

2 Buňka – základní jednotka života

2.1 Vznik buněk

Pokud si omezíme filozoficky komplikovanou definici života pouze na organizmy plně a samostatně schopné své vlastní reprodukce, lze tvrdit, že je vše živé tvořeno základními morfologicko-funkčními jednotkami – buňkami (latinsky *cellula*, obr. 2.1). Existují sice i **nebuněčné formy** živých soustav, například **viry**, **viroidy** a **virusoidy**, zde je ale problematické mluvit o organizmech v pravém slova smyslu. Sami o sobě se viry ani ostatní zmíněné infekční částice nedokáží reprodukovat a při své replikaci více či méně spoléhají na systémy napadených buněk nebo dokonce jiných nebuněčných živých soustav. Můžeme je proto považovat spíše za jakési molekulární vnitrobuněčné parazity představované prostou genetickou informací, případně chráněnou proteinovým obalem, která však pro samostatný život nepostačuje. Specifickou kategorií potom reprezentují **priony** – infekční proteinové částice, které zcela postrádají genetickou informaci, přesto se v buňkách množí a vyvolávají smrtelné choroby živočichů i člověka. Priony představují patologické protějšky normálních proteinů, běžně přítomných v buňkách, od kterých se liší pouze svou konformací, tj. prostorovou strukturou molekuly. Při kontaktu s jinými proteiny na ně tuto konformaci přenášejí, čímž je přetvářejí v patologické, a tato reakce se lavinovitě šíří¹.

Vznik buněk vysvětluje více hypotéz, z nichž žádná není doposud uspokojivě prokázána. Někteří badatelé dokonce zastávají názor, že ke zrodu života došlo opakovaně. Nicméně se zdá, že všechny dnešní buňky mají jednoho společného předka. Detailní výklad jednotlivých alternativ jde nad rámec této kapitoly, takže je následující text nutné chápat spíše jako ilustraci možného vývoje. Zásadními událostmi ve vývoji prabuňky muselo být vymezení se jejího předchůdce vůči okolnímu prostoru a vznik genetického kódu, který následně získal schopnost své vlastní reprodukce. Zda se nejprve vytvořil samoreplikující se genetický kód (patrně na bázi ribonukleové kyseliny), který byl následně opouzdřen membránou, nebo zda dříve existoval tzv. koacervát, který pohltil jednoduché replikující se molekuly, zůstává předmětem debat. Dnes již klasická Oparinova teorie považuje za jeden z evolučních milníků právě **koacerváty**, tedy jakési kapénkovité shluky makromolekul, později ještě ohraničené primitivní membránovou strukturou. Koacerváty se na Zemi objevily patrně někdy před 3,85 miliardami let a jejich následným zdokonalováním, zejména již zmíněným pohlcením

¹ Jako již mnohokrát v historii, i tentokrát byl obdobný fenomén předpovězen již mnohem dříve v literatuře sci-fi. Ve své knize „*Cat’s Cradle*“ (1963) popisuje **Kurt Vonnegut** novou formu ledu, tzv. ice-nine, který při kontaktu s vodou způsobuje její řetězovou přeměnu na ice-nine. Jelikož všechny živé organizmy fungují na bázi kapalné vody, představuje pro ně kontakt s ice-nine smrt. Není toto snad úžasná vize prionů?

primitivního autoreplikujícího se genetického kódu, se postupně vyvinula **eobionta** (protoorganizmy, progeonta). Tyto prabuňky již vykazovaly jednoduchý metabolismus a dokázaly se rozmnožovat, takže představovaly jakýsi základní kámen biologické evoluce vedoucí k dnešním prokaryotům (baktérie a archea) a později eukaryotům.

2.2 Prokaryota a eukaryota

Dle přítomnosti pravého buněčného jádra dělíme buňky na fylogeneticky starší prokaryotické (řecky; pro = před, karyon = jádro) a mladší eukaryotické (řecky; eu = pravý). **Prokaryoty** rozumíme bezjaderné, zpravidla jednobuněčné organizmy (bakterie, archea), které vznikly přibližně před 3–3,5 miliardami let a které jsou značně jednodušší a asi 10x menší (desetiny mikrometru až několik mikrometrů) než buňky jaderné, eukaryotické (obr. 2.1). Místo pravého jádra obsahují jen **nukleoid** (prokaryotický chromozom) sestávající se obvykle z jedné molekuly dvouřetězcové deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která u bakterií neasociuje s histony², nemá introny³ a není membránou oddělena od cytoplazmy. Archeální DNA však histony váže a introny se v genech mohou vyskytovat, takže archea z hlediska organizace genetické informace spíše připomínají eukaryota, a bývají proto pokládána za překlenující článek mezi prokaryoty a eukaryoty.

Kromě nukleoidu se v cytoplazmě prokaryot vyskytují i **plazmidy**, malé kruhové molekuly DNA, které nesou doplňkovou genetickou informaci, často pro rezistenci k různým environmentálním faktorům, například antibiotikům. Jelikož si buňky plazmidy čile vyměňují, může se rezistence touto cestou snadno šířit. Syntéza proteinů probíhá obdobně jako u eukaryot na ribozomech, prokaryotické ribozomy jsou ale menší. Membránové orgány, typické pro eukaryotické buňky, pak zcela chybí. U fotosyntetizujících prokaryot lze sice najít tylakoidy a chromatofory (vychlípeniny cytoplazmatické membrány nebo váčky s fotosyntetickými barvivami), stále však nejde o plnohodnotné plastidy. Od vnějšího prostředí chrání prokaryota buněčná stěna (kromě mykoplazmat), některá mají i další obaly, fimbrie a bičík. Jedná se o buňky haploidní⁴, množící se asexuálně prostým dělením.

Eukaryotické buňky (obr. 2.1) existují jako jednobuněčné samostatně žijící organizmy (kvasinky, prvoci) nebo se spolupodílí na tvorbě specializovaných tkání a orgánů vyšších

² Histony jsou velmi konzervativní bazické jaderné proteiny, které se u eukaryot vážou na DNA a vytvářejí s ní chromatin.

³ Geny se u eukaryot a v menší míře i archeí skládají z exonů a intronů. Exony kódují genetickou informaci, zatímco introny představují nekódující sekvence. Exony i introny se přepisují do primárních transkriptů RNA, z kterých však specializované enzymy introny následně vyštěpí (mluvíme o tzv. sestřihu).

⁴ Diploidní buňky obsahují dvě sady párových (homologických) chromozomů, jedna sada pochází od otce, druhá od matky. Haploidní buňky mají jen jednu sadu chromozomů.

mnohobuněčných organismů. V tomto případě se v rámci jednoho organismu vyskytuje mnoho různě diferencovaných a funkčně zaměřených typů buněk, které prostřednictvím vzájemné komunikace a spolupráce společně umožňují jeho existenci. Eukaryotické buňky jsou proti prokaryotům mnohem složitější a větší, zejména se liší přítomností **pravého jádra** a membránových cytoplazmatických organel (mitochondrie, lyzozomy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, případně plastidy).

Zásadní rozdíly se týkají také uspořádání genetické informace, jejíž převážnou většinu nese u eukaryot jaderná DNA. Ta je lineární a reprezentuje chromozomy v pravém slova smyslu. Chromozomy se sestávají z **chromatinu**, tedy organizovaného komplexu DNA s histony a nehistonovými proteiny. V buněčném jádře ohraničeném jadernou membránou se u různých organismů vyskytuje druhově specifický počet chromozomů charakteristických velikostí a morfologie. Na rozdíl od prokaryot představují dominantní část jaderné DNA introny a nesčetné nekódující sekvence. Jelikož eukaryota mohou být jak haploidní, tak diploidní, množí se nepohlavně i sexuálně. U některých může docházet i k střídání haploidní a diploidní fáze a způsobu rozmnožování.

Eukaryota nemají plazmidy, malá část genetické informace se však nachází v **semiautonomních organelách** – mitochondriích a u rostlin i plastidech. Mitochondriální (mtDNA) a plastidové (pDNA) genofory se víceméně podobají prokaryotickému nukleoidu. Mezi organizmy sice existuje značný rozptyl ve velikosti a genové hustotě mtDNA a pDNA, povětšinou se však jedná o kruhovou DNA bez intronů, která neasociuje s histony. Strukturu mtDNA a pDNA proto považujeme za silný důkaz endosymbiotického původu semiautonomních organel. V jedné organelle přitom nalézáme jednotky až desítky molekul DNA.

Přerod prokaryotické buňky na buňku eukaryotickou vedl pravděpodobně přes **archea**, celý proces však stále zůstává zastřen tajemstvím. Jednou z cest může být vzájemná, i vícestupňová fagocytóza prokaryotických buněk a pozdější transformace internalizovaných buněk v membránové organely – mitochondrie, chloroplasty, a případně i buněčné jádro (tzv. **endosymbiotická teorie**). Mitochondrie se patrně vyvinuly z parazitické bakterie rodu *Rickettsia* a primární plastidy z určité sinice pozřené jinou buňkou. Pro vznik eukaryotického jádra byl pak postulován nespočet hypotéz, včetně symbiotických, z nichž žádná ale není obecně akceptována. Pro diskusi na toto téma proto odkazujeme na specializovanou literaturu. Unikátním fenoménem, který se uskutečnil pouze u eukaryot, je **rozvoj mnohobuněčnosti** spojený s morfologickou a funkční specializací buněk, jejich vzájemnou komunikací a koordinovanou společnou existencí v rámci organismu. Prokaryotické buňky sice také někdy

vytvářejí kolonie a vzájemně se ovlivňují, nelze však mluvit o mnohobuněčnosti ve skutečném slova smyslu. Mnohobuněčné formy života se objevily separátně u živočichů, rostlin a hub. V dnešní době svět buněk zahrnuje obrovské spektrum rozmanitých typů, lišících se ve všemožných parametrech. Přesto můžeme buňky v základních rysech s trochou nadsázky obecně přirovnat k vysoce organizovaným mikroskopickým chemickým továrnám, ohraničeným buněčnou membránou (případně ještě buněčnou stěnou – rostliny, houby) a naplněným cytoplazmou obklopující buněčné jádro (nebo nukleoid).

Obr. 2.1 Stavba prokaryotické a eukaryotické buňky

1. jadérko, 2. jádro, 3. ribozom, 4. váček, 5. hrubé endoplazmatické retikulum, 6. Golgiho aparát, 7. cytoskelet, 8. hladké endoplazmatické retikulum, 9. mitochondrie, 10. vakuola, 11. cytozol, 12. lysozom, 13. centriol).

A: https://cs.wikipedia.org/wiki/Prokaryotick%C3%A1_bu%C5%88ka.

B: http://projekt.gymtri.cz/soubory/Biologie/1-rocnik/eukaryotni-bunky/euk_bunka.svg.png

2.3 Cesta k objevu buňky

Z dnešního pohledu považujeme buňky za nejmenší systémy schopné samostatného života a reprodukce, které disponují vlastním genetickým materiálem, proteosyntetickým aparátem a energetickým metabolismem. Buňky dále vykazují schopnost dráždivosti, růstu a v některých případech i pohybu a diferenciace. Za zakladatele **cytologie** (nauky o buňce) lze považovat Jakoba Schleidena (1804–1881) a Theodora Schwanna (1810–1882), společně s českým vědcem Janem Evangelistou Purkyně (1787–1869). K objevu buňky vedla dlouhá cesta, jež byla dlážděna mnoha zlomovými objevy i omyly a sahá minimálně k vynálezu světelného mikroskopu, který nám otevřel dveře do mikrosvěta. Vynálezce mikroskopu není přesně znám. První použitelný mikroskop sestrojil nejspíše holandský brusič skla **Zacharias Jansen** se svým otcem Hansem v polovině 16. století.

Termín „buňka“ nejdříve použil **Robert Hooke** (1635–1703) ve své knize *Micrographia*, kde v roce 1665 podrobně popsal zdokonalení mikroskopu a zároveň opublikoval své nákresy nejrůznějších mikroskopických i makroskopických objektů. S vlastnoručně sestrojeným mikroskopem pozoroval mimo jiné i dutinky v korkové zátce, které mu připomínaly komůrky ve včelí plástvi. Pojmenoval je tedy „cellulae“, buňky. Zatím však nevěděl nic o jejich stavbě a funkci.

Do roku 1719 se datuje nejstarší známá kresba buněk s jádry od **Antoního van**

Leeuwenhoeka, zobrazující červené krvinky lososa. Leeuwenhoek byl téměř fanatickým

pozorovatelem mikrosvěta a učinil v této oblasti mnoho podstatných zjištění. Například v dešťové vodě našel celé spektrum mikroorganismů, kterým přiřkl jméno „zvířátka“ (*animalcules*). Přestože se původně věnoval vědeckému výzkumu jen jako amatér, stal se z něj nakonec jeden z nejvýznamnějších průkopníků mikroskopie a otec mikrobiologie.

V roce 1831 objevil **Robert Brown** buněčné jádro a roku 1834 vyslovil **Pavel Fjodorovič Gorjaninov** (1796–1865) myšlenku, že každý živý organismus je složen z buněk. K rozkvětu cytologie pak významnou měrou přispěl již zmíněný český fyziolog **Jan Evangelista Purkyně**, který roku 1837 přednesl v Praze svoji „zrníčkovou teorii“. Jako jeden z prvních poukázal na skutečnost, že se organismy (rostliny i živočichové) skládají ze zrnité hmoty, jejíž každé zrníčko (buňka) vykazuje samostatnou metabolickou aktivitu. Vnitřní obsah buňky nazval protoplazmou a buňkám připisoval fundamentální význam pro existenci života.

Inspirováni těmito i svými vlastními objevy formulovali roku 1839 **Matthias Jakob Schleiden** a **Theodore Schwann** tzv. buněčnou teorii. Potvrdili, že rostliny i živočichové se sestávají ze stejných základních jednotek – buněk, a prokázali, že všechny buňky obsahují jádra. Důležitým krokem kupředu bylo zejména vysvětlení činnosti buněk na základě molekulárních a atomárních procesů. Jak buňky vznikají, však zůstávalo i nadále zastřeno tajemstvím. Za podstatné lze proto považovat vyvrácení tzv. abiogeneze, tj. spontánního vzniku živých buněk z neživé hmoty, které učinil **Louis Pasteur** (1822–1885). Roku 1855 pak **Rudolf Virchow** konečně dokázal, že buňky pocházejí zase a jen z buněk jejich dělením (*omnis cellula e cellula*). Tuto myšlenku následně rozpracoval **Walther Flemming** (1843–1905), který ji rozšířil i na chování buněčných jader (*omnis nucleus e nucleo*; jádra vznikají jen z jader již existujících). K tomuto závěru dospěl při sledování dělení chromozomů, které nazval mitózou. Rozvinout mohl myšlenky **Karla Wilhelma von Nägeliho** a **Wilhelma Hofmeistera**, kteří nezávisle na sobě pozorovali mitózu a chromozomy již v letech 1844–1849, funkční význam těchto fenoménů ale asi ještě příliš nechápali.

Zcela převratný milník pak představovalo rozluštění principů dědičnosti, kterým **Gregor Johann Mendel** předběhl svou dobu nejméně o 100 let. Přestože ještě neznal chromozomy ani DNA, podhalil roušku závislosti mezi fenotypem a genotypem a matematicky definoval principy přenosu genetické informace z generace na generaci (Mendelovy zákony dědičnosti). Mendel se tak stal zakladatelem zcela nového vědního oboru – genetiky. V roce 1943 pak **Oswald Avery**, **Colin MacLeod** a **Maclyn McCarty** identifikovali DNA jakožto nositelku dědičné informace, na což v roce 1953 navázali **Rosalind Elsie Franklinová**, **Francis Crick** a **James Watson** přelomovým popisem struktury dvoušroubovice DNA a odhalením základního kopírovacího mechanismu, jímž život pochází ze života. Zatímco dva později

jmenovaní badatelé dostali za tento počín v roce 1962 Nobelovu cenu, Franklinová, jejíž zásluhy byly patrně největší, se bohužel udílení cen nedožila.

Všechny tyto a řada dalších objevů umožnily dále zdokonalit buněčnou teorii až do dnešní podoby, kdy je zřejmé, že buňky představují základní stavební a funkční jednotky všeho živého (nebuněčné organizmy na nich existenčně závisí), vznikají pouze z již existujících buněk, vycházejí svým původem ze společného předka⁵ a obsahují genetickou informaci, která je základem jejich vzezření i aktivit. Každá buňka přitom přenáší svou genetickou informaci do dceřiných buněk, které jsou na jejím základě vystavěny a mohou se díky ní dále rozmnožovat.

Na závěr jen zdůrazněme, že výzkum buněk zůstává i v současnosti neuvěřitelně dynamickou a fascinující záležitostí, což by samozřejmě nebylo myslitelné bez paralelního rozvoje adekvátních, především mikroskopických technik. Obrovský posun v našem porozumění buněčné anatomii a funkcím přinesl elektronový mikroskop, který o dva až tři řády překonal fyzikálně dané maximální možné rozlišení optického mikroskopu (cca 200 nm; tzv. Abbeho limit). O tento pokrok se v roce 1931 zasloužil **Ernst Ruska**, za což byl později (1986) oceněn Nobelovou cenou. I přes doposud nepřekonanou rozlišovací schopnost však není ani elektronová mikroskopie pro výzkum buněk všespásná. Vzorčky se totiž musí fixovat a nařezat na tenké plátky, což buňky jednak poškozuje, jednak je není možné studovat v trojrozměrném prostoru a/nebo v reálném čase (živé buňky). Řada vědců proto hledala a následně i vymyslela různé způsoby, jak již zmíněný Abbeho limit obejít. Rozlišení optické mikroskopie se tak posunulo k dnešní hranici 10 nm. Za tento průlom byla v roce 2014 opět udělena Nobelova cena, kterou tentokrát obdrželi tři vědci současně – **Eric Betzig** a **William Moerner** za tzv. SMLM mikroskopii (Single Molecule Localization Microscopy) a **Stefan Hell** za STED mikroskopii (Stimulated Emission Depletion Microscopy).

2.4 Anatomie buňky – cytoplazma a cytoplazmatické organely

Eukaryotickou buňku můžeme v zásadě rozdělit na **buněčné jádro** (chromatin + nukleoplazma) a zbytek buňky vyplněný **cytoplazmou**, ve které se nacházejí semiautonomní organely (mají svoji DNA) a další membránové i nemembránové útvary. Od okolního prostředí buňku odděluje cytoplazmatická membrána a v některých případech i buněčná stěna. Co do vzhledu a funkce jsou buňky velmi variabilní, což u jednobuněčných odráží jejich různé životní strategie, u mnohobuněčných pak specializaci v rámci organismu. Základní rysy

⁵ Což dokládá např. stejné chemické složení buněk.

však mají všechny buňky společné. V (lékařské) radiobiologii nás zajímají zejména buňky eukaryotické.

2.4.1 Buněčná stěna

Výskyt buněčné stěny se omezuje jen na prokaryota (baktérie, archea) a některé eukaryotické organizmy – řasy, rostliny a určité druhy hub. Buněčná stěna vytváří kolem buněk exoskelet, který je chrání před vlivy okolního prostředí a patogeny, nebo naopak, v případě patogenních bakterií, před imunitním systémem hostitele. Díky své pevnosti také brání osmotické expanzi buněk a u rostlin a hub plní i funkci stavební a skladovací. Buněčná stěna dovoluje vstup vody a v ní rozpuštěných živin, ztěžuje ale mezibuněčnou komunikaci. Proto se v ní zpravidla vyskytují otvory, kterými procházejí **plazmodezmy** (spoje) propojující vnitřní obsah (**protoplasty**) jednotlivých buněk. Hlavní komponentou buněčné stěny může být u eukaryot celulóza, hemicelulóza a pektiny (rostliny), chitin (houby), nebo chitin společně s β -1,3-polyglukanem (kvasinky). U bakterií pak rozlišujeme dva typy buněčné stěny, na základě jejichž rozdílného barvení krystalovou violetí dělíme bakterie na **grampozitivní** a **gramnegativní**. Grampozitivní buněčná stěna se skládá převážně z peptidoglykanů a je dosti mohutná, zatímco gramnegativní buněčná stěna je více lipopolysacharidová a podstatně tenčí, pokrývá ji nicméně ještě další (druhá) membrána. Archea mají buněčnou stěnu převážně z pseudopeptidoglykanu.

2.4.2 Buněčné membrány

Rozlišujeme **cytoplazmatickou membránu (plazmalema)**, která izoluje buňky od okolního prostředí, a **membrány buněčných organel** (vnitrobuněčné), které vymezují jednotlivé funkční kompartmenty v buňce. Membránové útvary (Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, lysozomy, vakuoly, tylakoidy, peroxizomy a případně další mikrotělíška) obklopuje membrána jednoduchá, jádro a semiautonomní organely (mitochondrie, plastidy) dokonce membrána dvojitá. Membrány nejenže oddělují vnitřní prostor organel a membránových útvarů od okolní cytoplazmy, ale také se aktivně podílejí na jejich činnostech. Specifické funkce organel se proto projevují i ve složení příslušných membrán, což se týká zejména spektra zabudovaných proteinů.

Strukturu membrány popisuje tzv. **semipermeabilní mozaikový model**, zvaný též model tekuté mozaiky. Podstata modelu spočívá v tvorbě lipoproteinové dvojvrstvy, ve které „plavou“ včleněné proteiny (obr. 2.2) a další komponenty. Základ membrány představují fosfolipidy (glycerofosfolipidy a sfingolipidy), jež mají na jedné straně molekuly hydrofilní

fosfátový zbytek (tzv. hydrofilní hlavička) a na straně druhé jeden nebo dva hydrofobní uhlíkové řetězce mastných kyselin (tzv. hydrofobní ocásky). Jako celek proto molekuly fosfolipidů vykazují **amfipatické⁶ vlastnosti**, což se projevuje jejich orientací vůči vodě tak, že polární (hydrofilní) hlavičky s vodou reagují, zatímco nepolární (hydrofobní) ocásky ji na základě hydrofobních interakcí⁷ vypuzují a vzájemně spolu asociují. Spontánně (tzv. self-assembly) se tak formuje **fosfolipidová dvojvrstva** o tloušťce 7,5 nm, kde od sebe odvrácené hydrofilní hlavičky tvoří na bočním řezu membránou (obr. 2.2) horní a spodní povrch dvojvrstvy, zatímco vzájemně vmezeřené hydrofobní ocásky vyběhají z těchto hydrofilních povrchů vyplňují její vnitřní prostor. Spontánní charakter skládání lipidové dvojvrstvy zajišťuje také regeneraci membrány v případě jejího poškození. Důležitou lipidovou složkou membrán jsou mj. steroly, u savců např. cholesterol a ergosterol. Do fosfolipidové dvojvrstvy se zanořují **membránové proteiny**, které mohou částečně či zcela procházet membránou (integrální proteiny) nebo se jen vázat na její povrch (periferní proteiny). Proteiny plní v membráně nejrůznější úkoly, zejména spojené s membránovým transportem a buněčnou signalizací dovnitř i ven z buňky. V membráně je zakotven například nespočet různých receptorů s enzymatickou aktivitou nebo funkčně spřažených s enzymy, které reagují na impulzy z vnějšího prostředí a převádějí je na signály regulující buněčné řídicí dráhy⁸. Kritické dráhy spouští například dělení buňky po zachycení růstového faktoru. Mutace příslušných membránových receptorů proto nezřídka pozorujeme v nádorových buňkách, kde činí receptory nezávislé na okolních signálech nebo jiným způsobem abnormálně stimulované, a tudíž kontinuálně signalizující a nutící buňku k neustálé proliferaci. Následky této situace si můžeme snadno domyslet. Receptory umožňují také vzájemné rozpoznání buněk a jejich komunikaci, třeba v rámci imunitní reakce. Jako signální molekuly na vnějším povrchu membrány slouží i **sacharidy**. Důležité je, že se kompozice vnitřní a vnější strany fosfolipidové dvojvrstvy liší, což se projevuje asymetrií a polaritou membrány. Další funkčně podstatnou vlastností fosfolipidové dvojvrstvy je její **semipermeabilita**, díky níž do buňky a buněčných organel volně proniká jen voda (osmóza) a některé malé a nepolární molekuly (difúze). Obráceně řečeno, membrány *de facto* nepropouštějí nabitě částice (ionty) a polární molekuly, takže se pro jejich vstup do buňky musely vyvinout specifické **transportní mechanismy** (obr. 2.2) spoléhající se na

⁶ Amfipatický = zároveň hydrofilní a hydrofobní.

⁷ Kromě hydrofobních interakcí se na formování membrány podílí i další síly – elektrostatické a van der Waalovy síly, tvorba vodíkových můstků a nekovalentní interakce.

⁸ Regulačními drahami rozumíme kaskády biochemických procesů vedoucí ve svém konečném důsledku k nějakému efektu, například iniciaci buněčného dělení apod.

transmembránové proteiny (zprostředkovaná difúze a aktivní přenos). Proteiny fungují buď sami jako transmembránové přenašeče, nebo vytvářejí iontové pumpy a transportní kanálky, jež transport vykonávají. Různé membrány exprimují odlišné soubory transportních proteinů, čímž se specializují k patřičným funkcím.

Transport může probíhat samovolně přímo přes membránu, nebo zprostředkovaně přes transportní membránové struktury. Z hlediska spotřeby energie se transport dělí na pasivní a aktivní. Mezi pasivní formy patří **prostá difúze** a **zprostředkovaná difúze**, tedy mechanismy přenosu malých molekul po koncentračním spádu (elektrochemický gradient) bez spotřeby energie. Difúzí dovnitř a ven z buňky pronikají například plyny a malé hydrofobní molekuly. Prostá difúze se řídí pouze fyzikálně-chemickými zákony a buňky ji proto nemohou ovlivňovat. Zprostředkovaná difúze se týká molekul, které volně neprostupují membránou (fosfátové a další ionty, aminokyseliny, monosacharidy, disacharidy atd.), a proto vyžadují přítomnost proteinových přenašečů, například **membránových kanálků**. Kanálky fungují obousměrně, některé jsou specifické jen pro určité molekuly a případně i regulovatelně uzavíratelné. Prostřednictvím kanálků může tedy buňka příjem konkrétních látek přizpůsobovat okamžitým potřebám. Důležitý je v tomto ohledu například transport různých iontů. Alternativně se pasivní přenos odehrává přes **proteinové přenašeče**, na které se transportované molekuly navážou a poté jsou „překlopeny“ skrz membránu na její vnitřní stranu. Dochází k tomu díky konformačním změnám vyvolaných v přenašeči vazbou příslušné látky.

Aktivní transport spotřebovává energii získanou štěpením adenosintrifosfátu (ATP) (**primární aktivní transport; uniport a kotransport**) nebo ze současného přenosu jiné látky po koncentračním spádu (**výměnný transport** neboli **sekundární aktivní transport**). To se může dít směrem opačným proti vlastní transportované látce (**antiport**) nebo i stejným (**symport**). Aktivní transport se uskutečňuje pomocí iontových pump, přenašečových proteinů vybavených ATPázovou aktivitou nebo membránových váčků. **Iontové pumpy** (sodíko-draslíková, vodíková, kalciová) hrají v životě buňky zásadní úlohu, protože zodpovídají za udržování důležitých buněčných gradientů, nezbytných například pro šíření elektrického signálu (nervových vzruchů), produkci kyseliny chlorovodíkové (HCl) v žaludku anebo syntézu ATP v mitochondriální membráně (blíže kap. 2.4.5). Buněčné membrány tak zajišťují nejen příjem a výdej látek, ale také se aktivně podílí na buněčném metabolismu a šíření vzruchů mezi buňkami.

S využitím membránových váčků probíhají poslední dvě formy aktivního transportu – **endocytóza** a **exocytóza**. Endocytózou rozumíme přenos nespecifických látek dovnitř buňky.

Látky jsou nejprve obaleny buněčnou membránou, která se posléze vychlipuje dovnitř buňky a odštěpuje zde váčky (vezikuly) uvolňující svůj obsah do cytozolu. Podle charakteru dopravované látky rozlišujeme **fagocytózu**, jejímž prostřednictvím buňky pohlcují větší pevné látky ale třeba i bakterie a jiné buňky, a **pinocytózu**, zaměřenou na extracelulární tekutiny a v nich rozpuštěné látky. Tvorba váčku může být zahájena i specifickou vazbou látky na receptor v membráně. Naopak vylučování buněčného obsahu (neurotransmitery, inzulin atd.) nazýváme **exocytózou**. Váčky se odškrcují od Golgiho aparátu, putují k cytoplazmatické membráně, splývají s ní, a následně se vylévají do extracelulárního prostoru.

Obr. 2.2 Mozaikový model cytoplazmatické membrány se znázorněnými mechanismy transmembránového transportu látek <http://www.dancesalsa.co/types-of-transport-diagram.html>

2.4.3 Cytoplazma

Cytoplazma vytváří prostředí pro existenci buněčných organel včetně jádra a zprostředkovává jejich metabolické a transportní spojení. V cytoplazmě se rozpouští celá řada látek a dochází k jejich ředění pro chemické přeměny. U rostlin má tato základní hmota živých organismů charakter solu, u živočichů spíše gelu. Hlavní složku cytoplazmy představuje voda (60–85 %), mezi další významnější komponenty patří globulární bílkoviny (albuminy, globuliny) a celá řada organických i anorganických látek, například enzymy, ribonukleové kyseliny (RNA), lipidy, mastné kyseliny, lipoproteidy a aminokyseliny. Cytoplazmu proto můžeme považovat za jakýsi koncentrovaný gel nejrůznějších molekul vykazující nesčetné enzymatické a další chemické aktivity (anaerobní glykolýza, částečné odbourávání potravy, syntéza lipidů atd.). Zcela zásadním procesem, který zde probíhá na ribozomech, je translace proteinů. Cytoplazma také pomáhá regulovat hospodaření s vodou a elektrolyty a na rozdíl od jádra se barví kyselými barvivy.

2.4.4 Ribozomy

Ribozomy představují nejmenší buněčnou organelu pozorovatelnou jako granula o průměru 20–30 nm. Skládají se z ribozomálních RNA (rRNA) a desítek proteinů. Při podrobnějším pohledu lze rozeznat **malou a velkou podjednotku**, u eukaryot se sedimentačními

koeficienty⁹ 40 S a 60 S (celý ribozom 80 S). Prokaryota mají ribozomy o něco jednodušší a menší (70 S), s podjednotkami 30 S a 50 S. Ribozomy katalyzují **translaci**, tedy syntézu proteinů podle informace zakódované v mediátorové RNA (mRNA). Termín translace je zde opravdu výstižný, neboť na ribozomech se skutečně překládá sekvenční kód DNA do kódu aminokyselin. Informace zapsaná v DNA pomocí čtyř písmen (bází) musí být převedena do abecedy aminokyselin, jež se skládá z písmen jednadvaceti¹⁰, navíc jiných než v DNA (obr. 2.3). Úlohu překladatelů zde plní **aminoacyl-tRNA-syntetázy** a **transferové RNA (tRNA)**. Aminoacyl-tRNA-syntetázy jsou přísně specifické enzymy, jež umí dle prostorové struktury (tj. konformace) molekul rozpoznat vzájemně si odpovídající kombinaci aminokyseliny a příslušné tRNA, na jejíž 3'-konec akceptorového raménka aminokyselinu napojí. Kromě vazebního místa pro aminokyselinu má každá tRNA také tzv. **antikodon**, tvořený třemi nukleotidy, kterým na základě komplementarity bází¹¹ rozeznává korespondující **kodon** na mRNA. Transferová RNA s navázanou aminokyselinou takto na ribozomu dekóduje informaci obsaženou v mRNA, načež přenášenou aminokyselinu zařadí na správné místo do syntetizovaného polypeptidového řetězce. Pro každou z 21 aminokyselin existuje jedna aminoacyl-tRNA-syntetáza a alespoň jedna specifická tRNA, která může číst i více z 64 možných kodonů. Tento fenomén, tj. začlenění konkrétní aminokyseliny do proteinu prostřednictvím více kodonů, označujeme jako **degeneraci genetického kódu**. Proces přidávání aminokyselin do proteinového řetězce lze ve zjednodušené podobě popsat následovně: Iniciační tRNA s navázaným methioninem (případně formylmethioninem u bakterií) nasedne do příslušného místa malé podjednotky ribozomu. Poté se k malé podjednotce přichytí svým 5'-koncem také mRNA, a to prostřednictvím zde přítomné rRNA. Malá podjednotka s **iniciační tRNA** se pak posouvá po mRNA k jejímu 3'-konci, dokud nenarazí na **iniciační kodon** AUG, od kterého má být translace zahájena. Iniciace translace ze správného místa je pro syntézu proteinu naprosto kritická, jelikož jakákoliv nepřesnost v jeho identifikaci, byť i o jediný nukleotid, zapříčiní nesmyslné čtení sekvence mRNA celého genu¹². Po nalezení iniciačního kodonu se s malou podjednotkou spáruje i podjednotka velká, která katalyzuje vznik **peptidické vazby** mezi aminokyselinami¹³, jež jsou k ribozomu

⁹ Velikost ribozomů a jejich podjednotek je udávána pomocí sedimentačních koeficientů, tedy v tzv. Svedbergových sedimentačních jednotkách [S].

¹⁰ Uvažujeme zde i selenocystein.

¹¹ Tedy na stejném principu, dle kterého se řídí replikace a transkripce.

¹² Vzhledem k tripletovému charakteru genetického kódu má posun startovního místa transkripce o 1 nebo 2 nukleotidy někdy i mnohem závažnější následky pro funkci proteinu než posun o 3 nukleotidy. Dojde totiž k narušení celého čtecího rámce genu.

¹³ Jelikož klíčovou úlohu při této katalýze hraje rRNA, představuje ribozom jakýsi obří ribozym.

dopravovány dalšími a dalšími tRNA. Nově přichází tRNA se vážou na ribozom a vytlačují z něj starší tRNA, které již odevzdaly svou aminokyselinu. Tímto mechanismem je zajištěno kontinuální prodlužování peptidového řetězce a zároveň i směřování celého ribozomu kupředu po mRNA k dalším kodonům. Ve svém pohybu ribozom pokračuje, dokud se nezastaví na **kodonu terminačním**, který syntézu proteinu ukončí. U prokaryot probíhá rozpoznání iniciačního kodonu trochu jiným způsobem než u eukaryot, takže ribozomy mohou nasedat na mRNA po celé její délce, a tedy v mnohonásobném počtu (polycistronní mRNA).

Z hlediska lokalizace rozlišujeme ribozomy volně se vyskytující v cytoplazmě a ribozomy vázané na endoplazmatické retikulum. Logicky lze odvodit, že volné ribozomy syntetizují proteiny cytoplazmatické, zatímco ribozomy drsného endoplazmatického retikula především proteiny určené pro cytoplazmatickou membránu, některé buněčné orgány (např. enzymy lyzozomů) a také export z buňky. Volné a vázané ribozomy mají přitom zcela stejnou stavbu a o jejich interakci s endoplazmatickým retikulem rozhoduje pouze proteinový řetězec, jehož syntéza na ribozomu právě započala. Proteinové řetězce cílící volné ribozomy do endoplazmatického retikula nesou na svém N-konci speciální signální sekvenci, jež je rozpoznávána tzv. částicí SRP (signal recognition particle). Celý ribozom s navázanou částicí SRP se následně přichytí k příslušným receptorům v retikulu. Celkově můžeme v buňce najít miliony ribozomů.

Obr. 2.3 Translace genetické informace a syntéza proteinů na ribozomech

<https://slideplayer.cz/slide/6077889/19/images/28/Genetick%C3%A1+informace+DNA+RNA+Proteiny+Replikace+Transkripce+Translace.jpg>

2.4.5 Mitochondrie

Jedná se původně o samostatné mikroorganizmy, bakterie, které se v průběhu evoluce symbioticky začlenily do buněk. Mitochondrie mají ovoidní (chondros) až protáhlý (mitos) tvar a jejich velikost kolísá v rozsahu 1–2 μm . Některé buňky si vystačí s jen jednou obří mitochondrií, obvykle se však setkáváme se stovkami až tisíci mitochondrií. Mitochondrie jsou v cytoplazmě rozloženy víceméně disperzně, nejčastěji se ale nachází poblíž jádra, případně v oblasti buňky, která vyžaduje vysoký přísun energie (kontraktilní aparát srdečního svalu, bičík spermií apod.). Tato lokalizace koresponduje s funkcí mitochondrií, které můžeme metaforicky přirovnat k jakýmsi „buněčným elektrárnám“ produkujícím **adenosintrifosfát (ATP)**, jež buňkám slouží jako univerzální zdroj energie. Jinými slovy,

mitochondrie přeměňují energii živin, zejména cukrů a tuků, do podoby přímo využitelné buňkou.

Mitochondrie ohraničují dvě membrány, z nichž obě hrají klíčovou úlohu v mitochondriálních procesech a obsahují vzájemně odlišná spektra proteinů. **Vnější membrána** je hladká a pórovitá, ta vnitřní naopak zvrásněná a vybíhající do vnitřního prostoru mitochondrie v podobě hřebenovitých výběžků – tzv. **krist**. Na **vnitřní membráně** probíhá **elektrotransportní (dýchací) řetězec** a **oxidační fosforylace**, takže její zvrásnění významně zvyšuje povrch dostupný pro syntézu ATP. Mezi membránami se nachází **intermembránový prostor**, který svým složením s ohledem na malé molekuly odpovídá díky vysoké propustnosti vnější membrány (až do cca 5000 Da) cytozolu. Oblast pod vnitřní membránou pak nazýváme **matrix**. Realizuje se zde řada fundamentálních biochemických dějů – **Krebsův cyklus (citrátový cyklus)**, **β -oxidace mastných kyselin** a část **cyklu močoviny**. Krebsův cyklus poskytuje vysokoenergetické elektrony pro dýchací řetězec ve vnitřní membráně. Enzymy řetězce postupně přenášejí elektrony až na kyslík (za vzniku vody), přičemž takto jimi uvolněnou energii obratem využívají k pumpování protonů pocházejících z vody uvnitř matrix do intermembránového prostoru, tj. přes vnitřní mitochondriální membránu. Tím se vytváří silný elektrochemický gradient nutící protony k návratu do matrix. To se děje průchodem přes **ATP syntázu**, která je též usazena ve vnitřní mitochondriální membráně a s využitím energie procházejících protonů syntetizuje ATP.

Mitochondrie, jako jediné cytoplazmatické organely lidských buněk kromě jádra, mají svou vlastní mitochondriální DNA (mtDNA) a RNA a uskutečňují transkripci i translaci. Genetická výbava mitochondrií však kóduje jen malou část potřebných proteinů, takže jejich funkce zároveň významně závisí na buněčném jádře. Mitochondrie proto patří mezi tzv.

semiautonomní organely. Genom mitochondrií představuje jedna či několik kruhových molekul DNA, které se volně vyskytují v matrix, nebo se pojí na vnitřní membránu.

Mitochondriální DNA se proto podobá spíše prokaryotickému genoforu než eukaryotickým chromozomům a dědí se matroklinně¹⁴. Mutace v mtDNA nebo jaderných genech pro mitochondriální enzymy způsobují dědičná nebo i získaná onemocnění, zejména metabolického charakteru. Ještě dodejme, že se mitochondrie množí autoreprodukci (nemohou vznikat prostým poskládáním buněčných komponent *de novo*) a nejsou součástí endoplazmatického retikula, přestože patří mezi membránové organely. K syntéze jejich

¹⁴ Paternální přenos mtDNA do dceřiných buněk jsme znali u některých organismů, nikoli však člověka. V roce 2018 byl případně překvapivě pozorován současný přenos mateřské a otcovské také u lidské mtDNA (Luo S. et al, Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. PNAS, 2018 115 (51) 13039-13044.

proteinů dochází na volných cytoplazmatických ribozomech nebo na vlastních ribozomech v mitochondriální matrix.

U některých organismů, například rostlin a řas, se mezi semiautonomní organely symbiotického původu řadí také plastidy, z nichž v obecnou známost vešly zejména chloroplasty. Chloroplasty se v mnoha rysech podobají mitochondriím, obsahují však chlorofyl a kromě jiných důležitých biochemických dějů zodpovídají za zcela zásadní proces – **fotosyntézu**.

2.4.6 Golgiho aparát

Pojem Golgiho aparát souhrnně označuje, podobně jako v případě endoplazmatického retikula, systém cisteren a váčků roztroušených v cytoplazmě, případně obklopujících jádro jako síť. Funkčně zprostředkovává Golgiho aparát přechod mezi endoplazmatickým retikulem, cytoplazmou a cytoplazmatickou membránou. V elektronovém mikroskopu bylo prokázáno, že se Golgiho aparát skládá ve své střední části z plochých cisteren ohraničených hladkou membránou, které v periferní zóně přecházejí do malých váčků (vezikul). Golgiho aparát představuje důležitou sekreční organelu a kromě buněčného transportu vytvořených látek zajišťuje i jejich posttranslační modifikace. Produkuje například imunoglobuliny a polysacharidové struktury pro povrchový glykokalix, což je ochranná polysacharidová vrstva pokrývající cytoplazmatickou membránu. Některé látky se v Golgiho aparátu také skladují a odstraňují.

2.4.7 Lyzozomy

Lyzozomy mají kulatý nebo ovoidní tvar, na povrchu je kryje jednoduchá membrána a vznikají oddělením z hladkého endoplazmatického retikula nebo Golgiho aparátu. Tyto duté organely disponují hydrolytickými enzymy, obecně patřícími mezi kyselé hydrolázy (například kyselou fosfatázu, lipázy, ribonukleázy, glykozidázy a celou řadu dalších enzymů). Uvnitř lyzozomů (lumen) panuje kyselé prostředí (pH asi 5), které umožňuje degradačním enzymům fungovat za běžných okolností pouze v těchto organelách. Obecně lyzozomy zodpovídají za rozklad určitých komponent buňky a materiálu vstřebaného z okolí (buněčné trávení). Při poškození buňky nebo po její smrti se enzymy z lyzozomů uvolňují do cytoplazmy a zprostředkovávají autolýzu jejího obsahu.

Rozlišujeme primární, sekundární a terciární lyzozomy. **Primární lyzozomy** jsou produkovány endoplazmatickým retikulem, odkud se dostávají do Golgiho aparátu a ve formě drobných váčků pokračují do cytoplazmy. **Sekundární lyzozomy** pak bývají větší a značně

heterogenní, dle toho, co tráví. Můžeme je rozdělit na heterolyzozomy a autolyzozomy. **Heterolyzozomy** vznikají splynutím primárního lyzozomu s fagozomem a odbourávají cizorodé látky, které vnikly do buňky fagocytózou (heterofagozomy), například bakterie. **Autolyzozomy** pak eliminují nežádoucí části organel a cytoplazmy. **Terciální lyzozomy** shromažďují nerozložitelné látky, například lipofuscin, který můžeme v mikroskopu pozorovat jako zelenožlutě až hnědočerveně zbarvené kapénky. Lyzozomální onemocnění, někdy nazývaná jako „strádavá“, se objevují vzácně a způsobuje je kumulace nezpracovaných látek v lyzozomech v důsledku poruchy aktivity některého z lyzozomálních enzymů. Podle nových studií se lyzozomy podílejí patrně i na buněčném signalizování, například spojeném s apoptózou. Lyzozomy nacházíme výhradně u živočišných buněk.

2.4.8 Peroxizomy

Peroxizomy, membránou obalená malá (0,1–1 μm) ovoidní tělíska, odvozují svůj původ od endoplazmatického retikula. Obsahují peroxidázu, katalázu, různé aminooxidázy a některé další enzymy, jež se uvnitř peroxizomů organizují v tzv. **krystaloid**, zajišťující správnou návaznost probíhajících chemických reakcí. Peroxizomy zejména oxidativně degradují dlouhé řetězce mastných kyselin a dalších substrátů, tvoří žlučové kyseliny a recyklují cholesterol. Procesem podobným β -oxidaci v mitochondriích se uvolňuje peroxid vodíku, který je následně využit pro sprzęžené oxidační reakce. Jakékoliv přebytky peroxidu ihned rozkládá kataláza na vodu a kyslík, a chrání tak buňku proti jeho toxickým účinkům. Souhrnně lze tedy říci, že se peroxizomy podílejí na buněčném metabolismu a odstraňování toxických látek (například etanolu, některých D-aminokyselin, fenolických látek, kyseliny mravenčí, glyoxylátu, epoxidů, formaldehydu, dusitanů a mnoha buněčných metabolitů).

2.4.9 Proteazomy

Proteazomy se vyskytují v cytoplazmě i buněčném jádře a představují nástroj likvidace přebytečných, nesprávně nasyntetizovaných a poškozených proteinů. Můžeme si je představit jako chemický mlýnek, vrátky uzavřený válec, do kterého je po otevření těchto vrátek na základě příslušného signálu nežádoucí protein vtažen, rozštěpen proteázami a na druhém konci vyloučen v podobě krátkých fragmentů až jednotlivých aminokyselin. Proteiny, které mají být proteazomem rozloženy, jsou nejprve příslušnými enzymy označeny **polyubiquitinovým řetězcem**. Některé porušené proteiny však podléhají degradaci i bez tohoto signálu. Proteazomy tak hrají v buňce extrémně důležitou úlohu, protože regulují

proteinovou homeostázu. Nepřekvapuje proto, že jejich disfunkce se podílí na celé řadě patologických procesů, včetně karcinogeneze.

2.4.10 Buněčné inkluze

Jako buněčné inkluze (paraplazma) nazýváme produkty buněčného metabolismu a exogenní látky, které se dočasně či trvale ukládají v cytoplazmě a mohou být či nemusí ohraničeny membránou. K **endogenním inkluzím** patří sekreční granula (váčky endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu vyplněná sekretem), glykogen (zásobní polysacharid), kapénky lipidů, krystaly bílkovin a další. **Exogenní inkluze** se dostávají do cytoplazmy fagocytózou nebo pinocytózou. Zbarvené inkluze označujeme jako pigmenty.

2.4.11 Cytoskelet

Cytoskelet se v každé eukaryotické buňce rozprostírá jako trojrozměrná síťovitá plazmatická struktura proteinové povahy, která se na jedné straně váže k buněčnému jádru a na straně druhé k plazmatické membráně. Na tuto síť se napojují i ostatní buněčné organely. Funguje jako jeden z nejdůležitějších organizačních systémů v buňce, který se uplatňuje po celou dobu její existence (pohyb organel, svalové stahy, přenos signálů buněčného metabolismu atd.). Podílí se také na buněčném dělení (vnitrobuněčný pohyb chromozomů) a zániku buněk (apoptóza či nekróza). Na stavbě cytoskeletu kooperují aktinová filamenta (mikrofilamenta), střední filamenta a mikrotubuly.

Aktinová filamenta (průměr 5–7 nm) slouží k pohybu buňky, váčků a vnitrobuněčných struktur. Kromě toho stabilizují buněčné výběžky a podílejí se na zaškrcování cytoplazmy během dělení. Svazčky mikrofilament ležící v klidové buňce pod cytoplazmatickou membránou (kontraktilní svazky) označujeme jako stresová vlákna. Globulární aktin v přítomnosti iontů K^+ a Mg^{2+} polymeruje za spotřeby ATP a tvorby vláknité dvoušroubovice. Opačný proces pak představuje depolymerizace vlákna. Ve svalových strukturách asociují aktinová filamenta s myozinem.

Střední filamenta (10 nm) poskytují buňce pevnost, chrání ji před deformacemi a tvoří vlákna v mezibuněčné hmotě (kolagen, elastin, retikulin). Střední filamenta vznikají stočením mnoha proteinových vláken, takže připomínají jakési mikroskopické lano. Důležitou komponentu středních filament představuje jaderná lamina (laminy A, B, a C), která se jako proteinová síťovitá vrstva rozprostírá pod vnitřní stěnou jaderné membrány, na kterou přiléhá a poskytuje jí mechanickou oporu. Lamina se rovněž podílí na ustanovení jaderné architektury chromatinu a regulaci aktivity genomu. Laminy dále spoluvytvářejí jadernou matrix a kostru

buněčného jádra, přičemž významně participují na jeho rekonstrukci po proběhnutí mitóze. Mutace v laminech a asociovaných proteinech způsobují často závažná dědičná i získaná onemocnění – laminopatie (například Emery-Dreifusovu dystorfii nebo Hutchinsonovu-Gilfordovu progerii, spíše známou jako tzv. syndrom předčasného stárnutí).

Mikrotubuly, tvořené tubulinem (průměr 25 nm), formují nekontraktilní struktury kolísavé délky, přítomné ve všech eukaryotických buňkách. Jsou stavebními složkami stabilních (cílie a bičíky) i labilních struktur (dělicí vřeténko – centriola). Rozpad a opětovné sestavení mikrotubulů probíhá rychle, takže mohou výhodně sloužit k tvorbě dynamického lešení pro vnitrobuněčný transport, organizaci organel a buněčné dělení.

2.5 Anatomie buňky – buněčné jádro a genetická informace

Buněčné jádro (latinsky nucleus, řecky karyon, obr. 2.4) bylo prvním objeveným sub-buněčným útvarem (R. Brown, 1831). Nikdo tehdy samozřejmě netušil, o jak fascinující organelu se jedná. Nejprve se na něj pohlíželo jako na jednoduchou strukturu, která již není, kromě jaderka, dělitelná na další subkompartmenty. Metaforicky řečeno, jádro tehdy badatelé považovali za jakýsi vak, v jehož nitru se převaluje amorfní jaderná matrix. Dnes je již nepochybné, že obhospodařuje jednak kompletní genetickou knihovnu¹⁵ eukaryotické buňky, jednak představuje jakýsi centrální buněčný počítač, disponující veškerými potřebnými databázemi, softwarem i hardwarem pro zajištění stavby a řízení funkce sebe sama i celé buňky. Jádro je ohraničeno dvojitou jadernou membránou a má obvykle okrouhlý až tyčinkovitý, někdy i laločnatý tvar s průměrnou velikostí asi 5–10 μm. Rozměry jádra závisí na typu, funkci a stáří buňky, např. se zmenšuje během stárnutí. Jádro se obvykle vyskytuje centrálně, jinak je tomu třeba u vajíček a tukových či svalových buněk. Buňka mívá zpravidla jen jedno jádro, ale existují i buňky mnohojaderné. Více jader nalezneme třeba u osteoklastů, sloužících k odbourání kostní tkáně, nebo syncytií, vznikajících splynutím svalových buněk. Jiné typy buněk naopak jádro zcela postrádají nebo je jeho funkce redukována¹⁶.

Hlavní komponenty buněčného jádra představují **karyoplazma (nukleoplazma)** a **chromatin** (chroma – barevný, barvitelný). Karyoplazma je poměrně tekutá hmota obsahující zejména histony, DNA polymerázy, RNA polymerázy, nukleotidy, proteiny participující na reparaci

¹⁵ Malou část genetické informace u eukaryot ukrývají i mitochondriemi a případně plastidy, u prokaryot je doplňková genetická informace uložena na plazmidech.

¹⁶ Například červené krvinky savců, které se nedělí a specializují se pouze na přenos kyslíku, vypudí jádro již v průběhu postnatální erythropoézy v kostní dřeni. Terminálně diferencovaných neutrofilů mají zase jádro silně kondenzované a geneticky málo aktivní. Jeho funkce totiž spočívá v obraně organismu proti infekci – po aktivaci patogenem jádro neutrofilu doslova exploduje, čímž do okolního prostředí vymrští spoustu chromatinových vláken, jež imobilizují infekční agens a vyvolávají další stimulaci imunitního systému.

DNA, nejrůznější typy RNA a další molekuly. Chromatin (neboli komplex DNA s histony a nehistonovými proteiny) vytváří v mitóze známé pentlicovité útvary, **chromozomy**. Dříve se myslelo, že chromozomy jsou jen mitotické, svou povahou dočasné struktury, které se během interfáze¹⁷ zcela rozpouští a v následující mitóze vznikají *de novo*. Tento předpoklad vycházel ze skutečnosti, že tehdejšími metodami přestávaly být chromozomy v období mimo mitózu viditelné. Interfázní jádro proto vědci ještě relativně nedávno připodobňovali k vaku, ve kterém plují a náhodně se mísí jednotlivá vlákna DNA, podobně jako nudle v polévce. Na přelomu 18. a 19. století začali Rabl (1885), Strasbourger (1905) a Boveri (1909) uvažovat o určité organizaci buněčného jádra a nenáhodném uspořádání chromatinu také během interfáze. Následně byly s využitím radioizotopové a později fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pozorovány jaderné domény interfázních chromozomů. Existence těchto domén, též zvaných jako chromozomální teritoria, jednoznačně prokázala, že chromozomy v interfázi sice dekondenzují, zachovávají si ale svou identitu a určitou strukturu. Dnes víme, že zaujímají pouze určitý limitovaný objem jádra, jen omezeně se prolínají, a společně vytvářejí funkční jadernou architekturu. Další výzkumy odhalily, že topologie chromozomálních teritorií v buněčném jádře a také chromatinu uvnitř těchto teritorií se řídí určitými pravidly statistického charakteru. S postupem času se tak stále zřetelněji ukazuje, že strukturní aspekty hrají ve fungování jádra a genetické informace zcela zásadní roli.

Můžeme si snadno představit, že úkolem kondenzované struktury mitotických chromozomů je umožnit souměrný a bezpečný přenos genetické informace do dceřiných buněk během buněčného dělení. Správně porozumět úloze struktury chromatinu v interfázi však bude mnohem složitější, protože chromozomy v tomto období buněčného života vykonávají své komplexní provozní a řídicí funkce. Patří mezi ně zejména materiální vyjádření genetické informace, iniciované transkripcí (přepisem) DNA do RNA. Další interfázní proces, který musí proběhnout mezi jednotlivými děleními buňky, představuje replikace (zdvojení množství) DNA a vytvoření sesterských chromatid chromozomů. A konečně, jelikož transkripce, replikace, buněčný metabolismus a vnější faktory DNA neustále poškozují, probíhají v interfázní buňce nesčetné procesy zaměřené na její opravu. Všechny tyto aktivity interfázních chromozomů vyžadují přístup složitých proteinových komplexů k DNA, a tudíž i určitou specifickou strukturu chromatinu. Struktura chromatinu tak hraje v interfázi zásadní řídicí úlohu, a je proto přísně regulována. Na této regulaci se výrazně podílí tzv. **epigenetické modifikace DNA a histonů**, které nejenže přímo upravují strukturu interfázních

¹⁷ tj. v období mezi mitózami

chromozomů, genů, nebo dokonce i jejich částí dle aktuálních buněčných požadavků, ale zároveň jednotlivé oblasti chromatinu opatřují specifickým **epigenetickým kódem**. Tento kód řídí interakce DNA s histony a dalšími proteiny (transkripčními faktory, polymerázami, reparačními proteiny DNA, strukturními proteiny chromatinu atd.), a tedy i to, jak budou buňky s genetickou informací pracovat. Jinými slovy, genetický kód zaznamenaný v sekvenci nukleotidů DNA popisuje, co bude buňka produkovat, zatímco epigenetický kód (epi = nad, tedy „nadgenetický“ kód) buňce určuje, jak a za jakých okolností se tak má dít. Kompletní sekvenci lidského genomu dnes známe díky úctyhodnému projektu HUGO. Vzrušující výzkum epigenetického kódu a způsobů, jakými buňka s naší genetickou knihovnou pracuje, však usilovně pokračuje. To se týká i otázek funkčního významu jaderné architektury a mechanismů vedoucích k jejímu ustanovení.

Obr. 2.4 Interfázní buněčné jádro a jeho komponenty

https://pngtree.com/freepng/cell-nucleus-structures_3526116.html

2.5.1 Jaderná membrána (karyolema)

Jádro na povrchu obaluje dvojitá jaderná membrána, **karyolema**. Karyolemu můžeme pozorovat v optickém mikroskopu jako tenkou, ostře ohraničenou linii, v elektronovém mikroskopu složenou ze dvou třívrstevných membrán (vnitřní a zevní). Na vnitřní membránu se váže chromatin prostřednictvím **jaderné laminy**, tj. jakéhosi proteinového lešení sestávajícího z laminů, které dodává jádru pevnost. Chromatin se k lamině přichytává jen prostřednictvím specifických chromozomálních lokusů, takže se jaderná membrána kromě jiných úkolů podílí také na ustanovení funkční jaderné architektury. Na vnější membránu se spolu s ribozomy pojí drsné endoplazmatické retikulum, do něhož volně prostupuje perinukleární prostor. Přes endoplazmatické retikulum a následně Golgiho aparát jádro komunikuje s cytoplazmatickými organelami, cytoplazmatickou membránou a mimobuněčným prostředím.

Interakci mezi jádrem a cytoplazmou dále zprostředkovávají **jaderné póry**, které v karyolemě vytvářejí transmembránové kanálky s osmičetnou symetrií a velikostí 20–50 nm. Jaderné póry zaujímají asi deset procent až jednu třetinu povrchu karyolemy a mají pro život buňky zcela zásadní význam. Zajišťují nezbytnou cirkulaci proteinů a RNA molekul mezi cytoplazmou (syntéza proteinů) a jádrem (syntéza RNA). Do cytoplazmy jimi proudí zejména molekuly mediátorové mRNA, transferové tRNA a ribozomální podjednotky vytvořené v jádře interakcí ribozomálních proteinů s ribozomálními rRNA. Proteiny lokalizované v jaderných

pórech také provádějí výstupní kontrolu řetězců RNA, čímž zabraňují průniku aberantních RNA do cytoplazmy. Naopak dovnitř jádra se jadernými póry dostávají ribozomální proteiny, sestřihové faktory RNA¹⁸, histony a další stavební komponenty chromatinu a veškeré proteiny řídící metabolismus DNA, zejména transkripční faktory, replikační faktory a enzymy.

V oblasti jaderných pórů vnitřní a vnější membrána splývá, přičemž vlastní pór přepažuje tenká diafragma. Maximální velikost molekul, které mohou jadernými póry pronikat, odpovídá asi 60 kDa. O transportu proteinů do jádra rozhoduje také tzv. **jaderný lokalizační signál (NLS)**, tj. krátká aminokyselinová sekvence umožňující navázání proteinu, který ji obsahuje, na příslušný transportér. **Jaderný exportní signál (NES)** naopak označuje proteiny určené pro export z jádra do cytoplazmy.

Aby byl během buněčného dělení umožněn rozestup chromozomů do dceřiných buněk, dochází na začátku mitózy spolu s kondenzací chromozomů k fosforylaci jaderné membrány a jejímu rozpadu na drobné fosfolipidové váčky. Při tvorbě nového jádra jsou pak komponenty membrány opět defosforylovány, což umožňuje shlukování a polymerizaci těchto váček na chromozomech a rekonstrukci membrány.

2.5.2 Jadérko

Jadérko (latinsky **nucleolus**) představuje dynamický útvar v interfázním buněčném jádře, který neohraničuje membrána. Ve světelném mikroskopu ho můžeme pozorovat jako oválné oblasti barvící se hematoxylinem a syntetickými bazickými barvivami. Fluorescenční barviva (DAPI, TOPRO3) jadérko naopak nebarví. Z toho lze vyvodit, že obsahuje jen relativně malé množství DNA. Konkrétně se jedná o **organizátory jadérka akrocentrických chromozomů**, které nesou mnohonásobné kopie genů pro rRNA a kolem kterých se jadérka formují.

V případě člověka se tvorby jadérka účastní chromozomy 13, 14, 15, 21 a 22, společně zahrnující zhruba 400 genů pro rRNA. Tyto geny jsou velmi silně přepisovány. O intenzitě jejich transkripce si můžeme udělat obrázek již jen ze samotného faktu, že rRNA tvoří více než polovinu RNA produkované v jádře. Kolem genů pro rRNA se tak kumuluje objemná sféra jejich transkriptů, které zde podléhají dalším úpravám (maturace). Hotové molekuly RNA následně interagují s ribozomálními proteiny za vzniku ribozomálních podjednotek. V elektronovém mikroskopu můžeme rozlišit několik morfologických vrstev jadérka, není však zcela jasné, jak tyto vrstvy korelují s výše popsanými procesy a strukturami. Kompozice jadérek je navíc proměnlivá. Nejdříve se v buňce vyskytuje několik pre-jadérek, která spolu

¹⁸ Sestřih z pre-mRNA odstraní introny za vzniku mRNA, která teprve slouží k translaci na ribozomech.

posléze splývají. V jádře je tak obvykle přítomno jádérko jedno, někdy však i více, v závislosti na typu a metabolické aktivitě buňky. V některých typech buněk se jádérko objevuje až v průběhu diferenciaci. Jáderka mají tvar kulatého tělíska o průměru 1–3 μm a nacházejí se uprostřed jádra nebo u jeho vnitřní membrány. Jádérko zajišťuje především syntézu rRNA, v současné době však začínáme odhalovat i jeho další funkce, například zapojení do reakce buňky na stres nebo infekci.

2.5.3 Jaderná DNA a základní jaderné procesy – replikace a transkripce

Jak již bylo uvedeno, převážnou část jádra vyplňuje **chromatin**, tedy DNA v komplexu s histony a nehistonovými proteiny. Všechny tyto složky mají v chromatinu nezastupitelnou úlohu. **Deoxyribonukleová kyselina** (obr. 2.5) uchovává, realizuje a udržuje kontinuitu genetické informace. Tato polymerní makromolekula se skládá ze dvou řetězců vytvořených spojením různě velkého počtu nukleotidů prostřednictvím fosfodiesterové vazby. **Nukleotidy** se sestávají ze zbytku kyseliny fosforečné, deoxyribózy (cukru) a jedné z purinových (adenin, guanin) nebo pyrimidinových (cytozin, thymin) bází. Spojováním deoxyribóz přes zbytky kyseliny fosforečné se vytváří tzv. **cukr-fosfátová páteř DNA**, na kterou se přes deoxyribózu pojí pomocí N-glykosidické vazby jednotlivé **baze**. Specifickým řazením těchto bází v rámci řetězce (tj. sekvencí nukleotidů) je v DNA zapsána vlastní genetická informace.

Z chemického hlediska rozlišujeme 5'-konec a 3'-konec řetězce DNA. **5'-konec** zakončuje fosfátový zbytek na uhlíku 5 deoxyribózy (proto 5'), zatímco **3'-konec** OH skupina na uhlíku 3 deoxyribózy (proto 3'). Již proslavená **dvoušroubovice DNA** vzniká vazbou dvou opačně orientovaných (tzn. 5-->3 a 3-->5), tzv. antiparalelních řetězců prostřednictvím **vodíkových můstků** mezi protilehlými nukleotidy. Dvoušroubovice DNA je obvykle pravotočivá¹⁹ a na základě tzv. **Watson-Crickova párování bází** v ní proti adeninu (A) stojí v opačném řetězci vždy thymin (T), zatímco guanin (G) se páruje s cytozinem (C). A a T pojí dva vodíkové můstky, G a C pak tři. Z uvedeného plyne, že dvoušroubovici mohou vytvářet jen takové řetězce, které jsou si při antiparalelní orientaci vzájemně inverzním obrazem – mluvíme o tzv. **komplementárních řetězcích**²⁰. Na principu komplementarity spočívají kromě samotné stavby dvoušroubovice DNA i její aktivity podmiňující existenci života tak, jak ho známe – tj. replikace, transkripce a některé mechanismy reparace DNA a regulace genové exprese.

¹⁹ Existuje několik helikálních forem DNA, zatímco A a B jsou pravotočivé, méně obvyklá forma Z je levotočivá; formy A a Z se vyskytují jen za specifických podmínek.

²⁰ Vzájemně komplementární jsou například řetězce 5'-AACTG-3' a 3'-TTGAC-5'.

Fenomén komplementarity proto představuje naprosto stěžejní evoluční „vynález“ a využívají ho i některé důležité metody molekulární biologie a genového inženýrství.

Obr. 2.5 Struktura nukleotidů (vlevo) a molekuly DNA (vpravo)

<https://www.biologyexams4u.com/2013/04/double-helix-dna-model-by-watson-and.html#.W3aijLh9haQ>

Než postoupíme k vyšším organizačním celkům chromatinu – chromozomům, zastavíme se na chvíli ještě u zmíněné replikace a transkripce DNA. **Replikací** rozumíme zdvojení buněčného obsahu DNA před rozdělením rodičovské buňky na buňky dceřiné. Jedná se tedy o proces zajišťující kontinuitu života. Replikace je iniciována v S fázi buněčného cyklu v předem určených místech genomu, definovaných nukleotidovou sekvencí *ori* (tzv. **origins**). Od těchto počátků probíhá obousměrně a tzv. semikonzervativním způsobem. Řetězce mateřské dvoušroubovice DNA se nejprve v místě replikace za pomoci enzymů vzájemně rozvolní (denaturují), čímž se v DNA objeví „bublina“ nespárovaných nukleotidů, do které se následně váže celá řada replikačních proteinů za tvorby dvou protisměrně orientovaných **replikačních vidlic**. Celou strukturu si můžeme připodobnit ke dvěma proti sobě postaveným písmenům Y, replikačním vidlicím, nejprve se dotýkajícím svou rozvětvenou částí a poté se s postupem replikace od sebe vzdalujícím (obr. 2.6). Báze písmene Y odpovídá stále ještě nerozpletené dvoušroubovici, zatímco každá z jeho větví představuje jeden z uvolněných (jedno)řetězců. Oba oddělené (jedno)řetězce slouží jako templát pro syntézu nascentního řetězce DNA. Primární úlohu v tomto procesu hraje DNA-dependentní DNA polymeráza (**DNA polymeráza**), která čte sekvenci nukleotidů na templátovém řetězci a na základě komplementarity bází postupně přidává nukleotidy do řetězce nového. DNA polymeráza nicméně dokáže katalyzovat spojení nukleotidů prostřednictvím **fosfodiesterových vazeb** pouze ve směru 5'-->3'. Ze dvou nových řetězců DNA je proto kontinuálně syntetizován jen jeden (**vedoucí řetězec**), zatímco ten druhý (**opožďující se řetězec**) je prodlužován postupně po krátkých úsecích, tzv. **Okazakiho fragmentech** (obr. 2.7). Protože DNA polymeráza vyžaduje pro zahájení své činnosti existenci krátkého fragmentu RNA, na který by mohla začít nukleotidy napojovat, závisí ve své činnosti na DNA-dependentní RNA polymeráze (**DNA primáze**), která tyto tzv. **primery** vytváří. Pro syntézu celého vedoucího řetězce stačí primer jediný, v případě opožďujícího se řetězce je zapotřebí jeden primer pro každý Okazakiho fragment. Na rozdíl od transkripce (viz dále) se během replikace nový řetězec ihned páruje s řetězcem původním (templátovým) a formuje s ním dvoušroubovici DNA. V celkovém výsledku výše popsaných aktivit proto vznikají dvě dceřiné molekuly DNA, z nichž

každá se sestává z jednoho templátového řetězce rodičovské DNA a jednoho řetězce nově nasyntetizovaného. Proto replikaci označujeme za **semikonzervativní** (obr. 2.6).

Obr. 2.6 Iniclace a průběh replikace DNA <http://uoitbiology12u2014.weebly.com/dna-replication.html>

Na závěr zdůrazněme, že kromě DNA polymerázy a primázy se na replikaci podílí celá řada dalších enzymů a proteinů, z nichž každý má svou nezastupitelnou specifickou úlohu (obr. 2.7). Například **helikázy** rozmotávají dvoušroubovici DNA před postupující replikační vidlicí. Ve snižování narůstajícího torzního pnutí v DNA jim pomáhají i **topoizomerázy**. **Ribonukleázy** zajišťují odstranění RNA primerů z nascentních řetězců DNA a **speciální typy DNA polymeráz** následně vyplnění takto vytvořených mezer deoxyribonukleotidy. **Ligázy** nakonec zacelí zlomy v cukrfofosátové páteři nových řetězců, objevující se zejména v replikátech opožďujícího se řetězce. Pro zajímavost lze ještě uvést, že nepřesnost replikace u člověka odpovídá pouze asi 1 chybě na 10^9 až 10^{11} nukleotidů, přičemž lidská DNA v haploidním stavu (tj. v buňkách před replikací) obsahuje cca. 3.2×10^9 párů bazí (3.2 Gbp). Takto vysokou přesnost celého složitého procesu zajišťuje korekturní (proofreading) funkce samotné DNA polymerázy a také další opravné mechanismy buňky (Kap. 3), vyměňující špatně zařazené nukleotidy za správné jak již během replikace, tak po jejím dokončení. **Transkripce** (přepis) je dalším fundamentálním procesem, ke kterému dochází v buněčném jádře a jímž se zahajuje realizace genetického programu buňky. Prostřednictvím transkripce vytváří DNA své „pracovní“ kopie v podobě různých typů RNA molekul – mRNA, rRNA, tRNA, a tzv. malých RNA. Nejprve se DNA přepíše do **primárního transkriptu** (obecně hn-RNA nebo též pre-RNA), teprve jehož dalšími **post-transkripčními úpravami**²¹ vznikají funkční RNA. V případě strukturálních genů²² jsou to tzv. **mediátorové RNA**²³ (mRNA), které následně putují z jádra cytoplazmou k ribozomům, kde dochází ke konečné materializaci genetické informace překladem jejich sekvence (translací) do podoby stavebních, regulačních,

²¹ **Post-transkripční úpravy** si můžeme nejlépe ilustrovat na genech kódujících proteiny (tzv. **strukturální geny**), které se u eukaryot a v menší míře také archeí skládají z **exonů** a **intronů**. Oba typy sekvencí se přepisují do primárního transkriptu, do proteinů se však překládají pouze exony kódující jejich aminokyselinovou sekvenci. V rámci post-transkripčních úprav pre-mRNA proto probíhá tzv. **sestřih (splicing)**, tj. vyštěpení intronů. Během sestřihu mohou být z pre-mRNA eliminovány spolu s introny i různé kombinace exonů (**alternativní sestřih**), čímž z jednoho strukturálního genu vznikají různé mRNA, a tedy i **izoformy** daného proteinu. Jednotlivé izoformy se více či méně liší svými funkcemi, protože je jejich exprese často limitována na různé tkáně nebo vývojová stádia buněk a organismu. Další úpravy mRNA transkriptů u eukaryot zahrnují pokrytí jejich 5'-koneců tzv. čepičkou a přidání polyadenylačního (poly-A) signálu na jejich 3'-konece. První uvedená modifikace chrání mRNA před rozkladem a zprostředkovává navázání mRNA na ribozom, druhá modifikace stabilizuje křehkou mRNA a podílí se na jejím transportu.

²² Strukturální geny kódují aminokyselinovou sekvenci proteinů.

²³ Mediátorová mRNA je někdy též nazývána jako informační RNA.

signalizačních, enzymatických a dalších proteinů (viz výše, kap. 2.4.4). Transkripty nekódujících sekvencí DNA (rRNA, tRNA, malé RNA) se do proteinů nepřekládají a samy v buňce vykonávají nepostradatelné funkce. Například ribozomální RNA (rRNA) tvoří nedílnou součást ribozomů a transferové tRNA k nim dopravují aminokyseliny potřebné pro syntézu proteinů. Další typy nekódujících RNA se společně s proteiny podílejí na regulaci a průběhu vitálních procesů v buněčném jádře, např. transkripce.

Obr. 2.7 Schéma prokaryotické replikační vidlice <http://www.onlinebiologynotes.com/dna-replication/>

Jelikož transkripce samotná probíhá v základních rysech podobně jako replikace, zmíníme jen několik důležitých faktů. K transkripci dochází na rozdíl od replikace (S fáze) především v G₁ a G₂ fázi buněčného cyklu. Je však třeba zdůraznit, že řada genů je transkribována také/právě v S fázi, což znamená, že buňka musí v tomto kritickém období transkripci, replikaci a navíc i procesy reparace DNA precizně separovat v prostoru a čase. Případná kolize mezi těmito aktivitami²⁴ vede k **replikačnímu stresu** a **genomické nestabilitě**, jež je markérem i častou příčinou karcinogeneze.

Transkripce se od replikace liší také tím, že geny nejsou během buněčného cyklu transkribovány jen jednou, nýbrž opakovaně, s intenzitou odrážející potřeby buňky. Jinými slovy, každý buněčný typ má svůj geneticky naprogramovaný specifický **transkripční profil**, charakteristický souborem transkribovaných genů a intenzitou jejich transkripce. Transkripční profil závisí také na fázi buněčného cyklu a okamžitém stavu buňky.

Transkripci iniciuje vazba specifických kombinací **transkripčních faktorů** na regulační oblasti DNA. **Obecné transkripční faktory** přisedají na tzv. **promotory**, **specifické transkripční faktory** se pak vážou na **enhancery** nebo **silencery**, tedy další regulační sekvence, které zesilují nebo umlčují transkripci. Enhancery a silencery mohou být přitom od promotorů na DNA značně vzdáleny, což poukazuje na skutečnost, že regulační procesy zahrnují i změny struktury chromatinu. Transkripčních faktorů existuje velké množství a jejich produkce přísně závisí na typu a stavu buňky. Obecné transkripční faktory se exprimují ve všech buňkách, zatímco speciální transkripční faktory pouze v buňkách určitého typu a/nebo za určitých podmínek (např. v ozářených buňkách, buňkách vystavených tepelnému stresu, infekci, atd.). Každý typ buněk proto disponuje specifickým souborem genů a má svůj charakteristický transkripční profil, jak již bylo zmíněno.

²⁴ manifestující se např. tvorbou hybridů RNA-DNA, tzv. R-smyček

Samotný proces transkripce probíhá obdobně jako replikace, přepisuje se však pouze antikódující²⁵ (negativní) řetězec DNA za vzniku jednoho řetězce RNA. Ten se následně od molekuly DNA oddělí a řetězce DNA spolu opět asociují do původní dvoušroubovice. Centrálním enzymem transkripční mašinerie je **DNA-dependentní RNA polymeráza (RNA polymeráza)**, která na základě komplementarity bází zajišťuje vlastní přepis řetězce DNA do RNA. Syntéza řetězce se děje ve směru 5'-->3'. RNA polymeráza ale na rozdíl od DNA polymerázy nevyžaduje k zahájení své činnosti žádný primer a proti adeninu (A) vkládá uracil (U), takže thymin (T) se v RNA nevyskytuje. Transkripce trpí proti replikaci větší chybovostí, což ale může buňka tolerovat, protože odchylky v transkriptech RNA nevedou k dědičnému ovlivnění genetické informace.

2.5.4 Chromozomy a organizace chromatinu

V somatických buňkách člověka dosahuje souhrnná délka molekul DNA v dekonenzovaném stavu přibližně 2 m. Veškerá DNA musí být přitom funkčně sbalena do buněčného jádra o průměru pouze asi 10 μm . Tento nelehký úkol může být splněn pouze hierarchickou organizací chromatinu do vyšších struktur (obr. 2.8). První stupeň spiralizace DNA realizují **histony**, které obsahují převážně pozitivně nabitě aminokyseliny (Arg a Lys), a proto se elektrostaticky vážou k negativně nabitým fosfátům DNA. Na zásadní důležitost struktury histonů ukazuje už i sama konzervativnost histonových genů, které jsou prakticky totožné pro všechna eukaryota²⁶. Rozlišujeme 5 typů histonů: H1, H2A, H2B, H3 a H4, které spolu s DNA tvoří **nukleozomy** – základní jednotky chromatinu. Každý nukleozom se sestává z oktatameru tzv. **korových histonů**, přesněji jednoho tetrameru (H2A/H2B)₂ a dvou dimerů H3/H4, kolem kterých se obtáčí přibližně dvě otáčky DNA. Histon H1, tzv. spojovací histon, pak spíná jednotlivé nukleozomy jako svorka. Nukleozomové vlákno dosahuje tloušťky 10 nm a pro svůj vzhled v elektronovém mikroskopu ho často nazýváme jako „**korálky na niti**“. Tato struktura je patrně charakteristická pro transkripčně aktivní geny (zejména tedy **euchromatin**) v interfázním jádře. S pomocí histonu H1 se 10 nm vlákno dále spiralizuje do podoby tzv. **solenoidu** s přibližně 6 nukleozomy na otočku a průměrem 30 nm. Tento stupeň kompakce chromatinu předpokládáme u transkripčně neaktivních genů (**heterochromatin**), byly však navrženy i jiné modely. Další, ještě více diskutované organizační struktury, se vytvářejí při formování chromozomů během mitózy a meiózy. Solenoidní vlákno se postupně

²⁵ Kódující řetězec (pozitivní, paměťový) DNA je nositelem genetické informace a má stejnou sekvenci jako nově syntetizovaný řetězec RNA s tím rozdílem, že obsahuje thymin (T) tam, kde je v RNA uracil (U).

²⁶ Podobné histony se navíc vyskytují také u archeí.

uspořádává do smyček vyšších řádů, patrně připevněných k proteinovému lešení. Nejdříve se formuje chromatinová struktura o průměru 300 nm, jejímž dalším skládáním vzniká **chromatida**, silná 600 až 700 nm.

Obr. 2.8 Struktura chromatinu

<http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/32-chromosomes/eukaryote-genetics.html>

Stavba chromozomů a karyotyp člověka

Jaderné chromozomy představují materiální nosiče naprosté většiny genetické informace eukaryot, jen její nepatrná část se nachází ještě v mitochondriích a u některých organizmů, například rostlin a řas, i v plastidech. Mitochondrie a plastidy však obsahují chromozomy kruhové, podobné těm prokaryotickým. Dle velikosti dělíme lidské jaderné chromozomy do 7 skupin (A–G), přičemž základní struktura chromozomů je patrná z obr. 2.9. Každý metafázní chromozom se skládá ze dvou chromatid spojených v místě **primárního zúžení (konstrikce)** centromerou.

Centromera rozděluje chromatidu na **krátké (p)** a **dlouhé (q) raménko**, je tvořena repetitivními sekvencemi (u člověka α -satelitní DNA) a její úloha spočívá především ve zprostředkování rozchodu chromatid do dceřiných buněk. V centromerickém chromatinu je histon H3 nahrazen proteinem CENP-A, který reprezentuje signál pro vazbu kinetochoru, jehož prostřednictvím se chromozomy napojují na mikrotubuly dělicího vřeténka. S ohledem na umístění centromery rozlišujeme chromozomy **metacentrické** (centromera téměř uprostřed chromozomu, raménka p- a q- přibližně stejně dlouhá), **submetacentrické** (centromera mezi středem a koncem chromozomu, raménka p- a q- délkově odlišená) a **akrocentrické** (centromera blízko jednoho z konců, velký nepoměr v délce ramen). Krátká raménka akrocentrických chromozomů zakončují tzv. **organizátory jadérka (NOR)**, jež obsahují mnohonásobné kopie genů pro ribozomální RNA a od zbytku chromatid je odškrcuje tzv. **sekundární konstrikce**.

Obr. 2.9 Struktura metafázního chromozomu

Na úplném konci všech chromozomů nacházíme další důležité struktury – **telomery** (řecky telos = zakončení a meros = část). Jsou to specifické sekvence DNA²⁷ organizované do kvadruplexní struktury, jež tvoří komplexy spolu s proteiny, jakési čepičky, jež chrání konce

²⁷ u obratlovců tvořené například opakujícím se hexamerem (TTAGGG)_n

lineárních chromozomů. Bez telomer by byly totiž volné konce chromatid rozpoznávány reparačními enzymy jako dvouřetězcové zlomy DNA, což by ve snaze o jejich opravu vedlo k fúzím mezi chromozomy, genomické nestabilitě a následně smrti buňky nebo její nádorové transformaci. Ani telomery však nedokážou lineární chromozomy stabilizovat trvale. Na rozdíl od cirkulární DNA nejsou totiž konce lineární DNA v somatických buňkách nikdy zcela doreplikovány, takže se telomery postupně zkracují. V pohlavních buňkách délku telomer obnovuje **telomeráza**, tj. specifická RNA-dependentní DNA polymeráza, která dokáže doplnit nukleotidové sekvence i na konce chromozomů. V somatických buňkách se ale tento enzym přirozeně neexprimuje²⁸. Aby se zabránilo neblahým následkům absence telomer, přecházejí buňky po určitém počtu dělení (**Hayflickův limit**) do tzv. **senescence**, případně umírají programovanou buněčnou smrtí (**apoptózou**). Senescentní buňky sice dále přežívají, nemohou se však dělit.

Další charakteristický rys chromozomů představuje periodické střídání různě velkých oblastí heterochromatinu a euchromatinu podél délky chromatid, jež se po obarvení chromatinu speciálními cytogenetickými technikami projevuje jako pruhování. Každý chromozom má přitom svůj specifický **pruhovací vzorec**. Z praktického hlediska je tento vzorec užitečný pro studium strukturních a numerických aberací chromozomů. S vyšší precizností mohou být chromozomy pruhovány s využitím moderních molekulárně genetických technik, například různých aplikací **fluorescenční in situ hybridizace (FISH)**, zejména tzv. **mnohobarevného pruhování (mBAND či M-BAND)**. Zde však mechanismus pruhování záleží na komplementaritě DNA sond a chromozomálních sekvencí, nikoliv na strukturních rozdílnostech euchromatinu a heterochromatinu jako u cytogenetických přístupů.

Ve většině typů buněk člověka²⁹ nalézáme 23 párů chromozomů (obr. 2.10), přičemž jeden párový chromozom pochází vždy od otce a druhý od matky. Dvacet dva párů představují nepohlavní chromozomy (**autozomy**), jeden pár chromozomy pohlavní (**gonozomy**). U ženy se vyskytují dva homologické gonozomy X, u muže jeden gonozom X a jeden Y. Normální **karyotyp**³⁰ člověka tedy zapisujeme jako 46,XX (žena) nebo 46,XY (muž). U žen je v časně fázi embryonálního vývoje jeden z chromozomů X inaktivován v rámci kompenzace genové

²⁸ K reaktivaci **telomerázy** však často dochází v nádorových buňkách, což vede k jejich imortalizaci.

²⁹ Výjimku představují třeba bezjaderné červené krvinky a haploidní pohlavní buňky.

³⁰ Pojmem **karyotyp** označujeme soubor všech chromozomů v buňce. Karyotyp je charakteristický pro daný biologický druh a pohlaví (např. 46,XY u muže). U jednotlivců může nicméně z různých příčin (vrozené vývojové vady, nádorové bujení) docházet ke změnám od normálního karyotypu. Tyto odchylky se mohou týkat všech buněk jedince nebo jen jejich frakce. V tomto případě pojem karyotyp používáme i k popisu těchto odchylek. Například karyotyp pacientů s Downovým syndromem (se třemi chromozomy 21) je 47,XY,+21. Existují-li v rámci organismu dvě nebo více buněčných linií s rozdílným karyotypem, mluvíme o tzv. mozaicizmu.

dávky (**lyonizace**) a v buněčném jádře ho pozorujeme jako tzv. **Barrovo tělísko**. Tato inaktivace probíhá náhodně, takže není předem zřejmé, zda postihne chromozom pocházející od otce nebo od matky.

Obr. 2.10 Karyogram³¹ (vlevo) a ideogram³² (vpravo) člověka

<https://slideplayer.cz/slide/4871372/16/images/31/Karyotyp+%C5%BEeny+46,XX+%E2%80%93+G+pruhy.jpg>
<http://luisbilogia.blogspot.com/2007/04/> nebo podle CANCER GENOMICS & PROTEOMICS 10:19-26 (2013)

Interfázní buněčné jádro

Aby mohl chromatin v tomto období vykonávat své funkce, nemůže být zdaleka tak kondenzovaný jako mitotické chromozomy. Vysoká kondenzace chromatinu během mitózy vyhovuje bezpečné separaci chromozomů do dceřiných jader, neumožňuje však přístup proteinových komplexů k DNA, čímž brání průběhu transkripce, replikace a reparace. Po průchodu mitózou proto chromozomy silně dekondenzují, stále si však zachovávají svou identitu ve formě organizovaných **chromozomálních teritorií**. Stupeň dekondenzace chromatinu odpovídá jeho genetické aktivitě. V interfázním jádře obarveném barvivou DNA tak můžeme pozorovat „mozaiku“ různě silně obarvených oblastí. Zjednodušeně můžeme dekondenzované a málo obarvené domény identifikovat s transkripčně aktivním **euchromatinem** a kondenzované domény poskytující silný signál naopak s **heterochromatinem**, který jen zřídka obsahuje kódující sekvence nebo dokonce intenzivně transkribované geny. Heterochromatin zaplňuje především periferní oblast jádra podél jaderné membrány a kolem jadérka, euchromatin pak recipročně zejména části centrálnější. Prostor jádra, který není vyplněn chromatinem, nazýváme jako **interchromatinový prostor** a můžeme ho přirovnat k systému kanálků a lagun s proudící nukleoplazmou a nespočetnou řadou různých proteinů a molekul RNA. Vědci navrhuji mnoho modelů popisujících organizaci a chování chromatinu v interfázním jádře, z nichž každý vystihuje pouze určitá experimentální pozorování a organizačně-funkční aspekty. Problematika architektury buněčného jádra tak zůstává stále aktuální. Důležitou úlohu ve fungování buněčného jádra hraje nejen organizace ale i dynamika chromatinu v prostoru a čase.

³¹ **Karyogram** = uspořádaná vizualizace karyotypu s chromozomy seřazenými podle jejich velikosti a struktury.

³² **Ideogram** = grafické znázornění karyotypu, například podle pruhování G.

2.5.5 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) významně přispěla k poznání struktury a funkce chromozomů a často ji využíváme nejen v základním (radio)biologickém výzkumu ale také jako důležitý diagnostický nástroj v klinické praxi. Jedná se o molekulárně genetickou metodu, založenou na schopnosti cíleně připravených DNA sond hybridizovat s komplementárními sekvencemi DNA v lidském genomu (obr. 2.11). Fluorescenčně značenou sondu a molekuly DNA ve vzorku buněk nejprve denaturujeme za vzniku samostatných řetězců DNA. Přidáme-li nyní sondu ke vzorku, váže se ke komplementární oblasti chromatinu, ať už v interfázním buněčném jádře nebo na mitotických chromozomech. Sondy lze cílit na nejrůznější chromatinové nebo chromozomové struktury – specifické geny nebo i jejich části, centromery, telomery, chromozomální raménka, případně i celé chromozomy. Zkoumané vzorky zahrnují například kultivované buňky a nejrůznější klinický materiál – kostní dřev, periferní krev, moč, řezy tkání fixované ve formolu a zalité v parafinu, otisky tkání atd. Zásadní výhodou FISH je, že nám dovoluje kvalitativně i kvantitativně charakterizovat chromatin v intaktních buněčných jádrech. To znamená, že jsme pomocí fluorescenční mikroskopie a FISH schopni analyzovat nejen detailní změny struktury a počtu mitotických chromozomů, ale také architekturu a dynamiku chromatinu v interfázi. V interfázním jádře můžeme například studovat, jak se mění různé topologické a další strukturální parametry chromatinu (chromozomálních teritorií, genů apod.) v závislosti na transkripci, replikaci, reparaci DNA, životních podmínkách buněk nebo jejich fyziologickém či patologickém stavu atd. FISH může proto kromě diagnostických výsledků poskytnout i neocenitelná data o vztahu mezi nejrůznějšími procesy v buněčném jádře, jejich mechanismem a stavem buňky. Dnes se FISH rutinně používá zejména v onkologické a genetické diagnostice, ale také v radiobiologii. Nabízí například řešení otázky, jak souvisí mechanismus tvorby chromozomálních aberací s fyzikálními parametry ionizujícího záření, strukturou chromatinu a architekturou interfázního buněčného jádra. FISH má mnoho technologických variací či aplikací, které se neustále rozvíjejí. **Imuno-FISH** kombinuje FISH s imunofluorescenčním značením proteinů, čímž poskytuje vhled do světa interakcí specifických oblastí genomu s různými proteiny, a tudíž i lepší porozumění jaderné architektuře a mechanismům vitálních procesů. Nedocenitelný význam mají pro radiobiologii metody mnohobarevné FISH (**mFISH**) a mnohobarevného pruhování chromozomů (**mBAND**), které bezprecedentně zdokonalují analýzu strukturních i numerických aberací chromozomů. Při mFISH (a také **spektrálním karyotypováním, SKY**) vizualizujeme každý

pár homologických mitotických chromozomů nebo jejich interfázních teritorií jiným fluorochromem (nebo jejich kombinací). Můžeme tak snadno identifikovat a kvantifikovat nejrůznější, byť i velmi komplexní výměny chromatinu mezi chromozomy. Mnohobarevné pruhování pak představuje obdobu mFISH, sondy jsou však navrženy tak, aby namísto barvení jednotlivých chromozomů detailně napruhovaly konkrétní chromozom – lze tak odhalit i drobné intrachromozomální přestavby. Technologický zlom by mohla přinést tzv. **COMBO-FISH** (Combinatorial Oligo FISH), jež v současné době podléhá intenzivnímu rozvoji. Namísto dlouhých DNA sond pracuje se soubory krátkých oligonukleotidů nebo fragmentů PNA (peptidová nukleová kyselina), které za určitých okolností hybridizují s DNA i bez nutnosti její denaturace (např. pomocí tzv. Hoogsteenova párování bází). Díky tomu a vzhledem ke své malé velikosti nenarušují COMBO-FISH sondy strukturu chromatinu tak, jak se tomu děje při běžné FISH. COMBO-FISH (a případně Immuno-COMBO-FISH) je navíc dobře kompatibilní se super-rozlišovací mikroskopií a v budoucnu by tak mohla přinést mnohem detailnější informaci o struktuře chromatinu. Svatým grálem buněčné biologie je pak možnost vizualizace specifických oblastí chromatinu v živých buňkách, což není na rozdíl od vitálního značení proteinů doposud možné. Tím, že se COMBO-FISH obejde bez denaturace, nezdá se nyní ani tento dříve utopický cíl nedosažitelný.

Obr. 2.11 Základní princip metody fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

2.6 Buněčný cyklus a dělení buněk

2.6.1 Buněčný cyklus

Během svého života prožívá buňka několik cyklicky se opakujících etap, lišících se stavem buňky a završených jejím rozdělením na buňky dceřiné. Celé této periodicky se opakující sekvenci buněčných stavů říkáme **buněčný cyklus** (obr. 2.12). Každá fáze buněčného cyklu má pro život buňky svůj specifický a nenahraditelný význam. Buňky se smí proto rozdělit, jen když je k tomu důvod a průchod cyklem striktně regulují. Tato přísná kontrola zajišťuje, aby k dělení docházelo pouze tehdy, obdrželi-li k tomu buňka příslušné signály ze svého nitra i okolní tkáně. Pro postup do další životní fáze pak musí buňka splnit i řadu dalších podmínek, například nesmí obsahovat poškozenou DNA. Vše ověřují tzv. **kontrolní body** (cell cycle checkpoints), které se vyskytují na konci každé fáze buněčného cyklu a někdy i v jejich průběhu. Prostřednictvím aktivace kontrolních bodů se buňka snaží vyhnout nadměrné proliferaci, genomické nestabilitě a nádorové transformaci. Jeden buněčný cyklus můžeme tedy definovat jako koordinovanou a přísně regulovanou souslednost buněčných procesů

probíhající v buňce od momentu jejího zrodu do vzniku potomstva, přičemž délka cyklu se výrazně liší podle typu buněk a podmínek prostředí. Některé buňky se nedělí prakticky vůbec (nervové a svalové), jiné jednou za rok (např. jaterní) a další i několikrát denně (např. výstelky střev či některé prekurzorové buňky v kostní dřeni).

Proces buněčné proliferace (cytokineze) je bezpodmínečně spojený se zdvojením jádra.

Období buněčného cyklu, ve které se jádro dělí, označujeme jako **M fázi** (mitóza nebo meióza), periodu mezi M fázemi potom jako **interfázi**. Interfáze zaplňuje asi 90 % celého buněčného cyklu a pozorujeme během ní několik funkčních etap – fázi **G₀** (anglicky gap), presyntetickou fázi **G₁**, syntetickou fázi **S** (synthetic) a postsyntetickou fázi **G₂**. Během presyntetické (jinak též postmitotické) **fáze G₁** se zdvojuje buněčná hmota a probíhá intenzivní syntéza RNA a proteinů (mj. histonů). Chromozomy se zatím sestávají pouze z jedné chromatidy a buňka se připravuje na replikaci jaderné DNA v navazující S fázi. **G₁** fáze reprezentuje nejdelší a nejvariabilnější období cyklu. V **S fázi** se množství DNA v buňce zdvojnásobí, takže každý chromozom od tohoto okamžiku tvoří dvě homologické sesterské chromatidy. Proběhne-li replikace DNA úspěšně až do konce, vstupuje buňka do **fáze G₂**.

Tuto fázi, zvanou též jako premitotická, charakterizuje syntéza proteinů potřebných pro sestavení mitotického aparátu a zdvojení počtu buněčných organel. Nyní je buňka připravena k rozdělení a postupuje z interfáze do mitózy či meiózy. Nemají-li se buňky dále dělit, přecházejí do **fáze G₀** (obr. 2.12), kde setrvávají v tzv. stavu **kviescence** (klid, odpočinek).

Z **G₀** mohou opět vystoupit a začít se dělit, obdrží-li k tomu patřičné stimuly. Zastavené v **G₀** fázi nalézáme různé diferencované buňky, například buňky nervové a lymfocyty.

O urychlení, zpomalení, či úplném zastavení buněčného cyklu rozhodují tři hlavní kontrolní body, které řídí celá řada faktorů. Klíčovou úlohu hrají **cykliny**, **cyklin-dependentní kinázy** (CDK, protienkinázy vyžadující cykliny jako katalytickou podjednotku) a **inhibitory CDK kináz**. **První kontrolní bod** buněčného cyklu se nachází na přelomu fází **G₁** a **S** (**G₁/S checkpoint**), kdy buňka čeká na potřebné mitogenní signály. Pokud tyto signály nedostane, přechází do fáze **G₀**. V opačném případě pokračuje do **S** fáze, čímž je již předurčena k dokončení buněčného cyklu nezávisle na další přítomnosti růstových faktorů. Rozhodnutí o průchodnosti kontrolního bodu **G₁/S** závisí hlavně na kináze **CDK4/6**, cyklinu **D1**, a proteinech z rodin **p16** a **p21**, které fungují jako inhibitory **CDK kináz**. Komplex **CDK4/6** s cyklinem **D1** zvyšuje expresi cyklinu **E**, který posléze interaguje s **CDK2** a otvírá dveře do **S** fáze. **Druhý regulační uzel** leží mezi fázemi **G₂** a **M** (**G₂/M checkpoint**) a kontroluje stav DNA po replikaci. Buňka před vstupem do mitózy ověřuje, zda během replikace nevznikly v DNA chyby a zda její duplikace proběhla kompletně. Není-li DNA poškozena, může buňka

přejít do mitózy nebo meiózy (kap. 2.6.2), jinak musí být nejprve opravena. Rozhodují slovo v iniciaci M fáze má defosforylace komplexů cyklinů B s kinázou CDK1. **Poslední kontrolní bod** střeží přechod z fáze M do fáze G₁ (**M checkpoint** nebo **spindle-assembly checkpoint**) a na konci metafáze ověřuje správné připojení chromozomů k dělicímu vřeténku, aby mohlo dojít k jejich správné separaci. Segregační proces pak zahrnuje celou sérii molekulárních dějů, odstartovanou rozkladem cyklinu B.

Z hlediska buněčné odpovědi na ozáření musíme ještě zmínit, že buňky s poškozenou DNA mohou zastavit buněčný cyklus v G₁, S nebo G₂ fázi. Léze v DNA aktivují protein p53, který následně stimuluje expresi proteinu p21 (WAF1/Cip1) a jeho prostřednictvím inhibuje komplexy cyklinů s CDK kinázami (CDK2, CDK1 a CDK4/6). Tím p53 navozuje blok buněčného cyklu v příslušném kontrolním bodě a poskytuje buňce potřebný čas k reparaci vzniklých DNA lézí či spuštění apoptózy, je-li poškození neopravitelné. Kontrolní body buněčného cyklu jsou často nefunkční u maligně pozměněných buněk, a stejně tak i reparační procesy DNA. Tyto poruchy vedou k nekontrolovanému dělení nádorových buněk a jejich genomické nestabilitě, zároveň je ale činí více citlivými k činidlům poškozujícím DNA, včetně ionizujícího záření. Toho využívá chemoterapie i radioterapie nádorových onemocnění.

Obr. 2.12 Jednotlivé fáze buněčného cyklu a jeho kontrolní body

2.6.2 Dělení buněk

Mitóza

Mitózou rozumíme dělení eukaryotických somatických buněk, při kterém z jedné buňky mateřské vzejdou dvě buňky dceřiné s diploidním genomem a stejnou genetickou výbavou, jakou měla buňka rodičovská. V průběhu mitózy rozlišujeme čtyři fáze (obr. 2.13).

V **profázi** dochází ke kondenzaci a zkracování chromozomů. Zároveň se mezi dvěma centrozomy na opačných pólech buňky vytváří dělicí vřeténko a zaniká jadérko společně s jaderným obalem (prometafáze). Během **metafáze** se zdvojené chromozomy rovnají do ekvatoriální roviny (obr. 2.13, rozdíl proti meióze obr. 2.14) a směřují centromerami do středu vřeténka. Formuje se seskupení tvaru hvězdy, monoaster. **Anafázi** zahajuje rozestup chromatid, takže lze již odlišit dvě sady chromozomů připomínající dvojistou hvězdu (diaster). Poté chromozomy dále putují směrem k opačným pólům dělicího vřeténka, kterých dosáhnou v **telofázi**. Chromozomy soustředěné kolem opačných pólů se despiralizují a hydratují (dekondenzují), zároveň se obnovuje jadérko. Splýváním váček endoplazmatického retikula

vzniká jaderná membrána, postupně oddělující nová jádra od cytoplazmy. Posledním krokem je vlastní **cytokineze**, v jejímž průběhu se cytoplazma postupně zaškrcuje kontraktilním prstencem (aktin a myozin), dokud nedojde k úplné separaci dceřiných buněk.

Obr. 2.13 Mitóza a její fáze

Meióza

Meióza, neboli **redukční dělení**, ve své podstatě spojuje dvě na sebe navazující mitózy.

Během **prvního (heterotypického) dělení** se na rozdíl od mitózy do dceřiných buněk nerozchází sesterské chromatidy jednotlivých chromozomů, nýbrž celé homologické chromozomy. Dceřiné buňky tudíž neobsahují vzájemně ekvivalentní genetickou informaci v podobě mateřských a otcovských chromatid od každého chromozomu, ale vzájemně opačné sady homologických chromozomů. Jelikož k separaci homologů dochází náhodně, může v případě člověka jedna dceřiná buňka obsahovat například 10 chromozomů pocházejících od matky a 13 od otce, zatímco u druhé dceřiné buňky tomu bude logicky naopak.

Při **druhém (homotypickém) dělení** už vše probíhá stejně jako u mitózy a do dceřiných buněk se přesune vždy jedna chromatida každého z chromozomů. Díky výše popsaným procesům se redukuje počet chromozomů na haploidní sadu, a meióza tak představuje způsob buněčného dělení, kterým jsou produkovány pohlavní buňky (**gamety**). Meióza proto umožňuje pohlavní rozmnožování založené na splynutí pohlavních buněk rodičů v diploidní zygoty.

Z uvedeného plyne, že se při meióze rekombinují otcovské a mateřské dědičné vlohy prostřednictvím segregace homologických chromozomů. Párové alely na homologických chromozomech se od sebe oddělí, a každá gameta vlastní pouze alelu mateřského nebo otcovského původu. Ani promixování otcovských a mateřských chromozomů samo o sobě však nedokáže zajistit takovou genetickou variabilitu gamet, jakou skutečně pozorujeme. Pokud by mitóza probíhala jen tak, jak jsme si popsali, produkovali by se při ní 4 gamety, z nichž by však dvě a dvě byly stejné. Navíc by se konkrétní sestava alel genů nacházejících se na jednom chromozomu dědila vždy beze změny jako celek. Ke genetické rozmanitosti gamet nicméně přispívá i tzv. **crossing-over**, ke kterému dochází během párování homologických chromozomů ještě před prvním meiotickým dělením. Při crossing-overu spolu **homology rekombinují**, neboli si vzájemně vyměňují náhodné úseky chromatinu. Ve výsledku obsahuje každá z chromatid jinou kombinaci fragmentů původně čistě mateřského a otcovského chromozomu. Po proběhnutí crossing-overu se tedy geneticky liší i sesterské

chromatidy jednoho chromozomu, takže jejich separací při druhém meiotickém dělení vznikají čtyři unikátní gamety s novými kombinacemi alel.

Obr. 2.14 Srovnání mitotického (A) a meiotického (B) dělení buněk

V průběhu meiózy můžeme během prvního i druhého dělení identifikovat specifická stádia jako v mitóze. Na rozdíl od mitózy se však během první profáze vzájemně párují homologické chromozomy, které se následně vyrovnávají do ekvatoriální roviny proti sobě. K dělicím vřeténkům na opačných koncích buňky se nepojí jednotlivé chromatidy nýbrž celé homologní chromozomy. Profáze prvního dělení se ještě dělí na **leptotene** (chromozomy začínají kondenzovat), **zygotene** (kondenzace pokračuje, homology vytvářejí synapse – synaptonemální komplex), **pachytene** (mj. probíhá crossing-over), **diplotene** (homology se oddělují, překřížená místa jsou patrná jako tzv. **chiazmata**) a **diakinezi** (homology se rozcházejí, dochází k terminaci chiazmat jejich přesunem na konce chromozomů a rozpadá se jaderná membrána).

2.7 Buněčná smrt – apoptóza

Vzhledem k důležitosti z hlediska radiobiologie zmiňme na závěr našeho povídání o buňce ještě dva základní způsoby, jimiž buňka zaniká – apoptózu a nekrózu (autofagii zde vzhledem k omezenému prostoru, přestože neoprávněně, opomíjíme). Staří Řekové používali slovo *apoptosis* pro podzimní padání listů ze stromu, v biologii tak proto trochu metaforicky označujeme proces programované buněčné smrti. Při **apoptóze** umírá konkrétní buňka vlivem působení složité kaskády proteolytických enzymů, kaspáz³³, aniž by došlo k poškození okolních buněk. Apoptóza představuje aktivní proces spojený s expresí specifických genů a spotřebou ATP. Proto pro apoptózu používáme často i termín buněčná sebevražda. V každém případě se jedná o postupný, vícestupňově řízený proces. Signály pro apoptózu vycházejí z buňky samotné nebo z jejího okolí, například od imunitního systému. V ozářených buňkách je apoptóza iniciována zejména přítomností neopravených nebo neopravitelných lézí DNA. Impulz ke spuštění apoptózy může přijít přes tzv. **receptory smrti** situované v cytoplazmatické membráně (**vnější dráha**) nebo z mitochondrií (**vnitřní dráha**). Na apoptickém signalizování se ale podílejí i jiné organely – endoplazmatické retikulum (uvolnění Ca^{2+}), lyzozomy (uvolnění lytických enzymů) a samozřejmě buněčné jádro

³³ Kaspázy = anglicky Caspases – Cysteine ASpartate ProteASES nebo též Cytosolic ASpartate-Specific cystein Proteases.

(aktivace p53, kyslíkové radikály, proteinkinázy). S ohledem na poškození DNA hraje zásadní roli **protein p53**, který považujeme za hlavního **strážce buněčného genomu**. Není-li s DNA vše v pořádku, zastaví protein p53 buněčný cyklus, čímž poskytne čas k její opravě. Pokud však vyhodnotí poškození jako příliš závažné, iniciuje transkripci proapoptických proteinů. Tyto proteiny ve spolupráci s dalšími zmíněnými nitrobuněčnými signály (Ca^{2+} , volné radikály) naruší permeabilitu mitochondriálních membrán, což se projeví bobtnáním zvrásněné vnitřní membrány, rupturou mitochondrií a vylitím cytochromu C a dalších proapoptických proteinů (Diabolo, AIP) do cytoplazmy. Uvolněné mediátory následně aktivují kaspázy, které se v buňce doposud vyskytovaly jen jako neaktivní prokaspázy a které reprezentují vlastní vykonavatele apoptózy. V případě vnější cesty jsou prokaspázy konvertovány na kaspázy přímo aktivovanými receptory smrti. Kaspázy poté začínají štěpit stovky buněčných cílů, přičemž stimulují k činnosti i další destrukční enzymy. Tím apoptóza přechází do ireverzibilní fáze. Fragmentaci podléhá mj. jaderná DNA a cytoskelet (laminy), následkem čehož se apoptická buňka scvrkává a na jejím povrchu se tvoří bublinovité útvary (blebs). Zároveň se mění struktura cytoplazmatické membrány – na její vnější povrch se přemísťuje fosfatidylserin, jež představuje tzv. eat-me signál, označující apoptické buňky (a jejich zbytky) pro eliminaci imunitním systémem. V konečné fázi apoptózy se buňky rozpadají na apoptická tělíška, která jsou fagocytována makrofágy či okolními buňkami. S apoptózou se setkáváme v souvislosti s fyziologickými i patologickými procesy. Nezastupitelnou roli hraje v průběhu prenatálního vývoje člověka, při formování tkání a orgánových soustav. Konkrétním příkladem může být třeba oddělení jednotlivých prstů na ruce a nohy. Apoptózou se organismus zbavuje mj. buněk zbavených kontaktu s ostatními buňkami, infikovaných buněk a buněk nádorových. Nádorové buňky však často získávají schopnost apoptóze uniknout.

Alternativně mohou ozářené buňky zmírat **nekrózou**, ke které dochází v důsledku působení vnějších faktorů na buňku, třeba vlivem infekce nebo mechanického či chemického poškození. Při nekróze se na rozdíl od apoptózy objem buňky zvětšuje, praská cytoplazmatická membrána a vnitřní obsah buňky se vylévá do okolí. Nekróza proto obvykle vede k rozvoji zánětu. Nekrózou umírají například buňky vystavené vysokým dávkám ionizujícího záření, které kromě DNA poškodí závažným způsobem i proteiny, membrány a buněčné organely.

Základní literatura

1. SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita, 2017. ISBN 978-80-210-8613-5.
2. ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
3. ROSYPAL, S. et al. *Úvod do molekulární biologie. Díl první*. Brno: Stanislav Rosypal, 1998. ISBN 80-902562-0-1.
4. ROSYPAL, S. et al. *Úvod do molekulární biologie. Díl druhý*. Brno: Stanislav Rosypal, 1999. ISBN 80-902562-1-X.
5. ROSYPAL, S. et al. *Úvod do molekulární biologie. Díl třetí*. Brno: Stanislav Rosypal, 2000. ISBN 80-902562-2-8.
6. ROSYPAL, S. et al. *Úvod do molekulární biologie. Díl čtvrtý*. Brno: Stanislav Rosypal, 2002. ISBN 80-902562-4-4.
7. ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
8. CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B. *Biologie*. Brno: Computer Press, 2006. ISBN 80-251-1178-4.
9. VOET, D.; VOETOVÁ, J. G. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1990. ISBN 80-85605-44-9.
10. GARCÍA GÓMEZ-TEJEDOR, G., FUSS, M. *Radiation damage in biomolecular systems*. London New York, Springer Dordrecht Heidelberg, 2012. ISBN 978-94-007-2563-5.

3 Účinky ionizujícího záření na subcelulární a celulární úrovni, mechanismy reparace DNA

3.1 Interakce ionizujícího záření s biologickými systémy

Interakce buněk s ionizujícím zářením začíná stejnými fyzikálními procesy a řídí se 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 organizmů je až jejich biochemická a biologická odpověď, na kterou se v této kapitole zaměříme především.

Již samotný název ionizujícího záření napovídá, že jde o záření, jehož kvanta mají dostatečnou energii k ionizaci atomů, tj. odtržení elektronů z jejich elektronového obalu. Ve vodném prostředí (cytoplazma) je k tomuto zapotřebí minimálně 33 eV, což odpovídá vlnovým délkám kratším³⁴, než přísluší ultrafialovému záření (přibližně <40 nm).

Z biofyzikálního hlediska stojí za to zdůraznit, že ve srovnání s jinými formami energie je energie ionizujícího záření nezbytná k poškození či dokonce usmrcení člověka relativně velmi malá. Například při celotělové expozici 10 Gy (10 J.kg^{-1}) záření gama, tj. dávce, která již vyvolává smrtelnou formu nemoci z ozáření, předá záření člověku o hmotnosti 80 kg pouze 800 J. Přitom třeba k ohřátí 1 l vody o 1 °C potřebujeme 4180 J, tj. energii více než 4x větší. Zmíněná dávka 10 Gy u člověka zvýší tělesnou teplotu pouze o 0,002 °C, přesto však vyvolá smrt. Biologickou účinnost ionizujícího záření proto nemůžeme vysvětlit pouze množstvím předané energie. Avšak ani zohlednění charakteru energetického přenosu, tj. koncentrovaného uvolnění vysokoenergetických kvant v malém objemu buňky, neposkytuje úplné ozřejnění problému. To vedlo k postulování tzv. **terčové teorie**, jež počítá s existencí obzvláště citlivého terče uvnitř buňky, jehož zasažení je pro buňku kritické a potenciálně vede k smrti celé buňky. Následně se podařilo tento terč identifikovat s buněčným jádrem, respektive určitými lokusy jaderné DNA.

Z hlediska podstaty probíhajících dějů lze interakce záření s buňkou rozdělit do několika základních fází³⁵. Iniciální **fyzikální stádium** trvá jen velmi krátce, od 10^{-18} do 10^{-14} s, a

³⁴ Vztah mezi energií fotonu a vlnovou délkou popisuje rovnice $E = h \cdot f = h \cdot c / \lambda$; E = energie fotonu, f = frekvence, h = Planckova konstanta a λ = vlnová délka.

³⁵ Dále nastíněné dělení procesů v ozářených buňkách je nicméně pouze ilustrativní a do značné míry závislé na zdrojové literatuře. Totéž platí i o dobách trvání jednotlivých fází.

můžeme ho charakterizovat kaskádami ionizací. Primární záření a následně i elektrony vyražené z atomů primárním zářením³⁶ ionizují a excitují velké množství dalších atomů. Absorpce 1 Gy záření dokáže vyvolat řádově až 10^5 ionizací v každé buňce. Jinými slovy, fyzikální fáze představuje období, kdy atomy a molekuly biologického systému absorbují energii záření. Následně se rozvíjejí procesy fyzikálně-chemické (10^{-14} až 10^{-10} s), chemické, biochemické (od tisícín sekund do několika sekund) a biologické (sekundy až desetiletí).

Fyzikálně-chemické stádium vyplňují vzájemné interakce mezi vytvořenými ionty a okolními molekulami za produkce volných radikálů a dalších reaktivních agens, například peroxidu vodíku. Během **chemického a biochemického stádia** pak mezi sebou reagují přítomné reaktivní radikály, např. z H^\bullet a OH^\bullet vzniká za přítomnosti kyslíku O_2 , H_2 a H_2O_2 . Vzájemnou rekombinací radikálů některé z nich zanikají (H^\bullet a OH^\bullet opět tvoří vodu), nezrekombinové radikály a další reaktivní molekuly však napadají okolní biomolekuly, ve kterých generují nejrůznější léze, popsané v dalších statích této kapitoly. Na biochemické stádium plynule navazuje **stádium biologické**. Poškozené biomolekuly vyvolávají patofyziologické změny ve fungování buněk, které v závislosti na rozsahu poškození bezprostředně umírají (okamžitá interfázni smrt), nebo přežijí a aktivují komplexní odpověď buňky na ozáření. Cílem této odpovědi je pozastavit buněčný cyklus a poskytnout buňce čas pro opravu DNA a případně i dalších buněčných struktur (membrán apod.). Pokud se však léze DNA nepodaří odstranit, přecházejí poškozené buňky do senescence nebo iniciují apoptické sebevražedné pochody³⁷, aby předešly (u mnohobuněčných organismů) rozšíření genetického poškození do potomstva. Alternativně mohou buňky vstoupit do mitózy s nedoopravenou DNA a zemřít následkem mitotické katastrofy (kap 3.4.4). Smrt buněk vystavených vysokým dávkám ionizujícího záření a genetické změny buněk přežívajících nižší expozice se následně různým způsobem (kap 3.4.1 a 3.4.2) projevují na úrovni tkání, orgánů a posléze i celého organismu. Z pohledu člověka se tak biologické stádium postupně transformuje do **stádia medicínského**. Zdravotní následky ozáření se projevují jako akutní ale i pozdní, přičemž doba latence nezdřídka trvá až desítky let.

Přímý a nepřímý účinek ionizujícího záření

S výjimkou neutronů nemůže ionizující záření pronikat do atomových jader. Fotony, elektrony, protony a těžší elektricky nabitě částice proto narušují v zasaženém atomu pouze

³⁶ respektive protony a fragmenty buněčných jader v případě neutronového záření

³⁷ Apoptóza = geneticky naprogramovaná buněčná smrt u mnohobuněčných organismů. Na rozdíl od nekrózy nevyvolává ve tkáni zánět.

jeho elektronový obal. Tím ionizují a destabilizují molekuly. Záření ionizuje jednak biomolekuly samotné, jednak prostředí, ve kterém se vyskytují. Pro biologické systémy je tímto prostředím voda, z níž se převážně skládají. Ionizuje-li záření vlastní biomolekuly a přímo je poškozuje, mluvíme o tzv. **přímém účinku ionizujícího záření**. Biomolekuly mohou být v tomto případě ionizovány samotným zářením primárním nebo sekundárními produkty jeho interakce s hmotou, zejména tzv. delta elektrony vyraženými z okolních molekul. Přijetí kvanta záření biomolekulou a její ionizace vede následně k chemické změně a případně i ovlivnění biologické aktivity této biomolekuly. Přímý účinek ionizujícího záření (**Obr. 3.1**) tak ze své podstaty představuje fyzikální, případně fyzikálně-chemický proces, při kterém ionizace a excitace narušují chemické vazby mezi atomy v biomolekulách důležitých buněčných komponent.

Nepřímý účinek záření spočívá v ionizaci média a poškození biomolekul až sekundárně, prostřednictvím volných radikálů a dalších reaktivních agens generovaných radiolýzou vody (H^\bullet , OH^\bullet , H^+ , OH^- , H_2O_2 , e_{aq}^- atd.) (**Obr. 3.2**). Při nepřímém účinku (**Obr. 3.1**) jde tedy o narušování biomolekul chemickou cestou. Vzhledem ke krátké životnosti volných radikálů (cca. 10^{-10} s) mohou být nebezpečné pouze ty, které se zrodí v bezprostřední blízkosti (2–3 nm) potenciálně atakované biomolekuly. Nacházejí-li se buňky v okysličeném prostředí, tvoří se v nich za jinak stejných podmínek i některé další radikály a radikály obecně vznikají ve větším množství, zejména pak HO_2^\bullet a $\text{O}_2^{\bullet-}$. ($\text{B}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{BO}_2^\bullet$; $e^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\bullet-}$; $\text{H}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{O}_2^{\bullet-}$). Tento jev nazýváme jako **kyslíkový efekt**. Popsaný fenomén je významný např. v radioterapii, jelikož hypoxické nádory odpovídají na léčbu hůře, než nádory dobře prokrvené a tudíž prokysličené.

Obr. 3.1 Přímý (nahore) a nepřímý (dole) efekt ionizujícího záření

Příspěvek přímého a nepřímého efektu k poškození biomolekul se významně liší v závislosti na typu ionizujícího záření. Zatímco ionizující záření gama nebo X (s malou hustotou ionizace, tj. nízkým lineárním přenosem energie, LET³⁸) narušuje funkci biomolekul především prostřednictvím nepřímého efektu, hustě ionizující záření (např. urychlené ionty s vysokým LET) účinkuje z velké části přímo. Tento rozdíl vyplývá z různého charakteru depozice energie zářením. Experimentálně lze příspěvek přímého a nepřímého efektu k radiobiologickému účinku ionizujícího záření stanovit například porovnáním přežívání

³⁸ LET, lineární přenos energie – střední energie předaná látce zářením na jednotkové dráze letu částice; základní jednotkou je $\text{J}\cdot\text{m}^{-1}$, v radiobiologii se ale častěji setkáme s praktičtější jednotkou $\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$.

buněk ozářených v přítomnosti a nepřítomnosti dimethylsulfoxidu (DMSO), který funguje jako vychytávač volných radikálů. Pro záření s nízkým LET (gama a X) bylo prokázáno, že přibližně 60 % dvouřetězcových zlomů DNA vzniká prostřednictvím nepřímého efektu. Pro hustě ionizující záření tato hodnota výrazně klesá, např. na 32 % pro urychlené ionty s LET = 2106 keV/μm.

Obr 3.2 A: Produkce kyslíkových radikálů (ROS) a dalších reaktivních produktů radiolýzy vody v ozářených buňkách.

B: Přispění kyslíkového efektu k fixaci poškození DNA.

Modifikováno podle: Pouget et al. *Antioxidants & Redox Signaling*, (2018), DOI:10.1089/ars.2017.7267 a Bénédicte & Pierre. *Frontiers in pharmacology* (2012), DOI 10.3389/fphar.2012.00094.

3.2 Radiační poškození biomolekul

Ionizujícím zářením mohou být atakovány všechny typy biomolekul. Z hlediska narušení funkcí buňky má zásadní význam poškození proteinů, lipidů, RNA a především DNA.

Pozměněná funkce biomolekul se projeví ve fungování vyšších biologických organizačních celků a nakonec i stavu celého organismu. Na buněčné úrovni se uvedené poruchy manifestují okamžitou, mitotickou nebo apoptickou smrtí, přechodem buňky do senescence³⁹, konverzí buňky na buňku nádorovou nebo různými fyziologickými dysfunkcemi.

3.2.1 Poškození proteinů

Proteiny jsou výkonné a stavební složky buňky participující na zajišťování všech jejích činností. Patří mezi ně důležité signální molekuly, nejrůznější enzymy, strukturní proteiny, transportní proteiny membrán atd. Poškození proteinů může mít proto pro buňku fatální dopad. Zdá se ale, že se projevuje až při extrémním ozáření, jelikož většinu typů proteinů obsahuje buňka ve velkém množství a mnohé z nich odolávají značným dávkám záření. Například k inaktivaci izolovaných restričních enzymů⁴⁰ *HindIII* a *PvuII* dochází až po jejich vystavení několika stům Gy záření gama. Inaktivační dávky jednotlivých proteinů se nicméně značně liší. Patrně mohou být i výrazně nižší, což kromě struktury proteinu záleží i na mnoha faktorech prostředí. Stále se však pohybujeme v oblasti natolik vysokých expozičních, že už i

³⁹ Senescence = stav, při němž se buňky již nemohou dále dělit a patrně permanentně zastavují svůj buněčný cyklus, nicméně nedochází k jejich smrti. Buňka ještě určitý čas vykonává některé své funkce, je však již fyziologicky pozměněná. Senescence, podobně jako apoptóza, brání přerodu normální buňky v nádorovou.

⁴⁰ Restriční enzymy = enzymy štěpící DNA prostřednictvím přerušování fosfodiesterových vazeb obou řetězců; exonukleázy štěpí DNA postupně od konců řetězce, endonukleázy potom na specificky rozpoznávaných sekvencích „uvnitř“ řetězce.

mnohem menší dávky naprosto zdecimují DNA a způsobí smrt většiny buněk⁴¹. Při neletálních dávkách naopak zůstane v buňce vždy dostatek nepoškozených molekul proteinů na to, aby zajistily její přežití kritické fáze po ozáření. Nebyla-li přitom trvale poškozena DNA, buňka později nefunkční proteiny odstraní (hydrolyzou proteolytickými enzymy v proteazomech) a nahradí je novou syntézou bez následků pro její budoucí život. Tímto se poškození proteinů zásadně liší od poškození DNA, které se přenáší, není-li správně opraveno, do budoucích generací buněk a ovlivňuje jejich stav a činnost.

Řada recentních studií provedených zejména na prokaryotických organizmech lišících se svou radiosenzitivitou nicméně naznačuje, že význam radiačního poškození proteinů možná podceňujeme. Ozáření různých prokaryot stejnou dávkou záření totiž způsobovalo vzájemně podobný počet kritických změn v DNA těchto organismů, přesto se jejich přežívání významně lišilo, a naopak korelovalo se schopností buněk chránit své proteiny před oxidativní újmou. Toto zjištění patrně znamená, že vysoký antioxidační potenciál některých buněk dokáže stabilizovat funkce důležitých proteinů. Pravděpodobnými kandidáty se v tomto směru jeví zejména nízko početné regulační a reparační proteiny, které se podílejí na řízení buněčných procesů a opravě molekuly DNA po ozáření. Jednou tak možná budeme muset úloze poškození proteinů přisoudit zásadnější význam už i při relativně nízkých dávkách (od cca 0,5 Gy).

Proteiny narušuje jak záření samotné, tak zejména ionty OH^- pocházející z radiolýzy vody. Ty mají schopnost odtrhnout vodík z peptidového řetězce, vázat se na aromatické zbytky aminokyselin a reagovat s atomy síry. Následkem reakcí s ionty OH^- mohou proteiny změnit svou konformaci, což obvykle vede ke změně nebo ztrátě jejich funkce. V závažnějších případech lze pozorovat až fragmentaci a denaturaci proteinů, projevující se jejich agregací díky zvýšené hydrofobii. Reakcemi s radikály se navíc „aktivují“ i vlastní proteiny – stávají se z nich proteinové radikály, které peroxidačně poškozují další proteiny a biomolekuly a interagují s nimi za vzniku produktů se zcela pozměněnými vlastnostmi. Velmi nebezpečné jsou zejména proteinové adukty na molekule DNA, které brání její replikaci, transkripci i reparaci. Radiační poškození proteinů tak může ovlivňovat nejen buněčné procesy zprostředkované samotnými proteiny, ale i dalšími typy biomolekul (zejména DNA).

⁴¹ Některé buňky snášejí opravdu obrovské dávky záření; např. *Deinococcus radiodurans* toleruje dávky >12 000 Gy, tedy zhruba 3000x více než většina obratlovců.

3.2.2 Poškození lipidů

Lipidy představují základní stavební jednotky všech buněčných membrán. Mají proto zásadní význam v prostorovém definování buňky samotné a kompartmentalizaci buněčných organel a procesů. Lipidy vymezují hranice buňky a zároveň brání pronikání nežádoucích substancí do jejího nitra. Spolu s membránovými proteiny regulují transmembránový transport iontů a mnoha dalších látek a stabilizují osmotické gradienty. Tím udržují nejen buněčnou homeostázi, ale také zajišťují správnou komunikaci s okolním prostředím a buňkami ve tkáni. Membrány hrají zásadní roli také v energetickém metabolismu buňky a prostřednictvím membránových receptorů v regulaci buněčných biochemických drah.

Obdobně jako všechny ostatní biomolekuly, také lipidy (mastné kyseliny) reprezentují cíle radikálového poškození. Opět se na něm podílí zejména radikál OH^\bullet . Odtržením elektronu z mastných kyselin, přednostně z dvojných vazeb, vznikají jejich nestabilní radikály, které posléze s kyslíkem tvoří radikály peroxylové. Reakcí těchto radikálů s dalšími mastnými kyselinami se rozbíhá řetězová reakce, při které se další a další lipidy mění v lipidové peroxidy nebo cyklické peroxidy mastných kyselin, přičemž se zároveň uvolňují nové radikály ženoucí reakci kupředu. Uvedeným způsobem může dojít k závažnému narušení struktury membrány a snížení mobility membránových proteinů, což se následně projeví poruchou její selektivní permeability doprovázené deregulací příjmu iontů a látek z okolí (osmóza, membránové napětí, přenos vzruchů atd.) nebo i únikem vnitrobuněčného obsahu (např. enzymů) do prostředí. Tento stav je pro buňku potenciálně fatální, například vyústí-li v disbalanci kalciových iontů. Po expozici vysokým dávkám záření tak můžeme očekávat totální kolaps buněčné homeostázi a okamžitou smrt buňky, menší poškození však dokáže buňka opravit.

3.2.3 Poškození RNA

Molekuly RNA zastávají v buňce nejrůznější efektorové a signalizační funkce. Obecně lze však dle základního dogmatu molekulární biologie říci, že zprostředkovávají (za přispění proteinů) expresi genetické informace, tj. její materializaci z podoby zakódované v sekvenci DNA do formy proteinů, následně vykonávajících buněčné funkce. Kromě toho vykazují různé malé RNA významné funkce regulační s ohledem na expresi genů. RNA má v principu stejnou molekulární stavbu (nikoli však prostorové uspořádání) jako DNA, s tím zásadním rozdílem, že ji tvoří pouze jedno vlákno, které se organizuje do složitých prostorových struktur. Díky ribóze ve své cukr-fosfátové páteři reaguje RNA s okolím mnohem snadněji než DNA. RNA tak může být poškozena obdobným způsobem jako DNA (viz níže), ovšem

s vyšším rizikem fragmentace. V RNA snadno vznikají jednořetězcové zlomy, které působí na integritu molekuly stejně jako v případě DNA mnohem obtížněji indukovatelné zlomy dvouřetězcové. Významná je i oxidativní eroze RNA vyvolaná volnými radikály.

Jelikož se molekuly RNA obvykle vyskytují ve větším počtu kopií a mají, na rozdíl od DNA, omezenou funkční životnost, mohou být (v případě zachování integrity DNA) znovu nasyntetizovány. Patrně existují i specifické mechanismy pro eliminaci defektních RNA. Dysfunkce určité frakce RNA molekul proto ovlivňuje buňku mnohem méně než genetické změny v DNA. Experimentální důkaz pro toto tvrzení plyne například z pozorování, že inkorporace radionuklidů do DNA usmrcovala buňky mnohem účinněji, než byl-li stejný radionuklid součástí molekul RNA. Některé studie nicméně spojují oxidativní poškození a zlomy RNA s poruchami syntézy proteinů v buňkách a následně rozvojem některých, zejména neurodegenerativních onemocnění. Radiačnímu poškození RNA však současná věda věnovala doposud jen málo pozornosti.

3.2.4 Poškození DNA

Specifické postavení jaderné DNA mezi biomolekulami a její poškození

U eukaryot⁴² se DNA vyskytuje v buněčném jádře, mitochondriích a u rostlin i v plastidech (např. chloroplastech). Jaderná DNA je nositelkou genetické informace, podle které se celá buňka vytváří a určuje i celkové chování buňky během jejího života. Na rozdíl od početných mimojaderných DNA a ostatních typů biomolekul existuje jaderná DNA jen ve dvou kopiích. Dojde-li tedy jednou k jejímu poškození bez včasné opravy, ztrácí se originální genetická informace navždy. Změna genetické informace může vést ke ztrátě funkce některých proteinů nebo expresi proteinů s funkcí pozměněnou, jak popisujeme níže. Jelikož se zdravotně uvedené poruchy obvykle projeví až po nakumulování určitého množství genetických změn (mutací⁴³), což někdy trvá i desítky let, představují defekty DNA pro buňku časovanou bombu. DNA navíc vykazuje citlivost i k nízkým dávkám ionizujícího záření. Z hlediska negativního působení záření na DNA proto neexistuje žádná prahová dávka, jejíž nepřekročení by vylučovalo zhoubný efekt. Ze všech možných biomolekul je proto poškození jaderné DNA nejkritičtější a může mít pro buňku i organismus trvalé a nebezpečné následky. A to i v případě, že buňka přežije akutní fázi po ozáření. Na druhou stranu nesmíme opomenout, že buňka disponuje efektivními reparačními mechanismy, které dokážou naprostou většinu poškození DNA včas a správně opravit.

⁴² Eukaryota = jaderné organizmy, tj. organizmy obsahující pravé jádro.

⁴³ Mutace = dědičně zafixované poškození DNA vedoucí ke změně genetické informace – genotypu buňky.

Kritické cíle DNA a následky jejich zasažení

Interakce záření s jaderným genomem⁴⁴ má náhodný charakter, a nelze tudíž předem říci, které geny a jak budou poškozeny. Počet lézí DNA určitého typu (jednořetězcových zlomů, dvouřetězcových zlomů atd.) proto v populaci buněk ozářených stejnou dávkou statisticky osciluje kolem určité průměrné hodnoty, liší se však distribuce těchto lézí v rámci genomu. Každá buňka má tudíž poškozené různé geny a čeká ji zcela jiný osud. Smrt nebo nádorová transformace buňky, potenciálně ohrožující celý organismus, nastává při nízkých dávkách pouze po alteraci funkce některých důležitých genů – kritických cílů.

Jako nejdůležitější příklad kritických cílů můžeme uvést tzv. **protoonkogeny**, tj. geny, jež se významným způsobem podílejí na stimulaci buněčného dělení. Aktivačními mutacemi se protoonkogeny⁴⁵ mění v tzv. **onkogeny**, jejichž činnost vede k neregulovanému dělení buňky. Onkogenní proteiny jsou totiž mnohem „pracovitější“ než původní protoonkogeny a stimulují buňku k neustálému dělení i v nepřítomnosti patřičných mitogenů. Nebezpečí mutací protoonkogenů navíc spočívá ve skutečnosti, že k vyvolání dramatické změny fenotypu⁴⁶ plně postačuje poškození už i jedné alely genu. Buněčný cyklus je totiž narušen i v situaci, kdy protein exprimovaný z druhé alely téhož genu funguje normálně.⁴⁷

Mezi kritické cíle radiačních mutací patří i další typy genů, zejména pak nádorové supresory (antionkogeny). Nádorově supresorové geny představují pravý opak protoonkogenů, jelikož brání nadměrnému dělení buněk. Riziko spojené s poškozením nádorových supresorů proto spočívá ve ztrátě jejich funkce. Jelikož i poloviční množství funkčního proteinu stále postačuje ke kontrole buněčného dělení, dochází k pozorovatelné poruše funkce mutovaného supresoru (na rozdíl od protoonkogenu) až po inaktivaci obou alel jeho genu. Jde o tzv. recesivní mutace. Druhá alela supresoru může být proto chápána jako jeho záložní kopie, podstatně prodlužující dobu správného fungování buněk v situaci, kdy DNA permanentně trpí nejrůznějšími vnitrobuněčnými i mimobuněčnými ataky. Přestože je v případě nádorových supresorů nutné inaktivovat obě alely, stále platí, že stačí poškození jediného genu k tomu, aby se buňka stala výrazně vulnerabilnější k nádorové transformaci.⁴⁸

⁴⁴ Jaderný genom = kompletní genetická informace obsažená v jaderné DNA.

⁴⁵ Protoonkogeny = geny, jejichž produkty pozitivně řídí různé aspekty buněčného dělení.

⁴⁶ Fenotyp = pozorovatelná manifestace genotypu.

⁴⁷ Mluvíme proto o tzv. dominantních mutacích.

⁴⁸ Analogií je např. porucha předních brzd automobilu – automobil sice stále zvládne zastavit pomocí brzd zadních, takže zdánlivě funguje jak má, stává se však potenciálně velmi nebezpečným. Jakákoliv další porucha brzdového systému již může mít nedožrnné důsledky vedoucí k havárii.

V případě solidních nádorů se onemocnění rozvíjí až po nakumulování určitého množství kritických změn DNA (klonální teorie). Někdy ale stačí už prvotní defekt k vyvolání úplné nádorové transformace buňky. Typickým příkladem jsou leukémie. Třeba u akutní promyelocytární leukémie (APL) dochází díky reciproké translokaci mezi geny PML a RARa (t(15;17)) k expresi fúzního proteinu PML/RARa, u chronické a akutní myeloidní leukémie (a některých dalších) vzniká následkem reciproké translokace mezi geny BCR a ABL (t(9;22)⁴⁹) fúzní protein BCR/ABL atd. Uvedené fúzní proteiny mají přitom již sami o sobě dostatečný potenciál k vyvolání rakoviny.

Celkově lze shrnout, že při zasažení kritických cílů v DNA hrozí i při nízkých dávkách rozvoje nádorového bujení, nezvládne-li buňka poškození správně a včas opravit. Postižení pohlavních buněk rodičů může vést k různým vrozeným vývojovým vadám u potomstva⁵⁰. Při expozici nízkým dávkám proto největší riziko pro organismus plyne z přenosu karcinogenních mutací do dalších generací buněk a jejich postupná kumulace. Negativní účinky jednotlivých dávek ionizujícího záření se díky tomu sčítají po celý život.

3.2.5 Poškození DNA na molekulární úrovni

Ionizující záření indukuje v DNA celou řadu lézí (**Obr. 3.3**), přičemž napadá všechny její komponenty, tj. baze, deoxyribózy i fosfátové skupiny. Následkem vytvořených poškození pak vyvolává všechny typy mutací, tj. mutace genové⁵¹, chromozomové⁵² i genomové⁵³, jak bude diskutováno později. DNA může být modifikována přímo absorpcí kvanta záření nebo nepřímo produkty radiolýzy vody, jak jsme si již objasnili dříve. Významnou úlohu u nepřímého účinku hraje zejména hydroxylový radikál OH•, který atakuje jak samotné baze, tak i cukernou komponentu DNA, deoxyribózu. Hydroxylový radikál se váže na dvojné vazby bází nebo z bází a deoxyribózy odebírá vodík. Přímým působením záření i radikálů se nejprve generují radikály ze samotných komponent DNA, které kaskádou následných reakcí poskytují, v závislosti na podmínkách prostředí, široké spektrum produktů měnících strukturně-funkční charakteristiky DNA.

⁴⁹ Takzvaný Filadelfský chromozom.

⁵⁰ U člověka je však výskyt radiačně vyvolaných vývojových vad oproti původním předpokladům překvapivě nízký.

⁵¹ Genové mutace = nukleotidové substituce a posunové mutace objevující se následkem delecí nebo inzercí jedné baze; vedou ke změnám kodonů DNA.

⁵² Chromozomové mutace = rozsáhlejší mutace DNA vznikající přeskupením genetického materiálu a projevující se pozorovatelnými strukturními přestavbami chromozomů.

⁵³ Genomové mutace = ztráty nebo zmnožení celých chromozomů nebo jejich sad.

Obr. 3.3 Různé typy radiačních lézí DNA

1. Modifikované baze

DNA se skládá z pyrimidinových (tymin, cytosin) a purinových (adenin, guanin) bází, přičemž k radiačnímu poškození vykazují citlivost oba tyto typy. V případě pyrimidinových bází preferují radikály OH^\bullet pro svůj atak dvojnou vazbu mezi uhlíky C5 a C6. Dalšími reakcemi s cytosinem nejčastěji vznikají cytosin glykol a 5,6-dyhydroxycytosin, a s thyminem pak thymin glykol (Tg, 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymin), 5-hydroxymethyluracil, 5-formyluracil a 5-hydroxy-5-methylhydantoin. Při reakcích s purinovými bazemi se OH^\bullet aduje do pozic C4, C5 nebo C8 u guaninu a C4 nebo C8 u adeninu za produkce hydroxylovaných cyklů v těchto pozicích. Mezi nejdůležitější produkty popsanych reakcí patří 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosin (8-oxodG) s jeho tautomerní formou 8-hydroxy-2-deoxyguanosinem (8-OHdG) a 8-hydroxyadenin. Modifikace 8-oxodG (8-OHdG) představuje nejvýznamnější marker oxidativního poškození bází, protože guanin ze všech bází nejsnadněji podléhá oxidaci. Kromě uvedeného náleží mezi významné procesy také deaminace bází – deaminací guaninu se tvoří xantin (X), adeninu hypoxanthin (HX) a cytosinu uracil (U).

Chemické modifikace v řadě případů ovlivňují tvorbu vodíkových můstků mezi bazemi a případně strukturu dvoušroubovice DNA. Následkem těchto změn se objevují chyby párování nukleotidů během replikace nebo její zablokování. Například guanosin změněný na 8-oxoG se páruje s adeninem (A) a nikoliv cytosinem (C) jako původní guanosin (viz příklady níže). Některé poškozené baze jsou navíc labilní a zejména v alkalickém prostředí mohou být konvertovány na abazická místa a zlomy řetězců DNA (viz níže).

Příklady mutagenese následkem radiační modifikace bází

A → HX; párování HX:C namísto A:T → záměna A:T za C:G v dalším replikačním cyklu

T → Tg; Tg nevede ke změně párování, způsobuje však distorzi dvoušroubovice DNA

C → U; párování U:A namísto C:G → záměna C:G za T:A

G → 8-oxoG; párování 8-oxoG:A namísto G:C → záměna G:C za T:A

G → X; párování stejně jako G

2. Abazická místa (AP sites)

Abazická, depurinová nebo depyrimidinová místa se objevují následkem přerušení glykosidické vazby mezi bazí a cukrfosfátovým řetězcem DNA. K depyrimidinaci a depurinaci dochází v důsledku chemických pochodů v ozářených buňkách, vlivem nestability glykosidické vazby u poškozených bazí a také v průběhu reparace bazí nebo i spontánně. Abazická místa mohou vyvolat kolaps replikačních vidlic, vést k inkorporaci nesprávných nukleotidů do DNA (bodové mutace) nebo být konvertována na složitější typy poškození – křížové vazby a jednořetězcové či dvouřetězcové zlomy DNA řetězců (viz níže).

3. Křížové vazby (cross-links) a adukty DNA

Přímou absorpcí energie záření a reakcemi s volnými radikály se v poškozené DNA generují mnohočetná reaktivní místa. Tato místa spolu potenciálně interagují za tvorby kovalentních vazeb a nelineárních propojení mezi bazemi, a to jak v rámci jednoho řetězce DNA, tak i mezi řetězci komplementárními. Purinové a pyrimidinové radikály napadají také aromatické aminokyseliny proteinů, čímž se tvoří proteinové adukty na DNA.

Křížové vazby mezi komplementárními řetězci DNA brání separaci řetězců při replikaci nebo transkripci a blokují průběh těchto procesů. Reparace křížových vazeb DNA pak potenciálně vede až k dvouřetězcovým zlomům, které reprezentují nejproblematictější radiační léze. Jedná se tedy o vysoce mutagenní a nebezpečné defekty. Řada chemoterapeutik využívá právě tohoto mechanismu poškození DNA k eradikaci nádorových buněk. Také ostatní zmíněné typy řetězcových vazeb a proteinové adukty na DNA představují překážku pro postupující replikační a transkripční vidlice. Proteinové adukty navíc znesnadňují přístup reparačních proteinů⁵⁴ k poškozenému místu na DNA, čímž komplikují své vlastní odstranění.

4. Jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy

Přerušením fosfodiesterové páteře vznikají v DNA jednořetězcové (SSB) nebo dvouřetězcové (DSB) zlomy. Dvouřetězcové zlomy se objevují tehdy, přeruší-li částice záření zároveň oba komplementární řetězce molekuly DNA (tedy následkem přímého účinku záření), nebo dojde-li k vytvoření dvou či více jednořetězcových zlomů v těsné vzájemné blízkosti nepřímým účinkem záření (tj. vlivem reaktivních radikálů). DSB jsou ze všech lézí DNA nejzávažnější, protože vedou ke kompletní desintegraci molekuly DNA, a představují tak značnou výzvu pro reparační systémy buňky. Ionizující záření přitom představuje jeden z nejefektivnějších induktorů DSB.

⁵⁴ zejména nukleotidové excizní reparace, NER

Odhaduje se, že 1 Gy záření gama v buňce vytvoří:

- 1000–2000 modifikovaných bazí;
- 500–1000 jednořetězcových zlomů;
- 25–50 dvouřetězcových zlomů.

3.3 Poškození sub-buněčných systémů

3.3.1 Poškození chromozomů

Lidské chromozomy a metody studia jejich poškození

U eukaryotických buněk se DNA nevyskytuje „nahá“, jako u prokaryot, nýbrž ve formě složitěho komplexu s histonovými a nehistonovými proteiny, zvaného chromatin. Detailně jsme strukturu chromatinu popsali v kapitole 2 o stavbě buňky. Pro účel následujícího textu však budiž zdůrazněno, že postupnou hierarchickou organizací chromatinu se formují chromozomy, které v mitóze dosahují maximálního stupně kondenzace a svého všeobecně známého tvaru. Mitotické chromozomy mohou být barveny běžnými barvivami DNA (cytogenetické barvení) a jejich hrubá struktura pak studována pomocí standardní optické mikroskopie. S využitím „pruhovacích“ technik⁵⁵ se na chromozomech zviditelní periodicky se střídající různě rozsáhlé oblasti heterochromatinu a euchromatinu, tzv. chromozomální pruhy. Každý chromozom má svůj specifický pruhovací vzorec, dle kterého lze mnohem snáze než prostým barvením chromatinu odhalit a přesně definovat (pozice, rozsah) strukturní i numerické aberace chromozomů v rámci celého karyotypu. Za **karyotyp** považujeme druhově specifický soubor všech chromozomů eukaryotické buňky nebo jedince a jeho popis v termínech počtu a struktury chromozomů, a případně i odchylek těchto parametrů od normálu. Schematickému znázornění karyotypu se říká **ideogram**.

Výrazně přesnější analýzu i komplexních karyotypových změn nabízejí molekulárně cytologické techniky umožňující současnou vizualizaci jednotlivých chromozomů prostřednictvím různobarevně značených DNA sond – **mnohobarevná fluorescenční *in situ* hybridizace** (mFISH) a **spektrální karyotypování** (SKY). Metody se liší způsobem barvení chromozomů, pracují ale na stejném základním principu, tj. hybridizaci fluorescenčně značených fragmentů DNA (DNA sond) s komplementárními sekvencemi genomické DNA v buněčném jádře. Hybridizací zde tedy rozumíme proces, při kterém se značený

⁵⁵ nejčastěji se používá tzv. pruhování G, nazvané podle barvení chromozomů roztokem *Giemsa*-Romanovski v přítomnosti trypsinu

(jedno)řetězec denaturované sondy specificky váže prostřednictvím vodíkových vazeb ke komplementárnímu úseku taktéž denaturované molekuly studované DNA. Obdobu mFISH představuje technika zvaná mBanding – **mnohobarevné pruhování chromozomů**. Na rozdíl od mFISH jsou zde DNA sondy navrženy tak, aby namísto celých jednotlivých chromozomů barvily krátké, na sebe navazující úseky určitého chromozomu. Získáme tak pruhovaný chromozom, podobně jako v případě cytologických pruhovacích technik. Pruhovací vzorec ovšem není periodický a vzniká zcela jiným mechanismem než u cytologického pruhování. Hlavně je ale mnohobarevný a mnohem podrobnější. Metody mFISH a mBand lze proto výhodně kombinovat, jelikož první z nich se zaměřuje na celkovou identifikaci a popis interchromozomálních změn karyotypu, zatímco druhá na detailní analýzu přestaveb vybraných chromozomů, včetně intrachromozomálních aberací. Kromě přímé detekce chromozomálních abnormalit (případně ještě doplněné o techniku **předčasné chromozomové kondenzace**, PCC), můžeme k odhadu poškození chromozomů využít i metody nepřímé. Uveďme například **mikrojaderný test**, založený na kvantifikaci tzv. mikrojadra. Mikrojádra se formují z acentrických fragmentů chromozomů, případně následkem neúspěšné vazby centromer chromozomů na kinetochory a mikrotubuly dělicího vřeténka. Na konci mitózy se pak inkriminovaný genetický materiál vyčleňuje z buněčného jádra a obaluje se vlastní jadernou membránou.

Normální karyotyp člověka je 46,XY (muž) nebo 46,XX (žena), což odpovídá 23 párům **autozomů** (nepohlavních chromozomů) a 1 páru **gonozomů** (pohlavních chromozomů). Ionizující záření vyvolává jak poruchy struktury chromozomů (**strukturní aberace**) tak změny jejich počtu (**numerické aberace**). Strukturní aberace mohou postihovat pouze jeden chromozom (**intrachromozomální aberace**) nebo dva a více chromozomů (**interchromozomální aberace**). Z hlediska dopadu chromozomálních aberací na buňku je především důležité, zda v ní zůstane i přes proběhnuvší strukturní (kvalitativní) změny celková genetická informace kvantitativně zachována (**balancované aberace**), nebo zda dojde ke ztrátě či zisku určité porce genetického materiálu (**nebalancované aberace**). Také numerické aberace se týkají jednotlivých chromozomů (**aneuploidie**) nebo i celých chromozomálních sad (**polyploidie**) a vedou k různě rozsáhlým kvantitativním odchylkám od normálního karyotypu.

Chromozomální aberace indukované ionizujícím zářením

Většinu lézí DNA popsanych v kapitole 3.2.5 dokážou buňky poměrně snadno a rychle opravit, a to beze ztráty nebo změny genetické informace. Je-li totiž postižen pouze jeden

řetězec DNA, může být druhý nepoškozený řetězec využit jako templát k rekonstrukci původní genetické informace poté, co byla postižená oblast z DNA reparačními mechanismy „vystřižena“. Dosyntetizování chybějícího fragmentu DNA se pak uskuteční na principu komplementarity bazí. Současné přerušování obou řetězců DNA v případě dvouřetězcových zlomů s sebou však přináší dvě nebezpečná rizika – 1) riziko ztráty genetické informace následkem nutnosti „začištění“ poškozených konců DNA a 2) riziko spojení nesprávných chromozomálních fragmentů pocházejících z jednoho nebo více různých chromozomů. Snaha o opravu DSB proto nezřídka ústí nejen v bodové mutace a drobné delece, ale také intrachromozomální inverze a další chromozomální aberace, zejména translokace, dicentrické chromozomy a prstencové chromozomy. Vzhledem k vysoké účinnosti indukce DSB ionizujícím zářením a výše uvedeným hrozbám lze proto konstatovat, že DSB představují zásadní typ radiačního poškození DNA. Připomeňme však, že i některé původně méně závažné typy lézí DNA mohou být během oprav konvertovány na DSB.

Na rozdíl od většiny chemických látek, ionizující záření způsobuje chromozomální aberace nezávisle na replikaci DNA, a tudíž i fázi buněčného cyklu. Vyvolává tak přestavby chromatinu **chromozomového** i **chromatidového typu**. Chromozomové aberace postihují obě chromatidy mitotického chromozomu – formují se v G₁ fázi na jediné přítomné chromatidě a následně se během S fáze přenášejí i na chromatidu nově syntetizovanou. Chromatidové aberace mají svůj původ až v S/G₂ fázi, a proto v první mitóze zasahují pouze jednu chromatidu. Při replikaci v dalším buněčném cyklu se nicméně konvertují na aberace chromozomové.

Nejvýznamnější chromozomální aberace typické pro ozářené buňky uvádíme níže.

A. Strukturní aberace chromozomů (tzv. chromozomové mutace)

1. Kruhový (ring) chromozom

Kruhový chromozom vzniká cirkularizací chromozomu a spojením krátkého a dlouhého raménka poté, co se z nich následkem ozáření odlomily terminální konce (terminální delece) nebo došlo k poškození telomer. Méně často se objevují acentrické kruhy vyštěpené pouze z jednoho raménka. Přítomnost kruhového chromozomu se pojí se ztrátou genetické informace, jelikož odštěpené konce ramének nemají centromeru, a nepřenášejí se proto stabilně do dceřiných buněk. Kruhový chromozom navíc působí problémy během mitózy, potenciálně ústící až ve smrt buňky.

2. Dicentrický chromozom

Dicentrický chromozom reprezentuje jeden ze stěžejních produktů v ozářených buňkách, který se formuje podobně jako výše zmíněný chromozom kruhový. Rozdíl spočívá v tom, že se nyní jedná o interchromozomální aberaci s participací dvou chromozomů. Po terminální delecí konců ramének p nebo q obou zúčastněných chromozomů přestanou být tato raménka chráněna telomerami proti vzájemným interakcím. Dojde-li nyní k jejich spojení, vytvoří se fúzní chromozom, který má dvě centromery. Obdobně se může zformovat i chromozom tricentrický ze tří chromozomů. Jako v případě kruhového chromozomu vede i tato aberace ke ztrátě genetické informace, přičemž poruchy mitotického dělení, které vyvolává, bývají mnohem závažnější. Přítomnost dicentrických chromozomů je proto pro buňku letální.

3. Delece

Jako delece označujeme chromozomální aberace spojené s vyštěpením části chromozomu a ztrátou inkriminovaného genetického materiálu. V kontextu radiačního poškození se delece objevují jednak následkem ozáření samotného, jednak díky začišťování uvolněných konců DNA během oprav dvouřetězcových zlomů. Začišťování konců obvykle ústí jen v drobné delece, rozsáhlejší delece však vznikají následkem aktivity alternativních (záložních) reparačních mechanismů (kap. 3.6.2). O **intersticiálních delecích** mluvíme tehdy, vzniknou-li v chromozomu dva dvouřetězcové zlomy DNA (DSB) a DNA je znovu spojena takovým způsobem, že fragment chromatinu mezi zlomy z chromozomu vypadne. Odlomení a chybění terminální části chromozomálních ramének následkem jednoho DSB pak označujeme jako **terminální delece** (nebo též deficiencie). V závislosti na fázi buněčného cyklu, ve které záření chromozom poškodilo, postihují delece jen jednu (S/G₂ fáze) nebo obě chromatidy (G₁ fáze).

4. Translokace

Spojením nesprávných konců DNA v místech dvouřetězcových zlomů během jejich oprav vznikají translokace, nejčastější typ chromozomálních aberací vyvolaných zářením. Lze je tedy definovat jako přesuny menších či větších fragmentů chromatinu mezi chromozomy (**interchromozomální translokace**) nebo i v rámci chromozomu jednoho (**intrachromozomální translokace**). Translokace obecně vedou ke stejným molekulárním defektům jako inverze. Někdy se geny na koncích translokovaných fragmentů přenesou do nevhodného nového prostředí nebo dokonce vytvoří fúzní gen ze zbývajících částí genů na translokovaném fragmentu a hostitelském chromozomu. Problém nastává zejména tehdy, dostane-li se takto některý z onkogenů pod kontrolu silného promotoru, jež neustále stimuluje jeho transkripci, a tudíž i proliferaci buněk. Deregulaci buněčného cyklu způsobí i přemístění nádorově supresorového genu do geneticky umlčené oblasti, spojené se ztrátou jeho funkce. Fúzní geny se transkribují do fúzních proteinů s pozměněnými vlastnostmi, které vykazují

často onkogenní potenciál. Fúzních proteinů existuje celá řada, příkladem budiž PML/RARa, způsobující akutní promyelocytární leukémii, nebo BCR/ABL, zodpovědný za rozvoj akutní a chronické myeloidní leukémie, případně i dalších typů leukémií.

Translokace dělíme na **nebalancované** a **balancované**. Následkem dělení buněk s **nebalancovanými translokacemi** trpí dceřiné buňky ztrátami nebo naopak nadbytkem genetického materiálu. U gamet se tato situace pojí s neplodností, častými potraty a hrozícím vývojem různých vývojových vad u potomstva. Proběhne-li vzájemná výměna chromatinu naopak bez kvantitativní změny genetické informace, jde o **translokace balancované**. Ty obvykle nemají dopad na svého nositele, kromě již výše uvedeného rizika poruchy činnosti genů v oblastech zlomových bodů chromozomů. Nicméně i balancované translokace přítomné v gametách mohou vyústit v nebalancovaný karyotyp u potomstva, spojený s různě vážnými zdravotními dopady.

Translokace se uskutečňují jako **prosté** nebo **reciproké**. Při prosté translokaci se fragment jednoho chromozomu relokalizuje na jiný nehomologický chromozom. Během translokace reciproké se vzájemně vymění fragmenty chromatinu mezi dvěma chromozomy. Zvláštní translokační produkt představuje **Robertsonský chromozom**, jež se objevuje následkem spojení dlouhých ramének dvou akrocentrických chromozomů po předchozím odlomení ramének krátkých (Robertsonská translokace)⁵⁶.

Specifickým fenoménem pro ionizující záření s vysokým lineárním přenosem energie (LET) jsou **komplexní chromozomální translokace**, na kterých se podílí větší množství chromozomů a zlomů DNA. Detekovány byly například u zaměstnanců jaderného komplexu Majak, kteří profesně přicházeli do kontaktu s plutoniem. Komplexní chromozomové přestavby doprovázejí také pokročilé nádory.

Existují dvě základní hypotézy vysvětlující mechanismus chromozomálních translokací. První z hypotéz, tzv. **Position-First Hypothesis**, vychází z předpokladu omezené pohyblivosti chromatinu a jeho nenáhodné organizace v buněčném jádře. Translokace mohou podle této hypotézy probíhat víceméně pouze mezi geny, které se v buněčném jádře nacházejí díky jeho specifické architektuře ve vzájemné blízkosti již předtím, než jsou zasaženy DSB (např. PML/RARa, BCR/ABL). Druhá hypotéza, tzv. **Breakage-First Hypothesis**, naopak počítá se zvýšenou mobilitou chromatinu v místech zlomů DNA. Dovoluje proto výměny chromatinu i mezi původně vzdálenými chromozomálními lokusy. V „extrémní“ podobě této hypotézy putují poškozené chromozomální lokusy (s DSB) cíleně do tzv. reparačních továrniček, kde je

⁵⁶ Izochromozom se skládá ze dvou ramének q nebo p. Příčina však nespočívá v (Robertsonské) translokaci, nýbrž v aberantním příčném rozdělení centromery jediného chromozomu během buněčného dělení.

vícero DSB opravováno společně. Může tak mezi nimi snadno docházet ke komplexním translokacím. Obě hypotézy mají své přednosti i nedostatky, což poukazuje na komplikovanější mechanismus chromozomálních translokací, patrně kombinující různé aspekty obou teorií. Zde odkazujeme na přehledný článek Falk et al. (2010) (viz seznam literatury).

5. Pericentrické a paracentrické inverze

Inverze potřebují ke svému zrodu dva dvouřetězcové zlomy v jednom chromozomu, které ho rozdělí na tři fragmenty. Přetočením (inverzí) centrálního fragmentu a jeho znovuspojením s distálními fragmenty následně vzniká chromozom s inverzí. Obsahoval-li invertovaný fragment centromeru, jedná se o inverzi pericentrickou, pokud ne, jde o inverzi paracentrickou. K inverzím terminálních fragmentů nedochází, protože distální konce chromozomů jsou proti fúzím chráněny telomerami. I kdyby se tak stalo, absence telomer na koncích přeskupených chromozomů by způsobovala jejich nestabilitu. Inverze patří mezi balancované aberace, tzn., že se z buněk bezprostředně nevytrácí genetická informace. Ke ztrátám ale může dojít u potomstva pohlavních buněk, díky problémům během meiotické rekombinace. Vždy navíc hrozí riziko narušení funkce genů lokalizovaných na koncích invertovaných fragmentů obdobně jako u translokací.

6. Fragmenty chromozomů

Z chromozomů se někdy odlomí krátké fragmenty chromatinu (viz delece). Tyto fragmenty se z buněčného jádra následně vyředí, protože nemají centromeru, a nemohou být tudíž během mitózy či meiózy napojeny na dělicí vřeténko. Ztráta genetické informace se následně projevuje těžkými až letálními poruchami funkce genomu.

Obr. 3.4 Charakteristické strukturální aberace (chromozomálního typu) detekované v ozářených buňkách

B. Numerické aberace (tzv. genomové mutace)

Kromě strukturálních mutací jednotlivých chromozomů (chromozomální mutace) indukuje ionizující záření také změny počtu celých chromozomů (aneuploidie) nebo i chromozomálních sad (euploidie/polyploidie). Zejména u nádorových buněk dochází následkem ozáření k tzv. endopolyploidii, tedy zmnožení chromozomálních sad bez současného rozdělení jádra (endomitóza)⁵⁷. Jádra endomitotických buněk dosahují obřích rozměrů a jejich dělení obvykle končí smrtí buněk. Občas se nicméně z endomitotických jader

⁵⁷ Přirozeně tento proces probíhá třeba v buňkách lidských jater.

zpětně „vyštěpují“ opět jádra v principu diploidní. Tyto tzv. pseudodiploidní buňky jsou po určité stabilizaci genomu schopné dalšího života a dělení. Uvedený proces ale ústí v řadu strukturních přestaveb chromatinu, a stejně tak i rozsáhlé změny karyotypu – **aneuploidii** a/nebo **polyploidii**). Vzhledem k této skutečnosti a velkému množství obsaženého genetického materiálu zosobňují endopolyploidní buňky jakési inkubátory zrychlené genomické evoluce. Vzniknou-li následkem ozáření v normální nebo prekancerózní tkáni, lze endopolyploidní buňky opodstatněně podezřívat z iniciace nádorového bujení. U již existujících nádorů pak katalyzují jejich genetickou nestabilitu a ochotu metastázovat. Následky radiační mutagenese mohou být ale i pozitivní. Například polyploidie představují u rostlin cílený šlechtitelský efekt, protože polyploidní rostliny vykazují řadu výhod. Mimo jiné se vyznačují většími buňkami, což má třeba v případě píce za následek její vyšší výnosy, lepší stravitelnost a kvalitu.

C. Genomická nestabilita

V některých ozářených buňkách můžeme kromě okamžité tvorby genových a chromozomálních mutací pozorovat ještě další, opožděnou vlnu rozsáhlého vzestupu nejrůznějších mutačních událostí – tzv. genomickou nestabilitu⁵⁸. Tvorba mutací během této vlny není proporcionální absorbované dávce a nelze ji vysvětlit přímým působením záření na DNA. Příčinu genomické nestability proto můžeme spíše odvozovat od nějakého všeobecného narušení funkce genomu. V úvahu připadají například poruchy reparačních systémů, opožděná produkce volných radikálů a epigenetické změny vyvolané v chromatinu ozářením. Následkem genomické nestability buňky zrychleně kumulují nejrůznější typy mutací (genové amplifikace, strukturní chromozomální aberace a numerické karyotypové změny), takže nikoho nepřekvapí, že tento stav úzce souvisí se vznikem a progresí nádorových onemocnění. Zajímavé je, že se chromozomální nestabilita objevuje nejen v ozářené buňce samotné, ale i v jejích dalších generacích.

Využití chromozomálních aberací k retrospektivnímu odhadu absorbované dávky – biodozimetrie

Při nepředvídatelných situacích, například během radiačních nehod, obvykle nemáme k dispozici standardní dozimetrická měření. Při tomto scénáři navíc předpokládáme ozáření většího množství osob, které se v době expozice nacházely v nestejných vzdálenostech od

⁵⁸ Též se používají termíny genová, chromozomální nebo genomová stabilita.

zdroje záření, byly různě stíněny a případně i odlišným způsobem kontaminovány. Odhad dávky může být v těchto případech proto značně problematický a jakékoliv přirozeně dostupné kvantifikátory expozice nabývají zásadního významu. Jednou z možností retrospektivního odhadu absorbované dávky u obětí neplánovaných expozic je sledování přítomnosti chromozomálních aberací, jež představují citlivý indikátor individuální expozice ionizujícímu záření až do minimální dávky přibližně 0,02 Gy. Většina typů chromozomálních aberací je nicméně z buněčných jader postupně eliminována, takže jejich biodozimetrický význam postupně klesá. Patrně nejvýznamnějším markerem ozáření jsou **dicentrické chromozomy**. Četnost dicentriků se snižuje exponenciálně s časem po ozáření, přičemž literatura uvádí poměrně výrazně rozdílné poločasy tohoto poklesu, u lymfocytů např. 100 dní až 3 roky.⁵⁹ Bez korekcí tedy považujeme analýzu dicentrických chromozomů za spolehlivou přibližně do několika týdnů po ozáření. Využit lze také **chromozomálních fragmentů**, jejichž četnost přibližně odpovídá dicentrikům. Hodnocení však může být nespolehlivé. **Kruhové chromozomy** se zase tvoří méně často než dicentrici, takže jejich analýza potřebuje více času i financí. Mezi dlouhodobě perzistující a tudíž teoreticky výhodnější aberace patří **chromozomální translokace**. Jejich detekce a rozbor však vyžadují mnohem sofistikovanější metody (mFISH) než počítání kruhových a dicentrických chromozomů. Tím se stává analýza translokací v masovém měřítku spíše jen teoretickou možností. Z různých typů chromozomálních aberací proto za prakticky nejužitečnější a nejpřesnější biodozimetrický ukazatel absorbované dávky stále platí frekvence dicentrických chromozomů, které se vyskytují s nejvyšší frekvencí a můžeme je dobře rozlišit. Jako výchozí materiál pro kvantifikaci chromozomálních aberací většinou používáme G₀ lymfocyty izolované z periferní krve, které po odběru stimulujeme k buněčnému dělení a zastavíme v mitóze. V případě hromadných událostí musí být ozářené osoby co nejrychleji roztrženy pro adekvátní lékařskou péči. Kromě kvantifikace chromozomálních aberací, která se neobejde bez časově náročné kultivace lymfocytů, se proto vehementně hledají i další biomarkery radiační expozice. Kromě již dlouho zavedeného sledování změn v krevním obraze lze přímo monitorovat i zářením vyvolané defekty DNA na molekulární úrovni. Za vůbec nejcitlivější metodu v současnosti považujeme imunofluorescenční detekci histonu γ H2AX⁶⁰, tj. histonu H2AX fosforylovaného na serinu 139. K fosforylaci H2AX dochází specificky v oblastech dvouřetězcových zlomů DNA, takže množství γ H2AX v jádře koreluje s absorbovanou

⁵⁹ Důvody tohoto rozptylu nejsou příliš známy, uvažuje se například o vlivu samotného záření na apoptózu buněk.

⁶⁰ Histon H2AX je variantou histonu H2A.

dávku záření. Kromě vysoké senzitivity nabízí analýza γ H2AX i relativní rychlost. Histon γ H2AX může být v buňkách prokázán již několik minut po expozici a samotná procedura netrvá déle než 1 den. Kvantifikace může být založena na měření celkové fluorescence γ H2AX v buňkách prostřednictvím průtokové cytometrie nebo stanovení počtu ohnisek γ H2AX pomocí fluorescenční mikroskopie. Druhý způsob je pracnější, dle distribuce γ H2AX v jádře ale umožňuje rozlišit, zda byly buňky vystaveny záření s nízkým nebo vysokým lineárním přenosem energie (LET). Využití metody komplikuje rychlý úbytek γ H2AX s časem, podobně jako v případě chromozomálních aberací. Většinu dvouřetězcových zlomů totiž buňka opraví již během několika (8 h)⁶¹ hodin po ozáření. Přesto lze při dostatečné dávce prokázat zvýšenou frekvenci γ H2AX u ozářených osob i několik dní po ozáření. V případě dozimetrických událostí vojenského charakteru představují problém situace, kdy došlo k expozici osob současně ionizujícím záření a některým bojovým látkám. Například yperit dokáže indukovat dvouřetězcové zlomy DNA obdobně jako ionizující záření. Mezi další intenzivně studované biodozimetrické markery patří například změny hladin proteinů podílejících se buněčné odpovědi na ozáření (p53, ATM atd.).

3.3.2 Poškození buněčných membrán a organel

Dle současného pohledu má z hlediska radiačního poškození buňky nejzásadnější význam **buněčné jádro**, které řídí veškeré funkce buňky, ukrývá v sobě DNA a u eukaryontních organismů ho ohraničuje jaderná membrána. Imunní vůči záření však nejsou ani další organely, jako lysozomy, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, peroxizomy a mitochondrie, u rostlin pak i chloroplasty (plastidy).

Zejména **mitochondrie** a **chloroplasty**, jež mají svou vlastní DNA, mohou být poškozeny již nízkými dávkami záření. Dokonce se ukazuje, že mitochondriální DNA vykazuje k záření ještě vyšší citlivost než DNA v buněčném jádře. Existuje k tomu několik důvodů. Zaprvé, mitochondriální DNA (mtDNA) neasociuje na rozdíl od jaderné DNA s histony, které by ji chránily před účinky volných radikálů. Zadruhé, mtDNA je mnohem hustěji osídlena geny než DNA jaderná. Přestože představuje pouze asi 0,25 % celkového buněčného obsahu deoxyribonukleové kyseliny v buňce, sestává se víceméně (kromě D-smyčky) ze sekvencí kódujících proteiny. To představuje obrovský rozdíl ve srovnání s DNA jadernou, v jejímž případě tvoří kódující sekvence pouze asi 1 %. Pravděpodobnost, že jakékoliv poškození

⁶¹ Při expozici záření s vysokým LET může významné procento neopravených lézí perzistovat v buněčném jádře mnohem déle.

povede k biologickému efektu, je tedy pro mtDNA výrazně vyšší. Mitochondrie navíc disponují jen omezeným systémem oprav lézí mtDNA, díky čemuž mtDNA mutuje asi 10x rychleji než DNA jaderná. Na druhou stranu se mtDNA (a chloroplastová/plastidová DNA) vyskytují v buňce v mnoha kopiích. Nepoškozené kopie mtDNA a ctDNA/pDNA tak efekty nízkých dávek záření a mutací snadno kompenzují. Přestože byly doposud účinky ionizujícího záření na mitochondrie studovány méně než dopady na jadernou DNA, mnohé studie ukazují na přímé spojení mezi genetickými variacemi v mtDNA a některými chorobami, včetně rakoviny. U ozářených osob byly zaznamenány zvýšené hladiny delecí a bodových mutací v mtDNA, přičemž genetická variabilita mtDNA korelovala s radiosenzitivitou vyšetřovaných jedinců.

Při expozici vyšším dávkám záření vstupuje do hry i poškození lipidů a proteinů mitochondriálních membrán, následkem čehož selhávají jejich funkce. Ozáření buněk v řádu jednotek Gy tak véde například k dočasnému poklesu produkce ATP. Například pro osteosarkomové buňky vystavené 8 Gy záření gama činil tento pokles hodinu po ozáření až 20 %, později se ale hodnoty navrátily do normálu. Jindy bylo po ozáření zaznamenáno zmnožení mitochondrií doprovázené zvýšenou spotřebou kyslíku při zachování konstantní hladiny ATP. Z toho lze vyvodit, že se buňka brání dysfunkci mitochondrií navýšením jejich počtu.

Při závažnějším poškození buňky způsobí ztráta integrity membrán únik cytochromu c z mitochondrií a aktivaci apoptózy. Samotné mitochondrie navíc uvolňují do svého okolí velké množství reaktivních volných radikálů. Tento fenomén je studován i v souvislosti s rozvojem nebezpečné genomické nestability. Zdá se tedy, že mitochondrie představují důležitý cíl ionizujícího záření. Toto tvrzení podporují i nedávné objevy poukazující na nezanedbatelný význam i výlučně cytoplazmatického ozáření.

Dopad radiačního poškození lyzozomů a dalších organel na buňku zůstává stále víceméně neprostudován. **Lyzozomy** obsahují agresivní hydrolytické enzymy určené k degradaci proteinů (viz kap. 2). Trávicí enzymy lyzozomů však účinkují pouze při nízkém pH, které panuje uvnitř těchto organel. Prosáknutí lyzozomálních enzymů do cytoplazmy proto dokáže buňka do určité hladiny „vypufrovat“. Současný výzkum nicméně naznačuje, že už i méně závažné poškození lyzozomů může mít na buňku nepříznivý vliv. Lyzozomy se totiž patrně prostřednictvím signálních drah podílejí na regulaci důležitých buněčných procesů, například apoptózy. Při ruptuře velkého množství lyzozomů najednou pak už nelze vyloučit ani přímý efekt degradačních enzymů na okolní cytoplazmatické struktury.

Obecně se tak narušení funkce (membrán) buněčných organel souhrnně projeví různým stupněm celkového rozvratu buněčného metabolismu. Kromě již uvedeného se na této situaci zásadně podílí i poškození **cytoplasmatické membrány**. V důsledku narušení její integrity ztrácí buňka kontrolu nad příjmem látek z vnějšího prostředí a zároveň dochází k úniku vnitrobuněčného obsahu do okolí. Mechanizmy chemického poškození membrán a jejich konkrétní důsledky byly již popsány v souvislosti s poškozením lipidů (**kap. 3.2.2**).

3.4 Radiační poškození na úrovni buněk a jeho implikace pro efekty na úrovni tkání a organismů

Mechanismus radiačního poškození buněk a tkání se zásadním způsobem odvíjí od absorbované dávky záření. V případě vysokých dávek buňka umírá. Při překročení tzv. **prahových dávek** smrt postihne již tolik buněk, že se tento stav manifestuje poškozením tkání či orgánů – **deterministickými (tkáňovými) účinky**. S eskalací dávky se logicky zvyšuje proporce zmrávajících buněk a zákonitě i závažnost postižení, tj. klinických symptomů. Podprahové dávky funkci tkání a orgánů akutně neovlivní, protože buňky ozáření přežijí a v určitém časovém horizontu i nadále víceméně vykonávají své funkce. Záření ale poškodí jejich DNA a díky případným chybám v reparaci vytvořených lézí potenciálně i genetickou informaci. Rozsah genetických změn a počet afektovaných buněk roste s dávkou, a tudíž i riziko **pozdních stochastických zdravotních důsledků** na úrovni organismu. Zde jen zdůrazněme, že DNA každé buňky je postižená náhodně, a každá buňka tak nese jiné změny genetické informace. V tom spočívá zásadní rozdíl stochastických účinků oproti účinkům deterministickým, kdy jsou ve své podstatě všechny buňky postiženy stejně – zemrou. Aby se konkrétní genetická změna projevila na orgánové úrovni, musí nejprve dojít k její diseminaci do relevantní proporce buněk. U somatických buněk se tak stane pouze tehdy, přináší-li změna buňce růstovou výhodu, a tedy i možnost postupně navýšit své potomstvo na úkor buněk nepoškozených, rostoucích pomaleji. Projevem radiačně indukovaných genetických změn je tak premaligní stav buňky, případně následovaný její úplnou **nádorovou transformací**. U potomků rodičů s ozářenými gametami (pohlavní buňky) se však mohou kromě nádorových onemocnění vyskytovat i nejrůznější nemaligní **vrozené vývojové vady**, jež nejsou spojeny s růstovou výhodou mutovaných buněk. Z jedné poškozené gamety totiž vzniká celý nový organizmus. Z výše popsaného plyne, že nádorová onemocnění a vývojové vady postihnou na rozdíl od deterministických efektů jen určité, na dávce závislé procento

jedinců v ozářené populaci, nelze však předem určit koho. Proto pro **stochastické účinky** používáme často i termín **účinky pravděpodobnostní**.

Dle dalších kritérií dělíme účinky ionizujícího záření na **časné** (pouze deterministické) vs. **pozdní** (deterministické i stochastické) a **somatické** (deterministické i stochastické) vs. **genetické** (pouze stochastické).

3.4.1 Genetické poškození buněk (stochastické účinky)

Jak již bylo nastíněno výše, mezi stochastické následky radiačně vyvolaných mutací patří nádorové bujení a vrozené vývojové vady u potomstva. Léze v DNA mohou být neúspěšnou opravou zafixovány a způsobit změny v genomu buňky. Naštěstí jsou reparační mechanismy velmi účinné, a navíc ne všechny mutace se v buňce projeví i funkčně. Kódující sekvence totiž představují jen asi 1 % celé DNA. Kritické úseky DNA (kritické cíle), jejichž mutace potencují proliferaci buňky a ve svém důsledku způsobují rozvoj nádorového onemocnění, pak reprezentují procento ještě výrazně menší. A konečně, i když už dojde následkem (většinou většího množství) mutací k nádorové transformaci buňky, neznamená to ještě, že tato buňka přeroste v maligní nádor. Organismy totiž disponují výkonným imunitním systémem, jenž po poškozených buňkách permanentně pátrá a většinu jich zničí. Jinými slovy, efekt mutace na úrovni tkání a případně celého organismu (úmrtí na nádor) nastane pouze tehdy, byly-li v DNA zasaženy a poškozeny určité kritické cíle (**kap. 3.2.4**) v příhodné kombinaci a transformované buňky nebyly následně rozpoznány jako pro organismus nebezpečné⁶². Vzhledem k náhodné povaze interakce záření s DNA nemůžeme předem určit které geny a jak budou zářením poškozeny, natož pak, jaký bude budoucí vývoj této buňky a osud organismu. S ohledem na jedince lze proto pouze odhadnout riziko, s jakým u něho malignita vypukne při dané absorbované dávce, protože pravděpodobnost zasažení kritických cílů s dávkou úměrně roste. Stochastické účinky jsou unikátní tím, že se projevují (vrozené vývojové vady) také u neozářeného potomstva ozářených rodičů, byly-li u nich zasaženy gamety.

Stochastické účinky představují pro běžnou populaci největší riziko. Většina lidí je totiž vystavena pouze nízkým dávkám záření, zato však dlouhodobě či opakovaně (radon v domech, lékařská vyšetření apod.). Právě v oblasti nízkých dávek (<200 mSv) ale naše porozumění efektům ionizujícího záření stále pokulhává. Důvodem je zejména skutečnost, že nízké dávky způsobují jen nepatrné navýšení incidence nádorových onemocnění oproti

⁶² Některé typy nádorů navíc dnes umíme poměrně dobře léčit.

neozářené populaci, přičemž nádory vyvolané zářením nelze nijak odlišit od nádorů vznikajících spontánně nebo následkem jiných všudypřítomných mutagenů a karcinogenů (volné radikály a metabolity permanentně produkované následkem vitálních buněčných procesů, chemikálie v životním prostředí – kouření, alkohol, výfukové plyny, chemikálie unikající při průmyslové výrobě atd.). Záření totiž vyvolává v principu stejné mutace jako tyto faktory. Lokalizace nádorů není navíc vázána jen na původně ozářenou tkáň (krevní nádory, metastázy), což ztěžuje retrospektivní analýzu původu nádoru i v případě ozáření jen určité částí těla.

Dopady nízkých dávek záření lze proto studovat pouze na úrovni populací, v rámci velkých epidemiologických studií. Ze shromážděných dat od vysoce exponovaných přeživších obětí jaderného bombardování (Hirošima a Nagasaki) a radiačních havárií (Černobyl, Majak) vyplynula lineární závislost mezi dávkou záření a rizikem nádorového onemocnění.

Extrapolací těchto dat do oblasti nízkých dávek byl postulován tzv. **LNT (Linear Non-Threshold) model**, který popisuje riziko stochastických účinků jako lineární bezprahovou funkci absorbované dávky. Jinými slovy, i nejmenší možná dávka, jež je schopná způsobit poškození DNA, má zároveň potenciál vyvolat nádorové onemocnění. Pravděpodobnost, že se tak stane, přitom lineárně roste s dávkou. Objevují se ale i výsledky různých ozařovacích experimentů a populačních výzkumů, které se v oblasti nízkých dávek od LNT modelu výrazně odchyľují. V závislosti na konkrétní studii a sledovaném efektu záření se přitom odpověď buněk/organismu na ozáření posunuje od linearity směrem k **hypersenzitivitě** nebo naopak **hyposenzitivitě**. Pro oba tyto protichůdné závěry přitom existují smysluplná teoretická opodstatnění. Nízké dávky záření například nemusí stačit k úplné iniciaci reparačních systémů DNA a/nebo kontrolních bodů buněčného cyklu (hypersenzitivita). Permanentní stimulace reparačních systémů nízkými dávkami (např. zvýšená radiační zátěž z podloží) může naopak zefektivnit opravu vznikajících poškození DNA. Další mechanismy pak případně fungují i na vyšších organizačních úrovních organismu (tkáň, orgány, a celé jejich systémy). Například imunitní buňky aktivované zářením dokážou efektivněji identifikovat a eliminovat neopravitelně poškozené buňky. Nelze tak vyloučit, že i pro stochastické účinky (zejména leukémie) existuje určitá prahová dávka, obdobně jako u účinků deterministických. Extrémní variantou hyposenzitivity je tzv. **(radio)hormeze** – jev, kdy v určitém intervalu nízkých dávek pozorujeme dokonce pokles úmrtnosti buněk s rostoucí dávkou. Předpokládáme, že stimulované reparační systémy si v tomto případě umí lépe poradit i se spontánně se vyskytujícím poškozením DNA. Na úrovni organismu pak nabuzený imunitní systém zlikviduje i prekancerózní nebo nádorové buňky, které se čas od času

objevují u každého člověka a které by jinak zůstaly snáze přehlédnuty. Není proto vyloučeno, že dávková závislost rizika nádorového onemocnění sleduje v oblastech pod 200 mSv komplexnější trendy, než jsme doposud předpokládali (**Obr. 3.5**). Pro účely radiační ochrany však stále používáme již popsany bezprahový LNT model, protože je kromě hypersenzitivní závislosti nejpřísnější a pro výpočty nejpraktičtější. Experimentální studie zatím navíc neposkytly dostatečně přesvědčivé důkazy pro žádnou z alternativních hypotéz.

Obr. 3.5 Závislost rizika nádorového bujení na dávce záření v oblasti nízkých dávek.

Různé studie popisují bezprahovou lineární závislost (a), hypersenzitivitu (b), hyposenzitivitu/hormezi (c), a komplexnější závislosti, např. kombinující hypersenzitivitu a hyposenzitivitu (d). Jiné výzkumné závěry poukazují na existenci prahové dávky i v případě stochastických účinků (e). Po výrazně vyšší prahové dávce se začínají objevovat také efekty deterministické (f).

Nicméně poznamenejme, že i LNT model je víceméně hypotetický, protože byl navržen na základě extrapolace dat pro vysoké dávky absorbované s vysokým dávkovým příkonem pro dávky nízké a většinou chronické nebo opakované. Z fyzikálního pohledu podporuje LNT model sice opodstatněný předpoklad, že i minimální dávky záření mohou vyvolat poškození DNA a že každý další zásah zvyšuje pravděpodobnost mutace kritického cíle, nezohledňuje ale vliv biologických procesů, zejména nejisté chování reparačních systémů v oblasti nízkých dávek.⁶³

V posledních letech nabývá otázka zdravotního významu nízkých dávek nové aktuálnosti, jelikož strmě roste expozice osob ionizujícímu záření následkem lékařských vyšetření (zejména pomocí CT) a nejistoty panují také kolem vlivu záření na kosmonauty v souvislosti s plánovanými dlouhodobými pilotovanými extraterestriálními lety. Každopádně lze předpokládat, že upřesnění závislosti riziko – dávka bude mít významné filozofické a společensko-technické dopady. Pravděpodobnost celoživotního rizika úmrtí na nádorové onemocnění v důsledku ozáření vyjadřuje tzv. **koeficient rizika smrti**. Pro efektivní dávku⁶⁴

⁶³ Pro ilustraci problému s extrapolací dat získaných pro vysoké dávky do oblasti nízkých dávek uveďme následující přírovnání: Pokud 100 g určité látky zabije po pozření 100 % příjemců a 50 g pak 50 % příjemců, není vůbec jisté, že 1 g zabije 1 % příjemců. Efekt při takto nízké dávce nemusí být vůbec patrný, nebo se mohou dokonce projevit léčivé účinky látky.

⁶⁴ K odhadu rizika stochastických účinků se používá tzv. efektivní dávka, jejíž hodnota odpovídá součtu ekvivalentních dávek (H_T) absorbovaných jednotlivými orgány, vážených tkáňovým váhovým faktorem (w_T). Tkáňový váhový faktor zde zohledňuje relativní příspěvek jednotlivých tkání a orgánů k riziku vzniku stochastických účinků díky jejich různé citlivosti k ozáření. Ekvivalentní dávkou pak rozumíme střední dávku záření absorbovanou daným orgánem (D_T) která je již vztažena k radiobiologickému účinku (RBU) daného typu záření, vyjádřenému pomocí radiačního váhového faktoru (w_R) (**viz kap. 3.5.1**). Výpočet efektivní dávky lze tedy provést podle vzorce $E = \sum H_T w_T = \sum D_T w_R w_T$ [Sv, sievert]. Jednotkou efektivní a ekvivalentní dávky je

1 Sv je v současnosti uváděna hodnota $550 \cdot 10^{-4} \text{ Sv}^{-1}$, což znamená, že při vystavení 10 000 lidí ionizujícímu záření o dávce 1 Gy jich 550 zemře na rakovinu způsobenou ozářením. Mezi nejvímavější tkáně/orgány ke stochastickým účinkům patří kostní dřev a lymfoidní orgány, žaludek, tlusté střevo a plíce. V kontextu opakovaných mamografických vyšetření u žen s rizikem rakoviny prsu, často s defektními reparačními mechanismy DNA, stojí za zmínku relativně nový poznatek, že vysokou citlivost vykazuje i mléčná žláza.

3.4.2 Radiační mutagenese a karcinogeneze

Proces, během kterého iniciální poškození DNA přechází v nádorové onemocnění, můžeme zjednodušeně vysvětlit tzv. **klonální expanzí**, neboli postupnou akumulací mutací v buňkách a následným rozrůstáním se stále agresivnějších klonů premaligních buněk⁶⁵. Takto postupný vývoj nádorů vysvětluje, proč od ozáření do vypuknutí choroby uplynou často i desítky let, zejména v případě solidních nádorů. Někdy však stačí už prvotní defekt DNA k vyvolání úplné nádorové transformace buňky. Typickým příkladem jsou leukémie, jak již bylo popsáno v kapitole 3.2.4 (odstavec „Kritické cíle DNA a následky jejich zasažení“). Leukémie a lymfomy se proto po ozáření objevují obecně dříve než nádory solidní, často jako sekundární malignity po radioterapeutické nebo chemoterapeutické léčbě jiných nádorů. Jen pro úplnost budiž uvedeno, že nejen leukémie a lymfomy ale i některé solidní nádory může způsobit jediná katastrofická událost. Nedávno byla objevena tzv. **chromothripsis**, při níž ze zatím nejasné příčiny dochází k mnohonásobné fragmentaci jednoho či více chromozomů⁶⁶. Následně se chromosomální fragmenty spojují do velmi komplexních karyotypů, a pokud buňky přežijí, získávají obvykle vysoký onkogenní potenciál.

Z výše uvedeného vyplývá, že z hlediska závažnosti nádorových onemocnění není důležité, z kolika iniciálních mutací nádor pochází, ale pouze to, které konkrétní mutace se nádorovým buňkám během karcinogeneze podařilo nakumulovat. Protože se vzrůstající dávkou roste množství mutací v buňce a počet postižených buněk, stupňuje se i riziko vzniku nádoru (nikoliv však jeho klinická závažnost). Je také zřejmé, že se účinky jednotlivých expozi-

v obou případech Sv, který má stejný rozměr jako Gy ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1}$), jeho použití však poukazuje na skutečnost, že vyjádřená hodnota již zohledňuje relativní biologickou účinnost záření.

⁶⁵ Zafixování unikátních souborů mutací v jednotlivých buňkách způsobí diferenciaci buněčné populace do různých klonů. Část buněk si zachová normální vlastnosti, některé budou jen nepříliš životaschopné, ale jiné získají výrazné růstové výhody. S postupem času rychleji rostoucí (pre maligní) klony přerůstají ostatní buňky ve tkáni a kumulují další mutace. U některých buněk ozáření navíc vyvolá i opožděnou genetickou nestabilitu, charakteristickou výrazně vyšší mutační aktivitou, než odpovídá absorbované dávce. Tyto faktory eskalují další kumulaci mutací, u již tak postižených buněk a postupnou pozitivní

⁶⁶ Chromothripsis způsobuje např. významnou část případů myelodysplastického syndromu (MDS), který je častou sekundární malignitou.

sčítají po celý život. Z hlediska střádání mutací a nádorového bujení proto nezáleží na tom, zda byl organizmus ozáren jednorázově či protražovaně.

3.4.3 Smrt buněk (deterministické účinky)

Deterministické účinky jsou zjednodušeně řečeno opakem výše popsaných účinků stochastických. Dochází k nim následkem smrti většího množství buněk ve tkáni, než které může být sebeobnovovacími mechanismy nahrazeno. Jedná se tedy o účinky prahové – zaznamenáváme je až po překročení určité (prahové) dávky, která je charakteristická pro jednotlivé symptomy. Po vystavení organizmu nebo jeho části nadprahovým dávkám se příslušné radiační syndromy, na rozdíl od stochastických účinků, projeví u každého ozářeného jedince. Pokud se bude dávka dále zvyšovat, poroste tentokrát namísto pravděpodobnosti postižení (stochastické účinky) jeho závažnost a zároveň se bude zkracovat doba mezi ozářením a klinickou manifestací symptomů. Na buněčné úrovni poškodí prahová dávka určitou frakci ozářených buněk, jež se bude zvětšovat s absorbovanou dávkou sigmoidálně. Sigmoidální průběh má proto i závislost závažnosti deterministických účinků na dávce. Oblast křivky, kde se její další vzestup zastavuje, odpovídá smrti jedince.

Zejména s ohledem na radioterapii nádorů je důležité, že klinický projev deterministických účinků nezávisí jen na dávce, ale také na charakteru expozice. Rozložením dávky do vícera frakcí (frakcionovaná terapie) se riziko akutních nežádoucích efektů významně snižuje oproti stejně velké dávce absorbované jednorázově – prahové dávky se zvyšují. Prahové dávky pro pozdní (chronické) deterministické účinky, které se rozvíjí po opakovaném vystavení subakutním dávkám ionizujícího záření, jsou vždy výrazně (2–10x) vyšší než prahové dávky pro vysoké jednorázové expozice. Důvod spočívá v tom, že v meziobdobích mezi expozicemi dochází k repopulaci tkáně novými buňkami.

Z mechanismu deterministických účinků zákonitě vyplývá, že se týkají pouze ozářené tkáně a na rozdíl od stochastických účinků mají charakteristický klinický obraz. Lze je tedy spolehlivě odlišit od obdobných syndromů neradiačního charakteru. Vzhledem k jejich povaze (poškození tkáně a orgánů) mohou být deterministické účinky pouze somatické a ani při zasažení pohlavních buněk se nepřenášejí do potomstva⁶⁷. Zde je však třeba si uvědomit, že manifestaci deterministických efektů vždy doprovází latentní riziko účinků stochastických, které při dávkách potřebných k vyvolání deterministického poškození již zdaleka není zanedbatelné (viz **kap. 3.4.1**).

⁶⁷ Poškození pohlavních buněk se projeví pouze sníženou fertilitou rodičů.

Důsledky odumírání poškozených buněk se po vysokých jednorázových dávkách (v řádu jednotek Gy) projevují již brzy po ozáření, obvykle do několika dnů či týdnů. Při jednorázové celotělové expozici 5 Gy lze očekávat smrt 50 % ozářených osob obvykle do 20 až 30 dnů. Ve zvláště závažných případech (desítky Gy celotělově) člověk umírá ihned po ozáření, díky okamžité denaturaci a dezintegraci buněk. Dávky záření gama vedoucí k úmrtí 50 % ozářených jedinců (LD₅₀) jsou pro vybrané organizmy uvedeny a vzestupně seřazeny v tabulce 3.1. Při vyšších celotělových dávkách předchází efektu vymírání buněk ještě klinické symptomy reflektující podráždění regulačních center organismu produkty radiolýzy vody (nevolnost, nadměrná únava). V závislosti na dávce, charakteru expozice a ozářené části těla však mohou mít deterministické účinky i pozdní, případně chronický charakter.

Tabulka 3.1 Dávky LD_{50/30}⁶⁸ pro záření gama a různé organizmy.

Je třeba upozornit, že hodnoty LD₅₀ se pro některé organizmy v literatuře výrazně liší.

organismus	LD ₅₀ (Gy)	organismus	LD ₅₀ (Gy)
člověk	2,5–4	plazi (zmije)	80–200
opice	2,5–6	rostliny	3–500
pes	2,5–4	houby	300–500
prase	2,5–3,5	štíři	500–600
skot, kůň, koza	5,5–6,5	nematoda	50–1000
králík	7,5 – 8	hmyz (dospělí jedinci)	100–2000
netopýr	5–7,5 (LD ₁₀₀ 150)	želvušky (Tardigrade)	4200
hlodavci	5–11	prvoci	1000–5000
ptáci, drůbež	4–12 (20)	Deinococcus radiodurans	5000–12 000
žába	5–14	Micrococcus radiodurans	7500
ryby	8 – 20		
mlži, plži	50–200	Halobacterium	>11 000

⁶⁸ Dávka LD_{50/30} vede ke smrti 50 % ozářených jedinců do 30 dnů po expozici.

Důležitým faktorem rozhodujícím o časovém průběhu tkáňové odpovědi na ozáření je i typ buněk, ze kterých se tkáň skládá, respektive jejich mitotická aktivita. Různé buněčné typy se vyznačují různou citlivostí k ionizujícímu záření. Obecně citlivější jsou rychle se dělící buňky, např. aktivní kostní dřev, střevní, lymfoidní orgány a slizniční epitel. Rychle se dělící populace obsahují mnoho mitotických buněk, které trpí ozářením více než buňky v ostatních fázích buněčného cyklu. Neustálé dělení zároveň poskytuje jen krátký čas pro reparaci poškozené DNA a celkovou rekonvalescenci buněk. Ozáření výrazně proliferujících tkání se tak projeví již v krátké době po ozáření (díky smrti mnoha buněk), zároveň ale může být rychle opraveno prostřednictvím buněčné repopulace. Opačné chování pak charakterizuje pomalu proliferující tkáň – jejich poškození se manifestuje až po delší latentní periodě a hojí se jen pomalu, případně nabývá i chronického charakteru.

Na závěr ještě budiž zdůrazněno, že citlivost některých buněčných typů k deterministickým a stochastickým účinkům záření se výrazně liší. Například oční čočka snadno podléhá radiačnímu šedému zákalu⁶⁹, a přitom není znám žádný případ rakoviny čočky. Pro přehled a podrobný popis deterministických a stochastických účinků odkazujeme čtenáře na příslušnou kapitolu této knihy.

3.4.4 Smrt ozářených buněk

Neopravitelně poškozené buňky iniciují v závislosti na dávce záření a buněčném typu různé mechanismy buněčné smrti. Pro vysoké dávky (desítky až stovky Gy) celkově poškozující buněčný obsah je charakteristická okamžitá smrt nektrózou (**interfázní** nebo též **intermitotická smrt**). **Nektróza** začíná řádově v minutách po ozáření a končí rozpadem buněk s následným rozvojem zánětu. Produkty rozpadlých buněk a mediátory zánětu přitom negativně ovlivňují další buňky ve svém okolí.

Obecně nejčastější formu smrti buněk vystavených ionizujícímu záření však představuje **smrt mitotická**. Část vědecké obce interpretuje tento termín poměrně široce, jako nemožnost buňky dále se dělit poté, co buňka přežila akutní fázi po ozáření, avšak nezvládla opravit poškozenou DNA, a došlo u ní proto k zástavě buněčného cyklu. Buňky tedy mohou ještě nějaký čas přežívat a vykonávat své funkce předtím, než zemřou apoptózou nebo nektrózou. Tento scénář však odpovídá spíše přechodu buněk do senescence. Při užším pohledu na mitotickou smrt buňka umírá následkem chromozomálních aberací způsobujících kolaps buněčného dělení. Buňky překonají blok buněčného cyklu a vstoupí do mitózy, aniž by

⁶⁹ Prahová dávka pro vznik šedého zákalu oční čočky je 0.5 Gy pro jednorázovou dávku a 5–5,5 Gy pro protražovanou expozici.

dokončily opravu DNA. Smrt nastává kvůli nemožnosti odseparovat poškozené a nepatřičně pospojované chromozomy (mitotická katastrofa). Bez ohledu na přesnou definici mitotické smrti se její klinické symptomy projeví vždy až s určitým odstupem od ozáření, jehož délka odpovídá času potřebnému ke vstupu dostatečného množství buněk ve tkáni do mitózy. Doba latence proto výrazně závisí na typu ozářené tkáně.

Apoptóza je geneticky naprogramovaná smrt buňky, která kromě dalších funkcí zajišťuje ochranu organismu před nádorovým bujením. Pokud reparační systémy nezvládnou správně opravit poškozenou DNA, vyhodnotí buňka situaci jako nebezpečnou z hlediska zachování integrity genomu. Raději tedy spáchá sebevraždu, než aby dovolila přenos potenciálně karcinogenních mutací do dalších buněčných generací, a ohrozila tak celý organismus.

Apoptózou po ozáření umírají především radiosenzitivní buňky, například lymfocyty.

Senescence představuje mírnější, avšak též účinný ochranný mechanismus, při kterém se buňky trvale přestávají dělit, aniž by podlely smrti. Senescentní buňky dokážou do určité míry zastávat potřebné funkce, a okamžité následky pro tkáně a orgány jsou proto menší než při úmrtí buněk. Z dlouhodobějšího pohledu ale senescentní buňky vykazují aberantní biologické aktivity a tkáně trpí především sníženou sebeobnovovací a hojivou schopností (například po zranění). Z pohledu radioterapie se „ústup“ buněk do senescence považuje za veskrze pozitivní. Nové poznatky však nevylučují možnost, že některé senescentní buňky mohou za určitých okolností opět zahájit proliferaci. S ohledem na karcinogenezi (obecně) by tak vzhledem ke svému poškození představovaly pro organismus časovanou bombu.

3.5 Faktory ovlivňující radiační poškození buněk a buněčnou odpověď na ozáření

Biologický účinek záření závisí na mnoha faktorech. Kromě již diskutované dávky a dávkového příkonu mají zásadní význam také fyzikální parametry záření, typ ozářených buněk a jejich fyziologický stav (fáze buněčného cyklu, struktura chromatinu apod.).

3.5.1 Vliv typu ionizujícího záření na poškození DNA

V dosavadním textu jsme při zkoumání účinků ionizujícího záření zohledňovali pouze absorbovanou dávku. Absorbovaná dávka je však makroskopická veličina, která nám neříká nic o tom, jakým způsobem byla energie v buňce deponována. A právě v tom se různé typy ionizujícího záření v důsledku svých unikátních fyzikálních charakteristik zásadně odlišují. Záření gama a rentgenové záření jsou svou povahou proudy vysokoenergetických fotonů (tj. patří mezi elektromagnetická záření), takže nenesou žádný náboj, mají nulovou klidovou hmotnost, šíří se rychlostí světla a okolní prostředí ionizují pouze nepřímo. Průchod látkou

proto oba tyto typy záření brzdí jen minimálně, takže v ní dosahují dlouhého doletu a ionizační události se řídce rozprostírají podél celé dráhy letu částice. Na opačném pólu fyzikálních vlastností stojí neutronové záření, záření alfa a urychlené těžké ionty. Neutrony jsou nenabitě částice, které interagují výhradně s atomovými jádry, což vede k jejich rychlému zpomalování. Jednotlivé ionizace se tak koncentrují podél relativně krátké dráhy. Neutrony proto ve srovnání se zářením gama nebo X ionizují podstatně hustěji, přestože pouze nepřímo. Ještě vyšší hustotu ionizací vykazují těžké nabitě částice – záření alfa (jádra hélia) a urychlené těžké ionty. Hustotu, s jakou záření předává svou energii prostředí, popisuje již dříve uvedená veličina LET (lineární přenos energie). Na základě LET dělíme záření na **typy s nízkým LET** (paprsky γ a X, záření β)⁷⁰, jež při průchodu tkání vytváří asi 100 iontových párů/ μm , a **typy s vysokým LET** (neutrony, částice α , urychlené ionty), jež generují až 2000 iontových párů/ μm .

Fyzikální vlastnosti různých typů ionizujícího záření se samozřejmě promítají do charakteru poškození DNA na mikroskopické úrovni. Protože nenabitě fotony (gama, X) předávají svou energii okolnímu prostředí mnohem neochotněji než např. nabitě těžké urychlené částice (viz výše), musí pro dosažení stejné absorbované dávky dopadnout na buňku výrazně větší počet fotonů než těžkých částic. Připočteme-li k tomu ještě rozdílný efekt LET na distribuci ionizačních událostí a interakcí s DNA podél dráhy průletu částice jádrem, získáme pro fotony a těžké ionty mikrodozimetricky neporovnatelný obraz poškození buněčného jádra a DNA. Ten se významně odrazí i v cytogenetických a biologických dopadech ozáření. Charakteristickým typem radiogenetických defektů po expozici fotonovému záření budou **jednoduché interchromozomální aberace**, víceméně homogenně rozptýlené po celém jádře⁷¹. V buňkách vystavených těžkým iontům naopak převáží složité **komplexní a mnohočetné aberace**, postihující zejména vzájemně sousedící chromozomy zasažené prolétávající částicí, a **intrachromozomální přestavby**. Důvodem je koncentrace velkého množství zlomů (a jiných poškození) DNA v malých objemech podél dráhy letu částic. Z výše popsaných cytogenetických pozůstatků ozáření lze vyvodit, že schopnosti buněk opravit a vyrovnat se s radiačním poškozením DNA výrazně závisí na LET a případně i dalších parametrech absorbovaného záření. Komplexní DSB se evidentně opravují jen velmi obtížně, přičemž hrozí vysoké riziko ztráty genetické informace, nesprávného spojení konců

⁷⁰ LET není pro fotonová záření definováno; je-li proto LET použito v kontextu těchto záření, odkazuje na LET indukovaného sekundárního záření.

⁷¹ Přestože euchromatin vykazuje oproti heterochromatinu vyšší citlivost k poškození volnými radikály (kap. 3.5.3), distribuci lézí DNA v buněčném jádře můžeme pro záření s nízkým LET (gama, X) považovat víceméně za homogenní, zejména ve srovnání se situací po expozici buněk záření s vysokým LET.

fragmentované DNA, a často i celkového selhání reparace. Většina vědců se proto přiklání k hypotéze, že právě schopnost hustě ionizujícího záření indukovat komplexní dvouřetězcové zlomy, nebo dokonce klastry těchto poškození, nejlépe vysvětluje jeho vysoký radiobiologický účinek. Smrt buňky po ozáření hustě ionizujícím zářením je proto také mnohem méně než v případě řídké ionizujícího záření ovlivněna stavem buňky a jejími možnostmi reparovat běžné dvouřetězcové zlomy. Hustě ionizující záření také tolik nespolehá na reaktivní radikály, což má zásadní význam např. při radioterapii hypoxických nádorů. Pomocí hustě ionizujícího záření můžeme proto efektivněji likvidovat i nádorové buňky rezistentní ke konvenční léčbě paprsky gama nebo X. Na druhou stranu ale nelze vyloučit vyšší riziko sekundárních malignit, na což poukazuje i nadměrný výskyt nádorových onemocnění u osob s komplexními změnami karyotypu po expozici hustě ionizujícímu záření⁷² (např. pracovníci závodu Majak na výrobu plutonia).

Schopnost záření poškozovat DNA a usmrcovat buňky se zvyšuje s LET až do hodnoty asi 100–200 keV/μm, dle typu částice. Nad touto hodnotou se již projevuje tzv. **overkill efekt**, v jehož důsledku se závislost obrací a biologická účinnost záření s LET klesá. Jak totiž LET roste, zbavuje se záření energie ve stále větších „kvantech“. Tomu odpovídá i stupňující se komplexita defektů DNA v oblastech jednotlivých depozic energie, zároveň se ale snižuje počet depozičních míst. Při překročení uvedené hodnoty LET tak dochází k situaci, kdy další nárůst komplexity vytvářených lézí DNA již dále nepřispívá k účinnějšímu zabíjení buněk a dominantní vliv získává naopak úbytek počtu depozičních míst energie (tj. buněk zasažených zářením). Jinými slovy, na zabití některých buněk vynaloží záření zbytečně mnoho energie, která pak chybí na eliminaci buněk zbývajících.

Aby bylo možné zohlednit výše popsané rozdíly v charakteru depozice energie a porovnávat expozice jednotlivým druhům ionizujícího záření s ohledem na jejich biologickou nebezpečnost, násobí se absorbovaná dávka ještě tzv. **radiačním váhovým faktorem (w_R)**⁷³. Tato bezrozměrná veličina vyjadřuje, kolikrát je dané záření účinnější než záření gama nebo X. Pro záření gama se tedy $w_R = 1$. Totéž platí pro fotony obecně, elektrony a miony. Pro protony se pak uvádějí hodnoty 2–5, pro neutrony 2–20 (v závislosti na energii) a pro částice alfa, štěpné fragmenty a těžké ionty 20. Součin absorbované dávky a w_R označujeme jako

⁷² Využití těžkých iontů v medicíně ale naráží i na další problémy (ekonomické – je velmi drahé; fyzikální – např. dochází k fragmentaci částic; a biologické – problematické lokalizace a pohyb nádorů během ozařování atd.) a neposkytuje bohužel univerzální naději všem onkologickým pacientům. Každý typ záření se tak lépe hodí pro jiný typ nádoru.

⁷³ podobně se můžeme setkat i s tzv. dávkovým ekvivalentem (Q), který je však jinak definován; číselně ale koresponduje s w_R

ekvivalentní dávku. Ta má již výpovědní hodnotu z hlediska biologických účinků dané expozice (viz též poznámka pod čarou č. 64) a vyjadřujeme ji v sievertech [Sv]. Kromě radiačního váhového faktoru a dávkového ekvivalentu byla za účelem kvantifikace biologických účinků různých záření zavedena také veličina pojmenovaná jako „**radiobiologická účinnost záření**“ (RBU)(1).

(1) $RBU = \frac{D_R}{D_Z}$; kde D_R je dávka záření referenčního a D_Z dávka záření zkoumaného vedoucí ke stejnému biologickému efektu jako D_R .

V radiobiologii bývají radiační váhový faktor a RBU (v anglické literatuře RBE) často volně zaměňovány, což však není zcela správné. RBU není pouze charakteristikou daného druhu záření – kromě parametrů samotného záření se vztahuje ke specifickému biologickému účinku, buněčnému typu a charakteru expozice (např. dávce a dávkovém příkonu). Radiační váhový faktor lze proto chápat spíše jako veličinu, umožňující odhad RBU.

Obr. 3.6 Distribuce ionizací a lézí DNA po expozici buněk řídce (a) a hustě (b) ionizujícím záření

3.5.2 Vliv buněčného cyklu na poškození DNA

Citlivost buněk výrazně kolísá v průběhu buněčného cyklu. Nejcitlivější jsou buňky procházející dělením, tedy zrovna se nacházející v mitotické fázi. Citlivě reagují také buňky v pozdní fázi G_2 , případně i G_1 , mají-li dlouhý buněčný cyklus. Jako nejrezistentnější se naopak jeví buňky S-fázní, což může být poměrně překvapivé, vezmeme-li v potaz intenzivně probíhající replikaci a možný dopad radiačního poškození DNA na tento proces. Určité vysvětlení poskytují hladiny sloučenin se sulfhydrylovými skupinami, jež se během buněčného cyklu výrazně mění. Tyto sloučeniny fungují jako přirozená radioprotektiva schopná vychytávat volné radikály, přičemž jejich koncentrace nejvíce stoupá právě v S fázi a klesá v M fázi buněčného cyklu. Dalším důvodem zvýšené citlivosti mitotických buněk k záření je porušení struktury chromozomů v té nejméně vhodné době, kdy se separují do dceřiných buněk. Co se však děje s poškozenou DNA v mitóze, není úplně známo. Starší práce popisují zastavení reparačních pochodů s tím, že k opravě lézí DNA dochází teprve v následující fázi G_1 . Novější studie pak připouštějí určitou aktivitu reparačních systémů i v mitóze, přesto ale poukazují na tvorbu anafázních mostů, chromozomových aberací, známek genomické nestability nebo dokonce mitotickou katastrofu. Ať už se ale jedná o nižší

efektivitu reparace nebo její dočasnou absenci, obě tyto možnosti dobře vysvětlují zvýšenou citlivost mitotických buněk k záření.

3.5.3 Vliv struktury chromatinu na poškození DNA

Mitóza představuje jen krátké období v životním cyklu buňky. Většina buněk ve tkáni je tak ozářena v období mezi mitózami, během tzv. interfáze. V interfázních jádrech se chromozomy vyskytují v méně kondenzované formě než v mitóze – vytvářejí tzv. chromozomální teritoria, která mohou být např. pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) vizualizována jako různě velké, prostorově ohraničené chromatinové domény. Starší představa o zcela dekonenzovaných molekulách DNA volně plujících v buněčném jádře jako nudle v polévce je tedy zcela lichá. Obdobně jako na metafázních chromozomech lze i v teritoriích interfázních chromozomů rozlišit různé strukturně-funkční subdomény. Zejména se jedná o heterochromatin a euchromatin. Kondenzovaný heterochromatin obsahuje jen málo transkribovaných genů, intenzívně se barví barvivy DNA (DAPI, TOPRO3, apod.) a váže se na něj mnoho proteinů. Dekondenzovaný euchromatin je naopak geneticky aktivní a vykazuje oproti heterochromatinu obecně opačné strukturní a funkční vlastnosti. Názory na citlivost heterochromatinu a euchromatinu k záření se vyvíjely po mnoho let. Dnes se zdá nejpravděpodobnější, že za běžných podmínek (záření γ nebo X) trpí radiačním poškozením více euchromatin. Proteiny asociované s heterochromatinem (např. HP1) totiž lépe stíní DNA proti volným radikálům (uvolňujícím se radiolýzou vody), jež v případě záření γ nebo X způsobují největší újmu. Navíc těchto radikálů vzniká v kondenzovaném heterochromatinu méně než ve hydratovaném euchromatinu. Uvedené protektivní faktory nicméně ztrácejí svůj význam v buňkách ozářených hustě ionizujícím zářením, kde dominuje jeho přímý efekt. Poškození DNA prostřednictvím samotných (primárních i sekundárních) částic záření totiž nemůže zabránit žádná struktura chromatinu. Kondenzovaný heterochromatin navíc pro záření (s vysokým LET) poskytuje mnohem více terčů na jednotku objemu než euchromatin. S ohledem na biologické účinky záření se tak odhaluje nejen důležitost struktury chromatinu obecně, ale i provázanost interakcí mezi strukturou chromatinu a fyzikálními vlastnostmi záření.

Různá citlivost strukturně a funkčně odlišných chromatinových domén k indukci lézí DNA však není jediným fenoménem, který stojí za to v souvislosti s vlivem struktury chromatinu na biologické účinky záření prezentovat. Struktura chromatinu, a zejména pak výše popsaná architektura buněčného jádra, totiž hraje zásadní úlohu i v mechanismu tvorby chromozomálních aberací. Například pro chromozomální translokace se dříve předpokládalo,

že riziko chromozomálních výměn mezi specifickými geny závisí čistě na jejich vzájemné prostorové vzdálenosti v buněčném jádře. Novější výsledky však naznačují, že pravděpodobnost určité translokace (nebo jiné aberace) významně ovlivňují také struktura a organizace chromatinu v oblasti jádra mezi potenciálně translokovanými lokusy. Ilustrativní příklad popisuje **Obr. 3.7**. Struktura chromatinu má zásadní dopad také na reparaci DNA (viz níže).

Obr. 3.7 Vliv struktury chromatinu a architektury buněčného jádra na vznik chromozomálních translokací. Podle původní hypotézy pravděpodobnost translokace mezi dvěma geny závisela pouze na jejich vzájemné vzdálenosti v buněčném jádře. V nastíněné situaci by tedy translokace nejčastěji probíhala mezi lokusy C a B, které jsou si nejbližší. Nové poznatky ale poukazují i na zásadní vliv struktury chromatinu vyššího řádu. Např. heterochromatinová bariéra mezi lokusy C a B brání jejich vzájemné interakci. Dekondenzace chromatinu během reparace DNA navíc nutí tyto lokusy expandovat do jiných oblastí buněčného jádra. V případě lokusů A a C struktura chromatinu naopak podporuje jejich expanzi do společného jaderného prostoru, a tudíž i možnost translokace. Šance na vytvoření translokace je tak vyšší pro lokusy A a C, přestože lokusy C a B jsou si v buněčném jádře původně blíže. Lokus D je už patrně příliš vzdálen, než aby mohl s ostatními (A a C) běžně interagovat (podrobněji viz doporučená literatura, Falk et al., Mutation Research - Reviews in Mutation Research, 2010).

3.6 Opravy poškozené DNA

I malé množství defektů v molekule DNA vede k zástavě buněčného cyklu prostřednictvím stimulace jeho kontrolních bodů (cell cycle checkpoints). Buňka tím získává čas ke spuštění robustní odpovědi na ozáření. Tato odpověď zahrnuje především aktivaci sítě biochemických drah zaměřených na opravu a zachování funkce nejkritičtější buněčné molekuly, DNA. Pokud poškození překročí kritickou mez nebo jeho oprava selže, uvádí buňka v činnost sebevražedné biochemické dráhy vedoucí k apoptóze. Svým sebeobětováním tak zabrání přenosu potenciálně nebezpečných mutací do následujících buněčných generací. Je tedy zřejmé, že efektivita reparačních systémů má rozhodující vliv na osud ozářené buňky. Neúčinná reparace může vyústit ve smrt mnoha buněk a akutní poškození deterministického charakteru, zatímco nepřesná reparace způsobí efekty stochastické. Existuje celá řada vrozených mutací reparačních genů, jejichž přítomnost se manifestuje různě závažnou radiosenzitivitou postižených jedinců a predispozicí k nádorovým onemocněním. Aby dokázaly buňky odolávat neustálému mutačnímu tlaku, „vyvinuly si“ v průběhu evoluce celou řadu reparačních systémů, z nichž každý se přednostně opravuje jiný typ lézí DNA. Komplexnější popis

reparačních procesů a jejich provázanosti přesahuje možnosti této kapitoly. Zjednodušeně jsou základní principy reparačních procesů ilustrovány v kapitolách níže.

3.6.1 Opravy bazí a nesprávně spárovaných nukleotidů

Poškozené baze a špatně spárované nukleotidy patří mezi snáze opravitelná poškození DNA, protože postihují jen jeden její řetězec. Na chemicky modifikované (oxidované, alkylované, či jinak defektní) baze cílí **bázová excizní reparační (BER)**. Trochu v rozporu s názvem této reparační dráhy však BER nevyštěpuje z DNA pouze samotné abnormální baze, nýbrž celé nukleotidy⁷⁴. Vzniknuvší mezery v DNA jsou následně zaplněny nukleotidy novými, komplementárními k bazím v protilehlém (nepoškozeném) řetězci.

K opravě lézí DNA, které působí výrazné konformační distorze DNA molekuly, slouží **nukleotidová excizní reparační (NER)**. Specializuje se například na pyrimidinové dimery (UV záření), objemné adukty proteinových radikálů a dalších reaktivních chemikálií na DNA nebo léze objevující se následkem zesíťování DNA prostřednictvím křížových vazeb mezi nukleotidy (DNA crosslinks). V některých případech může zastoupit i BER, je-li tato dráha nefunkční. Existují dvě rozdílné varianty NER, z nichž jedna je funkčně vázána na transkripci. Obecně ale NER probíhá obdobně, jako BER, s tím rozdílem, že během NER dochází k vyštěpení rozsáhlejších úseků (12–13 nt) poškozeného řetězce DNA.

Oprava chybného párování bazí (mismatch repair, MMR) se zaměřuje na nukleotidy, jež byly do DNA řetězce nesprávně zařazeny během replikace⁷⁵ a unikly korekturní (proofreading) aktivitě samotné DNA polymerázy. Substrátem pro MMR jsou také tzv. IDL smyčky (insertion-deletion loops), příležitostně se tvořící v DNA následkem drobných inzercí nebo delecí po nepřesné replikaci. Protože špatně spárované nukleotidy nemusí být poškozeny, vyvstává zde zásadní problém, jak identifikovat řetězec s nezměněnou genetickou informací. Princip, na jakém buňka toto rozhodnutí činí, byl zatím spolehlivě popsán pouze u gramnegativních bakterií. *E. coli* využívá například skutečnosti, že nově syntetizovaný řetězec DNA ještě nestihl být metylován na adeninu v sekvencích GATC. Proteiny podílející se na MMR umí tuto metylaci detekovat, a odstranit tak nepatřičný nukleotid ze správného řetězce. U člověka je nově syntetizovaný řetězec rozpoznán patrně dle jednořetězcových zlomů, které v něm vznikají během replikace. Aby mohlo dojít k nalezení nejbližší sekvence GATC nebo

⁷⁴ Mechanismus BER: enzymy zahrnuté v BER nejdříve odštěpí poškozenou bazi za vzniku abazického místa, poté za abazickým místem vytvoří v cukr-fosfátové páteři DNA jednořetězcový zlom, na uvolněný konec DNA přidají správný nový nukleotid s nepoškozenou bází, odstraní původní deoxyribózu s fosfátovým zbytkem, a nakonec opět DNA řetězec spojí.

⁷⁵ Např. adenin (A) byl namísto cytozinu (C) vložen oproti guaninu (G).

zlomu řetězce, musí MMR odseparovat a následně odstranit ještě delší (~1000 nt) úseky DNA než NER. V některých případech vedou aktivity MMR k sekundární tvorbě dvouřetězcových zlomů, takže je pak nezbytné opravu DNA dokončit pomocí homologní rekombinace. Nejen tato skutečnost poukazuje na vzájemnou kooperaci a provázanost jednotlivých reparačních drah, jež v poslední době vyplouvá stále více na povrch. BER se může například spolupodílet na opravách zkřížených vazeb DNA a oxidovaných bazí a také buněčné signalizaci po poškození DNA.

3.6.2 Opravy zlomů DNA

Zatímco jednořetězcové zlomy DNA (SSB) dokáže buňka jednoduše a rychle spojit, dvouřetězcové zlomy (DSB) představují díky současnému přerušení obou řetězců v jednom místě molekuly DNA vůbec nejhůře opravitelné léze indukované ionizujícím zářením. Existují dva základní mechanismy reparace DSB – **nehomologní spojování konců (NHEJ)** a **homologní rekombinace (HR)**. Liší se zejména využitím homologního templátu, tj. sesterské chromatidy, jež umožňuje přesnou rekonstrukci původní genetické informace. **NHEJ** (z anablického non-homologous end-joining) prostřednictvím komplexu DNA ligázy IV jednoduše spojí volné konce DNA, v případě radiačně indukovaných DSB většinou po jejich předchozím „začištění“⁷⁶. Jinými slovy, opravné kroky na rozdíl od homologické rekombinace nezávisí na přítomnosti nepoškozené chromatidy. To s sebou přináší řadu výhod i nevýhod. NHEJ vyniká především rychlostí a probíhá ve všech fázích buněčného cyklu. Proto tento způsob opravy převažuje u vyšších eukaryot, jejichž genomy často dosahují velkých rozměrů. Lze totiž předpokládat, že i v takto velkých genomech stihne tento mechanismus eliminovat rozsáhlá poškození v natolik krátké době, aby se zabránilo masivní tvorbě chromozomálních aberací a smrti buňky. NHEJ navíc vykazuje značnou substrátovou robustnost a schopnost spojit i chemicky různě modifikované konce DNA. Za rychlost a univerzálnost však NHEJ platí výrazně nižší přesností reparace oproti HR. V případě endogenně indukovaných DSB se nejedná o příliš závažný problém, jelikož není před vlastním spojením konců vyžadováno jejich enzymatické opracování, a NHEJ tak funguje relativně spolehlivě. Ionizující záření ale indukuje strukturně problematictější dvouřetězcové zlomy, jejichž konce nejde většinou spojit bez předchozího „začištění“. Často navíc vznikají i výrazně komplexní léze⁷⁷ a mnohočetné zlomy DNA, jež představují pro reparační

⁷⁶ Na 3'-konci řetězce DNA musí být –OH skupina a na 5'-konci fosfátový zbytek.

⁷⁷ Komplexní léze kromě DSB v sobě spojují DSB a další typy poškození DNA.

mechanizmy opravdovou výzvou. V ozářených buňkách se proto nepřesnost NHEJ výrazně zvyšuje a v podstatě vždy dochází k drobným změnám (zejména krátkým delecím) genetického materiálu. Komplexita DSB klastrů a lokální fragmentace chromatinu roste s hodnotou LET záření. Totéž proto platí pro pravděpodobnost a rozsah permanentních poškození DNA. Naštěstí jen asi 1 % lidské jaderné DNA kóduje geny, a ještě výrazně menší procento pak geny kritické z hlediska karcinogeneze. Shrňeme-li všechna uvedená fakta, lze tvrdit, že NHEJ účinně chrání buňky (zejména organismů s velkými genomy) před tvorbou chromozomálních aberací vedoucích k mitotické smrti buňky, při akceptovatelném riziku kontaminace genomu potenciálně nebezpečnými mutacemi.

Principiálně odlišným procesem je **homologní rekombinace (HR)**, která využívá sekvence DNA nepoškozené sesterské chromatidy k přesné rekonstrukci chromatidy poškozené. Resekční enzymy nejprve z molekuly DNA odstraní dlouhý úsek 5'-řetězce v obou směrech od místa DSB. Na zlomených koncích DNA se tak vytvoří dlouhé jednořetězcové přesahy 3'-řetězců. Jeden z těchto přesahů se za pomoci příslušných reparačních proteinů (zejména RAD51) vmezeří mezi DNA řetězce sesterské chromatidy, kde se na základě komplementarity bazí k jednomu z nich přichytí. Tímto krokem mají polymerázy zajištěn templát pro syntézu chybějící části poškozeného řetězce a úplnou obnovu jeho původní genetické informace. Po proběhnutí opravné syntézy se takto doplněný řetězec od sesterské chromatidy uvolní a znovu se spáruje s komplementárním úsekem původního partnerského řetězce v poškozené chromatidě. Již opravený řetězec nyní poskytuje templát pro dosyntetizování chybějící části druhého (partnerského) poškozeného řetězce. Alternativně k tomuto účelu slouží i doposud nevyužitý řetězec DNA nepoškozené sesterské chromatidy. Ten byl ze své původní dvoušroubovice vytlačen prodlužujícím se prvním poškozeným řetězcem, a může se tak s druhým poškozeným řetězcem snadno párovat. HR tak postupně konvertuje původně dvouřetězcový zlom⁷⁸ na dva vzdálené izolované jednořetězcové zlomy, které již neohrožují integritu DNA a lze je snadno spojit.

Homologní rekombinace probíhá mnohem složitější a pomalejší než NHEJ, navíc vzhledem k potřebě sesterské chromatidy pouze v pozdní S a G₂ fázi buněčného cyklu. Zato se jedná, až na určité výjimky, o mechanismus neskutečně přesný. Předpokládá se, že vzhledem k těmto charakteristikám využívají HR ke své reparaci zejména aktivní geny, z nichž mnohé jsou z hlediska mutageny a ohrožení buňky ionizujícím zářením kritickými cíli. Pro omezení HR na transkribované geny existuje i další důvod – neaktivní chromatin často obsahuje repetitivní

⁷⁸ DSB v podstatě odpovídá dvěma jednořetězcovým zlomům vyskytujícím se v komplementárních řetězcích DNA v nezájem si víceméně protilehlé poloze.

sekvence, které významně snižují přesnost tohoto reparačního mechanismu. Jak se však buňka rozhoduje pro NHEJ nebo HR v případě konkrétního dvouřetězcového zlomu zůstává jednou ze základních radiobiologických otázek. Zdá se, že vliv má patrně vícero faktorů než zmíněná fáze buněčného cyklu a genetická aktivita chromatinu. Svou roli hraje patrně i struktura chromatinu v okolí konkrétního zlomu, komplexita zlomu a typ buněk.

Specifický fenomén z hlediska reparace představují vysoce **komplexní dvouřetězcové zlomy**, respektive klastry dvouřetězcových zlomů a dalších typů lézí, indukované hustě ionizujícím zářením. Nezdá se, že by pro tyto léze, i přes jejich existenciální nebezpečnost, existoval nějaký specifický reparační mechanismus. Patrně tedy spolu kooperují všechny ostatní již popsané mechanismy.

Odpověď buňky na ozáření tak spíše než selektivní zapínání jednotlivých reparačních drah připomíná aktivaci jakési dynamické seberegulovatelné sítě provázaných reparačních mechanismů, pružně se přizpůsobujících konkrétní, velmi komplexní situaci. Ve skutečnosti totiž existují i určité hybridní mechanismy spojující různé aspekty NHEJ a HR, například tzv. **jednořetězcová hybridizace** (single strand annealing, SSA) nebo **mikrohomologií zprostředkované spojování konců** (microhomology-mediated end-joining, MMEJ). Tyto mechanismy zahrnují jistou míru resekce zlomených konců DNA, podobně jako u HR, avšak probíhají i v G₁ fázi buněčného cyklu a namísto skutečných homologií využívají jen krátké mikrohomologie (často poskytované například repetitivními sekvencemi). SSA i MMEJ jsou proto mutagení a slouží patrně hlavně jako záložní mechanismy tam, kde NHEJ a HR z nějakého důvodu selhávají. Vzhledem k uvedenému můžeme jen stěží mluvit o vyhraněných reparačních drahách, jak je literatura povětšinou prezentuje.

3.6.3 Význam reparačních systémů pro život

Pro docenění důležitosti reparačních systémů DNA si musíme uvědomit, že nejsou ani zdaleka omezeny na likvidaci defektů vyvolaných ionizujícím zářením. Ve skutečnosti DNA permanentně poškozují jak ataky nejrůznějších environmentálních faktorů, tak zejména samotné vnitrobuněčné procesy (energetický metabolismus, replikace a reparace DNA, produkce protilátek atd.). Odhaduje se, že jejich následkem denně vznikne zhruba 2×10^4 až 1 milion různých lézí DNA v každé buňce lidského těla. To odpovídá minimálně asi 850 lézím každou hodinu. Jen během jednoho replikačního cyklu buňky se v DNA díky aktivitě volných radikálů (ROS) objeví alespoň 5000 jednořetězcových zlomů, z nichž zhruba 1 % je následně

konvertováno na dvouřetězcové zlomy (tj. cca. 50 DSB/replikační cyklus)⁷⁹. Přitom teoreticky i jediný dvouřetězcový zlom může vést k smrti buňky, zůstane-li neopraven, případně nádorové transformaci, je-li opraven nesprávně.

Kromě nádorové transformace hraje akumulace dvouřetězcových zlomů a případných následných mutací zásadní úlohu také v procesu stárnutí, rozvoji chronického zánětu a progresi některých nenádorových, zejména neurodegenerativních chorob. Lze tedy bez nadsázky konstatovat, že bez reparačních systémů by nebylo života, alespoň v takové podobě, jak ho známe.

Naprostá bezchybnost oprav DNA, byť představitelná pouze teoreticky, by byla ale kontraproduktivní z hlediska evoluce. Aby mohl probíhat vývoj organismů, musí být DNA na jednu stranu stabilní, aby umožňovala spolehlivé uchování genetické informace, na druhou stranu si ale musí zachovávat určitý stupeň proměnlivosti. V extrémní podobě se „evoluce“ projevuje u nádorových buněk, které mají kromě častých defektů v reparačních mechanismech také nefunkční kontrolní body buněčného cyklu. Poškození DNA, nejen že tak není správně opraveno, ale přenáší se i do dalších buněčných generací. To umožňuje zrychlený vývoj nejrůznějších nádorových buněk a postupnou selekci agresivnějších a k léčbě stále rezistentnějších klonů. Na druhou stranu právě na uvedené defekty reparace a regulace buněčného dělení spoléhá i terapie (radioterapie, chemoterapie) nádorů.

Základní literatura:

1. HÁLA, J. *Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie*. Brno: Konvoj, 1998. ISBN 80-85615-56-8.
2. FRIEDBERG, E. C.; ELLEDGE, S. F.; LEHMANN, A. R.; LINDAHL, T.; MUZI-FALCONI, M. (Eds.). *DNA Repair, Mutagenesis, and Other Responses to DNA Damage. (Cold Spring Harbor Perspectives in Biology)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013. ISBN-10:1936113546, ISBN-13:978-1936113545.
3. DIRK-HENNER LANKENAU (Ed.). *Genome Dynamics & Stability. Genome Integrity: Facets and Perspectives*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. ISBN-10 3-540-37528-7, ISBN-13 978-3-540-37528-9. DOI 10.1007/b104871.
4. KUM KUM KHANNA, YOSEF SHILOH (Eds.). *The DNA Damage Response: Implications on Cancer Formation and Treatment*. Springer Science+Business Media

⁷⁹ což přibližně odpovídá ozáření buňky 1-2 Gy záření gama

- B.V., Dordrecht Heidelberg London New York, 2009. ISBN 978-90-481-2560-9, e-ISBN 978-90-481-2561-6, DOI 10.1007/978-90-481-2561-6.
5. THEODORE L. DeWEESE, MARIKKI LAIHO (Eds.). *Current Cancer Research. Molecular Determinants of Radiation Response*. Springer Science+Business Media LLC., New York Dordrecht Heidelberg London, 2011. ISBN 978-1-4419-8043-4, e-ISBN 978-1-4419-8044-1, DOI 10.1007/978-1-4419-8044-1.
 6. FALK, M. 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*. 2011, vol. 24, no. 3, pp. 225–47. PMID: 25072148.
 7. FALK, M.; LUKASOVA, E.; KOZUBEK, S. Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res*. 2010, vol. 704, no. 1–3, pp. 88-100. doi:10.1016/j.mrrev.2010.01.013.
 8. ZÖLZER, F.; KUNA, P.; NAVRÁTIL, L. *Mechanismy účinků ionizujícího záření*. České Budějovice: Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity, 2007.
 9. PEJCHAL, J.; ÖSTERREICHER, J.; VÁVROVÁ, J. Biodozimetrie: Dicentrická analýza a předčasná chromozomová kondenzace (PCC). *Vojenské zdravotnické listy*. 2007, vol. 76, no. 3, pp. 95-104.
 10. LIŠČÁK, R. et al. *Radiochirurgie gama nožem – Principy a neurochirurgické aplikace*. 1. vyd. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-2350-1.