

7-8  
2020/159

VYDÁVÁ  
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ  
SPOLEČNOST  
J. E. PURKYNĚ



# ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

## Z OBSAHU:

Klíčové momenty v historii československé radiobiologie  
Navrátil L. et al.

Biologické účinky ionizujícího záření  
Havránková R.

Moderní trendy v radioterapii  
Šlampa P.

Reparace DNA v buňkách nádorů hlavy a krku  
a možnosti využití monitorování tohoto procesu pro  
odhad radiorezistence jednotlivých nádorů a výběr  
optimální primární léčby Horáková Z. et al.

Trendy ve farmakologické stimulaci regenerace  
ionizujícím zářením poškozeného savčího organismu  
Hofer M.

Stáří není nemoc: Vývoj hladiny ochranných protilátek  
proti koronaviru SARS-CoV-2 u seniorů z Domova  
Břevnice Fejt V. et al.

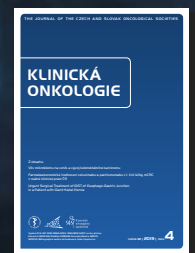
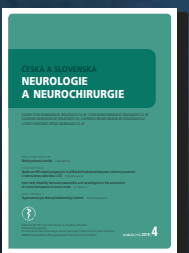
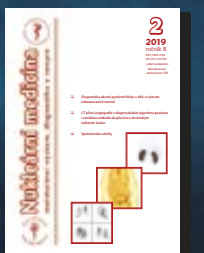
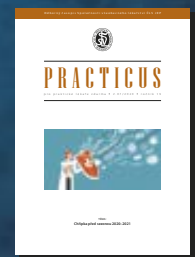
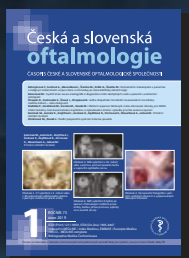
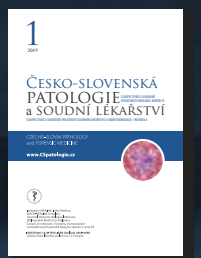
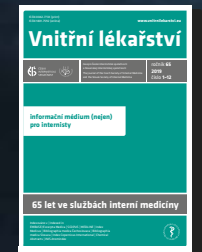
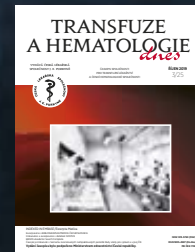
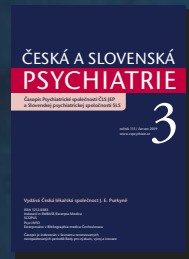
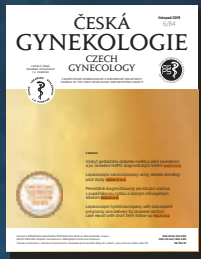
Principy a výhledy vakcinace proti viru SARS-CoV-2  
Smetanová J. et al.

Roční období, vitamin D a COVID-19  
Kopeček M., Höschl C.

# NABÍDKA ČASOPISŮ ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ



NAKLADATELSKÉ A TISKOVÉ ODDĚLENÍ ČLS JEP  
SOKOLSKÁ 31, 120 26 PRAHA 2  
tel./fax: 296 181 805, e-mail: nto@cls.cz  
[www.cls.cz](http://www.cls.cz)



## OBSAH

### EDITORIAL

Falk M. Radiobiologie excelující i stále tajemná . . . . . 251

### Původní práce

Fejt V. et al. Stáří není nemoc: Vývoj hladiny ochranných protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 u seniorů z Domova Břevnice . . . . . 303

### Přehledové články

Havránková R. Biologické účinky ionizujícího záření . . . . . 258

Šlampa P. Moderní trendy v radioterapii . . . . . 261

Horáková Z. et al. Reparační DNA v buňkách nádorů hlavy a krku a možnosti využití monitorování tohoto procesu pro odhad radiorezistence jednotlivých nádorů a výběr optimální primární léčby . . . . . 268

Hofer M. Trendy ve farmakologické stimulaci regenerace ionizujícím zářením poškozeného savčího organismu . . . . . 275

Kultová G. et al. Biologická dozimetrie a moderní (-omic) metody . . . . . 281

Falk M., Hausmann M. Pokroky ve výzkumu poškození a reparační DNA v buňkách vystavených různým druhům ionizujícího záření v éře superrozlišovací optické mikroskopie . . . . . 286

Smetanová J. et al. Principy a výhledy vakcinace proti viru SARS-CoV-2 . . . . . 298

Kopeček M., Höschl C. Roční období, vitamin D a COVID-19 . . . . . 312

### Dějiny lékařství

Navrátil L. et al. Klíčové momenty v historii československé radiobiologie . . . . . 252

## CONTENTS

### EDITORIAL

Falk M. Radiobiology shining, but still mysterious . . . . . 251

### Original articles

Fejt V. et al. Age is not a disease: Evolution of protective antibodies against SARS-CoV-2 in seniors from the Břevnice nursing home . . . . . 303

### Review articles

Havránková R. Biological effects of ionizing radiation . . . . . 258

Šlampa P. Modern trends in radiotherapy . . . . . 261

Horáková Z. et al. DNA repair in head and neck tumor cells and possibilities of its monitoring to estimate individual tumor radioresistance and selection of optimal primary treatment . . . . . 268

Hofer M. Trends in pharmacological stimulation of regeneration of ionizing radiation-damaged mammalian organism . . . . . 275

Kultová G. et al. Biological dosimetry and modern (-omic) methods . . . . . 281

Falk M., Hausmann M. Advances in research of DNA damage and repair in cells exposed to various types of ionizing radiation in the era of super-resolution optical microscopy . . . . . 286

Smetanová J. et al. Principles and new perspectives in the vaccination against SARS-CoV-2 virus . . . . . 298

Kopeček M., Höschl C. Season of the year, vitamin D and COVID-19 . . . . . 312

### History of medicine

Navrátil L. et al. Crucial moments in Czechoslovak radiobiology history . . . . . 252

<http://www.cls.cz>

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, z. s., Praha 2020

## ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH

On-line verze časopisu na: [www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych](http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych)

Registrací získáte přístup k plné on-line verzi časopisu a do jeho archivu.

Kontakt pro dotazy: [info@prolekare.cz](mailto:info@prolekare.cz) nebo +420 602 244 819



### Vedoucí redaktor:

MUDr. Petr Sucharda, CSc.

3. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

### Redaktoři:

Mgr. Martin Čermák, Mgr. Kristýna Poullová, Eva Srbová

### Vydává: Česká lékařská společnost

Jana Evangelisty Purkyně, z. s.

Sokolská 31, 120 26 Praha 2

### Pro ČLS JEP připravuje MeDitorial, s. r. o.

Sokolská 31/490, 120 26 Praha 2

### Výroba a tisk: Ocean Design

### Inzerce: ČLS JEP, z. s.

Sokolská 31, 120 00 Praha 2

tel.: +420 224 266 223

e-mail: [nto@cls.cz](mailto:nto@cls.cz); [cзма@cls.cz](mailto:cзма@cls.cz)

### V ČR rozšiřuje: Nakladatelství Olympia, s. r. o.

Verichova 973, 252 64 Velké Přílepy

### V SR: Mediaprint-Kapa Pressegrasso, a.s.

Stará Vajnorská 9, P. O. BOX 183, 830 00 BRATISLAVA

Infolinka: 0800 188 826, [www.ipredplatne.sk](http://www.ipredplatne.sk)

e-mail: [info@ipredplatne.sk](mailto:info@ipredplatne.sk), [objednavky@ipredplatne.sk](mailto:objednavky@ipredplatne.sk)

### Vychází: 8x ročně

Předplatné: na rok pro ČR je 800,00 Kč,  
SR 43,20 €, jednotlivé číslo 100 Kč, SR 5,40 €.

### Informace o předplatném podává

a objednávky předplatitelů přijímá:

ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2,

tel.: 296 181 805, e-mail: [nto@cls.cz](mailto:nto@cls.cz)

Rukopis byl předán do výroby 29. 12. 2020.

Zaslané příspěvky se nevracejí.

Otištěné příspěvky autorů nejsou honorovány,  
autoři obdrží bezplatně jeden výtisk časopisu.

### Příspěvky do Časopisu lékařů českých

procházejí zdvojeným recenzním řízením.

Articles published in the Journal of Czech

Physicians are subject to double review.

Vydavatel získává otištěním příspěvku

vylučně nakladatelské právo k jeho užití.

Vydavatel a redakční rada upozorňují,

že za obsah a jazykové zpracování inzerátů

a reklam odpovídá výhradně inzerent.

Žádná část tohoto časopisu nesmí být

kopírována za účelem dalšího rozšiřování

v jakékoliv formě či jakýmkoliv způsobem,

ať již mechanickým nebo elektronickým,

včetně pořizování fotokopii, nahrávek,

informačních databází na mechanických

nosičích, bez písemného souhlasu vlastníka autorských

práv a vydavatelského oprávnění

### Zasílání rukopisů – viz pokyny pro autory:

[www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-pokyny](http://www.prolekare.cz/casopis-lekaru-ceskych-pokyny)

Vážené kolegyně, vážení kolegové,  
končí rok, který i v *Časopisu lékařů českých* můžeme právem nazvat „rokem kovidovým“. Na jedné straně úžasné vzepětí vědy ve snahách o poznání viru a přípravu vakcín – vždyť do tohoto čísla zařazený článek o principech a výhledech vakcinace se ještě na počátku prosince jmenoval „Dočkáme se v roce 2021 vakcíny?“... Na straně druhé jsme přinejmenším rozpačití, ale spíše naštvaní a znechucení nad podobou a podáním zákazů, příkazů a jejich změn, většinou bez jakéhokoliv zdůvodňování, natož v duchu medicíny založené na důkazech, na který jsme si už dávno přivykli jako na zcela nezbytný základ.

Proto jsem rád, že přinášíme poznatky řádně podložené, které zpochybňují téměř rok stále dokola opakovaná tvrzení o křehkosti starých spoluobčanů, o jejich mimořádném ohro-

žení, ubohé imunitě a z toho vyplývající nutnosti izolovat je způsobem hodným nápravných zařízení. Paušální příkaz opakovaně testovat i seniory, kteří COVID-19 prokazatelně prodělali, a nucená karanténa po opuštění zařízení, aniž by byly vyšetřeny protilátky dostatečně prokazující jejich imunitu, bohužel svědčí pro alibistické vítězství byrokracie nad lidským přístupem k těmto členům společnosti.

Ale nechtěl bych, aby koronavirus zastínil téma tohoto dvojčísla. Radiobiologie není příliš známou oblastí medicíny, a jsem proto vděčen dr. Martinu Falkovi a všem jeho kolegům za skvěle připravený oborový přehled.

2021: *Quod bonum, felix, faustum, fortunatumque sit!*

**Petr Sucharda**

## REDAKČNÍ RADA

prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc.  
předseda redakční rady  
3. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

doc. MUDr. Martin Anders, Ph.D.  
Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN  
Ke Karlovu 11, 128 01 Praha 2

prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA  
Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV  
Šrobárova 1150/50, 100 34 Praha 10

prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.  
Ústav biofyziky 1. LF UK  
Salmovská 1, 120 00 Praha 2

prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA  
Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní  
medicíny (KARIM) 2. LF UK a FNM a IPVZ  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

MUDr. Otto Herber  
Ordinace praktického lékaře pro dospělé  
Nerudova 686, 278 01 Kralupy nad Vltavou

doc. MUDr. Debora Karetová, CSc.  
2. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.  
1. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2

prof. MUDr. Pavel Pařko, DrSc.  
3. chirurgická klinika 1. LF UK a FNM  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr.h.c.  
Osteocentrum LF UK a FNHK  
Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové

prof. MUDr. Jan Škrha, DrSc.  
3. interní klinika 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.  
Neurologická klinika 1. LF UK a VFN  
Kateřinská 30, 128 08 Praha 2

MUDr. Alena Šteflová, Ph.D., MPH  
Ministerstvo zdravotnictví ČR  
Palackého nám. 4, 128 01 Praha 2

prof. MUDr. Jan Švihovec, DrSc.  
Farmakologický ústav 2. LF UK  
Plzeňská 221/130, 150 00 Praha 5

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.  
Ústav lékařské biochemie a laboratorní  
diagnostiky 1. LF UK a VFN  
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2



# Radiobiologie excelující i stále tajemná

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 251

S objevem radioaktivity a ionizujícího záření svět vstoupil do nové éry atomového věku, aby poté už nikdy nebyl stejný jako dříve. Od tohoto epochálního přelomu uplynulo již mnoho let a došlo k udělení řady Nobelových cen za objevy spjaté se zářením, které se mezitím dočkalo aplikací v nejrůznějších oblastech lidského činění, včetně medicíny.

Ačkoliv by se však mohlo zdát, že radiobiologie má zlatý věk již za sebou, v posledních letech zažívá svou renesanci. Znovu se před námi otvírají některé stěžejní otázky doprovázející radiobiologii od samého jejího počátku, jež ovšem dosud nebyly experimentálně uchopitelné. Jako bychom se tedy po pomyslné spirále vrátili do časů původního nadšení pro výzkum ionizujícího záření, přičemž se však nacházíme o jednu otáčku výše, respektive hlouběji uvnitř buněčného nanokosmu, disponující dříve nedostupnými technologiemi a experimentálními možnostmi. Současná situace nám poskytuje obrovskou šanci k zásadnímu prohloubení znalostí o působení ionizujícího záření různého typu na biologické systémy na molekulární úrovni a jejich následné převedení do klinické praxe a radiační ochrany.

Léčbu ionizujícím zářením dnes v určité fázi choroby podstupuje, často velmi úspěšně, přibližně polovina onkologických pacientů. Technologický rozvoj též vedl k výraznému zpřesnění zobrazovacích metod doprovázenému extrémním nárůstem počtu radiodiagnostických vyšetření, nezřídka však málo opodstatněných. Zejména v některých zubních ordinacích je „rentgen“ prováděn již téměř automaticky, s nadsázkou při každé návštěvě, a z USA hrozí svým rozšířením do světa jako nový „výdobytek“ medicíny preventivní celotělové CT.

Mimo lékařské aplikace se přitom v mnoha státech naopak značně stupňuje radiofobie, vedoucí např. až k iracionálnímu a téměř sebedestrukčním tlaku na uzavření všech jaderných elektráren ve státech EU (Německo budí tragickým příkladem). Zmíníme-li ještě aktuálnost „radiobiologie“ a potažmo radiační ochrany v kontextu plánování prvního pilotovaného letu na Mars a bohužel také stupňujícího se rizika zneužití radioaktivních materiálů, či dokonce atomových zbraní teroristy nebo teroristicky smýšlejícími státy, nikoho nepřekvapí, že málokterý fenomén vyvolává ve společnosti aktuálně tak protichůdné emoce jako právě ionizující záření. Šíření hlubšího a racionálního povědomí o biologických účincích ionizujícího záření je proto v dnešním světě velice důležité. Naplňovat tento úkol se snaží mj. Společnost pro radiobiologii a krizové plánování České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně (SRKP ČLS JEP, [www.srkp.cz](http://www.srkp.cz)), mezi jejíž členy patří i většina autorů, kteří přispěli do tohoto vydání *Časopisu lékařů českých*.

Připravili jsme celkem 7 článků, jež se v logické posloupnosti dotýkají vybraných horkých radiomedicínských a radiobiologických témat. Kromě představení české radiobiologie a jejích úspěchů v historickém kontextu je – vzhledem k zaměření časopisu – prostor věnován zejména novým poznatkům o biologických účincích ionizujícího záření, možnostem jejich terapeutického ovlivnění a radioterapii. S důrazem na přístrojové vybavení dostupné pro pacienty v Česku se seznámíme s nejnovějšími trendy

v radioterapeutických přístupech. Zásadního zdokonalení se dočkaly zejména metody zacílení dávky do oblasti nádoru a plánování radioterapie, jež nyní dovolují zohlednit i pohyb a změny cílové oblasti v průběhu ozařování. Nové naděje přináší také využití protonového záření a v několika centech ve světě rovněž iontových svazků. Díky těmto vymoženostem dnes dokážeme likvidovat nebo alespoň kontrolovat i nádory v kritických oblastech lidského těla, kde by obdobný zákrok v minulosti byl nepředstavitelný. Biologickým účinkům těchto typů ionizujícího záření však doposud zcela nerozumíme.

Problémy, se kterými se radioterapie i přes dosažené pokroky stále potýká, jsou ilustrovány na léčbě nádorů hlavy a krku. Zhruba polovina těchto nádorů totiž na radioterapii nereaguje, přičemž důvody tohoto chování nejsou známy. Vystává tak závažné dilema výběru primární léčebné modalit, poukazující na nutnost a zároveň obtížnost identifikace biomarkerů radiorezistence umožňujících personalizovanou onkologickou péči.

V závěru se potom z klinické praxe přeneseme do základního výzkumu, abychom se pokusili lépe porozumět vztahům mezi fyzikálními vlastnostmi různých typů ionizujícího záření, charakterem poškození DNA, výběrem reparačních mechanismů, efektivitou reparace DNA a přežíváním ozářených buněk. Toto poznání je důležitým předpokladem nejen rozvoje hadronové radioterapie, ale také třeba efektivní ochrany posádek plánovaných vesmírných misí. Využívající superrozlišovací mikroskopie přivádějí autoři čtenáře až na samotnou hranici rozlišitelnosti buněčných struktur a procesů v intaktních buňkách.

Předkládané články, přestože všechny přehledového charakteru, pokrývají pouze špičku špičky současného dění v radiobiologii. Zájemcům o získání širšího povědomí o „nových trendech“ v radiomedicině a radiobiologii proto nelze než doporučit k nahlédnutí obsáhlejší odbornou literaturu, např. nedávno vydanou knihu kolektivu zde prezentujících autorů (Klinická radiobiologie. *Grada*, 2020) nebo sborník příspěvků z posledního Mezinárodního kongresu radiačního výzkumu (ICRR 2019) proběhnuvšího v anglickém Manchesteru.

Zdá se až neuvěřitelné, jak daleko radioterapie dospěla od časů svého zrodu. Už jen vizuální porovnání původních ozařovačů a dnešních urychlovačů je nade vše významné. Přesto však řada nádorů zůstává k radioterapii rezistentní a stále nerozumíme ani řadě základních radiobiologických problémů. V potaz musíme bohužel brát rovněž „ekonomickou“ toxicitu moderních radioterapeutických technologií. Leckterého čtenáře tak po vypití námi namíchaného koktejlu patrně dosti rozbolí hlava, poté co se absorbované informace plně rozvinou v protichůdné pocity nadšení, naděje a zároveň jisté deprese.

Přesto všem přeji zajímavé čtení a autorům srdečně děkují za jejich ochotu přispět k popularizaci radiobiologie v naší zemi.

**RNDr. Martin Falk, Ph.D.**

vědecký sekretář Společnosti pro radiobiologii  
a krizové plánování ČLS JEP

# Klíčové momenty v historii československé radiobiologie

Leoš Navrátil<sup>1</sup>, Stanislav Brádka<sup>2</sup>, Václav Navrátil<sup>1</sup>

<sup>1</sup>katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva FBMI ČVUT v Praze

<sup>2</sup>Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany, Milín

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 252–257

## SOUHRN

Posuzujeme-li rozvoj jakéhokoliv oboru v historických souvislostech, nelze oddělit Českou a Slovenskou republiku. Společných 75 let (kromě období 1939–1945) charakterizuje úzká spolupráce českých a slovenských univerzit a vědeckých ústavů, a radiobiologie nepředstavovala výjimku – proto hovoříme o československé radiobiologii. Ta ve své historii prošla třemi významnými etapami, ovlivněnými i světovou politicko-vojenskou situací, a je nutné zdůraznit, že její výsledky byly a jsou srovnatelné se zahraničními pracovišti. První etapa mezi roky 1895–1939 přinesla poznání základních mechanismů a důsledků působení ionizujícího záření na organismus. Druhá etapa v letech 1939–1990 představovala období rozvoje mírového využití atomové energie, ale i jejího zneužití pro vojenské účely. Podrobně se studovala nemoc z ozáření, ochrana před radiačním poškozením a možnosti radioprotekce. Převážná většina výsledků zůstávala utajena a nebylo možné je publikovat. Třetí etapa po roce 1990 posunuje radiobiologii k podrobnému studiu poradiačních změn na intracelulární úrovni s cílem zefektivnění radioterapie a ochrany před zářením, a to rovněž v kontextu nebezpečí zneužití ionizujícího záření teroristy. Zvýšená pozornost se věnuje rovněž vlivu ionizujícího záření na rostliny a možnému následnému přínosu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

ionizující záření, nemoc z ozáření, radiační ochrana, radiobiologická centra

## SUMMARY

Navrátil L., Brádka S., Navrátil V.

### Crucial moments in Czechoslovak radiobiology history

If we consider the development of any specialization in our region in an historical context, we cannot separate the Czech and Slovak Republics. The 75 years together (with the exception of 1939–1945) were a period of narrow cooperation between Czech and Slovak Universities and Scientific Institutes, and Radiobiology is no exception, which is why the discussion falls to Czechoslovak Radiobiology, as opposed to Czech Radiobiology alone. Czechoslovak Radiobiology has gone through three important stages in its history, influenced also by international political-military situations. Here it is necessary to emphasize that the results obtained by Czechoslovak Radiobiology were and are comparable with foreign institutions.

The first period, which dates back to 1895–1939, represents the initial discovery period of the mechanism and consequences of ionizing radiation on the body. The second period in 1939–1990 is considered to be the phase of peaceful uses of nuclear energy, their misuse for military purposes, along with detailed studies of radiation sickness and radiation protection, the majority of the results which were kept secret and could not be published at the time. The third period after 1990 is dedicated to the detailed study of post-radiation changes at the intracellular level with the aim to be used especially in radiotherapy and radiation protection, as well as the dangers of misuse of ionizing radiation by terrorists. Increased attention is also devoted to the effect of ionizing radiation on plants and their possible subsequent use.

## KEYWORDS

ionizing radiation, radiation sickness, radioprotection, radiobiology centers

## ÚVOD

Historii radiobiologie můžeme datovat od okamžiku objevu paprsků X Wilhelmem Conradem Röntgenem 8. listopadu 1895. Po několika letech nadšení a hledání aplikací v diagnostice a v léčbě byly zjištěny i negativní účinky ionizujícího záření. Po roce 1918 se této problematice věnuje především akademik František Běhounek, který brzy získá další spolupracovníky. Na studium vlivu radiace na živý organismus se zaměřuje řada univerzitních a výzkumných pracovišť v Evropě a v USA. Mnoho tehdy získaných poznatků platí dodnes.

Druhá světová válka urychlila vývoj atomové bomby – její použití Američany snad válku zkrátilo, ale s následky této tragédie se setkáváme dosud.

Po roce 1945 jaderná energie nachází uplatnění v energetice a v dalších průmyslových oborech. Ionizující záření šířeji proniká do zdravotnictví, objevuje se nový diagnostický a terapeutický obor nukleární medicína. I v tomto období lze výsledky československých pracovišť směle srovnávat se za-

hraničními, jejich zveřejnění však brání bipolární rozdělení světa, a tím i obava jejich využití „protivníkem“.

Třetí etapu, po pádu „železné opony“, charakterizuje detailní studium působení ionizujícího záření na organismus, ale také rostoucí riziko možnosti zneužití radioaktivních materiálů teroristy a ohrožení civilního obyvatelstva tzv. špinavou bombou.

## OBDOBÍ LET 1895–1918

V noci z 8. na 9. listopadu 1895 pozoroval **Wilhelm Conrad Röntgen** (1845–1923) ve své univerzitní laboratoři na Bahnhofstraße 8 ve Würzburgu dosud neznámé paprsky X. Krátce nato, 5. března 1896, odhalil **Antoine Henri Becquerel** (1852–1908), profesor pařížské Polytechnické školy, existenci přirozeného ionizujícího záření. Tyto dva epochální objevy stály na začátku rozvoje řady vědních oborů, včetně medicínsky a biologicky zaměřených, radiobiologii nevyjímaje.

Opomenout nelze ještě dva další významné vědce. **Jeanu Albana Bergonié** (1857–1925) považovala odborná veřejnost za mimořádnou osobnost, brilantní a vizionářskou ve svých názorech. Již ve 26 letech byl jmenován profesorem lékařské fyziky a intenzivně se věnoval hlubšímu poznání rentgenového záření, ke kterému měl jako náčelník lékařských radiografických zařízení 18. divize francouzské armády blízko. Později svůj odborný zájem rozšířil na ochranu před ionizujícím zářením. V roce 1902 se v Bordeaux setkal s **Louisem Mathieu Frédéricem Adrienem Tribondeauem** (1872–1918), který sloužil jako námořní lékař. I on měl obdivuhodně široký odborný záběr – od biochemie přes bakteriologii po radiobiologii a dermatologii. Spolupráce těchto vědců vyústila v roce 1906 ke zjištění, že radiosenzitivita tkáně je přímo úměrná její reprodukční aktivitě a nepřímo úměrná stupni diferenciaci buněk. Nejvyšší citlivost k ionizujícímu záření proto vykazují rychle se dělící nebo málo diferencované buňky. Toto pravidlo označujeme jako **zákon Bergonié a Tribondeau**.

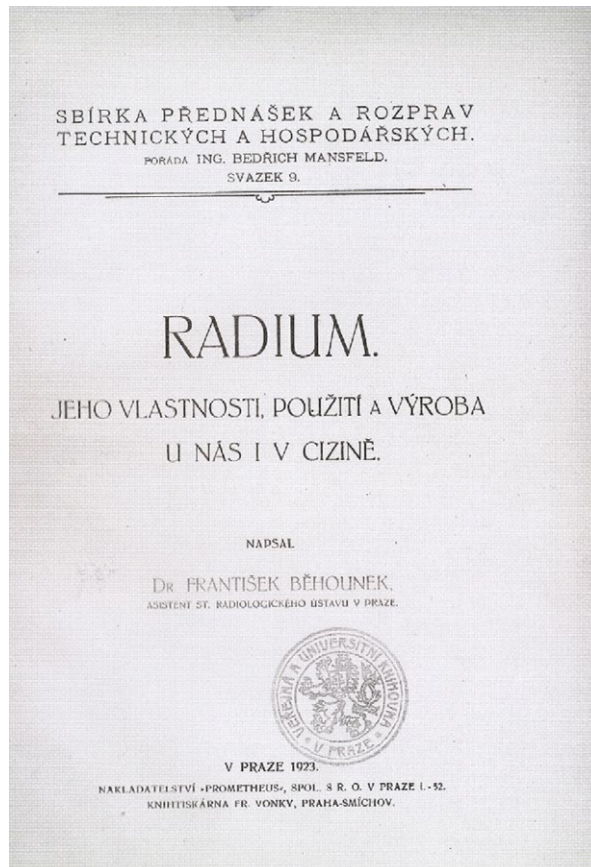
Objevy z konce 19. století rychle přecházely do medicínské praxe. Vědecký převrat a překotný aplikační rozpuk ovšem přinesly také řadu negativ. Přístrojová technika byla nedokonalá, dávkování nepřesné a radiobiologické znalosti chabé. Proto docházelo k častým vážným poškozením pacientů a personálu. O tomto období se dokonce mluví jako o „radiové módě“ – panovalo přesvědčení, že se našel univerzální lék na maligní nádory a že nízké dávky nejen neškodí, ale naopak stimulují (1).

V Čechách, ještě v časech rakousko-uherské monarchie, se jako první lékař možnostmi uplatnění rentgenového a následně i přirozeného záření v medicíně zabýval **prof. MUDr. Rudolf Tomáš Jedlička** (1869–1926). Již v roce 1897 pomocí rentgenových paprsků diagnostikoval na chirurgické klinice prof. Karla Maydla pražské Všeobecné nemocnice přítomnost cizího tělesa (hřebíku) v žaludku tesaře z Podřipska. V témž roce vybudoval první rentgenový kabinet v Praze v hotelu U černého koně, kde prováděl skiografická vyšetření. K nastavení správného stupně záření běžně používal vlastní ruku, aniž by tušil, tak jako ostatní lékaři, že její opakované vkládání do rentgenového záření vede k radionekróze. Přišel tak o tři prsty na levé ruce, zbyl mu jen palec a necelý ukazováček. I s tímto hendikepem ovšem nadále operoval. Prioritní postavení zaujímá rovněž v radioterapeutické aplikaci ionizujícího záření. Jako první v Rakousku-Uhersku aplikoval radiovou sůl, kterou zakoupil z vlastních finančních prostředků. V roce 1902 nejprve 20 mg radia, které mu však jeho asistentka neopatrností vyhodila, podruhé v roce 1912, kdy získal 42 mg, za cenu přibližně 50 tisíc rakousko-uherských korun (pro porovnání, kráva stála 400 až 500 korun a stejná byla měsíční mzda vysoce postaveného úředníka).

Objev terapeutických přínosů radonové vody se pak pojí se vznikem radioaktivních lázní v Jáchymově v roce 1906. Po skromných začátcích umožnily léčebné úspěchy otevření první lázeňské budovy Radium Kurhaus, kam se radonová voda sváděla z dolu několikakilometrovým potrubím.

První učebnice psanou v češtině dedikovanou problematice ionizujícího záření vydává v roce 1923 pod názvem „Radium: jeho vlastnosti, použití a výroba u nás i v cizině“ (obr. 1) po svém návratu z Paříže **prof. RNDr. František Běhounek** (1898–1973). V následujícím roce vychází jeho další učebnice, tentokrát věnovaná jak radiau, tak rentgenovým paprskům. Akademik Běhounek byl všestranný fyzik, který se vedle ionizujícího záření zabýval výzkumem atmosférické elektřiny. V roce 1926 založil a v letech 1933–1945 řídil Státní

radiologický ústav. Po roce 1945 působil ve vedoucích funkcích Československé akademie věd a Univerzity Karlovy. Od roku 1956 vedl katedru dozimetrie ionizujícího záření na Fakultě technické a jaderné fyziky Univerzity Karlovy (na založení fakulty se osobně podílel). Tato fakulta přešla v roce 1959 pod Českou vysokou učení technickou v Praze (ČVUT).



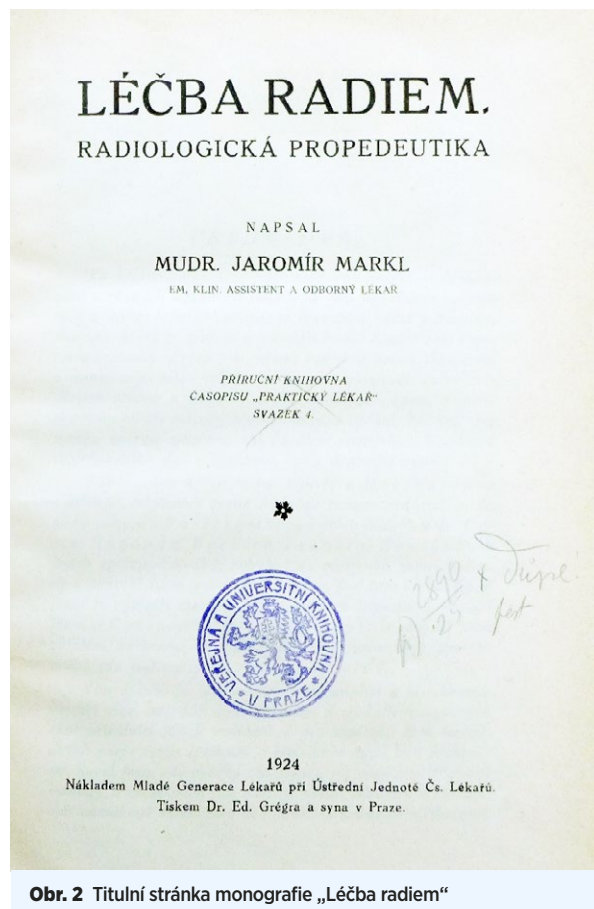
**Obr. 1** Titulní stránka monografie „Radium: jeho vlastnosti, použití a výroba u nás i v cizině“

Po 1. světové válce registrujeme v Československu výrazný rozvoj radioterapeutických oddělení. V roce 1922 se otevírá radiumterapeutické oddělení při nemocnici v Praze na Vinohradech a v roce 1927 radioterapeutický ústav v Pražském sanatoriu v Praze-Podolí tak, jak si přál v té době již zesnulý profesor Jedlička. O 4 roky později dochází k založení „radiového emanatoria“ na Lékařské fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě, v roce 1935 Masarykovy léčebny na Žlutém kopci v Brně a konečně v roce 1936 Radioléčebného ústavu Čs. spolku pro zkoumání a léčbu zhoubných nádorů v Praze na Bulovce (dnes Ústav radiační onkologie), který vedl **doc. MUDr. František Vladimír Novák** (1894–1940). Ten publikoval v roce 1937, společně s Františkem Běhounekem, učebnici „Lékařská radiobiologie“ (2), která rozšiřuje poznatky popisované v monografii Jaromíra Markla (viz dále). Je zajímavé, že autoři významně zpochybňují zákon Bergonié a Tribondeau a naopak pozitivně hodnotí Arndtův-Schulzův zákon, přestože ten byl určen pro homeopatika.

První v češtině sepsané radiobiologické pojednání reprezentuje útlá monografie **MUDr. Jaromíra Markla** (1894–1962) „Léčba radiumem“ (3), vytištěná v roce 1924 (obr. 2). Markl



byl primářem rentgenologického oddělení Státní nemocnice v Ostravě-Zábřehu, během války potom primářem centrálního rtg ústavu Závodní nemocnice Vítkovických železáren a v letech 1948–1951 lékařem revírní bratrské pokladny OKR. Uvedená monografie shrnuje radiobiologické poznatky té doby, zejména o biologických účincích radia. Pozorování se zaměřuje především na vliv ionizujícího záření na bakterie (stafylokoky, salmonely), viry (vzteklina) i na hadí jedy a možnosti jejich inaktivace. Značné pozornosti se dostává také účinkům na rostliny – na jejich látkovou výměnu, urychlené klíčení a rychlost růstu. Autor cituje převážně poznatky ze zahraniční literatury, připomíná ale i výsledky českého chemika, fyziologa a biologa **prof. RNDr. Julia Stoklasy** (1857–1936), prvního děkana Vysoké školy zemědělské a lesnického inženýrství.



**Obr. 2** Titulní stránka monografie „Léčba radiem“

Již v tomto období se podařilo nashromáždit dostatečné poznatky o vlivu ionizujícího záření na jádro buňky, o rozdílných účincích v závislosti na velikosti dávky a o latentní době předcházející manifestaci poradiačních symptomů. V rámci experimentálních prací se studovaly především změny u myši, potkanů a králíků po aplikaci radiových solí intravenózně či *per os*. Markl rovněž sumarizuje stávající znalosti změn jednotlivých orgánů po ozáření. Pozornost zasluhují například kapitoly o poradiačních změnách smyslových orgánů a metabolických změnách kyseliny močové a uhlohydrátů. Pro řadu orgánů se tehdejší závěry výrazněji nelišily od těch současných (například u kůže, gastrointestinálního traktu,

pohlavních orgánů a nervového systému). Zajímavá je úvaha o možnosti léčby maligní tkáně indukované ionizujícím zářením dalším následným ozářením, které by stimulovalo okolní, nádorem nepostíženou tkáň, a tím omezovalo růst nádoru a vedlo k uzdravě.

I když pojem frakcionace ještě nebyl v textu explicitně použit, autor frakcionované ozařování popisuje a doporučuje ozařovat nádor 8–14 dní. Tento názor však nepředstavoval obecný konsensus, například v Německu lékaři preferovali maximálně snesitelnou dávku rentgenového záření aplikovanou jednorázově. Radioterapie byla považována za účinnou také při léčbě dny, revmatismu, ischiasu, neuralgie, aterosklerózy, a dokonce i hypertenze renálního původu pro svůj sedativní efekt.

### OBDOBÍ LET 1945–1990

Za významného žáka akademika Běhounka je považován **prof. RNDr. Vilém Santholzer, DrSc.** (1903–1972). V roce 1928 nastoupil do Státního radiologického ústavu, kde pod vedením Františka Běhounka studoval příčiny „jáchymovské nemoci horníků“. Po 2. světové válce působil na Ministerstvu zdravotnictví ČSR, odkud v roce 1950 přechází na katedru lékařské fyziky Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V letech 1951–1958 v hodnosti plukovníka vedl tuto katedru na Vojenské lékařské akademii (VLA, od roku 1955 VLA JEP). V roce 1951 současně po dobu 7 měsíců zastával post děkana Vysoké školy chemické v Pardubicích (základ dnešní Univerzity Pardubice). Zabýval se především možnostmi aplikace atomové energie pro mírové účely a při dobývání vesmíru, zároveň však i nebezpečím jejího zneužití (4).

Další významnou osobnost, uznávanou již před rokem 1939, představoval **prof. MUDr. et RNDr. Ferdinand Herčík, DrSc.** (1905–1966), který se experimentálním radiobiologickým studiem věnoval již od roku 1932. Zkoumal zejména biologické účinky všech druhů krátkovlnného záření. Stal se průkopníkem československé biofyziky a zakladatelem československé radiobiologie. Po zavření českých vysokých škol v roce 1939 pracoval v Zemském radioléčebném ústavu (dnes Masarykův onkologický ústav), kde rozvíjel radioterapii a tajně pokračoval v experimentech. V letech 1949–1950 byl děkanem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Dne 1. února 1954 v Brně založil Biofyzikální laboratoř Československé akademie věd (ČSAV), která 1. ledna 1955 získala status Biofyzikálního ústavu ČSAV, jenž dodnes patří mezi významná vědecká pracoviště v oboru. Ve stejném roce byl jmenován členem korespondentem ČSAV a v období 1953–1959 byl prorektorem Masarykovy univerzity pro vědu a výzkum. V roce 1956 se stal členem, v letech 1960–1961 místopředsedou a v letech 1961–1962 předsedou Vědeckého výboru Organizace spojených národů pro účinky atomového záření v New Yorku. Významně se podílel na dosažení mezinárodní dohody o zákazu nadzemních pokusných jaderných výbuchů. Od roku 1963 byl členem výboru Mezinárodní asociace pro radiační výzkum a místopředsedou rady guvernérů v Mezinárodní agentuře pro atomovou energii (IAEA). Profesor Herčík předčasně zemřel na akutní infarkt myokardu, tedy nikoliv (jak chybně uvádějí některé literární zdroje) v důsledku nemoci z ozáření (1, 6).

Atomová energie našla uplatnění i v jiných odvětvích než v medicíně a ve vojenství. Příkladem budiž energetika nebo doprava. První jaderná elektrárna na světě, úspěšně spuštěná 27. června 1954, se nachází v Obninsku nedaleko



Moskvy (obr. 3). V tomto období atomová energie nachází uplatnění v pohonu ledoborců a ponorek.



Obr. 3 Atomová elektrárna v Obninsku

Rozšiřující se aplikační možnosti jaderné energie vedly po 2. světové válce k rozvoji řady dalších vědních oborů. Kromě mírového využívání jaderné energie představoval prioritou tehdejších velmocí vývoj jaderných zbraní. I když řada poznatků získaných tímto výzkumem našla dříve či později své uplatnění také v civilním sektoru, většina úsilí směřovala k plnění vojenských cílů. V době studené války proto stoupal význam studia možné ochrany před následky působení ionizujícího záření. Potřebné informace mohl poskytnout pouze intenzivní výzkum včetně radiobiologického. Poměrně značné vložené finanční prostředky pomohly výrazným způsobem posunout naše povědomí o mechanismu účinku ionizujícího záření na živý organismus. Československá republika nežůstala výjimkou a poznatky níže uvedených pracovišť byly na vysoké úrovni. Řada z nich tehdy měla označení tajné, a nesměly se tudíž publikovat. Po odtajnění po roce 1990 však sklídily uznání i z druhé strany v té době již neexistující „železné opony“.

Mezi klíčové úkoly radiobiologie mezi roky 1950–1990 patřilo studium:

- ochrany obyvatelstva a vojsk v případě použití jaderných zbraní nebo při haváriích civilních jaderných zdrojů;
- akutní a chronické nemoci z ozáření včetně možnosti její diagnostiky a terapie a specifík sdružených a kombinovaných forem poškození;
- vlivu jaderné energetiky na životní prostředí;
- diagnostických a terapeutických možností využití ionizujícího záření v medicíně;
- kosmického záření v rámci programu Interkosmos.

Stupňující se mezinárodní napětí na přelomu 40. a 50. let vyústilo v roce 1950 k založení radiobiologického oddělení při zdravotním odboru Vojenského technického ústavu v Praze. Náčelníkem byl jmenován **plk. MUDr. Josef Šveda** (1916–1982), který po založení VLA přešel v roce 1952 do Hradce Králové na oddělení radiologické ochrany, vytvořené při katedře radiologie VLA a Radiologické kliniky LF UK a FN Hradec Králové, vedené **plk. prof. MUDr. Janem Bašteckým, DrSc.** (1899–1979).

Na tomto oddělení začala pracovat první generace vojenských radiobiologů. Vedle Josefa Švedy, který zastával funkci jeho náčelníka od roku 1957 do roku 1963, sem patřili **plk. MUDr. František Morávek, CSc.** (1915–2006), **plk. doc. MUDr. Vojtěch Vondráček, CSc.** (1923–2008), **plk. MUDr. Antonín Šmíd, CSc.** (1928–2000) či pozdější přednosta Ústavu lékařské biofyziky 3. LF UK **plk. prof. MUDr. Vlastimil**

**Slouka, CSc.** (1927–2014). Dne 1. září 1963 došlo k ustavení samostatné katedry radiobiologie Vojenského lékařského výzkumného a doškolovacího ústavu Jana Evangelisty Purkyně (VLVDÚ JEP) v Hradci Králové. Prvním náčelníkem této katedry se v roce jejího ustavení stal **plk. prof. MUDr. Josef Mráz, CSc.** (1918–1975), který se v roce 1968 dočkal jmenování prvním profesorem vojenské radiobiologie Univerzity Karlovy (5).

Výzkumné úkoly v oblasti ochrany osob před účinky ionizujícího záření vyplývaly především z potřeb zdravotnické služby Československé lidové armády (ČSLA) a rozvíjející se jaderné energetiky. Celostátním řízením radiobiologického výzkumu pro potřeby ČSLA pověřila Státní plánovací komise od počátku 60. let až do roku 1975 Zdeňka Dienstbiera. Od 1. ledna 1976 se koordinačním pracovištěm stala katedra radiobiologie VLVDÚ JEP, respektive VLA JEP v Hradci Králové. V letech 1976–1985 řídil odbornou pracovní skupinu MNO/HT-ZS pro radiobiologii Milan Dostál, v období 1986–1990 Pavel Kuna, oba coby hlavní radiobiologové zdravotnické služby ČSLA. Od roku 1990 se této funkce ujímá Pavel Petýrek, a to až do ukončení práce této skupiny v roce 1991 (6).

V letech 1975–1985 vedl katedru radiobiologie **plk. prof. MUDr. Milan Dostál, CSc.** (1925–2009). Po jeho odchodu do důchodu převzal funkci náčelníka katedry v období 1986–1987 **plk. prof. MUDr. Pavel Kuna, DrSc.** (1940–2018). Ten byl v roce 1987 jmenován náčelníkem VLVDÚ JEP a v témž roce také náčelníkem – rektorem znovuobnovené VLA JEP (do roku 1990). Do funkce náčelníka katedry byl uveden v roce 1987 **plk. doc. MUDr. Pavel Petýrek, CSc.** (1936–2014), který ji řídil až do reorganizace VLA JEP v roce 1998, kdy se radiobiologické pracoviště s radioizotopovou laboratoří stalo součástí Ústavu radiobiologie a imunologie. V 80. letech kladla katedra zvláštní zřetel na studium efektu supraletálních dávek záření; za tímto účelem ozařovala laboratorní zvířata neutrony generovanými štěpením v tepelné koloně reaktoru VVR-S Ústavu jaderného výzkumu. Nelze opomenout ani experimenty s rychlými neutrony na izochronním cyklotronu U 120 M v Ústavu jaderné fyziky ČSAV v Řeži u Prahy. Radiobiologické zaměření se promítlo do výzkumu dalších kateder VLVDÚ JEP, respektive VLA JEP, tak i činnosti kateder a ústavů lékařské a farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové a Ústavu experimentální biofarmacie ČSAV. Zde je na místě připomenout **prof. RNDr. PhMr. Jaroslava Květinu, DrSc., dr.h.c., FCMA** (\*1930), kterého lze oprávněně považovat za zakladatele evropské radiobiologické farmakologie (7).

V září 1957 převzal vedení Fyzikálního ústavu Fakulty všeobecného lékařství Univerzity Karlovy (FVL UK, dnes 1. lékařská fakulta UK) **prof. MUDr. Zdeněk Dienstbier, DrSc., dr.h.c.** (1926–2012). Pracoviště bylo následně přejmenováno na Ústav lékařské fyziky a později na Katedru a ústav biofyziky a nukleární medicíny (KÚBNM). Zdeněk Dienstbier byl prvním docentem radiobiologie v Československu. V 1964 byl jmenován profesorem v oboru nukleární medicíny, třetím v této specializaci v celé Evropě. Protože dokázal projít badatelský radiobiologický výzkum s klinickou praxí (několik let působil jako odborný asistent na I. interní klinice FVL UK) a požadavky vojenské radiobiologie té doby, podařilo se mu v 60. letech 20. století vybudovat ústav s náročným a rozsáhlým vědeckovýzkumným programem, který svého času reprezentoval největší pracoviště v rámci Univerzity Karlovy. Tři funkční období byl členem výboru Evropské radiobiologické společnosti, v letech 1971–1972 dokonce jejím prezidentem. Řadu let zastával post předsedy výboru Společnosti nukleární medicíny a radiační hygieny ČLS JEP (8).

I po smrti profesora Ferdinanda Herčíka zůstal až do dnešních dnů významným radiobiologickým pracovištěm Biofyzikální ústav ČSAV v Brně (dnes AV ČR), ve kterém hrála a hraje radiobiologická sekce klíčovou úlohu. I zde působila a působí řada významných mezinárodně uznávaných radiobiologů. Nelze všechny vyjmenovat, připomeňme si tedy alespoň **prof. MUDr. Milana Pospíšila, DrSc.** (1929–2014), člena předsednictva pracovní skupiny pro kosmickou biologii a lékařství při Československé komisi pro spolupráci ve výzkumu a využití kosmického prostoru „Interkosmos“, **doc. MUDr. Miloslava Skalku, DrSc.** (1929–2001) či **MUDr. Antonína Vacka, CSc.** (1929–2009).

V Hradci Králové vedle VLA JEP existovalo ještě druhé radiobiologické pracoviště. Jednalo se o Ústav pro experimentální a klinickou radiobiologii a využití radioizotopů LF UK v Hradci Králové vedený **prof. MUDr. Ivanem Vodičkou, CSc.** (1932–2001). Ten v letech 1985–1990 zastával rovněž funkci děkana fakulty a v letech 1983–1990 byl přednostou Ústavu lékařské biofyziky. Ústav rozpracoval řešení otázek diagnostiky, patogeneze, profylaxe a léčby akutní nemoci z ozáření, vnitřní a zevní kontaminace radioaktivními látkami a problematiku experimentální onkologie.

Mezi významná československá radiobiologická pracoviště v 70. a 80. letech patřila katedra všeobecné biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košicích. Radiobiologové této katedry se soustředili především na studium vlivu atomových elektrárén na životní prostředí a možná zdravotní rizika pro jejich pracovníky, mapování pohybu radioaktivních látek v potravním řetězci a mutace rostlin po ozáření s dopadem na šlechtitelské metody. Od roku 1959 měli košičtí radiobiologové k dispozici unikátní experimentální kobaltové pole, které umožnilo studium vlivu záření gama na růst rostlin a na zde žijící živočichy při dávkovém příkonu od 0,1 do 10 Gy/hod. Volit šlo z rozličných modelů ozařování, od dlouhodobého působení nízkých dávek až po téměř přírodní podmínky. Po řadu let byl vedoucí postavou radiobiologické skupiny žák prof. Ferdinanda Herčíka **prof. MUDr. Milan Praslička, DrSc.** (1923–1985). Z tohoto pracoviště je nicméně nutné jmenovat také minimálně tři další významné osobnosti: **prof. MUDr. Ivana Ahlerse, DrSc.** (\*1933), **prof. MUDr. Evu Ahlersovou, DrSc.** (\*1934) a **prof. RNDr. Evu Mišúrovou, CSc.** (\*1936) (1).

Radiobiologickým tématům významným pro radiační ochranu se systematicky věnoval **doc. MUDr. Jan Müller, CSc.** (1914–2004), který vedl odbor ionizujícího záření Ústavu hygieny práce a chorob z povolání. Hlavní odbornou náplní odboru byly epidemiologické studie u horníků uranových dolů. V roce 1968 docent Müller emigroval do Kanady. V rozpracovaných studiích pokračovali jeho spolupracovníci a žáci ve Výzkumném ústavu hygieny záření, který byl později transformován v Centrum hygieny záření Institutu hygieny a epidemiologie (dnes Státní zdravotní ústav) v Praze. Studie se zaměřovaly na chromosomové aberace, radiační epidemiologii, patofyziologii krvetvorby po ozáření a některé radiotoxikologické problémy. Klíčovými osobnostmi tohoto pracoviště byli **prof. MUDr. Vladislav Klener, CSc.** (\*1927) a **MUDr. Emil Kunz, CSc.** (1930–2012) a rovněž vynikající radiobiolog a jaderný fyzik **Ing. Zdeněk Prouza, CSc.** (1940–2013), který předtím působil na KÚBNM. Své hluboké znalosti později využil jako místopředseda Státního úřadu pro jadernou bezpečnost (SÚJB) a následně jako zástupce ředitele Státního ústavu radiační ochrany (SÚRO).

Opomenout nelze úzké sepětí nových poznatků v radiobiologii s těžbou uranu na území Československa. Pro mimořádný strategický význam uranu a vzhledem ke zdravotně-hygienické závažnosti spojené s těžbou jeho rud vyvstala nutnost pracovníky tohoto odvětví přednostně zabezpečit také po zdravotní stránce. Prvním zdravotnickým pracovištěm, které vzniklo bezprostředně po 2. světové válce již v roce 1946, byl Výzkumný a vyšetřovací ústav Jáchymovských dolů umístěný v Jáchymově, v lázeňském domě Heiner. Pracovníci tohoto zařízení prováděli běžnou léčebnou péči a pravidelné prohlídky horníků. Mezi jejich další povinnosti patřily výjezdy na šachty a úpravny za účelem kontroly hygienických podmínek a odběru vzorků pro další laboratorní zpracování. Pozornost se věnovala rovněž experimentům s cílem zjistit a objektivizovat vztah mezi pracovním prostředím a některými změnami zdravotního stavu.

Strategický význam těžby uranových rud v poválečných letech jakož i pracovní rizika spojená s těžbou rud vedou k potřebě zřídit specializované zdravotnické zařízení pro pracující uranového průmyslu. Navíc se do popředí zájmu stále více dostává i prevence a zajištění zdravého životního a pracovního prostředí. Výnosem ministra zdravotnictví ČSR ze dne 27. června 1954 tak byl zřízen Závodní ústav národního zdraví uranového průmyslu (ZÚNZ UP) a později, rozhodnutím ministra zdravotnictví ČSSR ze dne 29. června 1960, Ústav pro hygienu práce a prevenci nemocí z povolání (ÚHP UP). Do jeho čela byl postaven zástupce hlavního hygienika ČSSR, který současně vykonával funkci jeho ředitele.

Po vyčerpání rudných ložisek na Jáchymovsku se ústav v roce 1965 přestěhoval do obce Kamenná v okrese Příbram. V témž roce došlo v rámci léčebně-preventivní péče ZÚNZ UP v Příbrami k založení radiotoxikologického oddělení, které se zabývalo výlučně vědeckovýzkumnou činností. Z té doby pochází řada odborných prací z oblasti hematologie a biochemie. Nový statut ZÚNZ UP a ÚHP UP dal v roce 1973 podnět ke spojení a sjednocení personální a materiální základny a vzniku samostatného oddělení radiobiologie a radiotoxikologie. Jeho činnost se soustředila především na problematiku plicního karcinomu jakožto nejzávažnějšího projevu rizik pracovního prostředí v uranových dolech. V rámci státního plánu rozvoje vědy a techniky oddělení řešilo významné úkoly státního i mezinárodního významu včetně oblasti imunologického výzkumu. S platností od 1. května 1974 byla rozhodnutím hlavního hygienika ČSR při ÚHP UP zřízena Národní referenční laboratoř pro dozimetrii radonu.

Již výše zmíněný Antonín Šmíd přechází z VLVDÚ JEP v 70. letech do ZÚNZ UP jako vedoucí lékař výzkumu a po ustavení oddělení radiobiologie a radiotoxikologie se stává jeho vedoucím. V roce 1976 byl jmenován ředitelem ÚHP UP. V roce 1995 dochází ke sloučení s Centrem medicíny katastrof Opava a název pracoviště se mění na **Ústav pro expertizu a řešení mimořádných situací**. V roce 2000 je přetransformován do Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v. v. i. (SÚJCHBO).

Přínosné radiobiologické studie týkající se možnosti využití radonu a radia v balneologii publikoval po dobu svého působení v Lázních Jáchymov **doc. MUDr. Vlastislav Hlavatý, CSc.** (1933–2014), který dříve působil rovněž na KÚBNM.

### OBDOBÍ PO ROCE 1990

V 90. letech se začaly objevovat názory, že po ukončení studené války se snížilo riziko ohrožení obyvatelstva

radioaktivním zářením na minimum, a tedy i význam radiobiologického výzkumu. Jeho přínos pro radioterapii, životní prostředí, jadernou energetiku nebo jaderný terorismus byl opomíjen. Ne nevýznamnou roli v tomto směru sehrály neziskové a ekologické iniciativy. Kvůli této situaci došlo k redukci počtu radiobiologických pracovišť jak v Československu, tak následně v Česku. Některá z nich zanikla nebo přešla na jinou problematiku. Řada odborníků odešla buď do důchodu, nebo na nová pracoviště a zájem mladší generace o obor výrazně poklesl.

Koncepce oboru se měnila i v souladu se zahraničními trendy. Dynamický rozvoj metodik, nová experimentální technika a prohlubující se mezinárodní spolupráce umožnily posunout studium radiačně vyvolaných biologických změn až na intracelulární úroveň. Zvýšil se důraz na porozumění účinkům nízkých dávek záření, rychlou a přesnou biodozimetrii, dochází k rozvoji radiogenetiky a formuje se nový pohled na ochranu obyvatelstva. Vedle výzkumu biologických efektů ionizujícího záření si rostoucí pozornost získává také studium vlivu neionizujících forem, především laseru a magnetického pole (1).

## ODBOURNÉ SPOLEČNOSTI SE ZAMĚŘENÍM NA RADIOBIOLOGII

Jak jsme již naznačili, českoslovenští radiobiologové měli nezastupitelnou úlohu nejen v oblasti vědeckovýzkumných aktivit, ale také v životě odborných společností a podíleli se na organizaci prestižních vědeckých konferencí.

Dne 5. listopadu 1959 byla založena Evropská radiobiologická společnost (dnes *European Radiation Research Society*). Mezi zakládající členy patřili rovněž radiobiologové z Československa. Ti již 3. a 4. listopadu 1955 uspořádali v Brně první československou radiobiologickou konferenci. Následně 23. února 1956 zahajuje svou existenci **Biofyzikální společnost** (v té době označována jako sekce) ČLS JEP, jejímž předsedou se stal Ferdinand Herčík, místopředsedy Milan Praslička a Zdeněk Dienstbier a jednatelem Vlastimil Slouka. Záhy se vytvořily sekce radiobiologická, radiohygienická, pro diagnostické využití radioizotopů a chladová. Biofyzikální společnost se v roce 1965 přejmenovala na **Společnost nukleární medicíny a radiační hygieny ČLS JEP**, v roce 1990 potom na **Českou společnost nukleární medicíny ČLS JEP**.

Významnou akcí představovala V. konference Evropské radiobiologické společnosti, která se konala v roce 1967 ve Špindlerově Mlýně na Bedřichově za účasti předních mezinárodně uznávaných radiobiologů. I. sjezd Československé společnosti nukleární medicíny a radiační hygieny ČLS JEP se uskutečnil ve dnech 8.–12. listopadu 1981 v hotelu Olympik v Praze při příležitosti 25. výročí jejího založení. Praha hostila radiobiology z celého světa dvakrát. V roce 1985 v prostorách Karolína, kdy se konala XIX. konference Evropské radiobiologické společnosti, a podruhé při XXXVII. setkání v roce 2009 v hotelu Diplomat (6, 8).

Současná **Společnost pro radiobiologii a krizové plánování ČLS JEP (SRKP)** byla ustavena v únoru 1992 v Brně a její členská základna zahrnuje výzkumníky i lékaře z civilního a vojenského sektoru zabývající se nejrůznějšími aspekty biologických účinků různých typů ionizujícího i neionizujícího záření, obranou před těmito účinky a naopak jejich využitím, zejména v radioterapii. SRKP je kolektivním členem dvou evropských vědeckých společností – *European Radiation Research Society* a *International Academy for Laser Medicine and Surgery*. V obou společnostech má přitom SRKP zastoupení ve výborech.

## ZÁVĚR

V historii československé radiobiologie najdeme řadu předních odborníků, kteří stáli v čele výzkumných a univerzitních pracovišť, jejichž výsledky získaly mezinárodní uznání, ať už našly své uplatnění v medicíně, průmyslu, energetice, zemědělství nebo měly spíše vojenský charakter. Tato pracoviště se vždy – bez ohledu na politickou situaci – snažila o mezinárodní spolupráci. Důkazem toho je účast tuzemských radiobiologů ve výborech mezinárodních odborných organizací, prezentace výsledků na zahraničních konferencích a opakované pořádání radiobiologických konferencí s širokou mezinárodní účastí v naší zemi. Poznatky získané v radiobiologii mají klíčový význam rovněž v ochraně obyvatelstva.

## Čestné prohlášení

*Autoři prohlašují, že v souvislosti se vznikem tohoto článku se nenacházejí ve střetu zájmů a že tento článek nebyl publikován v žádném jiném časopise.*

## Literatura

1. Havránková R (ed.). *Klinická radiobiologie*. Grada, Praha, 2020.
2. Běhouněk F, Novák FV. *Lékařská radiologie. Nákladem Mladé generace lékařů při Ústřední jednotě Čs. lékařů*, Praha, 1937.
3. Markl J. *Léčba radiem. Radiologická propedeutika*. Příruční knihovna časopisu *Praktický lékař*, sv. 4. *Nákladem Mladé generace lékařů při Ústřední jednotě Čs. lékařů*, Praha, 1924.
4. Santholzer V. *Mírové využití atomové energie*. Melantrich, Praha, 1949.
5. Dostál M. *Ke vzniku a rozvoji vojenské radiobiologie*. Sborník VLVDÚ JEP, zvláštní číslo k 25. výročí založení VLVDÚ JEP. Hradec Králové, 1983; 581–588.
6. Kuna P, Navrátil L, Dostál M. *Příspěvek k historii radiobiologie v Čechách, na Moravě a na Slovensku*. *Kontakt* 2008; 10: 214–225.
7. Mazák J a kol. *Nemoc z ozáření*. Vojenská zdravotnická knihovna, sv. 22. *Naše vojsko*, Praha, 1962.
8. Dienstbier Z. *25 let Československé společnosti nukleární medicíny a radiační hygieny*. *Časopis lékařů českých* 1981; 120(31–32): 963–967.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.**

katedra zdravotnických oborů  
a ochrany obyvatelstva

Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT  
Sportovců 2311, 272 01 Kladno  
Tel.: 603 435 273, 224 359 902  
e-mail: leos.navratil@volny.cz



# Biologické účinky ionizujícího záření

Renata Havránková<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva Fakulty biomedicínského inženýrství ČVUT v Praze  
<sup>2</sup>Ústav radiologie, toxikologie a ochrany obyvatelstva Zdravotně sociální fakulty JU v Českých Budějovicích

Čas. Léč. čes. 2020; 159: 258–260

## SOUHRN

Ionizujícím zářením označujeme tok hmotných částic nebo fotonů elektromagnetického záření, jež mají schopnost ionizovat atomy prostředí, kterým procházejí. Na buněčné úrovni se poškození může projevit smrtí buňky či změnou její cytotenetickej informace. Tyto děje mohou vést k nepříznivým tkáňovým reakcím (deterministickým účinkům), u kterých jsou projevy závislé na překročení dávkového prahu, nebo ke vzniku stochastických účinků, u nichž s dávkou stoupá pravděpodobnost poškození. Článek krátce shrnuje tyto účinky na lidský organismus.

## KLÍČOVÁ SLOVA

ionizující záření, biologický účinek, poškození DNA, tkáňová reakce, stochastický účinek

## SUMMARY

### Havránková R. Biological effects of ionizing radiation

Ionizing radiation refers to the flow of material particles or photons of electromagnetic radiation that can ionize atoms of the environment through which it passes. At the cellular level, damage can be manifested by cell death or changing their cytotenetickej information. These events can lead to adverse tissue reactions (deterministic effects) in which manifestations depend on exceeding the dose threshold, or to the stochastic effects, when the probability of damage increases with the dose. This article briefly summarizes these effects on the human body.

## KEYWORDS

ionizing radiation, biological effect, DNA damage, tissue reaction, stochastic effect

## ÚVOD

Interakce ionizujícího záření s živým organismem se řídí stejnými fyzikálními zákony jako u hmoty neživé, tj. přenosem energie záření na atomy a molekuly biologického systému. I v ozářených buňkách tedy nejprve dochází k ionizaci a excitaci atomů. Specifikem živých organismů je jejich biochemická a biologická odpověď. Již samotný pojem „ionizující záření“ napovídá, že jde o záření, jehož kvanta mají dostatečnou energii k ionizaci atomů, tj. odtržení elektronů z jejich elektronového obalu. Ve vodném prostředí (cytoplazmě) je k tomu zapotřebí minimálně 33 eV, což odpovídá vlnovým délkám kratším, než přísluší ultrafialovému záření (přibližně tedy < 40 nm) (1).

## PŮSOBENÍ IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

Poškození způsobené ionizujícím zářením je vícestupňový proces. Výchozím bodem je přímé či nepřímé působení ionizujícího záření na molekuly v průběhu fyzikální fáze, která trvá velmi krátkou dobu,  $10^{-24}$  až  $10^{-14}$  sekundy. Jedná se o období, kdy atomy a molekuly organismu absorbují energii záření. Následně, ve fyzikálně-chemické fázi ( $10^{-12}$  sekundy do  $10^{-10}$ ), vznikají volné radikály a další reaktivní agens. Ionty vzniklé během chemické fáze, radikály a další produkty reagují s biologicky důležitými molekulami (DNA, RNA, proteiny), mění jejich složení a funkci. Následně přecházejí do fáze biologické, kdy molekulární změny v biologicky důležitých látkách (chromatinu, enzymech) mohou vyústit ve funkční a morfologické změny v buňkách, v orgánech,

organismu jako celku. Tyto změny mohou nastat během několika minut, ale i za desítky let (2).

Ionizuje-li záření přímo biomolekuly, čímž je poškozujeme, mluvíme o tzv. **přímém účinku ionizujícího záření**. Biomolekuly mohou být v tomto případě ionizovány samotným primárním zářením nebo sekundárními produkty jeho interakce s hmotou, zejména tzv. delta elektrony vyraženými z okolních molekul. Přijetím kvanta záření biomolekulou a její ionizace vede následně k chemické změně a případně i ovlivnění biologické aktivity této biomolekuly (1). Biologické systémy obvykle obsahují vysoké procento vody, a značná část energie záření se proto absorbuje ve vodě. Radiolýzou vody vznikají vysoce reaktivní produkty, jako hydroxylový radikál  $\text{OH}\cdot$ , vodíkový radikál  $\text{H}\cdot$ , hydratovaný elektron  $e_{\text{aq}}$  a v přítomnosti kyslíku také značné množství peroxidu vodíku  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Všechny tyto produkty mohou vyvolávat další sekundární reakce s biologickými molekulami, a mluvíme proto o **nepřímém účinku záření** (3).

V přítomnosti kyslíku se účinek radikálů na biomolekuly zvyšuje. Ukazuje se, že kyslík reaguje s těmi místy, která byla zasažena radikály, a tím zvyšuje míru poškození. Tento jev označujeme jako **kyslíkový efekt**. Je důležitý pro radioterapii, protože nádory často obsahují oblasti, které jsou hypoxické (mají nízkou koncentraci kyslíku) následkem sníženého zásobování krví. Napadení biomolekul radikály lze rovněž uměle potlačit, například látkami obsahujícími skupiny SH (thiolové skupiny) – příkladem může být aminokyselina cystein. Působí jako látky zachycující radikály a snižují biologické působení na polovinu až třetinu, podobně jako nepřítomnost kyslíku. Některé z těchto látek byly navrženy

jako radioprotektivní látky pro osoby ohrožené radiační expozicí, avšak všechny jsou ve větší či menší míře toxické (4).

Ačkoliv ionizující záření poškozuje téměř všechny buněčné organely, klíčovou strukturou určující osud ozářené buňky zůstává jaderná DNA. Záření působí **zlomy dvoušroubovice DNA**, a to jak **jednoduché**, tak **zlomy dvojité**, postihující obě vlákna. Zatímco jednoduché zlomy si buňka jednoduše opraví, reparace dvojitých zlomů je podstatně složitější, a čím více dvojitých zlomů záření způsobí, tím větší je pravděpodobnost zničení buňky. Dvojitě zlomy působí především záření s vysokým lineárním přenosem energie (neutrony, těžké ionty), ale i fotonové či elektronové záření (5). Kromě jednoduchých a dvojných zlomů vznikají po ozáření také poškození bazí, cross-linky uvnitř DNA nebo DNA-protein, lokální denaturace či další. Při ozáření dochází k poškození i jiných molekul (např. proteinů, lipidů). Tyto molekuly jsou však v buňce obsaženy v mnoha kopiích, a proto lze pozorovatelný účinek záření očekávat až při poškození dostatečně velkého procenta kopií (3).

## PŮSOBENÍ IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA BUNĚČNÉ ÚROVNI

Pozměněná funkce biomolekul, zejména DNA, se projevuje v fungování vyšších biologických organizačních celků, a nakonec i na stavu celého organismu.

Na buněčné úrovni se uvedené poruchy manifestují **smrtí buňky** nebo **změnou genetické informace**. Buňka může být usmrcena v klidovém období (interfázi). Tento účinek však předpokládá povšechnou denaturaci buněčných složek, tedy relativně vysokou dávku. Významnějším typem buněčné smrti je zánik vázaný na mitózu, buněčné dělení. Poškození se neprojevuje okamžitě, ale tím, že buňka není schopna se dále dělit. Tato tzv. mitotická smrt buňky je pozorována při menších dávkách, které nestačí na vyvolání smrti v interfázi (6, 7). V důsledku ozáření dochází k inhibici buněčného dělení. I když buňka nezanimká, není již schopna průchodu mitózou, která klade vysoké nároky na přeskupení subcelulárních struktur. Pokud je poškození menšího stupně, buňka projde jednou či dvěma mitózami, než ztratí schopnost dalšího dělení. Nejnižší dávky vedou k tzv. bloku v určité fázi buněčného cyklu, buňky se nedělí a je jim poskytnut čas pro reparaci poškození. V případě ireparabilního poškození je iniciována apoptóza (8, 9). Odtud lze odvodit, že smrtící účinek záření na buňky se nejnázeje projevuje ve tkáních, ve kterých probíhá rychlé buněčné dělení (krvetočných orgánech, výstelce střev, vyvíjejícím se zárodku) (7).

K indukci změn dochází i v buňkách, které nejsou ozářené – tyto změny označujeme jako **bystander efekt**. Experimenty prokázaly, že stejně jako u buněk ozářených probíhají i u neozářených chromosomové aberace, dochází k jejich mutaci a onkogenní transformaci, případně až ke

smrti. Předpokládá se, že v tomto ději hrají významnou roli cytokiny a konexony. Dopad bystander efektu je vyšší u buňek bližších ozářené buňce. Pokud se jedná o sousední buňky, mluvíme někdy o komunikaci mezi stěnami (1).

Konečný výsledek působení ionizujícího záření na buňku a tkáň není určen pouze výše uvedenými mechanismy, ale je spoluurčován i uplatněním reparačních mechanismů. Lze odlišit tzv. časnou reparaci, to znamená obnovu schopnosti dalšího dělení na úrovni postižené buňky (trvá několik hodin), a proliferaci, jež vychází ze zachované schopnosti dělit se u přeživších buněk (trvá dny až týdny). Zcela jinou biologickou odezvu má ozáření lokální, při němž jsou postiženy jen určité tkáň. Stíněním části těla se uchová určitá část tzv. kmenových buněk, ze kterých může vzejít regenerace tkáně (7).

## DETERMINISTICKÉ A STOCHASTICKÉ ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ

Většina nepříznivých zdravotních účinků radiační expozice může být zařazena do dvou souhrnných kategorií označovaných jako deterministické účinky (nepříznivé tkáňové reakce), vznikající zejména v důsledku zabití či poškození buněk po vysokých dávkách ionizujícího záření, a stochastické účinky, k nimž patří rozvoj maligního bujení u exponovaných jedinců v důsledku mutací somatických buněk nebo dědičné choroby u jejich potomků v důsledku mutací reprodukčních (zárodečných) buněk (ICRP 103) (tab. 1).

Vyvolání **deterministických účinků** (nepříznivých tkáňových reakcí) je obecně charakterizováno **prahovou dávkou**. Důvodem pro existenci prahu je skutečnost, že kritická buněčná populace v dané tkáni musí doznat poškození (vážné funkční selhání nebo smrt) a to se následně projeví příslušným klinickým obrazem, který je do značné míry charakteristický, nekopíruje stavy u běžných nemocí, odlišuje se zejména časovým průběhem, prostorovou distribucí postižení a svéráznou kombinací jednotlivých příznaků. Nad prahovou dávkou závažnost poškození, včetně narušené schopnosti k zotavení tkáně, stoupá s dávkou záření (3, 10). Esovitý tvar křivky a existence dávkového prahu jsou odrazem skutečnosti, že v terčové populaci je poměrně značná funkční rezerva, tj. pokles buněčnosti se stoupající dávkou zprvu nezpůsobí žádné funkční důsledky a hodnocený efekt nastane až při překročení dávek prahových (obr. 1). Většina tkání v těle požadavek funkční rezervy splňuje (3).

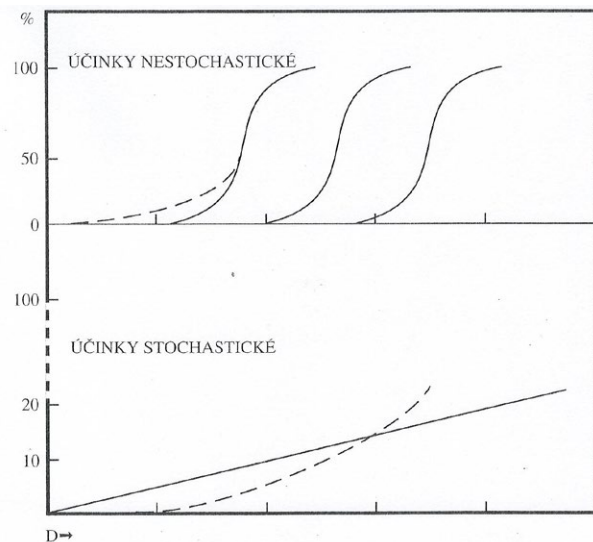
Časné tkáňové reakce mohou vznikat v časovém rozmezí několika hodin až týdnů a mohou být zánětlivého typu jako důsledek změněné propustnosti membrán buněk a uvolňování histaminu nebo to mohou být následné reakce po buněčných ztrátách (10). Hlavním faktorem určujícím míru poškození je absorbovaná dávka. Průběh a stupeň patologického procesu dále ovlivňují druh ionizujícího záření (beta,

**Tab. 1** Hlavní účinky ionizujícího záření na člověka (7)

ČASNÉ		POZDNÍ	
somatické		genetické	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• akutní nemoc z ozáření</li> <li>• akutní lokální změny</li> <li>• akutní radiodermatitida</li> <li>• poškození fertility</li> <li>• poškození vývoje plodu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chronická radiodermatitida</li> <li>• zákal oční čočky</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• zhoubné nádory</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• genetické účinky u potomstva</li> </ul>
nestochastické		stochastické	

gama, neutronové), časová distribuce ozáření (frakcionované, jednorázové, prolouvané, chronické), prostorová distribuce v organismu aj. (1).

**Stochastické účinky** jsou účinky vyvolané již zmíněnými mutacemi (změnami v genetické informaci buněk). Z pohledu radiační ochrany se předpokládá převážně **lineární bezprahový model** závislosti dávky na efektu. S dávkou tedy roste pravděpodobnost poškození (obr. 1). Vztah dávky a účinku je odvozován z epidemiologických studií. Klinický obraz těchto účinků není typický, neodlišuje se od „spontánně“ vzniklých případů (3).



**Obr. 1** Vztah dávky a účinku pro projevy deterministické a stochastické (3)

Při obdržení malých dávek ionizujícího záření je vysoká pravděpodobnost, že organismus poškození buňky zvládne pomocí reparačních procesů bez následků. Existuje však určité riziko, že se u jednotlivých buněk chyba nepodaří opravit nebo bude opravena pouze částečně a dojde ke vzniku tzv. **poradiační nestability genetického materiálu**, která může vyústit ve změnu buněčné DNA, jejímž důsledkem bývá rozvoj stochastických následků. Jde o proces, který je vyvolán poškozením jedné či několika málo buněk. Buňka, která má vlivem ionizujícího záření takto změněnou DNA, je potom za stochastické účinky zodpovědná (7).

Jednotlivé tkáně a orgány jsou ke **vzniku nádorů** po ozáření rozdílně vnímavé. Mezi nejvíce vnímavější patří kostní dřeň, žaludek, tlusté střevo, plíce či mléčná žláza. Hodnota, která charakterizuje celoživotní riziko úmrtí na zářením vyvolanou malignitu (zahrnuje různou radiosenzitivitu, ale i léčitelnost jednotlivých nádorů), se nazývá **koeficient rizika**. Celkový koeficient rizika úmrtí na zářením vyvolané zhoubné nádory byl stanoven pro pracovníky  $4,1 \times 10^{-2}$  Sv<sup>-1</sup> (to znamená, že ze 100 pracovníků ozářených efektivní dávkou 1 Sv bude pravděpodobně u 4 osob příčinou smrti zhoubný nádor). Koeficient rizika smrti pro celkovou populaci je vyšší  $5,5 \times 10^{-2}$  Sv<sup>-1</sup>, neboť jsou do ní zahrnuti i děti, u nichž existuje vyšší radiosenzitivita (7).

Důležitou charakteristikou je časový průběh výskytu zhoubných nádorů po ozáření. Leukémie, nádory štítné žlázy a nádory kostí se mohou projevovat už za několik let po expozici záření, zatímco většina ostatních malignit se projeví nejdříve za 10 let, někdy až za několik desetiletí po expozici. Přitom žádný jednotlivý typ nádorů není typickým projevem vlivu záření, takže je nemožné odlišit zářením vyvolané nádory od těch, které jsou vyvolány působením jiných možných činitelů (11).

Významnou skupinou pozdních účinků záření je **postižení potomstva ozářených osob**. Podkladem genetických změn je mutace, tj. změna v genetické informaci buňky. Za dědičné účinky je odpovědná tzv. gametická mutace, což je mutace v jádře zárodečných buněk (vajíčka, spermie) pohlavních žláz. Genetický účinek záření spočívá ve zvýšené frekvenci mutací v porovnání s mutacemi vznikajícími spontánně (7).

## ZÁVĚR

Biologické účinky po ozáření se mohou projevit bezprostředně po ozáření, ale i s latencí několika desítek let. I když zářením mohou být zasaženy všechny biomolekuly, z hlediska poškození je nejdůležitější DNA vzhledem k možnosti narušení či ztráty genetické informace. Ke změnám může docházet jak v buňkách ozářených, tak neozářených mechanismem bystander efektu.

## Čestné prohlášení

*Autorka práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.*

## Literatura

1. Havráková R (ed.). Klinická radiobiologie. Grada, Praha, 2020.
2. Gudkov IM, Vinichuk MM. Radiobiology & Radioecology. National Agricultural University of Ukraine, Kyjev, 2006.
3. Klener P et al. Principy a praxe radiační ochrany. Azin, Praha, 2000.
4. Havráková R a kol. Základy radiobiologie. ZSF JU, České Budějovice, 2018.
5. Feltl D, Cvek J. Klinická radiobiologie. Tobiáš, Havlíčkův Brod, 2008.
6. Podzimek F. Radiologická fyzika. Fyzika ionizujícího záření. ČVUT, Praha, 2015.
7. SÚJB. Stručný přehled biologických účinků záření. Dostupné na: [www.sujb.cz/radiační-ochrana/oznamení-a-informace/strucny-prehled-biologickych-ucinku-zareni](http://www.sujb.cz/radiační-ochrana/oznamení-a-informace/strucny-prehled-biologickych-ucinku-zareni)
8. Kuna P, Navrátil L. Klinická radiobiologie. Manus, Praha, 2005.
9. Österreicher J, Vávrová J. Přednášky z radiobiologie. Manus, Praha, 2003.
10. ICRP. Doporučení Mezinárodní komise radiologické ochrany 2007. ICRP, 2007; 37: 2–4.
11. UNEP. Ionizující záření. Účinky a Zdroje. Program OSN pro ochranu životního prostředí. UNEP, 2016.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**Mgr. Renata Havráková, Ph.D.**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany  
obyvatelstva FBMI ČVUT  
Sportovců 2311, 272 01 Kladno  
Tel.: 604 678 719  
e-mail: [renata.havrankova@fbmi.cvut.cz](mailto:renata.havrankova@fbmi.cvut.cz)



# Moderní trendy v radioterapii

Pavel Šlampa

Klinika radiační onkologie MOÚ a LF MU, Brno

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 261–267

## SOUHRN

Radioterapie je dynamicky se vyvíjející obor léčení zhoubných nádorů. Pokrok radioterapie významně souvisí s novými poznatky v radiobiologii, zaváděním nových systémů v radiodiagnostice a v plánování léčby zářením. Technický vývoj ozařovacích systémů za posledních 10 let nesmírně zvýšil kvalitu léčby zářením. Trvalým cílem moderní léčby zářením je minimalizovat toxicitu radioterapie při zachování terapeutického účinku. S rozvojem radioterapie se však objevuje a k diskusi zůstává problematika tzv. finanční toxicity různých ozařovacích technik a neúměrný nárůst výdajů na léčbu bez ohledu na její nákladovou efektivitu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

radioterapie, radiochirurgie, brachyterapie, moderní techniky

## SUMMARY

### Šlampa P. Modern trends in radiotherapy

Radiotherapy is a dynamically developing field of cancer treatment. Advances in radiotherapy are significantly related to new knowledge in radiobiology, the introduction of new systems in radiodiagnosics and radiation therapy planning. The technical development of irradiation systems over the last 10 years has greatly improved the quality of radiation therapy. The constant aim of modern radiation therapy is to minimize the toxicity of radiotherapy while maintaining the therapeutic effect. With the development of radiotherapy, however, the issue of so-called financial toxicity of various radiation techniques and disproportionate increase in treatment spending, regardless of cost-effectiveness.

## KEYWORDS

radiotherapy, radiosurgery, brachytherapy, modern techniques

## ÚVOD

Léčba zářením, radioterapie (lépe však náplň oboru vystihuje název radiační onkologie), je klinický obor, který v posledních 5–10 letech prošel v naší republice významnou přístrojovou obměnou. Každé komplexní onkologické centrum dnes disponuje moderní ozařovací technikou využívající lineární urychlovače s fotonovým a elektronovým zářením jako základní zdroje ionizujícího záření. Je potěšující, že máme v léčebném repertoáru i možnost léčby protonovým svazkem, moderní systémy pro radiochirurgické výkony a vyspělou techniku pro brachyterapii. V následujícím textu chci upozornit na novinky v moderní radioterapii, které jsou (nebo budou) dostupné v naší republice.

## RADIOTERAPIE ŘÍZENÁ OBRAZEM (IGRT)

Tato speciální technika ozařování využívá zobrazovacích metod v ozařovně před ozařováním nebo v jeho průběhu. Pro správné ozáření je totiž důležité, aby pacient na ozařovacím stole ležel pokaždé v naprosto stejné poloze jako při plánování ozařování. Odchyšky polohy v průběhu ozáření mohou vzniknout např. i malým pohybem, náplní orgánů (močový měchýř, konečník), dýcháním. Velmi zjednodušeně IGRT (*image-guided radiotherapy*) zajišťuje přesné zaměření svazků na ozařovači. Během ozařování je pravidelným snímkováním kontrolována poloha pacienta, zda nedochází k významným odchylkám.

Používají se rtg snímky pořízené přímo lineárním urychlovačem, jež se ukládají do systému a porovnávají s digitální rekonstrukcí snímků z CT vyšetření při plánování radioterapie. U novějších přístrojů vybavených přídatným rtg zdrojem můžeme pacienta vyšetřit výpočetní tomografií přímo pod ozařovacím přístrojem (*cone beam CT*). Vždy je hodnocena jak jednotlivá velikost odchylky nastavení, tak i systematická chyba, přičemž na základě těchto parametrů lze provést korekci srovnávacích značek umístěných na pacientovi,

respektive na fixační masce. V případě léčby protonovým svazkem či gama nožem probíhá kontrola obrazem mimo ozařovací přístroj (1, 2).

## RADIOTERAPIE S MODULOVANOU INTENZITOU (IMRT)

Radioterapeutická technika IMRT (*intensity-modulated radiotherapy*) cíleně kopíruje nepravidelný tvar ozařovaného objemu. Tvarováním ozařovaného pole se moduluje i intenzita svazku a dochází tak k dalšímu zlepšení distribuce dávky (např. šetření míchy při ozařování krku nebo konečníku při ozařování prostaty). Zároveň lze dosáhnout i rozdílného rozložení dávky v ozařovaném objemu. Navíc získáme prudký dávkový spád do okolí, lépe chráníme okolní zdravé tkáně.

**Dozimetrický přínos** modulace dávkového rozložení pomocí IMRT se projevuje především u radioterapie nádorů nosu, paranazálních dutin a baze lební, tedy lokalit, které bylo dříve velice obtížné dávkově homogenně pokrýt, aniž by současně nebyly ozářeny okolní rizikové orgány. Další přednost z dozimetrického hlediska představuje možnost omezit ozáření velkých slinných žláz s cílem snížit riziko pozdní xerostomie (suchost v ústech). S výhodou se technika využívá i při ozařování prostaty, kdy je před zářením šetřen konečník, nebo při ozařování gynekologických nádorů nebo konečníku, kdy jsou šetřena střeva a močový měchýř (1, 3).

## RADIOTERAPEUTICKÁ TECHNIKA VMAT

Jedná se o formu výše zmíněné IMRT, kdy se k modulaci intenzity svazku záření (přesněji fluence) pomocí lamel kolimátoru (systém lamel v hlavici přístroje upravující tvar ozařovaného pole) přidává ještě modulovaný pohyb ramene (*gantry*) urychlovače, modulace dávkového příkonu a u nejmodernějších přístrojů také dynamická změna polohy clon (*jaw tracking*).

Expozice probíhá za současného pohybu ramene, a ho-voříme tak o objemově modulované radioterapii kyvem – *volumetric-modulated arc therapy (VMAT)*, dříve nazývané též *IMAT (intensity-modulated arc therapy)*. S pomocí této techniky lze dosáhnout vysoce konformního prozáření cílového objemu (národu) a zároveň zajistit potřebný strmý spád dávky do okolí, aby bylo zajištěno maximální šetření zdravých tkání.

Nezanedbatelným přínosem je také rychlost dodání potřebné dávky záření (vysoký dávkový příkon). Zkrácení doby potřebné pro ozáření se projevuje nejen komfortem pro pacienty, ale snižuje se také pravděpodobnost pohybu pacienta během expozice, a tím i riziko nepřesného ozáření. Dalšími pozitivními efekty tohoto způsobu radioterapie jsou zkrácení čekací doby a zvýšení využitelnosti přístroje.

Kvalitativně ještě vyšší formou VMAT je **HyperArc radioterapie**, která navíc využívá synchronizovaný pohyb ozařovacího stolu s pohybem ramene lineárního urychlovače. Tato technika nonkoplanárního plánování a ozařování tak dosahuje ještě efektivnější radioprotekce v okolí cílového objemu a je vhodná pro stereotaktickou radioterapii a radiochirurgii (1, 2).

### PROTONOVÁ TERAPIE

Spektrum léčebných modalit stále výrazněji obohacuje protonová terapie. Poprvé byla klinicky použita v roce 1954 (Berkeley) a v současnosti je na světě v klinickém provozu 70 center, ve výstavbě asi 30 dalších. Protonová terapie svými fyzikálními a radiobiologickými charakteristikami slibuje významné zlepšení léčby ionizujícím zářením, její lokální kontrolu a snížení postradiačních komplikací. Na druhé straně protonová terapie v sobě skrývá rizika, která nelze úplně vyloučit – můžeme je pouze zmírnit hlubokou znalostí fyzikálních a radiobiologických zákonitostí absorpce nabitých částic v biologickém objektu.

Mezi uváděné výhody protonové terapie ve srovnání s terapií fotonovou patří:

- specifický průběh křivky hloubkové dávky;
- možnost přizpůsobení šířky Braggova peaku (SOBR – *spread-out Bragg peak*) rozměrům cílového objemu nádoru;
- snížení integrální dávky, hypersenzitivita a *bystander* efektu a následné omezení výskytu sekundárních malignit;
- vyšší radiobiologická účinnost (RBE) protonového svazku ve srovnání s fotonovou terapií.

Mezi rizika protonové radioterapie patří:

- vysoká citlivost na tkáňové nehomogenity (náplň střev, tělních dutin, skelet, cysty apod.);
- nepřesnosti plynoucí z pohybu cílového objemu a kritických orgánů;
- nepřesnosti plynoucí z rozdílu fyzikální a biologické dávky.

Ve vztahu k posledně uvedenému bodu experimenty ukázaly, že RBE urychlených protonů není konstantní, ale mění se v rozsahu od 1,07 do 1,3, s maximem v distální oblasti Braggova peaku; RBE je komplexní funkce parametrů alfa/beta, energie a LET (lineárního přenosu energie) protonů. Tyto vlivy dosud nejsou zahrnuty do výpočtu ozařovacího plánu.

Vývoj protonové terapie dlouhodobě brzdí vysoké finanční náklady. Výdaje na protonové zařízení se dvěma ozařovacími jsou cca 2,5násobné oproti zařízením se dvěma lineárními urychlovači. Předpokládá se však, že cena bude – spolu s technickým rozvojem – postupně klesat. Současný trend v protonové terapii představuje výstavba malých „singl“ ozařoven jako součástí velkých center fotonové radioterapie.

Protonová terapie bude výhledově dominovat v léčbě vybraných dětských nádorů, nádorů mozku, páteře a jiných nádorových lokalit, které zpravidla nelze zcela vyléčit pomocí fotonové terapie. Nicméně se neočekává, že by se protonová terapie v budoucnu stala převažující a základní modalitou v radiační onkologii vzhledem ke svým limitujícím faktorům uvedených výše v textu. Také kontrola polohy pacienta na ozařovacím lůžku (IGRT) u protonové terapie není na takové úrovni jako u fotonové terapie. Metody radiochirurgie protonovým svazkem se zatím zkouší v klinických studiích (1, 4, 5, 6).

### GAMA NŮŽ

Tento ozařovací systém je historicky nejstarší metodou radiochirurgického ozařování malých ložisek intrakraniálně. Tedy ozáření vysokou dávkou, která má letální účinek, ovšem i na zdravé tkáně v okolí nádoru, proto musí být léčba provedena velice přesně. Pracoviště gama nože v Praze patří mezi mezinárodně vysoce uznávaná centra.

V současné době existují na trhu 3 typy Leksellova gama nože (model 4C, model Perfexion a model Icon). Model 4C patří ke starším systémům, jež mají jiné uspořádání zdrojů než modernější Perfexion a Icon. Leksellův gama nůž Perfexion, komerčně dostupný od roku 2006, reprezentuje zcela nový systém s opět vylepšeným uspořádáním radioaktivních zdrojů. Disponuje celkem 192 zdroji <sup>60</sup>Co rozmístěnými v cylindrickém kolimátoru. Toto uspořádání se zcela odlišuje od předchozích typů U, B, C a 4C, kde byla geometrie hemisférická. Primární a sekundární kolimátory předchozích systémů nyní nahradil jediný masivní kolimátor z wolframu.

Kolimační prstenec z wolframu o tloušťce 120 mm je rozdělen do celkem 8 identických částí, tzv. sektorů, z nichž každý obsahuje celkem 72 kolimátorů (24 pro 4mm, 24 pro 8mm a 24 pro 16mm svazek záření). Velikost svazku pro každý sektor je měněna automaticky, a to posunem celkem 24 zdrojů <sup>60</sup>Co nad kolimačním prstencem.

Nejnovější systém potom představuje Leksellův gama nůž Icon (obr. 1). Radiační jednotka, robotický stůl a veškeré další parametry se shodují se systémem Perfexion popsáním výše, systém Icon v sobě ovšem integruje i zobrazovací jednotku *cone beam CT (CBCT)* a infračervenou kameru pro pozorování a kontrolu polohy pacienta během léčby. Kromě upevnění pacienta prostřednictvím stereotaktického rámu můžeme fixaci provést rovněž pomocí snímatelné masky, jež při frakcionaci představuje pro pacienty větší komfort než nasazování stereotaktického rámu. Kontrola polohy pacienta před ozářením pomocí CBCT a následná korekce polohy přináší rovněž možnost léčby extrakraniálních lézí, ovšem stále s omezením přibližně do úrovně krční páteře. Systém Icon byl uveden na trh teprve v roce 2015 a v současné době je umístěn i v Nemocnici Na Homolce v Praze (1).

### TOMOTERAPIE

Tomoterapie je forma rotační fotonové radioterapie charakteristická vysoce konformními distribucemi dávky s integrovanou třírozměrnou IGRT prostřednictvím (v současné době) megavoltážního CT. Princip techniky spočívá v umístění malého megavoltážního lineárního urychlovače na rotující *gantry* podobným způsobem jako u kilovoltážního rentgenového zdroje klasického diagnostického CT. V této konfiguraci poskytovala tomoterapie jako jedna z prvních



Obr. 1 Leksellův gama nůž Icon

technologií moderní třírozměrným obrazem řízenou radioterapií (IGRT). Její výhody se projevují především při velkoobjemové radioterapii (obr. 2).

Radioterapie byla obecně vyvinuta s důrazem na homogenitu dávky v tumoru. Tomoterapie spočívá v sekvenčním doručení dávky do tumoru, tj. dílčí části tumoru jsou ozařovány postupně tak, jak vysoce modulované svazky postupují a doručují dávku napříč cílovým objemem.

S tím souvisejí 2 důležité aspekty:

1. **Navazování polí:** Při navazování přidružených polí obecně existuje nebezpečí podzáření či přezáření v důsledku omezené přesnosti výpočtu a fyzikální realizace přidružených polí.

2. **Pohyb tumoru:** V důsledku pohybu tumoru (např. při dýchání) vzniká geometrická nejistota dílčího pole vůči tumoru, respektive změna geometrie pole-tumor při přechodu od jednoho pole k druhému. Tento fenomén je znám pod názvem *interplay effect*.

První problém je u tomoterapie redukován použitím helikálního pohybu, stejně jako u helikálního CT. Klinický efekt druhého problému se zmenšuje se zvyšujícím se počtem frakcí, a to průměrováním částečně přezářených a podzářených oblastí tumoru. Vzhledem k nesynchronizovanému začátku ozařování a fázi, frekvenci a amplitudě dýchání je velmi nepravděpodobné, že při každé frakci bude stejná část tumoru vystavena stejnému přezáření či podzáření (1).

## CYBERKNIFE

CyberKnife je robotický systém nesoucí lineární urychlovač speciálně uzpůsobený pro účely stereotaktické radioterapie a radiochirurgie na mobilním rameni. Urychlovačem vyrobené fotony o energii 6 MeV vytvářejí prostřednictvím superpozice několika stovek tenkých svazků z různých směrů strmý spád dávky. Díky preciznímu a kontinuálnímu snímání pozice pacienta, resp. vlastního ložiska, lze během ozařování minimalizovat zasažený objem, a tím výrazně snížit vedlejší účinky. Zároveň přístroj umožňuje dodat do cílového objemu několikanásobně vyšší dávku v jedné frakci

než konvenční radioterapie. Léčba je neinvazivní a ozařovat lze i několik ložisek najednou. Aplikuje se zpravidla v 1–5 frakcích. Relativní nevýhodou systému je délka ozáření, zpravidla 20–30 minut.

Základní prvek tohoto přístroje představuje robotické rameno, na kterém je umístěn lineární urychlovač. Obdobné rameno podpírá ozařovací lůžko, které nastavuje a následně upravuje polohu pacienta. Hovoří se o tzv. 6D polohování, jelikož robotické rameno umožňuje jak translační pohyb v osách x, y, z, tak i všechny tři rotace.

CyberKnife má na výběr přes 3 tisíce poloh sférické plochy, tzv. uzlů, ze kterých dochází k vlastnímu ozařování. Z každého uzlu může robot „zamířit“ do požadované oblasti svazek záření, jehož velikost lze regulovat změnou apertury kolimátoru Iris (fixní kolimátory jsou dnes již využívány výjimečně, nejmodernější verze systému navíc využívají více-lamelový kolimátor). Superpozicí několika desítek až stovek ozařovacích svazků se vytváří strmý spád dávky. Ozařovací



Obr. 2 Izodózní rozložení při tomoterapii u velkoobjemového ozařování



metoda je tedy neizocentrická, jelikož každý svazek může být zacílen do zcela jiného místa.

Ověření polohy cílového objemu zajišťují dva rentgenové zdroje instalované u stropu ozařovny z každé strany léčebného lůžka. Detektory jsou situovány pod lůžko na podlahu tak, aby svazky záření z rentgenových zdrojů procházely vždy skrze cílový objem a mohly být registrovány na protilehlém detektoru – tím lze určit okamžitou pozici ložiska. Když se pozice nádoru změní, ozařování se přeruší a robotické rameno upraví svou polohu tak, aby svazek záření mířil opět do cílového objemu, jak bylo naplánováno. Dle anatomicko-topografických poměrů v okolí cílového objemu, respektive jejich stability v čase je nutné vhodně zvolit systém pro precizní řízení obrazem (1).

### FLASH RADIOTERAPIE

Mnoho výzkumníků spolupracuje na vývoji inovací v radioterapii a zlepšení léčebných výsledků u zhoubných nádorů. Účinnost ozařování může nepochybně vylepšit také *flash* radioterapie. Princip metody spočívá v ultrarychlém dodání dávky záření (fotonového, elektronového, protonového) do cílového objemu (1000–10 000× rychleji než standardní urychlovač). V současné době probíhají první klinické studie, ale již experimenty ukázaly přednosti této techniky, především s ohledem na radioprotekci zdravých tkání (významné snížení rizika vzniku pozdních ireverzibilních poradiačních fibróz) při zachování protinádorové účinnosti (1).

### INTRAKRANIÁLNÍ STEREOATAKTICKÁ RADIOTERAPIE A RADIOCHIRURGIE

Intrakraniální stereotaktická radioterapie a radiochirurgie je speciální ozařovací technika, kterou se cíleně ozařují malé objemy intrakraniálních nádorových ložisek. Při vhodné velikosti a uložení nádoru v mozku se s výhodou využívá ozařování vysokými dávkami záření, v krajním případě potom ozáření jednou jedinou, velice vysokou dávkou fotonového záření. V tomto případě pak léčba probíhá – na rozdíl od klasické několikatydenní radioterapie – v průběhu jednoho dne a napodobuje tak chirurgický výkon (radiochirurgie).

Při stereotaktické radioterapii a radiochirurgii nabývá extrémní důležitosti přesnost ozáření, protože musíme zajistit, že vysoká dávka záření spojená s těmito ozařovacími

technikami zasáhne nádor, a nikoliv okolní zdravou tkáň. Absorbovaná dávka způsobí nekrózu zasaženého ložiska, ne však ihned jeho vymizení.

Dříve používaný systém invazivní fixace do stereotaktického rámu (napevno připevněného speciálními šrouby do hlavy) dnes nahrazuje speciální maska a otkovká fixace horní čelisti se srovnatelnou přesností. Použití masky je navíc bezpečnější a pacienty více akceptované. Tato moderní fixace pacienta dosahuje ekvivalentní přesnosti invazivní fixace (obr. 3 a 4). Celý proces přesného nastavení polohy pacienta se historicky nazývá stereotaktickým.

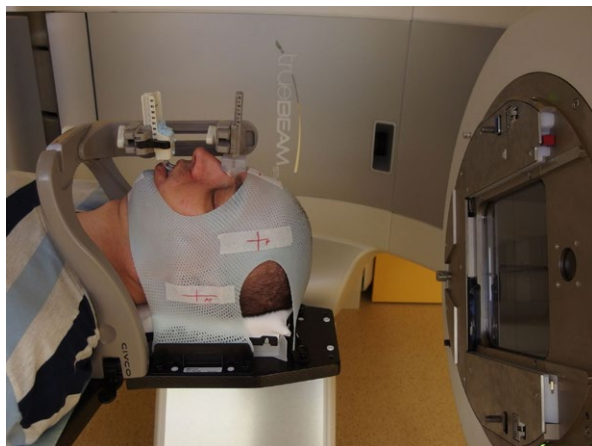
Dříve se rozlišovala stereotaktická radioterapie (SRT – *stereotactic radiotherapy*), kde je celková dávka rozdělena do několika frakcí, a radiochirurgie (SRS – *stereotactic radiosurgery*), při níž probíhá expozice jednorázově. V současnosti se tento terminologický rozdíl stírá (1, 2).

### EXTRAKRANIÁLNÍ STEREOATAKTICKÁ RADIOTERAPIE (RADIOCHIRURGIE)

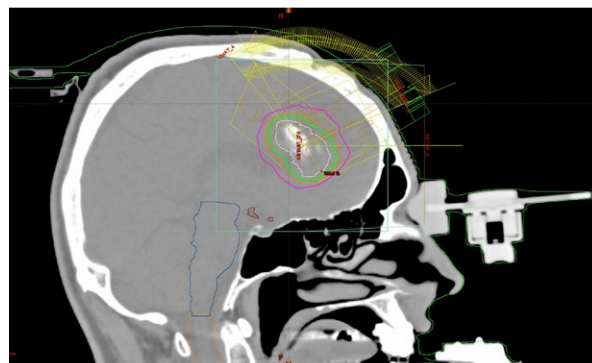
Extrakraniální stereotaktická radioterapie/radiochirurgie využívá k léčbě nádorových ložisek velmi přesné aplikace vysokých dávek záření v malém počtu frakcí (1–5). V praxi se pro tuto metodu léčby vžil označení pomocí zkratk SBRT či SABR (odvozených z anglických názvů *stereotactic body radiotherapy/stereotactic ablative radiotherapy*) a její rozvoj umožnila lepší vybavenost radioterapeutických pracovišť (moderní fixace pacientů, svazky záření „šité na míru“ stereotaxi, možnosti prostorové navigace svazků na cíl, přesná a rychlá aplikace dávky atd.).

Při odpovídajícím přístrojovém vybavení lze tuto metodu v dnešní době využít při léčbě nádorových ložisek v plicích, játrech, dutině břišní, pánvi či skeletu. Dlouhodobý lokální efekt řadí tento způsob léčby mezi výkony radikální i přesto, že v řadě případů se jedná v širším slova smyslu o paliaci (léčba metastatických ložisek). V řadě indikací má však SBRT/SABR jednoznačně kurativní potenciál (primární plicní tumory atd.).

Technika SBRT/SABR se standardně provádí lineárním urychlovačem (X-nůž) nebo systémy z něj odvozenými (robotický urychlovač CyberKnife, tomoterapie a další). Nezbytnou součástí uvedených přístrojů je možnost obrazové navigace (IGRT – radioterapie řízená obrazem). Aplikovaná dávka se pohybuje až v desítkách Gy, např. 3 × 18–20 Gy, 5 × 11–12 Gy nebo jednorázově 1 × 10–30 Gy. Takto vysoké dávky záření koncentrované do malého cílového objemu



Obr. 3 Fixace pacienta stereotaktickou maskou pro radiochirurgii



Obr. 4 Izodózní plán nonkoplanární techniky radiochirurgie s využitím lineárního urychlovače a fixace stereotaktickou maskou

překonávají buněčnou radiorezistenci, přímo nekrotizují exponované buňky, a dosahují tak maximálního letálního účinku. Nekrotizovaná tkáň se následně během několika měsíců fibroticky mění.

Vysoká přesnost doručení dávky umožňuje ozáření cílových objemů nacházejících se v těsné blízkosti radiosenzitivních orgánů (např. míchy, ledvin, tenkého střeva apod.). Další indikací SBRT/SABR jsou nádory v již dříve ozářeném terénu nebo primárně radiorezistentní. Přesnosti léčby je dosaženo zvýšenou úrovní fixace pacienta (maska, rám, vakuová dlaha, stlačení žaludeční krajiny atd.) a kontrolou jeho polohy (využití obrazové navigace, aplikace a sledování zlatých zrn, CT vyšetření urychlovačem přímo na ozařovacím stole – cone beam CT, sledování dýchacích pohybů – 4D CT plánování atd.). Dohromady tyto zlepšovací technologie umožňují plánování velmi malých bezpečnostních lemů, což při použití vysoce konformních technik radioterapie s velkým dávkovým spádem zaručuje minimální poškození přilehlých zdravých tkání.

Extrakraniální stereotaktická radioterapie představuje velmi efektivní a výborně tolerovanou metodu lokální léčby nádorových onemocnění s minimem vedlejších účinků (1, 7, 8).

### SIMULTÁNNÍ INTEGROVANÝ BOOST (SIB)

Pro princip navýšení dávky v určitém menším objemu za současného ozařování dalších struktur (většího objemu) nižšími dávkami se používá pojem simultánní integrovaný boost. Technikou SIB se zvyšuje dávka v podobě s nejvyšším rizikem recidivy (makroskopický tumor, lůžko tumoru), např. mozkovna je celá ozařována 3 Gy, ale v místě ložiska (metastáza, tumor) je dávka navýšena na 4 Gy.

V blízkosti kritických struktur může plánovací systém naopak naplánovat snížení dávky na úroveň tolerance daného orgánu k záření, což moderní ozařovací přístroje dokáží aplikovat. Je však nutná pečlivá, nejlépe denní kontrola nastavení pomocí IGRT systémů (1, 2).

### ŘÍZENÉ DÝCHÁNÍ PŘI OZAŘOVÁNÍ PRSU

Součástí léčby po operaci prsu pro zhoubný nádor je i ozařování. Vzhledem k cílové lokalitě představuje důležitou součástí tvorby ozařovacího plánu kontrola (ne)ozáření

srdce, přičemž i samy pacientky chtějí znát **vliv záření na srdce**. Radioterapie se připravuje pomocí CT vyšetření, díky kterému je umístění srdce dobře viditelné. Záření lze následně zacílit tak, aby procházelo jen prsem a srdce co nejvíce míjelo (obr. 5a). V případě použití moderních urychlovačů tak ženy obdrží v oblasti srdce tak malou dávku záření, že pro ně v tomto směru nepředstavuje žádné riziko poškození.

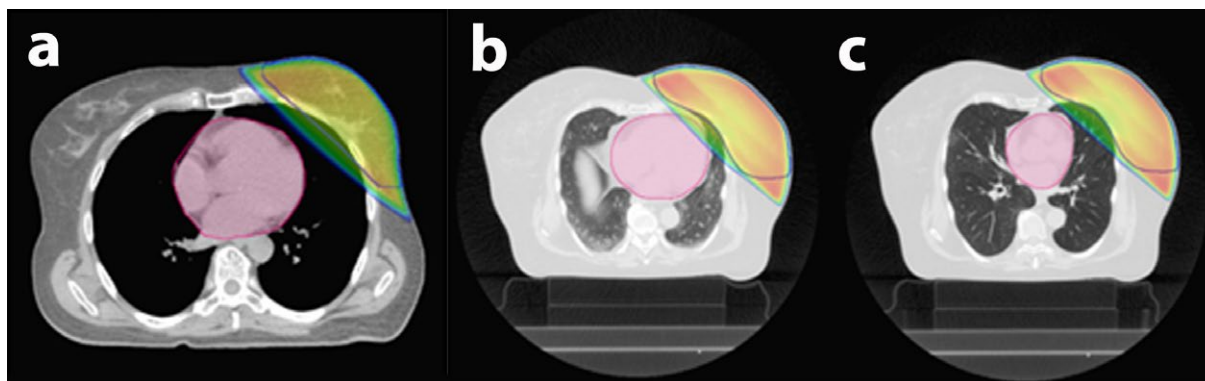
U menší části žen se však srdce nalézá natolik blízko prsu, že jím část záření prochází (obr. 5b). V takovém případě lze použít **ozařování v nádechu** (obr. 5c), během kterého se srdce dostane do bezpečné vzdálenosti. Aby ozáření probíhalo pouze v nádechu, urychlovač se opakovaně vypíná a spouští synchronně s dechem. Nádech (polohu hrudníku) kontroluje speciální snímáči zařízení položené na hrudníku. Tímto způsobem radioterapie dosahuje lineární urychlovače obdobné radioprotekce srdečního svalu jako protonové ozařování. Složitější systémy kontrolují ozařování v nádechu měřením přímo vdechovaného objemu vzduchu (1, 2).

### SYSTÉM CATALYST (SIGR)

Systém Catalyst (SIGR – surface image-guided radiation therapy) umožňuje sledovat povrch těla pacienta před zahájením ozařování i v jeho průběhu. Jelikož pracuje ve viditelné části elektromagnetického spektra a nevyužívá ionizujícího záření, neznamena jeho použití pro pacienta další radiační zátěž. Catalyst tak nabízí snadnější a přesnější polohování pacientů, zvýšení jejich bezpečnosti během ozařování a zároveň redukuje přídavné dávky ze zobrazovacích systémů.

Jelikož Catalyst monitoruje povrch těla pacienta, přináší jeho použití výhody zejména při ozařování prsu a končetin. Obr. 6 ukazuje polohování pacientky před ozářením levého prsu. Systém kontinuálně snímá obraz pacienta, průběžně jej srovnává s obrazem referenčním (typicky kontura těla z plánovacího CT) a zpětně na pacienta promítá barevný obraz zvýrazňující nevyhovující oblasti – červeně pozitivní odchylky a žlutě odchylky negativní. Radiologický asistent tak přímo vidí změny v poloze těla od žádané ozařovací pozice, což polohování pacienta významně usnadňuje.

Kontrola polohy pacienta probíhá nejen před zahájením ozařování, ale i v jeho průběhu. Catalyst tak neustále kontroluje stálost polohy a v případě její náhlé změny (např. kvůli zakašlání) vedoucí k překročení zadaných tolerancí ozařování pozastaví (1).

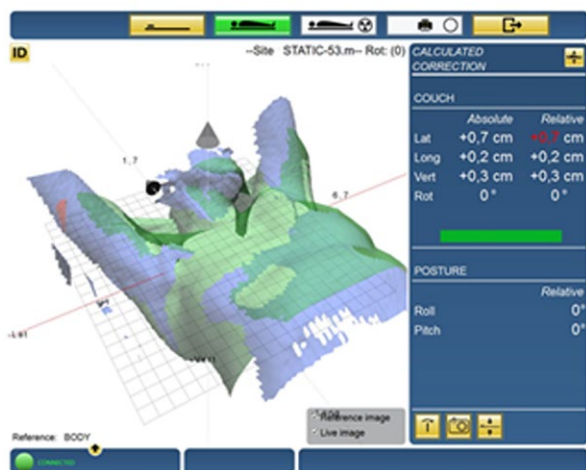


**Obr. 5** Řízené dýchání při ozařování prsu:

a) Srdce je vzdálené od prsu, nehrozí žádné riziko, standardní 3D technika radioterapie fotony lineárního urychlovače.

b) Srdce leží v blízkosti prsu a část záření skrz něj prochází, proto lékař rozhodne o ozařování v nádechu.

c) Ozařování v nádechu („řízené dýchání“) – na ozařovacím plánu je patrné výrazné zlepšení ve smyslu ochrany srdce před zářením. Barevné linie v obrázcích: růžová barva – srdce; modrá linie – objem ozařovaného prsu; barevná plocha – ozářená oblast.



Obr. 6 Systém Catalyst – polohování před ozařováním levého prsu

### AKCELEROVANÉ OZÁŘENÍ NÁDORU PRSU BRACHYTERAPIÍ

Léčba zhoubného nádoru prsu je kombinovaná. Po operačním výkonu, při kterém je odstraněna část prsu s nádorem, většinou následuje (mimo jiné) pooperační ozáření s cílem snížit riziko recidivy. Pooperační ozáření v nižších stádiích choroby může být provedeno formou ozáření pouze oblasti původního uložení nádoru – tzv. lůžka nádoru, kde je riziko největší.

Samostatná intersticiální brachyterapie představuje jednu z metod ozáření v místě lůžka nádoru prsu. Brachyterapií rozumíme tzv. vnitřní ozařování, kdy se do daného objemu tkáně či orgánu zavádí radioaktivní zářič. Standardně jde o iridiový zdroj s průměrem cca 1 mm a délkou 5 mm. Výhoda této metody spočívá v akceleraci léčby zkracující dobu jejího trvání přibližně na 4–5 dnů oproti 5–7 týdnům při standardní zevní radioterapii lineárním urychlovačem.

Samostatnou intersticiální brachyterapii zahajuje zavedení plastických trubiček (vodičů radioaktivního zdroje) do místa původního uložení (lůžka) nádoru, jež probíhá

v celkové anestézii. Plastikové trubičky jsou ohebné a zůstávají po celou dobu ozařování v prsu (obr. 7a, b), takže v dalším průběhu výkonu již není anestézie nutná. Samotné ozařování potom probíhá 2× denně celkem 4–5 dnů. Při každém ozařování se vodiče zdrojů záření připojí k přístroji, který automaticky zavede tyto zdroje do požadovaného objemu prsu. Zdroje záření tudíž cíleně exponují pouze lůžko nádoru (s bezpečnostním lemem), čímž se snižuje ozáření okolních zdravých tkání (kůže, podkoží, plíce, srdce aj.). Ozařování trvá asi 5 minut a většinou se provádí v 8 frakcích, 2× denně. Bezprostředně po poslední expozici jsou katétr z prsu odstraněny prostým vytažením; tento výkon je nebolestivý. Léčba samostatnou intersticiální brachyterapií vyžaduje hospitalizaci v době trvání přibližně 10 dnů. Se stejným léčebným efektem a nižšími pozdními následky přitom nahradí léčbu zevní radioterapii.

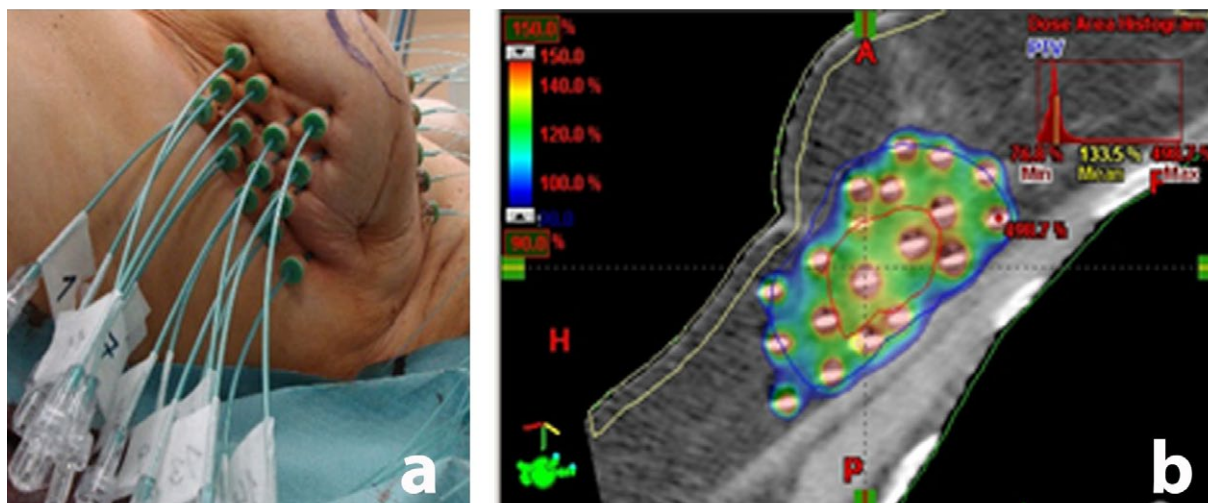
Nově se do praxe zavádějí systémy, které lůžko nádoru prsu ozařují již na operačním sále přenosnými urychlovači (Mobetron, Intrabeam aj.). Tímto způsobem se navyšuje dávka skutečně na místo, kde byl nádor umístěn – toto ozáření je potom zpravidla doplněno zevní radioterapií celého prsu (9).

### DALŠÍ MOŽNOSTI RADIOTERAPIE

Další zvyšování konformity ozáření počítá mj. s širším využitím konceptu **adaptivní radioterapie**, tzn. zohledněním změny velikosti a tvaru cílových objemů a rizikových struktur v průběhu frakcionované radioterapie, projevujícím se přizpůsobením ozařovacího plánu zjištěným změnám.

V současnosti již standardně disponujeme a v praxi využíváme značné množství tímto směrem orientovaných technologií, jejichž komplexní výčet jde ovšem nad rámec tohoto sdělení. Níže uvedený přehled proto zahrnuje jen ty nejvýznamnější:

- **Zpřesnění ozáření pohyblivých cílových objemů s využitím 4D CT** (tj. CT korelovaného s dýchacími pohyby): S pomocí 4D CT jsou cílové objemy určeny a ozářeny přesně i v případě změny jejich polohy při dýchání. Též lze ozařovat jen v určité fázi dechového cyklu s využitím automatické monitorace dechových pohybů.



Obr. 7 Brachyterapie:  
a) Zavedené vodiče pro iridiový zdroj u akcelerované parciální brachyterapie karcinomu prsu.  
b) Izodozní plán akcelerované parciální brachyterapie po operačním odstranění nádoru prsu.



- **Hadronová terapie:** K přesnějšímu a případně i efektivnějšímu ozáření nádorů může výrazně přispět rozvoj radioterapeutických technik využívajících nové druhy ionizujícího záření korpuskulární povahy (podle RBE lze dělit na lehčí částice, tj. protony, neutrony a  $\alpha$ -částice, a těžké částice, tj. uhlíkové, neonové, křemíkové a argonové ionty). Tyto typy záření vykazují fyzikálně výhodnější průběh depozice energie ve tkáni, konformnější dávkovou distribuci (Braggův peak), a tudíž i efektivnější šetření okolních zdravých tkání. Korpuskulární záření potom (kromě protonů) díky vysokému LET (lineární přenos energie, u neutronů definován nepřímo) charakterizuje i výrazně vyšší relativní biologická efektivita (RBE) ve srovnání se zářeními fotonového charakteru (hodnota RBE udává, kolikrát efektivita incidentního záření s ohledem na určitý biologický dopad, např. zabíjení buněk, převyšuje efektivitu stejné dávky konvenčního záření X nebo gama; jde tedy o poměr dávek záření referenčního a incidentního, jež způsobují stejné biologické důsledky). Účinek korpuskulárního záření s vysokým LET navíc mnohem méně než v případě záření fotonového závisí na oxysličení nádoru (hypoxie) a případně i přítomnosti různých mutací (p53 atd.) v genomu nádorových buněk.
- **Rozvíjející se využití MRI (+ PET) v plánovacích vyšetřeních ve fúzi s CT snímků.** Nejmoderněji přichází v úvahu také využití kontroly nastavení pacienta dle MRI vyšetření přímo na ozařovači MRI lineárního urychlovače.
- **Permanentní aplikace radioaktivních zrn v brachyterapii:** U nádorů prostaty nízkého rizika se tato technika jeví jako vhodná alternativa pro pacienty staršího věku, neboť se pojí s pouze jednorázovým invazivním výkonem (1, 10–13).

## ZÁVĚR

Vzhledem k fyzikálním charakteristikám ozařovacích svazků (fotony, protony, elektrony, neutrony ad.) nelze dosáhnout nulových hodnot záření v tkáních přilehlých cílovému objemu. Cílem moderní léčby zářením je minimalizovat toxicitu radioterapie při zachování terapeutického účinku. S rozvojem radioterapie se však objevuje a k diskusi zůstává problematika tzv. finanční toxicity různých ozařovacích technik, tzn. neúměrný nárůst výdajů na léčbu bez ohledu na její nákladovou efektivitu. Jedná se o jakousi analogii s moderními přípravky cílené protinádorové léčby

a imunoterapie, kde je pojem finanční toxicita rovněž nově zaváděn a musí být brán v potaz v každodenní diagnosticko-terapeutické rozvaze.

## Literatura

1. Šlampa P a kol. Radiční onkologie. Maxdorf, Praha, 2020.
2. Šlampa P. Žlutý kopec. Historie léčby zářením v Brně na Žlutém kopci. Maxdorf, Praha, 2018.
3. Šlampa P, Petera J a kol. Radiční onkologie. Galén, Karolinum, Praha, 2007.
4. Kahalley LS, Peterson R, Ris MD et al. Superior intellectual outcomes after proton radiotherapy compared with photon radiotherapy for pediatric medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2020; 38: 454–461.
5. Langendijk JA, Boersma JL, Rasch CRN et al. Clinical trial strategies to compare protons with photons. *Semin Radiat Oncol* 2018; 28: 79–87.
6. Petera J. Kontroverze protonové terapie u nádorů centrální nervové soustavy. *Klinická onkologie* 2018; 31: 24–27.
7. Burkoň P, Slávik M, Kazda T et al. Ablative dose stereotactic body radiation therapy for oligometastatic disease: a prospective single institution study. *Neoplasma* 2019; 66: 315–325.
8. Yeung R, Hamm J, Liu M et al. Institutional analysis of stereotactic body radiotherapy (SBRT) for oligometastatic lymph node metastases. *Radiat Oncol* 2017; 12: 105.
9. Schäfer R, Strnad V, Šlampa P et al.; Groupe Européen de Curiethérapie of European Society for Radiotherapy and Oncology (GEC-ESTRO). Quality of life in patients treated with accelerated partial breast irradiation using multicatheter interstitial brachytherapy versus whole-breast irradiation: 5-year results from the randomized, phase 3, non-inferiority GEC-ESTRO trial. *Lancet Oncol* 2018; 19: 834–844.
10. Hamming-Vrieze O, van Kranen SR, Heemsbergen WD et al. Analysis of GTV reduction during radiotherapy for oropharyngeal cancer: Implications for adaptive radiotherapy. *Radiother Oncol* 2017; 122: 224–228.
11. Havránková R (ed.). Klinická radiobiologie. Grada, Praha, 2020.
12. Jefferson T, Formoso G, Venturelli F et al. Hadrontherapy for cancer. An overview of HTA reports and ongoing studies. *Recenti Prog Med* 2019; 110: 566–586.
13. Wang C et al. Artificial intelligence in radiotherapy treatment planning: present and future. *Technol Cancer Res Treat* 2019; 18: 1533033819873922.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:  
**prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.**

Klinika radiční onkologie  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno  
Tel.: 543 131 127, 543 131 116  
e-mail: slampa@mou.cz

# Reparace DNA v buňkách nádorů hlavy a krku a možnosti využití monitorování tohoto procesu pro odhad radiorezistence jednotlivých nádorů a výběr optimální primární léčby

Zuzana Horáková<sup>1</sup>, Jaromír Gumulec<sup>2,3</sup>, Olga Kopečná<sup>4</sup>, Eva Pagáčová<sup>4</sup>, Michal Masařík<sup>2,3</sup>, Alena Bačíková<sup>4</sup>, Iva Falková<sup>4</sup>, Martina Raudenská<sup>2,3</sup>, Tomáš Vičar<sup>5</sup>, Hana Binková<sup>6</sup>, Martin Falk<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku LF UP a FN Olomouc

<sup>2</sup>Ústav patologické fyziologie LF MU v Brně

<sup>3</sup>Fyziologický ústav LF MU v Brně

<sup>4</sup>Oddělení buněčné biologie a radiobiologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

<sup>5</sup>Ústav biomedicínského inženýrství, FEKT VUT v Brně

<sup>6</sup>Oddělení ORL, Vojenská nemocnice Brno

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 268–274

## SOUHRN

V léčbě nádorů hlavy a krku (NHK) zaznamenáváme odklon od chirurgie směrem k radioterapii, respektive chemoradioterapii, s důrazem na poléčebnou kvalitu života. Volba léčebné modalitity však vychází pouze z klinických zkušeností a preferencí pacienta, protože neznáme marker radiosenzitivity jednotlivých nádorů. Nové možnosti rozhodování o nevhodnější primární terapii, směřující k personalizované medicíně založené na kvantifikovatelných biomarkerech, by mohlo nabídnout studium radiačního poškození a reparace DNA u jednotlivých nádorů. V předloženém článku diskutujeme, společně s významem radioterapie v léčbě NHK, své předběžné výsledky odhalující existenci několika skupin NHK s ohledem na stabilitu genomu a reparační schopnosti nádorových buněk po ozáření. Monitorování kinetiky tvorby a zániku reparačních ohnisek  $\gamma$ H2AX/53BP1 v buněčných primokultúrách nádorových tkání získaných od jednotlivých pacientů naznačuje, že specifické odchylky v reparaci DNA, charakteristické pro identifikované skupiny, korelují se zvýšenou nebo sníženou radiosenzitivitou nádorových buněk. Naše zjištění tak přispívají k lepšímu pochopení vzniku a progresu NHK. Souvislost reparačních skupin s odpovědí nádorů na radioterapii in vivo však zůstává předmětem výzkumu. Jelikož velká část NHK netrpí reparačními defekty, a přitom se jejich viabilita po ozáření vzájemně diametrálně liší, preterapeutické testy pokrývající celé spektrum příčin radiosenzitivity NHK budou muset využívat kombinaci více biomarkerů, jež však stále čekají na své odhalení.

## KLÍČOVÁ SLOVA

nádory hlavy a krku, dilema primární léčby, radioterapie, prediktivní markery radiorezistence, poškození a reparace DNA

## SUMMARY

**Horáková Z. et al. DNA repair in head and neck tumor cells and possibilities of its monitoring to estimate individual tumor radioresistance and selection of optimal primary treatment**

In order to maximize post-therapeutic quality of life, radio(chemo)therapy becomes preferred over surgery in head-and-neck tumor (HNT) treatment. However, the therapy selection is only based on the clinical experience and patient's preferences as the radiosensitivity markers remain unknown. New possibilities of deciding on the best primary therapy, moving us towards personalized medicine based on quantifiable biomarkers, have been opened by studies on DNA radiation damage and repair in individual patients' tumors. Together with the importance of radiotherapy in HNT oncology, we discuss here our preliminary results revealing the existence of several HNT groups with respect to genome stability and repair ability of tumor cells after irradiation. Monitoring of the formation and disappearance of  $\gamma$ H2AX/53BP1 foci in tumor cell primo-cultures derived from individual patients suggests that DNA repair capacity of the identified groups correlates with the tumor cell radiosensitivity. Our findings thus improve understanding of HNT biology; nevertheless, the relationship between the repair groups and in vivo response of tumors to radiotherapy must be further studied. Since most HNTs do not suffer from repair defects, although their viability varies after irradiation, pre-therapeutic tests covering the full spectrum of HNT radiosensitivity causes will require the use of a combination of multiple, still undiscovered biomarkers.

## KEYWORDS

head and neck tumors, primary therapy dilemma, radiotherapy, radioresistance predictive markers, DNA damage and repair

## ÚVOD

Zhoubné nádory hlavy a krku (NHK) zahrnují zhruba 5 % všech malignit a celkem představují 6. nejčastější nádorové

onemocnění. Celosvětově ročně se diagnostikuje cca 650 tisíc NHK a zaznamenává 350 tisíc úmrtí na tyto nádory. V Česku dle údajů webového portálu SVOD ([www.svod.cz](http://www.svod.cz)) evidujeme

každým rokem přibližně 1100 nových případů a 600 úmrtí na tuto diagnózu (1). Incidence NHK navíc v posledních dekádách stoupá, a to v naší zemi i celosvětově. Ještě strměji pak roste prevalence.

NHK se nezdá vyskytovat v blízkosti kritických anatomico-funkčních struktur, což činí operační zákrok často nemožný nebo značně devastující. Zásadní zlepšení terapeutických vyhlídek zatím nepřináší ani konzervativní léčba, z velké části založená na radioterapii (RT), jelikož přibližně polovina NHK neodpovídá na ozáření. Velký důraz je proto kladen na výzkum preterapeutických markerů radiorezistence NHK (2) a zároveň vývoj účinnější RT (3–5) spolu se zlepšováním mikrochirurgických metod.

NHK tvoří geneticky i klinicky heterogenní skupinu onemocnění, postihující více lokalit horního aerodigestivního traktu. Nejčastěji vznikají v hltanu, dutině ústní a hrtanu, histologicky se v naprosté většině případů jedná o spinocelulární karcinom. NHK se chovají povětšinou agresivně a mají špatnou prognózu, jednou z nejhorších, s tendencí k časným recidivám a vysoké mortalitě (až 50 %). Prognóza se nicméně diametrálně liší dle pokročilosti onemocnění v době diagnózy. Většina NHK bývá bohužel odhalena až v lokálně pokročilém stadiu (III+IV). Kvůli této skutečnosti a agresivnímu růstu nepřesahuje 5leté přežití celkově pro všechny NHK 50 %. U časných stadií (I a II) 5leté přežití po adekvátní chirurgické nebo i nechirurgické léčbě vzrůstá na 60–95 %, s velmi dobrou perspektivou. Zcela odlišných terapeutických úspěchů potom logicky dosahujeme u lokálně pokročilých nádorů stadia III a IV, kde i přes radikální a dnes již standardně aplikovanou multimodální léčbu přežívá 5 let pouze 40–50 % pacientů. Recidiva dále zhoršuje prognózu přibližně o 25 % a metastázy do krčních uzlin také o cca 25 %. Navzdory veškerému úsilí zaměřenému na prevenci, pokrokům v diagnostice a zavedení nejnovějších postupů v chirurgii a chemo/radioterapii se v průběhu posledních dekád nepodařilo zásadně zlepšit žádný ze sledovaných parametrů lokální kontroly onemocnění ani přežití (6).

Etiopatogeneticky i klinicky musíme podle asociace nádoru s infekcí vysoce rizikovými typy viru lidského papilomaviru (HPV) rozlišovat 2 skupiny, které vykazují zcela odlišné biologické chování, senzitivitu k léčbě, a tudíž i terapeutické výsledky a prognostické vyhlídky (7). Zatímco incidence „etiologicky tradičních“ NHK díky prevenci postupně klesá, byť jen velice zvolna, zcela opačný trend registrujeme u nádorů (spolu)vyprovokovaných virovými vlivy (HPV<sup>+</sup>), kde můžeme dokonce hovořit o celosvětové epidemii. Zopakujme, že HPV<sup>+</sup> nádory lépe odpovídají na radioterapii a lze u nich očekávat příznivější vyhlídky. Začíná se nicméně vyčleňovat i třetí skupina NHK, představovaná kuřáky s nádory asociovanými s HPV, která prognosticky spadá někam mezi HPV<sup>+</sup> nádory u nekuřáků a HPV<sup>-</sup> nádory.

V poslední době se stále silněji prosazuje důraz na maximalizaci kvality života pacientů po proběhnuvší léčbě. Minimalizace sekundárních účinků terapie se tak stává integrální součástí přípravy terapeutického plánu spolu s požadavkem na výsledky léčby samotné (přežití pacientů). Zásadní roli v tomto ohledu hraje správný výběr primární terapeutické strategie. Současné možnosti a problémy jednotlivých léčebných alternativ srovnáváme v následujícím textu.

## CHIRURGICKÁ LÉČBA NHK

Radikální chirurgická resekce s potřebnou bezpečnostní linií dostatečnou z onkologického hlediska představuje histo-

ricky ověřenou léčebnou modalitu. Vzhledem k anatomické blízkosti životně důležitých struktur se však ve většině případů pojí s podstatnou mutilací pacienta, zásadně zhoršující jeho poléčebnou kvalitu života. Operaci komplikuje zejména skutečnost, že se na anatomicky malém prostoru potkávají významné struktury dýchacích a polykacích cest, klíčové z hlediska funkčního a zároveň estetického. Chirurgické řešení proto často ústí v dlouhodobou až trvalou závislost na tracheostomii, případně gastrostomii. Vždy tak proti sobě stojí onkologická radikálnost a rozsah mutilace pacienta.

Akcentace poléčebné kvality života v současnosti vede ke stále preferovanější konzervativní léčbě, tj. radioterapii nebo chemoradioterapii, případně v kombinaci s biologickou léčbou (8). Pokroky v chirurgii představované endoskopickou resekci s využitím laseru nebo robotické chirurgie, hojně využívanou v posledních letech, zásadně přispívají ke zlepšení funkčních pooperačních výsledků. Zdá se tedy, zejména vzhledem k níže diskutovaným nedořešeným problémům souvisejícím s konzervativní léčbou (zejména ~50 % radiorezistence NHK), že jsme potenciál chirurgie ještě zcela nevyčerpali a operace tak zůstává v řadě případů nenahraditelná (9).

## NECHIRURGICKÁ LÉČBA

Radioterapie (RT) reprezentuje nejúčinnější, a tudíž i nejčastěji aplikovaný nechirurgický léčebný přístup, u NHK užíváný v indikaci kurativní, adjuvantní nebo paliativní. Princip RT spočívá v poškození DNA nádorových buněk, jež zároveň trpí častými defekty v reparačních mechanismech této molekuly, a navíc se ze samotné podstaty svého stavu dělí rychleji než buňky normální (10). Nádorové buňky tak ve srovnání s buňkami netransformovanými opravují DNA méně efektivně a mají na tyto opravy i méně času. Kvůli narušené funkci kontrolních bodů buněčného cyklu potom neregulovaně proliferující nádorové buňky vstupují do mitózy s nedoreparovanou DNA, což obvykle končí jejich přechodem do senescence nebo smrti kvůli neschopnosti dokončit mitózu (mitotická smrt).

Prakticky ovšem musíme počítat hned s několika zásadními komplikacemi zhoršujícími terapeutické vyhlídky. Radiosenzitivita nádorových buněk se i přes jejich sníženou reparační kapacitu neliší od buněk nádoru přiléhajících normálních tkání až tak dramaticky, aby šlo účinek záření principiálně považovat za selektivní. Vždy proto existuje riziko vážných vedlejších účinků RT, jako například indukce sekundárních malignit i při malých absorbovaných dávkách (viz níže). Při standardních radioterapeutických přístupech chráníme normální tkáně frakcionací celkové dávky záření do většího počtu časově separovaných subfrakcí. Tato procedura však podporuje selekci radiorezistentních klonů buněk a zvyšování radiorezistence nádoru následkem terapie (obdobně vzniku chemorezistence). Některé tumory (obecně) jsou navíc v důsledku svých genetických charakteristik *a priori* vysoce radiorezistentní. Z NHK na záření špatně odpovídá asi polovina případů (11), příčiny této rezistence nicméně čekají na své zmapování.

Radiorezistenci nádoru dále významně zvyšuje různé rozsáhlá a intenzivní, avšak téměř vždy přítomná hypoxie. Ionizující záření poškozuje DNA nádorových buněk buď přímo, nebo nepřímo prostřednictvím volných radikálů vznikajících radiolýzou vody. Pro fotonové záření gama nebo rtg, nejčastěji používané v radioterapii, nepřímý efekt značně dominuje.



Dostatečná oxygenace je proto nezbytná pro stabilizaci (zařizování) radikálového poškození DNA, a tudíž manifestaci efektu RT (10).

Radioterapii tedy i přes její neinvazivní charakter doprovázejí výrazné projevy toxicity. Kromě akutního poškození (mukozitida, dermatitida) trpí ozářené tkáně a orgány rovněž toxicitou pozdní (xerostomie, fibroindurace, dysfagie, dysfonie), přičemž vždy hrozí riziko indukce sekundárních nádorů. Všechny tyto faktory významně snižují poléčebnou kvalitu života a v případě lokalizace nádoru v blízkosti kriticky důležitých anatomicko-funkčních struktur i použitelnost RT. Principiálně můžeme vedlejší účinky RT omezit radiosenzitizací nádorových buněk nebo radioprotekcí buněk zdravé tkáně. Lze toho docílit cestou fyzikální (hadronová terapie [3, 5, 12, 13], kovové nanočástice [4, 14] apod.), chemickou (amifostin a další chemická agens [15–17]), biologickou (siRNA, specifické protilátky apod.) nebo technologickou (zpřesňující a maximalizující depozici dávky ionizujícího záření v objemu nádoru [18]).

Dva klinicky realizovatelné způsoby snížení toxicity RT v současnosti nabízejí nové technologie lépe zacilující ozáření na nádor samotný (18) a hadronová terapie pomocí urychlených protonů (5) nebo těžkých (zejména uhlíkových) iontů (19). Ozařování těžkými ionty představuje v současnosti patrně jedinou dostupnou léčebnou modalitu v případech, kdy standardní (fotonová) terapie selže a chirurgické řešení není myslitelné (záchranná RT) (19). Z progresivních radio-terapeutických technik jmenujeme radioterapii s modulovanou intenzitou (IMRT) nebo řízenou obrazem (IGRT), jež díky zpřesnění ozařovaného pole a jeho zaměření na nádor minimalizují radiční zátěž normálních tkání, především nejcitlivějších neurologických struktur, bez nutnosti redukovat aplikovanou dávku, respektive účinnost léčby. Moderním radio-terapeutickým technikám se podrobně a v širším měřítku věnuje článek profesora Pavla Šlampy v tomto vydání ČLČ.

Urychlené protony a těžké ionty interagují s hmotou v důsledku přítomnosti náboje jinak než záření fotonového typu. Většina energie záření je okolnímu prostředí předána v oblasti tzv. Braggova maxima (peaku), jež se objevuje těsně před koncem dráhy letu částice a jehož hloubku v těle pacienta nastavujeme volbou výchozí energie částic tak, aby došlo k překrytí s pozicí tumoru. Hadronová terapie tím při stejné aplikované dávce šetří normální tkáně před a zejména za nádorem mnohem lépe než fotonová záření. Urychlené těžké ionty navíc poskytují výhodu vysokého lineárního přenosu energie (LET), a tudíž i radiobiologické efektivity (RBE) a terapeutického účinku (3). DNA přitom poškozují zejména přímo, takže výsledek terapie mnohem méně závisí na hypoxii a genetickém pozadí nádoru (20). Vzhledem k extrémní finanční náročnosti a dosud ne zcela probádaným biologickým rizikům se však klinické využití těžkých iontů omezuje celosvětově na několik málo center. Na současné technologické úrovni je navíc přínos hadronové terapie pro některé typy nádorů stále diskutabilní (21).

Jeden z kritických problémů aplikace RT v onkologii NHK spočívá v neznalosti markerů radiosenzitivity či radio- rezistence jednotlivých nádorů (ačkoliv existují nesčetné genetické i negenetické změny již dříve obecně korelované s rezistencí nádorů k RT, jejich relevance pro NHK není známa, stejně jako způsob stanovení integrálního účinku jejich konkrétních kombinací na terapeutickou odpověď daného nádoru – viz *dále*). RT je tudíž vždy aplikována zcela neselektovaně a – protože zhruba polovina NHK na záření

neoreaguje – s významným rizikem selhání terapie. K tomuto tématu se detailněji vrátíme později.

Chemoterapie, zejména na bázi platiny, bývá zařazována především jako součást konzervativní chemoradioterapie (22). Pro doposud nejvyšší účinnost ji považujeme za zlatý standard v onkologii NHK, současně však působí značně toxicky. Při intoleranci nebo v paliativní indikaci se nabízí i možnost aplikace dalších modalit, případně kombinovaných s RT.

Rozvojem prochází i biologická léčba, např. na principu protilátek proti receptorům epidermálního růstového faktoru (EGFR), které NHK často vytvářejí v nadměrném množství (23). Nově se spektrum možností biologické léčby NHK rozrostlo o imunoterapii na bázi protilátek proti povrchovým receptorům PD1 (membránovému proteinu programované buněčné smrti 1) nebo ligandům tohoto receptoru – PD-L1 (24).

### STRATEGIE LÉČBY, ZÁCHOVNÝ PROTOKOL

V posledních letech se termín „léčebný protokol zachovávací orgán“ (OPP – *organ preservation protocol*) skloňuje stále častěji i v léčbě pokročilých NHK. Myšlenka OPP vznikla v 90. letech 20. století (25), nejprve v kontextu lokálně pokročilých nádorů hrtanu, které v případě chirurgického řešení vyžadují totální laryngektomií spojenou s trvalou tracheostomií. Přestože OPP spoléhá na konzervativní léčbu nahrazující mutilující operaci, benefity s ohledem na zachování funkce postižených orgánů bohužel nejsou jednoznačné (25).

Neopominutelné bývají zejména vedlejší účinky radio-terapie, zvláště v případě jejich další akcentace současně aplikovanou chemoterapií. Registrujeme toxicitu akutní, jež často limituje dokončení plánované terapie (především mukozitida a dermatitida v akutním stadiu), i chronickou, s dlouhodobými komplikacemi. Kombinací modalit, nejčastěji chemo- a radioterapie, se tak sice podařilo nahradit radikální chirurgickou léčbu a fyzicky „zachránit“ hrtan, metaanalýzy ovšem odhalily dramatické následky pozdní toxicity, nezdědka funkčně devastující. Těživě se manifestuje zejména dysfonie a dysfagie doprovázená aspirací (respektive tzv. tichou aspirací) potravy, ústíci v recidivující pneumonie. V závislosti na rozsahu nádoru je 30–60 % pacientů odkázáno na gastrostomii či tracheostomii déle než 1 rok po ukončení léčby. Strikturní polykacích cest s funkčními problémy se objevují až u 40 % jedinců. Při chemoterapii se dále vyskytují komplikace metabolické a při biologické léčbě dermatologické. Na základě pozdní toxicity se rozvíjí i značně limitující a kvalitu života snižující xerostomie, mandibulární osteodionekrózy, trismus, kožní hyperpigmentace, fibroindurace podkoží a závažné kosmetické defekty.

Analýze funkčních výsledků nechirurgické léčby se retrospektivně věnovalo mnoho studií (26). Ukázalo se přitom, že kromě kvantitativních výsledků kontroly nádoru a zachování postiženého orgánu musíme dopady hodnotit v širším kontextu. Nepoškození samotné anatomické struktury totiž neznamená zároveň nepozbytí její funkce. Ta může být primárně a nezvratně narušena již samotným nádorem před léčbou nebo posléze toxicitou terapie. Ani po úspěšné eliminaci nádoru nelze automaticky očekávat restituci funkce zasaženého orgánu, byť anatomicky intaktního. Ve skutečnosti jsou výsledky s ohledem na funkčnost orgánů nad původní očekávání špatné, bohužel i dlouhodobě. Při již zmíněné nechirurgické léčbě pokročilých nádorů hrtanu

se podařilo orgán zachránit u více než 2/3 pacientů; přesto však 30–50 % z nich zůstává po mnoho měsíců nebo i trvale závislých na gastrostomii/tracheostomii, pro nezvladatelnou dysfagii a obstrukci dýchacích cest se současnou dysfoníí. Neodstraněný, avšak nefunkční orgán v těchto případech představuje pro pacienta často přítěž pro riziko aspirací a recidivujících pneumonií.

Souhrnně tedy nezbyvá než konstatovat, že s ohledem na terapeutickou efektivitu a restituci kvality života prokazují zachovný (OPP) přístup v léčbě NHK obdobné výsledky jako chirurgické řešení (např. 27). Aktuální trendy v onkologii NHK se proto dynamicky mění v závislosti na aktuálních pokrocích v konkrétním směru. Po období dominující chirurgické resekce docházelo od 90. let 20. století k rozvoji RT, chemoterapie a biologické terapie a silnému příklonu ke konzervativní léčbě. V posledních letech po zavedení šetrných endoskopických a robo-chirurgických metod pozorujeme naopak renesanci chirurgie. Například Tang et al. (28) na základě dlouhodobého sledování 6288 pacientů poukazují na lepší lokální kontrolu a přežití pacientů po chirurgické excizi dokonce i v případě velmi pokročilých (T4) nádorů.

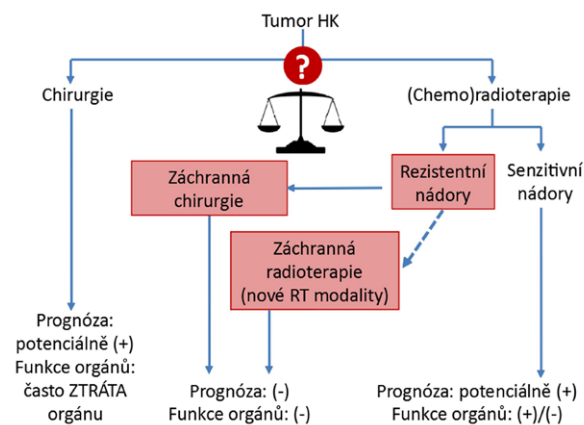
Konzervativní léčba s sebou navíc přináší po svém selhání u radiorezistentních typů nádorů i riziko persistence, či dokonce progresu nádoru. Toto riziko není u NHK rozhodně zanedbatelné, protože doposud neznáme spolehlivé a klinicky použitelné markery radiorezistence. Na ozáření přitom odpovídá jen asi 50 % nádorů HK. Toto nebezpečí potvrdily rovněž naše monocentrické studie retrospektivně hodnotící výsledky léčby (29–31). Následná záchranná chirurgie může být velmi náročná, při zásadní progresi onemocnění potom již i nemožná. Často vyžaduje komplikované plastické rekonstrukce, podmíněné nejen rozsahem zákroku, ale také sekundárním hojením v terénu radiačně změněných tkání. Asociované dehiscence ran a tvorba píštělí (referovaná až u 30 % pacientů) dále snižují kvalitu života po neúspěšné RT.

Roste tak tlak na včasné a přesné zhodnocení léčebné odpovědi a případně odhalení reziduálního či recidivujícího nádoru pomocí správně zvolených a spolehlivých zobrazovacích metod. Pro odlišení nádoru od léčbou indukovaných tkáňových změn lze velmi efektivně využít magnetické rezonance (MRI), vykazující senzitivitu > 90 % a specificitu > 80 %. Významný přínos slibuje nová difúzně vážená MRI (32). Ještě lepší výsledky poskytuje funkční zobrazování na bázi PET/CT, kombinující pozitronovou emisní tomografii (PET) s výpočetní tomografií (CT). Při této hybridní metodě se již blížíme 100% senzitivitě a > 90% negativní prediktivní hodnotě (pozitivní prediktivní hodnota dosahuje 100 %) (33).

## PRETERAPEUTICKÁ PREDIKCE ODPOVĚDI NA PRIMÁRNÍ LÉČBU

Předpokládalo se, že mutilaci pacienta následkem chirurgické excize nádoru se budeme moci vyhnout upřednostněním konzervativní léčby. RT a chemoterapie však představují obdobně agresivní léčebné metody doprovázené řadou závažných vedlejších efektů a významným rizikem terapeutického selhání a indukce sekundárních malignit. Uvážíme-li přibližně 50% necitlivost NHK k RT a nepovzbudivé vyhlídky záchranné chirurgie po neúspěšné RT, vynořuje se před námi dilema výběru primární terapie (obr. 1). Velmi zjednodušeně – rozhodneme-li se pro chirurgické řešení, s přibližně 50% pravděpodobností zbytečně a významným způsobem snížíme poterapeutickou kvalitu života pacien-

ta. Přikloníme-li se naopak k RT, léčba se stejně vysokým rizikem a významně zhoršenou budoucí prognózou vývoje onemocnění selže. Kterou modalitu tedy zvolit v 1. linii, chceme-li maximalizovat efekt léčby, a přitom nevíme, jak na ni nádor zareaguje? Bohužel doposud nemáme žádný biomarker preterapeutické predikce radiorezistence NHK, respektive senzitivity NHK k jednotlivým výše popsaným léčebným alternativám. Za této situace musejí být všechny terapeutické přístupy považovány v uvedeném smyslu slova za necilené.



Obr. 1 Dilema výběru nejúčinnější primární léčby

(Chemo)radioterapie je doposud aplikována převážně na základě klinických parametrů nádoru, preferencí pacienta a zkušeností chirurga. Prognóza a stratifikace léčby se tak řídí zejména stadiem pokročilosti nádoru definovaným klasifikací TNM, jež se dlouhodobě zakládá mj. na velikosti nádoru a infiltraci okolních struktur (34). Poznamenejme však, že souvislost mezi objemem nádoru v době stanovení diagnózy a úspěchem aplikované léčby (zde sekvenční RT a chemoterapie a poindukční terapie) se nepodařilo všeobecně prokázat; přežívání pacientů totiž obvykle korelovalo pouze s objemem nádoru po definitivní radioterapii (35).

Nově se do poslední, 8. aktualizace TNM klasifikace prosadily i další parametry: tloušťka nádoru dle hloubky invaze u nádorů dutiny ústní, extrakapsulární šíření metastáz mimo pouzdro lymfatických uzlin a u orofaryngeálních nádorů pak především status nádoru s ohledem na infekci HPV. Tento status, definovaný nejčastěji stále diskutabilní expresí proteinu p16 (36), můžeme považovat za jediný biologický parametr nádoru, který odráží jeho etiopatogenezi a který má natolik silný vliv na prognózu onemocnění, že si zasloužil zařazení do poslední verze klasifikace (37). Při jinak srovnatelném rozsahu nádoru přiřazujeme HPV-pozitivním nádorům hltnu nižší klasifikační stupeň než HPV-negativním a v brzké budoucnosti lze patrně očekávat i návrh deeskalace terapie u tohoto prognosticky příznivějšího typu NHK.

Přestože HPV status (protein p16) prokázal svůj zásadní význam jako důležitý prognostický faktor (36), stále postrádáme další spolehlivé biomarkery, které by umožnily preterapeutickou kategorizaci pacientů s ohledem na neefektivnější primární léčbu. V minulosti se za nepřímý prediktivní marker radiosenzitivity pokládala efektivita odpovědi nádoru na neoadjuvantní chemoterapii. Očekávaná korelace mezi chemosenzitivitou a radiosenzitivitou NHK se však bohužel

nepotvrdila (38). Ani měření metabolické aktivity jednotlivých ložisek nádorové tkáně pomocí PET, jakožto parametru úměrného riziku jejich recidivy, nepřineslo informaci umožňující dávkovou a intenzitní stratifikaci RT pro tato ložiska (nebo případně nádory) (39).

Přestože jsme značně pokročili v identifikaci typických změn NHK na úrovni genomu, transkriptomu, proteomu i metabolomu (40) a pronikáme stále hlouběji k molekulární podstatě příčin agresivního chování a špatné kurability NHK, prediktivní markery jejich odpovědi na jednotlivé léčebné modalilty se stále nedaří odhalit. Ačkoliv existují jisté dílčí úspěchy v naší honbě za biomarkery na úrovni výzkumu (viz níže), dosud nedošlo k jejich transformaci do podoby klinických studií, natož pak aplikací. Tento neúspěch jen zdůrazňuje komplexnost dějů zodpovědných za reakce nádorů *in vivo*.

## POTENCIÁLNÍ GENETICKÉ MARKERY RADIOSENZITIVITY/RADIOREZISTENCE NHK

Vzhledem k zaměření článku se zde omezíme pouze na markery vztahující se k radiosenzitivitě. Radiosenzitivitu a reálnou terapeutickou odpověď NHK navíc kromě vnitrobuněčných charakteristik nádorových buněk významně ovlivňují také komplexní, těžko vyhodnotitelné vlivy vzájemně se potencující nebo naopak negující. Jmenujme zejména faktory související se složením nádoru (např. zastoupení radiorezistentních nádorových kmenových buněk a heterogenita klonů) (41), hypoxii (42), vzájemné interakce mezi buňkami (6,43) a extracelulární nádorové mikroprostředí (6, 43). Vynořuje se tak zásadní otázka, do jaké míry analýzy radiosenzitivity nádoru provedené na buněčné úrovni (*in vitro*) predikují odpověď nádoru na terapii *in vivo*.

Jako zatím jediný významný ukazatel radiosenzitivity NHK se jeví jejich asociace s infekcí HPV (44). Klinicky je vyšší senzitivita HPV pozitivních nádorů k chemo- i radioterapii nesporná.

Dosud odhalené genetické změny sice ve specifických případech korelují s radiosenzitivitou/rezistencí nádorových buněk, či dokonce nádorů, jednotlivé defekty se však – až na výjimky – vzhledem ke klinické i genetické heterogenitě NHK vyskytují jen u malých frakcí pacientů, a těžko tedy mohou sloužit jako samostatně obecně uplatnitelné markery pro screening radiorezistence.

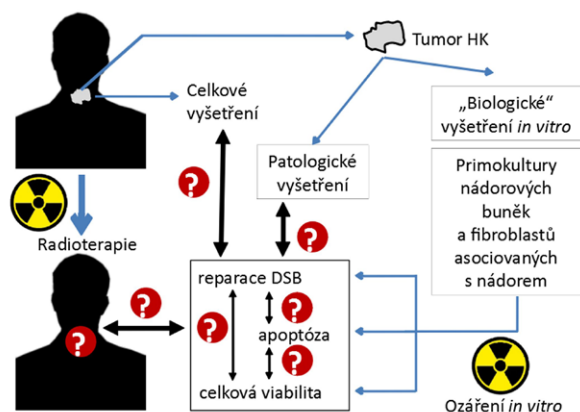
V našich studiích jsme testovali, zda lze jako marker radiosenzitivity/radiorezistence NHK využít monitorování kinetiky reparace dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) (obr. 2) (2), jež reprezentují nejzávažnější typ lézí DNA efektivně indukovaných IR (10), případně radiomimetiky (45). Efektivitu reparace jsme sledovali na buněčných primokulturách izolovaných z NHK jednotlivých pacientů a následně exponovaných záření gama *in vitro* (2). V různých časových intervalech (5 minut až 24 hodin) po ozáření (PO) jsme pomocí imunofluorescenční mikroskopie (metodika popsána v citaci 2) kvantifikovali počty reparačních ohnisek tvořených fosforylovaným histonem H2AX ( $\gamma$ H2AX) a proteinem 53BP1, jež jsou obecně považovány za markery DSB (46).

Tento postup se může zdát klinicky problematický, protože vyžaduje kultivaci buněk odebraných z nádoru (případně i separaci jednotlivých buněčných typů), jejich ozáření simulující účinky radioterapie a následně více či méně složité a několik dní trvající získávání a vyhodnocování dat. Přesto jsme se kvůli omezením end-point měření (tj. v jednom časovém bodě) a dosavadnímu neúspěchu s hledáním jednoduchých markerů vydali touto o poznání složitější cestou. Nelze vyloučit, že dlouhodobější a komplexnější *in vitro* analýzy kultivovaných a v různých časech po aplikaci terapeutických činidel fixovaných buněk, nebo dokonce kontinuální monitorování živých buněk budou nakonec i přes svou „nepraktičnost“ představovat perspektivní, ne-li jediný směr vedoucí k preterapeutické předpovědi léčebné odpovědi nádorů hlavy a krku. Obdobným vývojem si prošla například klinická mikrobiologie, kde byly metody spojené s kultivací mikroorganismů nejprve též zcela zatracovány.

Výhodou zde využitého přístupu je jednak v současnosti nejvyšší možná citlivost detekce DSB (3, 15, 46), jednak možnost v rámci jednoho experimentu a na omezeném množství dostupného biologického materiálu vyhodnotit integrovanou funkční dopad nejrůznějších mutací a případných dalších faktorů na reparaci DNA. Vzhledem k provedení studií na primokulturách složených z vlastních nádorových buněk a fibroblastů asociovaných s tumorem naše experimenty zahrnují také potenciální vlivy vzájemného působení mezi těmito buněčnými typy důležitými z hlediska vlastností nádoru (43, 47). Úspěšně proběhly též prvotní analýzy pro nádorové buňky a nádorové fibroblasty v separovaných kulturách. Zavedený systém tak reprezentuje mnohem obecněji využitelný model pro výzkum a monitorování odpovědi nádorů na léčbu (47), který lze kombinovat například s nastolením podmínek hypoxie různého stupně.

Vybrané parametry reparace DSB zjištěné výše popsaným způsobem jsme následně korelovali s viabilitou buněčných kultur po ozáření a aktivací apoptózy kvantifikovanou pomocí průtokové cytometrie (metodika popsána v citaci 48).

Právě vyhodnocované výsledky a naše předchozí studie (2, 49) naznačují existenci několika skupin NHK s různými typy odchylek od typické kinetiky a efektivity reparace DSB. Genetické změny asociované s pozorovanými odchylkami zatím neznáme, tyto odchylky však specificky poukazují na sníženou nebo zvýšenou viabilitu nádorových buněk po ozáření (nepublikovaná data). Zdá se, že jeden typ identifikovaných reparačních defektů se pojí s HPV pozitivitou NHK, zatímco zbývající typy postihují určité frakce HPV-negativních nádorů. K obdobným závěrům s ohledem na rozdíly reparace DSB mezi HPV-negativními a pozitivními NHK dospěli s využitím podobného experimentálního designu, avšak pouze na permanentních



**Obr. 2** Hledání biomarkerů radiorezistence NHK (2). Experimentální postup ukazující modré šipky. Neznámé korelace/souvělosti jsou vyznačeny otazníky.



nádorových liniích rovněž Nicksonová et al. (44). V této práci i v naší studii na nádorových primokulturách měly HPV-pozitivní buňky oproti těm negativním zvýšený počet ohnisek DSB perzistujících v buněčných jádrech ještě 24 hodin po ozáření. Zatímco Nicksonová et al. však u žádné z buněčných linií (HPV<sup>+</sup> ani HPV<sup>-</sup>) nezaznamenali nadpočetná ohniska DSB v době před ozářením, naše pozorování odhalila tento fenomén u významné frakce HPV<sup>+</sup> primokultur. Mechanismy radiosenzitivity HPV-pozitivních NHK tak patrně alespoň v některých případech zahrnují nejen pomalejší reparaci DSB, ale i existenci permanentní genomické nestability.

Na závěr budíž ještě zdůrazněno, že defekty v reparaci DSB se týkají jen určité frakce NHK. Značná část nádorů se tak chová radiosenzitivně, nebo naopak radiorezistentně, aniž by toto bylo doprovázeno odchylkami v efektivitě reparace DSB. Radiorezistence NHK je tak evidentně multifaktoriálním fenoménem.

## ZÁVĚR

NHK představují agresivní, geneticky komplexní a vůči léčbě rezistentní skupinu malignit. I přes zásadní rozvoj terapeutických možností za poslední dekády se však tento pokrok nedaří transformovat do očekávaného zlepšení léčebných výsledků. Z velké části lze tento nepovzbudivý stav připsat neznalosti příhodných biomarkerů, jež by umožňovaly racionální výběr optimální primární terapie NHK, respektive nejučinnější kombinace současně dostupných modalit (chirurgie, radioterapie, chemoterapie a imunoterapie nebo dalších biologických metod). Léčba je tak doposud aplikována necíleně, s významným rizikem jejího selhání, značného poklesu poléčebné kvality života a vysoké morbidit.

Výsledky našich studií ukazují na existenci několika skupin NHK charakterizovaných různými typy odchylek efektivit reparace dvouřetězcových zlomů DNA ve srovnání s normálními buňkami. Pozorované odchylky korelovaly se sníženou (nebo naopak zvýšenou) viabilitou nádorových buněk po ozáření. Předléčebná kvantifikace efektivit reparace DNA a přežívání ozářených buněk *in vitro*, provedená na buněčných primokulturách derivovaných z nádorů jednotlivých pacientů, by tak mohla odhalit neopominutelnou část radiosenzitivních a radiorezistentních nádorů. Většina NHK však bohužel nevykazuje signifikantní změny v reparaci DNA, respektive jejich dvouřetězcových zlomů.

Preterapeutické testy radiosenzitivity individuálních nádorů, jež by měly pokrývat celé spektrum mechanismů radiosenzitivity/radiorezistence NHK, tak budou muset zcela jistě zahrnovat kombinaci většího množství vhodných markerů (50), jež zatím čekají na své objevení. Podaří-li se však tyto markery v budoucnu identifikovat, bude vynaložené úsilí více než vyváženo terapeutickými benefity – možností racionálního výběru nejučinnější primární terapie a zároveň optimalizace ozařovacích schémat. Již dnes se nacházíme na cestě vedoucí k efektivnější a šetrnější personalizované medicíně založené na kvantifikovatelných parametrech (40). Potrvá jistě určitý čas, než se podaří nakumulovat dostatečné znalosti o velmi komplexní odpovědi NHK na různé léčebné modality a bezpečně je přenést do klinické praxe. Zdá se však, že již v brzké budoucnosti lze očekávat alespoň parciální zlepšení terapie NHK díky rozvoji robotické mikrochirurgie a významnému technologickému pokroku na poli radioterapie.

## Čestné prohlášení

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

## Poděkování

Výzkum uvedený v článku byl podpořen projekty GAČR 20-04109J, DAAD-19-03, GAČR 19-09212S, 17-08066Y, MZČR AZV 16-29835A a projekty Vládního zmocněnce a 3+3 pro spolupráci se SÚJV Dubna.

## Seznam zkratk

<b>BER</b>	bázová excizní reparace
<b>DSB</b>	dvouřetězcový zlom DNA
<b>HPV</b>	lidský papilomavirus
<b>HPV<sup>+</sup>, HPV<sup>-</sup></b>	nádory HPV-pozitivní a HPV-negativní
<b>HR</b>	homologní rekombinace
<b>NHK</b>	nádory hlavy a krku
<b>OPP</b>	léčebný protokol zachovávající orgán
<b>PDI</b>	povrchový receptor programované buněčné smrti 1
<b>PD-L1</b>	ligand receptoru PD1
<b>RBE</b>	radiobiologická efektivita
<b>RT</b>	radioterapie
<b>γH2AX</b>	histon H2AX fosforylovaný na serinu 139
<b>γH2AX/53BP1</b>	vzájemně kolokalizující jaderná ohniska histonu γH2AX a reparačního proteinu 53BP1 představují marker DSB

## Literatura

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M a kol. Webový portál SVOD: Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Masarykova univerzita, Brno 2005. Dostupné na: [www.svod.cz](http://www.svod.cz)
2. Falk M, Horáková Z, Svobodová M et al. γH2AX/53BP1 foci as a potential pre-treatment marker of HNSCC tumors radiosensitivity – preliminary methodological study and discussion. *EPJ D* 2017; 71: 241.
3. Ježková L, Zadneprianec M, Kulikova E et al. Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: A high-resolution microscopy analysis of γH2AX/53BP1 foci. *Nanoscale* 2018; 10: 1162–1179.
4. Štefančíková L, Lacombe S, Salado D et al. Effect of gadolinium-based nanoparticles on nuclear DNA damage and repair in glioblastoma tumor cells. *J Nanobiotechnology* 2016; 14: 63.
5. Michaelidesová A, Vachelová J, Puchalská M et al. Relative biological effectiveness in a proton spread-out Bragg peak formed by pencil beam scanning mode. *Australas Phys Eng Sci Med* 2017; 40: 359–368.
6. Alshafiq E, Begg K, Amelio I et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* 2019; 10: 540.
7. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N et al. Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med* 2018; 7: 241.
8. Rogers SN, Semple C, Babb M, Humphris G. Quality of life considerations in head and neck cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 2016; 130(S2): S49–S52.
9. Golušiški W. Functional organ preservation surgery in head and neck cancer: transoral robotic surgery and beyond. *Front Oncol* 2019; 9: 293.
10. Falk M, Falková I. Účinky ionizujícího záření na subcelulární a celulórní úrovni, mechanismy reparace DNA. In: Havránková R (ed.). *Klinická radiobiologie*. Grada, Praha, 2020: 67–102.
11. Ganci F, Sacconi A, Manciocco V et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma – possible molecular markers for local recurrence and new putative therapeutic strategies. In: Marcu LG (ed.). *Contemporary Issues in Head and Neck Cancer Management*. InTech, 2015.
12. Falk M, Hausmann M, Lukášová E et al. Determining omics spatiotemporal dimensions using exciting new nanoscopy techniques to assess complex cell responses to DNA damage: part A – radiomics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2014; 24: 205–223.
13. Falk M, Hausmann M, Lukášová E et al. Determining omics spatiotemporal dimensions using exciting new nanoscopy techniques to assess complex cell

responses to DNA damage: part B – structuromics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2014; 24: 225–247.

**14. Pagáčová E, Štefánčíková L, Schmidt-Kaler F et al.** Challenges and contradictions of metal nano-particle applications for radio-sensitivity enhancement in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 588.

**15. Hofer M, Falk M, Komůrková D et al.** Two new faces of amifostine: protector from DNA damage in normal cells and inhibitor of DNA repair in cancer cells. *J Med Chem* 2016; 59: 3003–3017.

**16. Hofer M, Hoferová Z, Falk M.** Pharmacological modulation of radiation damage. Does it exist a chance for other substances than hematopoietic growth factors and cytokines? *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1385.

**17. Hofer M, Hoferová Z, Falk M.** Brief story on prostaglandins, inhibitors of their synthesis, hematopoiesis, and acute radiation syndrome. *Molecules* 2019; 24: 4019.

**18. Meyer JL, Kavanagh BD, Purdy JA, Timmerman R (eds.).** IMRT, IGRT, SBRT – advances in the treatment planning and delivery of radiotherapy. *Front Radiat Ther Oncol* 2007; 40.

**19. Gao J, Hu J, Guan X et al.** Salvage carbon-ion radiation therapy for locoregionally recurrent head and neck malignancies. *Sci Rep* 2019; 9: 4259.

**20. Wang H, Jiang H, Van De Gucht M, De Ridder M.** Hypoxic radioresistance: can ROS be the key to overcome it? *Cancers (Basel)* 2019; 11: 112.

**21. Brenner DJ.** Proton radiotherapy: the good, the bad, and the uncertain. *Oncology (Williston Park)* 2012; 26: 168241.

**22. Chen YH, Lu H, Chien CY et al.** Efficacy of different chemotherapy regimens in patients with locally advanced synchronous esophageal and head/neck squamous cell carcinoma receiving curative concurrent chemoradiotherapy. *J Clin Med* 2020; 9: 197.

**23. Bossi P, Resteghini C, Paielli N et al.** Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(45): 74362–74379.

**24. Forster MD, Devlin MJ.** Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. *Front Oncol* 2018; 8: 310.

**25. Dandekar M, D'Cruz A.** Organ preservation strategies: review of literature and their applicability in developing nations. *South Asian J Cancer* 2014; 3: 147–150.

**26. Trivedi NP, Swaminathan DK, Thankappan K et al.** Comparison of quality of life in advanced laryngeal cancer patients after concurrent chemoradiotherapy vs total laryngectomy. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 139: 702–707.

**27. Hutcheson KA, Lewin JS.** Functional outcomes after chemoradiotherapy of laryngeal and pharyngeal cancers. *Curr Oncol Rep.* 2012; 14: 158–165.

**28. Tang Z-X, Gong J-L, Wang Y-H et al.** Efficacy comparison between primary total laryngectomy and nonsurgical organ-preservation strategies in treatment of advanced stage laryngeal cancer: a meta-analysis. *Medicine* 2018; 97: e10625.

**29. Binková H, Horáková Z, Tóthová E, Kostřica R.** Organ preservation protocol in oropharyngeal cancer. *Otorinolaryngol Foniatr* 2010; 59: 114–121.

**30. Horáková Z, Binková H, Tóthová E.** Results of surgical and nonsurgical treatment in patients with laryngeal cancer. *Otorinolaryngol Foniatr* 2010; 59: 107–113.

**31. Binková H, Šmardová J, Krpenský A, Kšicová K.** Prognóza nádorů hlavy a krku se zaměřením na nádorový supresor p53. *Otorinolaryngologie a foniatrie* 2004; 53: 189–195.

**32. Jajodia A, Aggarwal D, Chaturvedi AK et al.** Value of diffusion MR imaging in differentiation of recurrent head and neck malignancies from post treatment changes. *Oral Oncol* 2019; 96: 89–96.

**33. de Ridder M, Gouw ZAR, Navran A et al.** FDG-PET/CT improves detection of residual disease and reduces the need for examination under anaesthesia in oropharyngeal cancer patients treated with (chemo-)radiation. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2019; 276: 1447–1455.

**34. Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C et al.** TNM: klasifikace zhoubných novotvarů. *Grada, Praha, 2020.*

**35. Bohlen M, Busch C-J, Sehner S et al.** Tumor volume as a predictive parameter in the sequential therapy (induction chemotherapy) of head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2019; 276: 1183–1189.

**36. Gurin D, Slávik M, Shatokhina T et al.** Současný pohled na HPV asociované karcinomy orofaryngu a roli p16 jako surogátneho markeru high-risk HPV. *Klinická onkologie* 2019; 32: 252–260.

**37. Tumban EA.** Current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses* 2019; 11: 922.

**38. Wolf GT.** Options for preserving the larynx in patients with advanced laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Ear Nose Throat J* 2001; 80: 897–901.

**39. Chaput A, Calais J, Robin P et al.** Correlation between fluorodeoxyglucose hotspots on pretreatment positron emission tomography/CT and preferential sites of local relapse after chemoradiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2017; 39: 1155–1165.

**40. Polverini PJ, Lingen MW.** A history of innovations in the diagnosis and treatment of oral and head and neck cancer. *J Dent Res* 2019; 98: 489–497.

**41. Schulz A, Meyer F, Dubrovská A, Borgmann K.** Cancer stem cells and radioresistance: DNA repair and beyond. *Cancers* 2019; 11: 862.

**42. You GR, Cheng AJ, Lee LY et al.** Prognostic signature associated with radioresistance in head and neck cancer via transcriptomic and bioinformatic analyses. *BMC Cancer* 2019; 19: 64.

**43. Raudenská M, Svobodová M, Gumulec J et al.** Význam fibroblastů asociovaných s nádorem při patogenezi karcinomů v oblasti hlavy a krku. *Klinická onkologie* 2020; 33: 39–48.

**44. Nickson CM, Moori P, Carter RJ et al.** Misregulation of DNA damage repair pathways in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma contributes to cellular radiosensitivity. *Oncotarget* 2017; 8: 29963–29975.

**45. Rittich B, Španová A, Falk M et al.** Cleavage of double stranded plasmid DNA by lanthanide complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 800: 169–173.

**46. Falk M, Lukášová E, Kozubek S.** Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res* 2010; 704: 88–100.

**47. Svobodová M, Raudenská M, Gumulec J et al.** Establishment of oral squamous cell carcinoma cell line and magnetic bead-based isolation and characterization of its CD90/ CD44 subpopulations. *Oncotarget* 2017; 8: 66254–66269.

**48. Falk M, Falková I, Kopečná O et al.** Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Sci Rep* 2018; 8: 14694.

**49. Bobková E, Depes D, Lee JH et al.** Recruitment of 53BP1 proteins for DNA repair and persistence of repair clusters differ for cell types as detected by single molecule localization microscopy. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3713.

**50. Foy J-P, Bazire L, Ortiz-Cuaran S et al.** A 13-gene expression-based radioresistance score highlights the heterogeneity in the response to radiation therapy across HPV-negative HNSCC molecular subtypes. *BMC Medicine* 2017; 15: 165.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**RNDr. Martin Falk, Ph.D.**

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.

Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 728 084 060

e-mail: falk@ibp.cz

# Trendy ve farmakologické stimulaci regenerace ionizujícím zářením poškozeného savčího organismu

Michal Hofer

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

Čas. Léč. čes. 2020; 159: 275–280

## SOUHRN

Jako potenciální modulatory radiačního poškození byla testována řada různých substancí s rozdílnými mechanismy účinku, a to jak v pokusech na zvířatech, tak v některých případech i v klinických studiích. Jejich účinky byly vyhodnocovány jak po podání preiradiačním (jako radioprotektiva), tak postiradiačním (v léčebném modu – radiomitigátory). Zejména cytokiny a krve tvorné růstové faktory již byly použity k léčení obětí radiačních nehod. Dva léky odvozené od faktoru stimulujícího kolonie granulocytů již byly schváleny pro léčbu akutního radiačního syndromu. Existuje nicméně široké spektrum dalších substancí, zahrnující různé imunomodulatory, prostaglandiny, inhibitory syntézy prostaglandinů, agonisty adenosinových receptorů, rostlinné extrakty, flavonoidy, vitaminy a další, jež byly s uvedeným účelem rovněž studovány. Tyto látky s různými mechanismy účinku jsou často účinné, relativně netoxické a levné. Tento přehledový článek se zaměřuje převážně na výsledky experimentů, které poukazují na potenciál netradičních či nových léků stimulujících regeneraci ionizujícím zářením poškozeného organismu, jež by se mohly stát součástí terapeutických procedur aplikovatelných pacientům s akutním radiačním syndromem.

## KLÍČOVÁ SLOVA

akutní radiační syndrom, radioprotektiva, radiomitigátory, krvetvorba

## SUMMARY

### Hofer M. Trends in pharmacological stimulation of regeneration of ionizing radiation-damaged mammalian organism

Many different substances with varying mechanisms of effects have been tested both in animal experiments, as well as verified in clinical studies as potential radioprotectors and mitigators of radiation damage. Among them, especially cytokines and hematopoietic growth factors have been used also for treatment of radiation accident victims. Two granulocyte colony-stimulating factor-based radiation countermeasures have been approved already for the treatment of the acute radiation syndrome. Nevertheless, a wide spectrum of other substances comprising, e.g., various immunomodulators, prostaglandins, inhibitors of prostaglandin synthesis, agonists of adenosine receptors, herbal extracts, flavonoids, vitamins, and others, has also been studied. These agents with various mechanisms of their influences on an organism are often effective, relatively non-toxic, and cheap. This review concentrates predominantly on the results of experiments which show the potential of untraditional or new radiation countermeasures to become a part of therapeutic procedures applicable in patients with the acute radiation syndrome.

## KEYWORDS

acute radiation syndrome, radioprotectors, radiomitigators, hematopoiesis

## AKUTNÍ RADIACNÍ SYNDROM A JEHO TERAPIE POUŽITÍM CYTOKINŮ A KRVETVORNÝCH RŮSTOVÝCH FAKTORŮ

Radiační nehody, stejně jako případné teroristické útoky využívající zdroje ionizujícího záření, mohou vyústit ve vážné zdravotní poškození, jehož manifestace jsou označovány jako akutní radiační syndrom (ARS). V závislosti na absorbované dávce záření se ARS projevuje v různých orgánových systémech jako jednotlivé orgánové syndromy, a to syndrom hematopoetický, gastrointestinální, kutánní a neurovaskulární. Není divu, že z tohoto důvodu obdržela témata „radioprotektiva pro preiradiační použití“ a „léčebná agens pro postiradiační aplikaci“ (radiomitigátory) nejvyšší prioritu mezi výzkumnými oblastmi jako protipatření vůči nukleárním hrozbám. I když úsilí zaměřené na vývoj efektivních farmakologických prostředků určených k protekci a léčbě ARS bylo iniciováno již před více než 50 lety, teprve velmi nedávno byly dva léky, a to Neupogen a Neulasta,

schváleny americkým Úřadem pro kontrolu léčiv a potravin (FDA) jako radiomitigátory.

Krvetvorné růstové faktory jsou proteiny, které regulují proliferaci a diferenciaci erytrocytů a leukocytů. Cytokiny jsou proteiny s nízkou molekulární hmotností, jež vyvíjejí stimulační nebo inhibiční vliv na proliferaci, diferenciaci a funkci buněk imunitního systému. Jak Neupogen, tak Neulasta jsou léky odvozené od faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF), vytvořené za účelem zlepšení farmakokinetických vlastností G-CSF (1). G-CSF patří ke krvetvorným růstovým faktorům, jež byly spolu s cytokiny intenzivně testovány a vyhodnocovány z hlediska jejich schopnosti modulovat akutní radiační poškození (2, 3) a byly použity i pro léčbu obětí radiačních nehod (4).

Srovnatelná pozornost byla věnována také substancím nepatřícím mezi krvetvorné růstové faktory nebo cytokiny a jejich deriváty. Jak bylo ukázáno zejména ve studiích na zvířatech, existuje široké spektrum těchto substancí, jež jsou často účinné v modulování ARS, jakož i relativně netoxické a levné.



V následujícím textu sumarizujeme důležité informace o těchto látkách a zdůrazňujeme jejich potenciál z hlediska zařazení do léčebných schémat u pacientů s ARS.

### AMIFOSTIN

Amifostin (WR-2721) je nejvíce studovaným klasickým chemickým radioprotektivem z důvodu své vysoké radioprotektivní účinnosti (5). Přes velké množství studií však nebyl schválen pro léčbu ARS u lidí, a to vzhledem k nežádoucím vedlejším účinkům. Své použití nakonec našel v radiační onkologii, tento aspekt využití amifostinu je ovšem mimo rámec tohoto článku. Určitá pozornost je amifostinu stále věnována v experimentu, např. podávání malých dávek amifostinu spolu s  $\gamma$ -tokotrienolem. Kombinované přístupy by tak mohly přece jen umožnit využití tohoto radioprotektiva u pacientů s ARS.

### IMUNOMODULÁTORY

Imunoterapie je definována jako léčba nemoci indukci, posílením nebo potlačením imunitní odpovědi. S cílem modulovat ARS bylo testováno množství imunomodulátorů indukujících či posilujících imunitní odpověď – tyto imunomodulátory můžeme zařadit do několika skupin.

#### BETA-GLUKAN

Glukany, a zejména  $\beta$ -glukan, patří k nejstudovanějším imunomodulátorům, a to jak obecně, tak na poli farmakologické modulace radiačního poškození.  $\beta$ -glukany jsou známy jako stavební prvky buněčné stěny bakterií, kvasinek, hub a rostlin. Dřívější hematologické studie odhalily, že  $\beta$ -glukan stimuluje proliferaci neozářených myších pluripotentních kmenových buněk, jakož i buněk několika krvetvorných progenitorových buněčných linií (granulocytových, granulocytových/makrofágových, makrofágových a erytrocytových). Několik studií provedených zejména skupinami Patchenové a MacVittieho (Bethesda, USA) a Hofera a Pospíšila (Brno) ukázalo, že krvetvorbu stimující účinky  $\beta$ -glukanu mohou být úspěšně využity v léčbě hematopoetického ARS u myši; důležitým rysem využití  $\beta$ -glukanu u ozářených pokusných myši byla možnost podat s prospěchem tuto látku jak před ozářením, tak po něm, tedy jako radioprotektivum i jako radiomitigátor (6, 7).

Použití  $\beta$ -glukanu v kombinovaném léčebném režimu se rovněž ukázalo být úspěšným. Vzájemně se potencující efekty  $\beta$ -glukanu byly pozorovány při jeho kombinovaném podání s chemickými radioprotektivy cystaminem nebo WR-2721. Třílčková kombinovaná léčba  $\beta$ -glukanem, WR-2721 a selenem vykazala rovněž pozitivní výsledky.  $\beta$ -glukan byl úspěšně kombinován také s G-CSF nebo s inhibítorem cyklooxygenáz diklofenakem. Řada podrobností týkajících se pokusů shrnutých v tomto odstavci, zahrnujících také informaci o zlepšeném postiradiačním přežívání letálně ozářených experimentálních zvířat, jimž byl podán  $\beta$ -glukan, v některých z těchto studií, může být nalezena v detailním samostatném přehledu (7).

Pozdější studie potvrdily schopnost  $\beta$ -glukanu stimulovat krvetvorbu a zlepšovat přežívání pokusných zvířat exponovaných ionizujícím zářením a přidaly nové poznatky. V roce 2006 Cramer et al. odhalili úlohu komplementu ve úpravě krvetvorby po radiačním poškození. V roce 2011 zdůraznil Salama možnost podat ozářeným potkanům  $\beta$ -glukan perorálně. Pillai a Deviová poukázali ve své důkladné studii z roku 2013, v níž

byly kromě postiradiačního přežívání a krvetvorby hodnoceny také biochemické parametry, na nepřítomnost toxicity  $\beta$ -glukanu. Rondanelliová et al. položili ve svém přehledu z roku 2009 důraz na možné využití  $\beta$ -glukanu jak v profylaxi, tak léčbě pacientů s ARS vzniklým v souvislosti s jadernou havárií.

#### ANDROSTENDIOL (5-AED)

5-androstendiol (5-AED) je přirozený steroidní hormon kůry nadledvin. Bylo zjištěno, že AED stimuluje přirozený imunitní systém, a proto se počítán mezi imunomodulátory. První zpráva o stimulaci krvetvorného a imunitního systému u myši exponovaných zářením  $\gamma$  po aplikaci AED je z roku 2000; jak preiradiační, tak postiradiační podání 5-AED vedlo ke stimulaci myelopoézy a posílení odolnosti vůči infekci u ozářených zvířat (8). V následující studii byla pozorována stimulace buněk imunitního systému (monocytů, přirozených zabíječů, eozinofilů a bazofilů) po aplikaci 5-AED. Další experimenty odhalily, že 5-AED je účinný při subkutánním i perorálním podání a že radioprotektivní aktivita tohoto léku je doprovázena nízkou toxicitou.

Za jeden z mechanismů krvetvorbu stimujících účinků 5-AED byla označena amplifikovaná produkce G-CSF, a to v případě podání léku jak před ozářením, tak po něm. Srovnávací experimenty ukázaly, že radioprotektivní účinnost 5-AED je nejvyšší z 10 testovaných steroidních hormonů. Následně byly práce na myších doplněny o studie na primátech: byla nalezena multiliniová stimulace krvetvorby u ozářených makaků (8); tato informace byla potvrzena i za situace, kdy ozáření makakové neobdrželi kromě 5-AED žádnou další klinickou podporu. Jako jeden z mechanismů zvýšeného přežívání primátů exponovaných ionizujícím zářením byla nalezena indukce nukleárního faktoru  $\kappa$ B v přítomnosti 5-AED.

Pro další objasnění mechanismů krvetvorbu stimujících účinků 5-AED byla vyhodnocena exprese řady krvetvorných růstových faktorů a cytokinů u myši po podání 5-AED. Zvýšená exprese po injekci 5-AED byla zaznamenána pro faktor stimující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a interleukiny IL-2, IL-3, IL-6 a IL-10 ve slezině, jakož i pro G-CSF, GM-CSF, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), trombopoetin (TPO) a IL-2, IL-3, IL-6, IL-10 a IL-12 v kostní dřeni. Významná role G-CSF ve zprostředkování efektu 5-AED byla potvrzena studií, v níž byla protilátka proti G-CSF využita k potlačení radioprotektivní účinnosti 5-AED. Synergické působení 5-AED a TPO bylo popsáno u myši se zářením indukovaným hematopoetickým ARS; v této práci bylo pozorováno dvacetinásobné zvýšení počtu život zachraňujících krátkodobě repopulujících buněk kostní dřene u myši léčených kombinací 5-AED + TPO.

Vícenásobná aplikace 5-AED, zahrnující 1 preiradiační podání a 2 injekce týdně po dobu 3 týdnů po ozáření, byla také ověřena jako velmi úspěšné schéma při léčbě radiační vyvolaného útlumu kostní dřene (54); autoři konstatovali, že „5-AED může být významným terapeutickým kandidátem pro léčbu ARS, a to zejména ve scénáři masového zasažení obyvatelstva, kdy je důležitá rychlá a ekonomická intervence“.

5-AED se nyní nachází ve stadiu pokročilého vývoje a získal status US FDA IND (*investigational new drug*). Stickney et al. již publikovali výsledky prvních pozitivních klinických pozorování týkajících se bezpečnosti, tolerance a hematologické aktivity 5-AED u zdravých dospělých (9).

#### DALŠÍ IMUNOMODULÁTORY

Pravděpodobně nejstarším imunomodulátorem studovaným jako radioprotektivum je endotoxin – bakteriální

lipopolysacharid. Již v roce 1958 byla publikována práce informující o poklesu mortality u myši ozářených paprsky X po podání endotoxinu (10). Důležitým projevem radioprotektivního účinku endotoxinu byl nárůst počtů slezinných koloniformních jednotek, jež byly v té době využívány jako ukazatel počtu krvetvorných kmenových buněk. Následovala bohatá publikační aktivita na téma radioprotektivních vlastností endotoxinu. Nicméně vzhledem k závažným vedlejším účinkům nebyl zařazen do uvažovaných léčebných schémat jako látka využitelná u ozářených lidí. Naopak, redukce endotoxemie se stala požadovaným efektem substancí testovaných na léčbu ARS, např. antibiotik.

Broncho-Vaxom je bakteriální lyzát, který významně zvyšuje postiradiční přežití myši několika kmenů (11). S úspěchem byl testován při kombinovaném podání s chemickým radioprotektivem WR-2721 (amifostin). V pozdější studii byl Broncho-Vaxom podáván potkanům v opakovaných injekcích zahrnujících jednu preiradiační dávku a opakované postiradiační dávky v průběhu 3týdenního období frakcionovaného ozařování; autoři informovali o posílení antioxidantního systému a zvýšení koncentrace sérového gama globulinu.

TDM (trehalóza-dimykolát) je glykolipidová molekula, která se nachází v buněčné stěně bakterie *Mycobacterium tuberculosis*. TDM zvyšuje rezistenci k infekci u ozářených neutropenických myši (12). Syntetický derivát TDM byl úspěšně testován u myši se sepsí následující po ozáření a indukovaném traumatu.

Zajímavou radioprotektivní kombinací je kombinace oligoelementů selenu, zinku a manganu podaných současně s hadím jedem druhu *Lachesis muta*. Tato kombinace je autory označována jako imunomodulátor a byla testována jak u myši (13), tak potkanů (14).

Peptidoglykan je polymer bakteriálních buněčných stěn, který se skládá z cukrů a aminokyselin. V nedávné studii bylo pozorováno zlepšení přežívání a zmírnění intestinálního a dřeňového poškození u ozářených myši léčených po ozáření (15). Tyto parametry byly popsány jako synergicky posílené, pokud bylo myším podáno chemické radioprotektivum WR-2721 před ozářením a peptidoglykan po ozáření. Vedle radioprotekce krvetvorných a gastrointestinálních tkání tato kombinace permanentně ochránila tkáň submandibulární mandle před zářením indukovaným poškozením.

Další recentní studie se zabývaly polysacharidem ze *Sipunculus nudus*, nesegmentovaného mořského červa, který se skládá z manózy, glukózy, arabinózy a fukózy. Podání před ozářením významně zvýšilo přežívání ozářených myši (16). Při testování u psů vyvolal polysacharid ze *Sipunculus nudus* zlepšení krevního obrazu a krvetvornou aktivitu v kostní dřeni. V experimentu na záření poškozených myšičích byly nalezeny také synergické efekty při společném podání tohoto polysacharidu, WR-2721, rekombinantního lidského interleukinu 11 (rhIL-11) a rekombinantního lidského G-CSF (rhG-CSF). Mezi další zdůrazňované pozitivní vlastnosti polysacharidu ze *Sipunculus nudus* patří významné účinky antioxidantní a jeho účinnost při perorálním podání.

## PROSTAGLANDINY A INHIBITORY PRODUKCE PROSTAGLANDINŮ

Zdánlivě překvapivě byly jak prostaglandiny, zejména  $E_2$  ( $PGE_2$ ), tak inhibitory produkce prostaglandinů (inhibitory COX) úspěšně testovány z hlediska schopnosti podporovat

zotavení pokusných zvířat z ARS. Proto jsou obě skupiny látek pojednány ve společné kapitole.

Několik studií z 80. let 20. století ukázalo radioprotektivní účinky prostaglandinů, zejména  $PGE_2$ , a syntetického derivátu prostaglandinu  $E_1$ , misoprostolu, na gastrointestinální trakt (GIT) (17). Tyto efekty mohly být připsány následně potvrzenému ochrannému účinku prostaglandinů na gastrointestinální tkáň. Avšak přibližně ve stejné době se objevily také články informující o tom, že  $PGE_2$  stimuluje a chrání erytroidní a multilineární krvetvorné progenitorové buňky (18). Navíc byly publikovány práce referující o prostaglandiny indukované inhibici myelopoézy *in vivo*. Tyto výsledky pomohly pochopit účinky inhibitorů produkce prostaglandinů (inhibitorů COX, nesteroidních protizánětlivých léků) u ozářených experimentálních zvířat. V časných studiích byly testovány efekty neselektivních inhibitorů COX, inhibujících jak cyklooxygenázu 1 (COX-1), exprimovanou konstitutivně v řadě tkání zahrnující i gastrointestinální trakt, tak cyklooxygenázu 2 (COX-2), která je inducibilní a odpovědná za produkci prostaglandinů při zánětlivých stavech. U subletálně ozářených pokusných zvířat byly efekty neselektivních inhibitorů COX pozorovány po jejich pre- i postiradiačním podání jakož i při podání v průběhu frakcionovaného ozařovacího režimu. Použití neselektivních inhibitorů COX bylo spojeno s poměrně vysokou incidencí a intenzitou nežádoucích vedlejších efektů, zejména na gastrointestinální tkáň, a se zhoršeným přežíváním letálně ozářených zvířat. Detailní účinky neselektivních inhibitorů COX u ozářených zvířat jsou popsány v přehledovém článku (19).

Pozdější práce na tomto tématu používaly selektivní inhibitor COX-2 meloxicam, při jehož podání je zachována aktivita COX-1 a protektivní působení prostaglandinů v GIT. Podání meloxicamu ozářeným myším vedlo nejen k podpoře krvetvorby (20), ale i ke zlepšení postiradiačního přežívání, zejména byl-li meloxicam podán v jediné dávce těsně (1 hod) po letálním ozáření (21). Tím byla potvrzena výhodnost použití inhibitorů COX-2 v terapeutickém postiradiačním léčebném schématu.

Nedávnými studiemi Hoggatt et al. znovu otevřeli problematiku účinků hematologických a modifikujících radiací indukované poškození na základě farmakologických intervencí do metabolismu  $PGE_2$ . Konstatovali, že  $PGE_2$  podporuje usídlení, přežívání a metabolismus krvetvorných kmenových buněk. Berouce do úvahy dostupné vědomosti o postiradiační signalizaci prostřednictvím  $PGE_2$  jakož i vlastní pokusné výsledky sumarizovali autoři své poznatky tak, že zvýšeného přežívání a stimulace krvetvorby může být u ozářených myši dosaženo podáním jak  $PGE_2$ , tak také selektivního inhibitoru COX-2 meloxicamu, ale účinnost těchto léčebných modalit závisí na načasování jejich aplikace (22).

## ROSTLINNÉ EXTRAKTY

Rostlinné extrakty testované z hlediska schopnosti modulovat radiaci poškození savčího organismu zahrnují preparáty z mnoha rostlin. Jejich působení je komplexní a zahrnuje antiemetickou, protizánětlivou, antimikrobiální a antioxidantní aktivitu, stimulaci krvetvorby, imunostimulační a chelatační aktivitu jakož i schopnost urychlovat hojení ran. V přehledovém článku z roku 2005 (23) jsou shrnuty účinky extraktů z řady rostlin na proces úpravy radiací poškození.

Rostlinné extrakty jsou obecně pokládány za úspěšné při léčbě ARS a jejich výzkum pokračuje dodnes. Například bylo

zjištěno, že extrakt z *Cordyceps sinensis* chrání jak proti hematopoetickému, tak gastrointestinálnímu zářením indukovanému poškození. Preiradiační podání extraktu z *Podophyllum hexandrum* vykazovalo radioprotektivní účinnost, která byla dále posílena postiradiační aplikací extraktu z *Picrorhiza kurroa*. Bylo také zjištěno, že podání semipurifikované frakce z *Podophyllum hexandrum*, REC-2001, vedlo k významnému prodloužení přežívání letálně ozářených myší. Stimulační účinky na imunitní a krvetvorné tkáně byly zaznamenány u ozářených myší po podání extraktu z *Vernonia cinerea*. V roce 2016 publikovali Shakeri-Boroujeni et al. výsledky studie, v níž vykázal významný radioprotektivní efekt rostlinný extrakt z *Rosa canina*, *Urtica dioica* a *Tanacetum vulgare*.

### ANTIOXIDANTY

V této kapitole bude pojednáno poměrně široké spektrum substancí, většinou přirozeného původu. Jejich společným rysem je jejich schopnost chránit před radiačním poškozením nebo toto poškození léčit vychytáváním zářením indukovaných volných radikálů. Tyto přírodní antioxidanty jsou obecně méně efektivními radioprotektivy ve srovnání s amidofostinem a dalšími klasickými chemickými radioprotektivy, ale zároveň jsou většinou mnohem méně toxické (24).

### SKUPINA VITAMINU E

Vitamin E představuje několik sloučenin, které dělíme do 2 podskupin nazývaných tokoferoly a tokotrienoly; obě fungují jako důležité antioxidanty. Liší se chemicky: tokoferoly obsahují tři dvojně vazby ve svém bočním řetězci, zatímco tokoferoly ne. Tokotrienoly mají vyšší antioxidační aktivitu.

Schopnost modulovat ARS byla testována u 3 tokoferolů;  $\alpha$ -tokoferol zlepšoval přežívání a potlačoval symptomy ARS při podání jak před ozářením, tak po něm. Royová et al. přičkly léčebné účinky  $\alpha$ -tokoferolu podpoře buňkami zprostředkované imunity. Postiradiační aplikace monoglukosidu  $\alpha$ -tokoferolu, derivátu  $\alpha$ -tokoferolu, vedla jak ke zvýšenému přežívání myší, tak ke stimulaci krvetvorby. Sukcinát  $\alpha$ -tokoferolu byl odhalen jako stimulant přežívání ozářených myší, včetně těch, které byly vystaveny radiačním dávkám vyvolávajícím gastrointestinální ARS. Singh et al. zjistili, že jeho radioprotektivní účinnost je zprostředkovávána indukci produkce G-CSF.

Také u 2 tokotrienolů byly posuzovány schopnosti modulovat ARS.  $\delta$ -tokotrienol vyniká vysokou antioxidační aktivitou, chrání krvetvorbu a zvyšuje přežívání ozářených myší. V posledních letech byla zvýšená pozornost věnována zejména  $\gamma$ -tokotrienolu, dalšímu derivátu vitaminu E s vysokou antioxidační kapacitou. Z perspektivy jeho případného využití v terapii ARS je zdůrazňována výrazná účinnost stimulační krvetvorbu a zlepšující postiradiační přežívání. Kulkarniová et al. zdůrazňují důležitou úlohu G-CSF při zprostředkovávání radioprotektivních účinků  $\gamma$ -tokotrienolu na základě pokusu využívajícího podání protilátek proti G-CSF. Nedávno byla radioprotektivní účinnost  $\gamma$ -tokotrienolu potvrzena rovněž u primátů.

Řadu dalších detailů a literárních citací týkajících se radiobiologických vlastností tokoferolů a tokotrienolů můžeme najít v přehledovém článku z roku 2013 (25). Recentní přehled byl věnován  $\gamma$ -tokotrienolu (26). Autoři konstatují, že pokud jde o postiradiační regeneraci krvetvorby, v modelu na primátech je 1 dávka  $\gamma$ -tokotrienolu bez další podpůrné léčby ekvivalentní vícenásobným dávkám léků Neupogen

a Neulasta doprovázeným plnou podpůrnou léčbou zahrnující i krevní deriváty.  $\gamma$ -tokotrienol byl Singhem et al. zařazen mezi „slibné látky v pokročilém stadiu vývoje“.

### SLOUČENINY OBSAHUJÍCÍ SELEN

Z hlediska možných radioprotektivních účinků bylo studováno několik sloučení selenu, z toho nejintenzivněji seleničitan sodný a selenomethionin, přirozeně se vyskytující derivát selenu, který můžeme najít v obilných zrnech a luštěninách. Významný přínos pro přežívání ozářených myší zjistili Weiss et al. (27) po podání selenomethioninu 24 hodin nebo 1 hodinu před ozářením a 15 minut po něm.

Pravděpodobným mechanismem účinku selenomethioninu jakožto radiomitigátoru (látky fungující v postiradiačním terapeutickém režimu) je posílení funkcí imunokompetentních buněk. Existuje poměrně bohatá literatura týkající se schopnosti selenu modulovat radiační poškození, kde je možné najít řadu dalších podrobností. Nedávno publikované poznatky ukazují, že selen chrání proti radiačnímu poškození intestinální tkáně, a naznačují možnost využít sloučeniny selenu v léčbě gastrointestinálního ARS.

### DALŠÍ ANTIOXIDANTY

Na schopnost modulovat ARS bylo testována i řada dalších antioxidantů. Společnou charakteristikou zde uvedených je nízká toxicita a možnost perorálního podávání.

Aplikace vitaminu C (kyseliny askorbové) je spojená se zlepšením stavu kostní dřevě a zvýšeným přežíváním ozářených myší. Také ozářené myši, jimž byl perorálně podán vitamin A nebo jeho prekurzor,  $\beta$ -karoten, vykazovaly redukovanou morbiditu i mortalitu. Nedávno byly publikovány nálezy protektivních účinků kyseliny  $\alpha$ -lipoové na radiační poškozené myši tenké střeva, které naznačují možnost použít tuto látku v terapii gastrointestinálního ARS.

Zajímavým příspěvkem k tématu kombinovaného farmakoterapeutického přístupu k modulaci radiačního poškození byla zjištění Wambiho et al., kteří testovali efektivnost potravinového doplňku skládajícího se z L-selenomethioninu, vitaminu C, sukcinátu vitaminu E, kyseliny  $\alpha$ -lipoové a N-acetylcysteinu. Tento doplněk stravy vykázal pozitivní vliv na krvetvorbu a přežívání ozářených myší při podání před ozářením paprsky X či po něm nebo byl-li aplikován po ozáření protony.

Antioxidační potravinové doplňky jsou podrobněji rozbrány v samostatném přehledu (28).

### DALŠÍ SLOUČENINY TESTOVANÉ JAKO RADIOPROTEKTIVA ČI RADIOMITIGÁTORY GENISTEIN

Genistein byl izolován ze sóji a jedná se o inhibitor specifické tyrosinkinázy. Jeho účinky v ozářeném organismu jsou pravděpodobně komplexní a zahrnují antioxidační a krvetvorbu modulující efekty.

V práci z roku 2003 konstatovali Landauer et al., že genistein podaný v 1 subkutánní injekci významně zvyšuje přežívání myší. Byl-li aplikován 1x denně po dobu 7 dnů předcházejících celotělovému ozáření, bylo zjištěno komplexní posílení širokého spektra parametrů kostní dřevě a periferní krve. Krvetvorbu stimulační účinky genisteinu byly potvrzeny také po jeho podání v jedné preiradiační dávce. Detaily o způsobech, jimiž genistein modifikuje radiační poškození, jsou shrnuty v samostatném přehledovém článku (29).



Genistein podaný preiradiačně byl rovněž úspěšně kombinován s blokátorem angiotenzin konvertujícího enzymu kaptoprilem. Příznivý účinek byl prokázán stimulovanou krvetvorbou a zvýšeným přežíváním myši, kterým byla kombinace podávána perorálně v pitné vodě 1-30 dnů po ozáření. Zatímco celotělová dávka 8,25 Gy vedla u neléčených myši k nulovému přežívání, podávání samostatného genisteinu zvýšilo přežívání na 72 %, samostatného kaptoprilu na 55 % a kombinace genistein + kaptopril na 95 %. Genisteinu byl udělen status US FDA IND.

### AGONISTÉ ADENOSINOVÝCH RECEPTORŮ

V sérii studií na ozářených myších byla použita kombinace dipyridamolu (DP), léku inhibujícího vstup adenosinu do buňky, a adenosinmonofosfátu (AMP), prekurzoru adenosinu, ve snaze posílit receptory zprostředkovaný účinek adenosinu. Výsledky těchto studií jasně ukázaly, že preiradiačně aplikovaná kombinace DP a AMP stimuluje krvetvorbu a zvyšuje přežívání za podmínek jednorázového i frakcionovaného ozáření (30).

Adenosinové receptory existují ve 4 subtypech. Další experimenty, využívající agonisty selektivní pro jednotlivé subtypy, byla zaměřena na zjištění, který z těchto 4 subtypů je odpovědný za dříve pozorované krvetvorbu stimulující a radioprotektivní efekty neselektivních agonistů. Z nálezů vyplývá, že agonista adenosinových receptorů  $A_3$  IB-MECA neboli  $N^6$ -(3-jodobenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid stimuluje proliferaci krvetvorných progenitorových buněk (31). Následně bylo zjištěno, že IB-MECA podporuje krvetvorbu a krvetvorbu stimulující účinky G-CSF u subletálně ozářených myši. Vzájemně se potencující efekty na hematologické parametry ozářených myši byly pozorovány také při současném podání IB-MECA a inhibitoru COX-2 meloxicamu v postiradiačním léčebném režimu. Tato série pokusů byla zkompletována nálezem, že IB-MECA a meloxicam podané ve téměř terapeutickém režimu letálně ozářeným myším zvyšují (a to každý zvlášť i v kombinaci) přežívání zvířat exponovaných radiaci.

### DALŠÍ VYBRANÉ SLOUČENINY

ExRAD (ON 01210, Na, 4-karboxystyryl-4-chlorobenzylsulfon) je novou chemickou látkou s radioprotektivním účinkem na přežívání po subkutánním (32) nebo perorálním podání (33) i na závažnost poškození krvetvorby a gastrointestinálního traktu. Mechanismy radioprotektivních účinků ExRADu zahrnují prevenci p53-dependentní a nezávislé na záření indukované apoptózy, snížení radiační poškození DNA a stimulaci drah PI3-kinázy/AKT v buňkách exponovaných záření. ExRADu byl udělen status US FDA IND.

Metformin, biguanid užívaný při léčbě diabetu 2. typu, nedávno prokázal účinky jako radiomitigátor, byl-li podán 24 hodin po ozáření samotný nebo ve farmakologických kombinacích (34). Metformin je schválen pro humánní použití a má dobře charakterizovaný bezpečnostní profil.

Entolimod (CBLB502) je polypeptidová substance odvozená ze salmonelového flagelinu. Zlepšuje přežívání a chrání proti hematopoetickému a gastrointestinálnímu ARS jak při preiradiačním, tak postiradiačním podání (35). Dalšími zjištěnými vlastnostmi entolimodu jsou jeho schopnost zvyšovat klonogenní potenciál buněk kostní dřeně a redukovat apoptózu v intestinálních kryptách. Entolimod nalezl své využití také ve snížení radiací indukovaného epiteliálního poškození v myším modelu frakcionovaného ozáření hlavy

a krku. Bylo rovněž demonstrováno, že G-CSF a IL-6 mohou sloužit jako biomarkery účinnosti entolimodu. Jedná se o důležité pozorování, protože využití biomarkerů může být důležité při dávkové konverzi ze zvířete na člověka, a to zejména ve vztahu k faktu, že také entolimod má status US FDA IND.

FGF-2 je peptid odvozený od vázací domény fibroblastového růstového faktoru. Podání peptidu FGF-2 vedlo k vyléčení významného podílu myši s gastrointestinálním syndromem. Jeho použití zlepšovalo přežívání a repopulaci intestinálních krypt, obnovovalo gastrointestinální funkce a redukovalo zářením indukovanou zvýšenou hladinu endotoxinu v plazmě, jakož i koncentrace prozánětlivých cytokinů (36).

Deng et al. nedávno zjistili, že oktadecenyl thiofosfát, malá molekula napodobující mediátor růstového faktoru kyseliny lyzofosfátovou, chrání jak proti hematopoetickému, tak gastrointestinálnímu ARS (37). Kromě přímého účinku na gastrointestinální a krvetvorné tkáně oktadecenyl thiofosfát redukuje pronikání endotoxinu do krve.

Gastrointestinální ARS byl rovněž cílem radioprotektivního a radiomitigačního farmakologického přístupu využívajícího inhibitory enzymů obsahujících prolylhydroxylázovou doménu (PHD), jejichž podání vyústilo ve stabilizaci hypoxii indukujících faktorů (HIFs), jež chrání důležité buněčné kompartmenty před zářením indukovaným poškozením. Úloha osy PHD/HIF v záření indukované gastrointestinální toxicitě byla nedávno přezkoumána a procedury využívající PHDs jako stabilizátory HIFs byly navrženy jako nová třída radioprotektiv.

### POZNÁMKY KE KUTÁNNÍMU ARS

Kutánní ARS je klinicky relevantní jak u obětí jaderných nehod, tak u radioterapii exponovaných onkologických pacientů. Ve farmakoterapii byly zkoušeny např. topicky nebo systémově podané steroidy. Pro léčení pozdních následků radiačního poškození kůže byla aplikována kombinace pentoxifylinu a vitamínu E. Současné přístupy k léčbě kutánního ARS spočívají také v nefarmakologických metodách, jako jsou lokální injekce mezenchymových kmenových buněk nebo stromálních kmenových buněk odvozených z tukové tkáně.

### ZÁVĚR

Farmakologická modulace radiačního poškození má nejen dlouhou historii, ale i perspektivu. Řada substancí se jeví být slibná z hlediska případného zařazení do postupů zaměřených na ovlivnění ARS jak v podobě preiradiačního (protektivního) podání, tak do schémat postiradiačních (terapeutických). Podle mínění autora lze v této souvislosti uvažovat zejména o  $\beta$ -glukanu, 5-AED, meloxicamu,  $\gamma$ -tokoferolu, genisteinu, agonistovi adenosinových receptorů IB-MECA, ExRADu a entolimodu jako o nejvíce slibných sloučeninách.

Důležitým aspektem úvah o případném využití těchto, případně dalších radioprotektiv a radiomitigátorů v klinické praxi je fakt, že mnohé z nich jsou netoxické (nebo se vyznačují toxicitou pouze velmi nízkou), že mnohdy jsou k dispozici v podobě léků určených pro jiné indikace a jsou často levné i při výrobě většího množství. Dalším výhodou může být možnost kombinace 2 či více léčiv s cílem dále redukovat jejich toxicitu při zachování, nebo dokonce posílení celkového léčebného efektu – v detailech v samostatném přehledném článku (38).

## Seznam zkratk

<b>5-AED</b>	5-androstendiol
<b>AMP</b>	adenosinmonofosfát
<b>ARS</b>	akutní radiační syndrom
<b>CBLB502</b>	entolimod
<b>COX</b>	cyklooxygenáza
<b>DP</b>	dipyridamol
<b>ExRAD</b>	ON 01210 .Na, 4-karboxystyryl-4-chlorobenzylsulfon
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin, USA (U.S. Food and Drug Administration)
<b>G-CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů
<b>GM-CSF</b>	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
<b>IB-MECA</b>	N <sup>6</sup> -(3-jodobenzyl)adenosin-5'-N-methyluronamid
<b>HIFs</b>	hypoxii indukující faktory
<b>IFN-γ</b>	interferon gama
<b>IL</b>	interleukin
<b>PGE<sub>2</sub></b>	prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PHDs</b>	prolyhydroxylázové domény
<b>rhG-CSF</b>	rekombinantní lidský faktor stimulující kolonie granulocytů
<b>rhIL-11</b>	rekombinantní lidský interleukin 11
<b>TDM</b>	trehalóza-dimykolát
<b>TPO</b>	trombopoetin
<b>WR-2721</b>	amifostin

## Literatura

- Pospíšil M, Šandula J, Pípalová I et al.** Hemopoiesis stimulating and radioprotective effects of carboxymethylglucan. *Physiol Res* 1991; 40: 377–380.
- Hérodin F, Roy L, Grenier N et al.** Antiapoptotic cytokines in combination with pegfilgrastim soon after irradiation mitigate myelosuppression in nonhuman primates exposed to high radiation dose. *Exp Hematol* 2007; 35: 1172–1181.
- Hirouchi T, Ito K, Nakano M et al.** Mitigating effects of a combination of multiple pharmaceutical drugs on the survival of mice exposed to lethal ionizing radiation. *Curr Pharm Biotechnol* 2015; 17: 190–199.
- Singh VK et al.** Colony-stimulating factors for the treatment of the hematopoietic compartment of the acute radiation syndrome (H-ARS): a review. *Cytokine* 2015; 71: 22–37.
- Wasserman TH, Brizel DM.** The role of amifostine as a radioprotector. *Oncology (Williston Park)* 2001; 15: 1349–1354.
- Hofer M, Pospíšil M.** Glucan as stimulator of hematopoiesis in normal and gamma-irradiated mice. A survey of the authors' own results. *Int J Immunopharmacol* 1997; 19: 607–609.
- Hofer M, Pospíšil M.** Modulation of animal and human hematopoiesis by β-glucans: a review. *Molecules* 2011; 16: 7969–7979.
- Stickney DR, Dowding C, Garsd A et al.** 5-androstenediol stimulates multilineage hematopoiesis in rhesus monkeys with radiation-induced myelosuppression. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1706–1713.
- Stickney DR, Groothuis JR, Ahlem C et al.** Preliminary clinical findings on Nemune as a potential treatment for acute radiation syndrome. *J Radiol Prot* 2010; 30: 687–698.
- Ainsworth EJ, Hatch MH.** Decreased X-ray mortality in endotoxin-treated mice. *Radiat Res* 1957; 9: 84–84.
- Fedoročko P, Brezáni P.** Radioprotection of mice by the bacterial extract Broncho-Vaxom – comparison of survival 5 inbred mouse strains. *Int J Immunother* 1992; 8: 185–190.
- Madonna GS, Ledney GD, Elliot TB et al.** Trehalose dimycolate enhances resistance to infection in neutropenic animals. *Infect Immun* 1989; 57: 2495–2501.
- Crescenti EJV, Croci M, Medina VA et al.** Radioprotective potential of a novel therapeutic formulation of oligoelements Se, Zn, Mn plus *Lachesis muta* venom. *J Radiat Res* 2009; 50: 537–544.
- Crescenti EJV, Medina VA, Croci M et al.** Radioprotection of sensitive rat tissues by oligoelements Se, Zn, Mn plus *Lachesis muta* venom. *J Radiat Res* 2011; 52: 557–567.

- Liu W, Chen Q, Wu S et al.** Radioprotector WR-2721 and mitigating peptidoglycan synergistically promote mouse survival through the amelioration of intestinal and bone marrow damage. *J Radiat Res* 2015; 56: 278–286.
- Li N, Shen X, Liu Y et al.** Isolation, characterization, and radiation protection of *Sipunculus nudus* L. polysaccharide. *Int J Biol Macromol* 2016; 83: 288–296.
- Hanson WR, Ainsworth EJ.** 16,16-dimethyl prostaglandin E<sub>2</sub> induces radioprotection in murine intestinal and hematopoietic stem-cells. *Radiat Res* 1985; 103: 196–203.
- Kurland J, Moore MAS.** Modulation of hemopoiesis by prostaglandins. *Exp Hematol* 1977; 7: 119–126.
- Hofer M, Pospíšil M, Hoferová Z et al.** Stimulatory action of cyclooxygenase inhibitors on hematopoiesis: a review. *Molecules* 2012; 17: 5615–5625.
- Hofer M, Pospíšil M, Znojil V et al.** Meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor, supports hematopoietic recovery in gamma-irradiated mice. *Radiat Res* 2006; 166: 556–560.
- Hofer M, Pospíšil M, Dušek L et al.** A single dose of an inhibitor of cyclooxygenase 2, meloxicam, administered shortly after irradiation increases survival of lethally irradiated mice. *Radiat Res* 2011; 176: 269–272.
- Hoggatt J, Singh P, Stilger KN et al.** Recovery from hematopoietic injury by modulating prostaglandin E<sub>2</sub> signaling post-irradiation. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50: 147–153.
- Arora R, Gupta D, Chawla R et al.** Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res* 2005; 19: 1–22.
- Weiss JF, Landauer MR.** Radioprotection by antioxidants. *Ann NY Acad Sci* 1998; 899: 44–60.
- Singh VK, Beattie LA, Seed TM.** Vitamin E: tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures. *J Radiat Res* 2013; 54: 973–988.
- Singh VK, Hauer-Jensen M.** Gamma-tocotrienol as a promising countermeasure for acute radiation syndrome: current status. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 663.
- Weiss JF, Srinivasan V, Kumar KS, Landauer MR.** Radioprotection by metals: selenium. *Adv Space Res* 1992; 12: 223–231.
- Weiss JF, Landauer MR.** History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol* 2009; 85: 539–573.
- Landauer MR.** Radioprotection by the soy isoflavone genistein. In: Arora R (ed.). *Herbal Radiomodulators: Applications in Medicine, Homeland Defence and Space*. Cabi, Wallingford, 2008: 163–173.
- Pospíšil M, Hofer M, Znojil V et al.** Radioprotection of mouse hemopoiesis by dipyridamole and adenosine monophosphate in fractionated treatment. *Radiat Res* 1995; 142: 16–22.
- Hofer M, Pospíšil M, Weiterová L, Hoferová Z.** The role of adenosine receptor agonists in regulation of hematopoiesis. *Molecules* 2011; 16: 675–685.
- Ghosh SP, Perkins MW, Hieber K et al.** Radiation protection by a new chemical entity, Ex-Rad™: efficacy and mechanisms. *Radiat Res* 2009; 171: 173–179.
- Suman S, Datta K, Doiron K et al.** Radioprotective effects of ON 01210. Na upon oral administration. *J Radiat Res* 2012; 53: 368–376.
- Miller RC, Murley JS, Grdina DJ.** Metformin exhibits radiation countermeasures efficacy when used alone or in combination with sulfhydryl containing drugs. *Radiat Res* 2014; 181: 464–470.
- Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC et al.** An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008; 320: 226–230.
- Zhang L, Sun W, Wang J et al.** Mitigation effect of an FGF-2 peptide on acute gastrointestinal syndrome after high-dose ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 77: 261–268.
- Deng W, Kimura Y, Guduru V et al.** Mitigation of the hematopoietic and gastrointestinal acute radiation syndrome by octadecenyl thiophosphate, a small molecule mimic of lysophosphatidic acid. *Radiat Res* 2015; 183: 465–475.
- Hofer M, Hoferová Z, Depeš D, Falk M.** Combining pharmacological countermeasures to attenuate the acute radiation syndrome – a concise review. *Molecules* 2017; 22: 834.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**doc. MUDr. Michal Hofer, CSc.**

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.

Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 541 517 171, 541 517 161

e-mail: hofer@ibp.cz

# Biologická dozimetrie a moderní (-omické) metody

Gabriela Kultová<sup>1,2</sup>, Marcela Jeličová<sup>1</sup>, Jana Čížková<sup>1</sup>, Zuzana Šinkorová<sup>1</sup>, Aleš Tichý<sup>1</sup>

<sup>1</sup>katedra radiobiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví UO, Hradec Králové

<sup>2</sup>katedra biologie, Přírodovědecká fakulta UHK, Hradec Králové

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 281–285

## SOUHRN

Riziko akutního ozáření větší části populace stoupá a s ním i potřeba vyvíjet nové metody, které by mohly poskytnout rychlé posouzení obdržených dávek za použití moderních vysokokapacitních technologií. Současně vzrůstá i zájem o vývoj nových biomarkerů umožňujících kategorizaci ozářených osob, které by mohly být použity v epidemiologických studiích, a umožnily korelovat odhadované přijaté dávky s následným dopadem na zdraví pacienta. K tomu napomáhají rovněž aktuální poznatky v oblasti radiační genomiky, metabolomiky a proteomiky.

Ačkoli většina studií, které poskytly mnoho užitečných informací o biomarkerech expozice ionizujícímu záření, byla prováděna na zvířecích modelech, nejdůležitějšími testy zůstávají studie prováděné na pacientech, zejména onkologických. Pro predikci účinku záření lze použít různé biologické materiály, ideální se pro tento účel zdají být plazmatické proteiny. Z řady kandidátních markerů je velmi slibná ferredoxin-reduktáza (FDXR), která byla v několika biodozimetrických studiích potvrzena jak na úrovni lidského genu, tak proteinu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

radiační ochrana, biomarker, proteomika, metabolomika, biodozimetrie

## SUMMARY

### Kultová G. et al. Biological dosimetry and modern (-omic) methods

The increased risk of acute large-scale radiation exposure of the population underlies the necessity to develop new methods that could provide a rapid assessment of the doses received while using modern high-throughput technologies. At the same time, there is a growing interest in discovering new biomarkers enabling the categorization of irradiated individuals that could be used in epidemiological studies to correlate the estimated absorbed doses with the consequent impact on patient's health.

The aim of this study was to summarize the current literature on biological dosimetry, specifically ionizing radiation-responsive biomarkers. We briefly describe current knowledge in the field of radiation genomics, metabolomics, and proteomics.

Although the majority of studies that provided a plethora of useful information were conducted in animal models, oncological patients remain the crucial experimental model. The authors describe various biological materials that could be potentially used to predict the effect of ionizing radiation. Plasma proteins appear to be ideal for this purpose. Out of many candidate markers, the ferredoxin reductase (FDXR) seems to be promising, as it has been confirmed in several biodosimetric studies at the level of both human gene and protein.

## KEYWORDS

radiation protection, biomarker, proteomics, metabolomics, biodosimetry

## ÚVOD

Nebezpečí radiačních havárií nebo zneužití jaderných zbraní v současnosti poukazuje na rostoucí význam biologické dozimetrie. V případě hromadných nehod lze očekávat vystavení velké části populace ionizujícímu záření (IZ) za současné absence přesných fyzikálních dozimetrických dat. Důležitá úloha při bezprostřední selekci ozářených a neozářených jedinců tak připadne biologickým testům, jež však prozatím trpí mnoha problémy (časová náročnost, nízká senzitivita, výrazný pokles signálu s časem po ozáření apod.). Pro toto první, rychlé třídění jsou tedy nezbytné účinnější a pokročilejší testovací metody založené na biomarkerech, jejichž kvalitativní změny umožní stanovit časovou intenzitu a interval od ozáření organismu (1). Velké úsilí bylo proto věnováno nalezení vhodných biomarkerů expozice záření, které mohou poskytnout informace o efektivní dávce (2).

Hlavní zasaženou biomolekulu pro IZ představuje DNA, jejíž poškození má pro organismus největší důsledky. Genetickou informací a správné fungování buněk ohrožují zejména dvouřetězcové zlomy DNA (DSB), jež mohou být generovány buď nepřímo, reaktivními kyslíkovými radikály (ROS) vznikajícími radiolýzou vody, nebo přímo, interakcí

DNA se zářením. IZ ovšem poškozuje také proteiny, lipidy a aktivuje reparační mechanismy DNA, které mohou následně vést k oslabení buňky, v důsledku čehož dochází k projevům genotoxického stresu. Buňky jedinců vystavených IZ často zvýšeně produkují ROS v mitochondriích, což vede k řadě molekulárních procesů, na jejichž konci může být rozvoj akutní nemoci z ozáření (3).

Obecně vzato poškození vyvolaná IZ zahrnují senescenci a různé formy buněčné smrti, stárnutí buněčných struktur a abnormality v kompartmentu kmenových buněk (3). Tyto procesy vedou k aktivaci proteinu p53, což je důležitý transkripční faktor mnoha genů zapojených v buněčné odpovědi na ozáření (4).

Velikost absorbované dávky IZ má pro oběti události významné důsledky. Nízké dávky mají systémově za následek poškození krevetvorby a trávicího traktu, zatímco vysoké dávky vyvolávají poškození kardiovaskulární a centrálního i periferního nervového systému (5). Nízké dávky nemusejí mít okamžitě rozpoznatelné projevy, po delší době mohou vést ke vzniku nádorů (6). Na druhou stranu akutní radiační syndrom doprovází okamžité změny stavu organismu s výraznými patologickými projevy (7). V obou případech však následkem ozáření dochází k rychlým, avšak pouze dočasným



změnám exprese některých proteinů, které můžeme následně analyzovat v tělních tekutinách (krev, moč, sliny apod.). Pro co nejpřesnější zpětný odečet obdržené dávky by proto měly být vzorky biologického materiálu odebírány a změny hladin biomarkerů kvantifikovány pokud možno již během prvních dnů po ozáření. Individuální reakce na ozáření je nicméně komplexní. Vedle dávkového příkonu, typu záření a absorbované dávky závisí také na genetických a epigenetických predispozicích každého jednotlivce (8).

Ideální radiační biomarker by měl poskytovat informace o obdržené dávce a měl by být nezávislý na environmentálních a dalších faktorech (kouření, léková terapie, věk atd.) (9). Takový biomarker dosud neznáme, ale již byly navrženy způsoby zpětného odhadu dávky spojením několika genetických a metabolických biomarkerů (10). K tomu lze přidat i proteomické biomarkery krevní plazmy, jejichž zvýšené hladiny zejména po vysokodávkovém ozáření lze pozorovat v relativně krátkém čase (1).

### GENOMIKA V RADIAČNÍ BIODOZIMETRII

Analýza změn v expresi genů nabízí novodobý přístup k radiační biodozimetrii (11). Jak již bylo uvedeno, mnoho genů, které reagují na IZ, ovlivňuje protein p53. Oh et al. (2012) studovali 13 genů indukovaných zářením, ze kterých bylo 12 regulováno právě proteinem p53; 9 z nich je dobře známých: BBC3, CDKN1A, CCNG1, DDB2, FDXR, GADD45, MDM2, MYC a PCN (12).

Manningová et al. (2013) provedli podobný experiment, když studovali expresi 13 genů na úrovni mRNA v lidské krvi ozářené *ex vivo* rentgenovým zářením. Zjistili, že kombinace genů FDXR, DDB2 a CCNG1 by mohla být použita pro stanovení nízkých dávek záření a kombinace FDXR, DDB2 a PHPT1 potom dávek vysokých. Důležitým poznatkem je, že u posledních 3 jmenovaných genů získali statisticky významnou odpověď s lineárním charakterem, což naznačuje dobrou citlivost a reprodukovatelnost tohoto přístupu (13).

Úroveň exprese 8 genů (BBC3, FDXR, CDKN1A, PCNA, XPC, GADD45A, DDB2 a POLH) ve vzorcích krve byla 24 hodin po celotělovém ozáření vyšší než ve vzorcích před tímto ozářením a v kontrolní skupině zdravých jedinců. Dále bylo zjištěno, že pro všechny testované dávky se lišila úroveň exprese mezi dvěma časovými intervaly, kdy 6 hodin po ozáření byla vyšší než po 24 hodinách (14), což signalizuje určitou časovou závislost. Ghandhiová et al. (2015) informovali o genech, které byly citlivější na IZ než ostatní. *Ex vivo* ozařovali lidskou krev dávkami 0,56 Gy, 2,23 Gy a 4,45 Gy. Výsledkem bylo, že u genů FDXR, AEN, DDB2, PHLDA3, PCNA, GADD45A a ZMAT3 došlo ke zvýšení jejich exprese a u genů MYC, PFKP a PTGDS naopak k jejímu snížení (15).

Recentně uvedli Lacombe et al. (2018) dalších 5 top genů s nejvyšší korelací mezi dávkou a úrovní exprese: FDXR, TNFSF4, TMEM30A, ZMAT3 a AEN (16).

Řada kandidátních genů (AEN, CCNG1, CDKN1A, DDB2, FDXR, GADD45A, PCNA, SESN1 a ZMAT3) byla identifikována jako slibná a byla uvedena v několika publikacích. V současné době se na základě několika studií dostává do popředí zájmu FDXR, který se ukazuje být slibným transkriptomickým kandidátem. Lacombe et al. shrnuli další informace o genomových biomarkerech ve své rešerši (16).

### METABOLOMIKA V BIOLOGICKÉ DOZIMETRII

Biomarkery vyskytující se v krvi, moči, slinách, pokožním tuku či stolici mohou poskytovat řadu údajů pro

hodnocení radiační zátěže u savců včetně člověka. Podle Byrumové et al. jsou nejběžnějšími biologickými vzorky pro detekci biomarkerů moč a plazma (1).

Současné metabolomické studie ukazují na několik potenciálních biomarkerů. Například vyšší hladina valinu, alaninu, laktátu, argininu, malátu, leucinu, 2-aminobutyryátu, taurinu a glutathionu byla detekována ve tkáni sleziny u myši po ozáření dávkou 3 a 7,8 Gy (17). V další studii stanovili Cheemová et al. vyšší hladinu fenylalaninu, glutathionu, kreatininu a nižší hladinu adeninu a D-aspartátu ve střevní tkáni myši (jejuno-ileální oblast), která byla izolována 2 měsíce po ozáření dávkou 2 Gy (18). V jiné své práci Cheemová et al. při analýze myších jater a ledvin pozorovali změny v metabolických a lipidových profilech v časovém intervalu 60 dní po ozáření. Zjistili také výrazné změny v metabolismu karnitinu, cholinu a kyseliny arachidonové (19). V další studii tento tým prokázal změny ve složení metabolitů exosomů a plazmy po ozáření dávkami 5,8 Gy a 6,5 Gy (20).

Metabolity, jako je GSH, NAD<sup>+</sup> a spermin, by také mohly sloužit jako důležité ukazatelé ozáření (21). Laiakisová et al. pozorovali zvýšené vylučování taurinu, nikotinátu, alantoinu a kyseliny močové po expozici dávkám 8 a 15 Gy. Tento tým uvedl, že pomocí metabolomiky můžeme rovněž rozlišovat různé stresory (22).

Pravděpodobně nejvíce využívanou biologickou tekutinou v metabolických studiích je moč. Obsahuje metabolity, které lze použít k detekci různých onemocnění nebo stavů, včetně ozáření. Tyto metabolity odrážejí specifickou konkrétních tkání a jejich změny jsou detekovatelné v různých časových intervalech, na rozdíl od ukazatelů stanovovaných v krvi (23).

V jiné studii byli onkologičtí pacienti vystaveni celotělově dávce 1,25 Gy. Bylo zjištěno, že dva metabolity, konkrétně trimethyl-L-lysin a hypoxanthin, jsou v moči až 10× zvýšené ve srovnání s kontrolní skupinou (24). Zvýšené hladiny hypoxanthinu u celotělově ozářených pacientů potvrdili také Chen et al. (25).

Sliny mohou být použity k predikci tíže radiačního poškození organismu, protože obsahují metabolity citlivé na záření i po nízkých dávkách (26).

Mooreová et al. ve své studii, kde analyzovali vzorky slin onkologických pacientů celotělově ozářených dávkami 1,5, 1,65 a 2 Gy, identifikovali monocytový chemoatraktantový protein 1 (MCP-1), interleukin 8 (IL-8) a intercelulární adhezní molekulu 1 (ICAM-1) jako potenciální slinné biomarkery ozáření. Bohužel zatím nebylo publikováno mnoho studií o využití slin jako biologického materiálu v radiační biodozimetrii, zejména kvůli metodologickým potížím s přípravou vzorku (27).

V kalcifikovaných či zrohovatělých lidských tkáních (zuby, vlasy, nehty) se tvoří radikály, které jsou natolik stabilní, že jsou detekovatelné pomocí elektronové paramagnetické rezonance (EPR) i v delších časových intervalech po ozáření (28). Demidenko et al. ve své studii uvádějí, že vyšší dávky IZ vyvolaly u exponovaných lidí zvýšené signály EPR (29).

EPR měří tzv. radiačně indukované signály (RIS) např. ze vzorků nehtů po expozici IZ. RIS jsou natolik stabilní, že lze považovat za vhodné kandidáty pro biologickou dozimetrii (30). Využití EPR zubní tkáně *in vivo* zvyšuje přesnost odhadu absorbované dávky zasaženého organismu, což by mohlo vést k využití této metody při třídění velkého počtu obětí (31).

Podrobněji se touto problematikou zabývají ve svých pracích Kulkarniová et al. a Singh et al. (10).

## PROTEOMIKA V RADIAČNÍ BIDOZIMETRII

Moč se zdá být ideálním substrátem pro stanovení radičních biomarkerů, ale vhodnější volbou z proteomického hlediska se ukázaly být plazma a sérum, jež navíc obsahují další molekuly včetně proteinů. Analýzy těchto tělních tekutin poskytují cenné informace například o poškození tkáně, metabolickém fenotypu, zánětlivém a protizánětlivém stavu tkání apod. (32). Vhodnou metodou pro detekci proteinů ze séra a plazmy je vysoce rozlišovací hmotnostní spektrometrie kombinovaná s **vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií** (HPLC), což je robustní, reprodukovatelná a velmi citlivá technika (33).

Avšak biomarkery akutní nemoci z ozáření byly studovány i na myších modelech (34). Jako možný biomarker může být použita v biodozimetrii aminokyselina citrulin (35) obsažená v enterocytech, které jsou vlivem záření poškozeny. Byla zjištěna korelace mezi koncentrací citrulinu a poškozením GIT, což z citrulinu činí ideální biomarker pro gastrointestinální formu (36). Tato domněnka se potvrdila i v jiné studii na modelu nehumánních primátů (NHP), kde byla použita dávka 10 Gy a hladina citrulinu byla dále zaznamenávána i v následujících dnech (1, 2, 3 a 7 dní) po ozáření (37). NHP modely byly použity k identifikaci proteinových biomarkerů SAA, IL-6 a Flt3L jako indikátorů expozice 7 dní po ozáření (38).

Yi et al. identifikovali změny 18 proteinů v myši krvi po ozáření 100 a 250  $\mu\text{Gy/hod}$ . Nejvýraznější změna byla zaznamenána u glycin-N-methyltransferázy a nukleofosminu, u kterých došlo ke zvýšení jejich hladiny, a glutathion-S-transferázy A3, jejíž hladina se snížila (39).

Leeová et al. použili k identifikaci nových biomarkerů 3 dny po ozáření humanizované myši. Z celkem 46 identifikovaných proteinů reagujících na ozáření byly vybrány jako 4 hlavní biomarkery ozáření FDXR, BAX, DDB2 a ACTN1 (40). Další studie tyto kandidáty (FDXR, DDB2 a ACTN1) identifikovala také v lidské krvi a potvrdila je jako vhodné biomarkery pro odhad dávky záření (14).

Biologické testy prováděné na zvířecích modelech poskytly mnoho užitečných znalostí (biomarkery záření v krvi a moči), do budoucna je ovšem nezbytné výsledky validovat také u lidí. Unikátní přiležitost tak v tomto směru poskytují vzorky získané od pacientů s nádorovým onemocněním, kteří podstupují radioterapii (41). Proteinový profil těchto vzorků však může být ovlivněn probíhající malignitou, a není proto vždy snadné odlišit marker reagující na záření od markeru samotného onemocnění.

V posledním desetiletí byly jako prioritní markery ozáření odhaleny molekuly podílející se na signalizaci poškození DNA, např. kináza ATM, inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1A, histon H2AX fosforylovaný na serinu 139 ( $\gamma\text{H2AX}$ ) a protein p53 (42).

Turnerová et al. odebrali vzorky krve od zdravých dárců, jež následně ozářili *ex vivo* dávkou 0–8 Gy. Došli k závěru, že vyšší dávky způsobily zvýšení hladiny proteinu  $\gamma\text{H2AX}$  ve srovnání s dávkami nižšími (43). Mnoho studií uvedlo podobný závěr o lineární korelaci mezi dávkou a zvyšující se hladinou  $\gamma\text{H2AX}$  (44). Ohniska  $\gamma\text{H2AX}$  se objevují v buněčném jádře v místech dvouřetězcových zlomů DNA již 3–15 minut po ozáření, svého maxima pak dosahují zhruba v 30 minut až 1 hodinu po ozáření. Avšak vzorky musejí být odebrány od pacientů co nejdříve po ozáření, jelikož po 24–48 hodinách se fluorescenční signály díky úspěšné reparaci většiny DSB podstatně snižují (43). V důsledku této časové nestability

není  $\gamma\text{H2AX}$  ideálním kandidátem pro vysokokapacitní biodozimetrii větších populací.

## ZÁVĚR

Biomarkery radičního poškození s potenciálem aplikace v praxi, zejména pro třídění ozářených osob neboli triáž, mohou na rozdíl od fyzikálních dozimetrů poskytnout informace jak o obdržené dávce, tak o účinku IZ na biologické funkce pacienta. Tento přístup zatím není dokonalý a analýza uvedených markerů je poměrně problematická, co se týká znalostí, času a ceny.

V minulosti již bylo navrženo několik metod ke stanovení absorbované dávky, ale žádná z nich není optimální. Nejrozšířenější metodou pro odhad obdržené dávky představuje analýza dicentrických chromosomů (45). Bohužel je časově velmi náročná, a proto nevhodná pro tzv. medicínu katastrof, kde předpokládáme desítky až stovky tisíc suspektně ozářených jedinců. V takových případech potřebujeme rychlé a efektivní metody (46). Několik studií potvrdilo vliv IZ na genovou expresi (14). Gen FDXR představuje horkého kandidáta na radiční biomarker, jelikož jeho exprese se významně zvyšuje během 24 hodin po ozáření v širokém dávkovém rozmezí. O'Brienová et al. nepozorovali rozdíl mezi expresí FDXR u *ex vivo* a *in vivo* ozářených vzorků a prokázali její dávkovou závislost (2).

Velmi slibně se jeví výsledky výzkumu zaměřeného na zpracování vlasů, zubů a nehtů. Odběr vzorků je totiž relativně snadný a zářením indukované volné radikály mohou být v těchto vzorcích měřeny pomocí EPR ještě velmi dlouho po ozáření (28, 31).

V neposlední řadě existuje množství proteinů, jejichž hladiny se po ozáření mění dávkově závislým způsobem (47). Ačkoliv je identifikace plazmatických proteinů velmi náročná a pracná, čtené proteomické studie identifikovaly radiční biomarkery v plazmě a dalších tkáních (40). Jelikož je však přístup k lidským vzorkům plazmy omezený, většina experimentů byla provedena na zvířecích modelech (10). Metoda *ex vivo* se zdá být do budoucna vhodným experimentálním modelem pro predikci účinku ozáření *in vivo* (48).

Současný trend v biologické dozimetrii nespočívá v hledání jediného biomarkery pro odhad všech dávek (46), nýbrž v použití panelu více „-omických“ biomarkerů s patřičným dávkovým a časovým oknem (49). Dále se zdá být z klinického hlediska důležitější pro triáž predikce účinku IZ než samotná informace o obdržené dávce, i kdyby byla velmi přesná.

Uvážíme-li, že dostupné zavedené biomarkery stále nedisponují optimálními parametry, je přirozené, že vzniká jasná potřeba tento stav zlepšit. Předpokládáme, že s rostoucím úsilím a množstvím finančních prostředků věnovaných na výzkum biologické dozimetrie a s nástupem nových „-omických“ metod se v příštím desetiletí dočkáme výrazného pokroku v této oblasti.

## Čestné prohlášení

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

## Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva obrany ČR (Dlouhodobý zá-  
měr rozvoje organizace – Zbraně hromadného ničení 101) a Ministerstva

Školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt Specifického výzkumu 2106 – Univerzita Hradec Králové).

## Seznam zkratk

<b>ACTN1</b>	alfa-aktinin 1
<b>AEN</b>	apoptosis-enhancing nuclease
<b>ATM</b>	ataxia-telangiectasia mutated kinase
<b>ARS</b>	akutní radiační syndrom
<b>BAX</b>	Bcl2-associated X apoptosis regulator
<b>BBC3</b>	Bcl2-binding component 3
<b>CCNG1</b>	cyklin G1
<b>CDKN1A</b>	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 1
<b>DDB2</b>	DNA damage-binding protein 2
<b>EPR</b>	elektronová paramagnetická rezonance
<b>FDXR</b>	ferredoxin reduktáza
<b>Flt3L</b>	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
<b>GADD45A</b>	growth arrest and DNA damage-inducible alpha
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>GNMT</b>	glycin-N-methyltransferáza
<b>GSH</b>	redukovaný glutathion
<b>GSTA3</b>	glutathion-S-transferáza A3
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IL</b>	interleukin
<b>IZ</b>	ionizační záření
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>MDM2</b>	mouse double minute 2 homolog
<b>MYC</b>	myelocystomatosis oncogene
<b>NAD</b>	nikotinamidadeninindinukleotid
<b>NPM</b>	nukleofosmin
<b>PCN</b>	WD repeat-containing protein PCN
<b>PCNA</b>	proliferiční antigen buněčného jádra
<b>PFKP</b>	destičková izoforma fosfofruktokinázy
<b>PHPT1</b>	protein-histidin fosfatáza
<b>PHLDA3</b>	pleckstrin homology-like domain family A member 3
<b>POLH</b>	DNA polymeráza eta
<b>PTGDS</b>	prostaglandin H <sub>2</sub> D-izomeráza
<b>RIS</b>	radiačně indukované signály
<b>SAA</b>	sérový amyloid A
<b>SESN1</b>	sestrin 1
<b>TMEM30A</b>	transmembránový protein 30A
<b>XPC</b>	xeroderma pigmentosum, complementation group C
<b>ZMAT3</b>	zinc finger matrixin-type protein 3

## Literatura

- Byrum SD, Burdine MS, Orr L et al. Time- and radiation-dose dependent changes in the plasma proteome after total body irradiation of non-human primates: implications for biomarker selection. *PLoS One* 2017; 12(3): e0174771.
- O'Brien G, Cruz-Garcia L, Majewski M et al. *FDXR* is a biomarker of radiation exposure *in vivo*. *Sci Rep* 2018; 8: 684.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
- Kannan K, Amariglio N, Rechavi G et al. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 2001; 20: 2225–2234.
- Matoušek J, Österreicher J, Linhart P. CBRN – jaderné zbraně a radiologické materiály. *SPBI*, Ostrava, 2007.
- Orth M, Lauber K, Niyazi M et al. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiat Environ Biophys* 2014; 53: 1–29.
- Rieger KE, Hong W-J, Tusher VG et al. Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6635–6640.
- Reisz JA, Bansal N, Qian J et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules – mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 260–292.
- Lu TP, Hsu YY, Lai LC et al. Identification of gene expression biomarkers for predicting radiation exposure. *Sci Rep* 2014; 4: 6293.
- Singh VK, Newman VL, Romaine PL et al. Use of biomarkers for assessing radiation injury and efficacy of countermeasures. *Expert Rev Mol Diagn* 2016; 16: 65–81.
- Amundson SA, Do KT, Shahab S et al. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 2000; 154: 342–346.
- Oh JH, Wong HP, Wang X, Deasy JO. A bioinformatics filtering strategy for identifying radiation response biomarker candidates. *PLoS One* 2012; 7: e38870.
- Manning G, Kabacik S, Finnon P et al. High and low dose responses of transcriptional biomarkers in ex vivo X-irradiated human blood. *Int J Radiat Biol* 2013; 89: 512–522.
- Budworth H, Snijders AM, Marchetti F et al. DNA Repair and cell cycle biomarkers of radiation exposure and inflammation stress in human blood. *PLoS One* 2012; 7: e48619.
- Ghandhi SA, Smilenov LB, Elliston CD et al. Radiation dose-rate effects on gene expression for human biodosimetry. *BMC Med Genomics* 2015; 8: 22.
- Lacombe J, Sima C, Amundson SA, Zenhausem F. Candidate gene biosimetry markers of exposure to external ionizing radiation in human blood: a systematic review. *PLoS One* 2018; 13: e0198851.
- Xiao X, Hu M, Liu M, Hu J. <sup>1</sup>H NMR metabolomics study of spleen from C57BL/6 mice exposed to gamma radiation. *Metabolomics* 2016; 6: 1–11.
- Cheema AK, Suman S, Kaur P et al. Long-term differential changes in mouse intestinal metabolomics after  $\gamma$  and heavy ion radiation exposure. *PLoS One* 2014; 9: e87079.
- Cheema AK, Mehta KY, Rajagopal MU et al. Metabolomic studies of tissue injury in nonhuman primates exposed to gamma-radiation. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 3360.
- Cheema AK, Hinzman CP, Mehta KY et al. Plasma derived exosomal biomarkers of exposure to ionizing radiation in nonhuman primates. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3427.
- Patterson AD, Li H, Eichler GS et al. UPLC-ESI-TOFMS-based metabolomics and gene expression dynamics inspector self-organizing metabolomic maps as tools for understanding the cellular response to ionizing radiation. *Anal Chem* 2008; 80: 665–674.
- Laiakis EC, Hyduke DR, Fornace AJ. Comparison of mouse urinary metabolic profiles after exposure to the inflammatory stressors  $\gamma$  radiation and lipopolysaccharide. *Radiat Res* 2012; 177: 187–199.
- Clish CB. Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2015; 1: a000588.
- Laiakis EC, Mak TD, Anizan S et al. development of a metabolomic radiation signature in urine from patients undergoing total body irradiation. *Radiat Res* 2014; 181: 350–361.
- Chen Z, Coy SL, Pannkuk EL et al. Rapid and high-throughput detection and quantitation of radiation biomarkers in human and nonhuman primates by differential mobility spectrometry-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; 27: 1626–1636.
- Soni S, Agrawal P, Kumar N et al. Salivary biochemical markers as potential acute toxicity parameters for acute radiation injury: a study on small experimental animals. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35: 221–228.
- Moore HD, Ivey RG, Voytovich UJ et al. The human salivary proteome is radiation responsive. *Radiat Res* 2014; 181: 521–530.
- Swartz HM, Flood AB, Williams BB et al. electron paramagnetic resonance dosimetry for a large-scale radiation incident. *Health Phys* 2012; 103: 255–267.
- Domidenko E, Williams BB, Sucheta A et al. Radiation dose reconstruction from L-band *in vivo* EPR spectroscopy of intact teeth: comparison of methods. *Radiat Meas* 2007; 42: 1089–1098.
- Tipikin DS, Swartz SG, Sidabras JW et al. possible nature of the radiation-induced signal in nails: high-field EPR, confirming chemical synthesis, and quantum chemical calculations. *Radiat Prot Dosimetry* 2016; 172: 112–120.
- Flood AB, Williams BB, Schreiber W et al. Advances in *in vivo* EPR tooth biodosimetry: meeting the targets for initial triage following a large-scale radiation event. *Radiat Prot Dosimetry* 2016; 172: 72–80.
- Khan AR, Rana P, Devi MM et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolomic investigation of biochemical effects in serum of  $\gamma$ -irradiated mice. *Int J Radiat Biol* 2011; 87: 91–97.
- Lössl P, van de Waterbeemd M, Heck AJ. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. *EMBO J* 2016; 35: 2634–2657.



- 34. Johnston CJ, Hernady E, Reed C et al.** Early alterations in cytokine expression in adult compared to developing lung in mice after radiation exposure. *Radiat Res* 2010; 173: 522–535.
- 35. Bujold K, Hauer-Jensen M, Donini O et al.** Citrulline as a biomarker for gastrointestinal-acute radiation syndrome: species differences and experimental condition effects. *Radiat Res* 2016; 186: 71–78.
- 36. Pawar SA, Shao L, Chang J et al.** C/EBP $\beta$  deficiency sensitizes mice to ionizing radiation-induced hematopoietic and intestinal injury. *PLoS One* 2014; 9: e94967.
- 37. Jones JW, Tudor G, Bennett A et al.** Development and validation of a LC-MS/MS assay for quantitation of plasma citrulline for application to animal models of the acute radiation syndrome across multiple species. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406: 4663–4675.
- 38. Ossetrova NI, Sandgren DJ, Blakely WF.** Protein biomarkers for enhancement of radiation dose and injury assessment in nonhuman primate total-body irradiation model. *Radiat Prot Dosimetry* 2014; 159: 61–76.
- 39. Yi L, Mu H, Hu N et al.** Differential expression of NPM, GSTA3, and GNMT in mouse liver following long-term in vivo irradiation by means of uranium tailings. *Biosci Rep* 2018; 38: BSR20180536.
- 40. Lee Y, Pujol Canadell M, Shuryak I et al.** Candidate protein markers for radiation biodosimetry in the hematopoietically humanized mouse model. *Sci Rep* 2018; 8: 13557.
- 41. Pannkuk EL, Fornace AJ, Laiakis EC.** Metabolomic applications in radiation biodosimetry: exploring radiation effects through small molecules. *Int J Radiat Biol* 2017; 93: 1151–1176.
- 42. Marchetti F, Coleman MA, Jones IM, Wyrobek AJ.** Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 605–639.
- 43. Turner HC, Brenner DJ, Chen Y et al.** Adapting the  $\gamma$ -H2AX assay for automated processing in human lymphocytes. I. Technological Aspects. *Radiat Res* 2011; 175: 282–290.
- 44. Turner HC, Shuryak I, Weber W et al.**  $\gamma$ -H2AX kinetic profile in mouse lymphocytes exposed to the internal emitters cesium-137 and strontium-90. *PLoS One* 2015; 10: e0143815.
- 45. Amundson SA, Bittner M, Meltzer P et al.** Biological indicators for the identification of ionizing radiation exposure in humans. *Expert Rev Mol Diagn* 2001; 1: 211–219.
- 46. Kim D, Marchetti F, Chen Z et al.** Nanosensor dosimetry of mouse blood proteins after exposure to ionizing radiation. *Sci Rep* 2013; 3: 2234.
- 47. Schauer DA, Desrosiers MF, Le FG et al.** EPR dosimetry of cortical bone and tooth enamel irradiated with X and gamma rays: study of energy dependence. *Radiat Res* 1994; 138: 1–8.
- 48. Paul S, Barker CA, Turner HC et al.** prediction of in vivo radiation dose status in radiotherapy patients using *ex vivo* and *in vivo* gene expression signatures. *Radiat Res* 2011; 175: 257–265.
- 49. Blakely WF, Ossetrova NI, Whitnall MH et al.** Multiple parameter radiation injury assessment using a nonhuman primate radiation model-biodosimetry applications. *Health Phys* 2010; 98: 153–159.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

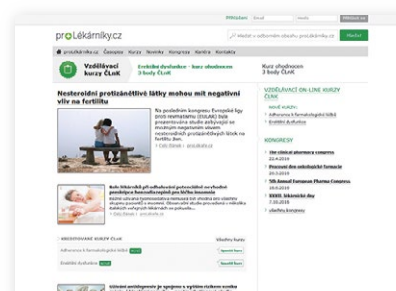
Fakulta vojenského zdravotnictví UO  
Trebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

Tel.: 973 253 216

e-mail: ales.tichy@unob.cz

pr  Lékárníky.cz

- + on-line vzdělávání lékárníků a farmaceutů
- + kurzy ohodnoceny body ČLnK
- + registrace a celý vstup je zdarma

Více na [www.prolekarniky.cz/kreditovane-kurzy](http://www.prolekarniky.cz/kreditovane-kurzy)

## Informace a kontakt:

Andrea Opletalová  
info@prolekarniky.cz  
MeDitorial, s.r.o. Lékařský dům,  
Sokolská 31/490, 120 26 Praha 2

# Pokroky ve výzkumu poškození a reparace DNA v buňkách vystavených různým druhům ionizujícího záření v éře superrozlišovací optické mikroskopie

Martin Falk<sup>1</sup>, Michael Hausmann<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

<sup>2</sup>Kirchhoffův institut pro fyziku, Univerzita Heidelberg

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 286–297

## SOUHRN

K novým poznatkům o vlivu různých druhů ionizujícího záření na buňky patří mikro- a nanodosimetrické aspekty poškození chromatinu. Fyzikální vlastnosti incidentního ionizujícího záření (fotonů gama, protonů a iontů s vysokým LET) souvisí s charakterem poškození chromatinu, možnostmi buňky opravit a přežít vytvořené léze DNA a rizikem genetických změn. Přestože výsledky jednoznačně potvrzují pozitivní korelaci mezi LET ionizujícího záření, komplexností indukovaných dvouřetězcových zlomů DNA (DSB) a biologickou účinností (RBE) záření, zároveň odhalují, že těmto vztahům ještě dostatečně nerozumíme. Příkladem budiž zjištění, že různé urychlené ionty s podobným LET mohou poškozovat DNA odlišným způsobem a zabíjet tak buňky s nesterilní účinností. Stále také neumíme vysvětlit mnoho aspektů reparace DSB, například co rozhoduje o aktivaci určité reparační dráhy v místě konkrétního DSB a jak je tento výběr ovlivněn použitým ionizujícím zářením a strukturou chromatinu.

Diskutované výsledky mohou být mj. důležité z hlediska nově se rozvíjející hadronové terapie nádorových onemocnění a plánování pilotovaných meziplanetárních letů. Z metodického hlediska potom tato práce ilustruje obrovský pokrok, který se udal na poli optické mikroskopie a jejích výzkumných aplikací. Detailněji je představena metoda lokalizační mikroskopie s rozlišením jednotlivých molekul (SMLM – *single-molecule localization microscopy*).

## KLÍČOVÁ SLOVA

ionizující záření různých typů, radiační poškození DNA a reparace, reparační ohniska indukovaná ionizujícím zářením (IRIF), architektura chromatinu, superrozlišovací mikroskopie, lokalizační mikroskopie s rozlišením jednotlivých molekul (SMLM)

## SUMMARY

**Falk M., Hausmann M. Advances in research of DNA damage and repair in cells exposed to various types of ionizing radiation in the era of super-resolution optical microscopy**

The present work introduces new findings about the influence of different radiation types on the cells, with the concern on the micro- and nanodosimetric aspects of chromatin damage. Emphasized is the relationship between the physical parameters of the incident radiation ( $\gamma$ -rays, protons and high-LET heavy ions), character of chromatin damage, ability of cells to repair and survive DNA damage, and risk of genetic changes. While confirming a positive correlation between the LET of ionizing radiation, complexity of induced DNA double-strand breaks (DSB), and biological effectiveness (RBE) of radiation, at the same time, we show that our understanding of this relationship is only incomplete. Our discovery that various accelerated ions with similar LET can damage DNA in different ways and kill cells with unequal efficiency, could serve as an example. In addition, many aspects of DSB repair remain to be explained, for instance, how the cell activates the particular repair pathway at sites of individual DSBs, and how it depends on the radiation used and the chromatin architecture. The discussed results may be important, above all, for newly developing hadron therapy and in the context of manned interstellar flights planning. From the methodological point of view, we point to a tremendous progress in the field of optical microscopy and its research applications. In more detail, we introduce single-molecule localization microscopy (SMLM).

## KEYWORDS

ionizing radiation of different types, DNA radiation damaging and repair, ionizing radiation-induced foci (IRIF), chromatin architecture, super-resolution microscopy, single-molecule localization microscopy (SMLM).

## IONIZUJÍCÍ ZÁŘENÍ A JEHO STÁLE MYSTERIÓZNÍ HÁV

Působení ionizujícího záření (IZ) na lidské zdraví je dvousečné. Aplikováno v rámci radioterapie představuje jeden z doposud nejúčinnějších nástrojů pro eliminaci nádorů. Na druhé straně může vést ozáření, v závislosti na závažnosti expozice, k okamžité smrti organismu nebo rozvoji pozdních zdravotních následků, zejména nádorového bujení. IZ je schopno poškozovat biologické objekty už v relativně nízkých

dávkách, přičemž ho ale nedokážeme vnímat svými smysly. Proto si stále zachovává část svého odnepaměti mystického hávu. V současné době navíc existuje významné riziko zneužití IZ a obrovské energie jaderných reakcí a zcela vyloučit nelze ani jaderné nehody, případně s nedozírnými následky. Nedávno jsme si zrovna připomněli 30. výročí největší lidmi zapříčiněné nevojenské katastrofy v dějinách – havárie jaderné elektrárny v Černobylu. Jen málo fyzikálních fenoménů proto v lidech vyvolává tak protichůdné emoce jako IZ.

Ionizující záření navíc zůstává do určité míry mysteri-  
ózní i z biologického a medicínského pohledu, jelikož stále  
ne zcela rozumíme jeho účinkům na živé systémy (1, 2).  
Přestože poškození DNA bylo odhaleno jako kritický aspekt  
biologických účinků IZ a vcelku detailně se podařilo popsat  
i kaskádu buněčných procesů následně aktivovaných v rámci  
buněčné odpovědi na ozáření, řada zásadních otázek radiač-  
ního poškození buněk a organismů zůstává nezodpovězena  
(3). Jako příklad zásadního významu budiž uvedena naše  
neznalost biologických účinků nízkých a velmi nízkých dávek  
IZ (1). Tento palčivý problém se s lidstvem táhne již od objevu  
radioaktivity, a ani s dnešními technologiemi nejsme schop-  
ni rozhodnout, zda IZ v nízkých dávkách působí na buňky  
stejným způsobem a mechanismem jako při expozici dávkám  
vysokým. Debatuje se, zda nízké dávky IZ vyvolávají hyper-  
senzitivní odpověď, např. kvůli nedostatečné aktivaci repa-  
račních systémů DNA, nebo jsou naopak za jistých okolností  
pro buňky prospěšné díky permanentní mírné stimulaci  
reparačních systémů DNA a – na vyšších úrovních organi-  
zace organismu – imunitního systému (efekt hormeze) (1).  
Tyto protichůdné procesy mohou přitom působit paralelně.

Vezmeme-li v úvahu, že život vznikl v době výrazně vyš-  
ších dávkových příkonů IZ, než je tomu dnes, nelze dokonce  
vyložit, že buňky určitou nízkou úroveň záření ke svému  
životu potřebují. Prokázat nebo vyvrátit tuto hypotézu by  
mohly právě iniciované experimenty v nově budovaných  
„podzemních“ laboratořích s extrémně nízkým radiačním  
požadím. K těmto a podobným studiím však potřebujeme  
velice citlivé metody detekce poškození DNA, které byly až  
donedávna nedostupné a obšírněji se jim věnujeme i v tomto  
článku (4). Lepšímu porozumění účinků IZ na lidské zdraví  
brání také neodlišitelnost radiačně indukovaných procesů  
od spolupůsobení dalších faktorů prostředí a spontánní  
karcinogeneze.

Studium biologických účinků IZ se proto stále více pře-  
souvá na buněčnou a molekulární úroveň. Radiobiologický  
výzkum se tak neodmyslitelně váže k pokrokům v oblasti mi-  
kroskopie (dnes zejména superrozlišovací mikroskopie) nastí-  
něným dále (5, 6). Zde se zabýváme zejména vztahem mezi  
fyzikálními parametry různých druhů ionizujícího záření,  
architekturou buněčného jádra (chromatinu), mechanismy  
vzniku a charakteristikami DSB a organizací jejich reparace  
v prostoru a čase. Představujeme některé své výsledky v to-  
to směru, jež jsou důležité medicínsky, mohou přispět ke  
změně určitých radiobiologických paradigmat a podařilo se  
jich dosáhnout primárně s využitím mikroskopie. Zároveň  
ilustrujeme zásadní význam unikátní vlastnosti mikroskopie  
spočívající ve schopnosti přímé vizualizace radiobiologických  
dějů, navíc na multidimenzionální (mikro-, meso-, nano-)  
úrovni. Princip superrezolučních mikroskopických metod  
překonávajících Abbeho (Rayleighův) difrakční limit je vy-  
světlen na příkladu superrezoluční lokalizační mikroskopie

(SMLM – *single-molecule localization microscopy*) (7, 8), hojně využí-  
vané v našem výzkumu. Pro detailní popis experimentálních  
metod a procedur pojících se k prezentovaným výsledkům  
nicméně odkazujeme na příslušné citované práce. Druhy  
IZ, k nimž se výsledky vztahují, a základní charakteristiky  
těchto záření jsou shrnuty v tab. 1.

## OBJEV OHNISEK REPARAČNÍCH PROTEINŮ INDUKOVANÝCH ZÁŘENÍM (IRIF) A JEJICH MIKROSKOPICKÁ VIZUALIZACE – ZÁSADNÍ PŘELOM V RADIOBIOLOGII

Ačkoliv některé naše studie i výzkumy jiných laboratoří  
začínají poukazovat na význam cytoplazmatického radiač-  
ního poškození buněk (9–11), jaderný chromatin zůstává i nadá-  
le kritickým cílem IZ. Nejnebezpečnějším typem poškození  
DNA jsou jen těžko opravitelné dvouřetězcové zlomy (DSB)  
této molekuly, které nejúčinněji indukuje IZ (4).

V řádu několika minut po ozáření dochází v místech DSB  
v rámci jejich reparace (*viz níže*) k fosforylaci histonu H2AX  
na serinu 139 (12). Tato fosforylace zahrnuje přibližně 2 Mb  
chromatinu, čímž se v buněčném jádře formují mikroskopic-  
ky vizualizovatelné oblasti takto modifikovaného histonu,  
označované jako ohniska  $\gamma$ H2AX. Tato ohniska následně  
fungují jako signál poškození DNA podílející se na iniciaci  
a regulaci reparace DNA. Přítomnost ohnisek  $\gamma$ H2AX zároveň  
rozhoduje o řadě procesů doprovázejících reparaci DNA,  
například o zástavě a reaktivaci buněčného cyklu a v případě  
závažného poškození o spuštění apoptózy (4). Ohniska  $\gamma$ H2AX  
v místech DSB v kooperaci s dalšími proteiny navozují struk-  
turu chromatinu vhodnou pro průběh reparace a vytvářejí  
platformu pro sestavení složitých reparačních komplexů  
(13). Jednotlivé reparační proteiny tak v časově specifické  
sekvenci a množství postupně kolokalizují s  $\gamma$ H2AX, čímž  
se formují tzv. zářeníem indukovaná ohniska (IRIF – *ionizing  
radiation-induced foci*).

Jelikož pro řídicí ionizující záření (rtg,  $\gamma$ ) koreluje počet  
reparačních ohnisek úzce s počtem DSB (4), představují IRIF  
kvantitativní, a v dnešní době dokonce nejcitlivější marker  
DSB (*obr. 1*). Ve většině radiačních situací tak lze prostým spo-  
čítáním IRIF v jádře odvodit (s korekcemi na čas uplynulý od  
ozáření) buňkami absorbovanou dávku IZ. Vede-li absorbovaná  
dávka 1 Gy záření  $\gamma$  k vytvoření přibližně 30 IRIF v buněčném  
jádrě, pak 1 IRIF odpovídá detekovatelné dávce v řádu desítek  
mGy (4). Této citlivosti nedosáhneme sledováním žádného  
jiného biomarkeru, např. mikrojadra, chromosomových  
translokací či jiných aberací. Vystačíme si přitom se stan-  
dardní imunofluorescenční mikroskopii nebo průtokovou  
cytometrií. Pomocí IRIF navíc měříme přímo rozsah poško-  
zení DNA, a nikoliv až následky nepřesné reparace tohoto  
poškození (chromosomové aberace, mikrojadra), jež závisejí  
na typu buněk, jejich stavu a dalších faktorech (4). Objev

**Tab. 1** Druhy ionizujícího záření vztahující se k diskutovaným výsledkům a jejich základní parametry

IZ	Z	Geometrie [°]	Energie [MeV/n]	LET [keV/μm]	Částic na jádro
$\gamma$ ( $^{60}\text{Co}$ )	–	90	1,33 + 1,17	0,3	mnoho
$\text{p}^+$	1	90	30	1,9	mnoho
$^{11}\text{B}$	5	10	7,5	148,3	3,3
$^{15}\text{N}$	7	10	13,1	181,4	2,1
$^{20}\text{Ne}$	10	10	33,9	170,9	2,7

Pozn.: Sloupec „geometrie“ určuje, pod jakým úhlem byla ozářena buněčná monovrstva. Z = protonové číslo.

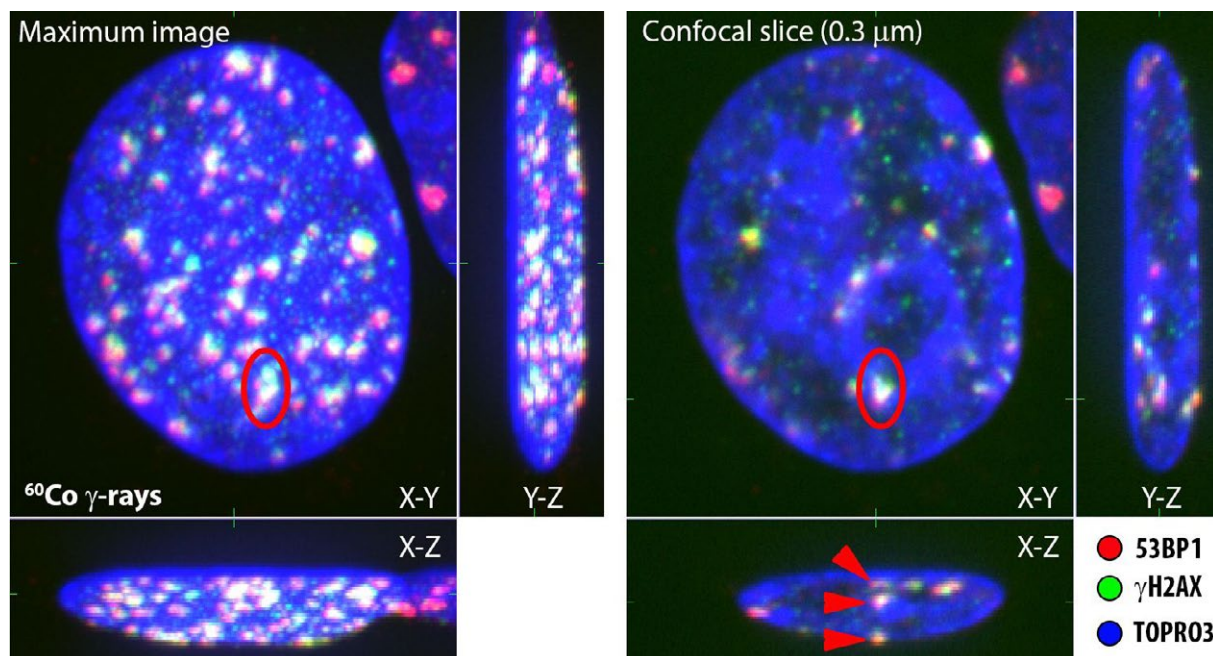


detekce ohnisek  $\gamma$ H2AX a asociovaných reparačních proteinů proto představuje v radiobiologii zásadní přelom s rozsáhlými aplikacemi výzkumnými (2, 4, 14) i biodozimetrickými (15).

Pro vysoké dávky v řádu Gy přetrvávají IRIF v buňkách po řadu dnů až týdnů od ozáření. Možnost jejich detekce je tak časově limitovaná, a navíc i poměrně náročná. Obdobně jako jiné biodozimetrické markery (14, 16) proto přináší kvantifikace IRIF užitek především v situacích, kdy nemáme k dispozici přesná fyzikální dozimetrická měření, nebo pokud potřebujeme přímo sledovat radiační poškození specifických tkání, či dokonce buněk exponovaného organismu. Kvantifikace IRIF zároveň představuje metodu pro odhad individuální radiosenzitivity nebo radiosenzitivity různých typů buněk (např. nádorových vs. krevních) (17), byť korelace mezi perzistujícími IRIF a radiosenzitivitou zůstává diskutována. Do těchto scénářů spadá např. triáž ozářených osob v případě rozsáhlé radiační nehody nebo identifikace pacientů hypersenzitivních k záření před započítím radioterapie. V obou případech používáme k měření lymfocyty periferní krve, které lze snadno získat, a navíc se nacházejí uniformně ve fázi G0 buněčného cyklu, což stanovení dávky zpřesňuje. Lze uvažovat také o přímém preterapeutickém testování reparační kapacity nádorových buněk u jednotlivých pacientů. Musíme však vést v patrnosti, že odpověď nádoru může být ovlivněna nejen reparačními schopnostmi, ale i řadou dalších faktorů, zejména hypoxií. Své předběžné výsledky v tomto směru podrobněji diskutujeme v článku Horáková et al. v tomto vydání a v citované publikaci Falk et al. (17). Detekce IRIF nás tak přivádí o krok blíže k personalizované léčbě.

V případě hromadných událostí může být praktičtější stanovovat počty DSB prostřednictvím měření integrální intenzity signálu  $\gamma$ H2AX pomocí průtokové cytometrie, která je ve srovnání s mikroskopií rychlejší, umožňuje analýzu obrovského množství buněk a poskytuje vyšší možnosti automatizace. Nicméně i v praktických situacích nabízí mikroskopie oproti průtokové cytometrii několik výhod, plně docenitelných zejména v případě „nestandardních“ radiačních situací (např. vystavení astronautů smíšeným radiačním polím), kdy mikrodózimetrická topologie IRIF dovoluje usuzovat (kromě dávky dané počtem IRIF) také na druh incidentního záření, tedy jeho LET a RBE (obr. 2). Kvantifikace pouze těch IRIF, kde spolu kolokalizuje  $\gamma$ H2AX s některým z reparačních proteinů (např. 53BP1), přitom zpřesňuje určení počtu DSB a odhad dávky (1, 2, 4, 14).

Zdůraznit však musíme zejména příspěvek vědecko-výzkumný. Pouze mikroskopie dovoluje přímo zkoumat vzájemné prostorově-časové vztahy mezi ohnisky  $\gamma$ H2AX, reparačními proteiny a prostředím v okolí DSB (architekturou chromatinu, jeho epigenetickými modifikacemi atd.) (obr. 1) (2, 4). Tato skutečnost s sebou přináší bezprecedentní experimentální potenciál, a objev IRIF a jejich mikroskopické vizualizace tak představuje milník v (radio)biologickém výzkumu. Navíc lze analyzovat účinky IZ individuálně v jednotlivých, případně i živých buňkách (18, 19). Význam této přednosti spočívá nejen v možnosti kontinuálního sledování zkoumaných procesů, ale také ve skutečnosti, že jednotlivé buňky v populaci se vyskytují v různých fázích buněčného cyklu, charakteristických preferovanými reparačními mechanismy a různou radiosenzitivitou. Průměrování výsledků pro všechny buňky, jak k němu dochází



**Obr. 1** Detekce ohnisek IRIF ( $\gamma$ H2AX = zelená, 53BP1 = červená) pomocí imunofluorescenční konfokální mikroskopie.

Vlevo: 2D obraz jádra (TOPRO3, modrá) lidského kožního fibroblastu, ozářeného 4 Gy záření gama, vytvořený superpozicí 30 optických řezů silných 0,25  $\mu$ m (tzv. maximální obraz).

Vpravo: Konfokální řezy stejným jádrem (0,25  $\mu$ m) v rovinách x-y, x-z a y-z protínajících vyznačený (červená elipsa) klastr ohnisek IRIF. Červené šipky na řezu rovinou x-z demonstrují, jak lze pomocí 3D fixace preparátů a konfokální mikroskopie odlišit v 3D prostoru jednotlivé IRIF, jež spolu v 2D prostoru splývají. Konfokální řez jádrem zároveň ukazuje pozice IRIF vůči strukturálně a funkčně specifickým chromatinovým doménám – euchromatinu (tmavě nebo slabě barvené oblasti) a heterochromatinu (intenzivní modrá). Studovat lze též různý rozsah kolokalizace ohnisek  $\gamma$ H2AX s proteinem 53BP1 a další morfologické parametry IRIF na mikroskopické úrovni.

Rozměr horizontální hrany snímků je cca 10  $\mu$ m.

například při experimentech prováděných na izolovaném buněčném materiálu, proto často vede k zamaskování některých důležitých jevů, nebo dokonce dezinterpretaci výsledků. Pro výzkumné účely má zásadní význam také skutečnost, že při použití vhodných postupů fixace můžeme studovat stejné vzorky současně pomocí různých mikroskopických metod, včetně superrozlišovací a elektronové mikroskopie, a rekonstruovat tak objekty zájmu (zde IRIF) na vzájemně korelované mikro → mezo → a nano úrovni (2, 3, 20, 21).

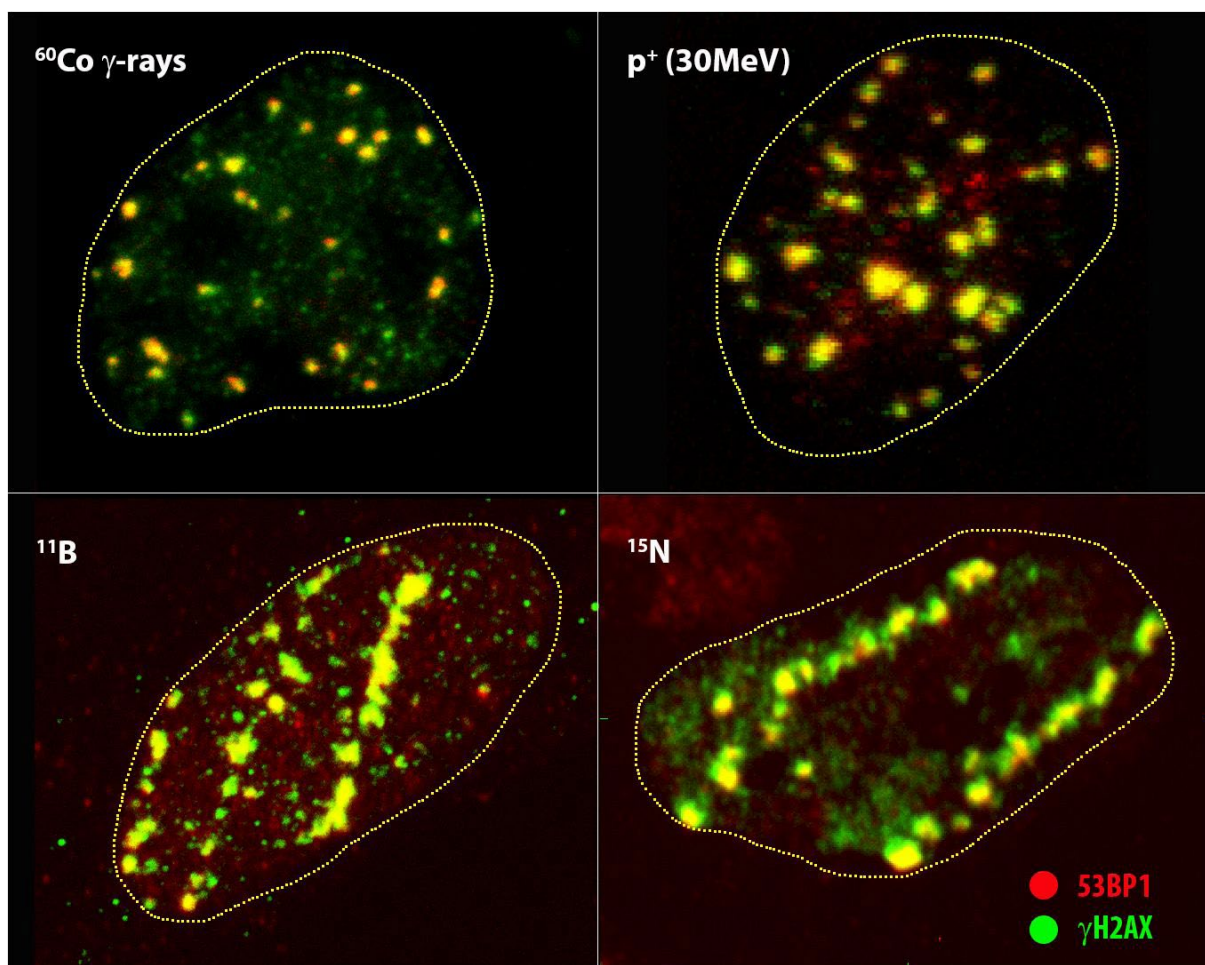
V následujících kapitolách se budeme podrobněji věnovat významu architektury chromatinu s ohledem na vznik DSB a IRIF v buňkách exponovaných různým typům ionizujícího záření a následně regulaci reparace DSB.

### STRATEGIE REPARACE DSB, GLOBÁLNÍ A LOKÁLNÍ FAKTORY JEJÍ REGULACE

Reparační mechanismy DNA (22) bez nadsázky umožňují buněčný život v jeho známé podobě. Kromě následků ozáření

vznikají DSB také účinkem dalších environmentálních faktorů (23, 24), především však následkem samotných vitálních procesů v buňce (22). DNA je tak permanentně poškozována a neobejde se bez účinných opravných systémů.

V lidských buňkách operují dvě základní dráhy reparace DSB – nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR) – a některé záložní (nebo též alternativní) mechanismy, které do různé míry spojují principy NHEJ a HR, a jejichž klasifikace je proto stále nejednotná. Dnes již známe poměrně detailně postupné biochemické kroky jednotlivých reparačních drah (22). Zůstává však záhadou, jaké jsou mezi NHEJ, HR a případně dalšími mechanismy oprav DSB vzájemné vztahy, zejména jak se buňka rozhoduje pro aktivaci určitého mechanismu v místě konkrétního DSB. Přitom je třeba zdůraznit, že výběr reparační dráhy v kontextu okolního prostředí představuje kritický moment opravy DSB, protože určuje rychlost – a zejména pak výsledek – celého úsilí s ohledem na přežití buňky a riziko mutagenese. Nalezení účinných technik inhibice nebo naopak



**Obr. 2** Mikroskopická struktura a jaderná distribuce ohnisek IRIF ( $\gamma\text{H2AX}$  = zelená, 53BP1 = červená) generovaných indikovanými druhy ionizujícího záření vzájemně se lišícími energií a lineárním přenosem energie (LET) (viz tab. 1).

Snímky představují maximální obrazy vytvořené superpozicí 30 optických konfokálních řezů silných  $0,25\ \mu\text{m}$  (tzv. maximální obraz). Prerušovaná čára vyznačuje oblast buněčného jádra, jehož barvení zde bylo vynecháno za účelem lepšího zviditelnění struktury IRIF. Dolní obrázky dobře ilustrují multiplicitu IRIF a jejich klastrování v buňkách ozářených urychlenými ionty s vysokým LET. V případě protonů s energií 30 MeV vidíme spíše obraz odpovídající záření gama (vlevo nahoře) v souladu se vzájemně podobným nízkým LET než urychlenými ionty ve spodním řádku. Přesto si nemůžeme nevšimnout několika mnohočetných/klastrovaných IRIF. Rozměr horizontální hrany snímků je cca  $10\ \mu\text{m}$ . Rozměr horizontální hrany snímků je cca  $10\ \mu\text{m}$ .



podpory aktivity specifických reparačních procesů tak může představovat důležitý a značně univerzální terapeutický prostředek, aplikovatelný například v radioterapii nádorů, léčbě některých nemaligních (zejména neurodegenerativních) onemocnění a boji proti stárnutí.

Ve fázi G2 (25) mohou buňky následovat dvě reparační strategie, z nichž každá má své logické opodstatnění. V prvním případě buňka iniciuje reparaci primárně jako NHEJ, která díky své rychlosti poskytuje šanci na včasný průběh reparace, zejména u organismů s velkými genomy. Přestože NHEJ trpí určitou nepřesností (v místech zlomů dochází zejména k malým delecím či inzercím), dokáže ve velké míře zabránit vzniku chromosomových aberací, které jsou pro buňku často smrtelné. Jelikož v lidském genomu tvoří kódující sekvence pouze asi 2 %, lze riziko vzniku mutací v důležitých genech následkem NHEJ považovat za relativně malé a více než vykompenzované jejím přínosem.

S ohledem na evoluční stáří HR, dominantní úlohu tohoto mechanismu u kmenových buněk a v souladu s jeho výrazně vyšší přesností oproti NHEJ však nezní nelogicky ani opačný scénář, kdy primární HR přechází v NHEJ tehdy, nemůže-li rekombinace úspěšně pokračovat (25). Ať už však buňka zahajuje NHEJ primárně nebo až po selhání HR, NHEJ (nebo alternativní mechanismy spojování konců DNA – viz dále) opravují cca 70 % DSB vytvořených řídce ionizujícím zářením, a to jak ve fázi buněčného cyklu G1, tak i G2. Vysoce precizní, nicméně pomalou HR tudíž patrně aktivují pouze určité DSB. Kromě HR a NHEJ navíc existují i již zmíněné reparační dráhy, jež svým mechanismem leží někde mezi výše uvedenými klasickými drahami a jsou vysoce mutagenní. Považujeme je proto za alternativní nebo záložní způsoby oprav DSB (22). Tyto reparační dráhy využívají pro rekombinaci krátké homologie, takže nepotřebují ke svému průběhu sesterské chromatidy a mohou potenciálně probíhat během celého buněčného cyklu.

Extenzivní resekce DNA, a tudíž HR je v lidských buňkách ve fázi G1 obecně inhibována. Předpokládalo se proto, že HR je tímto cílena pouze na fázi buněčného cyklu S/G2, kdy jsou dostupné sesterské chromatidy pro bezchybnou (*error-free*) reparaci. Výsledky prezentované letos na konferenci ICRR v Manchesteru nicméně toto paradigma mění odhalující, že HR, byť za specifických situací, probíhá během celého buněčného cyklu. DSB v intenzivně transkribovaných genomových lokusech jsou reparovány pomocí HR s využitím nascentní RNA jakožto reparačního templátu namísto sesterské chromatidy (26). Tento objev přináší logické a velmi očekávané rozuzlení problému, jak buňka chrání důležité (geneticky aktivní) lokusy genomu před mutacemi nejen ve fázi S/G2, ale také G1. Dále se například ukázalo, že myší embryonální kmenové buňky jsou na HR dominantně závislé v průběhu celého buněčného cyklu, přičemž ve fázi G1 slouží jako templát pro rekombinaci homologické chromosomy (27).

Buněčný cyklus je tudíž důležitý, nikoli však jediný faktor ve výběru reparační dráhy. Jasně se ukazuje, že výběr nejvhodnější reparační dráhy neřídí pouze „globální“ faktory, jako již zmíněný buněčný cyklus a například též buněčný typ, stupeň diferenciace (27–30). Velice záleží též na faktorech lokálních, jež se liší pro jednotlivé DSB. Prvním známým lokálním faktorem byly chemické vlastnosti zlomených konců DNA. Později se ukázalo, že výběr reparační dráhy ovlivňuje i řada dalších vzájemně provázaných lokálních faktorů daných in-

terakci incidentního záření s chromatinem. Zásadní význam přitom mají nejen specifické vlastnosti záření (zejména LET) a chromatinu (architektura, epigenetický kód, transkripční aktivita, lokalizace v buněčném jádře), ale zejména jejich výsledná kombinace (31).

Abychom shrnuli výše řečené, různé studie naznačují, že prostřednictvím HR jsou reparovány především těžko opravitelné DSB nebo DSB nalézající se v genomických lokusech s vysokou potřebou zachování nepoškozené genetické informace, tedy uvnitř aktivně transkribovaných genů (32). Těžko opravitelné DSB přitom zahrnují jednak mnohočetné a/nebo komplexní léze, jednak DSB lokalizované v architektonicky nevýhodných chromatinových doménách, např. v heterochromatinu. Situace bude patrně ale komplikovanější (33). Například komplexní/mnohočetné DSB musí buňka umět opravit nejen ve fázi buněčného cyklu G2, ale též ve fázi G1. Heterochromatin zase představuje pro HR velmi nebezpečný substrát, poněvadž umožňuje nelegitimní rekombinaci mezi repetitivními sekvencemi (34), přítomnými zde ve velkém množství (viz dále). Architektura chromatinu tudíž hraje kritickou roli v mnoha aspektech tvorby i reparace DSB.

### ARCHITEKTURA CHROMATINU A IRIF – KRITICKÉ FAKTORY V TVORBĚ DSB A REGULACI JEJICH REPARACE?

Relativně nedávno odhalila Penny Jeggová se svými spolupracovníky a řada dalších badatelů, že zatímco pro reparaci DSB v euchromatinu postačují tzv. korové proteiny NHEJ, tentýž proces v heterochromatinu se neobejde bez řady dalších proteinů a probíhá pomaleji (32). Reparace DSB tudíž vykazuje dvoufázovou (rychlou a pomalou) kinetiku nejen ve fázi buněčného cyklu G2, kde spolupůsobí principiálně rozdílné NHEJ a HR, ale i ve fázi G1, kde tento fenomén nelze objasnit kooperací NHEJ a HR. Vysvětlení naopak nabízí architektura poškozených chromatinových domén.

Otázkou, kterou se aktuálně zabýváme, je, zda se může architektura chromatinu podílet na tvorbě architektury IRIF a spolu s ní potom na regulaci reparačních procesů a případně i výběru určité reparační dráhy v místě konkrétního DSB (3, 20, 35, 36). Jelikož každý protein plní v rámci reparace DSB jiné úkoly a reparace probíhá v různém chromatinovém prostředí, lze očekávat, že se budou lišit také strukturní parametry jimi tvořených IRIF. Záření navíc deponuje svou energii stochasticky, což se projevuje značnou heterogenitou radiačně indukovaných DSB, přičemž na LET záření zásadním způsobem závisí i vzájemné topologické uspořádání DSB/IRIF v jádře. Můžeme proto předpokládat, že architektura a časová dynamika reparačních komplexů IRIF odráží zvolený reparační mechanismus, nebo dokonce přispívá k jeho výběru. Zda může architektura raných IRIF následně ovlivňovat další vývoj IRIF, a tudíž reparační procesy, je nyní předmetem intenzivního výzkumu (31).

V následujícím textu představíme některé indicie významně naznačující, že kromě „biochemického“ stavu buňky a fáze buněčného cyklu sehrávají důležitou roli ve výběru reparačních drah i strukturální aspekty DSB lézí a obklopujícího chromatinu. Lze se domnívat, že kompozici a strukturu formujících se IRIF stejně jako jejich dynamický vývoj v čase ovlivňují nejen biochemické interakce mezi reparačními proteiny, ale i nejrůznější další faktory, souhrnně se takto podílející na selekci a následném průběhu vybrané reparační dráhy v místě daného DSB. Jedním z těchto faktorů, jak se



stále více ukazuje, je patrně lokální architektura chromatinu v místě daného DSB.

Existenci vzájemných vztahů mezi architekturou chromatinu v místě DSB, architekturou IRIF, mechanismem reparačních procesů, a dokonce i mechanismem vzniku chromosomových aberací podporuje řada prací srovnávajících tvorbu a reparaci DSB v geneticky aktivním a strukturně „otevřeném“ euchromatinu, a naopak neaktivním a kondenzovaném heterochromatinu. Kromě obecného zjištění, že transkripčně neaktivní oblasti genomu jsou méně náchylné k indukci DSB řídké ionizujícím zářením (rtg,  $\gamma$ ) než oblasti intenzivně transkribované, zároveň však trpí mnohem většími obtížemi během reparace, se nám spolu s dalšími autory podařilo odhalit zajímavé role architektury chromatinu v (de) regulaci reparace DSB (37, 38). Příčinu pozorovaných rozdílů představuje nejen stupeň kondenzace chromatinu, ale jeho komplexní architektura v širším slova smyslu daná asociací se specifickými strukturními proteiny, např. HPI. Navázané proteiny totiž na jednu stranu chrání DNA před účinky nebezpečných volných radikálů vznikajících radiolýzou vody, na stranu druhou ovšem komplikují aktivitu reparačních enzymů (37, 38).

Aby mohly být DSB v kondenzovaném heterochromatinu opraveny, musejí se poškozené domény ještě před zahájením vlastní reparace podrobit rozsáhlé dekondenzaci a reorganizaci (34, 39). Zatímco k resekci DNA a pokrytí ssDNA konců proteiny RPA1 dochází již uvnitř kondenzované domény, k výměně RPA1 za rekombinázu RAD51, která je pro průběh HR nezbytná, může dojít až po dekondenzaci heterochromatinu. Dekondenzace heterochromatinu je patrně nezávislá na aktivitě ATM kinázy (18) a zdá se, že minimálně z velké části se jedná o proces řízený fyzikálními silami. Zdůrazněme též, že dekondenzace heterochromatinu se děje beze změny jeho originálního epigenetického kódu, a způsobuje tak dočasné rozpojení dvou až doposud úzce propojených regulačních systémů – epigenetického kódu a fyzické architektury chromatinu. Nezměněný epigenetický kód tak patrně uchovává informaci pro rekonstrukci chromatinu po reparaci (brání epimutacím) (40), zatímco architektura chromatinu definovaná fyzikálními procesy dočasně přebírá kontrolu nad HR. Pro úspěšný průběh HR musí dekondenzaci domény následovat ještě reorganizace poškozeného chromatinu na nano úrovni (34). Tento proces patrně zprostředkovává spolu s dalšími proteiny kináza ATM, která je pro reparaci v heterochromatinu nezbytná ve fázi buněčného cyklu G2 i G1 a dříve se předpokládalo, že zodpovídá právě za dekondenzaci. Situace však není doposud jasná, protože ve fázi G1 probíhá reparace heterochromatických DSB bez klasické rekombinace, přesto však závisí na ATM. Za zmínku stojí, že taktéž ribosomové geny protrudují během reparace DSB mimo jadérko a těžko opravitelné DSB jsou u některých organismů (např. kvasinek) transportovány a přichyceny k jaderné obálce (31).

Nutnost uvedených reorganizačních kroků tak poukazuje na přesnou vícestupňovou regulaci reparace DSB, zde konkrétně HR, a důležitost architektury chromatinu a fyzikálních procesů obecně v tomto procesu. Popsaný scénář také vysvětluje pomalejší průběh reparace DSB v heterochromatinu a zároveň odhaluje zajímavý způsob, jakým buňka řeší paradox s reparací heterochromatických DSB. Komplexní architektura chromatinu na jednu stranu preferuje reparaci pomocí HR. Heterochromatin však zároveň obsahuje mnoho repetit, které zvyšují riziko nelegitimní rekombinace a vzní-

ku chromosomových translokací (31, 39) (čemuž se věnujeme v poslední kapitole tohoto článku).

Získané výsledky tak kolektivně naznačují, že lokální architektura chromatinu může ovlivňovat vytváření a architekturu IRIF, a tudíž i mechanismus, kinetiku a přesnost reparace DSB. Existence nespočetných globálních a lokálních faktorů podílejících se na rozhodování o aktivaci určité reparační dráhy v místě jednotlivých DSB vede k zamyšlení, jak buňka dokáže tyto často protichůdné podněty vyhodnotit natolik rychle a spolehlivě, aby byla schopna včas zahájit nevhodnější reparační proces. V kontextu výše uvedeného se nabízí hypotéza, že architektura IRIF, formující se na základě komplexních okolních podmínek, může představovat integrující signál jednotlivých faktorů, který je pro buňku snadno a rychle interpretovatelný (31). Možnosti pro ověření této hypotézy se nyní otvírají s rozvojem superrozlišovací technik optické mikroskopie.

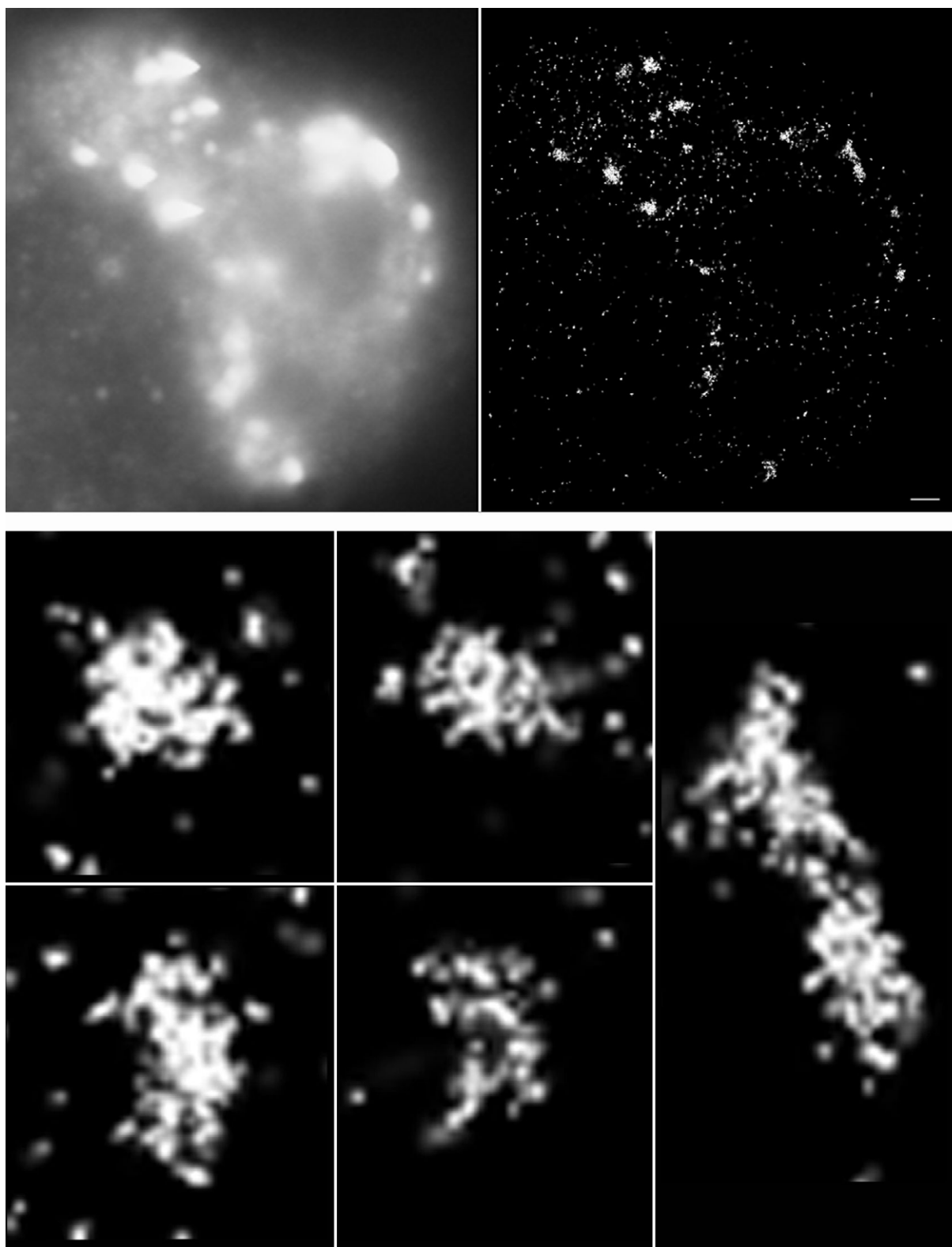
## NÁHLED DO BUDOUČNA - PŘINESE ROZVOJ SUPERROZLIŠOVACÍ MIKROSKOPIE REVOLUCI V NAŠEM POROZUMĚNÍ ARCHITEKTONICKÝM ASPEKTŮM REPARACE DSB?

Na základě výše uvedených příkladů, našich dřívějších prací (4, 14, 38, 39, 41–43) a dnes již velmi obšírné literatury můžeme konstatovat, že studium kinetiky tvorby a zániku ohnisek  $\gamma$ H2AX a kolokalizujících reparačních proteinů pomocí konfokální mikroskopie stojí z velké části za dnešním porozuměním biochemickým procesům spojeným se vznikem radiačního poškození DNA a jeho reparací. Mikroskopie, jakožto unikátní metoda v tomto směru, nám navíc otevřela dveře také k poznání organizace reparačních procesů v časoprostoru (4).

Přestože standardní optická mikroskopie prokázala a nadále prokazuje svoji nezastupitelnost zdaleka nejen v radiobiologickém výzkumu, chceme-li proniknout do skutečné podstaty vzniku radiačního poškození a reparace DNA, musíme se s mikroskopií ponořit ještě hlouběji, až na úroveň interakcí mezi jednotlivými molekulami (3, 20, 21, 35, 36, 44, 45). Zatímco však konfokální mikroskopie umožňuje sledovat tvorbu a dynamický vývoj IRIF, a do jisté míry i jejich kompozici a strukturu okolního chromatinu, pro detailní popis těchto objektů a souvisejících procesů na molekulární úrovni je nabízené rozlišení nedostatečné (43).

Donedávna tím pádem byla jedinou alternativou elektronová mikroskopie, jež sice nabízí bezprecedentní rozlišení, avšak za cenu poměrně destruktivní fixace vzorků a nutnosti jejich rozřezání na ultratenké řezy. Vizualizace prostorových struktur v nepoškozeném stavu je tak často velmi problematická a pozorování mohou být zatížena nejrůznějšími experimentálními artefakty. Vlastnosti reparačních komplexů a poškozeného chromatinu v rozlišovací oblasti mezi pozorovací úrovní mikroskopie optické (200 nm) a elektronové (nanometry), která je pro biologické systémy kritická, proto zůstávaly dlouho ukryty v pomyslné Pandořině skříňce (2).

Za zásadní průlom nejen v radiobiologii lze proto považovat vynález průkopnických metod superrozlišovací optické mikroskopie (3, 8, 21), kterým se různým způsobem podařilo prolomit Abbeho difrakční limit a přiblížit se svou rozlišovací schopností k hranici 10 nm (obr. 3). Toto rozlišení sice stále nedosahuje hodnot elektronové mikroskopie, je však již natolik velké, že přináší možnost vizualizovat jednotlivé



**Obr. 3** Vizualizace  $\gamma$ H2AX v jádře téhož buněčného jádra pomocí standardní imunofluorescenční mikroskopie (A) a lokalizační mikroskopie s rozlišením jednotlivých molekul (SMLM) (B).

Obraz B byl vytvořen uměle na základě matice koordinát získaných ze 4000 snímků pomocí SMLM v průběhu času po vysvícení vzorku silným laserem. Obraz C představuje detailní zobrazení nanostruktury vybraných molekulárních klastrů  $\gamma$ H2AX z panelů A a B.

molekuly při zachování většiny výhod standardní optické mikroskopie. Popis jednotlivých superrezolučních mikroskopických technik jde nad rámec této práce, a čtenáře tak odkazujeme na dříve publikované články (8). Zde se omezíme jen na vysvětlení principu metody SMLM (*single-molecule localization microscopy*), jejíž aplikaci v kombinaci s konfokální mikroskopií pro řešení stěžejních radiobiologických otázek se budeme následně věnovat (46).

SMLM patří mezi metody lokalizační superrozlišovací mikroskopie a její obrovská výhoda zahrnuje, kromě dříve nepředstavitelného optického rozlišení kolem 10 nm, také stejný způsob přípravy vzorků a jejich značení jako při standardní konfokální mikroskopii (3, 8, 20, 21). Jedinou podmínkou je, aby značící fluorochromy dokázaly po iniciálním vysvícení „blikat“, jak vysvětlíme níže. Nabízí se tak unikátní příležitost studovat stejné vzorky pomocí standardní konfokální mikroskopie a SMLM. Tuto výhodu sledujeme z hlediska studované problematiky jako naprosto zásadní, protože dovoluje získat korelované výsledky pro tytéž preparáty na mikro-, mezo- a nanoúrovni (3, 45). Vzájemné porovnání těchto multidimenzionálních dat nám může poskytnout zcela nové vhledy do mechanismů radiačního poškození DNA a její reparační. Nezanedbatelný přínos má souběžné použití konfokální mikroskopie a SMLM také z metodologického hlediska, zejména s ohledem na interpretaci získaných výsledků, komplikovanou v případě samotné SMLM zcela novým charakterem generovaných dat. Korelace výstupů SMLM a konfokální mikroskopie tak může s využitím znalostí již dříve dostupných na mikroskopické úrovni pomoci pochopit nové poznatky plynoucí ze SMLM.

Prolomení Abbeho limitu otvírající dveře k superrozlišení spočívá v případě SMLM na principiálně velmi jednoduchém triku – separaci signálů jednotlivých fluorochromů v čase (8, 47). Nejdříve je pomocí standardní mikroskopie v širokém poli (*widefield*) pořízen orientační obraz sledovaného objektu (*obr. 3*), v našem případě buněčného jádra s imunofluorescenčně značenými histony  $\gamma$ H2AX a/nebo dalšími reparačními proteiny podílejícími se na tvorbě IRIF. Tímto získáme představu o vlastnostech (orientační počet, distribuce) IRIF v rámci celého jádra. Za dané situace svítí současně všechny molekuly fluorochromů, takže jejich signály se překrývají a vzájemně interferují, díky čemuž lze dosáhnout jen běžného rozlišení. Vysvítíme-li však následně všechny fluorochromy silným laserovým pulzem (v řádu  $\text{kW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), uvedeme je do dočasně nesvítivého stavu, z něhož náhodně přecházejí do stavu dočasně svítivého — blikají. V každém okamžiku tak září pouze určitý malý počet fluorochromů, což nám poskytuje příležitost izolovat jejich signály v prostoru a čase. Za této podmínky nedochází k vzájemné interferenci mezi signály, a intenzitní profil každého z nich tak můžeme proložit Gaussovou funkcí a s velmi vysokou přesností určit pozici jeho barycentra. Pořízením časové série několika tisíc obrázků pozorovaného objektu s krátkým rozestupem (100 ms) pak získáme matici přesných souřadnic všech signálů a jejich dalších parametrů, včetně chyb měření. Tyto matice lze přímo podrobit nejrůznějším matematickým výpočtům (36) bez nutnosti často velmi obtížné analýzy obrazu, bez které se u většiny ostatních mikroskopických technik neobejdeme. Na druhou stranu můžeme jak ze surových tak i matematicky zpracovaných dat zkonstruovat umělý obraz pointilistického charakteru a jeho prostřednictvím vizuálně demonstrovat odhalené fenomény (*obr. 3*) (3, 21, 36, 46). Ještě podotkneme, že byť pointilistický obraz působí pro nezkuše-

né oko jako méně přirozený a přinášející méně informací ve srovnání se „standardním“ obrazem, opak je ve skutečnosti pravdou. Pointilistický obraz se totiž mnohem více blíží realitě, jelikož neobsahuje šum vznikající interferencí signálů, na něž si už naše mozky přivykly.

Jako příklad využití SMLM v radiobiologii uvedme právě probíhající analýzy nanostruktury ohnisek IRIF, konkrétně  $\gamma$ H2AX a vybraných reparačních proteinů účastnících se NHEJ a/nebo HR v buňkách vystavených různým druhům IZ. Přestože se výzkum teprve rozbíhá, už dnes můžeme říci, že ohniska  $\gamma$ H2AX v heterochromatinu vykazují jiné strukturální znaky a větší vzájemnou homogenitu než korespondující ohniska v euchromatinu (20, 46).

Zjistili jsme také, že struktura IRIF a jejich proteinová kompozice, respektive poměr reparačních proteinů detekovaných uvnitř a mimo ohniska IRIF se liší pro různé typy buněk, alespoň pro normální lidské kožní fibroblasty a radiorezistentní buňky U87 derivované z glioblastomu, jež byly doposud do naší studie zahrnuty (3). Přitom se zdá, že tyto strukturální a kompoziční odlišnosti korelují s efektivitou reparační DSB a viabilitou buněk po ozáření. V článku Bobkové et al. (3) jsme například dospěli k poznatku, že buňky U87 potřebují k vytvoření IRIF a následující reparační menší frakci jaderného proteinu 53BP1 než normální lidské kožní fibroblasty. Z měření postiradiačních změn velikosti ohnisek IRIF a počtu molekul proteinu 53BP1 v těchto ohniscích zároveň vyplývá, že zatímco kinetika reparační DSB v buňkách U87 se obecně podobá normálním fibroblastům, prvně jmenované buňky si dokážou efektivněji poradit s nebezpečnými klastrovanými lézemi DSB. Tato naše strukturální zjištění dobře korelují s vysokou radiorezistencí nádorových buněk U87.

Co nám tedy superrozlišovací techniky odhalují o povaze a funkcích IRIF? Dnes dostupné výsledky vykrešlují mikroskopicky detekovatelné IRIF jako klastry nanoskopických ohnisek  $\gamma$ H2AX a reparačních proteinů (3, 20, 21, 36, 46, 47). Zda se jedná o funkční a organizovanou nanostrukturu v rámci jednoho IRIF, klastr více IRIF (DSB) na mikroskopické úrovni nerozlišitelných, nebo jen artefakt imunofluorescenčního značení projevující se při takto vysokém rozlišení, zůstává předmětem dalšího bádání. Vzhledem ke skutečnosti, že jednotlivé reparační proteiny vytvářejí nestejně velké a strukturované nanoklastry, různým způsobem kolokalizující s ohnisky  $\gamma$ H2AX, jeví se zatím jako nejpravděpodobnější první možnost (3, 20, 21, 36, 46, 47). Tento závěr podporuje i skutečnost, že počty nanoklastřů  $\gamma$ H2AX pozorované v chromatinu buněk vystavených určité dávce záření řádově převyšují hodnoty očekávané z dosavadních měření pomocí standardní konfokální mikroskopie a některých dalších metod (např. pulzní elektroforézy) (44).

Představená pozorování tak kromě zcela nových vhledů do nanostruktury IRIF a okolního chromatinu velmi dobře ilustrují nutnost vzájemné korelace často překvapivých nanoskopických dat s precí jen snáze uchopitelnými výsledky mikroskopie. Jen tak se totiž lze přiblížit správným závěrům. Zavedení SMLM pro účely studia poškození IRIF indukovaných hustě ionizujícím zářením blíže rozvádíme v nedávno publikovaných člancích (3, 20, 21, 46).

## SPECIFIKA INTERAKCE CHROMATINU S HUSTĚ IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM

Do oblasti, kde se bez superrozlišovací mikroskopie téměř neobejdeme, spadá výzkum biologických účinků hustě



ionizujícího záření. Specifikem DSB indukovaných hustě ionizujícím IZ je totiž jejich multiplacita a komplexnost (43). První termín odkazuje na situaci, kdy se více zlomů DNA vyskytuje v těsné vzájemné blízkosti 1–2 helikálních otáček (tj. < 3–4 nm), o komplexních DSB, respektive komplexních lézích DNA potom mluvíme, vznikají-li v místě DSB i další typy poškození (43). Následkem velice lokalizované depozice energie dochází podél dráhy letu částic hustě ionizujícího záření k tvorbě mnohočetných klastrů DSB tvořících tzv. stopy (obr. 2). Částice s různým LET tak v chromatinu logicky generují stopy odlišných mikroskopických struktur, přičemž na této struktuře závisí i schopnost buňky poškození opravit (43). Expozice záření s vysokým LET, doprovázená tvorbou stop výrazně klastrovaných DSB (obr. 2), proto koresponduje s mnohem výraznějším rizikem smrti buňky nebo alespoň chybné reparace a mutagenese než při ozáření řídké ionizujícím zářením (22). Vysoká RBE tudíž kromě výhodného profilu depozice energie (Braggovo maximum) představuje jeden z důvodů, proč jsou částice s vysokým LET tolik atraktivní z hlediska nově vyvíjených radioterapeutických přístupů (hadronová terapie), a naopak obávané v kontextu plánování pilotovaných meziplanetárních letů.

Positivní korelaci mezi RBE a LET (22, 43) se podařilo experimentálně prokázat až do hodnoty LET přibližně 100–200 keV/μm, v závislosti na druhu částice IZ, sledovaném biologickém efektu a typu ozáření buňky. Pro ještě vyšší LET se pak už objevuje tzv. *overkill* efekt (22), kdy RBE začíná s LET klesat. Přestože komplexnost klastrů v částicemi zasažených buňkách vzrůstá spolu s LET i nadále (energie záření se uvolňuje ve stále větších „kvantech“), zároveň ubývá buněk zářením zasažených, jelikož danou dávku předává stále menší počet částic. Po překročení výše uvedené hodnoty LET tak dospějeme do situace, kdy záření „vyplývá“ zbytečně moc energie na usmrcení každé jednotlivé buňky, a ve výsledném efektu naopak převládá rostoucí počet neozářených, a tudíž nepoškozených buněk.

Vysokou biologickou účinnost urychlených iontů tak lze evidentně připsat vzniku klastrů komplexních/mnohočetných DSB, které buňka dokáže opravit jen velmi obtížně, pokud vůbec (43, 48). Zdá se přitom, že rostoucí komplexnost/multiplacita klastrů DSB vede k preferenci reparace pomocí homologní rekombinace, což je ještě umocněno, nachází-li se DSB v heterochromatinu. Závěry však nejsou doposud jednoznačné. Studium vztahu mezi fyzikálními parametry incidentního IZ, strukturálními charakteristikami DSB a jejich klastrů, distribucí DSB a jejich klastrů v rámci stop a lokální architekturou chromatinu v místě daného DSB proto představuje jeden ze základních úkolů dnešní radiobiologie.

Výzkumu na tomto poli jsme se věnovali v publikaci Ježkové et al. (43). Ačkoliv jsme potvrdili již obecně akceptovaný fakt, že multiplacita/komplexnost generovaných DSB vzrůstá spolu s LET incidentního záření a rozdílů (49) v mikrodozimetrické topologii stopy částice významně ovlivňují efektivitu reparace DSB a přežívání ozářených buněk (43, 48), dospěli jsme i k některým dalším zajímavým zjištěním. Multiplacita lézí DSB a efektivita jejich reparace se totiž lišila nejen pro záření  $\gamma$  a urychlené ionty  $^{11}\text{B}$  a  $^{20}\text{Ne}$ , s vysokým a vzájemně si podobným LET (tab. 1), ale překvapivě i mezi uvedenými ionty. Ionty neonu přitom vytvářely v DNA DSB léze o vyšší multiplacitě než ionty boru (43). Následně provedené simulace ionizačních stop iontů  $^{11}\text{B}$  a  $^{20}\text{Ne}$  pomocí software RITRACK (NASA) přitom naznačují, že důvodem rozdílné multiplacity klastrů DSB generovaných uvedenými

ionty je patrně odlišný mikrodozimetrický způsob depozice energie záření, a to i přes podobné hodnoty LET obou typů záření. Tento výsledek ukazuje na nutnost podrobnější sledovat jednotlivé fyzikální charakteristiky částic, a nejen „vše zastřešující“ LET, chceme-li odhadnout radiobiologickou účinnost hustě ionizujících záření, ať už za účelem výběru iontů potenciálně vhodných pro radioterapii nebo stanovení zdravotního rizika vyplývajícího z expozice.

IZ s vysokým LET představuje nejen unikátní radioterapeutický prostředek ale také experimentální nástroj pro studium regulace reparace DSB, protože nabízí všechny možné kombinace vlastností DSB, topologie DSB a charakteristik chromatinu. Zatímco energetické částice vytvářejí primárně velmi komplexní a mnohočetné DSB klastrované podél dráhy jejich letu, sekundárně emitované částice generují v DNA většinou jednoduché a prostorově izolované léze. Fragmentace chromatinu brání vazbě mašinérie NHEJ, takže reparace mnohočetných DSB vyžaduje HR (50). V případě komplexních DSB dochází i ke kolizi drah opravujících DSB a další typy DNA lézí. Jednoduché DSB pak v závislosti na okolním chromatinu a dalších faktorech mohou být reparovány prostřednictvím NHEJ, HR nebo i alternativních reparačních drah (31).

Zde je třeba podotknout, že hustě ionizující částicové záření, které poškozuje DNA přímo, interaguje s euchromatinem a heterochromatinem v podstatě opačným způsobem než řídké ionizující fotonové záření napadající DNA nepřímo prostřednictvím volných radikálů. Architektura heterochromatinu, jež stíní DNA před účinky radikálů (37), totiž neposkytuje ochranu před přímým poškozením prolétající částic. A protože heterochromatin nabízí atakující částici více cílů na jednotku objemu než euchromatin, mohou v heterochromatinu naopak vznikat mnohočetnější, a tudíž hůře opravitelné DSB než v euchromatinu (2, 31). Dezintegrace heterochromatinu následkem koncentrované depozice energie navíc narušuje ochrannou funkci architektury těchto domén proti předčasné HR mezi repetitivními sekvencemi (viz výše). Reparace klastrů DSB v heterochromatinu je proto velmi riskantní, jelikož NHEJ na těchto substrátech nemůže probíhat a HR se kvůli deregulaci eventuálně mění z velmi precizního reparačního mechanismu na mechanismus s vysokým rizikem tvorby chromosomových aberací (31).

Nepřekvapí proto, že komplexní přestavby chromosomů představují charakteristický rys expozice buněk hustě ionizujícímu záření. Na základě mikroskopických a nanoskopických studií lze předpokládat, že se architektura poškozeného chromatinu a IRIF bude lišit pro různé typy IZ, a tudíž ovlivňovat i způsob reparace (43). Výzkum je však zatím jen v počátcích, a bude proto zajímavé sledovat, co odhalí o významu architektonických aspektů v regulaci reparace DSB v nadcházejících letech.

### CO PROZRAZUJÍ IRIF O MECHANISMU VZNIKU CHROMOSOMOVÝCH ABERACÍ

Na závěr tohoto článku zmiňme ještě jeden velice důležitý fenomén, jenž vyplývá ze syntézy výše uvedených výsledků, a sice rozdílný mechanismus tvorby chromosomových translokací (případně i jiných aberací) v buňkách ozářených zářením s nízkým nebo naopak vysokým LET (39).

Z předchozích kapitol víme, že hustě ionizující záření generuje v DNA těžko opravitelné klastry DSB již samotným následkem prostorově koncentrované depozice energie, jež

vede k lokální fragmentaci chromatinu. Takto vznikající klastry tedy nazvěme klastry primárními (2,18). Není přitom obtížné si představit, že tato ohniska vzájemně si blízkých volných konců DNA reprezentují ideální substrát pro snadnou tvorbu komplexních chromosomových translokací a dalších aberací. Řídce ionizující záření naopak deponuje svou energii v jádře mnohem homogennějším způsobem, takže nevytváří ohniska (nebo dokonce stopy) fragmentovaného chromatinu a vzniknuvší DSB jsou od sebe více vzdáleny. Nicméně i v buňkách ozářených řídkou ionizující zářením občas pozorujeme komplexní chromosomové translokace. Jak tedy tyto translokace vznikají?

Dříve existovaly dvě protichůdné hypotézy vysvětlující tvorbu chromosomových translokací (4). První hypotéza (známá pod označením *position first*) považuje DSB za víceméně imobilní. Předpokládá tak, že k vzájemným výměnám chromatinu může docházet pouze mezi genetickými lokusy nacházejícími se ve vzájemné blízkosti již před ozářením. Jak se však za daných podmínek formují translokace mezi v jádře si vzdálenějšími lokusy, nebo dokonce translokace komplexní, lze vysvětlit jen stěží. Druhá hypotéza (*breakage first*) v podstatě kontradikuje hypotézu první, jelikož počítá s čilou migrací DSB do několika reparačních center, kde se více DSB opravuje společně. Nastává tak situace z hlediska následků podobná tvorbě primárních klastrů DSB po expozici hustě ionizujícímu záření. Tato hypotéza tak sice elegantně vysvětluje vznik translokací mezi vzájemně vzdálenými a případně i mnohočetnými lokusy, komplexní translokace by však za těchto podmínek patrně musely vznikat mnohem častěji, než ve skutečnosti pro řídkou ionizující záření pozorujeme.

Říká se, že pravda leží vždy někde uprostřed a námi provedená mikroskopická pozorování ohnisek IRIF (39) toto rčení, zdá se, potvrzují i v případě mechanismu tvorby chromosomových translokací. V jádrech buněk ozářených zářením jsme totiž nenaměřili celkově významnější nárůst mobility ohnisek IRIF oproti nepoškozenému chromatinu, odhalili jsme však frakci IRIF, jež vykazovala výrazně vyšší pohyb (39). Zvýšenou pohyblivost vykazovaly především IRIF lokalizované v kondenzovaném chromatinu („heterochromatinu“), přičemž jejich pohyb obvykle korespondoval s relokací do jaderných subkompartentů s nízkou hustotou chromatinu („euchromatinu“). Kvůli omezenému objemu těchto prostor zde mezi IRIF příležitostně docházelo k občasným kolizím a tvorbě „sekundárních“ klastrů dvou, tří nebo někdy i více ohnisek. Příčinu tohoto chování se nám následně podařilo asociovat s dekondukcí poškozených heterochromatinových domén, která podmiňuje další sestavování/aktivitu reparačních komplexů. Sekundární klastry IRIF tak na rozdíl od primárních vznikají nikoliv přímo následkem depozice energie záření, ale až následkem procesů reparace DSB (2,18).

Uvedená pozorování nás tak vedla k postulování nové hypotézy mechanismu vzniku chromosomových aberací, jež spojuje zdánlivě protichůdné aspekty obou dříve zmíněných hypotéz (4). Stručně řečeno, většina DSB je prostorově víceméně stabilních a jejich oprava probíhá samostatně v místech jejich vzniku. DSB lokalizované v heterochromatinu však následkem jeho dekondukcí v rámci reparačních procesů získávají větší pohyblivost a eventuálně vytvářejí sekundární klastry s rizikem nelegitimních chromatinových výměn. Tvorba sekundárních klastrů DSB tak vysvětluje, jak může příležitostně docházet k translokacím mezi vzdálenějšími lokusy nebo i komplexním translokacím v buňkách poškozených řídkou ionizující zářením. Náš model také

ozřejmuje, proč se komplexní translokace generované hustě a řídkou ionizující zářením tolik liší v počtu participujících DSB a proč expozice hustě ionizujícímu záření vyvolává především intrachromosomové aberace a *vice versa*. Zdá se proto, že dominantní mechanismus tvorby chromosomových translokací je pro hustě a řídkou ionizující záření zcela odlišný. Jen dodejme, že sekundární klastry se mohou během reparace formovat i v buňkách ozářených hustě ionizující zářením. Z primárních klastrů přitom vznikají vysoce komplexní klastry vyššího řádu (2).

Důležitým zjištěním plynoucím z výše uvedených pozorování (4, 39) je také skutečnost, že pravděpodobnost vzniku chromosomové translokace mezi dvěma konkrétními genetickými lokusy závisí nejen na prostorové vzdálenosti těchto lokusů v buněčném jádře (dané jadernou architekturou), ale také na lokální struktuře chromatinu v oblasti mezi těmito lokusy. Struktura chromatinu totiž ovlivňuje vzájemný pohyb jednotlivých DSB, a tudíž významným způsobem i pravděpodobnost jejich vzájemné interakce.

## ZÁVĚR

Objev ohnisek IRIF představoval zásadní milník v radiobiologii a buněčné biologii. Kromě praktických aplikací v biodozimetrii poukázal jejich výzkum na zásadní důležitost architektonických faktorů při vzniku radiačního poškození, reparaci DNA a tvorbě chromosomových aberací. Vzájemné interakce mezi ionizující zářením a chromatinem závisí na fyzikálních parametrech záření a architektuře chromatinu v místě DSB. Tyto interakce a další faktory mohou následně ovlivňovat architekturu formujících se reparačních komplexů (IRIF), a tudíž i výběr a průběh reparačních mechanismů. Pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy jsou však nezbytné studie IRIF na nanoúrovni.

Dalším milníkem nejen v radiobiologii je proto prolovení Abbeho difrakčního limitu doprovozené rozvojem superrozlišovacích mikroskopických metod, jež posouvají strukturální analýzy IRIF a reparačních dějů až na molekulární úroveň. Bude bezesporu nesmírně vzrušující sledovat, jak nanoskopické studie rozšiřují a případně zcela mění naše porozumění NHEJ, HR, alternativním reparačním drahám a jejich vzájemné regulaci.

## Čestné prohlášení

*Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.*

## Poděkování

*Práce byla podpořena projekty GAČR 20-04109J, DAAD-19-03, GAČR 19-09212S, 17-08066Y a projekty Vládního zmocnění a 3+3 pro spolupráci se SÚJV Dubna.*

## Seznam zkratk

<b>DSB</b>	dvouřetězcové zlomy DNA ( <i>DNA double-strand breaks</i> )
<b>γH2AX</b>	histon H2AX fosforylovaný na serinu 139
<b>HR</b>	homologní rekombinace
<b>IRIF</b>	reparační ohniska indukovaná (v místech DSB) ionizující zářením ( <i>ionizing radiation-induced foci</i> )
<b>IZ</b>	ionizující záření
<b>LET</b>	lineární přenos energie ( <i>linear energy transfer</i> )
<b>MMEJ</b>	spojování konců (DNA) zprostředkované mikrohomologiemi ( <i>microhomology-mediated end joining</i> )

<b>NHEJ</b>	nehomologní spojování konců (DNA) ( <i>non-homologous end joining</i> )
<b>RBE</b>	radiobiologická efektivita IZ
<b>SMLM</b>	lokalizační mikroskopie na úrovni jednotlivých buněk ( <i>single-molecule localization microscopy</i> )
<b>SSA</b>	jednořetězcová hybridizace ( <i>single-strand annealing</i> )

## Literatura

- Falk M, Hausmann M, Lukášová E et al.** Determining omics spatiotemporal dimensions using exciting new nanoscopy techniques to assess complex cell responses to DNA damage: part A – radiomics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2014; 24: 205–223.
- Falk M, Hausmann M, Lukášová E et al.** Determining omics spatiotemporal dimensions using exciting new nanoscopy techniques to assess complex cell responses to DNA damage: part B – structuromics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2014; 24: 225–247.
- Bobkova E, Depeš D, Lee JH et al.** Recruitment of 53BP1 proteins for DNA repair and persistence of repair clusters differ for cell types as detected by single molecule localization microscopy. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 3713.
- Falk M, Lukášová E, Kozubek S.** Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res* 2010; 704: 88–100.
- Pujals S, Albertazzi L.** Super-resolution microscopy for nanomedicine research. *ACS Nano* 2019; 13: 9707–9712.
- Requejo-Isidro J.** Fluorescence nanoscopy. Methods and applications. *J Chem Biol* 2013; 6: 97–120.
- Birk UJ.** Super-resolution microscopy of chromatin. *Genes (Basel)* 2019; 10: 493.
- Hausmann M, Ilič N, Pilarczyk G et al.** Challenges for super-resolution localization microscopy and biomolecular fluorescent nano-probing in cancer research. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 2066.
- Konishi T, Kobayashi A, Tengku Ahmad TF, Wang J.** Enhanced DNA double strand break repair triggered by microbeam irradiation induced cytoplasmic damage. *J Radiat Cancer Res* 2018; 9: 183.
- Pagáčová E, Štefančíková L, Schmidt-Kaler F et al.** Challenges and contradictions of metal nano-particle applications for radio-sensitivity enhancement in cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 558.
- Štefančíková L, Lacombe S, Salado D et al.** Effect of gadolinium-based nanoparticles on nuclear DNA damage and repair in glioblastoma tumor cells. *J Nanobiotech* 2016; 14: 63.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH et al.** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; 273: 5858–5868.
- Turinetto V, Giachino C.** Survey and summary multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 2489–2498.
- Hofer M, Falk M, Komůrková D et al.** Two new faces of amifostine: protector from DNA damage in normal cells and inhibitor of DNA repair in cancer cells. *J Med Chem* 2016; 59: 3003–3017.
- Pejchal J, Österreicher J, Vávrová J.** Biodozimetrie: dicentrická analýza a předčasná chromozomová kondenzace (PCC). *Vojenské zdravotnické listy* 2007; 76: 95–104.
- Markova E, Vasilyev S, Belyaev I.** 53BP1 foci as a marker of tumor cell radiosensitivity. *Neoplasma* 2015; 62: 770–776.
- Falk M, Horáková Z, Svobodová M et al.**  $\gamma$ H2AX/53BP1 foci as a potential pre-treatment marker of HNSCC tumors radiosensitivity – preliminary methodological study and discussion. *Eur Phys J D* 2017; 71: 241.
- Falk M, Lukášová E, Štefančíková L et al.** Heterochromatinization associated with cell differentiation as a model to study DNA double strand break induction and repair in the context of higher-order chromatin structure. *Appl Radiat Isot* 2014; 83 Pt B: 177–185.
- Bártová E, Kozubek S, Jirsová P et al.** Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells. *J Struct Biol* 2002; 139: 76–89.
- Bach M, Savini C, Krufczik M et al.** Super-resolution localization microscopy of  $\gamma$ H2AX and heterochromatin after folate deficiency. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1726.
- Depeš D, Lee JH, Bobkova E et al.** Single-molecule localization microscopy as a promising tool for  $\gamma$ H2AX/53BP1 foci exploration. *Eur Phys J D* 2018; 72: 158.
- Falk M, Falková I.** Účinky ionizujícího záření na subcelulární a celulární úrovni, mechanismy reparace DNA. In: Havránková R (ed.). *Klinická radiobiologie*. Grada, Praha, 2020: 67–102.
- Falk M, Falková I, Kopečná O et al.** Chromatin architecture changes and DNA replication fork collapse are critical features in cryopreserved cells that are differentially controlled by cryoprotectants. *Sci Rep* 2018; 8: 14694.
- Rittich B, Španová A, Falk M et al.** Cleavage of double stranded plasmid DNA by lanthanide complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 800(1–2): 169–173.
- Kousholt AN, Menzel T, Sørensen CS.** Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle. *Biomolecules* 2012; 2: 579–607.
- Jalan M, Olsen KS, Powell SN.** Emerging roles of RAD52 in genome maintenance. *Cancers* 2019; 11: 1038.
- Serrano L, Liang L, Chang Y et al.** Homologous recombination conserves DNA Sequence integrity throughout the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 363–374.
- Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA.** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res* 2008; 18: 134–147.
- Lukášová E, Kořístek Z, Klabusay M et al.** Granulocyte maturation determines ability to release chromatin NETs and loss of DNA damage response; these properties are absent in immature AML granulocytes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 767–779.
- Ma J, Setton J, Lee NY et al.** The therapeutic significance of mutational signatures from DNA repair deficiency in cancer. *Nat Commun* 2018; 9: 3292.
- Falk M, Hausmann M.** A paradigm revolution or just better resolution – will newly emerging superresolution techniques identify chromatin architecture as a key factor in radiation-induced DNA damage and repair regulation? *Cancers* 2021; 13: 18.
- Shibata A, Conrad S, Birraux J et al.** Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase: DSB repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J* 2011; 30: 1079–1092.
- Kakarougkas A, Jeggo PA.** DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* 2014; 87: 20130685.
- Amaral N, Ryu T, Li X, Chiolo I.** Nuclear dynamics of heterochromatin repair. *Trends Genet* 2017; 33: 86–100.
- Hausmann M, Neitzel C, Bobkova E et al.** Single molecule localization microscopy analyses of DNA-repair foci and clusters detected along particle damage tracks. *Front Phys Sect Med Phys Imaging* 2020; 8: 473.
- Hofmann A, Krufczik M, Heermann DW, Hausmann M.** Using persistent homology as a new approach for super-resolution localization microscopy data analysis and classification of  $\gamma$ H2AX foci/clusters. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2263.
- Falk M, Lukášová E, Kozubek S.** Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 2398–2414.
- Falk M, Lukášová E, Gabrielová B et al.** Local changes of higher-order chromatin structure during DSB-repair. *J Phys Conf Ser* 2008; 101: 012018.
- Falk M, Lukášová E, Gabrielová B et al.** Chromatin dynamics during DSB repair. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 1534–1545.
- Ježková L, Falk M, Falková I et al.** Function of chromatin structure and dynamics in DNA damage, repair and misrepair:  $\gamma$ -rays and protons in action. *Appl Radiat Isot* 2014; 83 Pt B: 128–136.
- Ševčík J, Falk M, Kleiblová P et al.** The BRCA1 alternative splicing variant  $\Delta$ 14–15 with an in-frame deletion of part of the regulatory serine-containing domain (SCD) impairs the DNA repair capacity in MCF-7 cells. *Cell Signal* 2012; 24: 1023–1030.
- Ševčík J, Falk M, Macurek L et al.** Expression of human BRCA1 $\Delta$ 17–19 alternative splicing variant with a truncated BRCT domain in MCF-7 cells results in impaired assembly of DNA repair complexes and aberrant DNA damage response. *Cell Signal* 2013; 25: 1186–1193.
- Ježková L, Zadneprianeč M, Kulikova E et al.** Particles with similar LET values generate DNA breaks of different complexity and reparability: a high-resolution microscopy analysis of  $\gamma$ H2AX/53BP1 foci. *Nanoscale* 2018; 10: 1162–1179.
- Reindl J, Girst S, Walsh DWM et al.** Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced  $\gamma$ H2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Sci Rep* 2017; 7: 40616.
- Friedrich T, Ilicic K, Greubel C et al.** DNA damage interactions on both nanometer and micrometer scale determine overall cellular damage. *Sci Rep* 2018; 8: 16063.
- Hausmann M, Wagner E, Lee JH et al.** Super-resolution localization microscopy of radiation-induced histone H2AX-phosphorylation in relation to H3K9-trimethylation in HeLa cells. *Nanoscale* 2018; 10: 4320–4331.
- Lemmer P, Gunkel M, Baddeley D et al.** SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Appl Phys B* 2008; 93: 1–12.



**48. Asaithamby A, Chen DJ.** Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutat Res* 2011; 711(1-2): 87-99.

**49. Baiocco G, Babini G, Barbieri S et al.** What roles for track-structure and microdosimetry in the era of -omics and systems biology? *Radiat Prot Dosimetry* 2019; 183(1-2): 22-25.

**50. Wang H, Wang Y.** Heavier ions with a different linear energy transfer spectrum kill more cells due to similar interference with the Ku-dependent DNA repair pathway. *Radiat Res* 2014; 182: 458-461.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**RNDr. Martin Falk, Ph.D.**

Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i.

Královopolská 135, 612 65 Brno

Tel.: 728 084 060

e-mail: falk@ibp.cz



MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ  
ČESKÉ REPUBLIKY



I. LÉKAŘSKÁ  
FAKULTA  
Univerzita Karlova



VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ  
NEMOCNICE V PRAZE



*Tady*  
**VYPROŠŤOVÁK  
NEPOMUŽE**

ALKOHOL MŮŽE ZPŮSOBOVAT  
RAKOVINU. NEVĚŘÍTE? PODÍVEJTE SE  
NA NAŠE WEBOVÉ STRÁNKY.

Tento materiál Centra veřejného zdraví se zaměřením na alkohol Kliniky adiktologie a LF UK a VFN v Praze a SZÚ byl podpořen neinvestičním příspěvkem na realizaci projektů v rámci programu protidrogová politika MZ ČR pro rok 2019.

**WWW.ALKOHOLPODKONTROLOU.CZ**

# Principy a výhledy vakcinace proti viru SARS-CoV-2

Jitka Smetanová, Zuzana Střížová, Jiřina Bartůňková, Tomáš Milota

Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol v Praze

Čas. Léč. čes. 2020; 159: 298–302

## SOUHRN

Uplynul již více než rok ode dne, co se první člověk nakazil novým typem koronaviru, SARS-CoV-2, způsobujícím infekční akutní respirační onemocnění COVID-19 s poměrně vysokou morbiditou i mortalitou. Nejohroženější skupinu obyvatel z hlediska nákazy tímto koronavirem představují zdravotníci, starší lidé a zvláště pacienti s chronickými nemocemi, mj. obezitou a diabetem mellitem. Kvůli komunitnímu šíření nákazy zavedli vládní představitelé většiny evropských zemí tzv. lockdown, kdy omezili pohyb osob, zavřeli většinu služeb a zavedli povinnou ochranu úst a nosu.

Nadějí v návrat života do období před pandemií představuje vývoj účinné a bezpečné vakcíny proti SARS-CoV-2, jež by pravděpodobně snížila výskyt těžkých forem onemocnění COVID-19 a zabránila masivnímu šíření nákazy. Ke konci listopadu bylo ve III. fázi klinického testování 13 klinických studií zahrnujících vakcíny proti SARS-CoV-2 na bázi inaktivovaných virů, rekombinantních nepatogenních virových vektorů a proteinů. První vakcína založená na bázi mRNA byla nedávno schválena, distribuována a aplikována vybraným obyvatelům Spojených států amerických, Izraele, Velké Británie a posléze i v členských státech Evropské unie včetně Česka.

V přehledovém článku prezentujeme probíhající klinické studie se zaměřením na jejich III. fázi, a to včetně mechanismu účinku jednotlivých typů vakcín.

## KLÍČOVÁ SLOVA

COVID-19, SARS-CoV-2, vakcíny, klinické studie

## SUMMARY

### Smetanová J. et al. Principles and new perspectives in the vaccination against SARS-CoV-2 virus

It has been a year since the first person on Earth became infected with a new type of coronavirus SARS-CoV-2, causing infectious acute respiratory disease COVID-19 with relatively high morbidity and mortality. The most endangered population by coronavirus SARS-CoV-2 are healthcare professionals, the elderly and people with associated comorbidities. Due to the fast community spread, governments of different European countries introduced precaution measures including limited socializing of people, closing of most public services and introducing mandatory facial protection.

The hope for a return to the life before the pandemic is the development of an effective and safe vaccine against SARS-CoV-2 which would presumably reduce the incidence of severe forms of COVID-19 and prevent the massive spread of the disease. At the end of November, we have 13 clinical trials in phase III involving SARS-CoV-2 vaccines based on inactivated viruses, recombinant non-pathogenic viral vectors and proteins. The first mRNA-based vaccine is currently being evaluated in phase II/III clinical trial and is already being distributed and applied to high-risk population in the United Kingdom, the United States, and Israel, followed by the countries of the European Union, including the Czech Republic.

In the review article we present currently ongoing clinical studies with a special focus on the phase III clinical trials and discuss the mechanisms of action of each type of vaccine.

## KEYWORDS

COVID-19, SARS-CoV-2, vaccines, clinical trials

## ÚVOD

Na začátku prosince roku 2019 se z čínského města Wu-chan začal šířit koronavirus SARS-CoV-2 způsobující těžký akutní respirační syndrom později pojmenovaný COVID-19<sup>(1)</sup>. S rozšířením onemocnění z Asie do Evropy, Austrálie a dalších světových kontinentů se Světová zdravotnická organizace (WHO) dne 11. března 2020 rozhodla vyhlásit stav pandemie (2).

Onemocnění COVID-19 se klinicky manifestuje velmi rozmanitě. U symptomatických pacientů je zpravidla prvním klinickým příznakem horečka a suchý dráždivý kašel doprovázený únavou. Častým projevem nemoci je také ztráta čichu, méně často i chuti (3). Vážnější případy mohou vést k rozvoji pneumonie či sekundárního hemofagocytujícího syndromu (zvaného též syndrom aktivovaných makrofágů – MAS) a mohou vyústit až v úmrtí nemocného (4). Tyto závažnější formy onemocnění COVID-19 vyžadující oxygenterapii, mechanickou ventilaci či v krajních případech mimotělní membránovou oxygenaci jsou častěji popisovány u chronicky nemocných a starších lidí (5). Uvádí se, že zhruba 20 % pacientů zůstává asymptomatických (6).

Dle celosvětových statistik k datu 30. 12. 2020 onemocnělo COVID-19 80 453 105 lidí, z toho 1 775 776 onemocnění podleho (7). Počet nakažených a zemřelých osob v souvislosti s onemocněním COVID-19 se nyní nejen v evropských státech, ale také například v USA a dalších zemích zvyšuje. Tento stoupající trend by mohl být zastaven ve chvíli, kdy by došlo k proočkování větší části populace účinnou anti-SARS-CoV-2 vakcínou.

## STRUKTURA A TAXONOMIE KORONAVIRU SARS-COV-2

Nositel genetiké informace koronavirů je jednovláknová molekula RNA (ssRNA). Koronavirus SARS-CoV-2 řadíme do podskupiny β společně s virem SARS-CoV, jenž v roce 2002 vyvolal epidemii syndromu náhlého respiračního selhání (SARS), a virem MERS-CoV, který o 10 let později v zemích Blízkého východu rovněž způsobil epidemii respiračního selhávání s velmi vysokou smrtností (8–10).

Společným znakem těchto virů vyvolávajících pneumonie je jejich přenos ze zvířete na člověka, jedná se tedy



o zoonózy. Jako primární zvířecí hostitel pro onemocnění COVID-19 byl identifikován netopýr, neboť izolované koronaviry netopýrů se v nukleotidové sekvenci shodují s lidským SARS-CoV-2 ve více než 90 %, v případě viru betaCoV RaTG13 dokonce v 96 % (11). Více než 90% genetickou shodu vykazují i koronaviry luskounů, kteří jsou v Číně loveni pro šupiny a maso, a představují tak s největší pravděpodobností mezipřehostitele. Navíc jsou tyto savci hojně dostupným zbožím na tržnici ve Wu-chanu, která je považována za epicentrum nákazy (12, 13).

Téměř rok se vědci zabývají strukturou nového koronaviru SARS-CoV-2, o němž je doposud známo pouze omezené spektrum informací. Lipidový obal koronaviru obsahuje několik proteinů, z nichž nejdůležitější úlohu pro vstup do hostitelské buňky hraje glykoprotein *spike* (S), který se váže na lidský receptor ACE2 (angiotenzin konvertujícího enzymu 2) (14). Zvýšená exprese tohoto receptoru s enzymatickou aktivitou byla prokázána především u epitelových buněk dolních cest dýchacích. Jeho přítomnost ovšem byla popsána i na řadě dalších buněk těla, například na endotelích, buňkách jícnu, střev, ledvin či srdce, jejichž poškození může pacienta přímo ohrožovat na životě (15). Pro svůj životní cyklus SARS-CoV-2 dále využívá membránové glykoproteiny svého obalu (E) i (M) a protein nukleokapsidy (N) nacházející se v matrixi samotného viru (16, 17). Struktura nového koronaviru je znázorněna na obr. 1 (18). Všechny 4 zmíněné glykoproteiny (S, E, M a N) by se v budoucnu mohly stát podstatným cílem

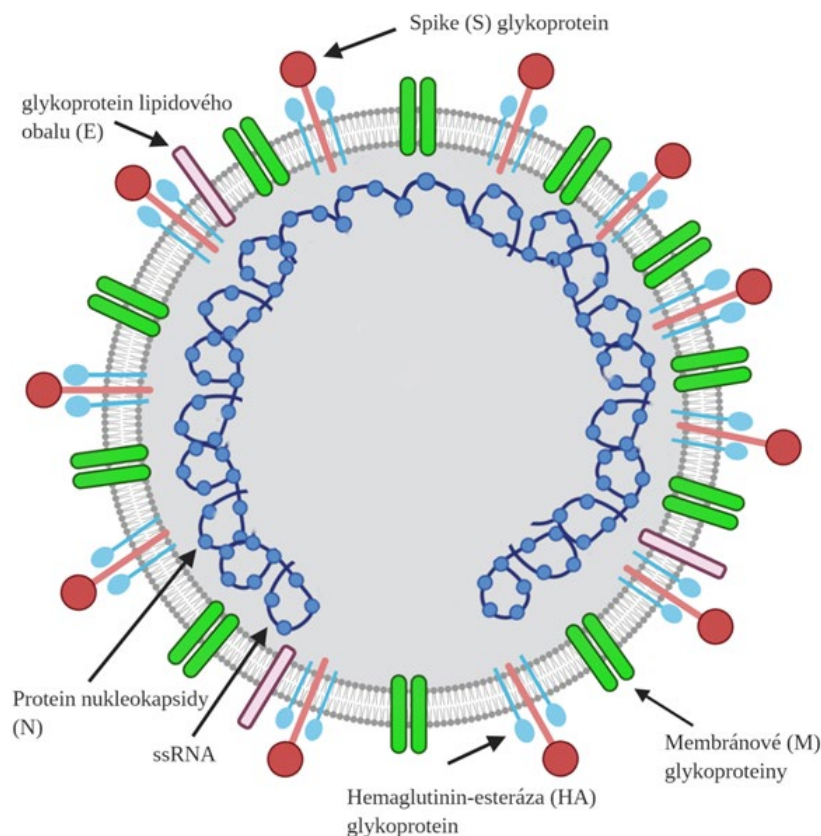
léků zaměřených na léčbu onemocnění COVID-19 a jeho přidružených komplikací.

## ZPŮSOB ŠÍŘENÍ SARS-COV-2

K šíření viru SARS-CoV-2 dochází ze 2 hlavních příčin. První z nich je přímá cesta, tedy přenos z člověka na člověka, a to pomocí kapének, jež člověk fyziologicky vylučuje při mluvení, kýchání a kašlání (19, 20). Před touto formou přenosu nás částečně chrání osobní ochranné pomůcky, především roušky. Druhou možností šíření představuje nepřímý kontakt, tedy dotek virem kontaminovaného povrchu a jeho mechanický přenos na sliznice očí či úst (21). Z tohoto důvodu je doporučeno dbát zvýšené hygieny, přičemž časté mytí a dezinfekce rukou a povrchů snižuje pravděpodobnost nákazy. Doposud se vědcům nepodařilo s jistotou říci, jak dlouho virus na povrchu přežívá, a tedy jak dlouho ohrožuje jedince nákazou. Šíření infekce napomáhá i relativně dlouhá inkubační doba trvající v průměru 5–7 dní, přičemž nakažený je infekční obvykle 2 dny před propuknutím příznaků, a nevědomky tak infekci dále šíří (22).

Některé studie také naznačují, že část pacientů si nevytvoří dostatečné množství protilátek a paměťových buněk, které by je chránily před opakovanou nákazou (23). Množství vytvořených protilátek je závislé na závažnosti průběhu onemocnění. Nicméně jejich koncentrace v čase může velmi rychle klesat (24). Nadějí v boji s novým typem koronaviru tak pro lidstvo zůstává vývoj bezpečné a účinné vakcíny, která by pravděpodobně vedla ke snížení výskytu těžkých forem onemocnění COVID-19. Problémem se však jeví četný výskyt mutací, kterým SARS-CoV-2 stejně jako virus chřipky podléhá (25, 26), a všeobecně nízká dlouhodobá ochrana vakcín proti respiračním onemocněním. Je proto pravděpodobné, že vakcína proti SARS-CoV2 se stane sezónní záležitostí s nutností pravidelných přeočkování u rizikových osob, podobně jako je tomu u vakcín proti chřipce (27).

Právě získané poznatky o interakcích viru SARS-CoV-2 s imunitním systémem jsou využity pro vývoj nové vakcíny, kde důležitou roli hraje způsob aplikace očkovací látky, její dávkování, typ použitého antigenu a přítomnost samotného adjuvans. Ke konci listopadu bylo v americké databázi klinických studií *ClinicalTrials.gov* pod záštitou *National Institutes of Health* (NIH) vedeno celkem 68 klinických hodnocení, rozdělených do pěti fází: I, I/II, II, II/III, III (28). V následujícím přehledu uvádíme příklady vyvíjených vakcín, jež jsou rozděleny z pohledu mechanismu účinku. Diskutovány jsou především vakcíny v pokročilých fázích vývoje a klinického hodnocení.



Obr. 1 Struktura koronaviru SARS-CoV-2 vytvořená pomocí programu Biorender



## DRUHY VAKCÍN PROTI SARS-COV-2

Dle výroby a typu použitého antigenu dělíme vakcíny na 4 základní typy. První typ představují vakcíny založené na přenosu genetické informace kódující patogenní proteiny koronaviru ve formě mRNA nebo DNA. K translokaci genetické informace do buněčného jádra dochází pomocí speciálních geneticky upravených plazmidů, jež nesou kromě antigenu i silný promotor (často SV40) (29, 30). Po tomto přenosu dokáží buňky hostitele exprimovat na svém povrchu fragmenty patogenních proteinů (virové antigeny) v komplexu s molekulami MHC I. třídy. Rozpoznání komplexu virového antigenu s molekulami MHC zapříčiní cytotoxickou imunitní odpověď mediovanou CD8<sup>+</sup> T buňkami. Naopak v aktivaci pomocných CD4<sup>+</sup> T buněk a k produkci protilátek je nezbytné zapojení buněk prezentujících antigen (APC) (31). Výhodou v porovnání s vakcínami obsahujícími rekombinantně připravené proteiny je bezesporu skutečnost, že po přepsání genetické informace do sekvence aminokyselin dochází k posttranslačním modifikacím proteinů. Z tohoto důvodu se genové vakcíny podobají skutečnému průběhu nákazy. Negativní stránkou je hrozící nebezpečí vzniku nekontrolovatelné genové exprese, mutace a postižení somatických buněk. Na vývoji DNA vakcín pracují například v Kanadě nebo v Koreji, jejichž vakcíny AG0301-COVID19 a GX-19 jsou momentálně ve fázi I/II klinického testování (28).

Vakcíny na bázi mRNA sdílejí několik společných prvků s DNA vakcínami. Jejich bezpečnost je však v porovnání s DNA vakcínami vyšší, protože exprese kódovaných proteinů probíhá v cytoplasmě, a nehrozí tak inkorporace do genomu hostitele. Na druhou stranu molekula mRNA nevykazuje tak vysokou stabilitu jako molekula DNA, proto je mRNA chráněna transportním systémem lipidové částice, která navíc usnadní její doručení do cílové buňky (32, 33). Na vývoji této skupiny vakcín pracuje mj. biotechnologická společnost Moderna ve spolupráci s lékařským výzkumným centrem NIH sídlícím ve Spojených státech amerických, jejichž vakcína mRNA-1273 vykazuje téměř 95% účinnost nedávno ukončila náběr dobrovolníků účastnících se studie III. fáze klinického testování (34) a začala již i její aplikace v praxi v USA. Vakcínu na bázi mRNA BNT162 vyladila i německá společnost BioNTech v kooperaci s americkou společností Pfizer. Jejich vakcína se rovněž nachází ve II./III. fázi klinického testování (28) a po schválení již byla distribuována a aplikována lidem ve Velké Británii, Izraeli nebo Spojených státech amerických; od konce prosince – po schválení Evropskou lékovou agenturou (EMA) – potom rovněž v členských zemích Evropské unie včetně Česka.

Podobného mechanismu využívá i druhá skupina vakcín na bázi rekombinantních nepatogenních virových vektorů, kterými nejčastěji bývají adenovirové vektory, ale někteří výrobci vyvíjejí také vakcíny s použitím vektorů poxvirových, paramyxovirových (virus spalniček) a řady dalších (35, 36). Cílem těchto postupů je pomocí vektorů dopravit do buňky genetickou informaci koronaviru SARS-CoV-2 společně se složkami potřebnými k zahájení exprese vybraného antigenu. Tím potom dochází k produkci koronavirových proteinů a k imunitní reakci vůči nim. Virový vektor představuje pro organismus poměrně silný podnět imunitní odpovědi. Pro samotnou vakcínu je třeba brát v úvahu volbu virového vektoru, neboť již existující imunita hostitele proti viru může významně snížit účinnost vakcíny (37). Slibné výsledky klinického testování vykazují vakcí-

na Ad5-nCoV vyvíjená čínskou firmou CanSino Biologics nebo vakcína Sputnik V vyrobená ve výzkumném ústavu Gamaleya v Rusku. Obě dvě jsou momentálně ve III. fázi klinického testování a nesou genetickou informaci kódující glykoprotein S. Naopak švýcarská firma ImmunityBio vnáší kromě DNA kódující glykoprotein S i protein N. Od této kombinace si slibuje vyvolání silné imunitní odpovědi, ale látka hAd5 je teprve v I. fázi klinického testování. Ve III. fázi klinického testování je rovněž vakcína AZD1222 od britské firmy AstraZeneca využívající adenovirový vektor ChAdOx1, jež slibuje poměrně vysoké procento účinnosti (28).

K navození imunitní odpovědi proti koronaviru jsou vyvíjeny i vakcíny obsahující rekombinantně připravené patogenní proteiny či pouze jejich fragmenty. Testované vakcíny proti onemocnění COVID-19 nejčastěji obsahují glykoprotein S společně s adjuvans, které je nesmírně důležité k vyvolání imunitní odpovědi proti samotnému antigenu (38). K přípravě rekombinantních proteinů se hojně využívají bakteriální expresní systémy, jež ovšem nejsou vhodné pro antigeny, které podléhají posttranslačním modifikacím. V těchto případech je pro rekombinantní přípravu proteinů efektivnější využít hmyzí nebo savčí buňky. Jako expresní systém proteinů slouží i transgenní rostliny, konkrétně pro glykoprotein S tabák (39). Tento druh vakcín je výrazně bezpečnější než vakcíny s atenuovanými viry. Vyvíjené proteinové vakcíny například UB-612, CoVac-1 nebo Recombinant New Coronavirus se nacházejí v I., respektive I./II. fázi klinického testování (28).

Kvůli bezpečnosti se dnes neočekuje plně virulentními kmeny mikroorganismů, ale využívají se kmeny inaktivované nebo atenuované. Inaktivované vakcíny obsahují celý usmrcený organismus bez schopnosti jeho replikace. K inaktivaci se používají především chemická činidla, a to formaldehyd nebo β-propiolaktón. U většiny inaktivovaných vakcín je pro tvorbu protilátek a paměťových buněk potřeba několik dávek, jako v případě očkování proti hepatitidě typu A (40). Inaktivované viry jsou například součástí vyvíjených vakcín CoronaVac a SARS-CoV-2 inactivated vaccine, jež jsou ve III. fázi klinického testování (28). Hlavním úkolem při přípravě živých atenuovaných vakcín je vytvořit takové kmeny, které nevyvolají v organismu klinické příznaky onemocnění. Ateuované kmeny se nejčastěji připravují několikanásobným pasážováním virulentních kmenů ve speciální buněčné kultuře nebo pomocí genetického inženýrství indukci genových mutací vedoucích k nevirulentním kmenům. Nebezpečí atenuovaných vakcín představuje riziko nežádoucích mutací, kterými se z nevirulentních kmenů mohou stát kmeny virulentní. V současné době není zaznamenána jediná živá atenuovaná vakcína proti onemocnění COVID-19, která by byla registrována ke klinickému testování.

## DISKUSE

S neustále znepokojivě se zvyšujícím počtem nakažených a hospitalizovaných pacientů s onemocněním COVID-19 se celý svět uchyluje k zavádění restrikcí a nařízení, jako je nošení roušek, zvýšená hygiena rukou a omezení sociálních kontaktů na minimum. Zavedená opatření cílí na snížení reprodukčního čísla (R) a snaží se ochránit zdravotnictví před možným kolapsem. Průměrně je jedinec po prodělaném infekčním onemocnění COVID-19 imunní cca 90 dní. Případy opětovné nákazy jsou zdokumentovány jak ve světě, tak

v Česku (41). Naději v ochraně obyvatelstva tak představuje očkování, které by snížilo výskyt infekčního onemocnění a pomohlo by k návratu k běžnému životu z dob před pandemií (42).

Na začátku roku 2020 započal celosvětový doposud neukončený závod o vývoj účinné a bezpečné vakcíny. Jednotlivé farmaceutické firmy se předháněly v tom, kdo první zaregistruje svoji vakcínu a začne ji distribuovat do celého světa. Laboratoře zvolily jak klasické metody k vývoji vakcíny, jako jsou inaktivované viry nebo rekombinantně připravené proteiny, tak také modernější genové metody založené na DNA, mRNA nebo na virových vektorech. Ty jsou kupodivu v klinickém vývoji nejdále, aniž kdy byly v jiných indikacích indukce protiinfekční imunity v minulosti úspěšné. Problémem ovšem může být stabilita vakcín – vakcíny na bázi mRNA obvykle vyžadují skladování při  $-70^{\circ}\text{C}$  až do aplikace, což může komplikovat jejich masovou distribuci. V době přípravy článku bylo celkem 13 klinických studií zaměřených na efektivitu a bezpečnost vakcín v prevenci SARS-CoV-2 ve III. fázi klinického testování (28), která je nezbytným krokem k registraci, a tedy k masové výrobě, distribuci a podání běžné populaci.

Stejně jako v případě vakcín proti jiným respiračním onemocněním se v případě anti-SARS-CoV-2 vakcíny předpokládá její přednostní podání rizikovým osobám, jako jsou pacienti s různými komorbiditami nebo osoby ve zvýšeném riziku nákazy (zdravotníci, klienti sociálních zařízení aj.). Vzhledem k tomu, že těžké formy COVID-19 zpravidla nepostihují děti, a klinické registrační studie proto probíhají pouze v populaci dospělých dobrovolníků, nepředpokládá se v nejbližší době zavedení plošného očkování dětí (28, 43).

## ZÁVĚR

Celý svět poslední dobou upíná zrak na vývoj nových vakcín, které by zpomalily šíření infekčního onemocnění COVID-19 a snížily podíl výskytu těžkých forem tohoto onemocnění. Aktuálně probíhají klinické studie zaměřené na testování bezpečnosti a účinnosti různých typů vakcín proti SARS-CoV-2. Ve III. fázi bylo ke konci listopadu celkem 13 klinických studií. Vakcína mRNA-1273 od firmy Moderna dokonce ve druhé polovině listopadu ve III. fázi ukončila náběr nových dobrovolníků. První masově dostupnou očkovací látkou se stala vakcína na bázi mRNA od společnosti Pfizer a její aplikace a distribuce již byla zahájena. Brzy se očekává ukončení III. fáze i dalších testovaných látek. V první polovině roku 2021 by měly být proočkovány rizikové skupiny i v Česku.

## Čestné prohlášení

Nikdo ze spoluautorů není v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

## Seznam zkratk

<b>APC</b>	buňky prezentující antigen
<b>EMA</b>	Evropská agentura pro léčivé přípravky
<b>MERS</b>	Middle East respiratory syndrome
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex
<b>NIH</b>	Národní institut zdraví, USA
<b>SARS</b>	těžký akutní respirační syndrom
<b>SV40</b>	opičí virus 40

## Literatura





- Huang C, Wang Y, Li X et al.** Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395: 497–506.
- Cucinotta D, Vanelli M.** WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomed* 2020; 91: 157–160.
- Kim GU, Kim MJ, Ra SH et al.** Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. *Clin Microbiol Infect* 2020; 26: 948.e1–948.e3.
- Gonçalves RSG, Victor AC, Távare ACOC, Duarte ALBP.** Be-careful! Behind the storm of severe COVID-19, could be hidden macrophage activation syndrome. A case report with excellent outcome. *Research Square* 2020, doi: 10.21203/rs.3.rs-47499/v1.
- Li X, Xu S, Yu M et al.** Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol* 2020; 146: 110–118.
- Long QX, Tang XJ, Shi QL et al.** Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; 26: 1200–1204.
- World Health Organization.** WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. WHO, 2020. Dostupné na: <https://covid19.who.int>
- Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM et al.** Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med* 2012; 367: 1814–1820.
- Weiss SR, Navas-Martin S.** Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 635–664.
- Chan-Yeung M, Xu RH.** SARS: epidemiology. *Respirology* 2003; 8: S9–S14.
- Zhou H, Chen X, Hu T et al.** A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr Biol* 2020; 30: 2196–2203.e3.
- Lam TTY, Jia N, Zhang YW et al.** Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* 2020; 583: 282–285.
- Zhang T, Wu Q, Zhang Z.** Pangolin homology associated with 2019-nCoV. *bioRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.02.19.950253.
- Ou X, Liu Y, Lei X et al.** Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 2020; 11: 1–12.
- Zou X, Chen K, Zou J et al.** Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med* 2020; 14: 185–192.
- Chan JFW, Kok KH, Zhu Z et al.** Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9: 221–236.
- Pačes J, Střížová Z, Smrž D, Černý J.** COVID-19 and the immune system. *Physiol Res* 2020; 69: 379–388.
- Koiraala A, Joo YJ, Khatami A et al.** Vaccines for COVID-19: The current state of play. *Paediatr Respir Rev* 2020; 35: 43–49.
- Parry J.** China coronavirus: cases surge as official admits human to human transmission. *BMJ* 2020; 368: m236.
- Střížová Z, Bartůňková J, Smrž D.** Can wearing face masks in public affect transmission route and viral load in covid-19? *Cent Eur J Public Health* 2020; 28: 161–162.
- Ren SY, Wang WB, Hao YG et al.** Stability and infectivity of coronaviruses in inanimate environments. *World J Clin Cases* 2020; 8: 1391–1399.
- Savvides C, Siegel R.** Asymptomatic and presymptomatic transmission of SARS-CoV-2: a systematic review. *medRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.06.11.20129072v2.
- van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH et al.** Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med* 2020; 382: 1564–1567.
- Wang K, Long QX, Deng HJ et al.** Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. *Clin Infect Dis* 2020, doi: 10.1093/cid/ciaa1143.
- Kaushal N, Gupta Y, Goyal M et al.** Mutational frequencies of SARS-CoV-2 genome during the beginning months of the outbreak in USA. *Pathogens* 2020; 9: 565.
- Lyons DM, Lauring AS.** Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses* 2018; 10: 407.
- Lorenc T, Marshall D, Wright K et al.** Seasonal influenza vaccination of healthcare workers: systematic review of qualitative evidence. *BMC Health Serv Res* 2017; 17: 732.

- 28. National Library of Medicine, the U.S. National Institutes of Health.** *ClinicalTrials.gov*.
- 29. Nishikawa H, Shiku H.** DNA vaccine. *Nihon Rinsho* 2008; 66: 1867-1872.
- 30. Li L, Petrovsky N.** Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* 2016; 15: 313-329.
- 31. Kowalczyk DW, Ertl HCJ.** Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 751-770.
- 32. Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.** mRNA vaccines-a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17: 261-279.
- 33. Zhang C, Maruggi G, Shan H, Li J.** Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. *Front Immunol* 2019; 10: 594.
- 34. Mahase E.** Covid-19: Moderna vaccine is nearly 95% effective, trial involving high risk and elderly people shows. *BMJ* 2020; 371: m4471.
- 35. Ura T, Okuda K, Shimada M.** Developments in viral vector-based vaccines. *Vaccines (Basel)* 2014; 2: 624-641.
- 36. Ramezani B, Haan I, Osterhaus A, Claassen E.** Vector-based genetically modified vaccines: exploiting Jenner's legacy. *Vaccine* 2016; 34: 6436-6448.
- 37. Thacker EE, Timares L, Matthews QL.** Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 761-777.
- 38. Chang S, Warner J, Liang L, Fairman J.** A novel vaccine adjuvant for recombinant flu antigens. *Biologicals* 2009; 37: 141-147.
- 39. Nascimento IP, Leite LCC.** Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 1102-1111.
- 40. Bell BP.** Hepatitis A vaccine. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13: 165-173.
- 41. Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD et al.** Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 52-58.
- 42. Kaur SP, Gupta V.** COVID-19 vaccine: a comprehensive status report. *Virus Res* 2020; 288: 198114.
- 43. Swann OV, Holden KA, Turtle L et al.** Clinical characteristics of children and young people admitted to hospital with covid-19 in United Kingdom: prospective multicentre observational cohort study. *BMJ* 2020; 370: 5.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**Mgr. Jitka Smetanová**  
 Ústav imunologie 2. LF UK a FN Motol  
 V Úvalu 84, 150 06 Praha 5  
 Tel.: 224 435 978  
 e-mail: jitka.smetanova@fnmotol.cz

## pr Lékaře.cz

-  on-line vzdělávání lékařů a lékárníků
-  kurzy ohodnoceny kredity ČLK
-  kurzy napříč specializacemi
-  absolvování kurzů zdarma

Více na [www.prolekare.cz/kreditované-kurzy](http://www.prolekare.cz/kreditované-kurzy)



Informace a kontakt:

Andrea Opletalová  
 info@prolekare.cz  
 MeDitorial, s.r.o. Lékařský dům,  
 Sokolská 31/490, 120 26 Praha 2



# Stáří není nemoc: Vývoj hladiny ochranných protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 u seniorů z Domova Břevnice

Václav Fejt<sup>1</sup>, Zuzana Krátká<sup>2, 5</sup>, Hana Zelená<sup>3, 6</sup>, Tomáš Fůrst<sup>4, 5</sup>

<sup>1</sup>Oddělení společných laboratoří, Nemocnice Havlíčkův Brod

<sup>2</sup>Imunologická laboratoř GENNET, s. r. o., Praha

<sup>3</sup>Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

<sup>4</sup>Katedra matematické analýzy a aplikací matematiky PŘF UP v Olomouci

<sup>5</sup>4BIN – Centrum pro bayesovskou inferenci

<sup>6</sup>Katedra biomedicínských oborů LF OU v Ostravě

Čas. Léč. čes. 2020; 159: 303–311

## SOUHRN

V Domově se zvláštním režimem v Břevnici bylo v březnu 2020 koronavirem SARS-CoV-2 infikováno 21 z 23 seniorů a 3 z nich v souvislosti s infekcí zemřeli. Předložená studie monitoruje tvorbu protilátek u této skupiny seniorů v období od začátku dubna do listopadu, tedy 1–8 měsíců po prodělaném onemocnění. Studie také srovnává několik různých metod stanovení protilátek.

Protilátky byly stanovovány opakovaně, vždy s odstupem několika týdnů, a to jak virus-neutralizačním testem, tak metodami ECLIA Roche (celkové imunoglobuliny), CMIA Abbott (IgG) a ELISA Euroimmun (IgG a IgA). Neutralizační protilátky byly detekovány u 18 z 20 osob v sérech odebraných po 6 měsících od prodělané infekce. Vysoké hodnoty neutralizačních protilátek korelovaly s vyššími hodnotami imunoglobulinů v ostatních testech a predikovaly vzestup protilátek IgG v podzimním období, kdy probíhala druhá vlna epidemie.

Na podzim v domově onemocněl žádný klient ani zaměstnanec, přestože v kraji Vysočina bylo tou dobou více než 5 % osob s pozitivním PCR testem. Infekce novým koronavirem nebyla zjištěna ani antigenními testy.

Tato studie ukazuje, že senioři si po prodělaném onemocnění COVID-19 tvoří ochranné protilátky, a jsou tedy zřejmě imunní vůči reinfekci po dobu delší než 8 měsíců. Na základě tohoto zjištění bychom chtěli otevřít diskusi o testování séroprevalence v domovech seniorů a podobných zařízeních, o úpravě epidemiologického režimu v závislosti na rizicích infekce a o případných očkovacích schématech v domovech seniorů.

## KLÍČOVÁ SLOVA

SARS-CoV-2, COVID-19, senior, protilátky, dynamika, domov důchodců, demence, reinfekce

## SUMMARY

**Fejt V. et al. Age is not a disease: Evolution of protective antibodies against SARS-CoV-2 in seniors from the Břevnice nursing home**

In the nursing home in Břevnice, 21 out of 23 seniors were infected with the SARS-CoV-2 virus in the spring of 2020. Three of them died from the infection. This study monitors the antibodies formation in group of seniors who have overcome the infection.

Between April and November (1–8 months after the infection), the antibodies were measured repeatedly within the period of several weeks. The virus neutralizing tests was used as well as the ECLIA assay by Roche (total immunoglobulins), CMIA assay by Abbott (IgG) and ELISA assay by Euroimmun (IgG and IgA). Six months from the infection, neutralizing antibodies were detected in 18 out of 20 seniors. High levels of neutralizing antibodies correlated with higher levels of immunoglobulins and were a good predictor of an increase of IgG in the autumn during the second wave of the epidemic in the Czech Republic.

During the autumn wave, neither any of the clients, nor any staff contracted the virus, although the prevalence of PCR positivity in the Vysočina region reached around 5 %. The antigen tests also came out all negative.

This study shows that in the senior population, the production of protective antibodies follows a normal pattern, and the seniors are probably immune to a repeated infection for at least 8 months from the first infection. Based on these results, we would like to open the discussion on the testing for seroprevalence in nursing homes, possible changes to the epidemiologic regime in relation to the risk of infection, and about vaccination schemes in these centers.

## KEYWORDS

SARS-CoV-2, COVID-19, elderly, antibodies, dynamics, nursing home, dementia, reinfection

## ÚVOD

Mezi nejrizikovější osoby z hlediska onemocnění COVID-19 patří lidé starší 70 let, u kterých dochází častěji k úmrtí než u osob mladších (1). Při popisu smrtelnosti užíváme dva termíny, které se k ní vztahují: **Case fatality rate** (CFR) je poměr počtu zemřelých k počtu diagnostikovaných (tedy pozitivních v PCR testu). **Infection fatality rate** (IFR) vyjadřuje poměr

počtu zemřelých a počtu všech infikovaných (ať už tato infekce byla detekována či nikoliv). CFR je velmi ovlivněn šíří a kvalitou diagnostiky. Může se dostat u libovolné infekce až ke 100 % jenom tím, že budeme testovat pouze zemřelé osoby. IFR je nezávislý na strategii testování, závisí ovšem jak na nemoci samotné, tak na sledované populaci, stavu zdravotního systému a jeho případném zahlcení. V češtině neexistuje

ustálená terminologie, proto doporučujeme používat termín „smrtnost odhalených případů“ pro CFR a „celková smrtnost“ neboli letalita pro IFR.

V metaanalýze provedené Johnem Ioannidisem je uveden odhad celkové smrtnosti (IFR) 0,05 % pro populaci mladší 70 let a 0,23 % pro populace věkově neomezené (1). Je třeba si uvědomit, že tento odhad je založen na stanovení séroprevalence (tedy na určení počtu nemocných detekcí protilátek), a reálnou IFR tedy pravděpodobně nadsazuje. Skutečný počet infikovaných osob bude vyšší, protože někteří infikovaní jedinci nevytvářejí protilátky, ale na infekci reagují aktivací nespecifické nebo buněčné imunity (2). I tak ale platí, že celková smrtnost s věkem strmě roste. Dle švédské studie dosahovala IFR v populaci starší 70 let téměř 5 % (3).

V Česku zemřelo do 30. prosince 2020 s koronavirovou infekcí 11 429 osob, z toho téměř 70 % bylo starších 75 let (4). Velmi riziková byla zejména zařízení, ve kterých je ubytován větší počet starších lidí – domovy seniorů, domovy s pečovatelskou službou nebo domovy se speciální péčí (5, 6). Infekce se v těchto zařízeních šíří zpravidla velmi rychle a zvládnutí epidemie představuje organizačně velmi složitou situaci. Nákaza zdravotnického personálu mnohdy vede k výraznému omezení kapacity zařízení a nezřídka je nutné situaci řešit za pomoci dobrovolníků či armády. Nicméně po překonání epidemie se personál i klienti stávají díky získané imunitě méně rizikovými z hlediska další vlny epidemie, čemuž se však vůbec nevěnuje pozornost.

Velké diskuse se vedou nad tím, zda se po prodělané nemoci COVID-19 vždy vyskytují protilátky, zda mají ochranný charakter a jak dlouho v těle přetrvávají (2). Větší naděje se upínají k očkování, ale zapomíná se na to, že stejně jako u jiných virových onemocnění je i v případě COVID-19 vysoce pravděpodobné, že jednou získaná specifická imunita má protektivní charakter. Po prodělaném onemocnění má imunitní systém při opakovaném kontaktu s virovou infekcí předpřipravený celý arzenál zbraní, který může použít, přičemž nejdůležitější je specifická T-buněčná i humorální imunita. Díky tomu při druhém kontaktu buď neonemocní vůbec, nebo by měl být průběh onemocnění výrazně slabší (7, 8). Je možné, že většinu pacientů s „opakovaným onemocněním COVID-19“ představují lidé, kteří sice napoprvé měli pozitivní PCR test, nicméně poté neměli žádné příznaky onemocnění nebo jejich potíže měly jinou příčinu. V tomto případě není možné vyloučit, že šlo o falešně pozitivní výsledek. Dále je dosti pravděpodobné, že posloupnost PCR výsledků pozitivní – negativní – pozitivní jde spíše na vrub velmi nízké kvantitě RNA po proděláné infekce, která je blízka detekčnímu limitu metody. Jsou ovšem známy i případy skutečné reinfekce (tedy opakovaně prokázané infekce novým koronavirem doprovázené opakovaným nástupem symptomů), tyto případy jsou však mimořádně vzácné (9). Kellam et al. ve svém přehledu uvádějí, že při většině reinfekcí jinými typy koronavirů, ke kterým dojde v období 6–12 měsíců po první infekci, je zjištěna slabší virová nálož a onemocnění má velmi mírný průběh (8).

V této studii popisujeme vývoj imunity u seniorů po prodělaném onemocnění COVID-19. Vycházíme z dat získaných z Domova se zvláštním režimem v Břevnicích, kde se starají o seniory s různými typy stařecké demence. Onemocnění COVID-19 u prvního klienta v zařízení bylo prokázáno v půlce března 2020. Mezi 23 klienty, 21 členy

zdravotnického personálu a jejich 18 rodinnými příslušníky se nákaza velmi rychle rozšířila a vzbudila i mediální zájem (10). Do řešení epidemie byli zapojeni nejen zaměstnanci ústavu, ale také zdravotníci z Nemocnice Havlíčkův Brod. V domově bylo nutné provést vyšetření infekce u všech klientů a pracovníků, bylo potřeba nastavit karanténní opatření, poskytnout zdravotnickou péči všem nemocným. Situace byla dále ztížena tím, že klienti trpěli demencí a náhlá změna režimu pro ně byla velmi stresující. Naprostá většina osob se uzdravila, 3 klienti onemocnění podlehl. Zdravotní stav klientů i personálu byl pravidelně monitorován i v následujících měsících. V rámci zdravotních kontrol bylo provedeno 5 cyklů odběru krve na stanovení protilátek proti SARS-CoV-2. V létě ani na podzim již další zaměstnanci nebo klienti neonemocněli. Jedna klientka v ústavu sice zemřela, ale nikoli v souvislosti s COVID-19. Žádná infekce novým koronavirem nebyla zjištěna ani v polovině listopadu při nařízeném testování pomocí antigenních testů, a to ani u klientů, ani u zaměstnanců.

Cílem publikace je shrnutí výsledků vyšetření protilátek u seniorů i zdravotníků, kteří prodělali onemocnění COVID-19 v jarní vlně epidemie SARS-CoV-2, srovnání různých testů na stanovení protilátek a popis dynamiky vývoje protilátek po dobu 8 měsíců od infekce. V české ani zahraniční literatuře si nejsme vědomi žádné srovnatelné studie.

## SOUBOR PACIENTŮ

Skupina seniorů zahrnovala 23 osob (17 žen a 6 mužů) v průměrném věku 84 let (v rozpětí 73–94 let). Všichni seniři trpěli demencí a dalšími potížemi obvyklými ve vysokém věku, ale byli v kompenzovaném stavu. Skupina zdravotnického personálu zahrnovala 21 osob (19 žen a 2 muže), v průměrném věku 52 let (v rozpětí 20–65 let). Skupinu rodinných příslušníků tvořilo 18 osob (6 žen, 12 mužů) v průměrném věku 38 let (v rozpětí 11–78 let).

V tab. 1 je uvedeno zastoupení osob v jednotlivých skupinách podle průběhu onemocnění. Osoby s lehkým klinickým průběhem onemocnění COVID-19 měly alespoň 1 z následujících příznaků: zvýšená teplota (37,0–37,9 °C), dušnost, kašel, anosmie či vyšší únava. Příznaky onemocnění u nich přetrvávaly maximálně 2 týdny. Osoby s těžším průběhem onemocnění byly nemocné déle než 2 týdny, měly horečku, vysokou únavu, byly silně dušné. 4 osoby byly hospitalizovány. U 4 osob s pozitivním výsledkem testu RT-PCR vůbec nedošlo

**Tab. 1** Přehled osob dle závažnosti onemocnění COVID-19.

Stav	Seniři	Zdravotníci	Rodinní příslušníci
Zdraví (PCR negativní)	2	9	13
Asymptomatický průběh	4	1	3
Lehký průběh	9 <sup>*)</sup>	6	2
Těžký průběh	5	5	0
Úmrtí	3 <sup>**)</sup>	0	0
<b>Celkem</b>	<b>23</b>	<b>21</b>	<b>18</b>

S výjimkou osob uvedených na prvním řádku tabulky měli všichni ostatní alespoň 1 pozitivní PCR test.

**Pozn.:** \*) Započtena je i 1 žena s hraničním výsledkem PCR testu.

\*\*\*) Započten je i první senior, který zemřel v březnu před zavedením PCR testů.

ke klinickým projevům onemocnění. Zdravá a negativní na RT-PCR zůstala 1 seniorka. 3 senioři zemřeli.

## METODIKA

### RT-PCR TEST

Testování pomocí RT-PCR testu probíhalo v období od 26. března do 29. dubna 2020. Všem osobám byl proveden sěr nazofaryngeální sliznice zkušeným zdravotníkem. Vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 metodou RT-PCR provedli v laboratoři Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkem bylo zjištěno pozitivních 21 z 22 seniorů, 12 z 21 zdravotníků a později ještě 5 z 18 rodinných příslušníků (tab. 1).

Jedna seniorka byla opakovaně PCR-negativní, klinicky nemocná nebyla, ale protilátky proti novému koronaviru u ní byly detekovány. Druhá seniorka měla opakovaně neprůkazný výsledek PCR testu, měla projevy lehkého respiračního onemocnění a protilátky proti novému koronaviru u ní byly detekovány. Třetí seniorka měla pozitivní výsledek PCR testu, projevy lehkého respiračního onemocnění, ale nebyly u ní detekovány neutralizační ani specifické protilátky IgG či IgM. U 1 seniora nebyl PCR test vůbec proveden, protože na respirační onemocnění (pravděpodobně COVID-19) zemřel ještě před testováním.

### ODBĚRY PERIFERNÍ KRVĚ

Odběry periferní krve proběhly 5x v období od dubna do listopadu. Po odběru žilní krve bylo centrifugací separováno sérum, které bylo uchováno při 2–8 °C. Stanovení protilátek proběhlo vždy do 7 dní od odběru. Další alikvoty séra byly zmrazeny na –20 °C.

### STANOVENÍ PROTILÁTEK

Na jaře 2020 se postupně začaly objevovat na trhu diagnostické soupravy na stanovení protilátek proti SARS-CoV-2. Podle typu antigenu se lišila jejich senzitivita (tedy schopnost správně odhalit jedince s protilátkami) a specifita (tedy schopnost správně odhalit jedince bez protilátek). Nukleokapsidový antigen (N) je společný různým typům koronavirů, naopak antigen S1 (*spike protein*) je specifický pro SARS-CoV-2 (2). Třetím typem antigenu, který je v soupravách používán, je RBP (*receptor-binding protein*), který je součástí podjednotky S1. Obecně více specifické bývají soupravy s antigenem S1, vyšší senzitivitu mívají soupravy s proteinem N. Častější zkřížená reakce bývá zjišťována zejména u IgM protilátek, a to například u pacientů, kteří prodělali EBV infekci (11) nebo infekci jinými betakoronaviry.

V této práci uvádíme výsledky vyšetření protilátek metodami ECLIA Roche, CMIA Abbott a ELISA Euroimmun (tab. 2).

**Tab. 2** Přehled použitých testů a jejich parametrů, datum jejich provedení a kvalitativní výsledky.

Test	Izotyp	Certifikace	Metoda	Výrobce	Senzitivita	Specifita	Cut-off
VNT			virus-neutralizační test	Virologická laboratoř ZÚ Ostrava	neuveдена	neuveдена	
PCR			polymerase chain reaction		70 <sup>a)</sup>	95 <sup>a)</sup>	
ECLIA Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Roche (N)	total Ig	US FDA EUA, CE-IVD	electrochemiluminescent immunoassay	Roche Diagnostics, Mannheim, GE	85,3–99,5 <sup>a)</sup>	99,81	1
CMIA Abbott Architect SARS-CoV-2 (S)	IgG	US FDA EUA, CE-IVD	chemiluminescent microparticle immunoassay	Abbott, USA	86,36–100 <sup>b)</sup>	99,63	1,4
ELISA Euroimmun Anti SARS-CoV-2 (S1)	IgG	US FDA EUA, CE-IVD	enzyme-linked immunosorbent assay	EUROIMMUN, Lübeck, GE	43,7–94,4 <sup>b)</sup>	99,60	0,8–1,1
	IgA	CE-IVD			88,2–96,9 <sup>c)</sup>	92–98,3	0,8–1,1
ELISA TestLine EIA COVID-19 (N)	IgG	CE-IVD	enzyme-linked immunosorbent assay	TestLine Clinical Diagnostics, s. r. o., Brno, ČR	95,10	99,00	0,9–1,1
	IgA	CE-IVD			97,40	97,70	0,9–1,1
	IgM	CE-IVD			95,7	97,7	0,9–1,1
ELISA TestLine EIA COVID-19 RBD (S1)	IgG		enzyme-linked immunosorbent assay	TestLine Clinical Diagnostics, s. r. o., Brno, ČR	99,90	99,10	0,9–1,1
	IgA				96,60	98,90	0,9–1,1
	IgM				97,50	95,10	0,9–1,1
VIDIA anti-SARS-CoV-2 (N)	IgG		enzyme-linked immunosorbent assay	VIDIA, s. r. o., Vestec, ČR	neuveдена	neuveдена	0,9–1,1
	IgA				neuveдена	neuveдена	0,9–1,1
	IgM				neuveдена	neuveдена	0,9–1,1
VIDIA anti-SARS-CoV-2 (S1)	IgG		enzyme-linked immunosorbent assay	VIDIA, s. r. o., Vestec, ČR	neuveдена	neuveдена	0,9–1,1
	IgA				neuveдена	neuveдена	0,9–1,1
	IgM				neuveдена	neuveдена	0,9–1,1

Rozmezí *cut-off* hodnot udané jako *a–b* znamená, že výsledek je pozitivní, je-li poměr změřené hodnoty vzorku *a* kalibrátoru větší než *b*, negativní, je-li tento poměr menší než *a*, a hraniční v ostatních případech.

Pozn.:

<sup>a)</sup> Senzitivita do 14 dnů od pozitivity PCR testu a po 14 dnech od pozitivity PCR testu.

<sup>b)</sup> Senzitivita do 10 dnů od pozitivity PCR testu a po 10 dnech od pozitivity PCR testu.

<sup>c)</sup> Senzitivita v kitu verze 4 a 5 (s novým puřrem).

<sup>\*)</sup> Hodnoty senzitivity a specifity testu RT-PCR jsou převzaté z publikace Watsonové et al. (25).



Tyto metody mají certifikaci US FDA EUA (12). V průběhu sledovaného období se však mírně měnilo složení těchto souprav. U ELISA Euroimmun IgA byl v září změněn pufr, čímž se zlepšila specifita vyšetření.

Zlatým standardem v serologické diagnostice je virus-neutralizační test (VNT). Přítomnost neutralizačních protilátek byla zjišťována v sérech získaných v září a vyšetření bylo provedeno virologickým oddělením Zdravotního ústavu v Ostravě, které má tuto metodu akreditovanou (13–15). Na 96jamkové sterilní mikrotitrační destičce se společně inkubuje suspenze živého viru SARS-CoV-2 s ředěným sérem pacienta (v ředění 1 : 10 do 1 : 2560). Jsou-li v séru přítomné neutralizační protilátky proti SARS-CoV-2, naváží se na specifické epitopy proteinu S1 virové částice, čímž zabráni jeho vazbě na buněčné receptory a vstupu do buňky. Po inkubaci virů s protilátkami se přidá suspenze buněk opičích ledvin linie CV-1 a vzorky se 3 dny kultivují. Po ukončení inkubace se do všech jamek přidá neutrální červeně, která obarví cytoplazmu vitálních neinfikovaných buněk, zatímco buňky usmrcené v důsledku virové infekce zůstanou neobarvené. To umožní makroskopické odečtení reakce – jsou-li buňky v jamce obarvené, tedy živé, pak byly v séru přítomné neutralizační protilátky, které ochránily buňky před virovou infekcí. V jamkách, ve kterých nebyl dostatek neutralizačních protilátek, virus buňky usmrtil. Výsledek se uvádí jako neutralizační titr, který je převrácenou hodnotou nejvyššího ředění séra, jež ochrání před infekcí minimálně 50 % buněk v příslušné jamce.

Další skupinu vyšetření tvořily testy ELISA menších výrobců uvedené v tab. 2. Do publikace jsme je zařadili proto, abychom ukázali, jak velká je heterogenita výsledků získaných dostupnými diagnostickými soupravami. Celkový počet provedených vyšetření a pozitivních nálezů je uveden v tab. 3.

## VIZUALIZACE DAT A STATISTICKÁ ANALÝZA

Vzhledem k nízkému počtu sledovaných osob jsme se maximálně snažili využít možnosti vizualizace dat. Jako ideální

nástroj se nám jeví takzvaný níťový diagram (*parallel coordinates graph*), který umožňuje vizualizaci číselných a kategoričtých dat v mnohazměrném prostoru. Bylo-li účelné spočítat korelace, volili jsme neparametrickou (Spearmanovu) korelaci, která zachycuje, jak dobře si vzájemně odpovídá pořadí hodnot dvou veličin, ale nepředpokládá mezi nimi lineární vztah.

## VÝSLEDKY

### DYNAMIKA TVORBY PROTILÁTEK

#### ECLIA Elecsys ROCHE – Anti SARS-CoV-2

Výsledky vyšetření celkových protilátek u seniorů stanovených testem ECLIA Elecsys Roche ukazuje obr. 1. Všichni senioři měli všechny výsledky testů po celou dobu pozitivní. Zajímavé je, že hodnota výsledku testu u většiny osob v čase rostla. Barevné rozlišení jednotlivých osob je zvolen podle výsledku testu VNT provedeného v září. Červeně jsou označeni lidé s nejvyšším množstvím neutralizačních protilátek, zeleně se středním a modře s nejnižším. Celková hladina protilátek ve sledovaném období u většiny osob rostla. Nejvyšší nárůst protilátek pozorujeme u osob s vysokým titrem VNT.

#### ELISA Euroimmun

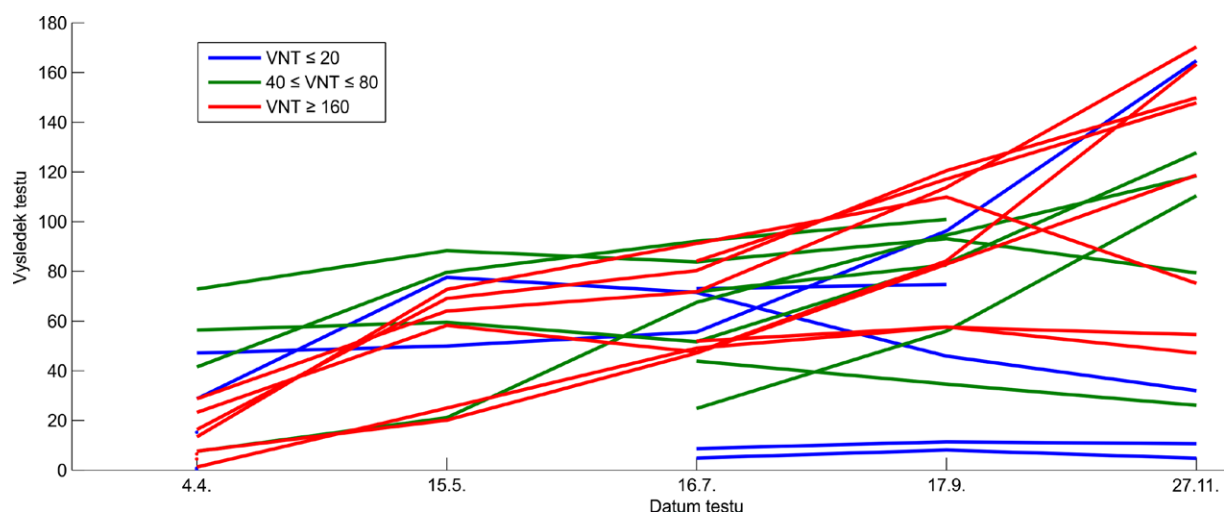
Výsledky vyšetření protilátek IgG a IgA metodou ELISA Euroimmun jsou uvedené na obr. 2. Opět jsou červeně označeny vzorky s nejvyšším množstvím neutralizačních protilátek, modře pak s nejnižším. V horním panelu obr. 2 jsou uvedené protilátky IgG. Vysoké hodnoty byly detekovatelné již první měsíc po infekci (v dubnu), pak došlo k jejich poklesu. V září se hladina protilátek opět zvýšila, v listopadu poklesla, ale hodnoty zůstaly u většiny osob vyšší než v červenci. Lidé, kteří měli vysoké hladiny neutralizačních protilátek, měli vysoké hladiny protilátek IgG i v listopadu.

Tab. 3 Přehled provedených vyšetření.

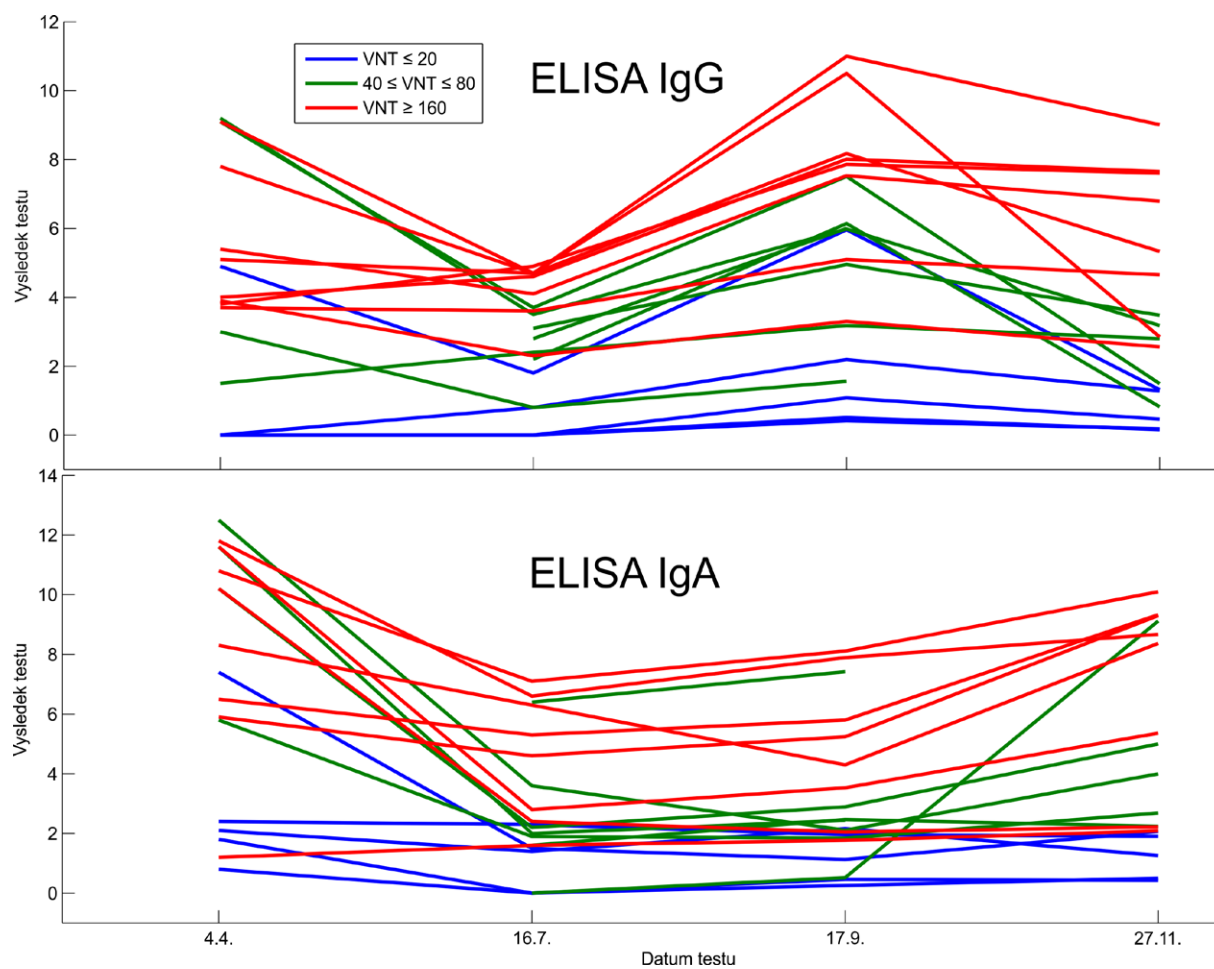
Test	Imunoglobulin	4. dubna	15. května	16. července	17. září	27. listopadu
VNT		nepr	nepr	nepr	18/20	nepr
ECLIA Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Roche (N)	total Ig	15/17	12/12	20/20	20/20	17/17
CMIA ABBOTT Architect SARS-CoV-2 (S)	IgG	14/17	10/10	nepr	nepr	nepr
ELISA Euroimmun Anti SARS-CoV-2 (S1)	IgG	13/17	nepr	15+2/20	17+1/20	14+1/20
	IgA	16+1/17	nepr	17/20	17/20	16/19
ELISA TestLine EIA COVID-19 (N)	IgG				19/20	
	IgA	nepr	nepr	nepr	10/20	nepr
	IgM				12/20	
ELISA TestLine EIA COVID-19 RBD (S1)	IgG				19/20	
	IgA	nepr	nepr	nepr	14+2/20	nepr
	IgM				20/20	
VIDIA anti-SARS-CoV-2 (N)	IgG				20/20	
	IgA	nepr	nepr	nepr	9+2/20	nepr
	IgM				2/20	
VIDIA anti-SARS-CoV-2 (S1)	IgG				20/20	
	IgA	nepr	nepr	nepr	18+2/20	nepr
	IgM				0+1/20	

Údaj *a+b/c* znamená, že z *c* provedených testů v tento den jich vyšlo *a* s pozitivní hodnotou a *b* s hraniční hodnotou. Pokud nebyly zjištěny hraniční výsledky, jsou uvedené jen pozitivní hodnoty *a*.

Pozn.: nepr – neprovedeno



**Obr. 1** Výsledek stanovení celkových protilátek u seniorů pomocí testu ECLIA Elecsys Roche v období od dubna do listopadu (tedy 1–8 měsíců po prodělaném COVID-19). Osa y zachycuje výsledek testu, tedy poměr chemiluminiscenčního signálu vzorku a kalibrátoru. Každá lomená čára představuje 1 osobu. Osoby jsou barevně rozlišené dle výsledku VNT (virus-neutralizačního testu), který proběhl v září.

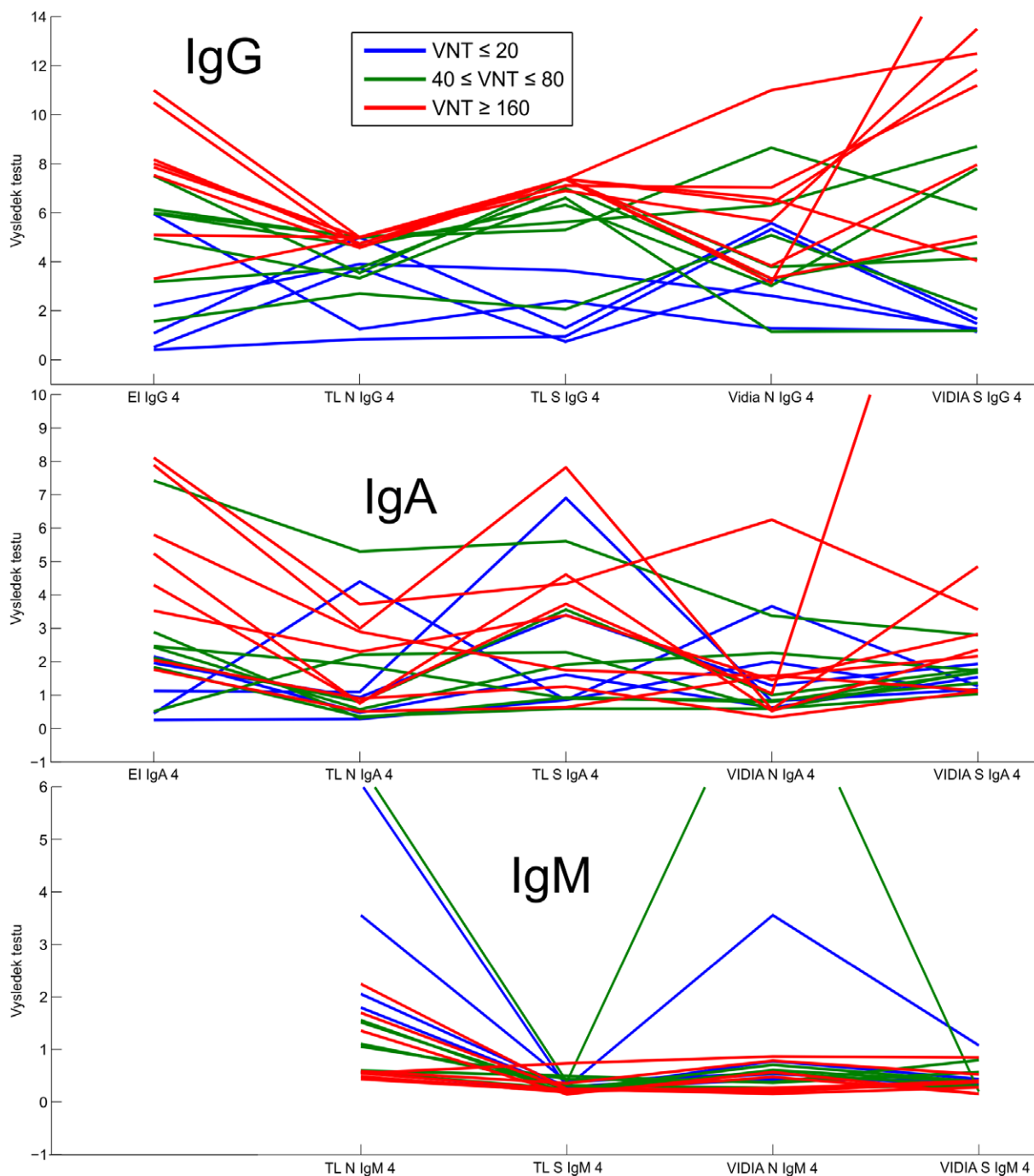


**Obr. 2** Výsledek stanovení protilátek IgG (horní panel) a IgA (dolní panel) u seniorů metodou ELISA firmy Euroimmun. Osa y zachycuje hodnotu *OD ratio* (poměr optických hustot vzorku a kalibrátoru; hodnoty > 1,1 odpovídají pozitivnímu výsledku). Každá lomená čára představuje 1 osobu. Osoby jsou barevně rozlišené dle výsledku VNT (virus-neutralizačního testu), který proběhl v září.

## PŮVODNÍ PRÁCE

Dolní panel *obr. 2* zachycuje stejným způsobem vývoj protilátek IgA. Vysoké hladiny IgA jsou patrné v prvním odběru, pak hodnoty klesaly. V období mezi červencem a listopadem protilátky IgA rostly u většiny osob. Jejich hladina v listopadu opět poměrně dobře koreluje s výsledkem VNT v září.

Nejdůležitějším poznatkem této části studie je, že po prodělaném onemocnění se u seniorů tvoří specifické protilátky IgA i IgG. Nárůst protilátek mezi zářím a listopadem může souviset s opakovaným kontaktem s virovou infekcí při druhé vlně epidemie.



**Obř. 3** Srovnání různých ELISA testů pro stanovení protilátek IgG (horní panel), IgA (prostřední panel) a IgM (dolní panel) při odběru v září 2020 (6 měsíců po infekci).

Každá lomená čára představuje 1 pacienta. Na horizontální ose jsou vyneseny jednotlivé metody, nikoliv čas. Osoby jsou barevně rozlišené dle výsledku VNT (virus-neutralizačního testu), který proběhl v září.



**CMIA Abbott, Architect**

Metodou Abbott byly stanoveny protilátky IgG ve vzorcích odebraných v dubnu a v květnu. V dubnu byla u 14 ze 17 vzorků zjištěna pozitivní hladina protilátek IgG. Pouze u 10 osob máme k dispozici hodnoty z května, přičemž všechny byly pozitivní. U 8 osob hodnota oproti dubnu vzrostla a u 2 poklesla.

**KORELACE JEDNOTLIVÝCH METOD**

V září se nám podařilo použít nejširší baterii ELISA testů na stanovení protilátek IgG, IgA a IgM. Na obr. 3 jsou výsledky stanovené 5 různými metodami. Kromě ELISA Euroimmun využívající antigen S1, byly použity testy Testline s (RBD) antigenem S a proteinem N a soupravy Vidia s proteiny S1 a N. V případě ELISA Testline a Vidia jsme stanovovali IgM, u ELISA Euroimmun jsme IgM neměřili.

Všechny testy IgG korelovaly s výsledkem VNT (horní panel obr. 3). Většina testů na IgG mezi sebou statisticky významně korelovala. Nekorelovaly mezi sebou pouze dva páry testů: ELISA Euroimmun s VIDIA N a potom testy Testline S s Vidia N. Nicméně z obr. 3 je zřejmé, že se hodnoty naměřené jednotlivými testy mezi sebou dosti liší.

V případě protilátek IgA (prostřední panel obr. 3) je situace mnohem méně přehledná než u IgG. Hladina protilátek IgA nijak neodpovídá výsledkům VNT. Korelace jednotlivých metod mezi sebou není nijak vysoká. Nejvyšší shoda ( $c = 0,81$ ;  $p < 0,0001$ ) byla naměřena mezi testy ELISA Euroimmun a VIDIA S. Další významná a vysoká korelace je mezi testy VIDIA S a TestLine S. Převažuje tedy očekávaná korelace podle použitého antigenu. Ostatní korelace dosahují hodnoty jen kolem 0,5 nebo nejsou statisticky významné vůbec. Číselné škály jednotlivých metod jsou opět dosti rozdílné.

V případě protilátek IgM (dolní panel obr. 3) se většina výsledků pohybuje v negativní oblasti. Pozitivní IgM byly zjištěny spíše ojediněle, a to u metod používajících méně specifický protein N. Všechna vyšetření sledující IgM proti specifickému proteinu S byla negativní. Výsledky IgM zřejmě antikorelují s VNT – pacienti s vysokými titry VNT mají typicky negativní protilátky IgM, a naopak vyšší hodnoty IgM vykazují častěji pacienti s nízkou hodnotou VNT. Žádná z korelací mezi jednotlivými dvojicemi testů v tomto případě není významná, což je ale zřejmě dáno tím, že většina výsledků se pohybuje v pásmu negativity.

**VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ PROTILÁTEK U ZDRAVOTNICKÉHO PERSONÁLU A RODINNÝCH PŘÍSLUŠNÍKŮ**

U zdravotníků a rodinných příslušníků byly protilátky stanoveny v červenci a v září. U všech 15 vyšetřených osob byly zjištěny pozitivní celkové imunoglobuliny metodou Roche. Pozitivní IgG protilátky byly zjištěny metodou ELISA Euroimmun u 9 z 11 (v červenci) a 7 z 10 osob (v září) a pozitivní IgA bylo zjištěno u 4 z 11 (v červenci) resp. u 9 z 13 osob (v září). Neutralizační protilátky byly testem VNT v září zjištěny u 13 osob, u 1 osoby byly negativní, u 1 nebyly neutralizační protilátky stanoveny vůbec.

**DISKUSE**

Onemocnění COVID-19 se sice výrazně podílí na vyšší smrtnosti osob starších 70 let (1), nicméně mnohem větší počet seniorů infekci novým koronavirem překoná a získá dlouhodobou imunitu. K dispozici však není mnoho studií,

kteří by imunitu seniorů dlouhodobě sledovali. V této publikaci jsme shrnuli své pozorování tvorby protilátek u skupiny seniorů, kteří COVID-19 prodělali na jaře 2020.

Domov Břevnice byl jedním z prvních ústavů v Česku postižených epidemií. Zatímco na jaře byla v naší zemi situace relativně mírná, na podzim zasáhla epidemie velký počet, ne-li většinu těchto zařízení. Jelikož nemáme přístup k centrálním datům, požádali jsme o data v jednom z krajů, se kterými dlouhodobě spolupracujeme, a to náměstkyni hejtmána Jihočeského kraje pro sociální oblast doc. Lucii Kozlovou. Z interních dat odboru sociálních věcí zdejšího krajského úřadu za období března až prosinec 2020 vyplývají následující informace: V Jihočeském kraji je celkem 47 pobytových zařízení – 32 domovů pro seniory s cca 3 tisíci osobami a 19 domovů se zvláštním režimem s cca 970 osobami. Na jaře se koronavirová infekce prokázala u většího počtu klientů (více než 15 osob) pouze v 1 zařízení, na podzim již v 15 zařízeních. Nejvíce se epidemie rozšířila v Městském ústavu sociálních služeb – domově pro seniory ve Strakonících, v Domově důchodců v Dobré Vodě, v Domově pro seniory v Jindřichově Hradci, v Alzheimercentru v Českých Budějovicích, v Domově pro seniory Hvízdal, v domově Sociální pohoda v Javorníku a na jaře ještě v Zařízení sociálních služeb SOVY v Českém Krumlově. Pouze ve 3 zařízeních se na podzim onemocnětí nevyskytlo vůbec.

Celkem bylo v těchto zařízeních pobytových sociálních služeb od října do 6. prosince 2020 léčeno 886 seniorů (tedy 22,3 % ze všech ubytovaných seniorů). Z nemocných klientů bylo 714 osob (80,6 %) léčeno přímo v pobytových zařízeních, 172 osob (19,4 %) bylo hospitalizováno. Celkem zemřelo 78 osob (8,8 % z nemocných osob).

Podobná data jsou k dispozici ze Švédska. Ve Stockholmu bylo na jaře zasaženo koronavirovou infekcí 61 % domovů pro seniory. Z 921 seniorů, kteří ve Švédsku zemřeli, 380 žilo v těchto zařízeních (5). Jiná studie z USA uvádí výskyt COVID-19 v 31,4 % domovech s pečovatelskou službou (6).

Také zaměstnanci těchto ústavů patří mezi vysoce rizikové skupiny z hlediska nákazy. Séroprevalence 23 % byla zjištěna např. u zaměstnanců těchto zařízení ve Stockholmu (5). Podobně ve stockholmských nemocnicích byla zjištěna séroprevalence 22–25 % u zdravotních sester, 19 % u lékařů a 13 % mezi ostatními zaměstnanci nemocnic (17).

Je důležité si uvědomit, že mezi jednotlivými zařízeními panují velké rozdíly. Někde onemocní téměř nikdo, jinde většina klientů a zaměstnanců. Tak významně postižených zařízení, jako byla Břevnice, však není mnoho. V ní jsme protilátky zjistili u 20 z 22 seniorů (90,9 %) a 9 z 21 zdravotníků (42,9 %).

V naší studii jsme pomocí série vyšetření provedených v období od dubna do listopadu 2020 potvrdili, že u naprosté většiny seniorů se protilátky tvoří a dlouhodobě přetrvávají. V září tedy přibližně po 180 dnech byly u většiny osob detekovány neutralizační protilátky testem VNT. Podobně Wajnbergová et al. detekovali dlouhodobý výskyt neutralizačních protilátek u osob s COVID-19 (18). Na podzim jsme detekovali vzestup protilátek IgG. Domníváme se, že tento vzestup může souviset s expozicí novému koronaviru při druhé vlně epidemie. Jestliže na konci listopadu bylo v kraji Vysočina zjištěno více než 5 % osob PCR testu jako pozitivních, pak je velmi pravděpodobné, že se virus objevil znovu i v břevnickém domově (4). Co je klíčové – nikdo z klientů ani personálu na podzim onemocněl. Podobně nikdo opakovaně onemocněl např. ani ve studii, kterou publikovali

Sekine et al., v níž sledovali specifickou T-buněčnou odpověď (7).

V souvislosti s ministerským nařízením bylo v listopadu provedeno testování antigenními testy. Žádosti, aby testování nebylo prováděno u klientů, kteří již COVID-19 prodělali, nebylo vyhověno. U nikoho z klientů ani zaměstnanců nebyla infekce zjištěna.

Společnost vnímá seniory jako osoby s křehkou imunitou a podlomeným zdravím. Jenže tento odlišný pohled na zdraví a imunitu mladých a starých lidí není podložený daty a v situaci infekce SARS-CoV-2 může vést k diskriminaci starších spoluobčanů. U mladých osob, které COVID-19 prodělaly, předpokládáme, že jsou vůči infekci odolní a mají velmi nízké riziko opakované nákazy. Plazma osob, jež mají neutralizační protilátky, se dokonce používá pro léčebné účely (18, 19). Seniory, kteří COVID-19 prodělali a kteří, jak jsme prokázali, také mají neutralizační protilátky, máme ovšem potřebu i nadále chránit. Tyto postupy ovšem vedou k tomu, že jim opakovaně zbytečně provádíme nazofaryngeální stěry, bráníme jim v kontaktu s rodinnými příslušníky i mezi sebou v rámci společných aktivit a v pohybu mimo zařízení. Je třeba si uvědomit, že na psychiku seniorů mají tato omezení zásadní negativní dopad a vedou k výraznému duševnímu i fyzickému strádání. Proto musíme věnovat více pozornosti tomu, abychom maximálně vyšli vstříc požadavkům na návrat rekonvalescentů do normálního života. Chránit je vhodné pouze rizikové jedince, ne ty imunní.

Na základě uvedených výsledků chceme navrhnout revizi opatření, která jsou nyní uplatňována. Domníváme se, že je vhodné po prodělaném onemocnění (po ukončení epidemie) všem klientům zařízení stanovit protilátky proti novému koronaviru kvalitním laboratorním vyšetřením krve, a v případě, že v daném zařízení zjistíme vyšší procento osob s protilátkami, je možné považovat kolektiv za méně rizikový a preventivní opatření v něm můžeme zmírnit (u osob s protilátkami již nemusíme neprovádět antigenní testy, můžeme jim umožnit návštěvy nebo volný pohyb mimo zařízení). Je pravděpodobné, že tito lidé nebudou muset být očkováni nebo bude stačit očkovat je později.

Vyšší riziko infekce mají pouze ti, kteří ještě protilátky nemají (i když někteří z nich mohou mít aktivovanou buněčnou imunitu, ale tu zatím neumíme stanovit). Podle vyjádření odborných společností má testování osob antigenním testem smysl pouze tehdy, pokud daní jedinci mají klinické příznaky respiračního onemocnění nebo byli v kontaktu s pozitivní osobou (20, 21).

Ve druhé části studie jsme ukázali, jak velká je heterogenita mezi soupravami, které se používají pro stanovení protilátek. Významně nedoporučujeme používat rychlotesty (laterální chromatografické testy), jelikož jejich senzitivita je obecně velmi nízká, což se ukázalo např. při použití testů Wantai v celorepublikové studii Preval (22) a také při použití testu Innovita v testování zdravotnických pracovníků v Plzni (23). Na jaře jsme testem Innovita detekovali IgG protilátky pouze u 12 ze 17 osob, na podzim jen u 7 z 20 osob. Navíc řada testů neměla funkční kontrolní zónu. Protilátky IgM byly pozitivní u 7 z 17 osob na jaře a na podzim u 1 z 20. Do této práce jsme proto výsledky nezařadili. Na trhu jsou k dispozici velmi kvalitní metody jako chemiluminiscenční metody (např. od firem Roche, Abbott, Diasorin) nebo některé metody ELISA (např. Euroimmun). Tyto metody byly otestovány americkým Centrem pro kontrolu a prevenci onemocnění (CDC) a mají certifikaci US-FDA EUA (12). Otestovali jsme

však i testy ELISA od českých výrobců TestLine a Vidia. Tyto metody s testy ELISA Euroimmun korelovaly, nicméně mezi nimi byly velké rozdíly. Potěšitelné bylo zjištění, že vzorky s vysokým titrem neutralizačních protilátek stanovených testem VNT se většinou objevily jako pozitivní i v těchto testech ELISA. Při hodnocení výsledků je třeba každou publikovanou studii posuzovat i s ohledem na použitý test, jeho senzitivitu a specifitu. Výsledky séroprevalence je nutné kriticky hodnotit v souvislosti s pozitivitou testů PCR v dané oblasti či v daném zařízení – jen tak dávají jednotlivé střípky informací smysluplné závěry.

Plošná pravidla vedou v řadě případů nejen k nesmyslnému zatížení testovaných lidí, zatížení personálu provádějícího odběr, ale také k plýtvání finančními prostředky. Stanovení protilátek kvalitními laboratorními testy umožňuje vytipovat imunní osoby (24). Pokud před další vlnou koronavirové epidemie zjistíme, kdo již infekci prodělal, můžeme lépe posoudit riziko infekce pro daný kolektiv a přizpůsobit tomu intenzitu protiepidemických opatření. To platí nejen pro domovy důchodců, ale i pro zdravotnická zařízení, školy a velké pracovní kolektivy.

### Poděkování

Děkujeme pracovníkům Domova se zvláštní péčí v Břevnici a hlavně všem klientům domova za dlouhodobou spolupráci a všem kolegům z laboratorů za pomoc s provedením testů. Dále děkujeme náměstkyni hejtmana Jihočeského kraje doc. Ing. Lucii Kozlové, Ph.D., a vedoucí odboru sociálních věcí KÚJČ Mgr. Pavle Doubkové za poskytnutí informací o průběhu epidemie COVID-19 v pobytových zařízeních v Jihočeském kraji.

### Čestné prohlášení

Pro část z provedených testů poskytly firmy Roche, TestLine, Vidia, Dynex a Abbott materiální podporu v podobě souprav zdarma nebo poskytly výrazné jednorázové slevy. V červenci 2020 Václav Fejt napsal o této studii pro Roche honorovaný článek do firemního časopisu.

Ostatní autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou a žádná farmaceutická firma nebyla ani jejím zadavatelem.

### Seznam zkratk

<b>CE-IVD</b>	in vitro diagnostika
<b>CFR</b>	celková smrtnost (case fatality rate)
<b>CMIA</b>	chemiluminescent immunoassay
<b>COVID-19</b>	coronavirus disease 2019
<b>ECLIA</b>	electrochemiluminescent immunoassay
<b>ELISA</b>	enzyme-linked immunosorbent assay
<b>EUA</b>	emergency use authorizations
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin, USA (U.S. Food and Drug Administration)
<b>IFR</b>	smrtnost odhalených případů (infection fatality rate)
<b>IgA, IgG, IgM</b>	imunoglobuliny A, G, M
<b>N</b>	nukleokapsidový antigen
<b>OD ratio</b>	poměr optických hustot vzorku a kalibrátoru v testu ELISA
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce
<b>RBP</b>	receptor-binding protein, součást S1
<b>RT-PCR</b>	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
<b>S1</b>	spike protein antigen 1
<b>SARS-CoV-2</b>	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
<b>VNT</b>	virus-neutralizační test

## Literatura

- 1. Ioannidis JPA.** The infection fatality rate of COVID-19 inferred from seroprevalence data. *Bulletin of the World Health Organization*, 2020 Oct 14; BLT.20.265892. Dostupné na: [www.who.int/bulletin/online\\_first/BLT.20.265892.pdf](http://www.who.int/bulletin/online_first/BLT.20.265892.pdf)
- 2. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB.** SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. *Lancet* 2020; 396: 1595–1606.
- 3. Folkhälsomyndigheten – Public Health Agency of Sweden.** The infection fatality rate of COVID-19 in Stockholm – technical report. *Folkhälsomyndigheten*, 2020. Dostupné na: [www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/53c0dc391be54f5d959ead9131edb771/infection-fatality-rate-covid-19-stockholm-technical-report.pdf](http://www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/53c0dc391be54f5d959ead9131edb771/infection-fatality-rate-covid-19-stockholm-technical-report.pdf)
- 4. Ministerstvo zdravotnictví ČR.** COVID-19: Přehled aktuální situace v ČR. *MZ ČR*, 2020. Dostupné na: [https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19?utm\\_source=general&utm\\_medium=widget&utm\\_campaign=covid-19](https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19?utm_source=general&utm_medium=widget&utm_campaign=covid-19)
- 5. Lindahl JF, Hoffman T, Esmaeilzadeh M et al.** High seroprevalence of SARS-CoV-2 in elderly care employees in Sweden. *Infect Ecol Epidemiol* 2020; 10: 1789036.
- 6. Abrams HR, Loomer L, Gandhi A et al.** Characteristics of U.S. nursing homes with COVID-19 cases. *J Am Geriatr Soc* 2020; 68: 1653–1656.
- 7. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O et al.** Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 2020; 183: 158–168.e14.
- 8. Kellam P, Barclay W.** The dynamics of humoral immune responses following SARS-CoV-2 infection and the potential for reinfection. *J Gen Virol* 2020; 101: 791–797.
- 9. Ledford H.** Coronavirus reinfections: three questions scientists are asking. *Nature* 2020; 585: 168–169.
- 10.** Nakažená seniorka z domova na Vysočině podlehla koronaviru. *Novinky.cz*, 29. 3. 2020. Dostupné na: [www.novinky.cz/koronavirus/clanek/nakazena-seniorka-z-domova-na-vysocine-podlehla-koronaviru-40318485](http://www.novinky.cz/koronavirus/clanek/nakazena-seniorka-z-domova-na-vysocine-podlehla-koronaviru-40318485)
- 11. Pickering S, Betancor G, Galão RP et al.** Comparative assessment of multiple COVID-19 serological technologies supports continued evaluation of point-of-care lateral flow assays in hospital and community healthcare settings. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1008817.
- 12. U.S. Food and Drug Administration.** EUA authorized serology test performance. *FDA*, 12. 7. 2020. Dostupné na: [www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance](http://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance)
- 13. Januška J, Daneš L, Heinz F.** Laboratory diagnostic methods of arboviral and rodent-borne viral infections. *Avicenum*, Praha, 1990.
- 14. Zelená H, Januška J, Raszka J.** Micromodification of virus-neutralisation assay with vital staining in 96-well plate and its use in diagnostics of Táhyná virus infections *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2008; 57: 104–108.
- 15. Litzba N, Zelená H, Kreil TR et al.** Evaluation of different serological diagnostic methods for tick-borne encephalitis virus: enzyme-linked immunosorbent, immunofluorescence, and neutralization assay. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014; 14: 149–159.
- 16. Ministerstvo práce a sociálních věcí ČR.** Statistická ročenka z oblasti práce a sociálních věcí 2019. *MPSV ČR*, 2020. Dostupné na: [www.mpsv.cz/documents/20142/975025/Statisticka\\_rocenka\\_z\\_oblasti\\_prace\\_a\\_sociálních\\_věcí\\_2019+%281%29.pdf/9da5cc00-7d78-7caa-6bf2-01eeccdeabd7](http://www.mpsv.cz/documents/20142/975025/Statisticka_rocenka_z_oblasti_prace_a_sociálních_věcí_2019+%281%29.pdf/9da5cc00-7d78-7caa-6bf2-01eeccdeabd7)
- 17. Rudberg AS, Havervall S, Månberg A et al.** SARS-CoV-2 exposure, symptoms and seroprevalence in healthcare workers in Sweden. *Nat Commun* 2020; 11: 5064.
- 18. Wajnberg A, Amanat F, Firpo A et al.** Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science* 2020; 370: 1227–1230.
- 19. Bohoněk M, Řezáč D.** Výroba a použití rekonvalescentní plazmy pro léčbu COVID-19 s přihlédnutím ke zkušenostem v ÚVN Praha. *Časopis lékařů českých* 2020; 159: 175–180.
- 20. Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP.** Přímá detekce SARS-CoV-2: detekce antigenu. *SPLM*, 23. 9. 2020. Dostupné na: [www.splm.cz/article/prima-detekce-sars-cov-2-detekce-antigenu](http://www.splm.cz/article/prima-detekce-sars-cov-2-detekce-antigenu)
- 21. Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP.** Stanovisko rakouské společnosti pro infekční choroby a tropickou medicínu k testování SARS-CoV-2. *SPLM*, 4. 10. 2020. Dostupné na: [www.splm.cz/article/stanovisko-rakouske-spolecnosti-pro-infekcni-choroby-a-tropickou-medicinu-k-testovani-sars-cov-2](http://www.splm.cz/article/stanovisko-rakouske-spolecnosti-pro-infekcni-choroby-a-tropickou-medicinu-k-testovani-sars-cov-2)
- 22. Ministerstvo zdravotnictví ČR.** Strategie testování onemocnění COVID-19 pro sezónu respiračních onemocnění 2020/202. Příloha 3 – Průřezové studie protilátkové imunity. *MZ ČR*, 29. 9. 2020. Dostupné na: [https://koronavirus.mzcr.cz/wp-content/uploads/2020/10/Strategie-testovani-onemocneni-COVID-19\\_def\\_200929.pdf](https://koronavirus.mzcr.cz/wp-content/uploads/2020/10/Strategie-testovani-onemocneni-COVID-19_def_200929.pdf)
- 23. Kučera R.** Srovnání manuálních a automatizovaných metodik stanovení protilátek IgG SARS-CoV-2. 28. severočeská imunologická konference, Ústí nad Labem, 11.–12. 9. 2020.
- 24. Krátká Z, Fürst T, Vencálek O et al.** Průzkumný vrt: jak správně připravit, provést a vyhodnotit séroprevalenční studii. *Časopis lékařů českých* 2020; 159: 217–225.
- 25. Watson J, Whiting PF, Brush JE.** Interpreting a COVID-19 test result. *BMJ* 2020; 369: m1808.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**MVDr. Václav Fejt**

Oddělení společných laboratoří,  
Nemocnice Havlíčkův Brod  
Husova 2624, 58 022 Havlíčkův Brod  
Tel.: 569 472 445  
e-mail: [vaclav.fejt@onhb.cz](mailto:vaclav.fejt@onhb.cz)



# Roční období, vitamin D a COVID-19

Miloslav Kopeček<sup>1, 2</sup>, Cyril Höschl<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Národní ústav duševního zdraví, Klecany

<sup>2</sup>Klinika psychiatrie a lékařské psychologie 3. LF UK v Praze

Čas. Lék. čes. 2020; 159: 312–316

## SOUHRN

Preventivní efekt vitaminu D na akutní respirační infekce potvrzují dvě metaanalýzy. Kauzální efekt nízké hladiny vitaminu D z hlediska vyššího rizika bakteriální pneumonie potvrzuje jedna mendelovská randomizační studie. Tyto studie pocházejí z období před pandemií COVID-19. Několik asociačních studií nalezlo vyšší výskyt jedinců pozitivních na SARS-CoV-2, závažnější průběh onemocnění COVID-19 nebo vyšší riziko úmrtí na něj u jedinců s deficitem vitaminu D ve srovnání s nedeficitními osobami.

V tomto sdělení upozorňujeme na rozdílný vývoj relativní mortality na COVID-19 v Evropě ve srovnání se státy jižní polokoule – Austrálií, Brazílií a Jihoafrickou republikou v závislosti na ročním období, což může souviset s intenzitou slunečního záření a následnou fluktuací sérových hladin vitaminu D. Přestože se zatím nelze jednoznačně vyjádřit k vlivu vitaminu D na COVID-19, je vhodné v období nedostatku slunečního záření, které je hlavním zdrojem vitaminu D, doplnit jeho zásoby správnou výživou či v podobě doplňků stravy, aby se předešlo jeho deficitu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

COVID-19, SARS-CoV-2, vitamin D

## SUMMARY

**Kopeček M., Höschl C. Season of the year, vitamin D and COVID-19**

Vitamin D supplementation reduced the risk of acute respiratory tract infection in two meta-analyses. Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on bacterial pneumonias risk. These studies involved patients before COVID-19 pandemic. Several association studies found higher incidence of SARS-CoV-2 positivity, greater COVID-19 severity and higher risk of mortality in vitamin D deficient subjects compared to vitamin D non-deficient controls.

We draw attention to the trend of inverse relative COVID-19 mortality in Europe versus the states of the Southern Hemisphere (Australia, Brazil, South Africa) in dependence on season, which may be associated with intensity of ultraviolet radiation and consequent seasonal fluctuation of serum vitamin D levels. Although we cannot yet confirm causal role of vitamin D in SARS-CoV-2 positivity or COVID-19, we recommend consumption of vitamin D rich food or vitamin D supplementation in the non-sunny season to prevent vitamin D deficiency.

## KEYWORDS

COVID-19, SARS-CoV-2, vitamin D

## ÚVOD

Zájem o potenciální roli vitaminu D v prevenci akutních respiračních infekcí (ARI) lze vystopovat do 30. let 20. století, kdy byl zkoumán efekt podávání rybího tuku na redukci pracovní neschopnosti pro nachlazení (1). V metaanalýze dvojité slepých randomizovaných placeboem kontrolovaných studií (25 studií, 10 933 účastníků) byl zjištěn preventivní efekt vitaminu D na rozvoj ARI (NNT = 33) (2). Benefit byl větší při podávání denních či týdenních dávek bez přídatku bolusových dávek (NNT = 20). Tato metaanalýza prokázala největší prospěch u jedinců s bazálními sérovými hladinami vitaminu D (25(OH)D) < 25 nmol/l (NNT = 4) (2).

V nerecenzované novější metaanalýze stejného výzkumného týmu (45 studií, 73 384 účastníků) byl preventivní efekt vitaminu D na rozvoj ARI potvrzen (poměr šancí [OR] 0,91; 95% interval spolehlivosti [CI] 0,84–0,99), přestože byla zjištěna významná heterogenita zařazených studií. Na rozdíl od předchozí práce nebyl zjištěn statisticky významný efekt bazálních hladin 25(OH)D. Nejsilnější protektivní efekt na rozvoj ARI byl spojen s podáváním denních dávek 400–1000 jednotek vitaminu D (OR 0,7; 95% CI 0,55–0,89) (3). Autoři studie upozorňují na možné zkreslení a přecenění preventivního efektu vitaminu D. Všechny studie zahrnuté v metaanalýzách byly z období před pandemií COVID-19.

Od 27. října 2020 je ve Velké Británii organizována 6měsíční studie CORONAVIT, která 5440 jedincům nabídne náhodně zařazení do jednoho ze 3 ramen. První skupina je kontrolní

neintervenci, jíž je doporučeno užívat 400 IU vitaminu D denně, ve dvou aktivních ramenech potom bude jedincům se sérovou hladinou 25(OH)D < 75 nmol/l podáváno 800 IU nebo 3200 IU cholecalciferolu (vitaminu D<sub>3</sub>) denně. Studie bude odpovídat na otázku, zda se liší frekvence jakékoliv respirační infekce mezi třemi rameny studie. V sekundárních cílech studie bude sledována rovněž redukce rizika a závažnosti infekce COVID-19.

## VÝSLEDKY ASOCIAČNÍCH STUDIÍ Z OBDOBÍ PANDEMIE

Čtyři (4–7) z pěti studií uvádějí vyšší výskyt jedinců pozitivních na SARS-CoV-2 u pacientů s anamnézou deficitu 25(OH)D než bez něho. Možné vysvětlení negativního výsledku studie (8) je skutečnost, že autoři použili anamnestická data o hladinách 25(OH)D z období 10–14 let před infekcí, zatímco 4 pozitivní studie použily anamnestická data, která nebyla starší než 1 rok. Zmíněná negativní studie nalezla vztah při jednorozměrné analýze, ten se však vytratil při více-rozměrné analýze, která brala v potaz zkreslující proměnné.

Nejrozsáhlejší počet jedinců (190 tisíc) zahrnula studie z USA (7). Ta prokázala inverzní vztah mezi pozitivitou na SARS-CoV-2 a cirkulující hladinou 25(OH)D v séru. Tento vztah přetrvával při zvážení demografických faktorů, jako je zeměpisná šířka, rasa/etnikum, pohlaví a věk. Upravený poměr šancí (OR) činil 0,984 při navýšení o 1 ng/ml (2,5 nmol/l)

(95% CI 0,983–0,986;  $p < 0,001$ ) (7). Studie Meltzera et al. (6) našla významně více jedinců s deficitní hladinou 25(OH)D v nebělošské populaci a zároveň více jedinců pozitivních na SARS-CoV-2 z nebělošské populace z oblasti Chicaga. To může souviset s faktem, že kožní fototyp modifikuje tvorbu 25(OH)D z UV záření (vyšší fototyp je spojen s nižší syntézou vitamínu D z UV záření).

Jiné malé studie poukazují na to, že mortalita na COVID-19 byla vyšší u jedinců s deficitem 25(OH)D v Itálii ( $n = 48$ ) (9), mužů ve Švýcarsku ( $n = 65$ ) (10) nebo že onemocnění má u pacientů s deficitem 25(OH)D vyšší závažnost ( $n = 62$ ) (11), vyžaduje přijetí na JIP ( $n = 134$ ) (12) či mechanickou ventilaci pro ARDS ( $n = 33$ ) (13). Studie z Turecka ( $n = 149$ ) pomocí multivariační logistické regrese zjistila, že počet lymfocytů a hladiny sérového albuminu a 25(OH)D (OR 0,927; 95% CI 0,875–0,982;  $p = 0,01$ ) byly nezávislým prediktorem mortality (14). Německá prospektivní studie ( $n = 185$ ) udala poměr rizik (HR) 6,12 (95% CI 2,79–13,42;  $p < 0,001$ ) pro invazivní mechanickou ventilaci a 14,73 (95% CI 4,16–52,19;  $p < 0,001$ ) pro úmrtí při deficitu 25(OH)D definovaném jako sérová hladina 25(OH)D  $< 30$  nmol/l (15).

Publikovány byly i 4 negativní studie ( $n = 109$ ) (16), ( $n = 413$ ) (17), ( $n = 347$ ) (18) ověřující vztah mezi hladinou 25(OH)D a závažností COVID-19. Čtvrtá studie ( $n = 129$ ) po úpravě na zkreslující faktory našla dokonce neočekávanou pozitivní asociaci mezi zvyšujícím se koncentrací 25(OH)D a úmrtností v nemocnici s poměrem šancí (OR) 1,73 (95% CI 1,11–2,69;  $p = 0,016$ ) (19).

Uvedené studie jsou asociční, nepotvrzují tedy kauzální vztah mezi COVID-19 a deficitem 25(OH)D. K průkazu kauzálního vztahu je třeba intervenčních studií či mendelovské randomizační analýzy.

## MENDELOVSKÉ RANDOMIZAČNÍ ANALÝZY

Mendelovská randomizační (MR) analýza využívá přirozené randomizace genetických variant jako zástupců expozičních proměnných. Protože jsou alely náhodně distribuovány v době počtů, genetické varianty nemohou být asociovány s potenciálně současně působícími faktory na hladinu 25(OH)D, jakými jsou např. obezita, věk, onemocnění ledvin či jiné chronické nemoci. MR analýza tedy není náchylná k reverzní kauzalitě, jak tomu může být u asocičních studií. Příkladem reverzní kauzality je nižší hladina 25(OH)D následkem obezity (cholekalCIFerol je lipofilní a ukládá se do tukové tkáně), nemocí ledvin nebo chronických nemocí, jež jsou spojeny s nižší venkovní aktivitou a s ní spojenou nižší expozicí ultrafialovému záření. Ultrafialové záření se podílí na tvorbě vitamínu D až z 80 %. 1 hodina expozice slunečnímu záření vedla v Německu ke zvýšení hladiny 25(OH)D o 0,04 nmol/l (95% CI 0,04–0,05 nmol/l) (20).

Určení kauzality, které je doménou některých intervenčních randomizovaných kontrolovaných studií, tak může být provedeno i z observačního uspořádání studie. V MR analýze ( $n = 116\ 335$ ) byl poměr šancí (OR) 1,12 (95% CI 1,02–1,23) pro bakteriální pneumonii při geneticky určeném snížení plazmatické hladiny o 10 nmol/l 25(OH)D. Výsledky nebyly asociovány s rizikem infekce močových cest, infekcí kůže, sepsí či gastroenteritidou, které byly použity jako negativní kontrola (21). Ve stejné studii byla obsažena i observační analýza ( $n = 35\ 833$ ), ve které byla hodnocena sérová koncentrace 25(OH)D a výskyt bakteriální pneumonie. Poměr rizik (HR) pro bakteriální pneumonii byl v přízpusobené multivariační analýze

1,27 (95% CI 1,16–1,40) pro jedince s 25(OH)D  $< 25$  nmol/l ve srovnání s jedinci s hladinou  $\geq 25$  nmol/l (21).

Aktuálně jsou v recenzním řízení 3 MR analýzy ověřující kauzalitu mezi genetickými variantami pro 25(OH)D a onemocněním COVID-19 (22–24). Všechny pracují se stejnou primární databází UK Biobank, kde jsou k dispozici vedle podrobných demografických údajů rovněž záznamy o zdravotních rizikových faktorech, stylu života i sérových koncentracích 25(OH)D před v mediánu 11 lety.

Jednotlivé studie se liší v metodických detailech. První MR analýza použila data od britských bělochů evropského původu a zjistila, že geneticky zvýšená hladina 25(OH)D o 1 směrodatnou odchylku (SD) na logaritmické škále nemá jasný efekt na vnímavost k infekci ( $n = 3432$  případů a 41 285 kontrol), ale vede ke zvýšení pravděpodobnosti hospitalizace ( $n = 867$  případů a 229 kontrol; OR 2,34; 95% CI 1,33–4,21) a závažnosti onemocnění COVID-19 ( $n = 293$  případů a 607 kontrol; OR 2,21; 95% CI 0,87–5,55), což potvrdily i další analýzy citlivosti (22). Geneticky určená hladina 25(OH)D vysvětlovala rozptyl hladin 25(OH)D ze 4,9 %. Autoři této studie nedoporučují užívání vitamínu D k prevenci COVID-19 a nabádají k monitorování rizika u probíhajících studií.

Druhá studie použila data z UK Biobank k datu 1. července 2020, kdy v ní bylo 3523 jedinců pozitivních na COVID-19 a 36 636 jedinců negativních na COVID-19 a dále 536 pacientů se závažným průběhem COVID-19 a 329 391 jedinců z obecné populace (23). Tato studie nepotvrdila kauzální vztah mezi geneticky určenou hladinou 25(OH)D a vnímavostí k infekci či závažnému průběhu COVID-19.

Výhoda dvou výše uvedených MR studií tkví v metodické čistotě ohledně přirozené randomizace, ale ke genetickým datům chybí aktuální hladina 25(OH)D nebo alespoň zohlednění časového faktoru, který bere ohled na expozici UV záření. Pokud by vyšší hladina 25(OH)D byla opravdu riziková, pak by v letních měsících měla být mortalita vyšší následkem vyšší intenzity UV záření ve srovnání se zimními a jarními měsíci. Naopak v jiné studii byla zjištěna významná negativní asociace mezi indexem UV záření a počtem úmrtí na COVID-19 ve 152 zemích v průběhu ledna až května 2020, což poukazuje na protektivní roli UVB záření z hlediska snížení počtu úmrtí na COVID-19 (25). Z uspořádání studie nelze rozhodnout, zda byl efekt UVB záření zprostředkovaný přímým efektem na virus, nebo jde o vliv zprostředkovaný vitamínem D či o nepřímý vliv UVB záření na venkovní aktivity. Že nelze opomíjet sezonní vlivy, ukazuje studie dvojčat, která prokazuje, že role dědičnosti 25(OH)D je vyšší v zimních měsících a nižší v měsících letních, což naznačuje měnící se vliv genetických faktorů závislých na intenzitě UVB záření (26).

Třetí MR studie (testy na přítomnost COVID-19 u 7898 účastníků, z toho 1596 pozitivních, 1020 hospitalizovaných a 399 úmrtí na COVID-19) zjistila inverzní asociaci mezi vy počítanou expozicí UVB záření z okolí relevantní pro syntézu vitamínu D před počátkem onemocnění a hospitalizacemi i úmrtími na COVID-19 (24). Expozice UVB záření vysvětlovala rozptyl hodnot 25(OH)D z 12,4 %, zatímco genetické skóre vysvětlovalo rozptyl jen ze 4,2 %. Tato MR studie nezjistila v senzitivní MR analýze kauzální efekt geneticky určené hladiny 25(OH)D pro COVID-19, ale našla potenciální kauzální efekt v metodě váženého módu.

Ani jedna ze 3 citovaných MR studií nemá dostatečnou statistickou sílu a je nutné počítat s tím, že ještě mohou být upraveny v recenzním řízení. Mendelovské analýzy jsou

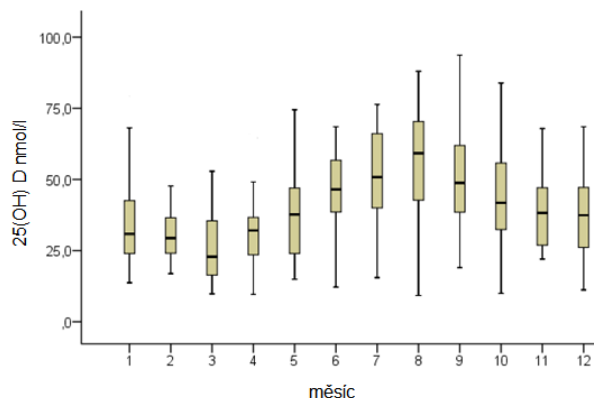
uspořádány pro průkaz lineárních vztahů, nikoliv pro nelineární vztahy, které jsou v některých observačních studiích označovány hraničními hodnotami, jež se však mezi sebou velmi liší (< 25–30 nmol/l; < 50 nmol/l; < 75 nmol/l). MR analýzy stojí metodicky výše než studie observační, ale níže než randomizované kontrolované studie. Na jasný průkaz efektu či absence efektu je tak nezbytné počkat na reprezentativní randomizované kontrolované studie.

## RANDOMIZOVANÉ INTERVENČNÍ STUDIE

Pilotní randomizovaná intervenční studie s podáním hydroxylovaného vitamínu D<sub>3</sub> (0,532 mg kalcidiolu první den, 3.–7. den 0,266 mg a dále 0,266 mg v týdenních intervalech) přidaného k nejlepší dostupné léčbě u hospitalizovaných pacientů pozitivních na COVID-19 ukázala, že v aktivním rameni bylo na oddělení JIP přesunuto významně méně pacientů (2 %) než v kontrolní skupině, kde to bylo 50 % (27). V aktivní skupině nikdo nezemřel, v kontrolní skupině 2 pacienti. Šlo o malou studii (n = 76), jejíž výsledky jsou nadějně, ale nelze je zatím generalizovat. Hydroxylovaná forma vitamínu D<sub>3</sub> má ve srovnání s cholekalciferolem výhodu v tom, že není potřeba hydroxylovat v játrech, a proto je navýšení hladiny 25(OH)D rychlejší než po podání cholekalciferolu a dále je 3,2× silnější (28).

Malá kvaziexperimentální studie porovnávací běžnou léčbu s perorálním bolusem 80 000 IU vitamínu D<sub>3</sub> v počátku onemocnění COVID-19 nebo měsíc před jeho propuknutím (n = 57) v kombinaci s dostupnou léčbou ve srovnání bez bolusu vitamínu D (n = 9) u křehkých seniorů a kontrolující zkreslující proměnné byla spojená s nižší závažností COVID-19 a vyšším přežitím (29).

Jiná malá kvaziexperimentální studie (n = 77) porovnávala 3 skupiny pacientů průměrného věku (88 ± 5 let). Skupiny se od sebe lišily intervencí: Jedna skupina dostávala orální bolus 50 000 IU vitamínu D<sub>3</sub> měsíčně nebo 80 000 IU a 100 000 IU každé 2–3 měsíce. Nikdo nedostával vitamín D<sub>2</sub> či intramuskulární injekce. Ve druhé skupině byli zahrnuti pacienti bez suplementace, ale do několika hodin od diagnózy COVID-19 dostali perorální dávku 80 000 IU vitamínu D<sub>3</sub>. V první skupině (n = 29) přežilo 14 dní 93,1 % pacientů s COVID-19,



**Obr. 1** Krabicový graf sérových koncentrací 25(OH)D v průběhu roku.

Jedná se o data 357 pacientů ve věku 31,6 ± 11,8 roku, z toho 149 žen (41,7 %), při přijetí do Národního ústavu duševního zdraví (32). Krabicový graf označuje medián, 25. a 75. percentil a dále 5. a 95. percentil.

ve druhé skupině (n = 16) 81,2 % a ve třetí (n = 32) potom 68,7 % jedinců. Pokud by byla skupina 3 brána jako referenční (poměr rizik [HR] = 1), pak plně přízpusobené HR pro 14denní mortalitu bylo 0,07 (p = 0,017) pro skupinu 1 a 0,37 (p = 0,28) pro skupinu 2 (30). Tato studie ukazuje možný preventivní potenciál cholekalciferolu u seniorů s ohledem na 14denní mortalitu na COVID-19, ale absenci efektu 1 bolusové dávky cholekalciferolu.

Ještě nerecenzovaná prospektivní randomizovaná studie (n = 240) prezentovaná v databázi *medRxiv* neprokázala benefit 1 perorální bolusové dávky 200 000 IU cholekalciferolu na délku hospitalizace ani další sekundární parametry (31).

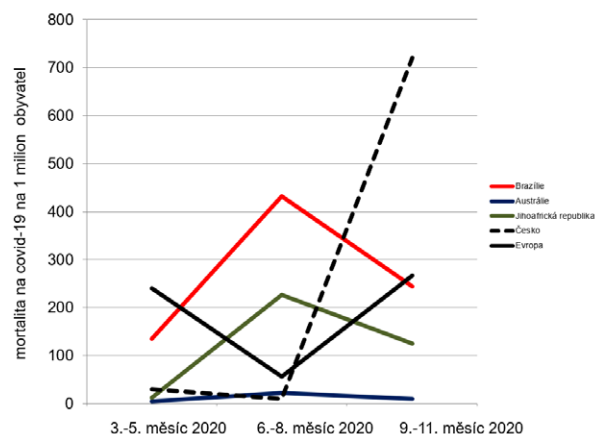
V poslední době bylo v databázi *ClinicalTrials.gov* registrováno několik intervenčních studií s různými formami vitamínu D v prevenci či léčbě COVID-19, které snad pomohou rozhodnout, zda je tato intervence prospěšná, či nikoliv. Neobjevili jsme žádnou klinickou studii hodnotící efekt kalcitriolu, který je až 4000× silnější než kalcidiol.

## FAKTOR SEZÓNŇÍCH ZMĚN

Lze předpokládat, že sérové hladiny 25(OH)D kolísají v Česku během roku obdobně jako u psychiatrických pacientů (*obr. 1*) díky změně intenzity UV záření (32). Mortalita na 1 milion obyvatel vypočítaná na podkladě situačních zpráv vydávaných Světovou zdravotnickou organizací (WHO) v jarních měsících (březen – květen) byla v Evropě (33) vyšší než v letních měsících (červen–srpen) a opět rostla v období podzimu (září – listopad) (*obr. 2*) (34).

Letní pokles relativní mortality může být dán lepší připraveností zdravotnického systému, epidemiologickými opatřeními, oslabením viru či sezónními vlivy, kam lze započítat i zlepšení saturace 25(OH)D v populaci. Tyto parametry ovšem až na výjimku sezónních vlivů nevysvětlí podzimní nárůst mortality v Evropě. Přesně opačné trendy ve změnách relativní mortality lze vypočítat na jižní polokouli (v Austrálii, Brazílii, Jihoafrické republice). Nejvyšší relativní mortalita na jižní polokouli byla v období zimy (*obr. 2*), kdy v Evropě bylo léto a relativní mortalita byla nejnižší.

Změna sérových hladin 25(OH)D jde ruku v ruce se sezónními změnami, jako jsou změny venkovní teploty, vlhkosti a UV indexu. Tyto fyzikální parametry mohou ovlivňovat jak šíření viru, tak chování lidí nezávisle na změně hladin



**Obr. 2** Srovnání relativní mortality na COVID-19 během 3 ročních období na vybraných územích severní a jižní polokoule



25(OH)D. Na druhou stranu je vitamin D hormonem steroidní povahy, který ovlivňuje imunitní funkce působením na dendritické buňky a T lymfocyty (35), a tím může ovlivňovat buněčnou imunitu i průběh COVID-19. Předpokládá se, že virus SARS-CoV-2 je odvozen od netopýřího koronaviru Bat-CoV RaTG13 (36), a noční savci z třídy letounů trpí deficitem 25(OH)D (37, 38), který může umožňovat snadnější šíření viru.

## DISKUSE A ZÁVĚR

K lepšímu objasnění vztahu sérových koncentrací 25(OH)D a tíže onemocnění COVID-19 by bylo nezbytné znát nejen aktuální hladiny 25(OH)D u hospitalizovaných pacientů pozitivních na COVID-19, ale i jejich hladiny před propuknutím onemocnění, neboť hladina 25(OH)D je považována za negativní zánětlivý reaktant, jenž v období zánětu klesá (39). A především by bylo třeba provést více dvojité slepých placebem kontrolovaných intervenčních studií s vitaminy, prohormony či hormony vitaminu D. Pokud nebude podnuknuta efektivní intervence nebo nedojde k oslabení viru, lze předpokládat další sezónní kolísání mortality na COVID-19.

Protože s ubývajícím sluncem se během podzimu a zimy snižuje 25(OH)D v séru, je vhodné ho doplnit v potravě bohaté na mořské tučné ryby nebo v podobě vitaminových doplňků. Doporučené dávky pro prevenci deficitu vitaminu D jsou dle Evropské agentury pro bezpečnost potravin 600 IU/den (15 µg/den) pro dospělé a 800 IU/den (20 µg/den) pro dospělé starší 70 let (40). U rizikových skupin (s BMI > 30 a při užívání kortikoidů či antiepileptik) se doporučuje 2–3× vyšší denní dávka (35). K řešení deficitu vitaminu D se používají vyšší dávky a odpověď na tuto léčbu je potom dobré monitorovat (41).

### Seznam zkratk

<b>25(OH)D</b>	25-hydroxyvitamin D
<b>ARDS</b>	syndrom akutní dechové tísně
<b>ARI</b>	akutní respirační infekce
<b>Bat-CoV RaTG13</b>	netopýří koronavirus
<b>BMI</b>	body mass index
<b>CI</b>	interval spolehlivosti
<b>COVID-19</b>	coronavirus disease 2019
<b>HR</b>	poměr rizik
<b>IU</b>	mezinárodní jednotka
<b>JIP</b>	jednotka intenzivní péče
<b>MR</b>	mendelovská randomizace
<b>NNT</b>	number needed to treat (počet pacientů, které je třeba léčit, aby nastal léčebný efekt)
<b>OR</b>	poměr šancí
<b>SARS-CoV-2</b>	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
<b>SD</b>	směrodatná odchylka
<b>UV</b>	ultrafialový
<b>WHO</b>	Světová zdravotnická organizace

## Literatura

- Martineau AR, Forouhi NG. Vitamin D for COVID-19: a case to answer? *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020; 8: 735–736.
- Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017; 356: i6583.
- Jolliffe DA, Camargo CA jr., Sluyter JD et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory infections: systematic review and meta-analysis of aggregate data from randomised controlled trials. *medRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.07.14.20152728.

- Merzon E, Tworowski D, Gorohovski A et al. Low plasma 25(OH) vitamin D level is associated with increased risk of COVID-19 infection: an Israeli population-based study. *FEBS J* 2020; 287: 3693–3702.
- D'Avolio A, Avataneo V, Manca A et al. 25-hydroxyvitamin D concentrations are lower in patients with positive PCR for SARS-CoV-2. *Nutrients* 2020; 12: 1359.
- Meltzer DO, Best TJ, Zhang H. Association of vitamin D status and other clinical characteristics with COVID-19 test results. *JAMA Netw Open* 2020; 3: e2019722.
- Kaufman HW, Niles JK, Kroll MH et al. SARS-CoV-2 positivity rates associated with circulating 25-hydroxyvitamin D levels. *PLoS One* 2020; 15(9): e0239252.
- Hastie CE, Pell JP, Sattar N. Vitamin D and COVID-19 infection and mortality in UK Biobank. *Eur J Nutr* 2020, doi: 10.1007/s00394-020-02372-4.
- Carpagnano GE, Di Lecce V, Quaranta VN et al. Vitamin D deficiency as a predictor of poor prognosis in patients with acute respiratory failure due to COVID-19. *J Endocrinol Invest* 2020, doi: 10.1007/s40618-020-01370-x.
- Hars M, Mendes A, Serratrice C et al. Sex-specific association between vitamin D deficiency and COVID-19 mortality in older patients. *Osteoporos Int* 2020; 31: 2495–2496.
- Panagiotou G, Tee SA, Ihsan Y et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels in patients hospitalized with COVID-19 are associated with greater disease severity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2020; 93: 508–511.
- Kun Ye, Fen Tang, Xin Liao et al. Does serum vitamin D level affect COVID-19 infection and its severity? A case-control study. *J Am Coll Nutr* 2020, doi: 10.1080/07315724.2020.1826005.
- Faul JL, Kerley CP, Love B et al. Vitamin D deficiency and ARDS after SARS-CoV-2 Infection. *Ir Med J* 2020; 113: 84.
- Karahan S, Katkat F. Impact of serum 25(OH) vitamin D level on mortality in patients with COVID-19 in Turkey. *J Nutr Health Aging* 2020, doi: 10.1007/s12603-020-1479-0.
- Radujkovic A, Hippchen T, Tiwari-Heckler S et al. Vitamin D deficiency and outcome of COVID-19 patients. *Nutrients* 2020; 12: 2757.
- Pizzini A, Aichner M, Sahanic S et al. Impact of vitamin D deficiency on COVID-19—a prospective analysis from the CovILD registry. *Nutrients* 2020; 12: E2775.
- Ferrari D, Locatelli M. No significant association between vitamin D and COVID-19. A retrospective study from a northern Italian hospital. *Int J Vitam Nutr Res* 2020, doi: 10.1024/0300-9831/a000687.
- Hernández JL, Nan D, Fernandez-Ayala M et al. Vitamin D status in hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection. *J Clin Endocrinol Metab* 2020, doi: 10.1210/clinem/dgaa733.
- Cereda E, Bogliolo L, Klersy C et al. Vitamin D 25OH deficiency in COVID-19 patients admitted to a tertiary referral hospital. *Clin Nutr* 2020, doi: 10.1024/0300-9831/a000687.
- Kraus FB, Medenwald D, Ludwig-Kraus B. Do extreme summers increase blood vitamin D (25-hydroxyvitamin D) levels? *PLoS One* 2020; 15: e0242230.
- Čolak Y, Nordestgaard BG, Afzal S. Low vitamin D and risk of bacterial pneumonias: Mendelian randomisation studies in two population-based cohorts. *Thorax* 2020, doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215288.
- Butler-Laporte G, Nakanishi T, Mooser V et al. Vitamin D and COVID-19 susceptibility and severity: a Mendelian randomization study. *Int J Epidemiol* 2020, doi: 10.1093/ije/dyaa229.
- Liu D, Tian Q, Zhang J et al. Association of 25 hydroxyvitamin D concentration with risk of COVID-19: a Mendelian randomization study. *medRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.08.09.20171280.
- Li X, van Geffen J, van Weele M et al. Genetically-predicted vitamin D status, ambient UVB during the pandemic and COVID-19 risk in UK Biobank: Mendelian randomisation study. *medRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.08.18.20177691.
- Moozhipurath RK, Kraft L, Skiera B. Evidence of protective role of ultraviolet-B (UVB) radiation in reducing COVID-19 deaths. *Sci Rep* 2020; 10: 17705.
- Karohl C, Su S, Kumari M et al. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 1393–1398.
- Castillo ME, Entrenas Costa LM, Vaquero Barrios JM et al. Effect of calcifediol treatment and best available therapy versus best available therapy on intensive care unit admission and mortality among patients hospitalized for COVID-19: a pilot randomized clinical study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020; 203: 105751.

- 28. Quesada-Gomez JM, Bouillon R.** Is calcifediol better than cholecalciferol for vitamin D supplementation? *Osteoporos Int* 2018; 29: 1697–1711.
- 29. Annweiler C, Hanotte B, de l'Eprevier CG et al.** Vitamin D and survival in COVID-19 patients: a quasi-experimental study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2020; 204: 105771.
- 30. Annweiler G, Corvaisier M, Gautier J et al.** Vitamin D supplementation associated to better survival in hospitalized frail elderly COVID-19 patients: the GERIA-COVID quasi-experimental study. *Nutrients* 2020; 12: E3377.
- 31. Murai IH, Fernandes AI, Sales LP et al.** Effect of vitamin D3 supplementation vs placebo on hospital length of stay in patients with severe COVID-19: a multicenter, double-blind, randomized controlled trial. *medRxiv* 2020, doi: 10.1101/2020.11.16.20232397.
- 32. Ihl M, Kožený J, Kopeček M.** Význam vitamínu D a jeho sérové koncentrace u psychiatrických pacientů v jednotlivých měsících roku. *Psychiatrie* 2020; 24: 152–162.
- 33. World Health Organization.** WHO Coronavirus disease (COVID-19) Situation report 133. *WHO*, 1. 7. 2020. Dostupné na: [www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200601-covid-19-sitrep-133.pdf?sfvrsn=9a56f2ac\\_4](http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200601-covid-19-sitrep-133.pdf?sfvrsn=9a56f2ac_4)
- 34. World Health Organization.** WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. *WHO*, 2020. Dostupné na: <https://covid19.who.int>
- 35. Šterzl I, Píkner R.** Deficit vitamínu D a imunitní funkce. *Medicína pro praxi* 2019; 16: 318–322.
- 36. Seyran M, Pizzol D, Adadi P et al.** Questions concerning the proximal origin of SARS-CoV-2. *J Med Virol* 2020, doi: 10.1002/jmv.26478.
- 37. Cavaleros M, Buffenstein R, Ross FP et al.** Vitamin D metabolism in a frugivorous nocturnal mammal, the Egyptian fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *Gen Comp Endocrinol* 2003; 133: 109–117.
- 38. Southworth LO, Holick MF, Chen TC et al.** Effects of sunlight on behavior and 25-hydroxyvitamin D levels in two species of Old World fruit bats. *Dermatoendocrinol* 2013; 5: 192–198.
- 39. Waldron JL, Ashby HL, Cornes MP et al.** *J Clin Pathol* 2013; 66: 620–622.
- 40. European Food Safety Agency.** Dietary reference values for vitamin D. *EFSA Journal* 2016; 14: 4547.
- 41. Vyskočil V.** Vitamin D. *Klinická farmakologie a farmacie* 2011; 25: 72–75.

ADRESA PRO KORESPONDENCI:

**MUDr. Miloslav Kopeček, Ph.D.**

Národní ústav duševního zdraví

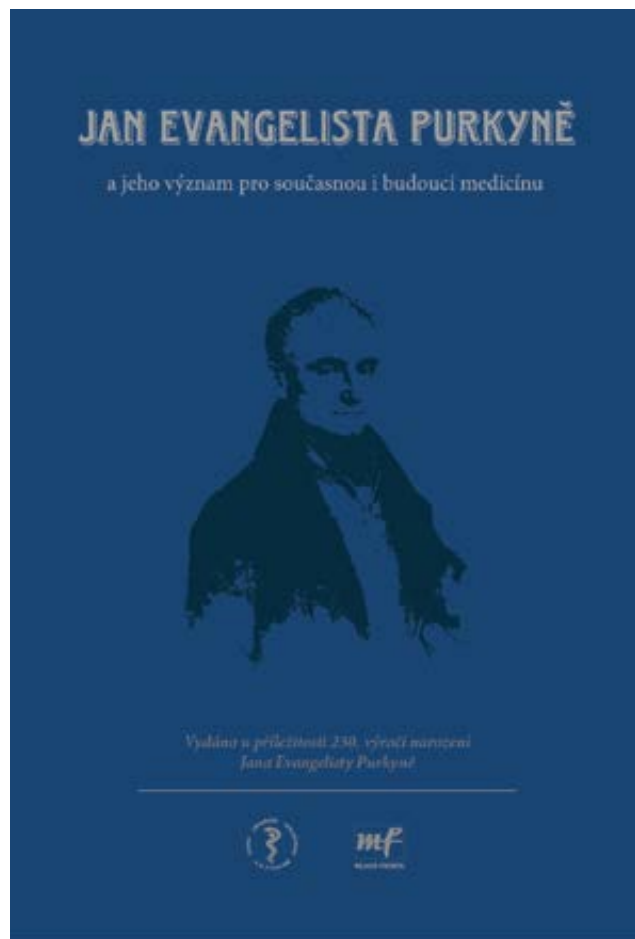
Topolová 748, 250 67 Klecany

Tel.: 283 088 325

e-mail: [miloslav.kopecek@nudz.cz](mailto:miloslav.kopecek@nudz.cz)

# Představujeme publikaci

## Jan Evangelista Purkyně a jeho význam pro současnou i budoucí medicínu



Publikace byla vydána k připomenutí 230. výročí narození slavného českého lékaře a vědce Jana Evangelisty Purkyně (18. prosince 1787 Libochovice – 28. července 1869 Praha). Jan Evangelista Purkyně patří k ve světě nejznámějším Čechům a jeho objevy ovlivnily řadu lékařských oborů. V závěru života se pak jako vlastenec podílel významnou měrou na vzniku moderní české společnosti. Publikace je připravena více než 50 autory z řad historiků, lékařů zabývajících se dlouhodobě osobností Jana Evangelisty Purkyně a známých představitelů nejvýznamnějších lékařských oborů. Publikace přináší příspěvky ke třem tématům:

1. Historický pohled na osobnost Jana Evangelisty Purkyně a purkyňovské tradice.
2. Purkyňovy objevy a koncepce ve vztahu k dnešku.
3. Co nás čeká aneb jak se budou medicína a přírodní vědy vyvíjet do konce tohoto století.

Kniha tak vychází z purkyňovských tradic a shrnuje, co Purkyně objevil a jak se medicína vyvinula od doby Purkyňovy a kam dále směřuje.

**Editoři: Štěpán Svačina, Jan Škrha,  
Tomáš Trč**

**Doporučená cena 550 Kč**

Při objednání na **kniha.cz** sleva 10%

**MEDICAL  
SERVICES**

Největší vydavatelství zdravotnických titulů v ČR  
a pořadatel kongresů, konferencí a symposií

**mf**  
MLADÁ FRONTA





Radost z jízdy



## **NENECHTE SI UJET NEJLEPŠÍ NABÍDKU NA VAŠE NOVÉ BMW X4 JIŽ ZA 1 199 000 Kč vč. DPH**

Jste pro nás velmi speciálními zákazníky. Vychutnejte si výsady programu prodeje BMW Renocar určených pro Vás a využijte celou řadu předností.

Pro rezervaci svého individuálního termínu testovací jízdy nás kontaktujte na:  
**lekarum@renocar.cz**



# **RENOCAR**

**BRNO** | Řípská 5c, Brno-Slatina (D1, EXIT 201)

**PRAHA** | Čestlice, Lipová 280, Praha – Čestlice (D1, EXIT 8)

**PRAHA** | Kongresové centrum, 5. května 1640/65, Praha 4

tel.: 548 141 548 | e-mail: [lekarum@renocar.cz](mailto:lekarum@renocar.cz)

[www.renocar.cz/lekari](http://www.renocar.cz/lekari)