytometry: Pioneering Software Simplicity* [online]. Dinnington, Sheffield [cit. 2020-01-26].

DAVIS, Anthony J a David J CHEN, 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational cancer research*. 2. **2**(3), 130-143. DOI: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02. ISSN 2218-676X.

DVOŘÁK, Josef, 2015. *Primární řasinky*. 1. Praha: Mladá fronta. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3730-3.

DVOŘÁK, Josef, Veronika SITOROVÁ, Dimitar NIKOLOV, Jaroslav MOKRÝ, Igor RICHTER, Stanislav FILIP, Aleš RYŠKA a Jiří PETERA, 2011. Primární řasinky a jejich biologické funkce. *Onkologie*. 2011. **2011**(54), 234-238.

EL-AOUAR FILHO, Rachid, Aurélie NICOLAS, Thiago DE PAULA CASTRO et al., 2017. Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. vol. 7. **7**. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00208. ISSN 2235-2988.

FILIPOVÁ, Alžběta, 2017. *Primární řasinka a její význam v reakci buněk na expozici ionizujícímu záření a cytostatikům*. Hradec Králové. Dizertační práce. Univerzita Karlova.

FILIPOVÁ, Alžběta, Daniel DIAZ-GARCIA, Aleš BEZROUK, Dana ČÍŽKOVÁ, Radim HAVELEK, Jiřina VÁVROVÁ, Govindan DAYANITHI a Martina ŘEZACOVÁ, 2015. Ionizing radiation increases primary cilia incidence and induces multiciliation in C2C12 myoblasts. *Cell Biology International*. vol. 39. **39**(8), 943-953. DOI: 10.1002/cbin.10462. ISSN 10656995.

GARCIA-GONZALO, Francesc a Jeremy REITER, 2012. Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *The Journal of Cell Biology*. vol. 197. **197**(6), 697-709. DOI: 10.1083/jcb.201111146. ISSN 1540-8140.

GOETZ, Sarah a Kathryn ANDERSON, 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*. vol. 11. **11**(5), 331-344. DOI: 10.1038/nrg2774. ISSN 1471-0056.

CHAPMAN, Graeme, 2000. Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. vol. 243. **243**(1-2), 3-12. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00224-6. ISSN 00221759. 6

JAHAN-TIGH, Richard, Caitriona RYAN, Gerlinde OBERMOSER a Kathryn SCHWARZENBERGER, 2012. Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*. vol. 132. **132**(10), 1-6. DOI: 10.1038/jid.2012.282. ISSN 0022202X.

JOHNSON, Colin A. a Spencer J. COLLIS, 2016. Ciliogenesis and the DNA damage response: a stressful relationship. *Cilia*. vol. 5. **5**(1), 1-13. DOI: 10.1186/s13630-016-0040-6. ISSN 2046-2530.

KIM, Sehyun a Leonidas TSIOKAS, 2014. Cilia and cell cycle re-entry. *Cell Cycle*. vol. 10. **10**(16), 2683-2690. DOI: 10.4161/cc.10.16.17009. ISSN 1538-4101.

KIM, Sehyun, Norann A. ZAGHLOUL, Ekaterina BUBENSHCHIKOVA, Edwin C. OH, Susannah RANKIN, Nicholas KATSANIS, Tomoko OBARA a Leonidas TSIOKAS, 2011. Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nature Cell Biology*. vol. 13. **13**(4), 351-360. DOI: 10.1038/ncb2183. ISSN 1465-7392.

KING, K. a J. CIDLOWSKI, 1998. CELL CYCLE REGULATION AND APOPTOSIS. *Annual Review of Physiology*. vol. 60. **60**(1), 601-617. DOI: 10.1146/annurev.physiol.60.1.601. ISSN 0066-4278.

LI, Mengqian, Liting YOU, Jianxin XUE a You LU, 2018. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Frontiers in Pharmacology*. vol. 9. **9**. DOI: 10.3389/fphar.2018.00522. ISSN 1663-9812.

LIM, S. a P. KALDIS, 2013. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. vol. 140. **140**(15), 3079-3093. DOI: 10.1242/dev.091744. ISSN 0950-1991.

LI, Xuan a Wolf-Dietrich HEYER, 2008. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*. vol. 18. **18**(1), 99-113. DOI: 10.1038/cr.2008.1. ISSN 1001-0602.

LOUCKS, Catrina, 2016. *Dissecting the sensory roles of motility-associated ciliary genes in Caenorhabditis elegans*. Burnaby, Kanada. Dizertační práce. Simon Fraser University.

MAIER, Patrick, Linda HARTMANN, Frederik WENZ a Carsten HERSKIND, 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*. vol. 17. **17**(1), 1-32. DOI: 10.3390/ijms17010102. ISSN 1422-0067.

MAITY, Amit, W.Gillies MCKENNA a Ruth J. MUSCHEL, 1994. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiotherapy and Oncology*. vol. 31. **31**(1), 1-13. DOI: 10.1016/0167-8140(94)90408-1. ISSN 01678140.

MALUMBRES, Marcos a Mariano BARBACID, 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*. vol. 9. **9**(3), 153-166. DOI: 10.1038/nrc2602. ISSN 1474-175X.

MARINOV, Iuri, 2008. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-143-7.

MIYOSHI, Ko, Kyosuke KASAHARA, Miyazaki IKUKO a Masato ASANUMA, 2011. Factors That Influence Primary Cilium Length. *Acta Medica Okayama*. 65. **65**(5), 279-285.

NGAMWONGSATIT, Puriya, Padmapriya BANADA, Watanalai PANBANGRED a Arun BHUNIA, 2008. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*. vol. 73. **73**(3), 211-215. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.03.002. ISSN 01677012.

NOLAN, John, Danilo CONDELLO, Erika DUGGAN, Mark NAIVAR a David NOVO, 2013. Visible and near infrared fluorescence spectral flow cytometry. *Cytometry Part A*. 83A. **83**(3), 253-264. DOI: 10.1002/cyto.a.22241. ISSN 15524922.

NUNEZ, Rafael, 2001. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current issues in molecular biology*. 3. **3**(3), 67-70.

OPENSTAX CNX, 2015. *Biology* [online]. OpenStax [cit. 2020-05-24].

PAZOUR, Gregory a George WITMAN, 2003. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Current Opinion in Cell Biology*. vol. 15. **15**(1), 105-110. DOI: 10.1016/S0955-0674(02)00012-1. ISSN 09550674.

PEDERSEN, Lotte, Jacob SCHRØDER, Peter SATIR a Søren CHRISTENSEN, 2012. The ciliary cytoskeleton. *Comprehensive Physiology*. vol. 2. **2**(1), 779-803. DOI: 10.1002/cphy.c110043.

PLOTNIKOVA, Olga V., Elena N. PUGACHEVA a Erica A. GOLEMIS, 2009. Primary Cilia and the Cell Cycle. *Primary Cilia*. Elsevier, (94), 137-160. Methods in Cell Biology. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)94007-3. ISBN 9780123750242.

RODEMANN, H. P., H. P. PETERSON a K. H. WANGENHEIM, 1991. Terminal Differentiation of Human Fibroblasts Is Induced by Radiation. *Scanning Microsc.* 5. **5**(4), 1135-1143.

SENGUPTA, Piali, 2017. Cilia and sensory signaling: The journey from “animalcules” to human disease. *PLOS Biology*. vol. 15. **15**(4). DOI: 10.1371/journal.pbio.2002240. ISSN 1545-7885.

SHIMADA, Mikio, Hisayo TSUCHIYA a Yoshihisa MATSUMOTO, 2017. Effect of different dose rates of ionizing radiation on ciliogenesis in hTERT-RPE1 cells. *Energy Procedia*. vol. 131. **131**, 444-447. DOI: 10.1016/j.egypro.2017.09.425. ISSN 18766102.

SCHAFER, K., 2016. The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*. vol. 35. **35**(6), 461-478. DOI: 10.1177/030098589803500601. ISSN 0300-9858.

SOUPARNO, BHATTACHARYA a ASAITHAMBY AROUMOUGAME, 2016. Ionizing radiation and heart risks. *Seminars in cell & developmental biology*. 2016. Academic Press, **2016**(58), 14-25.

STAUFFER, Sarah, Aaron GARDNER, Dewi UNGU, Ainara LÓPEZ-CÓRDOBA a Matthias HEIM, 2018. Mitosis. *Labster Virtual Lab Experiments: Basic Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 11-26. DOI: 10.1007/978-3-662-57996-1_2. ISBN 978-3-662-57995-4.

ŠINKOROVÁ, Zuzana a Lenka ZÁRYBNICKÁ, 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda: Část I. *Vojenské Zdravotnické Listy*. 77. Hradec Králové, **77**(3), 98-103.

TEYSSIER, Franck, Jacques-Olivier BAY, Claude DIONET a Pierre VERRELLE, 1999. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. *Bulletin du cancer*. 86. **86**(4), 345-357.

ULLMANN, Vojtěch, b.r. Biologické účinky ionizujícího záření: Radiační ochrana. *Astro Nukl Fyzika: - jaderná fyzika - astrofyzika - kosmologie - filosofie* - [online]. Ostrava [cit. 2020-06-03]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/RadiacniOchrana.htm>

VARJOSALO, M. a J. TAIPALE, 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes&Development*. vol. 22. **22**(18), 2454-2472. DOI: 10.1101/gad.1693608. ISSN 0890-9369.

VÁVROVÁ, Jiřina, Martina ŘEZÁČOVÁ, Zuzana ŠINKOROVÁ a Aleš TICHÝ, 2018. DOSE-RATE AS A CRITICAL ASPECT OF CELLULAR RESPONSE TO GAMMA-RADIATION. *Military Medical Science Letters*. vol. 87. **87**(3), 119-125. DOI: 10.31482/mmsl.2018.016. ISSN 03727025.

WANG, Lei a Brian DYNLACHT, 2018. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. *Development*. vol. 145. **145**(18), 1-13. DOI: 10.1242/dev.151407. ISSN 0950-1991.

WHEWAY, Gabrielle, Liliya NAZLAMOVA a John HANCOCK, 2018. Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. vol. 6. **6**, 1-13. DOI: 10.3389/fcell.2018.00008. ISSN 2296-634X.

WILLIAMS, Gareth a Kai STOEBER, 2012. The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*. vol. 226. **226**(2), 352-364. DOI: 10.1002/path.3022. ISSN 00223417.

YANG, L., G. XIE, Q. FAN a J. XIE, 2010. Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. *Oncogene*. vol. 29. **29**(4), 469-481. DOI: 10.1038/onc.2009.392. ISSN 0950-9232.

ZHAO, Yinlong, Rui ZHONG, Liguang SUN, Jie JIA, Shumei MA, Xiaodong LIU a Jian Jian LI, 2015. Ionizing Radiation-Induced Adaptive Response in Fibroblasts under Both Monolayer and 3-Dimensional Conditions. *PLOS ONE*. vol. 10. **10**(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0121289. ISSN 1932-6203.

ZHOU, Bin-Bing a Stephen ELLEDGE, 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. vol. 408. **408**(6811), 433-439. DOI: 10.1038/35044005. ISSN 0028-0836.