

## Vliv dávky záření na změnu zastoupení znaku H2AX

Jana Skálová, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 3. ročník

Školitelé: Ing. Bc. Tomáš Vlas

**Východisko:** Bakalářská práce s názvem „Vliv dávky záření na změnu zastoupení znaku H2AX“ je zpracována metodou kvantitativního výzkumu a zabývá se stanovením specifického znaku, který poukazuje na poškození DNA způsobené ionizujícím zářením. Biologická dozimetrie hraje důležitou roli při odhadování dávek radiace na vystavené jedince po radiačních nehodách, kde nejsou dostupné fyzikální dozimetrie. DNA eukaryotických buněk je neustále vystavena působení řadě exogenních i endogenních látek. Ionizující záření, ale i jiné škodlivé vlivy, indukují širokou škálu lézí DNA, z nichž nejzávažnější jsou dvouřetězcové zlomy DNA (DSB). V reakci na zlomy je indukována exprese molekuly  $\gamma$ -H2AX, která je hlavním předmětem této práce. Celá problematika je stále aktuální, jelikož odhad dávek radiace na základě exprese znaku  $\gamma$ -H2AX stále není stoprocentní.

**Cíl:** Cílem práce bylo zhodnotit vliv dávky záření gama na lidské tělo na základě sledování exprese molekuly  $\gamma$ -H2AX v DNA. Dílčími cíli pak bylo nalézt vhodný postup pro stanovení této molekuly a vhodné interpretace výsledků.

**Metodika:** Sledovaný soubor zahrnoval 14 zdravých dárců plně heparizované krve. Z plné krve byla získána potřebná mononukleární frakce separací na hustotním gradientu. Oddělená mononukleární frakce každého dárce byla doplněna o mitogen L-PHA a kultivační médium RPMI 1640. Tato směs byla ponechána přes noc v termostatu při 37 °C ke kultivaci. Vzorek každého dárce byl rozdělen na 4 zkumavky – negativní kontrola + 3 úrovně ozáření (0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy). Ozáření proběhlo na cesiovém zářiči Gammacell® 1000 Elite. Ozářené vzorky byly opět ponechány 24 hodin v termostatu ke kultivaci. Další postup vycházel z metody pro stanovení  $\gamma$ -H2AX po stimulaci DNA chemickými látkami – extrakorporální fotoforézy. Po vyjmutí z termostatu byly buňky označeny monoklonálními protilátkami CD45 KO, CD3 PB a AF 488 anti-H2AX. Měření bylo provedeno na průtokovém cytometru. Surová data byla analyzována v programu Kaluza Analysis 2.1.

**Výsledky:** Díky povaze histonu  $\gamma$ -H2AX byla hledaná závislost mezi jeho procentuálním zastoupením (expresí)  $\gamma$ -H2AX a dávkou přijatého záření statisticky potvrzena. Významný statistický rozdíl se jevil jen mezi negativní kontrolou a 3 úrovněmi, ale mezi samotnými ozářenými vzorky už ne. Metodika práce, která vycházela z velké části z extrakorporální fotoforézy, se jeví jako velmi vhodná. Důležitou částí je konečná interpretace výsledků. Program Kaluza Analysis 2.1 a jeho možnosti vybrání jen potřebných dat je spolehlivý a jednoduchý způsob interpretace.

**Závěr:** Histon  $\gamma$ -H2AX je možné považovat za spolehlivý specifický marker DSB. V dalších studiích by se mohl výzkum soustředit na měření exprese  $\gamma$ -H2AX pouze v rozmezí dávek 0,5 Gy a menší. Nicméně k tomu je potřeba vhodnější zářič, který bude schopen aplikovat takto malé dávky, než byl k dispozici pro tuto práci. V budoucnu by mohla tato metoda najít uplatnění v praktických scénářích, a to například u zpětného určování přijaté dávky osob po radiačních nehodách. Má velký potenciál, nicméně bude třeba provést spoustu dalších stanovení a testů.