

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Biomarkery ozáření v krevní plasmě leukemických pacientů

Písemná práce k doktorské zkoušce

Jméno:	Mgr. Gabriela Rydlová
Studijní program:	P1501 - Biologie
Studijní obor:	Aplikovaná biologie a ekologie
Vedoucí práce:	RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.
Konzultant práce:	pplk. gšt doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci pod vedením vedoucího práce vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité prameny a literaturu. Výsledky v předložené práci jsou originálními údaji, které byly získány během doktorského studia.

V Hradci Králové dne

Mgr. Gabriela Rydlová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D., která mě zasvětila do oblasti proteomiky a hmotnostní spektrometrie, dávala mi užitečné rady a konzultace v průběhu celého doktorského studia. Dále bych chtěla poděkovat za pomoc, konzultace, vstřícné jednání, rady v oblasti radiobiologie a publikační činnosti pplk. gšt. doc. PharmDr. Alešovi Tichému, Ph.D.

Poděkování patří i zaměstnancům Katedry radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví na Univerzitě Obrany v Hradci Králové. Zejména RNDr. Pavlu Řehulkovi, Ph.D. a Věrce Vozandychové Ph.D., kteří mi pomohli s úpravami metodiky a zpracováním vzorků, orientací v programu Proteome Discoverer a změřením vzorků na hmotnostním spektrometru. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za jejich podporu v průběhu celého mého doktorského studia.

Děkuji také Univerzitě Hradec Králové za finanční podporu v podobě specifických výzkumů (2106/2019; 2108/2020; 2105/2021), ze kterých byly hrazeny všechny experimenty, výjezdy na konference a kurzy. Výjezd na zahraniční stáž byl financován z programu ERASMUS+.

Anotace

Při radiačních událostech či nehodách, jejichž riziko objektivně stoupá, je očekáván velký počet suspektně ozářených osob, pro jejichž správnou terapii je klíčový údaj o obdržené dávce. Jedno z možných řešení nabízí využití analytických možností metod hmotnostní spektrometrie u proteinů krevní plasmy, jejíž získání je minimálně invazivní.

Proteiny citlivé na záření, jakož i jejich kombinace s hematologickými biomarkery byly navrženy jako biomarkery pro použití při posuzování radiační expozice a mohou poskytovat diagnostické informace o radiačním poškození specifického orgánu. Předkládaná práce obsahuje dosavadní výsledky týkající se identifikace proteinových biomarkerů v krevní plasmě. Tato studie je unikátní v tom, že byly použity lidské krevní vzorky ozářené *in vivo*. Bylo zjištěno, že proteiny účastní se odbourávání reaktivních forem kyslíku (ROS), opravách DNA, či imunitních a zánětlivých signálních drah mají tendenci měnit své přirozené hladiny v plasmě. Získané výsledky byly porovnávány se vzorky prasečí plasmy.

RYDLOVÁ, G. Biomarkery ozáření v krevní plasmě leukemických pacientů. Hradec Králové, 2024. Disertační práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí disertační práce RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D. 160 s.

Klíčová slova

Biomarker, proteomika, hmotnostní spektrometrie, ionizující záření, lidská plasma

Annotation

The risk of radiation events or accidents is objectively increasing, so a large number of suspected exposed people is expected. To decide the correct therapy the data of the received dose is crucial. One possible solution is to use the analytical capabilities of mass spectrometry methods for blood plasma proteins, the acquisition of which is minimally invasive.

Radiation-sensitive proteins, as well as their combination with haematological biomarkers have been proposed as biomarkers for use in assessing radiation exposure and can provide diagnostic information on radiation damage to a specific organ. This work presents previous results of the identification of protein biomarkers in blood plasma. The study is unique because of the usage of human blood samples irradiated *in vivo*. The proteins involved in reactive oxygen species (ROS) degradation, DNA repair, or immune and inflammatory signaling pathways tend to alter their natural plasma levels. The obtained results were compared with porcine plasma samples.

RYDLOVÁ, G. Biomarkers of radiation exposure in blood plasma of leukemia patients. Hradec Kralove, 2024. Doctoral thesis at Faculty of Science, University of Hradec Kralove. Thesis supervisor RNDr. Alena Myslivcova Fucikova, Ph.D. 160 p.

Keywords

Biomarker, proteomics, mass spectrometry, ionizing radiation, human plasma

Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část	13
1.1 Ionizující záření.....	13
1.1.1 Nemoc z ozáření.....	15
1.1.2 Dráhy působení IZ na organismus a buňky	21
1.1.3 Reaktivní formy kyslíku.....	22
1.2 Biomarkery radiačního poškození	23
1.3 Metabolomika a ionizující záření	25
1.4 Genomika a ionizující záření	26
1.5 Proteomika a ionizující záření	27
1.6 Hmotnostní spektrometrie.....	29
1.6.1 Iontové zdroje.....	30
1.6.2 Hmotnostní analyzátory	33
1.6.3 Hmotnostní detektory	37
1.6.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	38
1.7 Kvantitativní proteomika	39
1.7.1 Absolutní kvantifikace.....	40
1.7.2 Relativní kvantifikace	41
2 Praktická část.....	44
2.1 Přístrojové vybavení.....	44
2.2 Kity.....	45
2.3 Kolony	45
2.4 Chemikálie.....	45
2.5 Materiál.....	46
2.6 Programové vybavení.....	47
2.7 Charakteristika a odběr vzorků od leukemických pacientů	48

2.7.1	Získání plasmy z plné krve	50
2.7.2	Úprava vzorků a odstranění vysoce zastoupených proteinů v lidské plasmě	50
2.7.3	Úprava vzorků po imunodepleci	54
2.7.4	Stanovení bílkoviny metodou BCA na mikrotitrační destičce	55
2.7.5	Gelová elektroforéza	55
2.7.6	Enzymatické štěpení a přečištění	56
2.8	Charakteristika a odběr vzorků od miniprasat.....	57
2.8.1	Získání plasmy z plné krve a úprava vzorků prasečí plasmy	58
2.8.2	Odstranění vysoce zastoupených proteinů v prasečí plasmě	58
2.8.3	Enzymatické štěpení a přečištění	59
2.9	Relativní kvantifikace	60
2.10	LC-MS/MS analýza	63
2.11	Zpracování získaných dat	64
3	Výsledky a diskuze	66
3.1	Výběr vzorků	66
3.2	Optimalizace postupu odstranění abundantních proteinů	68
3.3	Výběr biomarkerů ozáření v lidské plasmě	76
3.4	Doplnění panelu biomarkerů ozáření o proteiny izolované z prasečí plasmy	95
3.5	Zhodnocení biomarkerů ozáření u prasečí a lidské plasmy	107
4	Závěr	109
5	Použitá literatura	112
6	Přehled souvisejících publikačních činností	135
7	Přílohy	136

Seznam použitých zkratek

ACTN1	actin alpha 1
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
ARS	akutní radiační syndrom (Acute Radiation Syndrom)
BAX	Bcl -2- associated x protein
BBC3	binding component 3 gene
BCA	kyselina bicinchoninová (Bicinchoninic Acid)
CID	kolizní indukovaná disociaci
CCNG1	cyclin G1
CDKN1A	cyclin dependent kinase inhibitor 1 A
DC	stejnoseměrný proud (Direct Current)
DESI	desorpční ionizace elektrosprejem (Desorption Electrospray Ionization)
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
ETD	disociace přenosem elektronů
FWHM	veličina (full width at half maximum)
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible 45 alpha
GAPDH	glyceraldehyd 3 - phosphate dehydrogenase
GIT	gastrointestinální trakt
HCD	kolizní disociace pro vyšší energii
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HR	homologní rekombinace
ICAT	izotopově kódované afinitní značky (Isotope-Coded Affinity Tags)
ILK	integrin-linked kinase
iTRAQ	izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification)
IZ	ionizující záření
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

	(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní Spektrometrií (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)
LET	lineární přenos energie (Linear Energy Transfer)
LFQ	kvantifikace bez nutnosti značení (Label free quantification)
LIT	lineární iontová past (Linear Iont Trap)
LNT	lineárně bezprahový model (Linear non-treshold)
MALDI	ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MDM2	mouse double minute 2 gen
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
MYC	myelocystomatosis proto-oncogene
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
NHEJ	nehomologní spojování konců
OT	orbitrap
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
POLH	DNA polymerase Eta
PRM	paralelní sledování vybraných reakcí (Parallel Reaction Monitoring)
Q	kvadrupólový analyzátor (Quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole)
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Reverse Transcripton Polymerase Chain Reaction)
RF	vysokofrekvenční střídavé napětí (Radio Frequency)
ROS	reaktivní forma kyslíku (Reactive Oxygen Species)
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time Polymerase Chain Reaction)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	jednorozměrná sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza

SESN1	sestrin 1
SILAC	značení stabilními izotopy pomocí aminokyselin v buněčné kultuře (Stable Isotope Labeling by Aminoacid in Cell Culture)
TBI	celotělové ozáření (total body irradiation)
TCEP	tris (2- carboxyethyl) phosphine
TEAB	hydrogenuhličitan triethylamonný
TMT	tandemové hmotnostní značky (Tandem Mass Tag)
TOF	analyzátor doby letu (Time of Flight)
TUBA4A	tubulin alpha-4 A chain
XPC	xeroderma pigmentosum complementation group C

Úvod

Při radiačních nehodách a případné hrozbě nukleárních incidentů stoupá riziko výskytu nemoci z ozáření. Při těchto událostech se očekává velké množství suspektně ozářených osob, u kterých je nutné v co nejbližší době zjistit míru expozice a obdrženou dávku. K rozlišení ozářených a neozářených osob se využívá principů biologické dozimetrie, která v posledním desetiletí zažívá velký rozvoj. Velká pozornost je věnována biomarkerům ozáření, které poskytují cenné informace. V současné době používané biodozimetrické metody jsou časově velmi náročné a je zapotřebí vysoce erudovaných pracovníků. Proto je třeba najít nové metody s vyšší kapacitou a specifické biomarkery, které by pomohly v krátkém časovém úseku odhadnout obdrženou dávku a míru expozice. Tyto údaje by v případě potřeby pomohly efektivně roztrždit obyvatelstvo dle míry zasažení a stanovit potřebnou léčbu.

Záření je považováno za stresující podnět, který vede k fenotypovým a epigenetickým změnám (NRC: Sources of Radiation, 2020). Různé dávky vyvolávají odlišné symptomy. U některých jedinců nízké dávky nemusejí vyvolat na první pohled patrné symptomy, ale mohou přesto vést ke karcinogenezi. Střední dávky vedou k poškození krve a gastrointestinálního traktu, větší dávky mohou způsobovat vážné poškození neurovaskulárního systému s následnou smrtí. Při zjišťování obdržené dávky se pro analýzu používají lidské biologické tekutiny (moč, krev, sliny a další), ve kterých jsou zpravidla přítomny tzv. indikátory (proteiny, metabolity), které mohou potenciálně přispět k získání informace ohledně radiační dávky během prvních dnů po ozáření. Tyto indikátory, resp. biomarkery, mohou vznikat v souvislosti s radiací indukovaným poškozením buněk, které vede k celé řadě patologických účinků: stárnutí, změně genové exprese, poškození lipidů, proteinů, DNA reparačních mechanismů a následné apoptóze vlivem nadměrné tvorby např. reaktivních forem kyslíku. Ideální biomarker by měl podávat informaci o obdržené dávce, míře expozice a současně by neměl zohledňovat věk a životní styl (kouření, užívání léků a drog). Takový biomarker v aktuální době neexistuje a nynější odhady radiační expozice jsou prováděny pomocí kombinace vyšetření několika různorodých nespecifických biomarkerů (cytogenetických, proteomických, genomických a metabolomických).

V posledních letech je proteomice věnována větší pozornost. Hladina proteinů se během dne nebo při různých stavech organismu (např. akutní a chronická onemocnění) prokazatelně dynamicky mění, a proto mohou některé z nich představovat vhodné kandidátní biomarkery ozáření. Jelikož proteiny se běžně vyskytují v tělních tekutinách, tak i plasma je v této studii prioritní vzhledem k rychlé a snadné dostupnosti.

Cílem této studie je pomocí hmotnostní spektrometrie nalézt proteomické biomarkery ozáření v lidské krevní plasmě ozářené *in vivo* a doplnit je o biomarkery z prasečí plasmy.

1 Teoretická část

1.1 Ionizující záření

Ionizující záření (IZ) při průchodu hmotou způsobuje ionizaci, která se vyznačuje přeměnou elektricky neutrálních atomů na kladné a záporné ionty přímo nebo nepřímo. Ionizace přímá je způsobována elektrony, pozitrony, protony, částicemi alfa a beta, které jsou nabitě a samy o sobě mohou vyvolat ionizaci, zatímco nepřímá ionizace se týká nenabitých částic zejména fotonů a neutronů, které při interakci s prostředím uvolňují sekundární ionizující nabitě částice. (Švec, 2005). Když IZ prochází živou tkání, tak se v ní ukládá energie, díky které dochází k ionizaci a excitaci iontů uvnitř hmoty. Poměr této energie dodané živé látce o dané hmotnosti se označuje termínem absorbovaná dávka. Bylo dokázáno, že různé druhy záření mají různé biologické účinky a jednotlivé tkáně na ně reagují odlišně (United Nations, 2010).

Bylo zjištěno, že každý občan ročně přijme 6,2 milisievertů IZ za rok, přičemž 50 % tvoří přírodní zdroje a 50 % tvoří umělé zdroje. Mezi přírodní patří kosmické záření, přírodní radioizotopy, a mezi ty umělé zařazujeme jaderné elektrárny, jaderné zbraně, radioizotopová lékařská vyšetření (National Research Council et al., 1990; NRC: Sources of Radiation, 2020). IZ lze rozdělit podle typu záření na alfa, beta a gama záření.

Alfa záření

Záření alfa je tvořeno jádry helia a jeho částice oproti jiným typům záření dokážou přenášet energii na větší vzdálenost (LET – Linear Energy Transfer). Ionizací tyto částice poměrně rychle ztrácí svoji energii a jejich dolet s ohledem na typ prostředí je malý. V pevných látkách a kapalinách se dolet udává v desetinách milimetrů a v plynech několik centimetrů (Švec, 2005). Alfa emitory (např. ^{226}Ra , ^{239}Pu a ^{241}Am .) mohou způsobit opožděné zdravotní problémy, pokud byl materiál vdechován nebo požíván. Ovšem většina alfa částic není schopna proniknout do neporušené kůže (Berger et al., 2006) a nepředstavuje pro člověka závažné radiační riziko. Ve vyšších dávkách, ale již mohou pronikat do buňky a prostupovat až do buněčného jádra, kde způsobí nevratné škody vedoucí k zániku celé buňky (Lorimore et al., 1998).

Beta záření

Beta částice jsou elektrony či pozitrony s nízkou LET. Tato veličina nabývá menších hodnot při přenášení fotonů o větší energii (Peudon et al., 2006). V porovnání s alfa částicemi mají beta částice delší dolet a odstínit je lze papírem či plastem. Jejich pronikavost je však nižší než u gama záření. Jedním z beta zářičů je kosmogenní radionuklid tritium, který se rozpadá na dva neutrony a jeden proton. Částice tritia jsou více radiobiologicky účinné než paprsky gama (Fairlie, 2007) a relativně malé a lehké ve srovnání s částicemi alfa. Mezi nejvíce používané beta zářiče patří ^{35}S , ^{63}Ni , ^{85}Kr , ^{90}Sr + ^{90}Y a ^{204}Tl (Švec, 2005).

Gama záření

Jedná se o fotony s velmi krátkou vlnovou délkou, které vznikají v důsledku radioaktivního rozpadu nebo při jaderných reakcích. Jsou v porovnání s alfa a beta zářením nejpronikavější. Ve skutečnosti je čistých gama zářičů málo a obvykle jsou doprovázeny alfa a beta zářením (Švec, 2005). Příkladem je beta rozpad ^{60}Co na ^{60}Ni , kde je jádro v excitovaném stavu a dojde k uvonění energie ve formě gama záření (Sohrabnezhad et al., 2012).

V případě nehody či cíleného útoku v zásadě existují tři možnosti, jak určit, zda byl jedinec vystaven IZ. První z možností je rekonstrukce fyzické dávky záření, která zahrnuje použití dozimetrů při modelování odhadované polohy jedince vůči zdroji záření. Další dvě možnosti zahrnují klinické hodnocení a biologickou dozimetrii (Miyazaki et al., 2014). První metodou pomocí dosimetru lze určit radiaci v okolním prostředí. Na trhu jsou různé typy, ale většina jich měří v mikrosievertch za hodinu. Nevýhodou při zjišťování obdržené dávky jedince je, že jedinec se s dosimetrem musí nacházet v radiaci postižené oblasti (Desrosiers et al., 2008). Mezi klinické příznaky hodnocení expozice IZ jsou viditelné projevy na exponovaném jedinci. Jednotlivé projevy se liší podle množství a velikosti absorbovaných dávek. Mezi první příznaky patří únava, nevolnost, zvracení, vypadávání vlasů a krvácení (Dainiak, 2002).

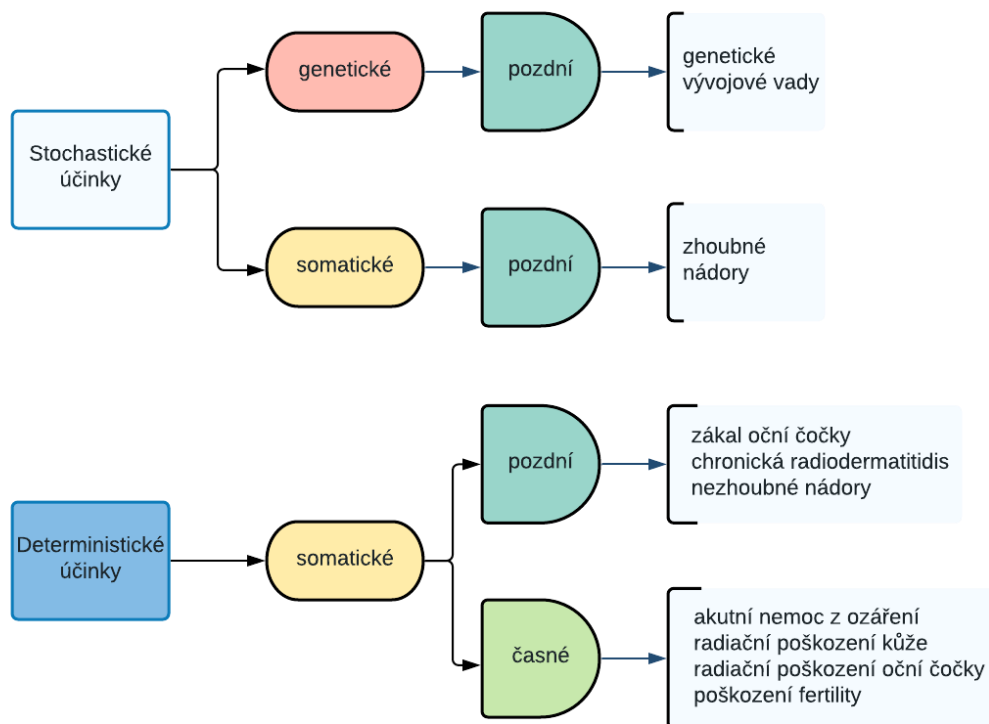
Poslední metodou ke zpětnému hodnocení obdržené dávky patří biologická dozimetrie, často označovaná zkráceně jako biodozimetrie (Swartz et al., 2014).

Touto metodou lze obdrženou dávku zjistit pomocí biologických parametrů jako např. chromozomových aberací, mikrojadér, dicentrických chromozomů a také pomocí tzv. biomarkerů. Právě tyto biomarkery by mohly být slibnou technikou v posuzování expozice jedince IZ (De Lemos Pinto et al., 2010).

1.1.1 Nemoc z ozáření

Nemoc z ozáření je radiační nemoc způsobená vystavením člověka různým dávkám IZ za určitý časový úsek. Expozice člověka IZ narušuje běžné metabolické procesy v buňkách, orgánech a startuje biologickou odpověď, která narušuje expresi genů a proteosyntézu (Menon et al., 2016). Poškozené buňky jsou často aneuploidní a mohou obsahovat celou řadu chromozomálních změn včetně delecí a translokací (Dutrillaux, 1997). Dochází k modifikaci DNA, vytváří se mutace, které mění chování buněk (Baverstock and Belyakov, 2005). Mutagenní účinky IZ na savčí buňky byly poprvé popsány v roce 1927 (Brown et al., 1986). Pokud mutace proběhne v zárodečné buňce, tak se účinky IZ promítnou i do budoucích generací a vzniká dědičné onemocnění. U somatických buněk dochází ke změnám růstového charakteru, které vedou k vytvoření nádorů (Barber and Dubrova, 2006; Baverstock and Belyakov, 2005). IZ má karcinogenní účinky na lidský organismus, a navíc vyvolává celou řadu biologických účinků v závislosti na fyzické povaze, dávkách a době expozice (Pernot et al., 2012; United nations, 2010). K nejcitlivějším buňkám IZ patří ty, co podléhají rychlému dělení. Ze somatických buněk to jsou hematopoetické kmenové buňky a kmenové buňky gastrointestinálního traktu (GIT), ze zárodečných to jsou spermatoocyty (Chao, 2007; Donnelly et al., 2010).

Účinky IZ můžeme rozdělit na deterministické a stochastické a podle nástupu projevu na časné (akutní), které se dostavují ihned po ozáření a pozdní (chronické), jenž se nemusí projevit několik týdnů, měsíců až roků po ozáření (obr. 1.1)

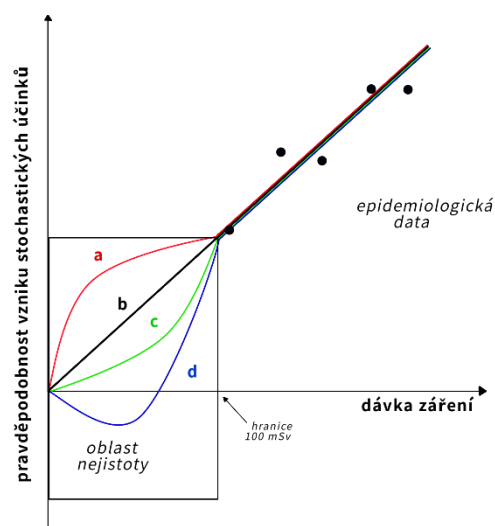


Obr. 1.1 Přehled účinků po ozáření u člověka (Rydlová, 2021)

Stochastické účinky

Stochastické účinky jsou označovány termínem „bezprahové“, kde se předpokládá, že pravděpodobnost jejich vzniku po expozici IZ se úměrně zvyšuje s dávkou. To znamená, že se nezvyšuje závažnost účinků se vzrůstající dávkou, jak je tomu u deterministických účinků, nýbrž pravděpodobnost jejich projevu. Míra poškození tedy není bezprostředně závislá na dávce (Blakely, 2000). Jakákoliv dávka, i malá, je spojena s určitým rizikem vzniku, a proto byl tento účinek definován jako stochastický, což znamená „náhodný, nebo statistické povahy“ (Trott and Kamrad, 2006). Vlivem náhodného efektu poškození organismu při kontaktu s IZ nemůžeme určit, které buňky a geny budou poškozeny a jaký bude jejich další vývoj. Nádorové onemocnění, nebo genetické změny postihnou určité procento lidí po expozici dané dávce, ale nelze určit u koho se poškození projeví. Navíc se účinky jednotlivých expozic v průběhu let sčítají a v důsledku toho se nerozlišuje počet expozičních frakcí, ale konečná dávka. Nezáleží kolik mutací během působení expozic vzniklo, ale které konkrétní mutace se nádorovým buňkám podařilo naakumulovat. Tyto účinky se mohou projevit i při poškození jedné buňky, nebo malého počtu buněk v důsledku zachování schopnosti dělení (Blakely, 2000; Havránková, 2020).

Stochastické účinky nevznikají bezprostředně po ozáření, ale projeví se za delší časový interval (nejčastěji 5–20 let) a jsou ovlivněny věkovou kategorií (Vladan, 2013). Uvádí se, že děti a mladiství jsou k IZ a projevům stochastických účinků vnímavější než dospělí a starší lidé. Tato teze je ovlivněna časovým faktorem, kdy manifestace nádorů od ozáření stoupá s časem. Děti a mladiství mají více času na jejich projevení než starší lidé. Dalším faktorem je větší intenzita dělení buněk v mladším věku v důsledku růstu a vývoje organismu (“ICRP 103,” 2007). Pravděpodobnost vzniku projevu stochastických účinků představuje lineárně bezprahový model (LNT – linear non-threshold), kde pravděpodobnost jejich vzniku roste s absorbovanou dávkou. Některé experimentální studie poukazují na jinou povahu křivek v oblasti nízkých dávek. Jednou z variant je hypersenzitivita, která se vlivem vedlejších účinků škodlivého charakteru projeví zvýšením rizika karcinogeneze. Opakem je hyposenzitivita, která se projevuje snížením počtu poškozených buněk, což vede k teoretickému snížení rizika vzniku karcinomu. Poslední variantou je hormeze, která se projevuje menší úmrtností buněk s rostoucí dávkou v oblasti nízkých dávek (Averbeck, 2010; Havránková, 2020). Povaha účinků a vlastnosti LNT modelu (obr. 1.2) znemožňuje odvodit hranici mezi bezpečnou a nebezpečnou expozicí čímž sťažuje klasifikaci kontroly radiačních rizik (“ICRP 103,” 2007).



Obr. 1.2 Grafické zobrazení závislosti vzniku stochastických účinků na dávce. Experimentální studie uvádí kromě bezprahové lineární závislosti (b) i hypersenzitivitu (a), hyposenzitivitu (c) a hormezi (d) (Rydlová, 2021)

Deterministické účinky

Mezi prvními pozorovanými biologickými účinky IZ byly deterministické účinky, které se projevily jako popáleniny na kůži radiografů. S nástupem radioterapie a objevem neutronů docházelo k deterministickým projevům i u pacientů v důsledku špatného odhadnutí dávky. Nejvíce poznatků o působení IZ a vzniku těchto účinků bylo získáno z radiačních havárií a útoků prostřednictvím atomových bomb. Deterministické účinky se obecně objevují pouze po akutní expozici vysokým dávkám (většinou $>0,1$ Gy) a jsou charakterizovány nelineární odezvou na dávku s prahovou dávkou, pod kterou není účinek pozorován (Edwards and Lloyd, 1998; Little, 2003). Chronické příznaky záření se vyskytují u jedinců, kteří byli dlouhodobě vystaveni IZ většinou v malých dávkách (Pellmar et al., 2005; Reeves and Ainsworth, 1995).

Při akutním poškození se příznaky dostavují ihned po ozáření a pozdní následky se většinou objevují po několika měsících až rocích (Dörr and Hendry, 2001). Bylo popsáno, že IZ postihuje v závislosti na dávce a typu záření nejčastěji kůži, hematopoetický, gastrointestinální a cerebrovaskulární systém (Chao, 2007). K hematopoetickým, gastrointestinálním a neurovaskulárním syndromům může dojít při celotělovému ozáření nebo při zasažení části těla velkou dávkou (Berger et al., 2006). Mezi hlavní příčiny poškození organismu po vystavení IZ patří narušení přirozené imunitní bariéry, která za normálních okolností nedovolí propuknutí infekce. Po ozáření je bariéra narušena a mezi vstupní brány infekce patří zejména kůže, dýchací cesty a GIT. Vhodná imunitní odpověď na patogeny je utlumena a přirozená mikrobiální flóra ve střevech se narušuje, což vede k uvolňování toxinů místními patogeny a celý proces vede k systémové infekci, šoku a následně k smrti (Brook et al., 1988). Syndrom akutního ozáření (ARS - Acute Radiation Syndrome) (tab. 1.1) je způsoben vysokou expozicí IZ za krátký časový úsek (Donnelly et al., 2010). Literatura rozděluje ARS na tři hlavní syndromy podle dávky a zasažené oblasti: hematopoetický syndrom (>1 Gy), gastrointestinální (>12 Gy) a neurovaskulární ($> 20-30$ Gy) (López and Martín, 2011; Singh et al., 2016).

Symptomy	Stupeň ARS a dávka celotělové expozice				
	Mírné (1-2 Gy)	Střední (2-4 Gy)	Vážné (4-6 Gy)	Velmi vážné (6-8 Gy)	Letální (>8 Gy)
Objevení prvních příznaků	2 h a déle po expozici	1-2 h	Do 1 h	Do 30 min	Do 10 min
Průjem	není	není	mírný	těžký	těžký
Teplota	normální	zvýšená	horečka	vysoká horečka	vysoká horečka
Vědomí	bez změny	bez změny	bez změny	se změnou	se ztrátou, která trvá sekundy až minuty
Bolest hlavy	nepatrná	mírná	střední	velká	velká
Počet leukocytů na mm³	<3000	<2000	<1000	<500	<100

Tab. 1.1 ARS příznaky podle dávky (Berger et al., 2006; Donnelly et al., 2010)

Mezi pozdní somatické účinky po expozici IZ patří karcinomy a leukemie. Mezi nejčastější projevy v důsledku expozice IZ patří akutní leukemie, chronická myeloidní leukemie, dlaždicobuněčný a malobuněčný karcinom plic, spinaliom a bazaliom epidermis, nádory štítné žlázy a prsu. Častým pozdním účinkem po zasažení IZ je leukemie, která může vzniknout následkem jedné velké dávky ozáření, nebo několika menších dávek (Slouka, 1959). Nejvýznamnější poznatky o vzniku leukemie a jiných zdravotních komplikací po kontaktu s IZ byly získány při jaderných haváriích a útocích (Černobyl, Hirošima, Nagasaki, Fukušima) (Folley et al., 1952). Při vyšších dávkách hrozí až z 10 % riziko výskytu nádorového onemocnění a dědičných chorob (Baverstock, 2008). Na vývoj onemocnění má vliv i míra expozice, která vede ke zvýšení rychlosti mutací (Barber and Dubrova, 2006; Hanahan and Weinberg, 2000), což vede k nárůstu velikosti již přítomných nádorů (Little, 2000). Jejich vznik a nekontrolovatelné množení rakovinotvorných buněk je způsobeno nadměrnou proliferací buněk v orgánu vlivem poškození, které vzniklo v důsledku genových či genomových mutací a chromozomových aberací (Trott and Kamprad, 2006). Při vzniku mutací, které vedou k nádorovému bujení, nemusí ale vzniknout maligní nádor. Imunitní systém organismu je účinný a většinu poškozených buněk zničí. Kritická situace nastává v momentě poškození DNA

v určitých genech, tzv. protoonkogenech, podílejících se na stimulaci buněčného dělení. Následkem mutace se protoonkogeny mění na onkogeny, které jsou zodpovědné za nekontrolovatelné dělení buněk (Havránková, 2020). Klasifikovat riziko vzniku karcinomu po expozici IZ je velmi obtížné vzhledem k tomu, že není určena hranice dávky, po které karcinom s jistotou vznikne (Kamiya and Sasatani, 2012). Pokusy na zvířatech a epidemiologické studie na lidech ukázaly, že pokud je dávka záření rovna, nebo vyšší než 100 mSv, je pozorováno zvýšené riziko vzniku rakoviny. Tím lze říci, že čím vyšší dávce je jedinec vystaven, tím je u něho vyšší procento vzniku karcinomu. Vztah mezi malou dávkou IZ a účinkem není přesně stanoven vzhledem k vysoké četnosti přirozeně se vyskytujících karcinomů (Trott and Kamprad, 2006). K orientačnímu hodnocení vzniku karcinomu se tak využívá doba latence, tedy doba projevu poškození od ozáření, která je u různých typů nádorů rozdílná. Udává se, že pro leukemii je medián doby latence 8 let, ale u jiných může být tento interval delší, až 15-25 let. Nejkratší doba mezi ozářením a manifestací nádoru byla zaznamenána u akutní myeloidní leukemie a kostního sarkomu a je udávána jako 2 roky. Předpokládá se, že riziko vzniku rakoviny přetrvává po expozici po celý život (Council et al., 2006). Při studiu populace vystavené nízkým dávkám je potřeba zohlednit důležité faktory životního stylu, jako je kouření cigaret a expozice rentgenovému záření v lékařských zařízeních, které mohou zkreslit výsledky (Boice, 2012). Speciální skupinou jsou karcinomy u dětí. Typickým příkladem je Černobylská jaderná havárie, kdy se zvýšil podíl dětí s výskytem rakoviny štítné žlázy (Kumar and De Jesus, 2022). Vzhledem k podobným klinickým příznakům nádorů vzniklých spontánně, nebo důsledkem expozice IZ nelze s jistotou konstatovat původ vzniku. Na vzniku karcinomu se mohou podílet i jiné negativní vlivy, které zahrnují vystavení se toxickým látkám, kouření, požití alkoholu atd. Radiace jenom zvyšuje riziko vzniku těchto onemocnění v organismu. Karcinom po expozici IZ nemusí vzniknout v místě ozáření, ale většinou je lokalizován v tkáních, které jsou vnímavé k IZ. Mezi nejcitlivější patří kostní dřev, žaludek, tlusté střevo, plíce a mléčná žláza (Vladan, 2013).

Současný přístup k léčbě pacientů po radičním poškození je založen na anamnéze, symptomatologii a výsledcích laboratorních vyšetření. Při hromadných jaderných

událostech je pro lepší efektivitu a rychlejší zásah důležité třídít poškozené podle míry zasažení a stavu (Berger et al., 2006).

1.1.2 Dráhy působení IZ na organismus a buňky

IZ má vliv na aktivaci imunitního systému. Účinky vysokých dávek jsou většinou pro organismus fatální, ale expozice nízkým dávkám mohou trvale změnit imunitní odpověď. Projevem může být rychlejší imunitní senescence a tím časný nástup rakoviny a degenerativních poruch souvisejících s věkem. Na druhou stranu radioterapie s využitím nízkých dávek má své příznivé účinky u chronických a degenerativních onemocnění (Lumniczky et al., 2021). Současné terapeutické použití IZ je sice účinné, ale má i svá rizika v podobě radiační toxicity a existence radiorezistentních nádorů.

Vystavení DNA ionizujícímu záření může přímo vyvolat oxidaci prostřednictvím deprotonace nebo odstranění elektronů (Santivasi and Xia, 2014). Poškození DNA i celé buňky se organismus snaží vyhnout svými reparačními mechanismy během buněčného cyklu. Pokud nedojde při exogenním poškození k úspěšné korekci a navození buněčného cyklu, nastupuje apoptóza. Při selhání apoptózy se chyby v DNA šíří prostřednictvím mutací do dalších buněčných linií (Dasika et al., 1999). K tomuto poškození může dojít v důsledku přímého účinku na molekuly DNA, což představuje 30-40 % všech případů záření. Poškození DNA vlivem volných radikálů, představuje 60-70 % všech případů záření (Ward, 1988).

Poškození DNA vyvolané IZ aktivuje kaskádu signálních drah, které řídí zastavení buněčného cyklu, opravu DNA, a osud buňky. Jednou z nich je signalizační kaskáda p53, která se podílí na nasměrování buněk s poškozenou DNA k zástavě buněčného cyklu, navázání reparačních procesů, popřípadě k apoptóze (Orre et al., 2007). Předpokládá se, že mutantní formy p53 by mohly vést k odolnosti buněk vůči poškození DNA. Tento fakt byl publikován v experimentální práci Leeho a Bernasteina (Lee and Bernstein, 1993). Mezi nejzávažnější formu poškození DNA patří dvouvláknové zlomy vzniklé v důsledku IZ a většinou jsou opravovány cestou homologní rekombinace (HR), nebo cestou nehomologního spojování konců (NHEJ) (Santivasi and Xia, 2014; Wang et al., 2020). HR je velmi využívanou metodou pro opravu poškozené DNA v savčích buňkách. Reparace DNA probíhá během pozdní S fáze a končí ve fázi G2 buněčného cyklu. Při nedostatku proteinů účastnících

se HR přichází na řadu oprava pomocí NHEJ, která přímo spojuje dva konce DNA. Oproti předchozí metodě je náchylnější k chybám a přispívá k nestabilitě genomu a hromadění spontánních a poškozením indukovaných chromozomálních aberací (Cruz-Becerra and Kadonaga, 2020; Liang et al., 1998). Metoda NHEJ je iniciována vazbou heterodimeru Ku, který disponuje dvěma polypeptidy Ku70 a Ku80, na konci řetězce DNA. Jeho vazba na DNA je nezávislá na sekvenci a hlavní funkcí je ochrana obou dvouvláknových konců poškozené DNA. Navíc se podílí na aktivaci katalytické podjednotky DNA-PKcs (fosfatidylinositol-3-kináza), která interaguje se strukturně specifickou nukleázou Artemis jejíž hlavní funkcí je štěpení poškozených konců DNA. Ku má na sobě specifická místa pro navázání DNA ligázy IV spolu s kofaktorem XRCC4 a XLF, které se účastní procesu ligace (Wang et al., 2020; Woodbine et al., 2014).

1.1.3 Reaktivní formy kyslíku

V důsledku vystavení buněk IZ dochází k redoxně-oxidačním dějům, které se podílejí na změně buněčné struktury prostřednictvím přímých interakcí záření s cílovými makromolekulami nebo nepřímo, prostřednictvím produktů radiolýzy vody a účinkům reaktivních forem kyslíku (Azzam et al., 2012). Reaktivní formy kyslíku jsou skupinou vysoce reaktivních molekul obsahující aspoň jeden atom kyslíku a jeden nebo více nepárových elektronů. Hrají četné role při regulaci fyziologických funkcí živých organismů včetně udržování normální buněčné homeostázy i prostřednictvím metabolického vzplanutí v boji proti patogenům. ROS jsou v organismu produkovány nejen po vystavení exogennímu stresu, ale i endogenně v různých organelách. Do této skupiny patří volné kyslíkové radikály, např. superoxidový aniontový radikál, hydroxylový radikál, hydroperoxylový radikál, kyslík a také volné dusíkové radikály. Za fyziologicky normálních podmínek při buněčných procesech jako jsou zánětlivé procesy a aerobní dýchání vzniká malé množství ROS. Jejich výskyt v organismu je přirozený a průběžně dochází k odstraňování volných radikálů z těla. Jsou považovány za signální molekuly, které se účastní diferenciací a apoptózy buněk, čímž přispívají k přirozenému stárnutí buněk. Podílí se také na baktericidní a bakteriostatické aktivitě či svalových kontrakcích (Jakubczyk et al., 2020). Expozice vysokým dávkám IZ vede k produkci velkého množství ROS v buňkách, které jsou pro okolní

prostředí i buňku škodlivé. Biologické účinky mohou vést k poškození DNA a různým buněčným reakcím, včetně zastavení buněčného cyklu, senescence, apoptózy a případně rakoviny (Lehnert and Iyer, 2002; Srinivas et al., 2018). Při působení nízkých dávek je monitorování ROS komplikovanější. Narayanan a kolektiv uvádí, že i lehké navýšení nízkých hladin ROS může zaktivovat metabolické dráhy, které by za normálního stavu byly nečinné. Takové tvrzení bylo prokázáno ozářením lidských buněk nízkou dávkou 1cGy, která způsobila nárůst intracelulárních superoxidových aniontů a peroxidu vodíku prostřednictvím aktivace NADPH/NADH oxidázy (Narayanan et al., 1997). K reaktivním formám kyslíku kromě již zmiňovaných, patří hydroxylové radikály a oxidy dusíku. Reakce těchto látek s biomolekulami lipidů, proteinů a DNA může vést k produkci dalších reaktivních molekul škodlivých svými účinky na organismus (Sies and Jones, 2020). Na ovlivnění vzniku ROS má zásadní vliv radiosenzitivita. V případě jejího snížení dochází ke změně odezvy na IZ (Ueno et al., 1996).

1.2 Biomarkery radiačního poškození

Pojem biomarker je definován jako vlastnost, která indikuje normální biologické procesy nebo patogenní procesy, či reakci na expozici a intervenci. Diagnostické biomarkery se používají k určení zdravotního stavu pacienta, u kterého může být na základě toho indikována léčba (FDA-NIH Biomarker Working, 2021). Biomarkery tedy ideálně představují citlivé a specifické ukazatele onemocnění a své uplatnění nachází v odvětví medicíny zejména při výběru vhodného léčebného postupu (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Vhodné biomarkery onemocnění by měly disponovat určitými vlastnostmi, jako je rychlá reakce na změnu stavu onemocnění a terapii, měly by mít vysokou specifitu a senzitivitu, a také by měly být opakovaně reprodukovatelné za standardních podmínek (Aronson and Ferner, 2017). Zájem o hledání biomarkerů, které mohou posloužit jako indikátory onemocnění se v posledních letech zvýšil (Fiehn, 2002).

Biomarkery související s radiačním poškozením lze rozdělit na časně a pozdní. Časně biomarkery radiačního poškození jsou důležité při různých nehodách či teroristických událostech, ve kterých je předpoklad vystavení velkého počtu lidí IZ neznámé intenzity. Tyto biomarkery by mohly být přínosem při třídění, léčbě a hodnocení radiační toxicity postižených lidí (Guipaud, 2013; Pernot et al., 2012).

Při výběru ideálních časných biomarkerů se musí zohlednit jejich charakteristické vlastnosti jimiž jsou specifita, citlivost, reprodukovatelnost a variabilita v populaci. S tím souvisí i možnost rychlého a neinvazivního odběru vzorku. Primární nevýhodou tkáňových biologických vzorků je způsob jejich získávání (biopsie, pitva), proto se upřednostňují biologické vzorky jako je moč, sérum, plasma nebo sliny (Tapio et al., 2010). Pro lepší výsledek je dobré použít kombinaci biomarkerů, která v ideálním případě odstraní odchylky způsobené časovou prodlevou mezi odběrem a vyhodnocením (Ryan et al., 2007). Naopak biomarkery pozdních účinků lze použít k dlouhodobému hodnocení zdravotního stavu osob, které byly v minulosti vystaveny IZ (Pernot et al., 2012).

V současné době se k predikci obdržené dávky v prvních osmi hodinách po ozáření používá algoritmus založený na kinetice lymfocytů (Goans and Waselenko, 2005). Osvědčenou metodou označovanou za zlatý standard pro odhad dávky ozáření je analýza dicentrických chromosomů (Romm et al., 2011). Tato metoda je citlivá a díky tomu dokáže stanovit i expozici malé dávky ozáření. I tento postup má své limity v podobě časové prodlevy při získávání výsledků, nízké kapacity a nepoužitelnosti po určité uplynulé době od expozice. Při obdržení vyšší dávky nastává problém s nalezením buněk v mitóze, kde se dicentrické chromozomy vyhodnocují (IAEA, 2011). Pro lepší identifikaci a kvantifikaci IZ se tak používají techniky, které čerpají z poznatků zejména metabolomiky, genomiky a proteomiky (Donnelly et al., 2010; Tapio et al., 2010).

Při hledání proteomických biomarkerů v plasmě je zásadní úprava odebraného vzorku. Proteom plasmy je velmi bohatý s dynamickým rozsahem jednotlivých proteinů a postranlačních modifikací. Navíc tyto biologické materiály jsou obohaceny o přítomnost lipidů, solí a dalších metabolitů, které by mohly představovat problém při analýze v podobě zkreslení výsledků. Odstranění těchto nepotřebných metabolitů a kontaminantů je žádoucí před samotnou separací (Pietrowska et al., 2019). Vzhledem k dynamičnosti celého proteomu mají různé proteiny rozdílné zastoupení. Koncentrace potenciálních biomarkerů specifických pro onemocnění je většinou v plasmě velmi nízká a jejich detekce je narušena dominancí albuminů, imunoglobulinů a dalších vysoce zastoupených plasmatických proteinů. Proto analýza kandidátních biomarkerů ve vzorcích plasmy často vyžaduje depleci abundantních proteinů, včetně vysoce zastoupeného albuminu

v zájmové frakci. Odstraněním vysoce zastoupených proteinů by mělo být úplné a reprodukovatelné (Fountoulakis et al., 2004).

Tato úprava vzorků plasmy je při proteomické analýze založené na hmotnostní spektrometrii (MS) zásadní. Ve vzorku plasmy se nachází velký rozsah koncentrací proteinů s 22 nejhojněji zastoupenými, které v lidské plasmě tvoří až 99 % celkové hmotnosti bílkovin, čímž dochází k potlačení peptidových iontů pocházející z nízko zastoupených proteinů. Tyto proteiny s nižším zastoupením se obvykle nacházejí v rozmezí nanogramů na mililitr a většinou netvoří více než 1 % hmotnosti plasmatických bílkovin (Tu et al., 2010). Jejich detekce je tak často náročná a nespolehlivá (Pietrowska et al., 2019). K těmto účelům se používají různé depleční techniky včetně komerčně dodávaných deplečních kolon, které sníží podíl abundantních proteinů a zvýší tak citlivost pro detekci specifických proteinů cílených analýz. Nevýhodou deplecí je možná ztráta vzorku a špatná strategie, která může vést k odstranění některých necílených a z experimentálního pohledu zajímavých proteinů (Bellei et al., 2011).

1.3 Metabolomika a ionizující záření

Metabolomika je jednou z nových vědních disciplín, která se zabývá analýzou všech metabolitů v buňce (identifikace i kvantifikace). Jedná se zpravidla o menší molekuly o velikosti 50-150 Da (Menon et al., 2016) jako jsou cukry, aminokyseliny, organické kyseliny, nukleotidy a lipidy (Dunn et al., 2005). Metabolity se dají považovat za konečné produkty buněčných regulačních procesů a jejich množství je regulováno biologickými systémy jako odpověď na genetické a environmentální změny (Fiehn, 2002). Mezi hlavní výhody sledování vybraných metabolitů při zjištění dávky IZ patří fakt, že jejich hladina závisí pouze na dávce IZ, nikoliv na genetickém profilu u něhož se změny po ozáření projeví o něco pomaleji (Lee et al., 2012). Analýza metabolomu spočívá zejména ve využití technik molekulární spektroskopie a MS. Zvýšení citlivosti uvedených metod a jejich selektivity lze docílit využitím plynové, nebo kapalinové chromatografie, která rozdělí analyzovanou směs látek podle předem daných kritérií (Nicholson and Wilson, 2003). Zkoumání metabolických markerů indukovaných IZ je možnou neinvazivní metodou při zjišťování obdržené dávky (Tyagi et al., 2020). Aktuální humánní metabolomické studie uvádí zvýšenou hladinu po ozáření u valinu,

alaninu, argininu, taurinu, thymidinu, N-hexanoglycinu a glutathionu (Patterson et al., 2010; Xiao et al., 2016). Tyagi a kol. shledali největší rozdíl mezi kontrolními a ozářenými vzorky u metabolitů taurinu, citrátu, fumarátu a α -ketoglutarátu při ozáření 7.5 Gy (Tyagi et al., 2020). Zvýšení hladiny u valinu a fenylalaninu potvrdila studie Pannkuka a kol. (Pannkuk et al., 2019).

1.4 Genomika a ionizující záření

Genomika používá pro studium rozdílů v expresi genů daných ozářením metody jako jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), DNA čipy, sériová analýza genové exprese přenos a detekce specifických úseků DNA a RNA (Southern a Northern blot) (Griffiths, 2018; Nallari, 2020; Taniguchi et al., 2001).

U mnoha genů dochází ke zvýšené, nebo snížené regulaci jejich exprese po vystavení IZ. Sledování míry genové exprese v lymfocytech periferní krve představuje alternativní metodu v radiační biodozimetrii (Amundson et al., 2000). Při zjišťování procesu genové exprese je genetická informace sledována ve formě finální struktury proteinů, sekvenci cDNA a mRNA (McAdams and Arkin, 1997). Kabacik et al. se ve své studii zaměřili na expresi 20 genů z B-lymfoblastoidní buněčné linie od 15 dárců. Využili metodu DNA čipů, díky které určili celkem 4 geny (Sestrin 1 (SESN1), Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 45 Alpha (GADD45A), Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (CDKN1A) a Cyclin G1 (CCNG1)) podléhajícím změnám při zasažení IZ (Kabacik et al., 2011). V jiné studii analyzovali 13 genů senzitivních k ozáření z nichž je 12 regulováno proteinem p53, konkrétně geny BCL2 Binding Component 3 gene (BBC3), Damage Specific DNA Binding Protein 2 (DDB2), Ferredoxin Reductase (FDXR), GADD45, Mouse Double Minute 2 gen (MDM2), Myelocystomatosis Proto-Oncogene (MYC), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), CDKN1A a CCNG1 (Oh et al., 2012). V jiné studii, kde byla použita metoda DNA microarray a následně pro validaci výsledků kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qRT-PCR Quantitative Reverse Transcripton Polymerase Chain Reaction) byly identifikovány již 4 zmiňované geny z předchozího výzkumu (CDKN1A, DDB2, CCNG1 a GADD45A) (Amundson et al., 2004). Budworth et al. se ve své studii zaměřili na 40 genů, které souvisí se změnou při zasažení IZ. Izolovali mRNA a s pomocí RT-PCR zjistili, že u *ex vivo* ozářené lidské krve byla hladina těchto 8 genů PCNA, Xeroderma pigmentosum complementation group C

(XPC), DNA Polymerase Eta (POLH), GADD45A, DDB2, BBC3, FDXR a CDKN1A vyšší než ve vzorcích před ozáření (Budworth et al., 2012).

1.5 Proteomika a ionizující záření

Ačkoliv je proteomika de facto součástí oboru genomiky, je v této práci pro přehlednost řešena v samostatné kapitole. Proteomika se zabývá studiem struktury, vlastností a funkcí od jednotlivých proteinů až po celý proteom (Patterson and Aebersold, 2003). Proteomická analýza zahrnuje separační a identifikační metody, mezi které patří například gelová elektroforéza, různé chromatografické metody, western blot a MS (Bantscheff et al., 2007). V současné době je MS vyspělým nástrojem, který může poskytnout cenné informace o biochemických mechanismech, které regulují buněčné procesy (Makawita and Diamandis, 2010; Tapio et al., 2010). Existuje již velké množství literatury, která se zabývá aplikací proteomických metod v mnoha různých oblastech klinického a biochemického zájmu, včetně patogeneze, vývoje, prevence a léčby široké škály onemocnění (Hochstrasser, 1997). V klinické praxi se při hodnocení zdravotního stavu koncentrace jednotlivých bílkovin v plasmě stanovuje běžně. Proteiny v lidské plasmě jsou vhodnými kandidáty v diagnostice onemocnění a terapeutickém monitorování. V jakémkoli vzorku plasmy se mohou nacházet kromě klasických plasmatických proteinů i proteiny tkáňové, pocházející z poškozené tkáně. Podle toho lze rozdělit proteiny do tří kategorií. První kategorie obsahuje hojně zastoupené proteiny, které zastávají v krvi různé funkce. Mezi ně se řadí proteiny koagulační kaskády a akutní fáze vrozené imunitní odpovědi, lidský sérový albumin a apolipoproteiny, které mají zásadní úlohu v transportu a homeostáze lipidů. Do druhé kategorie patří tkáňové proteiny bez specializované funkce v oběhu, ale mohou sloužit k diagnostice patologických stavů. Příkladem jsou enzymy, jako je aspartátaminotransferáza a alaninaminotransferáza, které se používají k diagnostice jaterních onemocnění. Poslední kategorií jsou signální molekuly jako jsou hormony a cytokiny, které se v plasmě vyskytují v minimálním množství (Geyer et al., 2017).

V posledních 5 letech je izolování proteinů z plasmy a jejich následná analýza pomocí MS velmi žádanou metodou k identifikování nových biomarkerů (Ignjatovic et al., 2019). Různé orgány a tkáně mohou reagovat na vystavení IZ

například změnou hladiny některých proteinů nebo změnami v následných posttranslačních modifikacích. Proto MS našla uplatnění i v biodozimetrii při hodnocení zdravotního stavu obyvatelstva po expozici IZ. Proteinové biomarkery získané z biologických vzorků mohou tedy posloužit k orientačnímu posouzení radiační dávky. (Sproull et al., 2019).

Například podle studie Srivastava a kol. se po ozáření změnila hladina těchto proteinů: integrin-linked kinase (ILK), tubuli alpha-4A chain (TUBA4A), glyceraldehyd 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) po ozáření dávkou 11 Gy (Srivastava et al., 2015). Lee a kolektiv identifikovali top 4 kandidátní biomarkery po ozáření: proteiny FXR, DDB2, Actinin alpha 1 (ACTN1) a Bcl-2-associated X protein (BAX) (tab. 1.2) (Lee et al., 2018).

Při hledání a stanovení nových proteomických biomarkerů se obecně využívá strategie tří fází. V první řadě dochází k detekci a identifikaci všech proteinů obsažených v biologickém materiálu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – High-Performance Liquid Chromatography) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) (Matthiesen and Bunkenborg, 2013). Druhou fází trojúhelníkové strategie je cílená proteomika, při níž se vybere relativně malý počet proteinů. Nejrozšířenější metodou verifikace za použití MS je monitorování více reakcí (PRM). Pro každý protein se vybere sada vhodných peptidů, které jsou při eluci fragmentovány. Sledováním několika fragmentů daného peptidu lze dosáhnout citlivé a specifické kvantifikace i u hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením (Abbatiello et al., 2015). Pro absolutní kvantifikaci je zapotřebí vnitřních standardů, které představují izotopicky značené verze sledovaných peptidů. Poslední fází často je validace pomocí imunoanalýz. Tato metoda má ovšem pár omezení, které souvisejí s rozpoznáváním antigenu a protilátky. Interference s metabolity nebo strukturně podobnými látkami, zkřížená reaktivita a nespecifičnost testů patří mezi ty nejvýznamnější. Dalším negativem je omezené množství dostupných testů na trhu. I přes tyto nevýhody jsou často používány pro jejich jednoduchost, rychlost získání výsledku a automatizaci (Wild, 2013).

Term	Uniprot	Species	Dose	Citation
ACTN1	Q92466	mouse	0-2 Gy	(Lee et al. 2018)
		human	0-8 Gy	(Budworth et al. 2012)
ATM	Q13315	human	>4 Gy	(Marchetti et al. 2006)
		mouse	0-8 Gy	(Li et al. 2011)
BAX	Q07812	mouse	0-2 Gy	(Lee et al. 2018)
CDK4	P11802	mouse	0,5;1 Gy	(Ju et al. 2003)
CDKN1A	P38936	human	>4 Gy	(Marchetti et al. 2006)
		mouse	0-8 Gy	(Li et al. 2011)
DDB2	Q92466	mouse	0-2 Gy	(Lee et al. 2018)
		human	0-8 Gy	(Budworth et al. 2012)
FDXR	P22570	mouse	0-2 Gy	(Lee et al. 2018)
Flt3L	P49771	mouse	18 Gy	(Sproull et al. 2017)
		NHP	1-8,5 Gy	(Ossetrova et al. 2014)
		mouse	0-10 Gy	(Johnston et al. 2010)
GNMT	Q14749	mouse	30-250	(Yi et al. 2018)
GSTA3	Q16772	mouse	30-250	(Yi et al. 2018)
IL-18	Q14116	mouse, minipig, NHP	1,6 Gy	(Ha et al. 2014)
IL-6	P08887	mouse	18 Gy	(Sproull et al. 2017)
		NHP	1-8,5 Gy	(Ossetrova et al. 2014)
		mouse	0-10 Gy	(Johnston et al. 2010)
		human	20-40 Gy	(Chalubinska-Fendler et al. 2016)
Ku70	P12956	human	2;4 Gy	(Kumaravel et al. 1998)
MYC	P01106	human	3-10 Gy	(Enomoto et al. 2003)
NPM	P06748	mouse	30-250	(Yi et al. 2018)

Tab. 1.2 Tabulka proteomických markerů vztažených k určité dávce a organismu publikovaných v radiobiologické literatuře. ACTN1 = actinin alpha 1, ATM = serine protein kinase, BAX = bcl-2-associated X protein, CDK4 = cyclin dependent kinase 4, CDKN1A = cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, DDB2 = damage Specific DNA Binding Protein 2, FDXR = ferredoxin reductase, Flt3L = Fms related tyrosine kinase 3 ligand, GNMT = glycine N methyltransferase, GSTA3 = glutathione S transferase A3, IL-18 = interleukin 18, IL -6 = interleukin 6, Ku70 = X-ray repair cross complementing protein, MYC = myc protooncogene protein, NPM = nucleophosmin (Kultová 2021).

1.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je rychlá, citlivá a destruktivní analytická technika, která se využívá k detekci a determinaci daného analytu. Je nepostradatelnou součástí mnoha vědních oborů zahrnujících medicínu, farmacii, biochemii, chemii a tvoří důležitý nástroj pro výzkum právě v oblasti proteomiky (Beuhler et al., 1974; Enjalbal et al., 2000; Han et al., 2008; Watson and Sparkman, 2007).

Počátek této metody spadá do 80. až 90. let 20. století. (Fenn et al., 1989; Ong and Mann, 2005; Watson and Sparkman, 2007). MS je založena na principu převedení molekul na plynné ionty, které jsou následně rozděleny podle poměru hmotnosti

a náboje (m/z). U jednotlivě nabitých iontů se měří odezva jejich trajektorií v elektrickém a magnetickém poli, výsledkem je záznam hmotnostních spekter (Beuhler et al., 1974; Niessen, 2006).

Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří hlavních částí: iontového zdroje, který přeměňuje molekuly analytu na plynnou fázi, hmotnostního analyzátoru, který separuje ionizované analyty na základě poměru m/z a detektoru, kde dochází k detekci iontů (Fenn et al., 1989). Existuje mnoho možných spojení, které kombinují jednotlivé iontového zdroje s hmotnostními analyzátory. V proteomice má největší uplatnění ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) ve spojení s analyzátozem doby letu (TOF – Time of Flight) a ionizace elektrosprejem (ESI – Electrospray Ionization) ve spojení s kvadrupólem, orbitrapem či iontovou pastí (O’Hair, 2006).

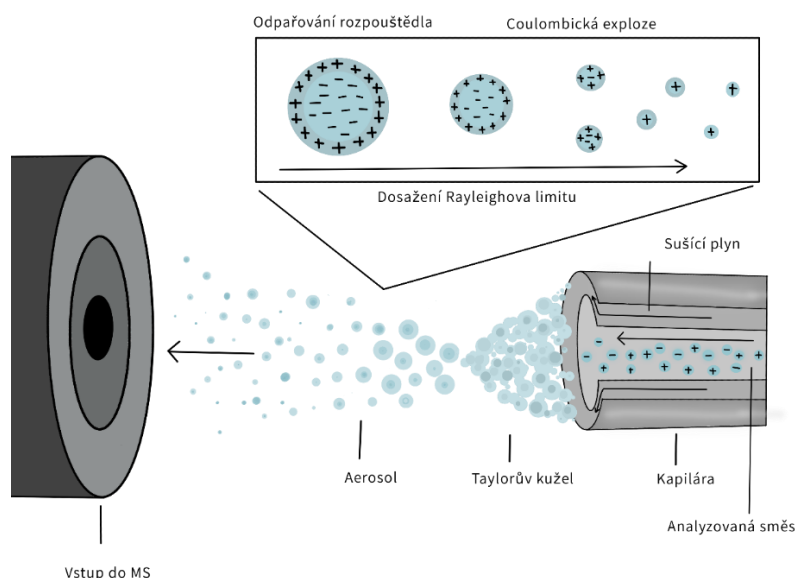
MS v kombinaci s HPLC se díky svým neocenitelným vlastnostem jako je citlivost, přesnost a možnost zpracovat i komplexní směsi řadí mezi často využívané techniky, které jsou určené ke kvantitativní a kvalitativní analýze proteinů, resp. jejich peptidů (Pandey et al., 2000).

1.6.1 Iontové zdroje

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem se stala účinnou šetrnou technikou, u které téměř nedochází k tvorbě fragmentových iontů, a tedy jsou téměř vždy pozorovány molekulové ionty. Ve spojení s HPLC se stala jednou z nejčastěji využívaných ionizačních metod v proteomice (Ho et al., 2003). Jedná se o měkkou ionizační techniku, která se používá pro analýzu polárních látek, biomakromolekul a zejména proteinů resp. jejich peptidů (Fenn et al., 1989). Funguje na principu vnášení analytu z kovové kapiláry do iontového zdroje za atmosférického tlaku. Na kapiláru (elektrodu) je aplikováno vysoké napětí (2-5 kV), které způsobuje polarizaci rozpouštědla a seskupení iontů se stejným (kladným) nábojem na konci otvoru kapiláry (Kearle and Tang, 1993). Vlivem vysokého napětí dochází k tvorbě Taylorova kužele, ze kterého se oddělují kapičky rozpouštědla spolu s analytem tvořící elektrosprej. Vlivem zvýšené teploty a sušícího plynu se rozpouštědlo odpařuje a tím se kapičky zmenšují (Bruins, 1998). Hustota náboje se postupně

zvyšuje až dojde k překročení kritického bodu (Rayleighův limit), kdy se kapičky rozpadají na menší o původním náboji (coulombická exploze). ESI tak snadno převádí ionty analytu z roztoku do plynné fáze, a ty následně vstupují do analyzátoru (obr. 1.3) (Ho et al., 2003).



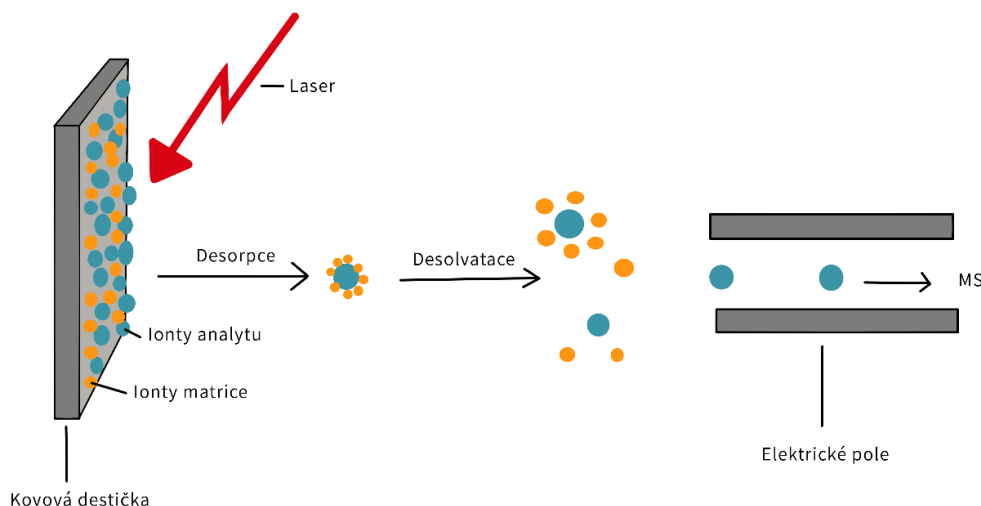
Obr. 1.3 Ionizace elektrosprejem (Rydlová, 2021)

Ionizace laserem za účasti matrice

Matricová laserová desorpce/ionizace byla vyvinuta na konci 80. let (Karas and Hillenkamp, 1988) a patří také mezi měkké metody ionizace. Tato metoda byla především vyvinuta k analýze proteinů a peptidů, ale postupem času našla uplatnění i ke stanovení dalších látek (Norková and Jaklová, 2013).

Ke vzorku se přidává v nadbytku aromatická kyselina (matrice) brání tepelnému rozkladu vzorku, který by nastal při přímé ionizaci (Vorm et al., 2002). Zkoumaná směs s matricí se nanese na kovovou destičku (obr. 1.4), nechá zaschnout a poté je ozářena nanosekundovými laserovými impulsy. Mezi nejběžnější matrice patří α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová kyselina a 3-hydroxypikolinová kyselina. Dodáním energie jsou molekuly matrice excitovány a následně stabilizovány přenosem protonu na analyt. Při použití MALDI vznikají nejčastěji jednonásobně nabitě ionty, méně často pak dvojnásobně a trojnásobně nabitě (Dreisewerd, 2003; Wang et al., 2016).

Spojením ionizace typu MALDI a analyzátoru TOF vznikla metoda, která vyniká svojí citlivostí, rozlišením a rychlostí. Ionty analytu jsou po ionizaci urychleny elektrickým polem (25-30 kV) a přes kovovou mřížku vstupují do trubice detektoru letu, kde se pohybují rychlostí danou poměrem jejich hmotnosti a náboje (“Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF,” n.d.).



Obr. 1.4 Ionizace laserem za účasti matrice (Rydlová, 2021)

Ostatní iontové zdroje

Mezi nejnovější měkkou ionizační techniku patří fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – Atmospheric Pressure Photoionization), kde je vzorek nejdříve převeden do plynné fáze a následně jsou molekuly analytu podrobeny interakci s fotonem (Raffaelli and Saba, 2003). Na podobném principu je založena chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization), která disponuje vysokou selektivitou a citlivostí (French et al., 1985). Principem metody je převedení vzorku do plynného skupenství a přenosu náboje prostřednictvím ionizovaných molekul reakčního činidla (Andrade et al., 2008). Za další měkkou ionizační metodu je považována desorpční ionizace elektrosprejem (DESI – Desorption Electrospray Ionization), při které je aplikována sprejovaná kapalina na povrch studovaného materiálu v určité vzdálenosti a úhlu. Při kontaktu iontů kapaliny se vzorkem dochází k desorpci iontů analytu a jejich vstupu do hmotnostního analyzátoru. Výhodou této metody je použití vzorku v původním stavu (listy, květy, tkáně) (Ranc et al., 2007; Venter et al., 2008). DESI spadá

pod neinvazivní metodu a v současné době je využívána k detekci a identifikaci výbušnin (Cotte-Rodríguez and Cooks, 2006). I když tyto metody mají určité výhody, v současné proteomice nemají až tak velký význam. APPI je vhodná pro analýzu nepolárních, labilních látek, v případě APCI až středně polárních sloučenin. Obě metody se využívají při analýze léčiv, drog, pesticidů, lipidů, iontových sloučenin a dalších nestabilních látek (Holčapek et al., 2010).

1.6.2 Hmotnostní analyzátory

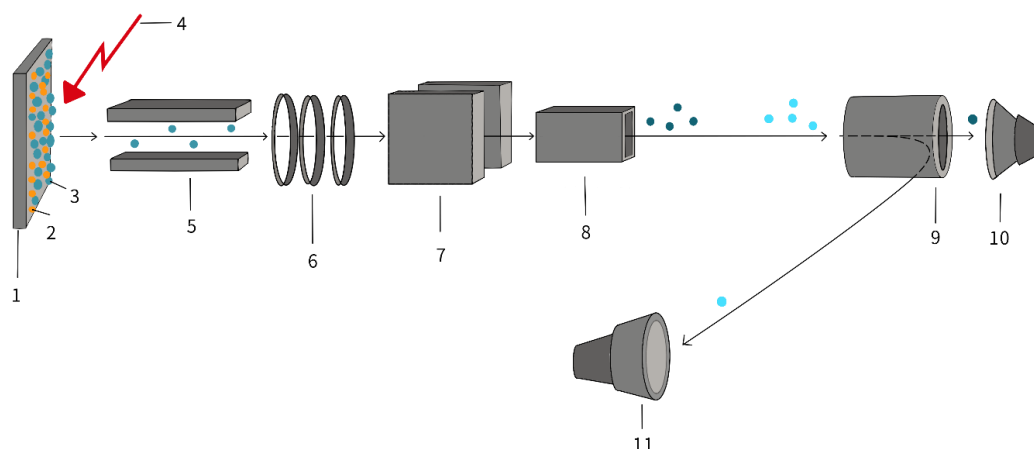
Ionty po vstupu do hmotnostního analyzátoru jsou rozděleny podle hodnoty poměru hmotnosti a náboje m/z (Rockwood et al., 2018). Pro proteomickou analýzu se používají hlavně čtyři typy hmotnostních analyzátorů: průletový, kvadrupólový, iontová past a orbitrap. Často jsou využívány jejich „hybridní“ varianty, které kombinují možnosti různých hmotnostních analyzátorů např: kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu (Q-TOF), dva analyzátory doby letu za sebou (TOF-TOF), trojitý kvadrupól (QqQ) apod.

Průletový (TOF)

Průletový analyzátor měří dobu rychlosti letu iontů ve vakuu trubici o dané délce. Separuje ionty na základě jejich hmotnosti a náboje (Domon, 2006). Po ionizaci jsou vzniklé ionty unášeny směrem na extrakční mřížku a v elektrickém poli (25-30 kV) dochází k jejich akceleraci do letové trubice. Předaná kinetická energie je úměrná m/z . V důsledku toho se ionty pohybují různou rychlostí a v lineárním módu dopadají na detektor v různých časech. Princip je založen na skutečnosti, že ionty s nižším m/z mají ve vakuu vyšší rychlost a dopadají na detektor dříve. K vyrovnání rozdílné kinetické energie se používá reflekttron, který prodlužuje dráhu letu a tím snižuje rozdíl v čase od průletu analyzátozem až po dopad na detektor v (Cain et al., 1994; Huong et al., 2014). Reflekttron zpomaluje pohyb iontů s větší E_k , které tak dopadnou na detektor současně s ionty s menší E_k (Rockwood et al., 2018).

Tento typ analyzátoru má hned několik výhod: vysokou rychlost snímání, přesnost, citlivost, téměř neomezený rozsah m/z a vysoké rozlišení (Bucknall et al., 2002). TOF analyzátor je snadno spojován s různými ionizačními technikami. Nejčastějším uváděným příkladem bývá spojení s MALDI (obr. 1.5), které je často využívané pro kvalitativní analýzu peptidů, bílkovin a nukleových kyselin.

Své uplatnění tato technika našla i v mikrobiologických laboratořích, kde je aplikována při rychlé identifikaci a diagnostice patogenů (Croxatto et al., 2012).



Obr. 1.5 Schéma MALDI ve spojení s TOF (Rydlová, 2021) 1-kovová destička, 2-matrice, 3-analyt, 4-laser, 5-extrakční mřížka, 6-kruhové pole pro akceleraci analytu, 7- deflektory, 8-rozdělovač hmoty, 9-reflektor, 10-lineární detektor, 11-reflexní iontový detektor

Lineární kvadrupólový analyzátor (Q)

Kvadrupólové hmotnostní analyzátoři se díky svým vlastnostem řadí mezi nepoužívanější v klinických laboratořích. Vynikají snadným použitím, cenovou dostupností a kompatibilitou s kapalinovou (LC – Liquid Chromatography) či plynovou chromatografií (Thomas, 2019). Kvadrupól obsahuje čtyři kovové tyče (elektrody), nejčastěji o kruhovém, nebo hyperbolickém průřezu, které jsou umístěny ve stejné vzdálenosti od středové osy. Vložené stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí na elektrody způsobí průchod iontů jen o dané m/z na detektor (Havlíček and Tureček, 2020). Tyče uspořádané vedle sebe mají polaritu opačnou, protilehlé mají polaritu stejnou. Oscilační elektrická pole se používají ke stabilizaci a destabilizaci iontů. Ionty vstupující do analyzátoru disponují malou energií 5-10 eV a působením napětí se periodicky pohybují podle m/z kolmo na podélnou osu kvadrupólu. Ionty disponující stabilní trajektorií jsou detekovány a ionty s nestabilní trajektorií jsou vypuzeny, nebo zachyceny na tyčích kvadrupólu. Skenování iontů je umožněno až po horní hranici 4000 m/z (Douglas, 2009; Thomas, 2019). Hmotnostní spektrometr disponující jedním kvadrupólovým analyzátořem měří pouze ionty (intaktní nebo fragmentované)

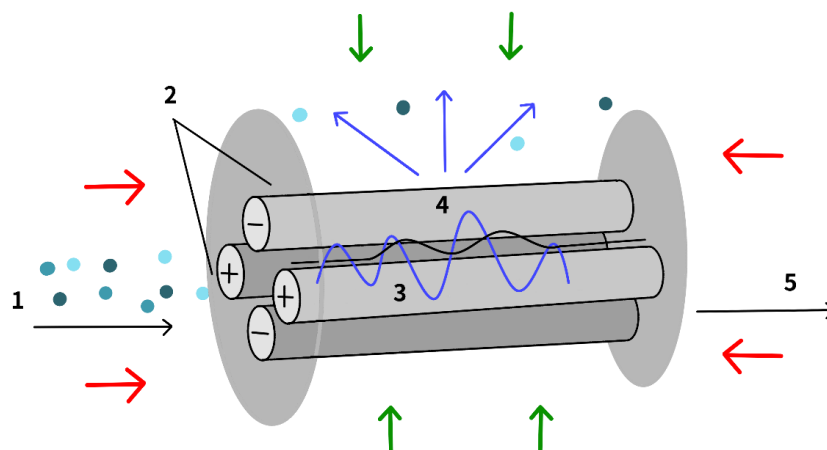
přiváděné z iontového zdroje. Na základě této vlastnosti je využití samostatného kvadrupólového analyzátoru velmi omezené. Tento nedostatek byl odstraněn uspořádáním více analyzátorů za sebou (Clarke, 2017).

Zapojením tří kvadrupólů v řadě vznikne QqQ. Skládá se ze tří komponentů, kde první (Q1) a poslední část (Q3) slouží jako hmotnostní filtr k propuštění iontů o dané m/z . Prostřední část (Q2) představuje kolizní celu naplněnou plynem (He, Ar, N₂) s nízkým tlakem, ve které dochází ke kolizi iontů plynu a analytu. Vzniklé fragmenty jsou přesouvány do Q3 a analyzovány. Tzv. tandemové uspořádání představuje tedy více zapojených analyzátorů za sebou pro zajištění vysoké selektivity detekce. Dalším příkladem jsou hybridní hmotnostní spektrometry, kombinující výhody jednotlivých analyzátorů: Q-TOF, kvadrupólový analyzátor s orbitální pastí (Q-OT), lineární iontová past s orbitální pastí (LTQ-OT) a další (Andrews et al., 2011; Michalski et al., 2011).

Iontová past

Iontová past funguje na principu zadržování iontů pomocí napětí na elektrodách po určitý časový úsek a následně je analyzuje (March, 1997). Nezbytnou součástí je helium, které funguje na principu tlumícího plynu a umožňuje akumulaci iontů uvnitř pasti (Havlíček and Tureček, 2020). Nejběžnější typ iontové pasti, často označované jako Paulova past se vyrábí ve dvou různých geometrických uspořádáních: sférická (3D) nebo lineární (2D) (Berkeland et al., 1998).

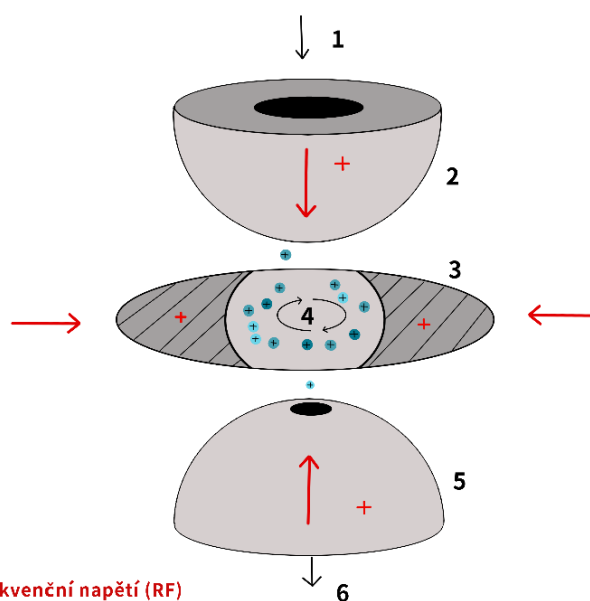
Lineární iontové pasti (LIT – Linear Ion Trap) jsou složeny ze 4 hyperbolických tyčí na jejichž koncích jsou umístěny elektrody, které umožňují uchovat ionty. Na ionty působí vysokofrekvenční střídavé napětí (RF) a axiálně stejnosměrné napětí (DC) (obr. 1.6) (Stafford et al., 1984). LIT se nejčastěji používá v pilotních studiích, které jsou zaměřeny na kvalitativní identifikaci proteinů (Rockwood et al., 2018). Sférická past se skládá ze tří elektrod: centrální prstencová elektroda, výstupní a vstupní koncová elektroda (obr. 1.7). Vstupní elektroda obsahuje menší středový otvor, skrz něj jsou ionty pulzně přivedeny do pasti. Ionty jsou zachyceny uvnitř pasti vložím vhodných poměrů napětí na elektrody. Výstupní elektroda obsahuje jeden, nebo více otvorů pro snadné vypuzení iontů směrem k detektoru (Farrar, 1988).



Stejnoseměrné napětí (DC)

Vysokofrekvenční střídavé napětí (RF)

Obr. 1.6 Schéma LIT (Rydlová, 2021) 1-vstup iontů z iontového zdroje, 2-čtyři kvadrupólové tyče (elektrody), 3-stabilní trajektorie iontů, 4-nestabilní trajektorie iontů, 5-vstup do detektoru



Vysokofrekvenční napětí (RF)

Obr. 1.7 Schéma 3D iontové pasti (Rydlová) 1-vstup iontů z iontového zdroje, 2-vstupní koncová elektroda, 3-prstencová centrální elektroda, 4-oscilující zachycené ionty, 5-výstupní koncová elektroda, 6-vstup do detektoru

Orbitrap

Analyzátor typu orbitální pasti (OT) disponuje vysokou rozlišovací schopností a tím zvyšuje svůj potenciál pro využití v klinické praxi. Součástí je centrální vřetenovitá elektroda obklopena vnější elektrodou skládající se ze dvou částí (Perry et al., 2008). Ionty se zdržují mezi elektrodami uvnitř, ale nepůsobí na ně žádné RF ani magnet, kterým disponují konvenční pasti. Místo toho jsou zachyceny elektrostatickým polem (Scigelova and Makarov, 2006). Ionty jsou do OT vypuzovány ve svazku v krátkém časovém intervalu s dostatečnou tangenciální rychlostí ze zařízení nazývaném C-trap. Tato část představuje uzavřený prostor vyplněný dusíkem, kde dochází k akumulaci a zachycení iontů. Ionty jsou po vstupu do analyzátoru přitahovány elektrostatickým polem ke středové elektrodě a zároveň je tato přitažlivost kompenzována odstředivou silou. V důsledku toho začnou oscilovat nejen kolem vřetenovité elektrody (orbitální pohyb), ale i podél ní (axiální pohyb) (Perry et al., 2008). Se stoupajícím napětím dochází ke stlačení iontů a stabilitě jejich trajektorie, která zamezuje nežádoucí kolizi s vnitřní elektrodou. Frekvence axiálního pohybu iontů je nezávislá na počáteční energii, ale je úměrná hodnotě m/z . Indukovaný proud zaznamenaný na vnějších elektrodách je převeden z dat frekvencí pomocí Fourierovy transformace na hmotnostní spektrum. OT disponuje schopností detekovat ionty, a proto nepotřebuje k detekci samostatně detektor. Tento typ analyzátoru v kombinaci s nano-LC separacemi se osvědčil jako užitečný nástroj v oblasti proteomiky. (Hu et al., 2005; Makarov, 2000). OT disponuje schopností fragmentace, ale jeho neocenitelnou vlastností je efektivní detekce iontů s vysokým rozlišením. Proto je často využíván v hybridních systémech, kde k fragmentaci iontů dochází v jiném analyzátoru, k němuž je připojen OT jako detektor. Často se využívá ve spojení s lineární iontovou pastí, kde dochází k selekci a fragmentaci iontů (Scigelova and Makarov, 2006).

1.6.3 Hmotnostní detektory

Z analyzátoru proudí ionty do poslední části, kde dopadají na detektory. Jejich hlavní úlohou je detekovat dopadající ionty a transformovat je na signál (Koppelaar et al., 2005). Detektor zaznamenává buď indukovaný náboj, nebo proud vytvářený při průchodu iontu či jeho nárazu a výsledky zobrazuje ve formě hmotnostního spektra (Agarwal and Goyal, 2017). Existuje několik typů detektorů, ty nejlepší z nich jsou

klasifikovány podle rychlosti časové odezvy, nízkých nákladů, malého šumu, vysokého rozlišení, dlouhé životnosti a stability (Neetu et al., 2012). Výběr vhodného detektoru k analýze závisí též na konstrukci hmotnostního spektrometru a jeho plánovaném využití.

Některé detektory fungují na principu měření proudu při dopadu iontů na jejich povrch. Tento typ detekce využívá tzv. Faradayova klec. Ionty dopadající na povrch dynody emitují elektrony, čímž dojde k indukci proudu a jeho zaznamenání (Maithal and Muralidhar, 2002). Dynodová elektroda je tvořena emitujícím materiálem (CsSb, GaP, BeO) (Agarwal and Goyal, 2017). Dalším využívaným typem je elektronový násobič, který patří mezi vysoce citlivé detektory a je tvořen z několika dynod. Ionty narážejí na povrch dynody, kde dochází k emitaci elektronů. Tyto elektrony narážejí na další dynodu, kde se generují sekundární elektrony a výsledkem je kaskáda elektronů (Maithal and Muralidhar, 2002).

1.6.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie je odvozena od slova tandem – dvojitý a používá se pro identifikaci proteinové nebo peptidové sekvence (Chen and Yates, 2007). Název vystihuje princip této metody, při které se při analýze uplatňují dva a více hmotnostních analyzátorů. Testovaný analyt je ionizován a ionty o zvolené hmotnosti jsou odděleny od ostatních v první části hmotnostního spektrometru. Následně vybrané primární ionty prochází kolizní celou, kde jsou fragmentovány za vzniku fragmentovaných produktů, které jsou skenovány v MS/MS (McLafferty, 1981). Typickým tandemovým uspořádáním je Q-TOF nebo QqQ, které bylo zmíněno v kapitole hmotnostní analyzátorů. První kvadrupól slouží k výběru jediného iontu ze směsi, který je následně předán do kvadrupólu druhého. V kolizní cele (druhý kvadrupól) dochází ke vzniku fragmentů, které se přenesou na třetí kvadrupól, kde dochází k jejich třídění podle molekulové hmotnosti. Konečným výsledkem je sekvence aminokyselin daného peptidu, který byl prekurzorovým iontem (Hunt et al., 1986). U prvního zmiňovaného uspořádání jsou prekurzorové ionty selektovány v kvadrupólu, následně fragmentovány v kolizní cele a tyto fragmenty jsou poté selektovány v průletovém analyzátoru a detekovány (Johnson et al., 2002).

K vlastní fragmentaci peptidů může dojít více způsoby, především se využívá kolizní indukovaná disociace (CID), která je využívanou metodou i v odhalení nízkomolekulárních látek. Většina moderních hmotnostních spektrometrů je založena na metodě CID, při které dochází k štěpení vazeb působením kinetické energie a následnému rozpadu molekulárních iontů na fragmenty (Douglas, 2009).

Fragmentové ionty vzniklé CID však často nestačí k úplné charakterizaci analytů. V posledních letech proto došlo k rozmachu alternativních metodik tandemové MS, jejichž cílem je nabídnout úplnou strukturní charakterizaci metabolitů a lipidů (Heiles, 2021).

Další fragmentační metodou je přenos elektronů (ETD) umožňující fragmentovat samostatně nabitě prekursorů a často tak poskytuje strukturně diagnostické fragmenty nepozorované při CID. Při fragmentaci vznikají *c*- a *z*-ionty s neporušenými modifikacemi na postranních řetězcích (Chen et al., 2018). ETD se zejména stala populární pro sekvenování peptidů s posttranslačními modifikacemi (Frese et al., 2011).

CID a ETD patří mezi dvě nejčastěji používané fragmentační techniky v hmotnostní spektrometrii (Sobott et al., 2009). Třetí využívanou technikou specifickou pro hmotnostní spektrometr typu Orbitrap je kolizní disociace pro vyšší energii (HCD). Fragmentace typu HCD využívá vyšší kinetickou aktivační energii při kratším časovém intervalu za vzniku *b*-, *y*- a *a*-iontů (Lingdong Quan, 2013). Principem této metody je fragmentace prekursorových iontů v HCD kolizní cele s následným transportem do C-pasti a detekci v Orbitrapu. Při použití vyšších aktivačních energií je dosaženo bohatších MS/MS spekter s vysokým rozlišením (Nagaraj et al., 2012).

1.7 Kvantitativní proteomika

Během posledních několika desetiletí se proteomika založená na hmotnostní spektrometrii stala stále výkonnějším nástrojem, který je nyní schopen rutinně detekovat a kvantifikovat tisíce proteinů (Pappireddi et al., 2019). Při hledání nových indikátorů určitého biologického stavu se kvantitativní proteomika stala důležitou součástí k objevování a ověřování proteinových markerů v komplexních biologických vzorcích. Je známo, že mnoho proteinů relevantních pro onemocnění se v organismu vyskytuje v minimálním množství (ng/ml až pg/ml)

(Landegren et al., 2012). Kvantitativní proteomika získává informace o změnách na proteinové úrovni v buňce, tkáni nebo organismu. Schopnost přesné kvantifikace změn v proteosyntéze bílkovin v reakci na různé vnitřní a vnější změny biologického systému v čase je jedním z nejdůležitějších cílů proteomiky, jenž přispívá k objasnění fyziologických a biochemických mechanismů. (Elliott et al., 2009; Hernychová et al., 2014; Ong and Mann, 2005). Dostupných technik pro kvantifikaci proteinů je mnoho a výběr té nejvhodnější pro konkrétní projekt závisí na mnoha faktorech zahrnujících typy vzorků, jejich počet, vybavení, náklady a čas (Van Langenhove et al., 1981). Přesná kvantifikace vybraných proteinů v jedné analýze naráz je metoda finančně nákladná, náročná na přípravu a zpracování analytů, není tedy vhodná pro běžné každodenní zpracování vzorků od nových pacientů. Své neocenitelné uplatnění má v odhalování nových biomarkerů onemocnění (Hernychová et al., 2014).

Kvantifikace může být použita ve dvou základních provedeních. Při absolutní kvantifikaci se zjišťuje přesné množství nebo koncentrace proteinů ve vzorku, zatímco u relativní kvantifikace se určuje relativní poměr hladin proteinů ve vzorku (Van Langenhove et al., 1981). Při kvantifikaci mohou být sledovány všechny proteiny, nebo může být uplatněna tzv. cílená kvantifikace, při níž jsou sledovány vybrané proteiny ve vzorku (Röst et al., 2014).

1.7.1 Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace je v proteomice velmi žádaná, protože umožňuje stanovit látkové množství peptidu a tím někdy i proteinu ve vzorku. Základním principem absolutní kvantifikace je použití izotopově značených standardních peptidů o známé koncentraci (Zhang et al., 2013). Tyto syntetické analogy stanovovaných peptidů se v daném množství přidávají během zpracování ke vzorkům. Vzhledem k tomu, že syntetické i nativní peptidy mají stejnou chemickou strukturu, tak jsou při LC separaci k nerozeznání. Jejich rozdíl tkví v odlišné molekulové hmotnosti, která je u syntetických peptidů o 8 nebo 10 Da vyšší. V MS/MS analýze po fragmentaci vybraných prekurzorů a porovnáním intenzit produktových iontů neznačeného a izotopicky značeného peptidu se s ohledem na použitou koncentraci standardu vypočítá koncentrace stanovovaného peptidu (Gerber et al., 2003).

1.7.2 Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace zahrnuje metody s použitím značek (label based) i bez jejich použití (label free) (Zhu et al., 2009). Proteiny se značkou a bez značky mají opět stejné chemické vlastnosti, ale liší se svou hmotností. V současné době je na trhu několik typů značících metod, u kterých dochází k průběžným inovacím. První značící *in vivo* metodou je metabolické značení využívající růstu živých buněk a organismů v médiích s přidanými aminokyselinami, které obsahují stabilní izotopy uhlíku, dusíku nebo kyslíku. Těžké izotopy jsou inkorporovány do proteinů živých organismů podáváním izotopicky značených aminokyselin v růstovém médiu nebo potravě (Oda et al., 1999). V současné době je dobře zavedenou metodou tohoto typu značení SILAC (Stable Isotope Labeling in Cell Culture), využívající inkorporace aminokyselin (arginin, lyzin) značených izotopem ^{13}C a ^{15}N . Buňky jsou kultivovány na připraveném lehkém, nebo těžkém médiu, které se liší přítomností značených aminokyselin. Po inkorporaci do proteinové struktury, následném smíchání obou kultur jsou proteiny izolovány, štěpeny a analyzovány v hmotnostním spektrometru. V hmotnostním spektru se identifikují píky stejných peptidů lišících se posunem v hmotnostním spektru na základě jejich m/z . Relativní zastoupení je zjištěno porovnáním plochy pod píkem (Gehrmann et al., 2004; Mann, 2006).

Strategie tzv. izobarického značení pro relativní kvantitativní proteomiku umožňují paralelní multiplexování kvantitativních experimentů. Při této technice se chemicky značí více peptidových vzorků izobarickými variantami chemických značek a každá varianta má stejnou molekulární strukturu a hmotnost. Každá varianta, je však navržena tak, aby při fragmentaci v hmotnostním spektrometru vytvářela jedinečný tzv. "reportérový ion". Jakmile jsou vzorky peptidů označeny, zkombinovány a analyzovány pomocí MS, diferenciálně označené peptidy jsou nerozlišitelné v prvním MS spektru intaktních peptidů. Jelikož každá varianta značky obsahuje labilní složku s různou hmotností, lze generovat zmíněné "reportérové ionty" a zaznamenat je v následném MS^2 spektru. Intenzity z každé varianty jsou zaznamenány tak, aby představovaly relativní množství peptidů v jednotlivých variantách (Zhang et al., 2013).

Chemické značení využívá inkorporace izotopových značek na část peptidu, nebo proteinu v důsledku chemické reakce s činidlem. Značky se váží na aminovou, karboxylovou skupinu či na postranní řetězce. První využívanou metodou byl

tzv. ICAT (isotope-coded affinity tags) u kterého se využívá vazba na cystein. Značka se skládá z biotinové skupiny, thiol-specifické skupiny a linkeru, který nese značené izotopy obsahující 8 deuterií v „těžké“ formě a 8 vodíků ve formě „lehké“. Po navázání značek se oba vzorky smíchají, podstoupí digesci a analyzují pomocí LC-MS/MS. V hmotnostním spektru se u peptidu obsahující deuteria hmota posune o 8 Da (Anand et al., 2017; Gygi et al., 1999).

S objevem izobarických značek přišla možnost analýzy více než dvou vzorků najednou. Mezi nejvíce využívané typy hmotnostních značek patří iTRAQ a TMT. U metody iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantification) lze analyzovat 4 až 8 vzorků najednou a při použití TMT (Tandem Mass Tag) dokonce až 16 vzorků v jedné analýze. Na rozdíl od předešlých metod je u izobarických značek zapotřebí tandemového uspořádání MS/MS (Dayon et al., 2010; Elliott et al., 2009). iTRAQ značka se skládá ze tří částí zahrnující peptidovou reaktivní skupinu, balanční skupinu a reportérovou skupinu. První část se váže kovalentní vazbou na postranní řetězce lysinu a N-konce peptidů. Reportérová skupina má specifickou hmotnost, která je zásadní při detekci a vyhodnocení. U varianty s možností naznačit až 8 vzorků se hmotnost této skupiny pohybuje od 113.1–119.1 a 120.1 Da. Balanční skupina vyrovnává celkovou hmotnost na 305.1 Da. U varianty se čtyřmi značkami je uváděná hmotnost reportérové skupiny 114.1, 115.1, 116.1 a 117.1 Da, balanční skupina vyrovnává hmotu celé značky na 145.1 Da. Jelikož se jedná o izobarické značky, nejsou v průběhu separace v HPLC a v MS spektru rozpoznatelné a jejich píky se překrývají. K rozpoznání dochází po fragmentaci v MS/MS módu, kde se oddělí reportérové skupiny, podle kterých lze určit relativní poměry jednotlivých peptidů ve vzorcích (Evans et al., 2012; Wiese et al., 2007).

Vzhledem k finanční náročnosti při používání značících technik a složitějšímu zpracování vzorků, při kterém může dojít ke ztrátě části proteinů, se často využívá metoda label free (Liu et al., 2004). Je to kvantifikační metoda založená na porovnávání iontových intenzit peptidů, kde existuje vztah mezi intenzitou MS signálu peptidu a jeho relativním množstvím. Při tandemové hmotnostní spektrometrii LC-MS/MS se využívá porovnávání spekter tzv. „spectral counting“, které je založené na teorii, čím více je daného peptidu ve vzorku, tím více MS/MS spekter se naměří (Zhu et al., 2009).

Výhodou u metod využívajících značení je, že se po navázání značek vzorky smíchají dohromady a v LC-MS/MS, popřípadě v LC-MS probíhá jedna analýza. Naopak u metody label free je každý vzorek připraven a podroben analýze samostatně (Nahnsen et al., 2013; Old et al., 2005; Zhu et al., 2009), což má své pozitivní vlastnosti. Především malé náklady a méně kroků se vzorkem, které by mohly vést k variabilitě. Nevýhodou je poměrně nízká přesnost měření, špatná reprodukovatelnost a detekce části peptidů (Webb-Robertson et al., 2015). Tímto problémem se zabývá studie od Coxe a jeho kolegů, kteří vyvinuli komerčně dostupný nástroj MaxLFQ. Jedná se o obecnou technologii bezznačkové kvantifikace, která je snadno použitelná a kompatibilní se standardními pracovními postupy statistické analýzy. Prostřednictvím algoritmů zvládá velmi rozsáhlé experimenty o více než 500 vzorcích (Cox et al., 2014). Všechny uvedené metody ať za použití značek nebo bez nich mají své omezené možnosti, a proto je ve vzorcích kvantifikována jen část proteinů. Ztráta nesouvisí jen s technologickým a metodickým faktorem, ale i s preanalytickou přípravou vzorků a zpracováním získaných dat z MS (Hernychová et al., 2014).

2 Praktická část

2.1 Přístrojové vybavení

Analytické váhy XP204 Excellence plus (Mettler Toledo, Strašnice, ČR)

Bio vortex V1 plus (Biosan, Riga, Litva)

HPLC systém Alliance 2695 separační modul (Waters, Milford, MA, USA)

Chladicí skříň ZD 2215 (Zanussi, Pordenone, Itálie)

Laboratorní štítkovač BMP 21-LAB (Brady, Milwaukee, WI, USA)

Magnetická míchačka Big-Squid (IKA, Staufen, Německo)

Odstředivka Megafuge 16R centrifuge (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Odstředivka Mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Odstředivka FVL-2400 N combi-spin (Biosan, Riga, Litva)

PH metr Inolab level (WTW - Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG., Weilheim in Oberbayern Německo)

PH elektroda SenTix 21 ((WTW - Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG., Weilheim in Oberbayern Německo)

Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Reader Beckman Coulter (CPS) (Danaher corporation, Brea, CA, USA)

Sběrač frakcí Fraction Collector III (Waters, Milford, MA, USA)

Thermomixer C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Třepačka Thermo-shaker TS-100 C (Biosan, Riga, Litva)

Třepačka Vortex V1 plus (Biosan, Riga, Litva)

Ultimate 3000 Dionex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Ultimate 3000RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Ultrazvukový sonikátor Brand VGT1730QT (eMAG, Bukurešť, Rumunsko)

Vakuová filtrační aparatura (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA)

Vakuová odparka Concentrator plus 5350 (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Výrobník ledové tříště 6B1540 (Brema, Říčany, ČR)

Zařízení PureLab classic na výrobu deionizované vody (Elga LabWater, Lane End, UK)

2.2 Kity

Kit na odstranění abundantních proteinů - ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

Kit pro bicinchoninový test (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NuPAGE Novex 10 % Bis Tris gel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

TMT Isobaric Label Reagent set (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

2.3 Kolony

Depleční mini kolona - High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Kapilární kolona (75 µm × 20 mm) naplněná částicemi Acclaim PepMap100 C18 o velikosti 3 µm Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

MARS Hu-14 imunoafinitní kolona (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)

MARS Hu-14 imunoafinitní spin kolona (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)

NanoEase kolona (3 µm, 100 Å; Waters, Milford, MA, USA).

Předkolona (5 µm, 100 Å; Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Separační kolona (75 µm × 150 mm) naplněná částicemi Acclaim PepMap RSLC C18 o velikosti 2 µm Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

2.4 Chemikálie

2-β-merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Aceton (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Coomassive brilliant blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Deoxycholát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dithiothreitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dodecyl sulfát sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Ethylacetát (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Fetální bovinní sérum FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Fosfátový pufr (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydrogenuhlíčan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Jodacetamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Kyselina octová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Kyselina trifluorooctová (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
LDS sample buffer Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Proteinový standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Precision Plus protein standard Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Pufr A pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Pufr B pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Růstové médium RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
TEAB pufr (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Trypsin, Sequencing Grade Modified (Promega, Madison, WI, USA)
Tris(2-karboxyetyl) fosfin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Urea (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Voda LC-MS Chromasolv (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.5 Materiál

0,22 µm spin filtr Ultrafree-MC (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)
Amicon Ultra-4 3K filtry (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
Běžné laboratorní sklo (kádinky, lahve pro uchovávání roztoků)
BD P100 odběrové zkumavky (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Centrifugační falkony 15ml, 30ml (Guangzhou Jet Bio-Filtration, Guangzhou, Čína)
Centrifugační tuby, různé objemy (TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
Empore kolonky 7 mm/3 ml (3M Company, Saint Paul, MN, USA)
Hamilton stříkačka (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Indikátorové pH papírky (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Krycí fólie na mikrotitrační destičky (AB Sciex, Foster City, CA, USA)
Kryozkumavky 5 ml (Corning Incorporated, New York, USA)
Membránový filtr 47 mm (MilliporeSigma, Burlington, USA)

Mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
Mikrotitrační destičky (96 TPP, Trasadingen, Švýcarsko)
Mikrozkumavky, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
Ochranné osobní pomůcky (nitrilové rukavice)
Špičky pro mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Hamburg, Německo)
Ultramicrospin kolonky (Harvard Bioscience, Holliston, USA)
Vaničky pro multikanálovou pipetu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Vialky pro HPLC (Waters, Milford, MA, USA)

2.6 Programové vybavení

Chromeleon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
MassLynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA)
Metascape v3.5.20240101 (www.metascape.org)
Multimode Analysis software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)
PMi prewiev 2.8.2. (Protein Metrics, Cupertino, USA)
Proteome Discoverer 2.4. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Raw Meat 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Reactome 3.7 (www.reactome.org)
R-software
Sequest HT (University of Washington, USA)
String 12.0 (www.string-db.org)
Thermo Q Exactive software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Thermo Xcalibur Qual Browser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Většina experimentální práce v průběhu doktorského studia byla prováděna ve spolupráci s Katedrou radiobiologie na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Náplní experimentální práce byla příprava vzorků a vykonávání různých metodik pro kvalitativní i kvantitativní analýzu proteinových vzorků souvisejících se studovanou problematikou. K těmto účelům, které zahrnovaly separaci a identifikaci proteinů, byly využity techniky hmotnostní spektrometrie ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Studie byla zaměřena na identifikaci proteinových biomarkerů v lidské plasmě. Za účelem doplnění informací získaných analýzou lidské plasmy byla provedena také analýza proteinů na prasečím modelu.

2.7 Charakteristika a odběr vzorků od leukemických pacientů

Vzorky lidské krve byly odebírány v letech 2015-2019 od zdravých dárců a leukemických pacientů ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Bulovka v Praze. Ke studii byl získán souhlas etické komise (obr. 2.1a, 2.1b). Vzorky krve byly odebírány od pacientů s leukemií, kteří v rámci chemoterapie podstupují celotělové ozařování, s informovaným souhlasem a etickým schválením Fakultní nemocnice Bulovka v Praze. Zdraví dárce byli vybráni na základě jejich aktuálního zdravotního stavu. V době odběru nesměli mít příznaky infekčního onemocnění, úraz či prodělanou operaci. Krev od každého pacienta byla odebrána podle obecných zásad pověřenou sestrou vždy v ranních hodinách ve dvou intervalech, ráno před celotělovým ozářením a následně 24 hodin po celotělovém ozářením. U zdravých dárců byla krev odebrána ve stejném časovém intervalu.

Pro tento projekt byla odebrána krev od 15 dobrovolníků, kteří představovali kontrolní skupinu, od 16 leukemických pacientů z fakultní nemocnice Bulovka v Praze. Celkem bylo tedy k dispozici 30 vzorků od zdravých dárců a 32 vzorků od leukemických pacientů, uvedeno v tabulce 2.1 a 2.2. Vzorky s krví byly převzaty v ranních hodinách a zpracovány v nejkratším časovém intervalu, nejdéle vždy do 1 hodiny od odběru. Krevní vzorky byly rozděleny do 4 skupin (K0h – kontrolní vzorek v čase 0h, K24h – kontrolní vzorek odebraný po 24h od prvního odběru, TBI 0G – vzorek od pacienta před ozářením, TBI 24h – vzorek od pacienta 24h po ozářením), které bylo možné vzájemně porovnat mezi sebou a určit, zda vytipované

markery nesouvisí s onemocněním pacienta a přirozenou změnou hladiny proteinů v organismu v závislosti na čase.

	n	muži	ženy	Medián věku
Kontrolní skupina	15	9	6	36 (25–46)

Tab. 2.1 Základní informace o dárcích

kód pacienta	pohlaví	věk	diagnóza	dávka (Gy)	Skupina
TBI 2 B	M	28	ALL	3.72	1
TBI 6 B	M	56	ALL	4.49	1
TBI 7 B	F	39	ALL	4.18	2
TBI 8 B	M	46	ALL	4.38	1
TBI 9 B	M	31	ALL	4.65	2
TBI 10 B	M	56	ALL	4.46	1
TBI 11 B	M	53	ALL	4.41	1
TBI 13 B	F	54	ALL	4.42	2
TBI 18 B	M	19	ALL	4.12	2
TBI 19 B	M	54	ALL	4.28	1
TBI 21 B	M	46	ALL	3.84	2
TBI 23 B	M	53	ALL	4.19	1
TBI 24 B	F	58	ALL	4.33	2
TBI 25 B	F	46	ALL	3.94	2
TBI 27 B	M	58	ALL	4.89	1
TBI 29 B	M	30	ALL	3.87	2

Tab. 2.2 Základní informace získané od leukemických pacientů včetně diagnózy, zařazení do skupiny a obdržené dávky záření. ALL-akutní lymfoblastická leukemie, TBI x – označení jednotlivých vzorků.

U pacientů i dárců byly zaznamenány potřebné informace (věk, pohlaví, diagnóza, dávka) a byla k nim přidělena identifikační čísla. Věk zdravých dárců se pohyboval v rozmezí 25-46 let s průměrem 36 let a poměrem pohlaví 9:6 s větším zastoupením mužů. Věk pacientů se pohyboval v rozmezí 19-58 let s průměrem 38 let a poměrem

pohlaví 26:7 s větším zastoupením mužů. Průměrná celková dávka, která byla použita při ozáření pacientů byla 4 Gy.

2.7.1 Získání plasmy z plné krve

Krev od leukemických pacientů byla odebírána v ranních hodinách do BD P100 zkumavek (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), které jsou vyráběny pro vědecké účely a jsou vybaveny mechanickým separátorem s filtrem. Tyto zkumavky obsahují inhibitor proteáz a protisrážlivý koagulant K₂EDTA (15,8 mg), který je nezbytný pro zajištění stability vzorku. Zkumavky s odebranou venózní krví byly ihned po odběru transportovány k zpracování, které probíhalo do 1 hodiny po odběru. Separace plasmy byla provedena za použití centrifugy megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) po dobu 20 min při 22 °C a 2 500 x g v úhlovém rotoru. Působením odstředivých sil se krevní tělíska stlačila pístem do spodní části zkumavky pod separátor a plasma zůstala nad separátorem.

Získaný objem plasmy byl převeden do zkumavky o objemu 15 ml, která se v dalším kroku vložila do centrifugy a točila se 5 min při 22 °C a 2 500 x g. Tím bylo docíleno, že zbytek krevních tělísek (peleta) zůstal u dna a plasma bez zbytečných kontaminantů mohla být zpracována dál. Množství odebrané plasmy každého vzorku se pohybovalo v rozmezí 2-3 ml. Supernatant byl následně odebrán a rozdělen na alikvóty po 100 µl do 10 mikrozkušavek a zbytek plasmy byl přenesen po 0.5 ml do větších mikrozkušavek. Všechny mikrozkušavky byly popsány identifikačními čísly a skladovány v mrazáku ZD 2215 (Zanussi, Pordenone, Itálie) při -80 °C pro pozdější zpracování.

2.7.2 Úprava vzorků a odstranění vysoce zastoupených proteinů v lidské plasmě

Příprava lidské plasmy před proteomickou analýzou zahrnovala v prvním kroku přefiltrování vzorků při 10 000 xg po dobu 5 min při teplotě 4 °C přes speciální zkumavku Ultrafree-MC s membránou o velikosti pórů 0.22 µm (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, USA). V další fázi byly testovány různé metody k odstranění vysoce zastoupených proteinů.

Odstranění abundantních proteinů pomocí hexapeptidové knihovny

K odstranění vysoce zastoupených proteinů u lidské plasmy byla testována technologie hexapeptidové knihovny ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Postup zahrnoval kroky předepsané výrobcem. Pro odstranění skladovacího roztoku z kolonek s hexapeptidovou knihovnou bylo použito centrifugy nastavené na 1000 xg po dobu 1 minuty. Ekvilibrace kolonek byla provedena promícháváním pomocí 600 µl promývacího pufru po dobu 5 minut s použitím třepačka Vortex V1 plus (Biosan, Riga, Litva). Tento krok byl následně ještě jednou zopakován, přičemž supernatant byl opět odstraněn centrifugací za stejných podmínek. Příprava samotných vzorků zahrnovala v prvním kroku centrifugaci při 10 000 xg po dobu 10 minut, tím bylo docíleno odstranění horní lipidové vrstvy a sraženin usazených na dně zkumavky. Pro dosažení optimálních výsledků by vzorky měly obsahovat více jak 50 mg/ml bílkoviny. Vzhledem k tomu, že lidská plasma obsahuje 65–85 µg/µl bílkoviny, tento požadavek byl splněn. Na zaktivované kolonky byl nanesen 1 ml vzorku a inkubován na rotační třepačce po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Supernatanty s nenavázanými proteiny byly odstraněny centrifugací při 1000 xg po dobu 1 minuty. V následujícím kroku byly kolonky promývány za použití 600 µl promývacího pufru a 600 µl deionizované vody. Pro uvolnění navázaných proteinů z hexapeptidové knihovny bylo naneseno 100 µl rehydratovaného elučního činidla. Obsah kolonky byl promíchán po dobu 5 sekund a inkubován při pokojové teplotě 15 minut. Proces inkubace a eluce byl proveden dvakrát. Po centrifugaci při 1000 xg po dobu 1 minuty byly jednotlivé eluáty smíchány a uchovány k dalšímu zracování při -80°C.

Odstranění abundantních proteinů pomocí centrifugační kolonky Agilent 5188-6560 MARS Hu-14 0.45ml

Další variantou pro odstranění vysoce zastoupených proteinů z lidské plasmy byla centrifugační kolona Agilent MARS Hu-14 0.45ml (Agilent Technologies, Wilmington, USA). Ekvilibraci kolonky bylo docíleno pufrem A pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, USA). Pro analýzu bylo použito 10 µl plasmy a 190 µl pufru A. Vzorek byl nanesen na kolonku a centrifugován při 100 xg po dobu 1 min. Inkubace byla provedena za laboratorní teploty po dobu 5 min. K promytí kolony bylo použito 400 µl pufru A a centrifugace při 100 xg po dobu 2 min a 30 s.

Tento krok byl zopakován ještě jednou. Tzv. frakce „flow-through“ (FT) byla eluována 2.5 ml pufrem B pro MARS (Agilent Technologies, Wilmington, USA).

Touto metodou bylo docíleno odstranění albuminu, imunoglobulinu G, A a M, transferinu, haptoglobinu, antitrypsinu, fibrinogenu, alfa-2-makroglobulinu, alfa-1-kyselého glykoproteinu, apolipoproteinu AI, apolipoproteinu AII, complementu C3, a transtyreтину, dle protokolu výrobce.

Odstranění abundantních proteinů pomocí jednorázových centrifugačních kolonek High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin

Jako jiná použitá varianta centrifugačních kolonek byly vyzkoušeny jednorázové kolonky High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Kolonky byly vytemperovány na pokojovou teplotu a bylo do nich naneseno 100 µl vzorku. Obsah kolonek byl extenzivně promíchán a inkubován při pokojové teplotě po dobu 10 min. Po inkubaci byla kolonka dána do centrifugy při 1000 xg po dobu 2 min, kde byla frakce obsahující proteiny zachytávána do zkumavky. U jednorázových kolonek došlo k odstranění stejných proteinů jako u předešlé metody.

Odstranění abundantních proteinů pomocí depleční kolony MARS Hu-14

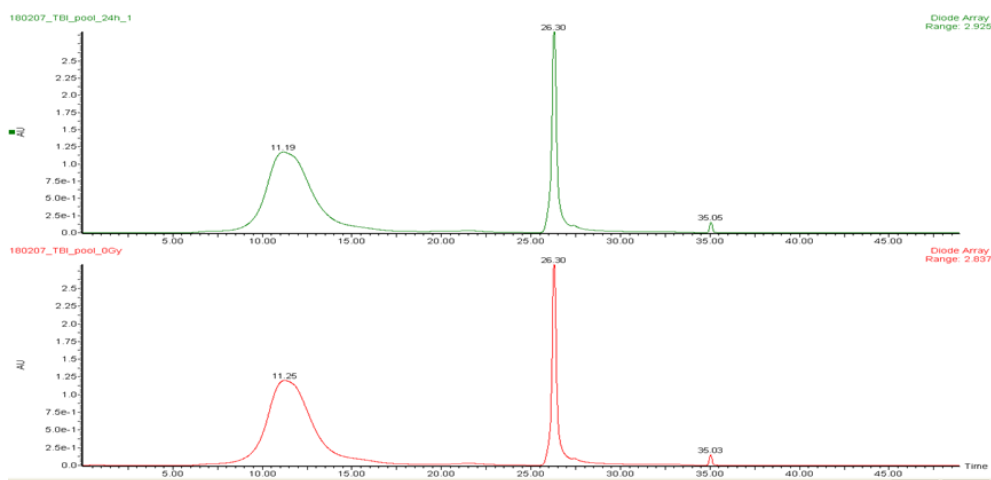
Na pracovišti KMPB FVZ UO je zavedenou metodou pro odstranění abundantních proteinů pomocí imunoafinitní deplece HPLC kolonou (4.6 mm ID x 100 mm) MARS Hu-14 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) s dodávanými pufry a používá se HPLC systém Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) s UV detekcí. Před samotnou deplecí byly vzorky 4x ředěny přidáním pufru A (Agilent Technologies, Wilmington, USA). HPLC vialky s 200 µl vzorku byly dány do karuselu kapalinového chromatografu, který byl vytemperován na teplotu 4 °C. Před vlastní analýzou vzorků byla provedena příprava celého HPLC systému, která zahrnovala proplach, převedení frit z methanolu na mobilní fáze a ekvilibraci. Teplota kolony byla nastavena na 22 °C a tlak na 60 mbar. Jedna separace probíhala 49 min (tab. 2.3). a nástřik jednotlivých vzorků (150µl) probíhal vždy na začátku metody.

Pořadí	Čas (min)	Pufr A %	Pufr B %	Průtok (ml/min)
1	0.00	100		0.125
2	21.00	100		0.125
3	22.00	100		1.00
4	24.00	100		100
5	24.10		100	1.00
6	32.00		100	1.00
7	32.10	100		1.00
8	44.00	100		1.00
9	45.00	100		0.125
10	49.00	100		0.125

Tab. 2.3 Průběh separace (Rydlová, 2021)

Frakce (FT-flow through), která obsahovala námi hledané nízko zastoupené proteiny, volně protékala bez zachycení na koloně v časovém intervalu mezi 9 a 16 minutou při průtoku mobilní fáze A 0.125 ml/min. Byla zachytávána sběračem frakcí Fraction Collector III (Waters, Milford, USA) mezi 5. - 22. minutou (obr. 2.2). Eluce vysoce zastoupených proteinů, které byly na koloně navázány na imobilizované protilátky, probíhala při průtoku 1 ml/min mobilní fází B. Při UV spektrometrické detekci byla použita vlnová délka 280nm.

Zachycené vzorky byly po dobu separace chlazeny na ledu ve stojanu sběrače frakcí. Pomocí imunoafinitní chromatografie došlo k odstranění až 94 % celkového obsahu proteinů, dle protokolu výrobce. Odstraněny byly nejvíce zastoupené proteiny ve vzorku (albumin, IgG, antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin, fibrinogen, alpha2-makroglobulin, alfa1-kyselý glykoprotein, IgM, apolipoprotein AI, apolipoprotein AII, komplement C3, and transthyretin). K ovládní HPLC systému Alliance 2695 byl použit software Masslynx 4.0 (Waters, Milford, USA) a sběr vzorků byl zajištěn sběračem frakcí (Waters, Milford, USA).



Obr. 2.2 Chromatografický záznam imunoafinitní separace pomocí HPLC kolony MARS Hu-14. První pík zobrazuje zachytávanou frakci FT s nížce zastoupenými proteiny a druhý pík zachycuje eluci. Imunoafinitní separace byla provedena u vzorků 0 G i 24 h ve stejné časové posloupnosti.

Odstranění abundantních proteinů pomocí ethanolu

Testovací variantou byla deplece ethanolem, která byla použita pro odstranění většího množství albuminu. 15 μ l lidské plasmy bylo doplněno deionizovanou vodou do objemu 500 μ l a vloženo do centrifugy při 5 000 xg po dobu 15 min. Po odstranění horní lipidové vrstvy bylo přidáno 450 μ l 150 mM NaCl a 525 μ l podchlazeného ethanolu a inkubováno při 4 °C po dobu 1 hodiny. Pro lepší oddělení vrstvy s nežádoucím albuminem byla použita centrifuga při 16 000 xg po dobu 45 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována s 300 μ l podchlazeného 42% ethanolu. Po centrifuze a opětovném odstranění supernatantu, byla peleta rozpuštěna v 100 μ l 100 mM hydrogenuhličitanu triethylamonného (TEAB).

2.7.3 Úprava vzorků po imunodepleci

Po separaci vysoce zastoupených proteinů byly vzorky pomocí membránových Amicon Ultra-4 3K filtrů (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) zkoncentrovány, odsoleny a převedeny z použitého HPLC MARS pufru A do vody, která je více vhodná pro následující štěpení proteinů. Depletovaná plasma byla přenesena na Amicon Ultra-4 3K filtr a stočena na centrifuze po dobu 15 min při 4 °C a 7 500 xg . V dalším kroku bylo na filtr přidáno 500 μ l deionizované vody a vzorky byly opět stočeny

v centrifuze za stejných podmínek, jako v předešlém kroku. Tento bod byl z důvodu lepšího promytí zopakován ještě jednou a po zkoncentrování na celkový objem 200 μ l byly vzorky přesunuty do mikrozkuumavek a uschovány při $- 80$ °C.

2.7.4 Stanovení bílkoviny metodou BCA na mikrotitrační destičce

Stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích bylo provedeno u všech vzorků metodou chelatace měďnatého iontu kyselinou bicinchoninovou (BCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Vzorky byly nanášeny v celkovém objemu 25 μ l v doubletu na mikrotitrační destičku včetně kalibrační řady standardu, do každé jamky bylo přidáno 200 μ l činidla. Kalibrační řada byla sestavena z 9 koncentrací obsahujících různé množství bovinního sérového albuminu (1000, 750, 500, 375, 250, 125, 25, 5 a 0 μ g/ml).

Mikrotitrační destička s nanesenými vzorky a kalibrační řadou byla vložena do termomixeru C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo) a inkubována po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Po zchladnutí mikrotitrační destičky při pokojové teplotě byla změřena bílkovina pomocí programu Multimode Analysis software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) na přístroji reader Beckman Coulter. (Danaher corporation, Brea, USA).

2.7.5 Gelová elektroforéza

Vzorky s odstraněnými abundantními proteiny ze všech metod byly porovnávány pomocí jednorozměrné gelové elektroforézy s nedepletovanou plasmou. Elektroforéza byla provedena na komerčně dostupném 10% gelu NuPAGE Novex Bis Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, USA). Do jednotlivých jamek bylo nanášeno celkem 15 μ g vzorku smíchaný s LDS pufrem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a 2- β -mercaptoethanolem (Merck Group, Darmstadt, Německo). Proteinový standard byl použit Precision Plus protein standard Kaleidoscope (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Elektroforéza byla provedena při nasatvení 100 V po dobu 10 min a následně 200 V po dobu 30 min, Po skončení byly gely opláchnuty pomocí dH₂O po dobu 5 minut. Pro vizualizaci byly gely dány do barvicího roztoku Coomassie brilliant blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) po dobu 15 minut. Odbarvení bylo provedeno pomocí odbarvovacího roztoku, který byl složen

z 12,5 % CH₃COOH (Merck Group, Darmstadt, Německo), 82,5 % dH₂O a 5 % MeOH (Merck Group, Darmstadt, Německo).

2.7.6 Enzymatické štěpení a přečištění

V případě enzymatického štěpení vzorků bylo do zkumavek odebráno potřebné množství jednotlivých vzorků s 50 µg bílkoviny. Jednotlivé alikvóty plasmy byly rozpuštěny s 250 µl 10 mM fosfátovým pufrem (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a k nim bylo přidáno 30 µl 10% dodecylsírany sodného (SDS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Proteiny byly denaturovány při 95 °C po dobu 3 minut. V dalším kroce byl do mikrozkušavek přidán 30 µl 1 M triethylamonium bikarbonátu a následně 15 µl 200 mM Tris-(-2 karboxyethyl)-fosfin hydrochlorid (TCEP) k redukci disulfidických vazeb mezi cysteiny. Vzorky byly vloženy do termomixeru po dobu 60 min při teplotě 37 °C a 600 rpm. Alkylace, která zamezuje k opětovnému spojení disulfidických můstků, bylo docíleno přidáním 15 µl 375 mM iodoacetamidu po dobu 30 min při pokojové teplotě. Imobilizace přebytečného iodoacetamidu bylo dosaženo přidáním 10 mM dithiotrenitolu. Proteiny byly vysráženy přidáním 6 objemů acetonu a inkubovány při -20 °C přes noc. Vysrážené proteiny byly odstředěny (8 000 × g) po dobu 10 min při 4 °C, supernatant byl odstraněn a proteinový granulát byl sušen 2 min ve vakuové odstředivce. Proteinový pelet byl znovu rozpuštěn v 70 µl vody, 10 µl 10% deoxycholátu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 10 µl 1 M triethylamonium bikarbonátu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v sonikátoru. Před přidáním trypsinu se upravilo pH pomocí 1 M HN₄HCO₃ na 8.5. Trypsin byl přidán v poměru 1:50, všechny vzorky byly vloženy do termomixeru při 300 rpm s nastavenou teplotou 37 °C a ponechány přes noc. K ukončení štěpného procesu byly vzorky okyseleny 20 µl 10% kyselinou trifluoroctovou a odstředěny (4 000 × g) po dobu 10 min, aby výsledné pH bylo s indikací 2. Supernatant byl převeden do čisté 1,5 ml zkumavky. Peleta byla promyta 100 µl 1% kyselinou trifluoroctovou a centrifugována při otáčkách 4 000 × g po dobu 2 min. Promývací roztok byl smíchán se supernatantem vzorku. Později bylo k roztoku přidáno 750 µl ethylacetátu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a mícháno po dobu 30 sekund ve vortexu. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze při otáčkách 10 000 × g po dobu 1 min. Horní organická vrstva byla odstraněna. Tento krok byl opakován čtyřikrát. Zbývající vodná vrstva obsahující

natrávené peptidy byla vysušena ve vakuové odstředivce. Vzorky byly znovu rozpuštěny ve 400 μ l 2% acetonitrilu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tato peptidická směs byla přečištěna pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) na kolonce Ultra microSpin s reverzní fází C18 (Harvard Bioscience, Holliston, USA). U kolonek byla provedena ekvibrace vnesením 200 μ l methanolu a vložením do centrifugy po dobu 1 min při 1000 rpm. Promytí kolonek bylo realizováno pomocí 200 μ l 50% acetonitrilu s 0.1% kyselinou trifluoroctovou a vložením do centrifugy za stejných podmínek. Poté bylo na kolonky opakovaně nanášeno 200 μ l 2% acetonitrilu, 0.1% kyselinou trifluoroctovou a ty vkládány do centrifugy po dobu 1 minuty a 1000 rpm. Po zaktivování kolonek byl několikrát po sobě nanesen vzorek a zkumavky byly znovu vloženy do centrifugy po dobu 1 min tentokrát při 1500 rpm. Odstranění interferujících složek a nečistot bylo provedeno pomocí 200 μ l 2% acetonitrilu, 0.1% kyselinou trifluoroctovou, kolonky byly opětovně umístěny do centrifugy po dobu 1 minuty při 1000 rpm.

Eluce byla provedena pomocí 200 μ l 50% acetonitrilu, 0.1% kyselinou trifluoroctovou. Tento krok byl prováděn opakovaně a následně byly vzorky odpařeny na vakuové odparce Concentrator plus 5350 (Eppendorf, Hamburg, Německo) a umístěny do mrazáku o teplotě -80°C . Před proteomickou analýzou byly vzorky rozděleny na alikvóty po 5 μ g a 15 μ g a vysušeny ve vakuové odparce. Pro LC-MS/MS analýzu bylo rozpuštěno 5 μ g vzorku v 20 μ l solventu A (2% acetonitril/0.1% kyselina trifluoroctová).

2.8 Charakteristika a odběr vzorků od miniprasat

K odběru krevní plasmy bylo získáno 22 miniprasat, které byly chovány ve viváriu Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové. Ke studii byl získán souhlas výboru pro práva zvířat při Ministerstvu obrany ČR (obr. 2.3). Zvířata byla chována individuálně s přirozeným světlem, voda a krmivo jim bylo podáváno *ad libitum*. Teplota byla udržována v rozpětí 18 až 20 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) a vlhkost na 60-70 %. Vzorky krve byly odebírány z krční žíly (*vena jugularis*) bez uspání před a 24 hodin po ozáření. Miniprasata byla celotělově ozařována ve věku 35 až 47 dnů gama zářením dodávaným zdrojem ^{60}Co (Chisocobalt, Chirana Technik, Rožnov pod Radhoštěm, Česká republika). Před ozářením byla uvedena do narkózy pomocí Zoletilu 100, Xylapanu a Narketanu a oči byly ošetřeny Ophthalmo-Azulenem.

Miniprasátka byla ozařována dávkami od 0.6 do 2.6 Gy a na základě toho byla rozdělena do dvou kategorií, jak je uvedeno v tabulce 2.4.

Kód miniprasat	kategorie	dávka Gy	pohlaví	kód miniprasat	kategorie	dávka Gy	pohlaví
147	H2	0.8	F	6	H4	2.4	F
148	H2	0.8	M	7	H4	2.4	F
149	H2	0.8	M	139	H4	2	M
150	H2	0.8	M	140	H4	2	M
166	H2	0.6	M	141	H4	2	F
168	H2	1	F	173	H4	2.6	F
169	H2	1	F	200	H4	2.4	F
170	H2	1	M	201	H4	1.6	M
171	H2	1.2	M	204	H4	2	M
172	H2	1.2	M	205	H4	2.4	M
197	H2	0.6	M				
198	H2	1.2	F				

Tab. 2.4 Základní údaje o miniprasatech zahrnující pohlaví, obdrženou dávku, identifikační kód a zařazení do kategorie. (F = samice, M = samec, H2 = první skupiny miniprasat, H4 = druhá skupina miniprasat)

2.8.1 Získání plasmy z plné krve a úprava vzorků prasečí plasmy

Příprava prasečí plasmy před proteomickou analýzou zahrnovala stejné kroky, jako u vzorků lidské plasmy, včetně použití stejných speciálních zkumavek. V současné době neexistují na trhu podobné speciální odběrové zkumavky určené pro zvířata nebo konkrétně pro miniprasata.

2.8.2 Odstranění vysoce zastoupených proteinů v prasečí plasmě

Při výběru optimální depleční techniky u prasečí plasmy byly vysoce zastoupené proteiny depletovány pomocí imunoafinitní chromatografie stejnou kolonou (4,6 mm ID x 100 mm) MARS Hu-14 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) a HPLC systém Alliance 2695 (Waters, Milford, USA) s UV detekcí, centrifugačními kolonkami Agilent 5188-6560 MARS Hu-14 0.45ml, jednorázovými kolonkami High Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Mini Spin Columns (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, USA) a ethanolem podle stejných postupů jako u lidských vzorků.

Stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích bylo provedeno u všech vzorků stejnou metodou chelatace měďnatého iontu kyselinou bicinchoninovou (BCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a následně byla vizualizace provedena pomocí jednorozměrné gelové elektroforézy s nedepletovanou plasmou podle stejného postupu jako je uvedeno v kapitole 2.7.5.

2.8.3 Enzymatické štěpení a přečištění

Vzorky prasečí plasmy byly naředěny 10 mM solným roztokem fosfátem pufovaným PBS, který byl připraven v laboratorních podmínkách z hydrogenfosforečnanu sodného, chloridu sodného a draselného (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) do požadovaného objemu 200 μ l. Po přidání 30 μ l 10% dodecylsulfátu sodného byly vzorky inkubovány při 100 °C po dobu 3 minut a následně ochlazeny a centrifugovány. Pomocí 1 M TEAB bylo upraveno pH > 8. Vzorky byly inkubovány při 60 °C po dobu 60 min s TCEP, čímž bylo docíleno redukce disulfidických vazeb mezi cysteiny. Po ochlazení vzorků na pokojovou teplotu bylo alkylace docíleno přidáním 15 μ l 375 mM iodoacetamidu a inkubací při 25 °C na tmném místě po dobu 30 minut. Proteiny byly vysráženy přidáním acetonu vytemperovaného na -20 °C a uchováním vzorků při této teplotě po dobu 4 hodin. Po precipitaci acetonem byly vzorky centrifugovány při 8 000 xg po dobu 10 min při 4 °C. Po odstranění acetonu byla peleta resuspendována 10 μ l 10% deoxycholátu sodného, 70 μ l deionizované vody a 10 μ l 1 M TEAB. Po rozpuštění pelety a zkontrolování pH bylo přidáno 10 μ l trypsinu (0,1 μ g/ μ l), stočeno na centrifuze a ponecháno při 37 °C přes noc.

Po inkubaci byly vzorky stočeny na centrifuze a ochlazeny na ledu. Digesce štěpící proteázou byla zastavena úpravou pH a to přidáním 10 μ l 10% kyseliny trifluoroctové, která zapříčinila precipitaci proteinů. Precipitát byl stočen na dno zkumavky při 4 000 xg a 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl převeden do nové zkumavky a zbývající sraženina byla promyta pomocí 100 μ l 1% kyseliny trifluoroctové a opět stočena za stejných podmínek. Po převedení supernatantu k původnímu bylo odstranění deoxycholátu sodného docíleno přidáním 750 μ l

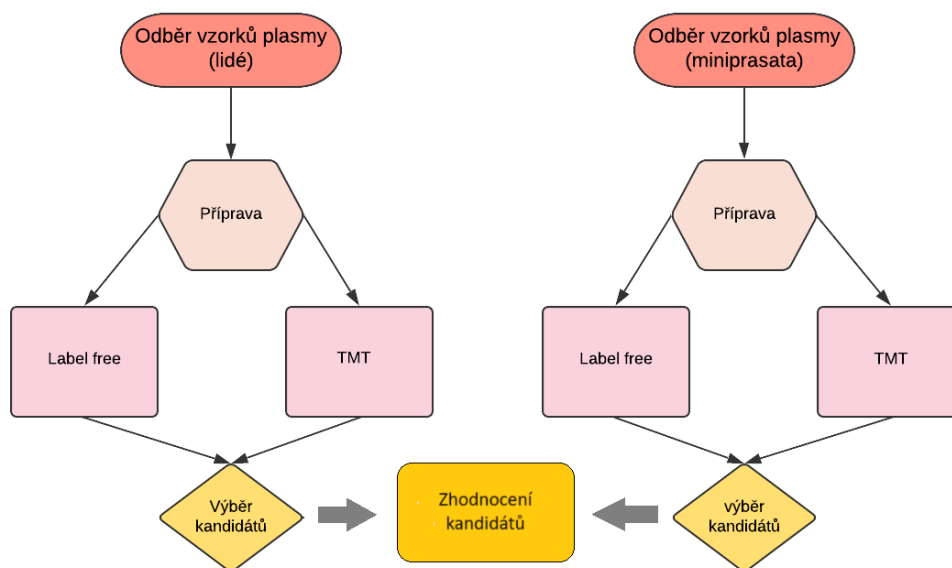
etylacetátu, zvortexováním, centrifugací při 1 000 rpm po dobu 1 min a odstraněním horní vrstvy. Především krok s etylacetátem byl zopakován ještě 5krát.

Tato peptidická směs v případě label free následné kvantifikace byla rozpuštěna v 300 µl 2% acetonitrilu, 0,1% kyseliny trifluoroctové a přečištěna pomocí extrakce na pevné fázi na kolonce Empore s reverzní fází C18 (3M Company, Saint Paul, USA). Pro efektivní rozpouštění byly vzorky vortexovány a vloženy do ultrazvukového sonikátoru Brand VGT1730QT (eMAG, Bukurešť, Rumunsko). Kolonky byly promyty 100% acetonitrilem na vakuovém manifoldu a ekvilibrovány nanesením 300 µl 50% acetonitrilu 0,1% kyseliny trifluoroctové. Poté bylo na kolonky nanášeno 300 µl 2% acetonitrilu, 0,1% kyseliny trifluoroctové. Po zaktivování kolonek byl 2krát po sobě nanášen vzorek. Odstranění interferujících složek a nečistot bylo provedeno pomocí 300 µl 2% acetonitrilu, 0,1% kyseliny trifluoroctové.

Eluce byla provedena pomocí 150 µl 50% acetonitrilu, 0,1% kyseliny trifluoroctové s využitím stříkačky pro lepší regulaci rychlosti eluce. Tento krok byl proveden ještě jednou a následně byly vzorky odpařeny na vakuové odparce Concentrator plus 5350 (Eppendorf, Hamburg, Německo) a umístěny do mrazáku o teplotě - 80 °C.

2.9 Relativní kvantifikace

Celý kvantifikační postup zahrnoval několik kroků a je znázorněn na obrázku 2.4. Pro prvotní zjištění kvantitativních rozdílů mezi vzorky ozářených pacientů a kontrolní skupinou a také prasečích vzorků před a po ozáření byla použita tzv. label free kvantifikace (LFQ) vzorků jednotlivých sledovaných skupin založená na srovnávací analýze proteinového, resp. peptidového materiálu bez nutnosti značení s využitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením např. Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Při provádění metody LFQ u lidských plasem byly provedeny dvě analýzy LFQ1 a LFQ2 po 8 vzorcích. Rozdělení na dvě skupiny bylo zavedeno s ohledem na TMT metodu, která obsahovala 16 značek. Při provedení LFQ metody u prasečí plasmy byly všechny vzorky měřeny v jedné analýze.



Obr. 2.4 Kvantifikační postup práce se vzorky (Rydlová, 2023)

Kvantifikace pomocí značících metod

Ke kvantifikaci vzorků od leukemických pacientů a prasečích vzorků byla využita metoda inkorporace TMT značek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). V naší studii byla použita sada pro značení až 16 vzorků, přičemž každý z 8 vzorků byl rozdělen na dvě poloviny (0 G a 24 h). Jednotlivé dávky záření byly u všech pacientů stejné (2 x 2 Gy). Vzorky byly rozděleny do dvou skupin (TMT1 a TMT2) podle pohlaví a randomizovány. První skupina (TMT1) obsahovala pouze mužské dárce, zatímco druhá skupina (TMT2) měla pacienty obou pohlaví (tab 2.5.).

Značka	TMT1	TMT2	Značka	TMT1	TMT2
126C	2B 0G	7B 0G	130C	11B 0G	21B 0G
127N	2B 24H	7B 24H	131N	11B 24H	21B 24H
127C	6B 0G	9B 0G	131C	19B 0G	24B 0G
128N	6B 24H	9B 24H	132N	19B 24H	24B 24H
128C	8B 0G	13B 0G	132C	23B 0G	25B 0G
129N	8B 24H	13B 24H	133N	23B 24H	25B 24H
129C	10B 0G	18B 0G	133C	27B 0G	29B 0G
130N	10B 24H	18B 24H	134N	27B 24H	29B 24H

Tab. 2.5 Označení lidských vzorků TMT značkami

U prasečí plasmy podle počtu vzorků byl použit set s 6 TMT značkami. Prasečí vzorky byly rozděleny do dvou skupin podle dávky ozáření H2=TMT1 a H4=TMT2 (tab 2.6).

Značka	Dávka	TMT1	TMT2
126	0 Gy	147, 148, 149, 150	140, 141, 173
127	0 Gy	166, 168, 169, 170	6, 7, 139
128	0 Gy	171, 172, 197, 198	200, 201, 204, 205
129	1,2-2,2 Gy	147, 148, 149, 150	140, 141, 173
130	1,2-2,2 Gy	166, 168, 169, 170	6, 7, 139
131	1,2-2,2 Gy	171, 172, 197, 198	200, 201, 204, 205

Tab. 2.6 Označení prasečích vzorků TMT značkami

U lidské plasmy byla peleta s 25 µg proteinu rozpuštěna v 100 µl 100 mM TEAB, zvortexována na třepače Vortex V1 plus (Biosan, Riga, Litva) a stočena na odstředivce Mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo). TMT značky byly ekvilibrovány na laboratorní teplotu, aby se zabránilo kondenzaci vody. Rozpuštěny byly v 40 µl acetonitrilu, následně byly zvortexovány na třepače a stočeny na odstředivce. Do každého vzorku bylo přidáno 20 µl TMT značky. Inkubace byla provedena v thermomixeru C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo) po dobu 60 minut, 500 rpm při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 8 µl 5% hydroxylaminu. Inkubace byla provedena v thermomixeru C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo) po dobu 15 min, 500 rpm při pokojové teplotě. V posledním kroku byly vzorky smíchány podle tabulky 2.6. Před proteomickou analýzou byly vzorky odsoleny podle postupu uvedeného v kapitole 2.7.3, rozděleny na alikvóty po 5 µg a 15 µg a vysušeny ve vakuové odparce Concentrator plus 5350 (Eppendorf, Hamburg, Německo). Pro LC-MS/MS analýzu bylo následně rozpuštěno 5 µg v 20 µl solventu A.

Vzorky prasečí plasmy s 50 µg proteinu byly rozpuštěny v 71 µl 100 mM TEAB, zvortexovány na třepače Vortex V1 plus (Biosan, Riga, Litva) a stočeny na odstředivce Mini Spin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo). TMT značky byly ekvilibrovány na laboratorní teplotu, aby se zabránilo kondenzaci vody. Rozpuštění bylo provedeno v 58 µl acetonitrilu, následně byly zvortexovány na třepače

a stočeny na odstředivce. Ke každému vzorku bylo přidáno 29 μl jednotlivé TMT značky podle tabulky 2.5. Vzorky se značkami byly inkubovány v thermomixeru C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo) 60 minut při pokojové teplotě a 500 rpm. Následně bylo přidáno 8 μl 5% hydroxylaminu. Inkubace byla provedena při pokojové teplotě v thermomixeru C 5355 comfort (Eppendorf, Hamburg, Německo), 500 rpm po dobu 15 minut. Před proteomickou analýzou byly vzorky odsoleny podle postupu uvedeného v kapitole 2.7.3, rozděleny na alikvóty po 5 μg a 15 μg a vysušeny ve vakuové odparce Concentrator plus 5350 (Eppendorf, Hamburg, Německo). Pro LC-MS/MS analýzu bylo následně rozpuštěno 5 μg v 20 μl solventu A.

2.10 LC-MS/MS analýza

Optimalizace přípravy vzorku probíhala na přístroji nanoLC UltiMate 3000 s UV detekcí na 214 nm (Dionex, CA, USA), který obsahuje předkolonu 300 μm ID \times 5 mm, PepMap100 naplněnou C18 stacionární fází (5 μm , 100 Å; Dionex CA, USA) a k ní připojenou analytickou kolonu NanoEase 100 μm \times 150 mm, Atlantis naplněnou C18stacionární fází (3 μm , 100 Å; Waters, Milford, MA, USA). Separace odsolené a naštěpené směsi peptidů byla provedena na přístroji UltiMate 3000 RSLCnano HPLC (Dionex, CA, USA) pomocí kapilární kolony Acclaim PepMap100 (75 μm \times 20 mm) naplněné částicemi C18 o velikosti 3 μm a separační kolonou Acclaim PepMap RSLC (75 μm \times 150 mm) naplněnou částicemi C18 o velikosti 2 μm . Separace byla provedena s gradientovou elucí (3-44% acetonitrilu s přidavkem 0,1% kyseliny trifluoroctové), která je zakončena nanoelektrosprejovou ionizací s přímým vstupem do MS. Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). MS měření bez použití značek bylo nastaveno v rozsahu 350-1650 m/z při 70000 FWHM (full width at half maximum) s maximální dobou plnění 100 ms a limitem max $1e^6$. MS/MS analýza byla provedena v m/z rozsahu odpovídající molekulové hmotnosti prekurzoru. V případě analýzy TMT značení bylo nastavení upraveno na úplné MS skenování (400-1650 m/z) při 70 000 FWHM s maximální dobou plnění 100 ms a limitem $3e^3$. Byly vybírány prekurzory s nábojem 2+ a vyšším. V případě LFQ analýzy se střídal jeden MS sken s následujícími až 12 MS/MS skeny vybraných prekurzorů u TMT jich bylo 10. Samotná kvantifikace

signálu probíhala na MS úrovni s identifikací komponent z MS/MS spekter. Pro zjištění kvantitativních rozdílů mezi vzorky ozářených pacientů, kontrolní skupinou a prasečí plasmy byla použita nejprve TMT analýza, při které byly ke směsným vzorkům přidány izobarické značky. Ty se navázaly na N konec peptidu a postranní část lysinu. Při MS/MS módu byly značky odděleny a podle intenzity reportérových iontů byly stanoveny relativní poměry jednotlivých analytů ve vzorcích.

2.11 Zpracování získaných dat

Instrumentální sběr dat z hmotnostního spektrometru byl proveden za pomoci softwaru Xcalibur (v4.2.47) a Tune control (v2.11.0.3006). Pro bioinformatické vyhodnocení experimentálně získaných dat byly použity komerčně dodávané nebo volně přístupné softwary. Pro identifikace proteinů byl použit vyhledávací program Mascot server (2.4, Matrix Science) nebo program Sequest HT, které zpracovávají původní data z MS a jsou integrovány s programem Proteome Discoverer (2.4.1.15, Thermo Fisher Scientific, USA), pomocí kterého bylo možné identifikovat a kvantifikovat proteiny přítomné ve vzorcích (relativní množství proteinů). Hlavní účel jejich součinnosti tkví v prohledávání databází a lepší analýze. Program Proteome Discoverer s programem Sequest HT obsahuje různé možnosti vyhodnocení získaných experimentálních dat a byl použit jak pro samotnou identifikaci proteinů, tak i pro kvantitativní vyhodnocení typu LFQ nebo TMT značení. Pro identifikaci byla použita aktuální UniProtKB/Swiss-Prot databáze. Zpracování dat probíhalo na základě nastavení selektoru spektra, top N píků a detektoru prekurzorů. Kritéria zadaná v programu SequestHT obsahovala databázi proteinů UniProt human UP000005640_(1.5.2023), enzym trypsin, maximální počet chybějících štěpných míst 1, minimální délka peptidu 7, maximální délka peptidu 144, minimální počet sekvencí peptidu 1, tolerance hmotnosti prekurzoru 10 ppm, tolerance hmotnosti fragmentu 0.02 Da, hmotnost b- a y-iontů, statické modifikace - Carbamidomethyl / +57,021 (C); dynamické modifikace - Oxidace / +15,995 Da (M); dynamické modifikace (proteinový terminus) - Acetyl / +42,011 Da (N-konec), Met-ztráta / -131,040 Da (M), Met-ztráta+Acetyl / -89,030 Da (M). Statistická analýza dat byla prováděna pomocí programu R-software. Gene

ontology analýza byla pak prováděna ve volně dostupných bioinformatických nástrojích a databázích (Metascape, Reactome, STRING).

3 Výsledky a diskuze

Cílem této experimentální práce bylo nalézt, identifikovat a vybrat vhodné proteiny v lidské plasmě jako kandidátní biomarkery poškození po expozici IZ pomocí LC-MS/MS. Panel biomarkerů z lidské plasmy byl rozšířen o proteiny z prasečí plasmy.

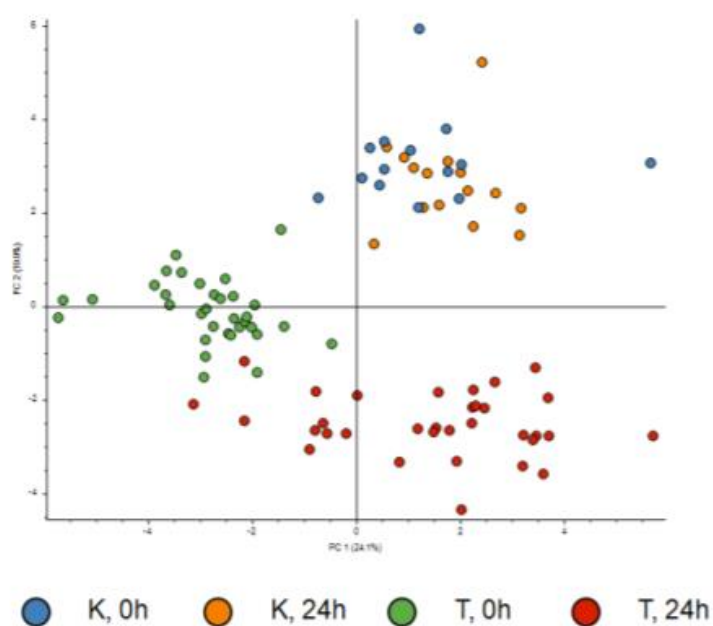
Tato kapitola je rozdělena do jednotlivých částí podle zpracovaných témat a z důvodu komplexnosti práce jsou dílčí výsledky uváděny vždy s diskusí, což by mělo zajistit lepší přehlednost. První podkapitola je věnována výběru biologických subjektů a materiálu. Druhá podkapitola je zaměřená na zhodnocení různých postupů odstraňování vysoce abundantních proteinů z plasmy. Ve třetí podkapitole jsou zhodnoceny vybrané kandidátní proteiny z lidské plasmy a jejich verifikace na zvířecím modelu, poslední podkapitola se zaměřuje na porovnání top kandidátů z obou analyzovaných biologických materiálů.

3.1 Výběr vzorků

Při ozáření skupiny lidí je nejdůležitější roztrždit tyto jedince podle získané dávky a zahájit adekvátní léčbu. K tomuto účelu by měly využítí proteinové biomarkery ozáření, které jsou citlivé k IZ a jejich hladina se mění za krátký časový interval po ozáření. Při zjišťování nových biomarkerů ozáření v lidské plasmě by v ideálním případě měla být studie provedena na zdravých osobách, které by se nechaly dobrovolně ozářit různými dávkami IZ. Tato možnost je samozřejmě z etických důvodů nereálná, a proto byla v této studii použita krev od ozářených leukemických pacientů. Tyto osoby byly ozářeny v rámci své terapie a dobrovolně nám po informovaném souhlasu poskytly krev pro naše účely ozářenou *in vivo*. Většina experimentálních studií zaměřených na identifikaci biomarkerů ozáření byla prováděna na zvířecích modelech, proto je tato studie velmi unikátní. Zisk vzorků má i své limity, které zahrnují počet odebraných vzorků od leukemických pacientů a stanovenou dávku ozáření. Množství vzorků pro tento projekt bylo vázáno na počet pacientů, kteří v letech 2015–2019 podstupovali chemoterapii a dávky byly stanoveny lékařem po určení závažnosti diagnózy. Jednotlivé vzorky pro následující analýzy byly rozděleny do 4 skupin: K0h – zdraví dárce u nichž byla odebrána krev v čase 0h, K24h – zdraví dárce u nichž byla krev odebrána po 24h

od prvního odebrání, TBI0G- krev odebraná od leukemických pacientů před ozáření, TBI24h – krev odebraná od leukemických pacientů 24h po ozáření.

Rozložení jednotlivých skupin všech vzorků bylo zpracováno pomocí analýzy hlavních komponent (graf 3.1). Z bodového grafu bylo vypořazováno, že komponenty kontrolních vzorků (K0h a K24h) mají shlukovité rozložení a utvářejí klastry. Zatímco vzorky od celotělově ozářených pacientů (TBI0G a TBI24h) byly rozmístěny ve větším rozptylu. Disponovaly tak větší variabilitou čímž se prokázala diferencovanost jednotlivých skupin vzorků před a po ozáření.



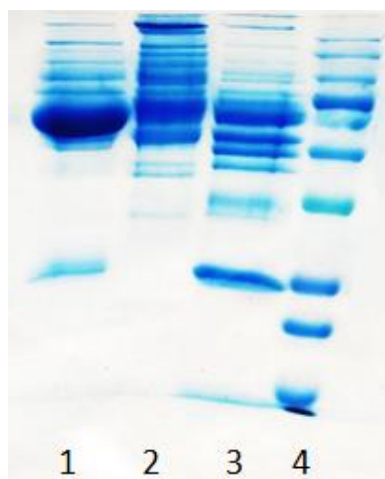
Graf 3.1 Bodový graf rozložení všech vzorků od celotělově ozářených pacientů (T 0h, T 24h) a kontrolních skupin (K 0h, K 24h)

Pro doplnění výsledků z lidské plasmy byla do studie dále zahrnuta prasečí plasma z 22 miniprasat, která představovala jednoduchý a dostupný experimentální savčí model s vhodnou genetickou korelací.

3.2 Optimalizace postupu odstranění abundantních proteinů

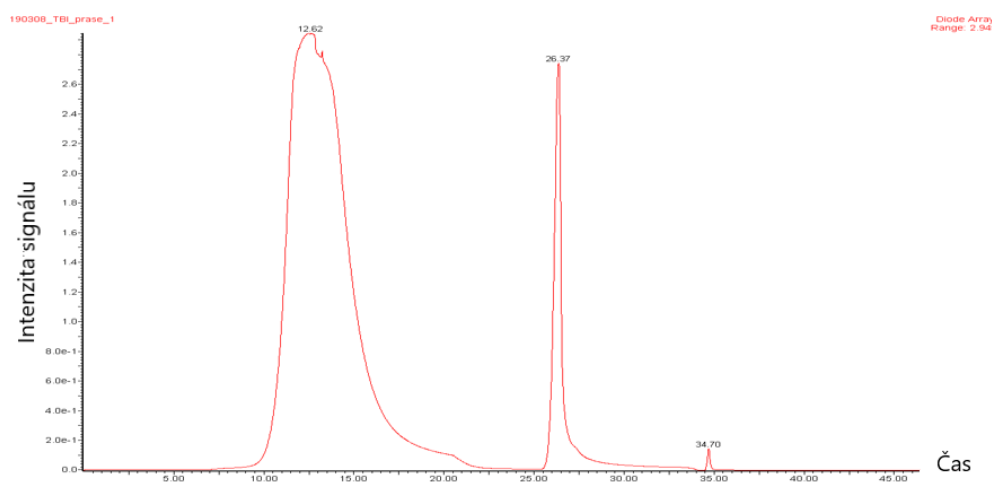
Pro výběr nevhodnější metody odstranění vysoce abundantních proteinů bylo vyzkoušeno celkem pět deplečních postupů: imunodeplece pomocí imunodepleční HPLC kolony MARS Hu-14 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), centrifugační kolony Agilent MARS Hu-14 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), hexapeptidové knihovny ProteoMiner Protein Enrichment Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), jednorázové centrifugační kolony High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a deplece pomocí ethanolu. Jednotlivé postupy byly aplikovány na lidskou a prasečí plasmu a srovnány. Pro zhodnocení efektivity jednotlivých deplečních postupů byla u nich změřena celková bílkovina a provedena jednorozměrná sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS-PAGE).

První testovanou variantou byla **imunodepleční HPLC kolona MARS Hu-14** (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), která obsahuje polyklonální protilátky pro současné specifické odstranění 14 nejzastoupenějších proteinů plasmu. Odstranění vysoce zastoupených proteinů plasmu bylo provedeno pomocí HPLC systému Alliance 2695, který oproti dále zmiňovaným metodám zpracovává vzorky automaticky. Tím je zachován stejný postup se všemi vzorky, čímž je docílena poměrně dobrá reprodukovatelnost. Deplece jednoho vzorku trvala necelou hodinu a eluát s nízkou zastoupenými zájmovými proteiny byl zachytáván pomocí sběrače frakcí (Waters, Milford, MA, USA). Na zhotoveném 1D SDS PAGE gelu je patrné, že u lidské plasmu došlo k odstranění vysoce zastoupených proteinů, zejména v oblasti kolem 67 kDa, kde se právě nachází nejzastoupenější lidský plasmatický protein albumin. To mělo za následek zviditelnění většího počtu ostatních proteinů přítomných v plasmě, jenž u nedepletované plasmu nebyly vizuálně patrné (obr. 3.1). Pro lidské vzorky byla tato metoda velmi vhodná, což jsme předpokládali.



Obr. 3.1 1D SDS elektroforetický gel se vzorkem lidské plasmy (1), depletované lidské plasmy pomocí kolony MARS Hu-14 HPLC (2) depletované lidské plasmy technikou hexapeptidové knihovny (3) a proteinovým standardem (4)

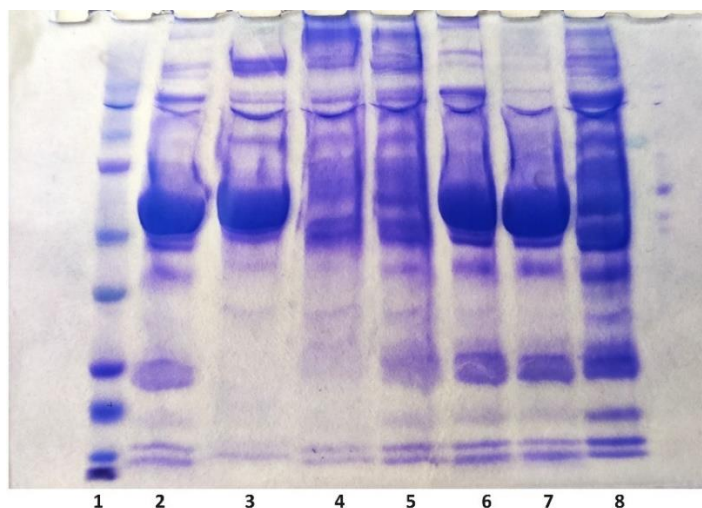
Stejná kolona byla použita i při depleci prasečích plasmatických vzorků. Podle chromatogramu nedocházelo k zachytávání vysoce zastoupených proteinů (obr. 3.2). V retenčním čase mezi 10.-20. minutou by mělo docházet k navázání vysoce zastoupených proteinů na imobilizované protilátky v kolonce a samovolnému odtoku níže zastoupených. Úspěšné navázání vysoce zastoupených proteinů na tyto protilátky by se na chromatogramu projevilo menší velikostí píků a plochou pod píkem v daném retenčním čase. Neúčinnost kolony, která je vyrobená pro depleci lidských vzorků, vedla k nedostatečné depleci vzorků prasečí plasmy. Na základě negativních výsledků z chromatogramu nebyla provedena vizualizace pomocí SDS-PAGE.



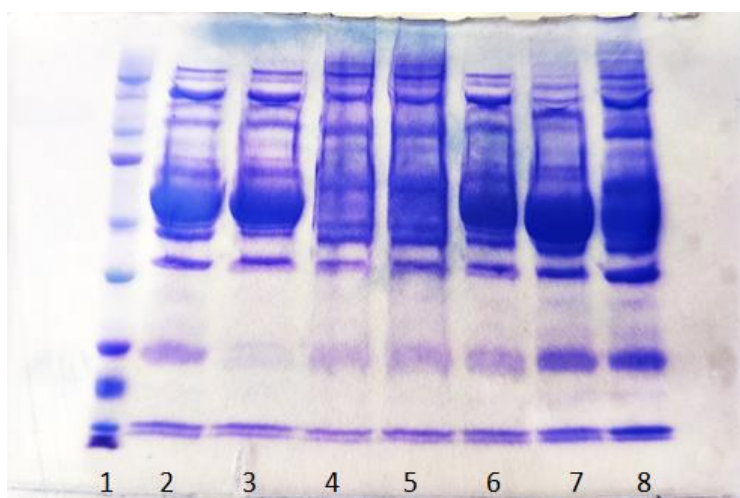
Obr. 3.2 Chromatografický záznam imunoafinitní separace prasečí plasmy pomocí imunodepleční HPLC kolony MARS Hu-14, při které došlo k nedostatečnému navázání vysoce zastoupených proteinů.

Současně s předešlou metodou byla vyzkoušena u obou typů plasmy **centrifugační kolonka Agilent MARS Hu-14** (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). U této kolonky byly vzorky nanášeny manuálně a pomocí odstředivých sil bylo dosaženo jejich protékání přes kolonu. Tuto kolonku se stejnými protilátkami, jaká byla použita v předešlé depleci jsme zvolili kvůli menší nanášce, při které nedochází ke spotřebování velkého množství vzorku.

Pro lepší usměrnění toku byly vzorky nanášeny pomocí injekční stříkačky. Při vizualizaci této depleční metody na lidských (obr. 3.3) a prasečích (obr. 3.4) vzorcích pomocí SDS-PAGE bylo zjištěno, že nedošlo k odstranění vysoce zastoupených proteinů u obou biologických vzorků. I když tato kolona obsahuje stejné imobilizované protilátky jako předešlá, byla zvolena z důvodu zjištění jednotlivých rozdílů při manipulaci s nimi. Vzhledem k neúčinnosti kolony u obou biologických materiálech a výsledků z **imunodepleční HPLC kolona MARS Hu-14** nebyla deplece provedena opakovaně. Nedostatečná deplece u obou plasem mohla být způsobena nefunkční kolonou.



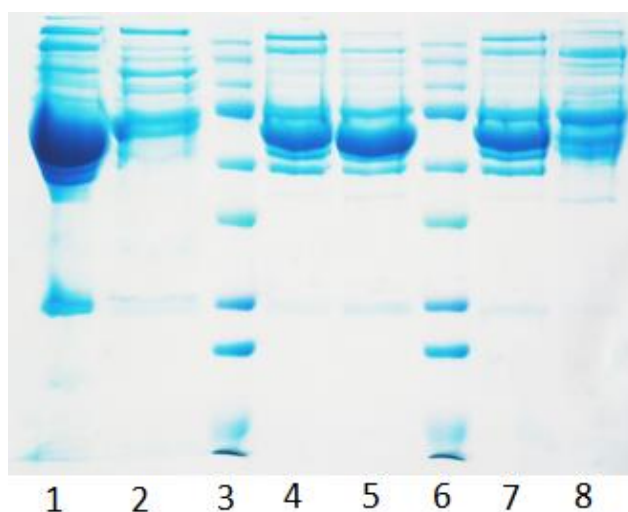
Obr. 3.3 1D SDS elektroforetický gel se vzorkem proteinového standardu (1), **lidské plasmy** (2), depletované lidské plasmy centrifugační kolonou (3), lidské plasmy depletované pomocí ethanolu (4), lidské plasmy depletované pomocí ethanolu – druhé resuspendování pelety (5), lipidové vrstvy (6), supernatantu 1 (7), supernatantu 2 (8)



Obr. 3.4 1D SDS elektroforetický gel se vzorkem proteinového standardu (1), **prasečí plasmy** (2), depletované prasečí plasmy s centrifugační kolonou (3), prasečí plasmy depletované pomocí ethanolu (4), prasečí plasmy depletované pomocí ethanolu – druhé resuspendování pelety (5), lipidové vrstvy (6), supernatantu 1 (7), supernatantu 2 (8)

Další použitou testovací variantou pro snížení komplexity plasmy byla použita **hexapeptidová knihovna ProteoMiner Protein Enrichment Kit** (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Tato metoda byla použita pouze na lidskou plasmu s cílem zjistit, zda tento postup bude vykazovat lepší výsledky oproti klasické imunoafinitní depleci. Na gelu je viditelná vyšší detekovatelnost ostatních proteinů přítomných v plasmě, jejichž detekce by v přítomnosti vysoce zastoupených proteinů byla značně omezená. Oproti koloně MARS Hu-14 došlo samozřejmě vzhledem k principu knihovny k odstranění jiných proteinů (obr. 3.1).

Dále byly použity **jednorázové centrifugační kolonky High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin** (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Výhoda těchto kolon byla v použití jedné kolonky na jeden vzorek, čímž se zamezilo nedostatečnému vymytí kolony po předchozích vzorcích a tzv. carryoveru v případě použití většího množství vzorků. Dalším pozitivem byla dostupnost 24 deplečních kolonek v jednom kitu, což v porovnání s hexapeptidovou knihovnou bylo více jak dvojnásobek. Z vizualizace depletované lidské plasmy na polyakrylamidovém gelu (obr. 3.5) lze konstatovat, že došlo k úspěšnému odstranění vysoce zastoupených proteinů.



Obr. 3.5 1D SDS elektroforetický gel se vzorkem lidské plasmy (1), depletované lidské plasmy jednorázovou kolonou (2), prasečí plasmy (4, 7), prasečí plasmy depletované jednorázovou kolonou (5), prasečí plasmy depletované centrifugační kolonou (8) a proteinovým standardem (3,6)

Vzhledem ke snadné manipulaci se vzorky, kolonkami a pozitivnímu výsledku byla metoda použita i na prasečí plasmu. Po vizualizaci vzorek prasečí plasmy a depletované prasečí plasmy jednorázovou kolonkou nevykazoval žádný rozdíl. Z toho lze usoudit, že opět nedošlo k navázání proteinů na depleční kolonku.

Vzhledem k neúčinnosti deplečních kolon na prasečí plasmu byla dále vyzkoušena deplece albuminu pomocí **ethanolu**. K odstranění albuminu došlo u lidské i prasečí plasmy. Pro zjištění efektivity a zhodnocení správného postupu této metody byly na gel naneseny supernatanty, rozpuštěné pelety po odsátí prvního a druhého supernatantu a získaná lipidová vrstva. Z gelu bylo patrné, že většina albuminu byla obsažena v prvním supernatantu a z části i v druhém, zatímco v resuspendované peletě byl albumin výrazně snížen (obr. 3.3 a 3.4).

Zhodnocení deplece prasečích vzorků

Všechny uvedené depleční kolony jsou vyráběny pro účely odstranění abundantních proteinů ze vzorků lidské plasmy. Neadekvátní navázání proteinů na imobilizované protilátky v koloně vedla k nedostatečné depleci ekvivalentních proteinů plasmy miniprasat. Z tohoto důvodu byla na prasečí plasmatické vzorky použita deplece albuminu srážením ethanolem. Tato metoda není limitována počtem vzorků a není finančně nákladná. Při zhodnocení účinnosti metody pomocí gelu bylo patrné, že vysoce zastoupený albumin byl významně odstraněn a méně zastoupené proteiny byly zviditelněny. Dalším krokem bylo orientační ověření obsahu proteinů v depletovaných vzorcích. Obsah bílkovin byl měřen celkem dvakrát a byl proveden u směsných vzorků ozářené skupiny. Obsah bílkovin ve vzorku prasečí plasmy byl naměřen s hodnotou $79 \pm 4,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ u centrifugační kolonky byl $71 \pm 1,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, u jednorázové kolony byl $0,5 \pm 0,006 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. U deplece za použití ethanolu bylo stanovení obsahu bílkoviny změřeno ve všech vzorcích u obou skupin. U skupiny před ozářením byl obsah bílkovin naměřen s hodnotou $0,4 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a u celotělově ozářené skupiny byl obsah bílkovin $0,5 \pm 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pro ověření množství proteinů po depleci v lidské plasmě byly získané hodnoty po změření metodou BCA přepočítány na celkový výtěžek z plasmatického vzorku (tab. 3.1). Obsah bílkovin v plasmě potvrdil neúčinnost centrifugační kolony, tak jak bylo vyobrazeno na gelu. U jednorázové kolonky došlo k odstranění velké části bílkovin, ale při orientačním zobrazení na gelu bylo vidět, že albumin nebyl

odstraněn. Dle výsledků použitých metod a z finančního hlediska bylo pro úpravu koncentračního rozpětí plasmy zvolena deplece pomocí ethanolu.

Typ deplece	Stanovení bílkoviny v prasečí plasmě [ug/ul]	Procentuální vyjádření bílkoviny v prasečí plasmě
Nedepletovaná plasma	79	100 %
Centrifugační kolonka MARS Hu 14	71	90 %
Jednorázové centrifugační kolonky High-Select™	0,5	0,6 %
Ethanol neozářená skupina	0,4	0,5 %
Ethanol ozářená skupiny	0,5	0,7 %

Tab. 3.1 Celkové stanovení bílkoviny v prasečí plasmě s využitím různých deplečních postupů

Zhodnocení deplece lidských vzorků

Při použití všech zmiňovaných metod ve vzorcích lidské plasmy kromě centrifugační kolonky Agilent MARS Hu-14 bylo docíleno k odstranění většiny abundantních proteinů. Neúspěšná deplece u zmiňované kolonky mohla nastat z důvodu naplnění kapacity kolony, či poškození depleční kolony.

Při depleci je nejdůležitější, aby došlo k efektivnímu odstranění albuminu a imunoglobulinů, které jsou ve vzorcích ve velkém množství a zastírají minoritní proteiny. Jednorázová centrifugační kolonka High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin byla v odstranění albuminu dle výsledků na polyakrylamidovém gelu nejefektivnější. U použití hexapeptidové knihovny došlo sice k nárůstu detekovatelnosti minoritních proteinů, ale oproti jednorázové kolonce nebyl albumin odstraněn dostatečně. Je to z toho důvodu, že knihovna obsahuje omezený počet vazebných míst v podobě hexapeptidů, a proto vysoce zastoupené proteiny rychle zaplní volná místa a přebytečné bílkoviny jsou odmyty (Paulus and Wehr, 2007). Dochází tak k vyrovnání poměrových rozdílů mezi minoritními a majoritními proteiny ve vzorku. Tím dochází k potlačení kvantitativních rozdílů mezi proteiny

ve vzorcích a další kvantitativní analýza je obtížná. Deplece pomocí ethanolu dosáhla k úspěšnému odstranění nežádoucího albuminu, ale celý proces je velmi náročný a oproti jednorázovým kolonkám při použití většího počtu vzorků by mohlo snadno dojít k nežádoucí chybě, která by měla negativní dopad na reprodukovatelnost.

Dalším krokem bylo orientační ověření obsahu proteinů v depletovaných vzorcích. Obsah bílkovin byl měřen celkem dvakrát a byl proveden u směsných nedepletovaných vzorků, u depletovaných vzorků pomocí imunodepleční HPLC kolony MARS Hu-14 a hexapeptidové knihovny. V případě deplece pomocí ethanolu a centrifugační kolony Agilent MARS Hu-14 bylo stanovení obsahu bílkovin měřeno dvakrát a bylo provedeno na vzorku od leukemického pacienta před ozářením. Stanovení obsahu bílkovin u depletovaných vzorků pomocí jednorázových centrifugačních kolonek High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin bylo provedeno u každého vzorku zvlášť.

Obsah bílkovin u nedepletovaných vzorků byl u skupiny K0h $65 \pm 5,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, K24h $65 \pm 6,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI0G $61 \pm 4,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI24 h $66 \pm 3,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. U kolony MARS Hu-14 HPLC byl obsah bílkoviny u skupiny K0h $0,5 \pm 0,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, K24h $0,6 \pm 0,06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI 0G $0,5 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI24 h $0,8 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. U centrifugační kolony $0,2 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, metodou hexapeptidové knihovny byl obsah bílkovin naměřen u skupiny K0h $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, K24h $0,6 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI 0G $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI24 h $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, u jednorázové kolony byl obsah bílkovin u skupiny TBI 0G $0,2 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, TBI24h $0,2 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ a u ethanolu byl změřen s hodnotou $0,3 \pm 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pro ověření množství proteinů po depleci v lidské plasmě byly získané hodnoty po změření metodou BCA přepočítány na celkový výtěžek z plasmatického vzorku (tab. 3.2). Pro úpravu koncentračního rozpětí lidské plasmy vzhledem k výsledkům z SDS-PAGE, financím a k velkému množství vzorků byla zvolena imunoafinitní deplece pomocí jednorázových centrifugačních kolonek High-Select™ Top14 Abundant Protein Depletion Resin.

Typ deplece	Typ vzorku	Stanovení bílkoviny v lidské plasmě [ug/ul]	Procentuální vyjádření bílkoviny v lidské plasmě
nedepletovaná plasma	K0h	65	100 %
	K24 h	65	100 %
	TBI0G	61	100 %
	TBI24h	66	100 %
HPLC MARS Hu 14 kolona	K0h	0,5	0,75 %
	K24h	0,6	0,92 %
	TBI0G	0,6	0,98 %
	TBI24h	0,8	1,21 %
centrifugační kolonka MARS Hu 14	7B 0G	0,2	0,33 %
hexapeptidová knihovna	K0h	0,5	0,8 %
	K24h	0,6	0,9 %
	TBI0G	0,5	0,8 %
	TBI24h	0,6	0,9 %
jednorázové centrifugační kolonky High-Select™	TBI0G	0,2	0,3 %
	TBI24h	0,2	0,3 %
ethanol	7B 0G	0,3	0,5 %

Tab. 3.2 Celkové stanovení bílkoviny v lidské plasmě s využitím různých deplečních postupů

3.3 Výběr biomarkerů ozáření v lidské plasmě

Pro identifikaci irelevantních proteinů, které jsou spojené s onemocněním leukemických pacientů, byly porovnávány vzorky od leukemických pacientů a zdravých dárců v čase 0 h. Pro odstranění proteinů, u kterých se hladina mění v rámci cirkadiánního cyklu byly vzorky porovnávány od zdravých dárců v čase 0 h a 24 h. Hladina hodnot, která byla považována za přirozeně stabilní změnu proteinů,

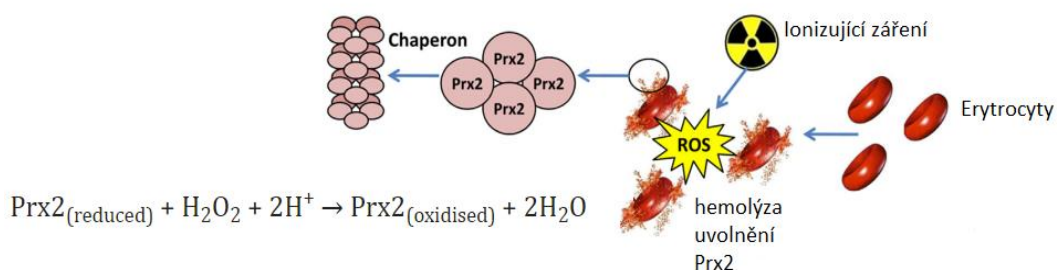
byla stanovena v rozmezí 0.89–1.21 na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$. Za významně statisticky signifikantně změněné proteiny při porovnávání vzorků od leukemických pacientů v čase 0 G a 24 h byly považovány ty se stanovenou změnou menší než 0.89násobnou a větší než 1.21násobnou. Do další selekce bylo zahrnuto odstranění proteinů, které byly v naší studii brány jako kontaminanty. V první řadě se to týkalo keratinu, který byl do vzorků zanesen zřejmě při jejich manipulaci, přípravě na proteomickou analýzu nebo při odběru krve. Pro výběr potenciálních kandidátů byla výše uvedená kritéria zachována při dalších analýzách lidských i prasečích vzorků.

U lidské plasmy byly provedeny celkem 4 analýzy LFQ1, LFQ2, TMT1 a TMT2. Na základě experimentu LFQ1 bylo identifikováno 285 proteinů, z nichž 16 vykazovalo změnu hladiny po ozáření na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ (tab. 3.3). Celkem 12 proteinů bylo koncentračně zvýšených a 4 byly koncentračně snižené. Mezi nejvíce změněné proteiny patřily flavinová reduktáza, filamin A, protein obsahující dezintegrinovou a metaloproteinázovou doménu a tyrozinkináza.

Prvním zmíněným proteinem s nejvyšším koncentračním zvýšením byla **flavinová reduktáza** (BLVRB), která se podílí na odstraňování kyslíku z plasmy. Dochází tak k větší odolnosti tkání vůči oxidačnímu stresu jenž vzniká po expozici IZ (Knaus et al., 2017). Volné flaviny generované flavinovou reduktázou slouží jako potenciální zdroj H_2O_2 , jenž přispívá k navýšení ROS v plasmě (Seaver and Imlay, 2004). Dalším proteinem byl **filamin A** (FLNA), který reaguje na poškození DNA a tumor supresorových genů BRCA1 a BRCA2. Deficit FLNA způsobuje narušení opravy dvouřetězcových zlomů DNA (DSB), což vede k senzibilizaci buněk na IZ (Yue et al., 2012). Nepřítomnost filaminu A ohrožuje HR a NHEJ (Velkova et al., 2010).

Mezi nejvýznamnější proteiny, které byly detekovány prostřednictvím analýzy LFQ1 a jejichž hladina po ozáření v organismu stoupá byly peroxiredoxin 2, kataláza a laktoferin. **Peroxiredoxin 2** (PRDX2) je antioxidantní enzym, který využívá zbytky cysteinu k rozkladu peroxidů vodíku. PRDX2 je třetím nejhojnějším proteinem v erytrocytech a byl identifikován u bakterií, rostlin, kvasinek a savců. Patří do skupiny peroxidáz, které se podílí na enzymatické degradaci organických a anorganických hydroperoxidů (Low et al., 2008; Wood et al., 2003). PRDX2 je

hlavním typem peroxiredoxinů a hraje důležitou roli v prevenci poškození zprostředkovaného ROS v erythrocytech (Ma et al., 2019, p. 2). Vztah mezi IZ a PRDX2 byl popsán ve studii Sharapova a kolektivu, kde byl ozářen zvířecí model subletálními a letálními dávkami a byl detekován radioprotektivní účinek PRDX2. Intravenózním podáváním zmiňovaného proteinu modelovému organismu před expozicí IZ přispělo k výrazně vyšší míře přežití jedinců a také došlo k potlačení rozvoje leukopenie, trombocytopenie a k ochraně buněk kostní dřeně před poškozením genomu DNA. Navíc došlo k potlačení apoptózy, stimulace buněčné proliferace a k rychlejšímu obnovení redoxního stavu buněk (Sharapov et al., 2019). Při působení IZ dochází k tvorbě ROS a k hemolýze erythrocytů ze kterých se uvolňují PRDX2, ty na sebe navazují H₂O₂ čímž dochází k jejich oxidaci a uvolnění H₂O do okolí (obr. 3.6). Další významnou vlastností je chaperonová aktivita, která je indukována oxidací cysteinu peroxidázy působením IZ nebo zvýšením teploty. Tím dochází ke změně prostorového uspořádání „shlukování“ proteinů a k navození stresové odpovědi (Jang et al., 2004).



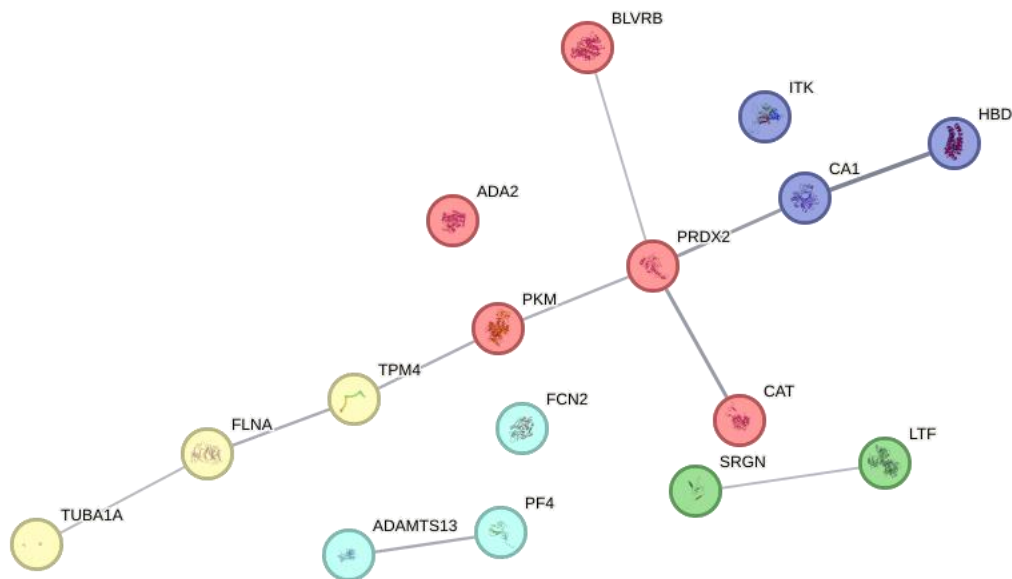
Obr. 3.6 Schéma zobrazující působení peroxiredoxinu 2 (Prx2) (Upraveno podle Sharapov et al., 2019)

Kataláza (CAT) je silný antioxidační enzym, který se nachází téměř ve všech živých organismech, jehož funkcí je přeměna peroxidu vodíku na vodík a vodu (Xiao et al., 2015). Tento protein by mohl být zajímavý ve vztahu k IZ, jelikož zachytává ROS v organismu. I když není v přímém vztahu k IZ publikován, tak ve studii Shen a kolektivu zvýšení hladiny CAT může chránit řadu tkání před poškozením způsobeným oxidačním stresem (Shen et al., 2012). Posledním vhodným biomarkerem je **laktotransferin (LTF)**, který patří mezi antioxidanty a inhibuje účinky Fentonovy reakce a následných hydroxylových radikálů prostřednictvím

chelatace železa (Kopaeva et al., 2022; Shimmura et al., 1996). Laktotransferin se podílí na různých fyziologických procesech, včetně vazby a transportu iontů železa, imunitních a zánětlivých reakcí. Tento protein má mnohočetné ochranné funkce a radioprotektivní vlastnosti (García-Montoya et al., 2012).

Prvním snížením proteinem byla **tyrozinkináza** (ITK) často označována jako **interleukinem indukovaná T buněčná kináza**. Podílí se na imunitní odpovědi a zejména aktivuje pomocné a T buňky (Zhong et al., 2014). U ozářených myší, který podstoupily léčbu v podobě podávání tyrozinkinázových inhibitorů, byl zjištěn pozitivní dopad na radioprotekci slinné žlázy (Wie et al., 2017). Z toho lze usuzovat, že snížení tyrozinkinázy v organismu může vyvolat radioprotektivní účinky. **Protein obsahující dezintegrinovou a metaloproteinázovou doménu** (ADAMTS13) se podílí na opravách tkání a procesech hojení ran. Při těchto procesech dochází k navýšení hladin v neporušených i poškozených tkáních (Hodgkinson et al., 2010). Podílí se na kardiovaskulární remodelaci, regulaci jejich funkcí a také se účastní patologických procesů, jako je např. kardiovaskulární onemocnění, zánět, oxidační stres, metastázování nádorů (Takawale et al., 2015). Bylo zjištěno, že ADAMTS13 může být spojen s přežitím cévních buněk po expozici IZ (McRobb et al., 2017).

U detekovaných proteinů vybraných na základě kritérií byly v dostupné databázi string porovnány vzájemné interakce. Jednotlivé proteiny byly uspořádány do 5 klastrů. Nejzastoupenější skupina je označená červeně obsahuje proteiny, které se podílí na odstranění ROS (obr. 3.7). Ostatní se podílí na imunitní reakci či na struktuře buněk.



Obr. 3.7 Vzájemné interakce proteinů detekované v experimentu LFQ1 a jejich uspořádání do 5 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny související s detoxikací ROS. Žlutá skupina obsahuje proteiny zodpovědné za udržení vnitřní struktury a organizaci buňky. Světle modrá souvisí s komplementovou kaskádou. Tmavě modrá a zelená označuje zbývající proteiny bez interakcí (www.string-db.org).

V druhém experimentu LFQ2 bylo identifikováno 308 proteinů, z nichž 34 vykazovalo změnu hladiny po ozáření na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ (tab. 3.4). Celkem 20 proteinů bylo koncentračně snižovaných a 14 bylo koncentračně zvýšených. Mezi nejvíce změněné proteiny na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ s regulací nahoru byly protein S100-A12, desmokolín 1, nesprin 1, peroxiredoxin 1, C reaktivní protein a s regulací dolů byly flavinová reduktáza, trombospondin 1, hemoglobinová podjednotka D, sérový amyloid, destičkový faktor 4, karbonická anhydráza 2.

Protein S100-A12 spolu s proteiny S100-A8 a S100-A9 je hlavním prozánětlivým a se stresem souvisejícím proteinem spadajícím do početné rodiny S100. Je napojen na signální dráhu p53 související s poškozením DNA vlivem IZ (Van Dieck et al., 2009). Přímo se podílí na aktivaci endoteliálních buněk, mononukleárních fagocytů a lymfocytů (Roth et al., 2003). Zvýšené hladiny S100-A12 byly zaznamenány u lidí s lokálním a systémovým zánětem (Kessel et al., 2013). **Desmokolín-1** (DSC1) je desmosomální transmembránový glykoprotein, který zajišťuje adhezi mezi

buňkami (Chidgey, 2002; Lapcik et al., 2023). V publikaci Ogita a spol. při lokálním ozáření dásní došlo k navýšení hladiny desmokolinu 1 (Ogita et al., 2015). Dalším zvýšeným proteinem byl **nesprin 1** (SYNE1), který hraje zásadní roli v buněčné signalizaci, genové regulaci a udržuje stabilitu buněčných struktur (Sur et al., 2014). SYNE1 je nezbytný pro správné fungování proteinů, které mají úlohu při opravách DNA (Sur-Erdem et al., 2020). **Peroxiredoxin1** (PRDX1) a již zmiňovaný PRDX2 spadá do skupiny peroxidáz, které se vyskytují v šesti různých izoformách. Ačkoli se jejich jednotlivé role v antioxidantní ochraně značně liší, všechny katalyzují redukci organických hydroperoxidů, peroxyinitritu (Neumann et al., 2009) a H₂O₂ jenž způsobuje oxidaci proteinových thiolů, například v proteinových tyrozinfosfatázách (PTPs) (Lee et al., 1998). Vedle katalázy a glutathionperoxidázy, PRDX1 a 2 jsou třetími nejhojnějšími antioxidantními proteiny v erytrocytech a jejich deficit vede k hemolytické anémii (Ho et al., 1997). Přítomnost peroxiredoxinů v organismu signalizuje výskyt peroxidů (Diet et al., 2007). Jiným významným proteinem identifikovaným v plasmě byl **C reaktivní protein (CRP)**, který je primárně syntetizován v jaterních hepatocytech a následně uvolňován do plasmy. Doba rozpadu tohoto proteinu je 19 hodin a hlavním induktorem jeho syntézy je interleukin 6 (IL-6) (Dupuy et al., 2003). Mezi další induktory patří prozánětlivé cytokiny, jako je interleukin 1 (IL-1), tumor nekrotizující faktor (TNF- α) (Peisajovich et al., 2008). CRP hraje spolu s prozánětlivými cytokiny důležitou roli ve vrozené imunitě, vazbě imunoglobulinových receptorů, opsonizaci, aktivaci komplementu a zánětu (Loganathan et al., 2020). Jeho funkce je především v řadě patogenních procesů, jako je ateroskleróza, která je způsobena IZ (Ryu et al., 2022). Dále byl CRP klasifikován jako rizikový faktor kardiovaskulárních onemocnění (KVO), který hraje přímou roli při jejich vzniku (Li and Fang, 2004). Předchozí epidemiologické studie naznačují, že expozice nízkým a středním dávkám IZ může zvyšovat riziko KVO, zatímco vysoké dávky urychlují rozvoj aterosklerózy. Zvýšení hladin CRP po ozáření potvrdila studie Cengizové a spol., v níž bylo 51 pacientek s diagnózou karcinomu endometria ozářeno celkovou dávkou 50,4 Gy. Hodnoty po ozáření se zvýšily až dvojnásobně ve srovnání s hodnotami před ozářením (Cengiz et al., 2001). Podobné výsledky měly i jiné studie zabývající se stejnou tematikou (Ki et al., 2009; Ossetrova et al., 2011). Ačkoli se stanovení hladiny CRP běžně používá jako marker při běžných nachlazeních a zánětech

(Dupuy et al., 2003), tak by i přesto mohl sloužit jako doplňkový marker při radiačních událostech.

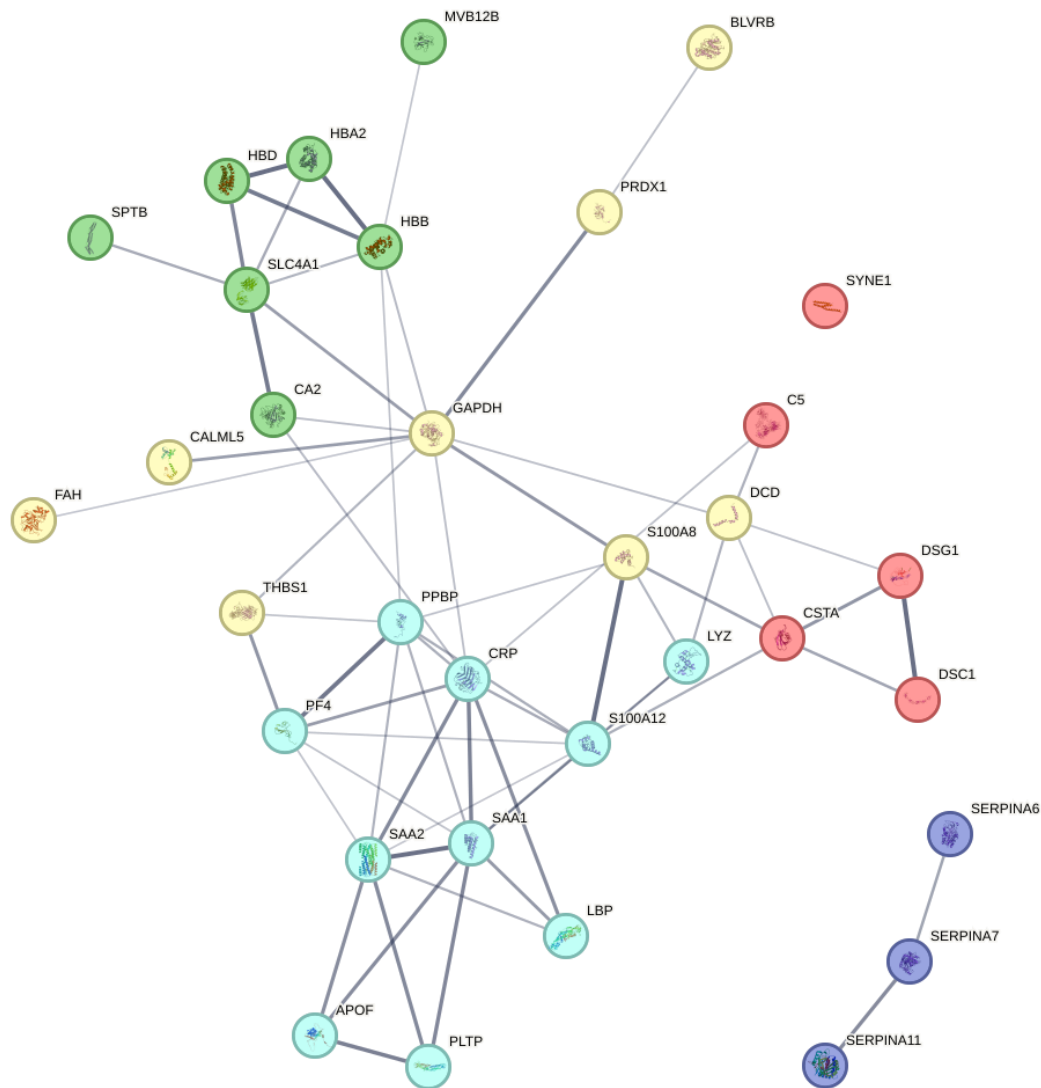
U **flavinové reduktázy** dochází ke zvýšení hladiny po vystavení se oxidačnímu stresu (Pluder et al., 2011). Tento poznatek byl uveden již na straně 84, ale v této analýze došlo k jeho koncentračnímu snížení. Mohlo by to být způsobeno vysokou variabilitou mezi vzorky, která ve výsledném hodnocení může způsobovat rozdíly mezi jednotlivými analýzami. K potvrzení závěru by bylo potřeba analýzu provést znovu se zaměřením na tento protein. **Trombospondin 1** (THBS1) interaguje s buněčnými receptory, růstovými faktory, cytokiny a proteázami. Prostřednictvím těchto interakcí reguluje aktivitu ligandů a buněčnou odpověď na podněty z prostředí, čímž přispívá k fyziologickým a patologickým procesům (Resovi et al., 2014). Snížená aktivita THBS1 vede ke zvýšení radiorezistence. Toto tvrzení testovali na myších modelech se sníženým THBS1. Snížení tohoto proteinu a ozáření zadní končetiny dávkou 25 Gy vedlo k poklesu apoptózy ve svalových buňkách oproti myším bez sníženého THBS1 (Isenberg et al., 2008). **Hemoglobinová podjednotka delta** (HEMD) je součástí molekuly hemoglobinu, která se nachází v erytrocytech. Působením IZ na hemoglobinové podjednotky vede ke změně konfigurace železa prostřednictvím volných radikálů, čímž dochází k neschopnosti vázat kyslík (De Oliveira et al., 2013). Hemoglobinové podjednotky jsou součástí erytrocytů, které jsou vystaveny většímu oxidačnímu stresu než jakýkoli jiný typ buněk kvůli velkému množství hemového železa. Vlivem IZ dochází k narušení jejich struktury a uvolnění hemoglobinů z erytrocytů (Lee et al., 2003). Protein **sérový amyloid A** (SAA) je především syntetizován v játrech a je přirozenou součástí krevního séra. Mezi nejvýznamnější členy akutní zánětlivé reakce patří sérový amyloid A1 a A2. Společně s CRP dochází k navýšení hladiny po infekcích, úrazech a jiných podnětech. Proteiny SAA interagují se specifickými receptory a podílejí se na remodelaci tkání prostřednictvím metaloproteináz a lokálních tkáňových změnách při ateroskleróze (Sack, 2020). V experimentální studii Sproulla a kolektivu hodnotili sérový amyloid A jako biomarker expozice IZ v myší plasmě. Desetitýdenní myší samice byly celotělově ozářeny dávkou 1-8 Gy a zhodnoceny po 24 hodinách. Hladina testovaného proteinu byla statisticky zvýšena oproti kontrole ve všech expozicích (Sproull et al., 2019). Při podstoupení radioterapie u pacientů s rektálním karcinomem dávkou 5 Gy

po dobu 5 dnů došlo ke zvýšení hladiny SAA až trojnásobně (Holm et al., 2020). V našem případě došlo ke snížení hladiny SAA v plasmě. Stejně jako u flavinové reduktázy by bylo vhodné ověřit si výsledek další analýzou. **Destičkový faktor 4** (PF4) je člen rodiny chemokinů, který inhibuje růst hematopoetických kmenových buněk a adhezi k endotelu. Podílí se na snížení citlivosti buněk kostní dřeně k chemoterapii a urychluje obnovu myší krevetvorby po celkovém ozáření těla (Chen et al., 2014). Endogenní hladiny PF4 ovlivňují obnovu počtu krevních destiček po radiačním poškození. Bylo zjištěno, že PF4 patří mezi inhibitory megakaryopoézy. Při sníženém obsahu PF4 v organismu dochází k zvýšení počtu trombocytů po IZ (Lambert et al., 2011). **Karbonická anhydráza 2** (CA2) je metaloenzym, který se podílí na životně důležitých fyziologických a patologických procesech, jako je homeostáza pH a CO₂ (Sjöblom et al., 2009), transport bikarbonátu a CO₂, resorpce kostí, kalcifikace a nádorové bujení. Jeho absence může vést k osteoporóze, renální tubulární acidóze a cerebrální kalcifikaci. Je přítomen především v pneumocytech typu II. Vzhledem k tomuto jedinečnému umístění se předpokládá, že CA2 se podílí na plicních funkcích, jako je regulace sekrece tekutin a usnadnění eliminace CO₂ (Chiang et al., 2002). Přímá souvislost s IZ nebyla v radiobiologické literatuře prokázána, ale u karbonické anhydrázy IX bylo zjištěno, že se podílí na ochraně buněk karcinomu ledvin před IZ (Rini and Small, 2005).

Mezi další koncentračně snížený protein, který byl detekován v lidské plasmě byl **Lysozym C** (LYZ). Jedná se o glykosidázu, která se vyskytuje v různých typech tkání, tj. v plasmě, slinách, játrech a kloubní chrupavce a vyznačuje se antibakteriální schopností (Reitamo et al., 1978). Při ozáření proteinu lysozymu dochází k narušení jeho struktury a ke snížení celkového množství enzymu v plasmě (Edwards et al., 2002). Franzini a spol. pozorovali, že hydroxylový radikál OH a sekundární volné radikály způsobují změny v lysozymu. Zejména mají vliv na snížení jeho aktivity, která klesá s velikostí obdržené dávky (Franzini et al., 1993). Zvýšená hladina byla potvrzena u proteinu **S100-A8**. Patří mezi hlavní prozánětlivý a se stresem související protein rodiny S100 (Roth et al., 2003). Byl identifikován u autoimunních onemocnění (Choi et al., 2014) a jeho hladina se mění v přítomnosti karcinomu zejména karcinomu ledvin (Mirza et al., 2014), adenokarcinomu žaludku (Choi et al., 2012) a kolorektálního karcinomu (Duan et al., 2013). Spojován je především s vrozenou imunitou vzhledem ke schopnosti

aktivovat toll-like receptor 4 (Dessing et al., 2015). Přímá souvislost s IZ nebyla prokázána, ale mohl by být využíván jako doplňkový marker spolu s CRP.

Identifikované proteiny byly rozříděny do 5 klastrů a porovnány z hlediska jejich vzájemných vazeb. Nejvíce proteinů souviselo s imunitní reakcí a opsonizací. Další proteiny byly zodpovědné za odstranění oxidantů a účasti v zánětlivé odpovědi. Ostatní proteiny souvisely se zánětlivou reakcí a adhezí buněk (obr. 3.8).



Obr. 3.8 Vzájemné interakce proteinů detekované v experimentu LFQ2 a jejich uspořádání do 5 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny související s buněčnou adhezí. Žlutá skupina obsahuje proteiny účastníci se zánětlivé odpovědi. Zelená se podílí na buněčné detoxikaci oxidantů. Tmavě modrá souvisí s komplementovou kaskádou a světle modrá se podílí se na akutní imunitní odpovědi a opsonizaci. (www.string-db.org).

Další kvantifikační analýza použitá u lidské plasmy byla pomocí značící metody TMT, která vycházela z analýzy směsných vzorků.

Analýza dat TMT1 vedla k identifikaci 356 proteinů, z nichž 19 vykazovalo změnu hladiny po ozáření na statistické hladině významnosti ($p \leq 0,05$). Celkem 4 proteiny byly koncentračně sníženy a 15 proteinů bylo koncentračně zvýšených (tab. 3.5). Mezi nejvíce změněné proteiny na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ s regulací nahoru byly destičky aktivující faktor acetyl-hydroláza, karbonická anhydráza 2, tsukushi, protein S100-A6, peroxiredoxin 2 a s regulací dolů byly růstový faktor podobný inzulinu II a protein disulfid izomeráza.

Destičky aktivující faktor acetyl-hydroláza (PLA2G7) má rozmanité fyziologické a patologické funkce. Zejména se účastní zánětlivých a alergických reakcí jako lipidový mediátor (Stafforini et al., 1997). Přímá souvislost s IZ nebyla v radiobiologické literatuře zatím prokázána. Dalším detekovaným proteinem byla **karbonická anhydráza 2**, která již byla zmíněna a její vztah k IZ byl popsán na straně 90. **Tsukushi (TSK)** patří do rodiny malých proteoglykanů bohatých na leucin a podílí se na růstu kostí, hojení ran a regulaci kmenových buněk sítnice (Ohta et al., 2019). Účastní se signálních drah, které jsou důležité pro vývoj a metabolismus. Reguluje buněčnou komunikaci, proliferaci a osud buněk (Istiaq and Ohta, 2022). V dostupné literatuře nebyla nalezena spojitost s IZ. **Protein S100-A6** je jedním z dalších proteinů spadající do rodiny S100, které vážou Ca^{2+} . V omezeném množství vzniká v normálních tkáních a v několika typech nádorových buněk. Jako intracelulární protein se S100-A6 podílí na regulaci několika buněčných funkcí, jako je proliferace, apoptóza, dynamika cytoskeletu a buněčná odpověď na různé stresové faktory. (Donato et al., 2017). Zvýšená hladina proteinu S100-A6 v buňkách karcinomu tlustého střeva a plic byla zaznamenána po jejich vystavení se IZ. (Orre et al., 2007). IZ má vliv na zvýšení ROS v buňkách, které se podílí na vzniku buněčného oxidačního stresu. Tato změna vede k intracelulární redoxní nerovnováze, jenž by mohla být zodpovědná za změny v hladině S100-A6 (Leach et al., 2001). Na zesilování oxidačního stresu se podílí i signální dráha p53, která má schopnost zvyšovat produkci ROS (Sawada et al., 2004). Rozdíly v hladině proteinu S100-A6 po ozáření by mohly souviset s p53. Při působení H_2O_2 na dráhu p53 došlo

ke zvýšení hladiny S100-A6 po dobu 48h (Leśniak et al., 2005). Dalším zvýšeným proteinem byl **peroxiredoxin 2**, který byl již zmíněn na stranách 84-85.

Bylo prokázáno, že **inzulinu podobný růstový faktor 2** (IGFBP2) hraje důležitou roli ve vývoji, růstu a přežívání buněk. IGFBP2 může působit jako faktor k přežití tím, že inhibuje apoptózu vyvolanou poškozením DNA, či použitím chemoterapeutických látek (Zhang et al., 1999). Spadá do IGF dráhy, která se podílí na radiorezistenci. Tuto teorii dokazují i některé dále zmíněné studie. Například analýza neozářených a ozářených myší potvrdila, že radiosenzitivita a přežití po ozáření souvisejí mimo jiné se stavem aktivace tkáňové a systémové signalizace IGF-1 (Zinati-Saeed et al., 2020). Zvýšenou hladinu IGFBP2 u potkanů zaznamenala experimentální studie Wanga a kolektivu i po týdnu od ozáření pravé končetiny dávkou 17.5 Gy (Wang et al., 2007). V naší studii došlo k opačné tendenci. Mohlo to být způsobené vystavením subjektu rozdílné dávce IZ, nebo odběrem biologického materiálu v jiném časovém intervalu. Opačný výsledek mohl být způsoben i vysokou variabilitou mezi vzorky. Při dalším experimentu by bylo vhodné tento protein ověřit na více vzorcích znovu.

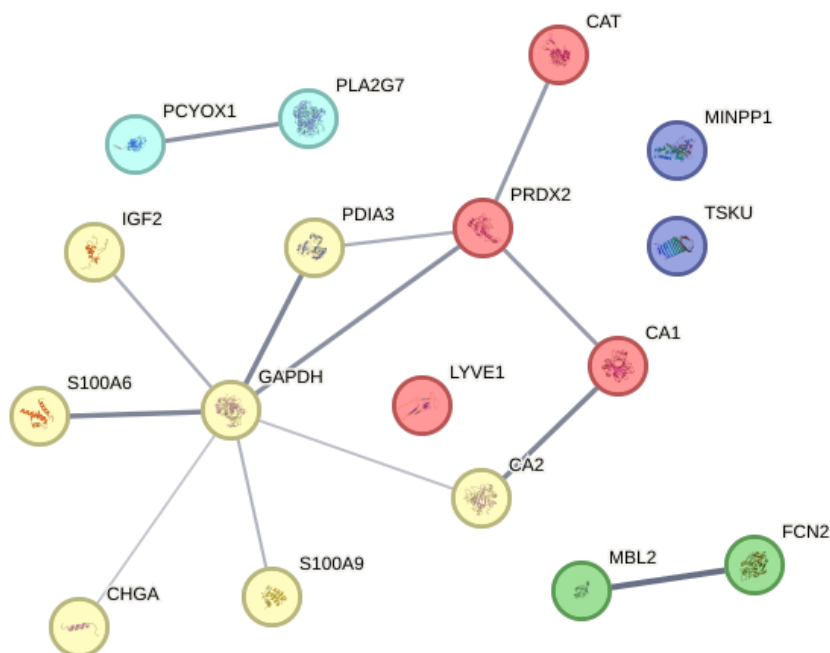
Protein disulfid izomeráza (PDI) je členem velké rodiny dithiol/disulfid oxidoreduktáz a katalyzují tvorbu disulfidových vazeb (Ferrari and Söling, 1999). Vyskytují se zejména v endoplasmatickém retikulu (ER) a jsou vylučovány především z hepatocytů, endoteliálních buněk či krevních destiček. V ER působí jako chaperony a účastní se kontroly kvality pro správné skládání proteinů. Mimo ER se podílí na důležitých biologických procesech, které souvisí s redoxními vlastnostmi a asociací s DNA. Zřejmě je zapojena i do imunitních reakcí, jelikož značné množství PDI bylo nalezeno i na povrchu lidských B-lymfocytů (Turano et al., 2002). PDI navazuje na činnost jiných enzymů přítomných v ER (GPX 7 a 8, PRDX 4), jenž se podílí na katalytické redukci H₂O₂ vyprodukovaného oxidoreduktinem 1. Při tomto procesu dochází k přeměně C57 a C86 GPX7 na kyselinu sulfenovou (disulfid), která je redukována PDI (Ali Khan and Mutus, 2014).

Mezi další proteiny jejichž hladiny se v organismu zvyšují po vystavení se IZ byly manóza vázající protein C a kataláza.

Manóza vázající protein C také označována jako lektin vázající manózu (MBL2) reaguje na expozici IZ zvýšením hladiny a aktivací lektinové dráhy komplementu (Collard et al., 2001). Ke zvýšení hladiny MBL2 v plasmě došlo i v případech

exponovaných myší dávkou 3 Gy (Rithidech et al., 2009). Dalším proteinem byla **kataláza**, která již byla popsána na straně 85.

Při porovnávání vzájemných interakcí bylo identifikováno nejvíce proteinů zodpovědných za přenos signálů a buněčnou komunikaci. Celkem čtyři proteiny se podílí na detoxikaci ROS a zbytek proteinů souvisel s metabolismem lipidů, aktivací komplementu a opsonizací (obr. 3.9).



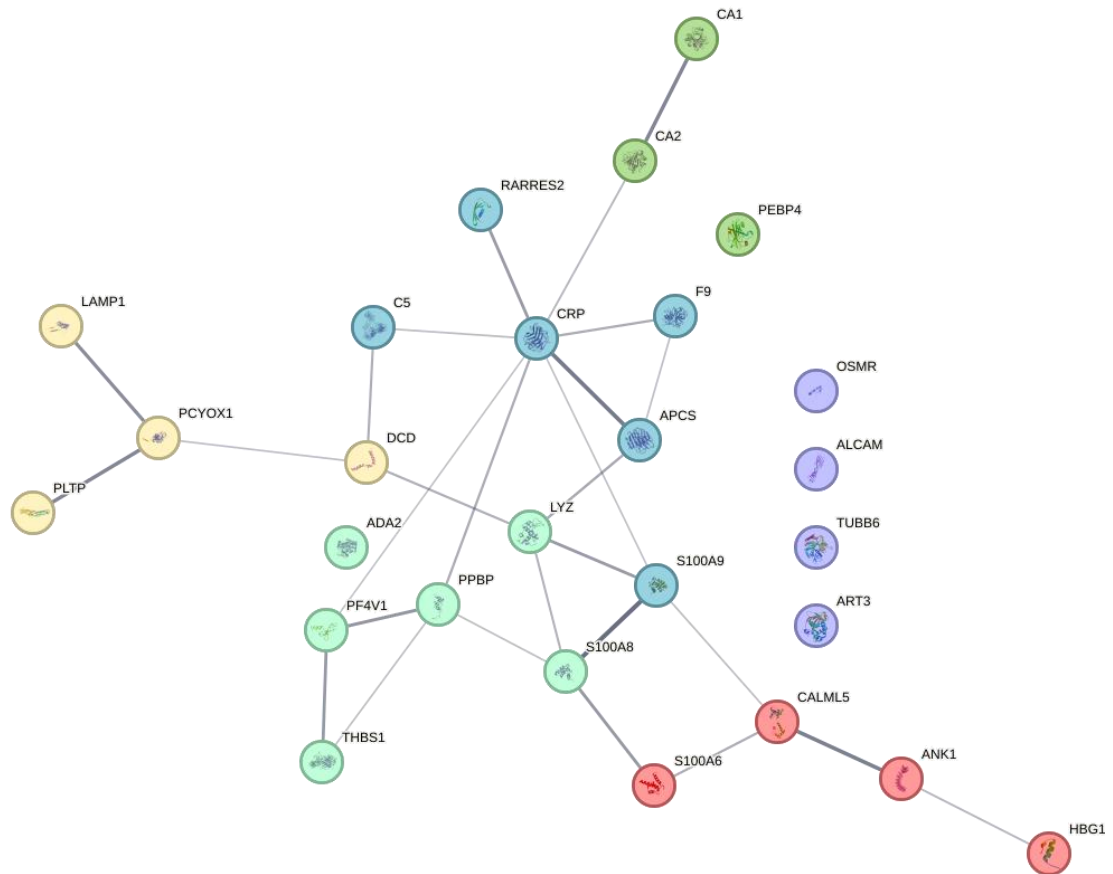
Obr. 3.9 Vzájemné interakce proteinů detekované v experimentu TMT1 a jejich uspořádání do 5 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny účastnící se detoxikace ROS. Žlutá skupina zprostředkovává přenos signálů a buněčnou komunikaci. Světle zelená se podílí na aktivaci komplementu a opsonizaci. Světlé modrá souvisí s metabolismem lipidů a tmavě modrá označuje zbývající proteiny bez interakcí (www.string-db.org).

V souboru dat z TMT2 bylo identifikováno 346 proteinů, z nichž 28 vykazovalo změnu hladiny po ozáření na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ (tab. 3.6). Celkem 15 proteinů bylo koncentračně zvýšených a 13 proteinů bylo koncentračně snížených. Mezi nejvíce změněné proteiny na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$ s regulací nahoru byly alfa amyláza 1A, protein krevních destiček, CRP, S100-A6 a THBS1.

Alfa amyláza 1A (AMY1A) je dalším z hlavních kandidátů nalezených v této studii. Tento amyolytický enzym katalyzující alfa-1,4-glykosid, se váže na škrob a další příbuzné alfa-glukany (Janeček et al., 2014). Je zejména produkován v slinných žlázách a jejich lokální vystavení IZ vede k zvýšení koncentrace amylázy v séru. Proto byla navržena korelace mezi amylázou v séru a obdrženou dávkou záření, čímž došlo ke stanovení časného biomarkeru poškození slinných žláz (Becciolini et al., 1984). Předchozí studie ukázaly, že produkce amylázy se při lokálním ozáření slinných žláz zvýšila až 80krát. Celotělové ozáření však v tomto ohledu nárůst AMY1A nezvýšil. Byla pozorována jen malá nebo žádná změna v její produkci (Hofmann et al., 1990). Na druhou stranu jiná studie provedená na primátech rhesus makak odhalila konzistentní nárůst AMY1A v plasmě 1 den po celotělovém ozáření (Blakely et al., 2007), což je v souladu s pozorováním provedeným v této studii. **Protein krevních destiček (PPBP)** patří do rodiny chemokinů CXC a je známý jako hlavní granulární protein krevních destiček. Jedná se o signální molekulu specifickou pro megakaryocyty a trombocyty (El-Gedaily et al., 2004). Při vystavení se expozici IZ dochází k poškození krevtvořby a negativním účinkům na krevní tělíška. Zejména dochází k poklesu krevních tělíšek včetně trombocytů (Dörr and Meineke, 2011). Úbytek zmiňovaného proteinu v naší studii by mohl souviset s ozářením. Mezi další slibné biomarkery identifikované i v tomto data setu byly **CRP** (str.88-89), **S100-A6** (str. 93-94) a **THBS1** (str. 89).

Lys a **S100-A8** byly další koncentračně snížené proteiny, které byly identifikovány i v naší studii. Oba dva byly popsány již na stránkách 90-91.

Proteiny byly rozděleny do jednotlivých skupin podle vzájemných interakcí a signálních drah. Nejvíce z nich působilo v imunitní odpovědi, odpovědi na stres a zánětlivé reakci. Další se podílely na metabolismu lipidů a karbonát anhydrázy (obr. 3.10).



Obr. 3.10 Vzájemné interakce proteinů detekované v experimentu TMT2 a jejich uspořádání do 6 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny bez vzájemné funkce. Žlutá skupina obsahuje proteiny účastníci se metabolismu lipidů a interakce lipid-protein. Zelená se podílí na aktivitě karbonát dehydratázy. Modrá souvisí s imunitní odpovědí a odpovědí na stres. Světle tyrkysová se účastní zánětlivé reakce a fialová označuje zbývající proteiny bez interakcí (www.string-db.org).

Na základě výsledků z analytického programu Proteome Discoverer byly jednotlivé údaje z LFQ a izobarického značení TMT vzájemně porovnány. Tento přístup umožnil identifikovat velké množství proteinů z nichž bylo na základě souboru specifických pravidel vybrání vhodní kandidáti. V první fázi screeningu bylo vyselektováno celkem 15 kandidátů ze kterých bylo vybráno top 5 kandidátů. Při porovnání výsledků z obou metod jsme dospěli k závěru, že výsledné hodnoty relativních poměrů jsou až na několik výjimek velmi podobné.

Mezi top 5 kandidátů byl vybrán CRP, AMY1A, MBL2, C5 a fosfolipidový transférový protein (PLPT) (tab. 3.7 a 3.8). Tyto proteiny se podílí

na metabolických drahách, o nichž je známo, že se vlivem expozice IZ mění, nebo jsou zapojeny do imunitní odpovědi (Cengiz et al., 2001; Nigam and Schewe, 2000).

Mezi proteiny s největší změnou byly **CRP** (str. 88-89) a **AMY1A** (str. 86), jenž byly popsány v předchozích odstavcích. Dalším kandidátem byl **PLPT** jenž je hlavní složkou buněčné membrány a plní důležité biologické funkce, jako je transport fosfolipidů (Wirtz, 1997). Membránové lipidy a zejména fosfolipidy obsahující polynenasycené mastné kyseliny jsou velmi citlivé na přítomnost ROS, protože mohou narušit membránu a vyvolat změny ve fluiditě a permeabilitě. Také mohou vyvolat změny v transportu iontů a inhibovat buněčný metabolismus (Nigam and Schewe, 2000). Při nadměrné produkci ROS dochází k překročení kapacity antioxidačního obranného mechanismu, což vede k oxidačnímu stresu, který způsobuje poškození buněk oxidací proteinů, lipidů, nukleových kyselin a dalších makromolekulárních látek (Forrester et al., 2018). Volné radikály a singletový kyslík aktivují lipooxygenázu a cyklooxygenázu, což vyvolá specifickou enzymatickou oxidaci lipidů (Niki, 2015) a také fosfolipidů (Parasassi et al., 1994). Oxidační poškození má za následek změnu ve funkci membrán a metabolismu fosfolipidů. Proto byl navržen jako potenciální marker expozice IZ (Wang et al., 2016). V naší studii došlo k zvýšení plasmatické hladiny PLPT více jak 1,5násobku. Čtvrtý kandidát, **C5**, je součástí komplementového systému. Účastní se zánětlivých procesů spolu s receptory komplementu CR1 a CR3 a funguje jako enzymatický mediátor. Proteiny komplementového systému jsou za normálních okolností neaktivní, dokud nejsou postupně aktivovány řadou řetězových reakcí (Pangburn and Rawal, 2002). Cytokin IL-6 aktivuje C5, který prostřednictvím C5aR produkuje silný anafylatoxin. Výsledkem je lýze patogenu a spuštění zánětu (Jore et al., 2016). Souvislost mezi zvýšenou hladinou C5aR v reakci na IL-6 byla prokázána při toxickém poškození jater (Fausto et al., 2006). Podpora regenerace hepatocytů je žádoucí, protože expozice IZ může způsobit významné poškození jaterní tkáně (Jirtle et al., 1981). Regenerace prostřednictvím C5a byla již dříve zaznamenána u myši (Schieferdecker et al., 2000). Působení IZ vede k produkci již zmíněných anafylatoxinů (C3a a C5a), které pak stimulují adaptivní imunitu a přispívají k eliminaci nádorových buněk (Surace et al., 2015). Naše výsledky rovněž prokázaly zvýšení hladiny C5 až 1,5krát ve srovnání s kontrolními vzorky, což zakládá jeho význam v odpovědi na celotělové ozáření.

Další kandidát je **MBL2**, která byla rozvedena na straně 94. **Protein vázající růstový faktor podobný inzulinu (IGFBP)** reguluje přenos signálu zprostředkovaného růstovým faktorem podobným inzulinu (IGF) (Taferner et al., 2011). Několik studií prokázalo souvislost dráhy IGF s IZ (Mylonas et al., 2000). Například analýza neozářených a ozářených myší ukázala, že radiosenzitivita a přežití po ozáření souvisí mimo jiné se stavem tkáně a systémovou signalizací IGF-1. Vystavení IZ vede k aktivaci několika tyrozinkinázových receptorů IGF-1, které se podílejí na radiační odpovědi na poškození DNA. Analýza neozářených a ozářených myší, potvrdila, že radiosenzitivita a přežití po ozáření souvisejí mimo jiné se stavem aktivace tkáňové a systémové signalizace IGF-1. Proteiny rodiny IGFBP jsou úzce spojeny se zánětlivou odpovědí a podílejí se na odstraňování superoxidů a buněk poškozených IZ (Zinati-Saeed et al., 2020). Za těchto podmínek se jejich plasmatické hladiny zvyšují podobně jako v naší studii. V tomto kontextu naše výsledky potvrzují jejich roli při celotělové expozici záření a také implikují význam radiosenzitivity. Další identifikované kandidáty **apolipoprotein B-100 (APOB)** a **apolipoprotein F (APOF)** se podílí na metabolismu lipidů (Segrest et al., 1994). Zvýšená plasmatická hladina apolipoproteinu B-100 je silným rizikovým faktorem pro rozvoj předčasného aterosklerotického onemocnění vyvolaného IZ (Young, 1990). Při testování hladiny apolipoproteinu B-100 v plasmě radiologických pracovníků, kteří byli vystaveni IZ o celkové dávce 3.5 mSv/rok byly vyšší než v plasmě neozářených dárců (Serhatlioglu et al., 2003). U apolipoproteinu F nebylo v radiologické literatuře nalezeno spojení s IZ.

LYZ je rozveden na straně 90. **Lipopolysacharidový vazebný protein (LBP)** funguje jako vazebný a transportní protein, který se účastní první linie obrany proti mikrobům (Zweigner et al., 2006). Jedná se o protein akutní fáze a jeho hladiny se významně zvyšují během systémových zánětlivých reakcí a sepse. Jeho sekrece je indukována IL-1 nebo IL-6 a nejvyšší hladiny LBP během akutní fáze bývají 2-3. den (Jack, 2000). Do těla se uvolňuje z hepatocytů a po glykosylaci se dostává do krevního oběhu. Bylo prokázáno, že dalším zdrojem syntézy jsou epitelové buňky kůže, plic, střeva, lidských dásní, malé svalové buňky plicních tepen, buňky srdečního svalu a buňky ledvin (Schumann et al., 1990). LBP se mimo jiné podílí na metabolismu lipidů a patogenezi kardiovaskulárních onemocnění

(Yu and Song, 2020). LBP byl již dříve popsán jako potenciální časný biomarker kardiální toxicity po radioterapii (Cheema et al., 2022). Výsledky Chalubinské-Fendlerové a spol. prokázaly jeho asociaci s IZ v plicní tkáni v závislosti na dávce (Chalubinska-Fendler et al., 2016). Konkrétně byly zvýšené hladiny LBP pozorovány u 51 pacientů s rakovinou 24 hodin po ozáření. LBP může být potenciálním markerem radiotoxicity, který si zaslouží další zkoumání (Chalubinska-Fendler et al., 2019).

Di-N-acetylchitobiáza (chitobiáza, CTBS) je lysozomální glykosidáza, která se podílí na degradaci glykoproteinů vázaných na asparagin v jaterní tkáni a v lidské placentě (Fisher and Aronson, 1992). Identifikace a zvýšená hladina CTBS v moči byla zjištěna u potkanů, kteří podstoupili deset ozařování v jedné frakci při dávkovém příkonu 1,95 Gy/min. Moč byla sbírána 24 hodin po expozici. Pro zachování stejných podmínek a zlepšení účinnosti výsledků byli kontrolní potkani ozáření fiktivně, aby se vyvolala stejná stresová reakce jako u ozářených potkanů (Sharma et al., 2008). Podobné zvýšení hladin CTBS bylo zjištěno také v této studii na lidské plasmě.

Fikolin 3 a lektin vázající manózu (FCN3) ve spojení s MBL/Fikolin-asociovanými serinovými proteázami (MASP) jsou iniciačními molekulami lektinové dráhy (Thiel, 2007). Hladina FCN3 se v séru zvyšuje během zánětlivých a infekčních stavů. V minulosti bylo zjištěno, že nedostatek FCN3 je spojen s život ohrožujícími infekcemi (Hein et al., 2010). FCN3 se také podílí spolu s MBL na odstraňování apoptotických buněk prostřednictvím aktivace komplementu (Kuraya et al., 2005). Pokud je nám známo, jedná se o první zprávu spojující FCN3 s expozicí IZ, neboť jeho hladina byla v provedených experimentech zvýšena až 1,4krát.

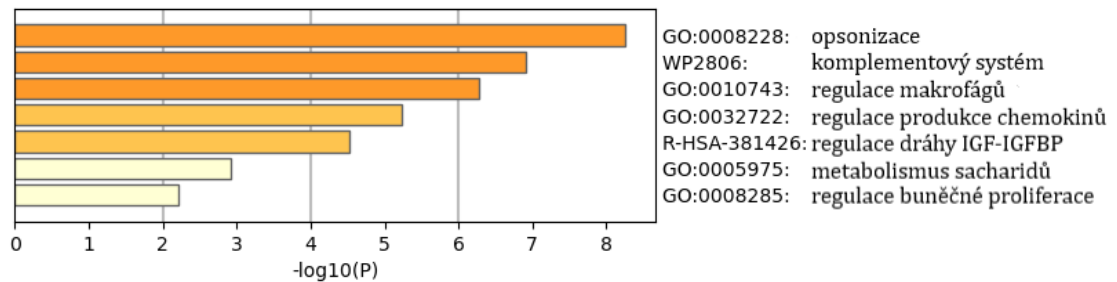
Kalistatin (SERPINA4) je plasmatický protein, který inhibuje serinové proteázy a angiogenezi. Kalistatin je exprimován v endoteliálních a hladkých svalových buňkách lidských cév, jater a ledvin (Miao et al., 2000). Váže se na tkáňový kallikrein a působí proti apoptóze a oxidačnímu stresu (Shen et al., 2009). Podávání kalistatinu tlumilo produkci ROS a poškození orgánů v důsledku oxidačního stresu (Gao et al., 2008). Kalistatin snižuje expresi transkripčního faktoru indukovatelného hypoxií (HIF)-1, což má za následek snížení množství kyslíku v mikroprostředí nádoru a zvýšení účinků radioterapie a chemoterapie (Shiau et al., 2010). Z toho lze vyvodit,

že cirkulující hladiny kalistatinu mohou být potenciálním markerem onemocnění souvisejícího s oxidačním stresem (Gao et al., 2008). Mírné zvýšení hladiny kalistatinu bylo pozorováno také u vzorků TBI analyzovaných v této studii, kde se předpokládala zvýšená přítomnost ROS.

Protein C závislý na vitaminu K (PROC) je glykoprotein působící jako antikoagulant (Wypasek and Undas, 2013). Je syntetizován v játrech a podílí se na inaktivaci aktivovaného faktoru V (FVa) a VIII (FVIIIa) štěpením na specifických argininových zbytcích, čímž ovlivňuje krevní oběh a srážlivost (Kovács et al., 2015). Deficit C je spojen se zvýšeným rizikem žilního tromboembolismu (VTE) (Ding et al., 2015). Nedostatek vitaminu K může přispívat k výraznému krvácení, špatnému vývoji kostí, osteoporóze a zvýšenému výskytu kardiovaskulárních onemocnění (DiNicolantonio et al., 2015). Přímá souvislost s IZ nebyla v radiobiologické literatuře popsána, a proto by byla zajímavým kandidátem pro další zkoumání, nicméně námi pozorované zvýšení bylo jen mírné.

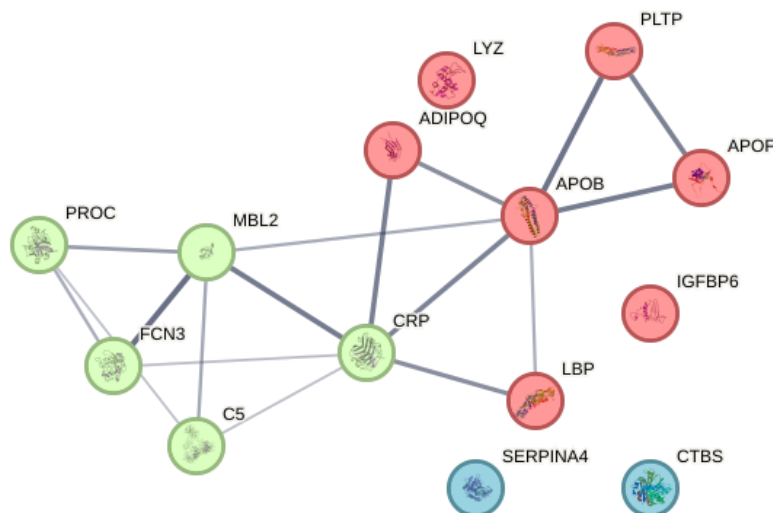
Adiponektin (ADIPOQ) je jedním z cytokinů, které regulují citlivost na inzulin a zánět. Je vylučován adipocyty a uvolňován z tukové tkáně a váže se na růstové faktory, čímž se podílí na proliferaci buněk. Pozitivně reaguje na oxidační stres a jeho vlastnosti mu umožňují regulovat poškození tkání a jejich reparaci po ozáření (Ponemone et al., 2010). Adiponektin inhibuje zánětlivé reakce na různé podněty prostřednictvím signálních drah. Byl prokázán vztah mezi plasmatickými hladinami adiponektinu a zánětlivými markery, jako je CRP (Ouchi and Walsh, 2007). Absence nevede k poškození GIT, ale k narušení erytrocytů v důsledku zvýšeného oxidačního stresu (Ponemone et al., 2010). Další vlastností je ochrana fibroblastů před buněčnou smrtí a senescencí vyvolanou zářením (Katsuki et al., 2006). Při ozáření kultivovaných adipocytů a fibroblastů dávkou 5 Gy došlo u fibroblastů až k 40% redukci, zatímco hladina adipocytů byla po ozáření podobná. Vyšší životaschopnost fibroblastů byla pozorována, když byly oba proteiny kultivovány společně při stejné dávce. Tento experiment potvrdil cytoprotektivní účinek fibroblastů adipocyty (Kosmacek and Oberley-Deegan, 2020). V této studii bylo pozorováno mírné zvýšení plasmatických hladin adiponektinu. Stejného výsledku bylo dosaženo v jiné studii, v níž bylo 16 samců makaků rhesus ozářeno dávkou 4 Gy (Bacarella et al., 2020).

Kandidátní proteiny byly hodnoceny z hlediska jejich biologické funkce. Tímto způsobem bylo identifikováno několik signálních drah vyvolaných zářením (obr. 3.11). Tyto dráhy mohly být spojeny s opsonizací, komplementovým systémem a regulací růstového faktoru podobného inzulinu (IGF). Kromě toho došlo k dysregulaci metabolismu sacharidů a buněčné proliferace.



Obr. 3.11 Přehled signálních drah u top kandidátů ze vzorků lidské plasmy (www.metascape.org)

Při posouzení vzájemných interakcí bylo nejvíce proteinů zodpovědných za metabolismus lipidů a aktivaci komplementu či opsonizaci (obr. 3.12).



Obr. 3.12 Vzájemné interakce u vybraných top proteinů a jejich uspořádání do 3 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny účastnící se metabolismu a transportu lipidů. Světle zelená se podílí na aktivaci komplementu a opsonizaci. Tmavě modrá označuje zbývající proteiny bez interakcí (www.string-db.org).

Před selekcí potenciálních kandidátů z label free a metody TMT předcházela výběr proteomických biomarkerů z radiobiologické literatury podle kterého byla sepsána rešeršní studie. Na základě dat z label-free, TMT a referencí z radiobiologické literatury byl vytvořen top seznam potenciálních kandidátů (tab. 3.9).

Označení	Název	Uniprot kód
1	alfa amyláza 1A	PODUB6
2	C reaktivní protein	P02741
3	Di-N-acetylchitobiáza	Q01459
4	fosfolipidový transférový protein	P55058
5	komplement C5	P01031
6	lipopolysacharidový vazebný protein	P18428
7	lysozym C	P61626
8	protein vázající růstový faktor podobný inzulinu	P24592
9	adiponektin	Q15848
10	apolipoprotein B100	P04114
11	apolipoprotein F	Q13790
12	fikolin 3	O75636
13	kalistatin	P29622
14	manóza vázající protein C	P11226
15	protein C závislý na vitamínu K	P04070
16	peroxiredoxin 1	Q06830
17	peroxiredoxin 2	P32119
18	kataláza	P04040
19	laktotransferin	P02788
20	protein S100-A6	P06703
	reference v radiobiologické literatuře a detekce label-free + TMT	
	detekce label-free + TMT	
	reference v radiobiologické literatuře a detekce label-free nebo TMT	

Tab. 3.9 Přehled ozářením indukovaných proteinů v lidské plasmě podle referencí z radiobiologické literatury a identifikovaných metodou label free a TMT.

3.4 Doplnění panelu biomarkerů ozáření o proteiny izolované z prasečí plasmy

Pro doplnění panelu biomarkerů ozáření byly izolovány proteiny z prasečí plasmy. K detekci nových biomarkerů se obvykle využívá biologický materiál získaný ze zvířecích modelů, které mají tu výhodu, že na nich lze studovat účinky IZ v různých dávkách. Navíc jsou tyto modely bez nemocí a jsou chovány ve standardizovaných podmínkách, což eliminuje proměnné spojené

s onemocněním a životním prostředím. Použití zvířecích modelů také obchází etické problémy spojené se studiem lidských chorob. (Reza Khorramizadeh and Saadat, 2020). Pro stanovení proteinů ve vzorcích prasečí plasmy byl zachován stejný postup jako v případě lidské plasmy. V první řadě byly vzorky měřeny metodou label-free a v dalším kroku i s použitím značek TMT. U značící metody byly vzorky rozděleny do dvou skupin H2 a H4 podle obdržené radiační dávky. Hmotnostně spektrometrická data byla zpracována v programu Proteom discoverer. Pro výběr potenciálních kandidátů byla dodržena stejná kritéria, která byla použita při analýzách lidské plasmy. Metodou label free bylo celkem detekováno 142 proteinů z toho 19 kandidátů splnilo stanovená kritéria na statistické hladině významnosti $p \leq 0.05$. Celkem 12 proteinů bylo koncentračně zvýšených a 7 koncentračně snížených (tab. 3.10).

S největším koncentračním zvýšením při porovnání ozářených a neozářených vzorků prasat byla **glutathion peroxidáza (GPX3)**. GPX3 představuje významný endogenní antioxidant podílející se na vychytávání volných radikálů a detoxikaci xenobiotik (Meister and Anderson, 1983). Enzym GPX3 je aktivován kofaktorem glutationem a jeho aktivita souvisí s odstraňováním peroxidu vodíku a lipidových peroxidů, čímž chrání buněčné bílkoviny a molekuly obsažené v membránách před oxidací (McCord and Fridovich, 1969). Metabolická kontrola glutationu je klíčová pro udržení redoxní rovnováhy v organismu. Její porušení vede k výraznému nárůstu hladiny ROS a k oxidačnímu stresu, což negativně ovlivňuje vývoj ANO. U myši, kterým byl podán prooxidant paraquat, bylo zaznamenáno nadměrné zvýšení hladiny glutathion peroxidázy 1 (GPX1) jako adaptivní reakce na ochranu buněk před oxidačním stresem. Pokud byla funkce GPX1 u myši deaktivována, při stejném množství podaného prooxidantu byla míra jejich přežití minimální (Lei, 2001). V experimentální studii Kunwara a kolektivu aktivita GPX3 v séru korelovala s rozvojem fibrózy u ozařovaných myši, čímž bylo vyvozeno tvrzení, že tento enzym by mohl být vhodným indikátorem rozvoje plicní fibrózy (Kunwar and Haston, 2014). Při chemoradioterapii osob dochází k častým projevům radiační pneumonitidy vlivem cytotoxických účinků záření prostřednictvím ROS. V experimentální práci Parka a kolektivu byla porovnávána hladina GPX3 s rozvojem pneumonitidy. Ti, u nichž se pneumonitida projevila, vykazovali nižší aktivitu GPX3 ve srovnání s těmi, u nichž se pneumonitida nevyvinula

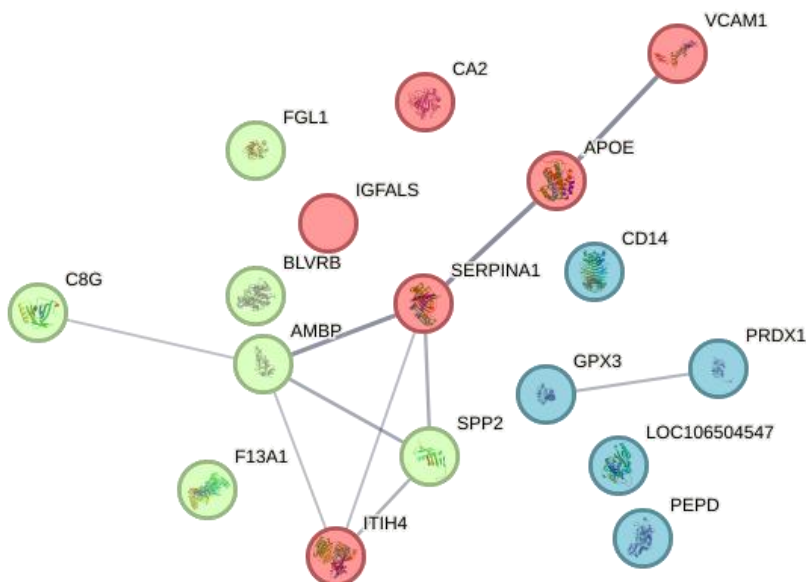
(Park et al., 2007). Ze závěrů experimentálních prací lze usuzovat, že aktivita GPX3 se zvyšuje s výskytem ROS vzniklých působením IZ. Získaná data v této studii korelují s výsledky zmiňovaných experimentálních prací.

Dalším kandidátem s vyšším koncentračním zvýšením byl vybrán **sekretovaný fosfoprotein 24 (SPP2)**. Tento protein patří do rodiny cystatinů, které se řadí mezi inhibitory serinových proteáz a je lokalizován především v játrech a kostech. Jeho hlavní funkcí je účast na remodelaci kostní tkáně (Bennett et al., 2004; Brochmann et al., 2009). Několik publikací poukazuje na vliv rentgenového a gama záření na kolagenovou síť, čímž dochází k ovlivnění mechanických vlastností kostí (Al Kayal et al., 2015; Rahman et al., 2020, 2018). Navíc působí jako mediátor osy regulace a transportu IGF-1 a jeho vazebných proteinů (Woolbright et al., n.d.). Přičemž radiobiologická literatura poukazuje na spojitost s ozářením a radiosenzitivitou (Panganiban and Day, 2013). Dle získaných dat se lze domnívat, že proteosyntéza SPP24 vzrůstá v organismu po expozici IZ a podílí se na přežití organismu po vystavení se tohoto typu stresu. Mezi další nahoru regulované proteiny byly vybrány apolipoprotein, komplement gama řetězce C8, monocyt s antigenem CD14, prekurzor proteinu alfa 1 mikroglobulin/bikunin, alfa 1 antitrypsin, protein obsahující serpinovou doménu, properdin, trypsinový inhibitor inter alfa s těžkým řetězcem H4, Angiotensin 1, komponenta komplementu C9, apolipoprotein H, komponenta komplementu C7 a trombospondin 4. Předností těchto proteinů byla zejména úzká vazba na serinové proteázy, komplementovou kaskádu a imunitní odpověď.

Mezi vhodné kandidáty regulované dolů se statistickou hladinou významnosti $p \leq 0.05$, kteří splnili kritéria byli vybráni **kyselá labilní podjednotka (IGFALS)**, **protein vaskulární buněčné adheze (VCAM1)**, **PRDX1** a **biliverdin reduktáza (BLVRB)**. Protein IGFALS má zásadní význam pro udržení integrity cirkulujícího systému IGF/IGFBP. Jeho nedostatek u lidí je charakterizován silně sníženými sérovými koncentracemi IGF-I a IGFBP-3 (Domené et al., 2011). Jak již bylo zmíněno signální dráha IGF reaguje na účinky IZ při expozici organismu. Druhým kandidátem byl protein VCAM1, který se účastní imunitních reakcí a podporuje migraci makrofágů a leukocytů, především T buněk do míst zánětu (Kong et al., 2018). Oba tyto procesy jsou typicky spuštěny po ozářením, což podtrhuje biologický význam a relevanci získaných poznatků. K snížení hladiny VCAM1 po expozici IZ bylo

dosaženo u ozářených potkanů v séru stejně jako v našem případě (Zhao et al., 2021). Dalším kandidátem byl PRDX 1, který byl také izolován z lidské plasmy a popsán na straně 88. Posledním kandidátem byl fyziologický antioxidant BLVRB, jehož hlavní funkce je přeměna biliverdinu na bilirubin (Sun et al., 2000). Podílí se i na regulaci metabolismu glukózy, řízení buněčného růstu, apoptóze (Florczyk et al., 2008) a zajišťuje ochranu buněk před oxidačním stresem (Barañano et al., 2002).

Kandidátní proteiny byly hodnoceny z hlediska jejich biologické funkce. Tímto způsobem bylo identifikováno několik signálních drah souvisejících s aterosklerózou, aktivací komplementu, koagulací včetně dráhy související s detoxikací ROS (obr. 3.13).



Obr. 3.13 Vzájemné interakce u vybraných proteinů z metody LFQ a jejich uspořádání do 3 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny související s onemocněním aterosklerózy a kardiovaskulárního onemocnění. Světle zelená se podílí na aktivaci komplementu a koagulaci. Modrá označuje proteiny, které hrajou roli v detoxikaci ROS (www.string-db.org).

Při porovnávání statisticky významných proteinů bylo zjištěno, že jejich signální dráhy souvisí s regulací komplementové kaskády, odstraňováním ROS a buněčnou odpovědí na chemický stres (obr. 3.14). Všechny tyto signální dráhy společně působí na snížení cytotoxicity vyvolané po expozici IZ.

Pathway name	Curated found	Curated Total	Interactors found	Interactors Total	Entities found	Entities Total	Entities ratio	Entities pValue
Detoxification of Reactive Oxygen Species	2	42	0	0	2	42	0.005	3.77E-3
Cellular response to chemical stress	3	148	0	0	3	148	0.017	3.88E-3
Transfer of LPS from LBP carrier to CD14	1	2	0	0	1	2	0	4.35E-3
NFE2L2 regulating anti-oxidant/detoxification enzymes	1	2	0	0	1	2	0	4.35E-3
Erythrocytes take up oxygen and release carbon dioxide	1	8	0	0	1	8	0.001	1.73E-2
TRIF-mediated programmed cell death	1	9	0	0	1	9	0.001	1.95E-2
Terminal pathway of complement	1	9	0	0	1	9	0.001	1.95E-2
Erythrocytes take up carbon dioxide and release oxygen	1	11	0	0	1	11	0.001	2.37E-2
O2/CO2 exchange in erythrocytes	1	11	0	0	1	11	0.001	2.37E-2
Reversible hydration of carbon dioxide	1	12	0	0	1	12	0.001	2.59E-2
Heme degradation	1	15	0	0	1	15	0.002	3.22E-2
TRAF6-mediated induction of TAK1 complex within TLR4 complex	1	16	0	0	1	16	0.002	3.43E-2
IRAK2 mediated activation of TAK1 complex upon TLR7/8 or 9 stimulation	1	16	0	0	1	16	0.002	3.43E-2
Caspase activation via Death Receptors in the presence of ligand	1	16	0	0	1	16	0.002	3.43E-2
Activation of IRF3, IRF7 mediated by TBK1, IKKKE	1	17	0	0	1	17	0.002	3.64E-2
Regulation of TLR by endogenous ligand	1	17	0	0	1	17	0.002	3.64E-2
Caspase activation via extrinsic apoptotic signalling pathway	1	19	0	0	1	19	0.002	4.06E-2
IKK complex recruitment mediated by RIP1	1	23	0	0	1	23	0.003	4.9E-2
Metabolism of porphyrins	1	27	0	0	1	27	0.003	5.73E-2
Cellular responses to stress	3	481	0	2	3	483	0.055	8.51E-2

Obr. 3.14 Přehled 20 nejvíce zastoupených signálních drah, kterých se účastní statisticky významně regulované plasmatické proteiny u miniprasat po ozáření. (reactome.org, 2023)

K další kvantifikační analýze byla zvolena metoda za použití značek TMT. Pro naši studii bylo použito 6 značek. V tomto konkrétním počtu jsou dodávány sety s TMT značkama. Miniprasata byla ozářena různými dávkami IZ a rozdělena do 3 radiačních kategorií (H1, H2 a H4) podle tíže akutního radiačního syndromu. Rozdělení jednotlivých vzorků do kategorií je uvedeno v tabulce 2.4. Vzájemně byla porovnávána skupina prasečích vzorků ozařovaných dávkou v rozmezí od 0.6 do 1.2 Gy (H2) a od 2.0 do 2.6 Gy (H4) s kontrolní skupinou neozářených prasátek (H1).

Celkem 90 proteinů bylo v ozářených vzorcích nižšími dávkami (H2) z toho 39 proteinů splnilo zadaná kritéria. Koncentračně snížených proteinů bylo 9 a zvýšených 30. Statistickou hladinu významnosti nesplnil žádný protein. Mezi nejvíce zvýšené kandidáty patřily paraoxonáza, apolipoprotein A-IV, perilipin 5, sekretovaný fosfoprotein 24. Mezi nejvíce snížené kandidáty patřil protein obsahující doménu globin, hemoglobinová podjednotka beta a protein obsahující doménu Ig (tab. 3.11).

Nejvíce byla koncentračně zvýšená **paraoxonáza-1** (PON1). Jedná se o enzym s laktonázovou a esterázovou aktivitou, který rozkládá lipidové peroxidy a má antioxidační účinky (Arenas et al., 2015). PON1 díky své antioxidační funkci reaguje na oxidační stres, zabraňuje apoptóze buněk a poškození vyvolané IZ

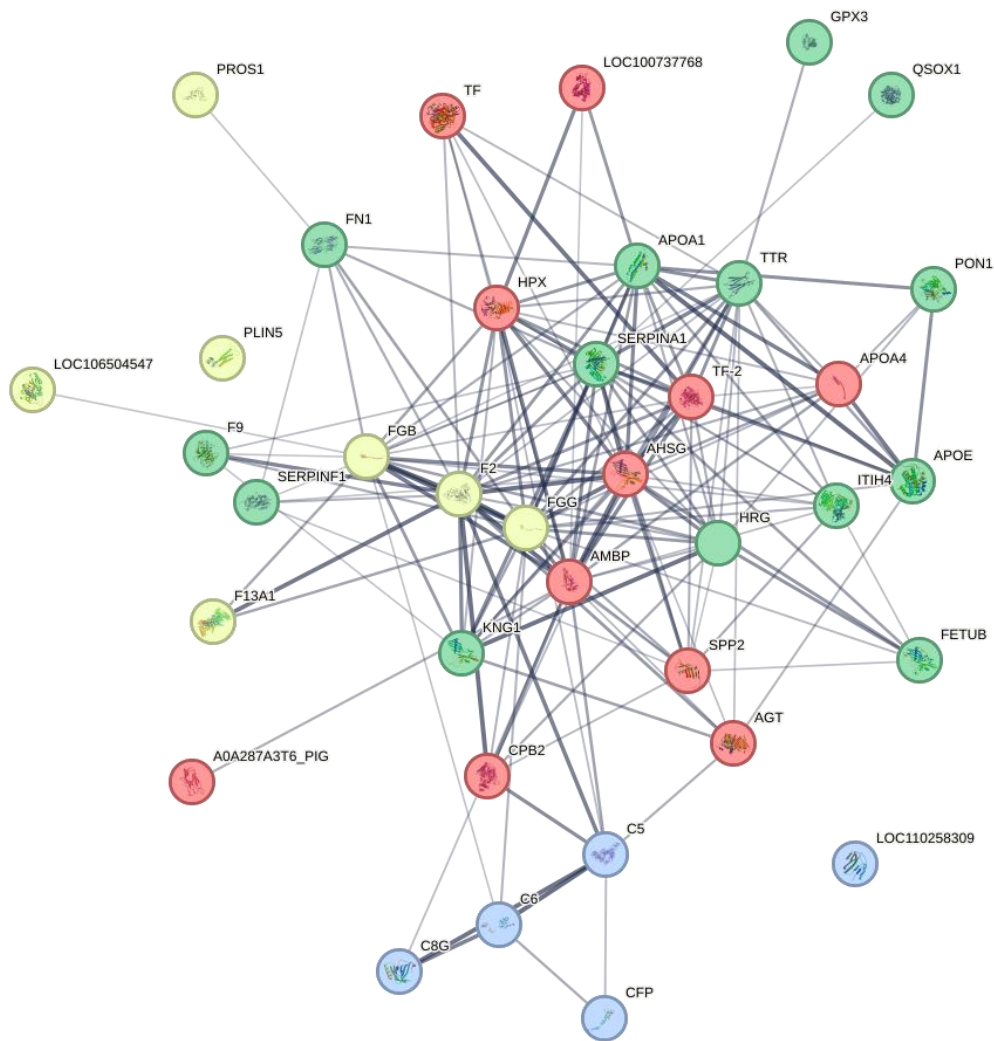
(Arenas et al., 2015; Jasinski and Olszewska-Slonina, 2022). V experimentální studii Krüger a jeho kolektivu byly savčí buňky ozařovány dávkou 7 Gy, což vedlo k navýšení hladiny paraoxonázy 2 až 1,2násobně. Z toho lze usuzovat, že expozice organismu IZ může vést k zvýšení hladiny proteinu PON1 (Krüger et al., 2015). **Apolipoprotein A-IV** (APOA-IV) je hlavní proteinová složka chylomikronů a vysokodenzitních lipoproteinů v plasmě. Je syntetizován ve střevě a vylučován do mezenterické lymfy na chylomikronech. (Deng et al., 2015). Produkce apoA-IV se zvyšuje během příjmu potravy, což podporuje vstřebávání lipidů (Wang et al., 2012). Kromě toho bylo prokázáno, že apoA-IV zabraňuje oxidaci lipidů a potlačuje zánět (Qin et al., 1998). Hraje ústřední roli v transportu a metabolismu lipidů, absorpci a antioxidační aktivitě. V souladu s těmito funkcemi byly popsány nízké plasmatické hladiny apoA-IV u několika populací s ischemickou chorobou srdeční, u pacientů s Crohnovou chorobou a zánětlivým onemocněním GIT (Dieplinger et al., 2009). Přímá souvislost s IZ nebyla prokázána, ale vzhledem k jeho antioxidačním vlastnostem by bylo vhodné se na tento protein v příštích analýzách zaměřit. **Perilipin 5** (Plin5) je jedním z členů rodiny perilipinů, která se podílí na metabolismu lipidů (Dalen et al., 2007). Patří mezi povrchové proteiny lipidových kapiček, které chrání před působením lipáz (Sztalryd and Brasaemle, 2017). Vylučován je především v oxidativních tkáních, včetně srdce, hnědé tukové tkáně, kosterního svalstva a jater (Cusi, 2012). Dalším kandidátem je **sekretovaný fosfoprotein 24**, který byl popsán již na stránce 106.

Mezi prokázaný biomarker dle radiobiologické literatury, jehož hladina v organismu stoupá po expozici IZ je **GPX3**, která byla již popsána na straně 105. Koncentrační zvýšení v plasmě myší exponovaných dávkou 3 Gy bylo zaznamenáno u proteinů **alfa 2-HS glykoprotein** (AHSG), **fetuin B** (FETUB) a **kininogen 1** (KNG1). U těchto proteinů došlo ke koncentračnímu zvýšení i v naší studii (Rithidech et al., 2009).

Mezi kandidáty s koncentračně sníženou hladinou byly **proteiny obsahující globinovou doménu**, jako je myoglobin a hemoglobin. Oba proteiny obsahují hem a jeho prostřednictvím vážou a transportují kyslík (Kanatous and Mammen, 2010). Expozice IZ ovlivňuje nejen strukturu a funkci, ale i celkovou koncentraci hemoglobinu v plasmě. U pacientů, kteří podstupovali radioterapii bylo zaznamenáno snížení hladiny hemoglobinu v krvi i týdny po ozáření (Thomas,

2001). Myoglobin zvyšuje přísun kyslíku do mitochondrií svalových buněk a myokardu a jeho afinita ke kyslíku je oproti hemoglobinu větší (Wittenberg and Wittenberg, 2003). Expozice IZ způsobuje narušení struktury a degradaci polypeptidových řetězců (Lee and Song, 2002). Naše studie potvrdila snížení hladiny **hemoglobinové podjednotky beta** (HBB), ale také proteinů obsahující globinovou doménu. **Imunoglobuliny** (Ig) jsou proteiny, které vznikají v lymfatické tkáni a následně se uvolňují do krevní plasmy, kde plní důležitou roli v imunitní odpovědi organismu. Jejich schopnost specificky vázat určitý antigen představuje základ humorální imunity (Titov et al., 1995). Mezi imunoglobuliny patří IgA, IgD, IgE, IgG, IgM a nejvíce jsou v plasmě zastoupeny IgG, IgA a IgM. Během radioterapie dochází k poklesu jejich hladin v séru a snížený obsah přetrvává i několik týdnů po ozáření (Brown et al., 1976; Lumniczky et al., 2021). U 14 profesně exponovaných pracovníků, kteří byli vystaveni celkové dávce radiace 0,5 až 3 Gy, došlo k největší změně v hladinách u IgA, IgM, IgG a IgE (Rybkina and Azizova, 2016).

Proteiny byly hodnoceny z hlediska jejich biologické funkce a vzájemných interakcí. Identifikováno bylo několik signálních drah vyvolaných zářením, z nichž nejvíce proteinů bylo zapojených do metabolismu lipidů. Další signální dráha obsahovala proteiny účastnící se detoxikace ROS (obr. 3.15).



Obr. 3.15 Vzájemné interakce u vybraných proteinů z prasečí plasmy z analýzy TMT (H2) a jejich uspořádání do 4 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny související s detoxikací ROS. Zelená se podílí na metabolismu lipoproteinů. Modrá označuje proteiny zprostředkující aktivaci komplementové kaskády a žlutá se účastní koagulace a buněčné adheze (www.string-db.org).

Identifikovaných proteinů v ozařovaných vzorcích vyššími dávkami (H4) bylo celkem 109 z toho 16 proteinů splnilo zadaná kritéria. Koncentračně snížených proteinů bylo 5 a zvýšených 11. Statistickou hladinu významnosti $p \leq 0.05$ splnil pouze jediný protein haptoglobin. Mezi nejvíce změněné kandidáty směrem nahoru byly fibronectin, haptoglobin a inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4. Mezi nejvíce snížené kandidáty patřil protein obsahující doménu globin, hemoglobinová podjednotka beta a protein obsahující doménu serpin (tab. 3.12).

Fibronectin (FN1) je klasický buněčný adhezní protein a je považován za hlavního organizátora matrix, protože ukládání a sestavování kolagenů, fibrilínů, fibulinů, trombospondinů a tenascinů závisí na předem sestavené fibronectinové síti (Kaur and Reinhardt, 2015). Při zkoumání citlivosti buněk na ozáření dávkou 4-6 Gy bylo zjištěno, že při zvýšeném fibronectinu dochází k radioprotekci a ke snížení citlivosti buněk k IZ (Cordes et al., 2003). Cytoprotektivní účinek fibronectinu u pacientů byl potvrzen i ve studii Baluna a kolektivu (Baluna et al., 2004). Při lokálním ozařování pacientů s karcinomem plic, žaludku nebo slinivky břišní dávkami od 0.5 Gy po 6 Gy bylo zaznamenáno zvýšení hladiny fibronectinu v plasmě. Inhibice fibronectinu vedla ke snížení adheze buněk a jejich poškození při ozáření (Lee et al., 2014). Dalším identifikovaným proteinem byl **haptoglobin** (HP), který patří mezi antioxidanty a podílí se na regulaci peroxidačních procesů. Jednou z hlavních funkcí HP je vázání hemoglobinu uvolněného z poškozených červených krvinek, čímž zabraňuje ztrátám železa z organismu. Kromě toho se haptoglobin podílí na imunitních reakcích organismu, jak dokazuje studie (Tseng et al., 2004). Při jednorázovém ozáření myši různými dávkami od 1.7 do 9 Gy bylo zjištěno zvýšení hladiny haptoglobinu v séru, které korelovalo s velikostí dávky. V jiné studii bylo množství haptoglobinu v séru menší při frakcionovaných dávkách ozáření než při expozici jednotné dávce (Burger and Knyszynski, 1971). Ve studii Zhou a kolektivu při odběru plasmy první den byla hladina haptoglobinu vyšší než druhý den po ozáření, což lze použít jako molekulární ukazatel pro včasné hodnocení dávky. Hladina haptoglobinu korelovala se vzrůstající dávkou obdrženého IZ (Zhou et al., 2022). **Inter-alfa-trypsin inhibitor těžký řetězec H4** (ITIH4) patří do rodiny inhibitorů, jenž jsou spojovány se zánětem a karcinogenezí (Jiang et al., 2019). ITIH4 je primárně vylučován játry a hraje zásadní roli v infekci vyvolaném zánětu a inhibici sekrece zánětlivých cytokinů (Kobayashi, 2006). Zvýšené hladiny ITIH4 byly detekovány u skotu infikovaném bovinním respiračním syncytiálním virem (Piñeiro et al., 2004). Snížená hladina v séru byla naopak pozorována u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Nízké sérové hladiny s tímto typem karcinomu jsou spojovány s kratším přežitím u pacientů (Noh et al., 2014). Přímá souvislost s IZ nebyla v radiobiologické literatuře nalezena.

Mezi další koncentračně snížené proteiny byly **HBB** a **protein obsahující doménu globin**, jenž byly popsány na straně 110. **Mezi proteiny obsahující doménu serpin**

patří inhibitory serinových proteáz, které regulují a řídí klíčové fyziologické procesy, jako je zánět, koagulace, trombóza, trombolýza a imunitní reakce. Některé z nich působí jako funkční inhibitory aktivity proteáz, jež jsou zodpovědné za proteolýzu. Mezi serpiny patří až 37 proteinů, jako například alfa 1 antitrypsin, antichymotrypsin, antitrombin serpin 2 a další (Kellici et al., 2021). U buněk vykazujících radiorezistenci po expozici ionizujícímu záření (IZ) došlo k navýšení hladiny proteinu serpin 2. Deficit tohoto proteinu z funkčního hlediska způsobuje snížení oprav homologní rekombinace (Zhang et al., 2022). Významné zvýšení inhibitoru serinových proteáz serpin A3K bylo objeveno u celotělově exponovaných myší dávkou 1 Gy a 3 Gy. Zatímco angiotenzinogen (serpin A8) byl u myší snížen (Yamaguchi et al., 2022). Dle radiobiologické literatury lze konstatovat, že hladina jednotlivých serpinů reaguje na IZ odlišně.

Proteiny byly hodnoceny z hlediska jejich biologické funkce a vzájemných interakcí. Identifikovány byly tři signální dráhy, z nichž nejvíce proteinů se účastní transportu kyslíku a zánětlivých reakcí. Další signální dráha obsahovala proteiny, které se podílí na aktivaci komplementové kaskády a koagulaci. Poslední dráha byla tvořena jediným proteinem adiponektinem, jenž se podílí na protizánětlivých účincích (obr. 3.16).



Obr. 3.16 Vzájemné interakce u vybraných proteinů z prasečí plasmy z analýzy TMT (H4) a jejich uspořádání do 3 klastrů. Červená skupina obsahuje proteiny související se zánětlivou reakcí a transportem kyslíku. Zelená se podílí na aktivaci komplementové kaskády a koagulaci. Modrá označuje adiponektin, který má protizánětlivé účinky (www.string-db.org).

Při hledání biomarkerů ozáření v krevní plasmě byla studie rozšířena o proteinové biomarkery vztažené k obdržené dávce a tíži akutního radiačního syndromu. Ve skupině H2 podle splněných kritérií byly nejvíce koncentračně zvýšeny PON1, PLIN5 a APO4. Zmíněné proteiny se dle radiobiologické literatury účastní metabolismu proteinů a antioxidační aktivity. Ve skupině H4 byl nejvíce koncentračně změněn HP, který má antioxidační účinky a hraje roli v imunitní odpovědi. U proteinu obsahující doménu globin a u hemoglobinové podjednotky došlo k největšímu koncentračnímu snížení u obou skupiny H2 i H4. Oba proteiny se účastní na přenosu kyslíku a imunitní odpovědi. Stejná detekce proteinů u exponovaných prasat s rozdílnými dávkami mohla být způsobena malým rozdílem mezi stanovenými expozicemi. Respektive došlo ke stejné odezvě při expozici dávkou od 0.6 do 1.2 Gy (H2) a od 2.0 do 2.6 Gy (H4). Při celotělovém ozáření dávkou od 2 do 6 Gy nastává dřeňová forma u akutní nemoci z ozáření, která se projevuje

poklesem prekurzorů krevních buněk (Garau et al., 2011). Vzhledem k tomu, že oba proteiny jsou součástí krevních buněk jejich pokles mohl být právě způsoben vlivem IZ. Odstupňovanost ve stanovených dávkách nebyla výrazná, proto nejspíš nedošlo k velkému rozdílu u vybraných detekovaných proteinů. Mezi proteiny se stejnou tendencí navýšení nebo snížení hladiny byly fibronektin, fibrinogen beta a inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce, které by mohly být vhodnými biomarkery ozáření u prasat bez rozdílu obdržené dávky.

Při vyhodnocení výsledků nebyla u většiny proteinů splněna statistická hladina významnosti. I přes tento neúspěch jsou vybraní kandidáti z pohledu radiobiologické literatury velmi slibní. V našem případě statisticky nevýznamná p hodnota mohla vzniknout neadekvátně navrženou studií v statistickém programu nebo malým počtem proteinů v navržené studii, které mají vliv na výslednou hodnotu.

Při zhodnocení všech identifikovaných proteinů z obou použitých metod (label-free, TMT) a referencí z radiobiologické literatury byl vytvořen top seznam potenciálních kandidátů (tab. 3.13). Mezi zmíněnými slibnými kandidáty v radiobiologické literatuře byly sekretovaný fosfoprotein 24, glutation peroxidáza a fibronektin.

Označení	Název	Uniprot kód
1	sekretovaný fosfoprotein 24	Q711S8
2	glutation peroxidáza	A0A287AIJ3
3	fibronektin	F1SS24
4	inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	A0A286ZT99
5	protein AMBP	P04366
6	apolipoprotein E	P18650
7	hemoglobinová podjednotka beta	A0A5G2QRW3
8	komplement C8	A0A287AFQ4
9	alfa 2HS glykoprotein	P29700
10	fetuin B	F1SS24
11	haptoglobin	Q8SPS7
12	kininogen 1	A0A5G2QZH2
13	paraoxonáza	A0A287AWR7
14	protein vaskulární buněčné adheze	F1S567
	reference v radiobiologické literatuře a detekce label-free + TMT	
	detekce label-free + TMT	
	reference v radiobiologické literatuře a detekce label-free nebo TMT	

Tab. 3.13 Přehled ozáření indukovaných proteinů v prasečí plasmě podle referencí z radiobiologické literatury, a identifikovaných metodou label free a TMT.

Při porovnávání jednotlivých kandidátů z metod LFQ a skupin H2 a H4 byly hodnoty rozdílné zejména u skupiny H4. Jednalo se o SPP2, GPX3, APOE, AHSG, HP, KNG1 a PON1 (tab 3.14 a 3.15). Takto odlišné hodnoty mohly nastat v případě nekompletního naznačení vzorků pomocí TMT značek.

3.5 Zhodnocení biomarkerů ozáření u prasečí a lidské plasmy

Při zhodnocení biomarkerů ozáření v lidské a prasečí plasmě byla zjištěna shoda u tří kandidátů: LYZ, HBB a PRDX1. LYZ byl koncentračně snížen ve všech metodách u obou typech plasmy. HBB u prasečí i lidské plasmy byla ve všech metodách koncentračně snížena až na jednu výjimku. Po vystavení organismu IZ i nižším dávkám dochází ke snížení hladiny podjednotek v plasmě. Již od 1 Gy dochází k dřevné formě akutního radiačního syndromu, kde dochází k poškození krevních tělísek včetně erytrocytů. Vzhledem k tomu, že se jedná o nejadernou buňku, tak nemůže sama syntetizovat proteiny, proto se vyvinula řada antioxidantních enzymů, jako je CAT, GPX3 a peroxiredoxiny, které je chrání před oxidačním poškozením a udržují jejich fyziologické funkce během erythropoézy (Stuhlmeier et al., 2003). V naší studii byl potvrzen výskyt a koncentrační změna u všech zmíněných proteinů. Posledním byl PRDX1, u kterého došlo v případě lidské plasmy ke koncentračnímu zvýšení, ale u prasečí plasmy ke koncentračnímu snížení. Tato opačná tendence mohla být způsobena testováním plasmy ze dvou různých organismů. I přesto, že se jedná o příbuzné savčí modely mají jisté odchylky v proteomu. Ovšem dle radiobiologické literatury dochází u PRDX1 v prasečí plasmě po ozáření k navýšení hladiny (Flohé and Harris, 2007). Z tohoto důvodu je pravděpodobné, že v naší studii došlo k chybě. Pro lepší zhodnocení by chtělo provést analýzu znovu na dalších vzorcích.

Finální kandidáti z prasečí plasmy byli porovnání s lidskými proteiny. U většiny proteinů z prasečích vzorků došlo ke změně koncentrační hladiny, oproti tomu u lidských proteinů ke změně nedošlo. Zejména se jednalo o GPX3, FN1, ITIH4, AMBP, APOE, C8G, AHSG, FETUB, HP, KNG1 a VCAM1. Protein PON1 u lidské plasmy nebyl vůbec detekován. U SPP2 došlo k většímu zvýšení v porovnání s lidskou plasmou (tab 3.14). Statistická hladina významnosti $p \leq 0.05$ byla splněna jen v případě analýzy z LFQ z čehož lze usuzovat, že značení nejspíš neproběhlo v pořádku (tab 3.15).

Při porovnání finálních kandidátů z lidské plasmy se stejnými proteiny z prasečí plasmy bylo zjištěno, že u vzorků z lidské plasmy, kde dochází ke koncentračnímu zvýšení, tak u prasečích vzorků ke změně nedochází. Jedná se zejména o proteiny CRP, PROC a APOB100. Proteiny MBL, PLPT a IGFBP6 v prasečí plasmě nebyly nalezeny. APOF, LYZ, LBP AMY1, SERPINA4, FCN3, CTBS byly detekovány v prasečí plasmě pouze u metody LFQ. V případě TMT značení zřejmě nedošlo ke správnému navázání značek, a tak nebyly detekovány. V případě proteinů APOF a AMY1A byl zaznamenán opačný směr koncentrační změny. U C5 a ADIPOQ byly hodnoty relativních poměrů u jednotlivých metod rozdílné, proto nelze s jistotou konstatovat, k jaké změně dochází po působení IZ (tab. 3.16 a 3.17).

U některých proteinů jako například SAA, IGFBP2 a BLVRB došlo k opačnému zjištění, než uvádí radiobiologická literatura. Mohlo to být způsobené větší variabilitou vzorků, či testováním většího množství proteinů. Pro ověření by bylo vhodné provést další testy.

4 Závěr

IZ je tok hmotných částic nebo fotonů elektromagnetického záření, které ionizují atomy prostředí jímž procházejí (Havránková, 2020). Expozice organismu IZ vyvolává kaskádu na sebe navazujících opravných reakcí, které mohou vést k buněčné smrti, senescenci, karcinogenezi a poškození celého organismu. Radiační poškození zahrnuje morfologické a funkční změny a míra poškození souvisí s celkovou dávkou ozáření, časovým intervalem a objemem ozářených tkání (Ryan, 2012). Vystavení se malým dávkám IZ je bezbolestný proces, čímž vzniká velké riziko. Při radiačních událostech či nehodách, jejichž tendence možného výskytu objektivně stoupá, je očekáván velký počet suspektně ozářených osob, pro jejichž správnou terapii je klíčový údaj o obdržené dávce. Současné techniky biologické dozimetrie jsou stále závislé na zlatém standardu, tj. na analýze dicentrických chromozomů (DCA), která se používá ke stanovení dávky záření. Ačkoli je DCA spolehlivá a reprodukovatelná, je také časově náročná a velmi pracná, a proto není uspokojivá pro události zahrnující hromadné nehody. V těchto případech jsou zapotřebí rychlé testy. Jedno z možných řešení nabízí využití analytických možností metod hmotnostní spektrometrie u proteinů krevní plasmy, jejíž získání je minimálně invazivní. Cílem této práce bylo shrnutí účinků IZ, využití MS v proteomice a identifikování nových potenciálních biomarkerů v lidské plasmě, které by reagovaly na expozici organismu IZ.

Používání biomarkerů při hodnocení a diagnostice patologickofyziologických stavů jakožto indikátorů různých onemocnění se v lékařské medicíně používá delší dobu. I přes mnohaletou historii je toto téma v současné době velmi diskutovatelné. Důraz na specifitu požadovaných vlastností a charakteristiku biomarkerů je čím dál tím více rázný. Časová náročnost, reprodukovatelnost, senzitivita patří mezi hlavní požadavky k výběru vhodných biomarkerů daného onemocnění. Najít takový biomarker, který by splňoval všechna zadaná kritéria včetně jednoduché aplikovatelnosti je poměrně náročné. Existuje řada molekul (metabolity, proteiny, geny), které se dají v různém biologickém materiálu detekovat. V klinické praxi pro jednoduchost odběru je nejčastěji využívána krev, plasma, sérum a moč. Pro predikci účinků IZ se zdá být ideální použití plasmatických proteinů. Proteiny jako vhodné biomarkery různých onemocnění a jsou popisovány v mnoha publikacích (Boccellino et al., 2019; Wang et al., 2018). Aktuálně existují proteiny, které byly

studovány v rámci ozařování zvířecích modelů, jejichž hladiny se po expozici IZ mění. Při výběru kandidátů hraje určitou roli i použitá metoda při, které jsou definované látky detekovány. V minulosti bylo v lékařském odvětví aplikována metoda založená na detekci protilátek, ale její časová a finanční náročnost byla v klinické praxi velmi problematická. Své uplatnění v detekci proteinů z plasmy našla vysoce rozlišovací hmotnostní spektrometrie především založená na cílené kvantifikaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Proteiny jsou velmi slibné molekuly, které se podílí na fenotypu a poskytují přímé informace o biologických drahách, které se podílí na mnoha fyziologických a patologických změnách v organismu (Geyer et al., 2017). Jak již bylo zmíněno jejich hladina se mění v rámci denního cyklu, na stavu organismu a onemocnění. Při výběru biomarkerů ve vzorcích plasmy byly do studie zahrnuty všechny možné faktory, které by se podíleli na změně stavu plasmatických proteinů a nebyly spjaty s účinky IZ.

V první kapitole teoretické části byl popsán charakter IZ a jednotlivé typy s ohledem na částice a druh ionizačního procesu. Dále bylo v této studii pojednáno o působení IZ na živý organismus. Princip projevů stochastickým a deterministickým účinkům včetně jednotlivých fází akutní nemoci ozáření dle absorbované dávky. Vznik a působení reaktivních forem kyslíku a působení jednotlivých drah v organismu při expozici IZ.

Další kapitola pojednávala o biomarkrech ozáření se zaměřením na metabolomiku, genomiku a nejvíce rozebrána byla proteomika. Poslední kapitola pojednávala o hmotnostní spektrometrii, částech MS a uplatnění jednotlivých typů v současné praxi. Využití kvantifikačních metod se zaměřením na cílovou proteomickou analýzu.

Experimentální část byla zaměřena na detekci a identifikaci biomarkerů ozáření v lidské plasmě. Na základě publikované práce o biomarkrech ozáření byly vybrány kandidáti, jejichž seznam byl doplněn o další kandidáty nalezených pomocí srovnávacích proteomických experimentů. Pro rozšíření panelu kandidátních proteinů byla do studie zahrnuta i detekce biomarkerů v prasečí plasmě.

Celkem bylo vybráno 20 biomarkerů z lidské plasmy a 14 biomarkerů z prasečí plasmy. Za slibné kandidáty z lidské plasmy byly vybráni zejména AMY1A, CRP,

CTBS, C5, PLPT, PRDX1, LBP, LYZ a IGFBP6, které byly detekovány metodou TMT i LFQ a navíc byly zmíněny i v radiobiologické literatuře.

Za perspektivní kandidáty z prasečí plasmy, které byly detekovány pomocí obou metod byly vybrány GPX3, SPP2 a FN1. I když statistická hladina významnosti nebyla splněna, tak z pohledu radiobiologické literatury se jedná o velmi slibné kandidáty. Při porovnávání dvou skupin rozdílně ozářených prasat byla nejvíce koncentračně snížená skupina proteinů obsahující globin a HBB, ale jejich rozdíl v hladinách nebyl výrazný. Nejvíce koncentračně zvýšené proteiny u skupiny H2 byly APO4A, PON1 a PLIN5, u skupiny H4 to byl HP.

Mezi navrhované společné proteiny u prasečí a lidské plasmy u kterých došlo ke výraznější koncentrační změně byly PRDX1, C5, LYS a HBB.

Během řešení této práce byla získána přínosná data, která by mohla posloužit k další studii na více vzorcích. Pokračování v práci zaměřené na biomarkery ozáření zejména v lidské plasmě by mohly přispět k rozšíření dosavadních poznatků o obdržené dávce.

5 Použitá literatura

- Abbatiello, S.E., Schilling, B., Mani, D.R., Zimmerman, L.J., Hall, S.C., MacLean, B., Albertolle, M., Allen, S., Burgess, M., Cusack, M.P., Gosh, M., Hedrick, V., Held, J.M., Inerowicz, H.D., Jackson, A., Keshishian, H., Kinsinger, C.R., Lyssand, J., Makowski, L., Mesri, M., Rodriguez, H., Rudnick, P., Sadowski, P., Sedransk, N., Shaddox, K., Skates, S.J., Kuhn, E., Smith, D., Whiteaker, J.R., Whitwell, C., Zhang, S., Borchers, C.H., Fisher, S.J., Gibson, B.W., Liebler, D.C., MacCoss, M.J., Neubert, T.A., Paulovich, A.G., Regnier, F.E., Tempst, P., Carr, S.A., 2015. Large-Scale Interlaboratory Study to Develop, Analytically Validate and Apply Highly Multiplexed, Quantitative Peptide Assays to Measure Cancer-Relevant Proteins in Plasma. *Mol Cell Proteomics* 14, 2357–2374. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.047050>
- Agarwal, P., Goyal, A., 2017. A review on analyzers for mass spectrometry. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* Volume 8 Issue 4. <https://doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.4.p139-151>
- Al Kayal, T., Panetta, D., Canciani, B., Losi, P., Tripodi, M., Burchielli, S., Ottoni, P., Salvadori, P.A., Soldani, G., 2015. Evaluation of the effect of a gamma irradiated DBM-pluronic F127 composite on bone regeneration in Wistar rat. *PLoS One* 10, e0125110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125110>
- Ali Khan, H., Mutus, B., 2014. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. *Front Chem* 2, 70. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00070>
- Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, A.J., 2000. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 154, 342–346. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2000\)154\[0342:iopmbi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2000)154[0342:iopmbi]2.0.co;2)
- Amundson, S.A., Grace, M.B., McLeland, C.B., Epperly, M.W., Yeager, A., Zhan, Q., Greenberger, J.S., Fornace, A.J., 2004. Human in vivo radiation-induced biomarkers: gene expression changes in radiotherapy patients. *Cancer Res.* 64, 6368–6371. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1883>
- Anand, S., Samuel, M., Ang, C.-S., Keerthikumar, S., Mathivanan, S., 2017. Label-Based and Label-Free Strategies for Protein Quantitation, in: Keerthikumar, S., Mathivanan, S. (Eds.), *Proteome Bioinformatics, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 31–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6740-7_4
- Andrade, F.J., Shelley, J.T., Wetzel, W.C., Webb, M.R., Gamez, G., Ray, S.J., Hieftje, G.M., 2008. Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source. 1. Ionization of Compounds in the Gas Phase. *Anal. Chem.* 80, 2646–2653. <https://doi.org/10.1021/ac800156y>
- Andrews, G.L., Simons, B.L., Young, J.B., Hawkridge, A.M., Muddiman, D.C., 2011. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal. Chem.* 83, 5442–5446. <https://doi.org/10.1021/ac200812d>
- Arenas, M., García-Heredia, A., Gascon, M., Marti, S.S., Pla, M.R., Robles, F., Ávila, P.E. de, Rochina, P., Riu, F., Joven, J., Camps, J., 2015. Paraoxonase-1 Activity and Concentration After Radiation Therapy Treatment in Patients With Breast Cancer: Can Be a Useful Marker to Predict the Radiation Therapy Toxicity and Breast Cancer Prognosis? *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 93, E517. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2015.07.1870>
- Aronson, J.K., Ferner, R.E., 2017. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol* 76, 9.23.1-9.23.17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>
- Averbeck, D., 2010. Non-targeted effects as a paradigm breaking evidence. *Mutat Res* 687, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.004>

- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.-P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters, Special Issue: Oxidative Stress-Based Cancer Biomarkers* 327, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.012>
- Bacarella, N., Ruggiero, A., Davis, A.T., Uberseder, B., Davis, M.A., Bracy, D.P., Wasserman, D.H., Cline, J.M., Sherrill, C., Kavanagh, K., 2020. Whole Body Irradiation Induces Diabetes and Adipose Insulin Resistance in Nonhuman Primates. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics* 106, 878–886. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.11.034>
- Baluna, R., Fuller, C.D., Eng, T.Y., Thomas, C.R., 2004. Plasma fibronectin levels in cancer patients undergoing radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 60, S375–S376. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.07.230>
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., Kuster, B., 2007. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017–1031. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>
- Barañano, D.E., Rao, M., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 2002. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16093–16098. <https://doi.org/10.1073/pnas.252626999>
- Barber, R.C., Dubrova, Y.E., 2006. The offspring of irradiated parents, are they stable? *Mutat. Res.* 598, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.01.009>
- Baverstock, K., 2008. Implications of New Radiobiological Insights for the Long Term Management of High Level Radioactive Waste. *Energy & Environment* 19, 497–514. <https://doi.org/10.1260/095830508784641381>
- Baverstock, K., Belyakov, O.V., 2005. Classical radiation biology, the bystander effect and paradigms: a reply. *Hum Exp Toxicol* 24, 537–542. <https://doi.org/10.1191/0960327105ht562oa>
- Becciolini, A., Giannardi, G., Cionini, L., Porciani, S., Fallai, C., Pirtoli, L., 1984. Plasma amylase activity as a biochemical indicator of radiation injury to salivary glands. *Acta Radiol Oncol* 23, 9–14. <https://doi.org/10.3109/02841868409135978>
- Bellei, E., Bergamini, S., Monari, E., Fantoni, L.I., Cuoghi, A., Ozben, T., Tomasi, A., 2011. High-abundance proteins depletion for serum proteomic analysis: concomitant removal of non-targeted proteins. *Amino Acids* 40, 145–156. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0628-x>
- Bennett, C.S., Khorram Khorshid, H.R., Alexandra Kitchen, J., Arteta, D., Dalgleish, R., 2004. Characterization of the human secreted phosphoprotein 24 gene (SPP2) and comparison of the protein sequence in nine species. *Matrix Biology* 22, 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2003.12.001>
- Berger, M.E., Christensen, D.M., Lowry, P.C., Jones, O.W., Wiley, A.L., 2006. Medical management of radiation injuries: current approaches. *Occup Med (Lond)* 56, 162–172. <https://doi.org/10.1093/occmed/kql011>
- Berkeland, D.J., Miller, J.D., Bergquist, J.C., Itano, W.M., Wineland, D.J., 1998. Minimization of ion micromotion in a Paul trap. *Journal of Applied Physics* 83, 5025–5033. <https://doi.org/10.1063/1.367318>
- Beuhler, R.J., Flanigan, E., Greene, L.J., Friedman, L., 1974. Proton transfer mass spectrometry of peptides. Rapid heating technique for underivatized peptides containing arginine. *J. Am. Chem. Soc.* 96, 3990–3999. <https://doi.org/10.1021/ja00819a043>
- Biomarkers Definitions Working Group., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>
- Blakely, E.A., 2000. Biological Effects of Cosmic Radiation: Deterministic and Stochastic: *Health Physics* 79, 495–506. <https://doi.org/10.1097/00004032-200011000-00006>
- Blakely, W.F., Ossetrova, N.I., Manglapus, G.L., Salter, C.A., Levine, I.H., Jackson, W.E., Grace, M.B., Prasanna, P.G.S., Sandgren, D.J., Ledney, G.D., 2007. Amylase and blood cell-count hematological radiation-injury biomarkers in a rhesus monkey radiation model—use of

- multiparameter and integrated biological dosimetry. *Radiation Measurements, Proceedings of the 7th International Symposium on EPR Dosimetry and Applications and the 2nd International Conference on Biodosimetry* 42, 1164–1170. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2007.05.013>
- Boccellino, M., Pinto, F., Ieluzzi, V., Giovane, A., Quagliuolo, L., Fariello, C., Coppola, M., Carlucci, A., Santini, M., Ferati, K., Bexheti-Ferati, A., Giordano, A., Di Domenico, M., 2019. Proteomics analysis of human serum of patients with non-small-cell lung cancer reveals proteins as diagnostic biomarker candidates. *Journal of Cellular Physiology* 234, 23798–23806. <https://doi.org/10.1002/jcp.28948>
- Boice, J.D., 2012. Radiation epidemiology: a perspective on Fukushima. *J Radiol Prot* 32, N33-40. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/32/1/N33>
- Brochmann, E.J., Behnam, K., Murray, S.S., 2009. Bone morphogenetic protein–2 activity is regulated by secreted phosphoprotein–24 kd, an extracellular pseudoreceptor, the gene for which maps to a region of the human genome important for bone quality. *Metabolism* 58, 644–650. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.01.001>
- Brook, I., Walker, R.I., MacVittie, T.J., 1988. Effect of antimicrobial therapy on bowel flora and bacterial infection in irradiated mice. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 53, 709–716. <https://doi.org/10.1080/09553008814551081>
- Brown, L.R., Dreizen, S., Rider, L.J., Johnston, D.A., 1976. The effect of radiation-induced xerostomia on saliva and serum lysozyme and immunoglobulin levels. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 41, 83–92. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(76\)90255-3](https://doi.org/10.1016/0030-4220(76)90255-3)
- Brown, R., Stretch, A., Thacker, J., 1986. The nature of mutants induced by ionizing radiation in cultured hamster cells: II. Antigenic response and reverse mutation of HPRT-deficient mutants induced by γ -rays or ethyl methanesulphonate. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 160, 111–120. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(86\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0027-5107(86)90035-7)
- Bruins, A.P., 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 794, 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2)
- Bucknall, M., Fung, K.Y.C., Duncan, M.W., 2002. Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13, 1015–1027. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(02\)00426-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(02)00426-9)
- Budworth, H., Snijders, A.M., Marchetti, F., Mannion, B., Bhatnagar, S., Kwoh, E., Tan, Y., Wang, S.X., Blakely, W.F., Coleman, M., Peterson, L., Wyrobek, A.J., 2012. DNA repair and cell cycle biomarkers of radiation exposure and inflammation stress in human blood. *PLoS ONE* 7, e48619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048619>
- Burger, M., Knyszynski, A., 1971. Haptoglobin and Irradiation in Mice. *Radiation Research* 46, 613–620. <https://doi.org/10.2307/3573438>
- Cain, T.C., Lubman, D.M., Weber, W.J., Vertes, A., 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 1026–1030. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290081224>
- Cengiz, M., Akbulut, S., Atahan, I.L., Grigsby, P.W., 2001. Acute phase response during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49, 1093–1096. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(00\)01426-7](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(00)01426-7)
- Chalubinska-Fendler, J., Fendler, W., Spych, M., Wyka, K., Luniewska-Bury, J., Fijuth, J., 2016. Lipopolysaccharide-binding protein is efficient in biodosimetry during radiotherapy of lung cancer. *Biomed Rep* 5, 450–454. <https://doi.org/10.3892/br.2016.739>
- Chalubinska-Fendler, J., Graczyk, L., Piotrowski, G., Wyka, K., Nowicka, Z., Tomasik, B., Fijuth, J., Kozono, D., Fendler, W., 2019. Lipopolysaccharide-Binding Protein Is an Early Biomarker of Cardiac Function After Radiation Therapy for Breast Cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* 104, 1074–1083. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2019.04.002>

- Chao, N.J., 2007. Accidental or intentional exposure to ionizing radiation: biodosimetry and treatment options. *Exp. Hematol.* 35, 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.01.008>
- Cheema, A.K., Li, Y., Moulton, J., Girgis, M., Wise, S.Y., Carpenter, A., Fatanmi, O.O., Singh, V.K., 2022. Identification of Novel Biomarkers for Acute Radiation Injury Using Multiomics Approach and Nonhuman Primate Model. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 114, 310–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2022.05.046>
- Chen, E.I., Yates, J.R., 2007. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Molecular Oncology* 1, 144–159. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.05.001>
- Chen, J.-J., Gao, Y., Tian, Q., Liang, Y.-M., Yang, L., 2014. Platelet factor 4 protects bone marrow mesenchymal stem cells from acute radiation injury. *Br J Radiol* 87, 20140184. <https://doi.org/10.1259/bjr.20140184>
- Chen, X., Wang, Z., Wong, Y.-L.E., Wu, R., Zhang, F., Chan, T.-W.D., 2018. Electron-ion reaction-based dissociation: A powerful ion activation method for the elucidation of natural product structures. *Mass Spectrom Rev* 37, 793–810. <https://doi.org/10.1002/mas.21563>
- Chiang, W.L., Chu, S.C., Yang, S.S., Li, M.C., Lai, J.C., Yang, S.F., Chiou, H.L., Hsieh, Y.S., 2002. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 188, 199–205. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(02\)00078-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(02)00078-2)
- Chidgey, M., 2002. Desmosomes and disease: an update. *Histol Histopathol* 17, 1179–1192. <https://doi.org/10.14670/HH-17.1179>
- Choi, D.-K., Li, Z.J., Chang, I.-K., Yeo, M.-K., Kim, J.-M., Sohn, K.-C., Im, M., Seo, Y.-J., Lee, J.-H., Kim, C.-D., Lee, Y., 2014. Clinicopathological roles of S100A8 and S100A9 in cutaneous squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *Arch Dermatol Res* 306, 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1453-y>
- Choi, J.H., Shin, N.R., Moon, H.J., Kwon, C.H., Kim, G.H., Song, G.A., Jeon, T.Y., Kim, Dae Hwan, Kim, Dong Hun, Park, D.Y., 2012. Identification of S100A8 and S100A9 as negative regulators for lymph node metastasis of gastric adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 27, 1439–1448. <https://doi.org/10.14670/HH-27.1439>
- Clarke, W., 2017. Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls, in: Nair, H., Clarke, William (Eds.), *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*. Academic Press, San Diego, pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800871-3.00001-8>
- Collard, C.D., Montalto, M.C., Reenstra, W.R., Buras, J.A., Stahl, G.L., 2001. Endothelial Oxidative Stress Activates the Lectin Complement Pathway: Role of Cytokeratin 1. *The American Journal of Pathology* 159, 1045–1054. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61779-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61779-8)
- Cordes, N., Blaese, M.A., Plasswilm, L., Rodemann, H.P., Van Beuningen, D., 2003. Fibronectin and laminin increase resistance to ionizing radiation and the cytotoxic drug Ukrain® in human tumour and normal cells in vitro. *International Journal of Radiation Biology* 79, 709–720. <https://doi.org/10.1080/09553000310001610240>
- Cotte-Rodríguez, I., Cooks, R.G., 2006. Non-proximate detection of explosives and chemical warfare agent simulants by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Commun.* 2968–2970. <https://doi.org/10.1039/B606020J>
- Council, N.R., Studies, D. on E. and L., Research, B. on R.E., Radiation, C. to A.H.R. from E. to L.L. of I., 2006. *Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase 2*. National Academies Press.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., Mann, M., 2014. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13, 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>

- Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Cruz-Becerra, G., Kadonaga, J.T., 2020. Enhancement of homology-directed repair with chromatin donor templates in cells. *eLife* 9, e55780. <https://doi.org/10.7554/eLife.55780>
- Cusi, K., 2012. Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* 142, 711–725.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.003>
- Dainiak, N., 2002. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. *Exp Hematol* 30, 513–528. [https://doi.org/10.1016/s0301-472x\(02\)00802-0](https://doi.org/10.1016/s0301-472x(02)00802-0)
- Dalen, K.T., Dahl, T., Holter, E., Arntsen, B., Londos, C., Sztalryd, C., Nebb, H.I., 2007. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. *Biochim Biophys Acta* 1771, 210–227. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.11.011>
- Dasika, G.K., Lin, S.-C.J., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., Lee, E.Y.-H.P., 1999. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18, 7883–7899. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203283>
- Dayon, L., Pasquarello, C., Hoogland, C., Sanchez, J.-C., Scherl, A., 2010. Combining low- and high-energy tandem mass spectra for optimized peptide quantification with isobaric tags. *Journal of Proteomics* 73, 769–777. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.10.015>
- de Lemos Pinto, M.M.P., Santos, N.F.G., Amaral, A., 2010. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Radiat Environ Biophys* 49, 567–581. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0311-3>
- De Oliveira, G.C., Maia, G.A.S., Cortes, V.F., De Lima Santos, H., Moreira, L.M., Barbosa, L.A., 2013. The effect of γ -radiation on the hemoglobin of stored red blood cells: the involvement of oxidative stress in hemoglobin conformation. *Ann Hematol* 92, 899–906. <https://doi.org/10.1007/s00277-013-1719-z>
- Deng, X., Walker, R.G., Morris, J., Davidson, W.S., Thompson, T.B., 2015. Role of Conserved Proline Residues in Human Apolipoprotein A-IV Structure and Function *. *Journal of Biological Chemistry* 290, 10689–10702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637058>
- Desrosiers, M.F., Puhl, J.M., Cooper, S.L., 2008. An Absorbed-Dose/Dose-Rate Dependence for the Alanine-EPR Dosimetry System and Its Implications in High-Dose Ionizing Radiation Metrology. *J Res Natl Inst Stand Technol* 113, 79–95. <https://doi.org/10.6028/jres.113.007>
- Dessing, M.C., Tamaro, A., Pulskens, W.P., Teske, G.J., Butter, L.M., Claessen, N., van Eijk, M., van der Poll, T., Vogl, T., Roth, J., Florquin, S., Leemans, J.C., 2015. The calcium-binding protein complex S100A8/A9 has a crucial role in controlling macrophage-mediated renal repair following ischemia/reperfusion. *Kidney International* 87, 85–94. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.216>
- Dieplinger, H., Ankerst, D.P., Burges, A., Lenhard, M., Lingenhel, A., Fineder, L., Buchner, H., Stieber, P., 2009. Afamin and Apolipoprotein A-IV: Novel Protein Markers for Ovarian Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 18, 1127–1133. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0653>
- Diet, A., Abbas, K., Bouton, C., Guillon, B., Tomasello, F., Fourquet, S., Toledano, M.B., Drapier, J.-C., 2007. Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages. *J Biol Chem* 282, 36199–36205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706420200>
- Ding, Q., Yang, L., Dinarvand, P., Wang, X., Rezaie, A.R., 2015. Protein C Thr315Ala variant results in gain of function but manifests as type II deficiency in diagnostic assays. *Blood* 125, 2428–2434. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-617274>
- DiNicolantonio, J.J., Bhutani, J., O'Keefe, J.H., 2015. The health benefits of vitamin K. *Open Heart* 2, e000300. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2015-000300>

- Domené, H.M., Hwa, V., Jasper, H.G., Rosenfeld, R.G., 2011. Acid-labile subunit (ALS) deficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Genetics of Growth* 25, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.010>
- Domon, B., 2006. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* 312, 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Donato, R., Sorci, G., Giambanco, I., 2017. S100A6 protein: functional roles. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 2749–2760. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2526-9>
- Donnelly, E.H., Nemhauser, J.B., Smith, J.M., Kazzi, Z.N., Farfán, E.B., Chang, A.S., Naeem, S.F., 2010. Acute radiation syndrome: assessment and management. *South. Med. J.* 103, 541–546. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181ddd571>
- Dörr, H., Meineke, V., 2011. Acute radiation syndrome caused by accidental radiation exposure - therapeutic principles. *BMC Med* 9, 126. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-126>
- Dörr, W., Hendry, J.H., 2001. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 61, 223–231. [https://doi.org/10.1016/s0167-8140\(01\)00429-7](https://doi.org/10.1016/s0167-8140(01)00429-7)
- Douglas, D.J., 2009. Linear quadrupoles in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 937–960. <https://doi.org/10.1002/mas.20249>
- Dreisewerd, K., 2003. The Desorption Process in MALDI. *Chem. Rev.* 103, 395–426. <https://doi.org/10.1021/cr010375i>
- Duan, L., Wu, R., Ye, L., Wang, H., Yang, X., Zhang, Yunyuan, Chen, X., Zuo, G., Zhang, Yan, Weng, Y., Luo, J., Tang, M., Shi, Q., He, T., Zhou, L., 2013. S100A8 and S100A9 are associated with colorectal carcinoma progression and contribute to colorectal carcinoma cell survival and migration via Wnt/ β -catenin pathway. *PLoS One* 8, e62092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062092>
- Dunn, W.B., Bailey, N.J.C., Johnson, H.E., 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* 130, 606–625. <https://doi.org/10.1039/b418288j>
- Dupuy, A.M., Terrier, N., Sénécal, L., Morena, M., Leray, H., Canaud, B., Cristol, J.P., 2003. [Is C-reactive protein a marker of inflammation?]. *Nephrologie* 24, 337–341.
- Dutrillaux, B., 1997. Ionizing radiation induced malignancies in man. *Radioprotection* 32, 431–440.
- Edwards, A.A., Lloyd, D.C., 1998. Risks from ionising radiation: deterministic effects. *J Radiol Prot* 18, 175–183. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/18/3/004>
- Edwards, A.M., Ruiz, M., Silva, E., Lissi, E., 2002. Lysozyme modification by the fenton reaction and gamma radiation. *Free Radic Res* 36, 277–284. <https://doi.org/10.1080/10715760290019291>
- El-Gedaily, A., Schoedon, G., Schneemann, M., Schaffner, A., 2004. Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 75, 495–503. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603288>
- Elliott, M.H., Smith, D.S., Parker, C.E., Borchers, C., 2009. Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jms.1692>
- Enjalbal, C., Martinez, J., Aubagnac, J.-L., 2000. Mass spectrometry in combinatorial chemistry. *Mass Spectrometry Reviews* 19, 139–161. [https://doi.org/10.1002/1098-2787\(200005/06\)19:3<139::AID-MAS2>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1098-2787(200005/06)19:3<139::AID-MAS2>3.0.CO;2-S)
- Evans, C., Noirel, J., Ow, S.Y., Salim, M., Pereira-Medrano, A.G., Couto, N., Pandhal, J., Smith, D., Pham, T.K., Karunakaran, E., Zou, X., Biggs, C.A., Wright, P.C., 2012. An insight into iTRAQ: where do we stand now? *Anal Bioanal Chem* 404, 1011–1027. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5918-6>
- Fairlie, I., 2007. RBE and w(R) values of Auger emitters and low-range beta emitters with particular reference to tritium. *J Radiol Prot* 27, 157–168. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/27/2/003>
- Fausto, N., Campbell, J.S., Riehle, K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45–S53. <https://doi.org/10.1002/hep.20969>

- FDA-NIH Biomarker Working, 2021. , in: BEST (Biomarkers, EndpointS, and Other Tools). Food and Drug Administration (US), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>
- Ferrari, D.M., Söling, H.D., 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339, 1–10.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48, 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Fisher, K.J., Aronson, N.N., 1992. Cloning and expression of the cDNA sequence encoding the lysosomal glycosidase di-N-acetylchitobiase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 19607–19616. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41818-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41818-2)
- Flohé, L., Harris, J.R., 2007. Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions | SpringerLink. *Subcellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6051-9>
- Florczyk, U.M., Jozkowicz, A., Dulak, J., 2008. Biliverdin reductase: new features of an old enzyme and its potential therapeutic significance. *Pharmacol Rep* 60, 38–48.
- Folley, J.H., Borges, W., Yamawaki, T., 1952. Incidence of leukemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *The American Journal of Medicine* 13, 311–321. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(52\)90285-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(52)90285-4)
- Forrester, S.J., Kikuchi, D.S., Hernandez, M.S., Xu, Q., Griendling, K.K., 2018. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res* 122, 877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>
- Fountoulakis, M., Juranville, J.-F., Jiang, L., Avila, D., Röder, D., Jakob, P., Berndt, P., Evers, S., Langen, H., 2004. Depletion of the high-abundance plasma proteins. *Amino Acids* 27, 249–259. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0141-1>
- Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J., Pasquier, C., 1993. Oxidative damage to lysozyme by the hydroxyl radical: comparative effects of scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1203, 11–17. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(93\)90030-u](https://doi.org/10.1016/0167-4838(93)90030-u)
- French, J.B., Thomson, B.A., Davidson, W.R., Reid, N.M., Buckley, J.A., 1985. Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry, in: Karasek, F.W., Hutzinger, O., Safe, S. (Eds.), *Mass Spectrometry in Environmental Sciences*. Springer US, Boston, MA, pp. 101–121. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2361-7_6
- Frese, C.K., Altelaar, A.F.M., Hennrich, M.L., Nolting, D., Zeller, M., Griep-Raming, J., Heck, A.J.R., Mohammed, S., 2011. Improved peptide identification by targeted fragmentation using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *J Proteome Res* 10, 2377–2388. <https://doi.org/10.1021/pr1011729>
- Gao, L., Yin, H., S Smith, R., Chao, L., Chao, J., 2008. Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction. *Lab Invest* 88, 1157–1166. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.85>
- Garau, M.M. i, Calduch, A.L., López, E.C., 2011. Radiobiology of the acute radiation syndrome. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy* 16, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2011.06.001>
- García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Transferrins: Molecular mechanisms of iron transport and disorders* 1820, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.06.018>
- Gehrmann, M.L., Hathout, Y., Fenselau, C., 2004. Evaluation of metabolic labeling for comparative proteomics in breast cancer cells. *J Proteome Res* 3, 1063–1068. <https://doi.org/10.1021/pr049906k>
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P., 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *PNAS* 100, 6940–6945. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832254100>

- Geyer, P.E., Holdt, L.M., Teupser, D., Mann, M., 2017. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol* 13. <https://doi.org/10.15252/msb.20156297>
- Goans, R.E., Waselenko, J.K., 2005. MEDICAL MANAGEMENT OF RADIOLOGICAL CASUALTIES: Health Physics 89, 505–512. <https://doi.org/10.1097/O1.HP.0000172144.94491.84>
- Griffiths, A.J.F., 2018. Genomics [WWW Document]. Encyclopedia Britannica. URL <https://www.britannica.com/science/genomics> (accessed 10.15.20).
- Guipaud, O., 2013. Serum and plasma proteomics and its possible use as detector and predictor of radiation diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 990, 61–86. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5896-4_4
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R., 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17, 994–999. <https://doi.org/10.1038/13690>
- Hager, J.W., 2001. Axial ejection in a multipole mass spectrometer.
- Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R., 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology, Analytical Techniques/Mechanisms* 12, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Havlíček, V., Tureček, F., 2020. Kvadrupólový analyzátor a iontové pasti. *Chemické listy* 114, 106–112.
- Havránková, R., 2020. Biological effects of ionizing radiation. *Cas Lek Cesk* 159, 258–260.
- Heiles, S., 2021. Advanced tandem mass spectrometry in metabolomics and lipidomics—methods and applications. *Anal Bioanal Chem* 413, 5927–5948. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03425-1>
- Hein, E., Honoré, C., Skjoedt, M.-O., Munthe-Fog, L., Hummelshøj, T., Garred, P., 2010. Functional Analysis of Ficolin-3 Mediated Complement Activation. *PLOS ONE* 5, e15443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015443>
- Hernychová, L., Dvořáková, P., Michalová, E., Vojtěšek, B., 2014. Quantitative Mass Spectrometry and Its Utilization in Oncology. *Klin Onkol* 27, S98–S103. <https://doi.org/10.14735/amko20141S98>
- Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF [WWW Document], n.d. URL <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-8/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof.html> (accessed 9.27.20).
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M., Tai, H., 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* 24, 3–12.
- Ho, Y.S., Magnenat, J.L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., Funk, C.D., 1997. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272, 16644–16651. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16644>
- Hochstrasser, D.F., 1997. Clinical and Biomedical Applications of Proteomics, in: Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D., Hochstrasser, D.F. (Eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics, Principles and Practice*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 187–219. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03493-4_8
- Hodgkinson, L.M., Wang, L., Duncan, G., Edwards, D.R., Wormstone, I.M., 2010. ADAM and ADAMTS gene expression in native and wound healing human lens epithelial cells. *Mol Vis* 16, 2765–2776.
- Hofmann, R., Schreiber, G.A., Willich, N., Westhaus, R., Bögl, K.W., 1990. Increased serum amylase in patients after radiotherapy as a probable bioindicator for radiation exposure. *Strahlenther Onkol* 166, 688–695.
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2010. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *Journal of Chromatography A* 1217, 3908–3921. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.049>

- Holm, M., Joenväärä, S., Saraswat, M., Tohmola, T., Ristimäki, A., Renkonen, R., Haglund, C., 2020. Preoperative Radiotherapy Leads to Significant Differences in the Plasma Protein Profile of Rectal Cancer Patients. *Oncology* 98, 493–500. <https://doi.org/10.1159/000505697>
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40, 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>
- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., Hauer, C.R., 1986. Protein sequencing by tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6233–6237. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.17.6233>
- Huong, T.T., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnková, L., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R., 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of metallomics and nanotechnologies* 1, 3.
- IAEA, 2011. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies [WWW Document]. International atomic energy agency. URL <https://www.iaea.org/publications/8735/cytogenetic-dosimetry-applications-in-preparedness-for-and-response-to-radiation-emergencies> (accessed 1.25.21).
- ICRP 103, 2007. . *Annals of the ICRP* 2–4.
- Ignjatovic, V., Geyer, P.E., Palaniappan, K.K., Chaaban, J.E., Omenn, G.S., Baker, M.S., Deutsch, E.W., Schwenk, J.M., 2019. Mass Spectrometry-Based Plasma Proteomics: Considerations from Sample Collection to Achieving Translational Data. *J Proteome Res* 18, 4085–4097. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00503>
- Isenberg, J.S., Maxhimer, J.B., Hyodo, F., Pendrak, M.L., Ridnour, L.A., DeGraff, W.G., Tsokos, M., Wink, D.A., Roberts, D.D., 2008. Thrombospondin-1 and CD47 Limit Cell and Tissue Survival of Radiation Injury. *The American Journal of Pathology* 173, 1100–1112. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080237>
- Istiaq, A., Ohta, K., 2022. A review on Tsukushi: mammalian development, disorders, and therapy. *J. Cell Commun. Signal.* 16, 505–513. <https://doi.org/10.1007/s12079-022-00669-z>
- Jack, R.S., 2000. *CD14 in the Inflammatory Response*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., Janda, K., 2020. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski* 48, 124–127.
- Janeček, Š., Svensson, B., MacGregor, E.A., 2014. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol Life Sci* 71, 1149–1170. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z>
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.-W., Yun, D.-J., Rhee, S.G., Cho, M.J., Lee, S.Y., 2004. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* 117, 625–635. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.002>
- Jasinski, M., Olszewska-Slonina, D., 2022. Serum Paraoxonase-1 Activity and the Risk of Prostate Cancer Recurrence in Patients Treated with Radiotherapy. *Antioxidants* 11, 346. <https://doi.org/10.3390/antiox11020346>
- Jiang, X., Bai, X.-Y., Li, B., Li, Y., Xia, K., Wang, M., Li, S., Wu, H., 2019. Plasma Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chains H3 and H4 Serve as Novel Diagnostic Biomarkers in Human Colorectal Cancer. *Disease Markers* 2019, e5069614. <https://doi.org/10.1155/2019/5069614>
- Jirtle, R.L., Michalopoulos, G., McLain, J.R., Crowley, J., 1981. Transplantation System for Determining the Clonogenic Survival of Parenchymal Hepatocytes Exposed to Ionizing Radiation. *Cancer Research* 41, 3512–3518.
- Johnson, J.V., Yost, R.A., Kelley, P.E., Bradford, D.C., 2002. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps [WWW Document]. ACS Publications. <https://doi.org/10.1021/ac00219a003>

- Jore, M.M., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N.M., Li, Y.I., Nunn, M.A., Elmlund, H., Lea, S.M., 2016. Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nat Struct Mol Biol* 23, 378–386. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3196>
- Kabacik, S., Mackay, A., Tamber, N., Manning, G., Finnon, P., Paillier, F., Ashworth, A., Bouffler, S., Badie, C., 2011. Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int. J. Radiat. Biol.* 87, 115–129. <https://doi.org/10.3109/09553002.2010.519424>
- Kamiya, K., Sasatani, M., 2012. [Effects of radiation exposure on human body]. *Nihon Rinsho* 70, 367–374.
- Kanatous, S.B., Mammen, P.P.A., 2010. Regulation of myoglobin expression. *Journal of Experimental Biology* 213, 2741–2747. <https://doi.org/10.1242/jeb.041442>
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>
- Katsuki, A., Suematsu, M., Gabazza, E.C., Murashima, S., Nakatani, K., Togashi, K., Yano, Y., Sumida, Y., 2006. Decreased high-molecular weight adiponectin-to-total adiponectin ratio in sera is associated with insulin resistance in Japanese metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 29, 2327–2329.
- Kaur, J., Reinhardt, D.P., 2015. Chapter 3 - Extracellular Matrix (ECM) Molecules, in: Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M. (Eds.), *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Academic Press, Boston, pp. 25–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397157-9.00003-5>
- Kebarle, P., Tang, L., 1993. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 65, 972A-986A. <https://doi.org/10.1021/ac00070a001>
- Kellici, T.F., Pilka, E.S., Bodkin, M.J., 2021. Small-molecule modulators of serine protease inhibitor proteins (serpins). *Drug Discovery Today* 26, 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.11.012>
- Kessel, C., Holzinger, D., Foell, D., 2013. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. *Clin Immunol* 147, 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.11.008>
- Ki, Y., Kim, W., Nam, J., Kim, Donghyun, Park, D., Kim, Dongwon, 2009. C-reactive protein levels and radiation-induced mucositis in patients with head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75, 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.11.012>
- Knaus, U.G., Hertzberger, R., Pircalabioru, G.G., Yousefi, S.P.M., Branco dos Santos, F., 2017. Pathogen control at the intestinal mucosa – H₂O₂ to the rescue. *Gut Microbes* 8, 67–74. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279378>
- Kobayashi, H., 2006. Endogenous anti-inflammatory substances, inter- α -inhibitor and bikunin 387, 1545–1549. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.192>
- Kong, D.-H., Kim, Y.K., Kim, M.R., Jang, J.H., Lee, S., 2018. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1057. <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>
- Kopaeva, M.Y., Alchinova, I.B., Cherepov, A.B., Demorzhi, M.S., Nesterenko, M.V., Zarayskaya, I.Y., Karganov, M.Y., 2022. New Properties of a Well-Known Antioxidant: Pleiotropic Effects of Human Lactoferrin in Mice Exposed to Gamma Irradiation in a Sublethal Dose. *Antioxidants* 11, 1833. <https://doi.org/10.3390/antiox11091833>
- Koppelaar, D.W., Barinaga, C.J., Denton, M.B., Sperline, R.P., Hieftje, G.M., Schilling, G.D., Andrade, F.J., Barnes, J.H., Iv, I., 2005. MS Detectors. *Anal. Chem.* 77, 418 A-427 A. <https://doi.org/10.1021/ac053495p>
- Kosmacek, E.A., Oberley-Deegan, R.E., 2020. Adipocytes protect fibroblasts from radiation-induced damage by adiponectin secretion. *Sci Rep* 10, 12616. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69352-w>

- Kovács, K.B., Pataki, I., Bárdos, H., Fekete, A., Pfliegler, G., Haramura, G., Gindele, R., Komáromi, I., Balla, G., Ádány, R., Muszbek, L., Bereczky, Z., 2015. Molecular characterization of p.Asp77Gly and the novel p.Ala163Val and p.Ala163Glu mutations causing protein C deficiency. *Thrombosis Research* 135, 718–726. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.01.011>
- Krüger, M., Pabst, A.M., Al-Nawas, B., Horke, S., Moergel, M., 2015. Paraoxonase-2 (PON2) protects oral squamous cell cancer cells against irradiation-induced apoptosis. *J Cancer Res Clin Oncol* 141, 1757–1766. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1941-2>
- Kumar, R., De Jesus, O., 2022. Radiation Effects On The Fetus, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kunwar, A., Haston, C.K., 2014. Basal levels of glutathione peroxidase correlate with onset of radiation induced lung disease in inbred mouse strains. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 307, L597–L604. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00088.2014>
- Kuraya, M., Ming, Z., Liu, X., Matsushita, M., Fujita, T., 2005. Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology* 209, 689–697. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2004.11.001>
- Lambert, M.P., Xiao, L., Nguyen, Y., Kowalska, M.A., Poncz, M., 2011. The Role of Platelet Factor 4 in Radiation-Induced Thrombocytopenia. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 80, 1533–1540. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.03.039>
- Landegren, U., Vänellid, J., Hammond, M., Nong, R.Y., Wu, D., Ullerås, E., Kamali-Moghaddam, M., 2012. Opportunities for sensitive plasma proteome analysis. *Analytical chemistry* 84, 1824–1830.
- Lapcik, P., Sulc, P., Janacova, L., Jilkova, K., Potesil, D., Bouchalova, P., Müller, P., Bouchal, P., 2023. Desmocollin-1 is associated with pro-metastatic phenotype of luminal A breast cancer cells and is modulated by parthenolide. *Cell Mol Biol Lett* 28, 68. <https://doi.org/10.1186/s11658-023-00481-6>
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B., 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61, 3894–3901.
- Lee, D.Y., Bowen, B.P., Nguyen, D.H., Parsa, S., Huang, Y., Mao, J.-H., Northen, T.R., 2012. Low-dose ionizing radiation-induced blood plasma metabolic response in a diverse genetic mouse population. *Radiat. Res.* 178, 551–555. <https://doi.org/10.1667/RR2990.1>
- Lee, J.M., Bernstein, A., 1993. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 5742–5746. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5742>
- Lee, S.H., Cheng, H., Yuan, Y., Wu, S., 2014. Regulation of Ionizing Radiation-Induced Adhesion of Breast Cancer Cells to Fibronectin by Alpha5beta1 Integrin. *Radiation Research* 181, 650–658. <https://doi.org/10.1667/RR13543.1>
- Lee, S.-R., Kwon, K.-S., Kim, S.-R., Rhee, S.G., 1998. Reversible Inactivation of Protein-tyrosine Phosphatase 1B in A431 Cells Stimulated with Epidermal Growth Factor*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 15366–15372. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15366>
- Lee, T.-H., Kim, S.-U., Yu, S.-L., Kim, S.H., Park, D.S., Moon, H.-B., Dho, S.H., Kwon, K.-S., Kwon, H.J., Han, Y.-H., Jeong, S., Kang, S.W., Shin, H.-S., Lee, K.-K., Rhee, S.G., Yu, D.-Y., 2003. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 101, 5033–5038. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2548>
- Lee, Y., Canadell, M.P., Shuryak, I., Perrier, J.R., Taveras, M., Patel, P., Koller, A., Smilenov, L.B., Brenner, D.J., Chen, E.I., 2018. Candidate protein markers for radiation biodosimetry in the hematopoietically humanized mouse model. *Scientific reports* 8, 1–11.
- Lee, Y.-W., Song, K.-B., 2002. Effect of γ -Irradiation on the Molecular Properties of Myoglobin. *BMB Reports* 35, 590–594. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.590>

- Lehnert, B.E., Iyer, R., 2002. Exposure to low-level chemicals and ionizing radiation: reactive oxygen species and cellular pathways. *Hum Exp Toxicol* 21, 65–69. <https://doi.org/10.1191/0960327102ht212oa>
- Lei, X.G., 2001. Glutathione peroxidase-1 gene knockout on body antioxidant defense in mice. *BioFactors* 14, 93–99. <https://doi.org/10.1002/biof.5520140113>
- Leśniak, W., Szczepańska, A., Kuźnicki, J., 2005. Calcyclin (S100A6) expression is stimulated by agents evoking oxidative stress via the antioxidant response element. *Biochim Biophys Acta* 1744, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.11.003>
- Li, J.-J., Fang, C.-H., 2004. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular diseases. *Med Hypotheses* 62, 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.014>
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., Jasin, M., 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5172–5177.
- Lingdong Quan, M.L., 2013. CID,ETD and HCD Fragmentation to Study Protein Post-Translational Modifications. *Mod Chem Appl* 01. <https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000e102>
- Little, J.B., 2000. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 397–404. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.397>
- Little, M., 2003. Risks Associated with Ionizing Radiation. *British medical bulletin* 68, 259–275. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg031>
- Liu, H., Sadygov, R.G., Yates, J.R., 2004. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Anal. Chem.* 76, 4193–4201. <https://doi.org/10.1021/ac0498563>
- Loganathan, S., Athalye, S.N., Joshi, S.R., 2020. Itolizumab, an anti-CD6 monoclonal antibody, as a potential treatment for COVID-19 complications. *Expert Opin Biol Ther* 20, 1025–1031. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1798399>
- López, M., Martín, M., 2011. Medical management of the acute radiation syndrome. *Rep Pract Oncol Radiother* 16, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2011.05.001>
- Lorimore, S.A., Kadhim, M.A., Pocock, D.A., Papworth, D., Stevens, D.L., Goodhead, D.T., Wright, E.G., 1998. Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 5730–5733. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5730>
- Low, F.M., Hampton, M.B., Winterbourn, C.C., 2008. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid Redox Signal* 10, 1621–1630. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2081>
- Lumniczky, K., Impens, N., Armengol, G., Candéias, S., Georgakilas, A.G., Hornhardt, S., Martin, O.A., Rödel, F., Schaeue, D., 2021. Low dose ionizing radiation effects on the immune system. *Environ Int* 149, 106212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106212>
- Ma, Q., An, L., Tian, H., Liu, J., Zhang, L., Li, X., Wei, C., Xie, C., Ding, H., Qin, W., Su, Y., 2019. Interactions between human hemoglobin subunits and peroxiredoxin 2. *FBL* 24, 1085–1096. <https://doi.org/10.2741/4770>
- Maithal, K., Muralidhar, K., 2002. Mass spectrometry and protein structure. *Indian journal of biochemistry & biophysics* 39, 205–216.
- Makarov, A., 2000. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156–1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>
- Makawita, S., Diamandis, E.P., 2010. The bottleneck in the cancer biomarker pipeline and protein quantification through mass spectrometry-based approaches: current strategies for candidate verification. *Clin Chem* 56, 212–222. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127019>
- Mann, M., 2006. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 952–958. <https://doi.org/10.1038/nrm2067>

- March, R.E., 1997. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 32, 351–369. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y)
- Matthiesen, R., Bunkenborg, J., 2013. Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics, in: Matthiesen, R. (Ed.), *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–45. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3_1
- McAdams, H.H., Arkin, A., 1997. Stochastic mechanisms in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 814–819. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.3.814>
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049–6055.
- McLafferty, F., 1981. Tandem mass spectrometry. *Science* 214, 280–287. <https://doi.org/10.1126/science.7280693>
- McRobb, L.S., McKay, M.J., Gamble, J.R., Grace, M., Moutrie, V., Santos, E.D., Lee, V.S., Zhao, Z., Molloy, M.P., Stoodley, M.A., 2017. Ionizing radiation reduces ADAM10 expression in brain microvascular endothelial cells undergoing stress-induced senescence. *Aging* 9, 1248–1268. <https://doi.org/10.18632/aging.101225>
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. GLUTATHIONE. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Menon, S.S., Uppal, M., Randhawa, S., Cheema, M.S., Aghdam, N., Usala, R.L., Ghosh, S.P., Cheema, A.K., Dritschilo, A., 2016. Radiation Metabolomics: Current Status and Future Directions. *Front Oncol* 6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00020>
- Miao, R.Q., Murakami, H., Song, Q., Chao, L., Chao, J., 2000. Kallistatin stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and neointima formation in balloon-injured rat artery. *Circ Res* 86, 418–424. <https://doi.org/10.1161/01.res.86.4.418>
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., Horning, S., 2011. Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer*. *Molecular & Cellular Proteomics* 10, M111.011015. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011015>
- Mirza, Z., Schulten, H.-J., Farsi, H.M., Al-Maghrabi, J.A., Gari, M.A., Chaudhary, A.G., Abuzenadah, A.M., Al-Qahtani, M.H., Karim, S., 2014. Impact of S100A8 expression on kidney cancer progression and molecular docking studies for kidney cancer therapeutics. *Anticancer Res* 34, 1873–1884.
- Miyazaki, M., Ohtsuru, A., Ishikawa, T., 2014. An overview of internal dose estimation using whole-body counters in Fukushima Prefecture. *Fukushima J Med Sci* 60, 95–100. <https://doi.org/10.5387/fms.2014-10>
- Mylonas, P.G., Matsouka, P.T., Papandoniou, E.V., Vagianos, C., Kalfarentzos, F., Alexandrides, T.K., 2000. Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160, 115–122. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00215-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00215-4)
- Nagaraj, N., D'Souza, R.C.J., Cox, J., Olsen, J.V., Mann, M., 2012. Correction to Feasibility of Large-Scale Phosphoproteomics with Higher Energy Collisional Dissociation Fragmentation. *J. Proteome Res.* 11, 3506–3508. <https://doi.org/10.1021/pr3003886>
- Nahnsen, S., Bielow, C., Reinert, K., Kohlbacher, O., 2013. Tools for Label-free Peptide Quantification*. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 549–556. <https://doi.org/10.1074/mcp.R112.025163>
- Nallari, P., 2020. Recent trends on Genomics & Gene Study 1.
- Narayanan, P.K., Goodwin, E.H., Lehnert, B.E., 1997. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 57, 3963–3971.

- National Research Council, N.R., Studies, D. on E. and L., Sciences, C. on L., V), C. on the B.E. of I.R. (BEIR, 1990. Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR V. National Academies.
- Neetu, K., Ankit, G., Ruchi, T., Ajay, B., Prashant, B., 2012. A REVIEW ON MASS SPECTROMETRY DETECTORS 10.
- Neumann, C.A., Cao, J., Manevich, Y., 2009. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 8, 4072–4078. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10242>
- Nicholson, J.K., Wilson, I.D., 2003. Opinion: understanding “global” systems biology: metabolomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2, 668–676. <https://doi.org/10.1038/nrd1157>
- Niessen, W.M.A., 2006. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 3rd ed. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781420014549>
- Nigam, S., Schewe, T., 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1488, 167–181. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00119-0](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00119-0)
- Niki, E., 2015. Lipid oxidation in the skin. *Free Radical Research* 49, 827–834. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.976213>
- Noh, C.-K., Kim, S.S., Kim, D.-K., Lee, H.-Y., Cho, H.J., Yoon, S.Y., Lee, G.H., Hyun, S.A., Kim, Y.J., Kim, H.J., Hwang, J.A., Ahn, S.J., Shin, S.J., Lee, K.M., Yoo, B.M., Cho, S.W., Cheong, J.Y., 2014. Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 as a diagnostic and prognostic indicator in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Clinical Biochemistry* 47, 1257–1261. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.05.002>
- Norková, R., Jaklová, J., 2013. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chem. Listy* 7.
- NRC: Sources of Radiation [WWW Document], n.d. URL <https://www.nrc.gov/about-nrc/radiation/around-us/sources.html> (accessed 4.2.20).
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D., Chait, B.T., 1999. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 6591–6596. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6591>
- Ogita, M., Tsuchida, S., Aoki, A., Satoh, M., Kado, S., Sawabe, M., Nanbara, H., Kobayashi, H., Takeuchi, Y., Mizutani, K., Sasaki, Y., Nomura, F., Izumi, Y., 2015. Increased cell proliferation and differential protein expression induced by low-level Er:YAG laser irradiation in human gingival fibroblasts: proteomic analysis. *Lasers Med Sci* 30, 1855–1866. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1691-4>
- Oh, J.H., Wong, H.P., Wang, X., Deasy, J.O., 2012. A Bioinformatics Filtering Strategy for Identifying Radiation Response Biomarker Candidates. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038870>
- O’Hair, R.A.J., 2006. The 3D quadrupole ion trap mass spectrometer as a complete chemical laboratory for fundamental gas-phase studies of metal mediated chemistry. *Chem. Commun.* 1469. <https://doi.org/10.1039/b516348j>
- Ohta, K., Aoyama, E., Ahmad, S.A.I., Ito, N., Anam, M.B., Kubota, S., Takigawa, M., 2019. CCN2/CTGF binds the small leucine rich proteoglycan protein Tsukushi. *J. Cell Commun. Signal.* 13, 113–118. <https://doi.org/10.1007/s12079-018-0487-x>
- Old, W.M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K.G., Mendoza, A., Sevinsky, J.R., Resing, K.A., Ahn, N.G., 2005. Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics*S. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 1487–1502. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500084-MCP200>
- Ong, S.-E., Mann, M., 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 1, 252–262. <https://doi.org/10.1038/nchembio736>
- Orre, L.M., Pernemalm, M., Lengqvist, J., Lewensohn, R., Lehtiö, J., 2007. Up-regulation, Modification, and Translocation of S100A6 Induced by Exposure to Ionizing Radiation Revealed by Proteomics Profiling *. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 2122–2131. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700202-MCP200>

- Ossetrova, N.I., Sandgren, D.J., Blakely, W.F., 2011. C-reactive protein and serum amyloid A as early-phase and prognostic indicators of acute radiation exposure in nonhuman primate total-body irradiation model. *Radiation Measurements, EPRBioDose 2010 International Conference* 46, 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2011.05.021>
- Ouchi, N., Walsh, K., 2007. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. *Clin Chim Acta* 380, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.01.026>
- Pandey, A., Andersen, J.S., Mann, M., 2000. Use of mass spectrometry to study signaling pathways. *Sci. STKE* 2000, pl1. <https://doi.org/10.1126/stke.2000.37.pl1>
- Panganiban, R.A.M., Day, R.M., 2013. Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence. *PLoS One* 8, e78589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078589>
- Pangburn, M.K., Rawal, N., 2002. Structure and function of complement C5 convertase enzymes. *Biochemical Society Transactions* 30, 1006–1010. <https://doi.org/10.1042/bst0301006>
- Pannkuk, E.L., Laiakis, E.C., Girgis, M., Dowd, S.E., Dhungana, S., Nishita, D., Bujold, K., Bakke, J., Gahagen, J., Authier, S., Chang, P.Y., Fornace, A.J., 2019. Temporal Effects on Radiation Responses in Nonhuman Primates: Identification of Biofluid Small Molecule Signatures by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Metabolomics. *Metabolites* 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9050098>
- Pappireddi, N., Martin, L., Wühr, M., 2019. A Review on Quantitative Multiplexed Proteomics. *ChemBiochem* 20, 1210–1224. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800650>
- Parasassi, T., Giusti, A.M., Gratton, E., Monaco, E., Raimondi, M., Ravagnan, G., Sapora, O., 1994. Evidence for an Increase in Water Concentration in Bilayers after Oxidative Damage of Phospholipids Induced by Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65, 329–334. <https://doi.org/10.1080/09553009414550391>
- Park, E.-M., Ramnath, N., Yang, G.Y., Ahn, J.-Y., Park, Y., Lee, T.-Y., Shin, H.-S., Yu, J., Ip, C., Park, Y.-M., 2007. High superoxide dismutase and low glutathione peroxidase activities in red blood cells predict susceptibility of lung cancer patients to radiation pneumonitis. *Free Radic Biol Med* 42, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.044>
- Patterson, A.D., Lanz, C., Gonzalez, F.J., Idle, J.R., 2010. The Role of Mass Spectrometry-Based Metabolomics in Medical Countermeasures Against Radiation. *Mass Spectrom Rev* 29, 503–521. <https://doi.org/10.1002/mas.20272>
- Patterson, S.D., Aebersold, R.H., 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetics* 33, 311–323. <https://doi.org/10.1038/ng1106>
- Paulus, A., Wehr, T., 2007. Accessing Low-Abundance Proteins in Serum and Plasma With a Novel , Simple Enrichment and Depletion Method sample preparation [WWW Document]. URL <https://www.semanticscholar.org/paper/Accessing-Low-Abundance-Proteins-in-Serum-and-With-Paulus-Wehr/ed47919bbed7333b43a2d105ea2779d46851b6c1> (accessed 4.8.22).
- Peisajovich, A., Marnell, L., Mold, C., Du Clos, T.W., 2008. C-reactive protein at the interface between innate immunity and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol* 4, 379–390. <https://doi.org/10.1586/1744666X.4.3.379>
- Pellmar, T.C., Rockwell, S., Radiological/Nuclear Threat Countermeasures Working Group, 2005. Priority list of research areas for radiological nuclear threat countermeasures. *Radiat. Res.* 163, 115–123. <https://doi.org/10.1667/rr3283>
- Pernot, E., Hall, J., Baatout, S., Benotmane, M.A., Blanchardon, E., Bouffler, S., El Saghire, H., Gomolka, M., Guertler, A., Harms-Ringdahl, M., Jeggo, P., Kreuzer, M., Laurier, D., Lindholm, C., Mkacher, R., Quintens, R., Rothkamm, K., Sabatier, L., Tapio, S., de Vathaire, F., Cardis, E., 2012. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies. *Mutat. Res.* 751, 258–286. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.05.003>

- Perry, R.H., Cooks, R.G., Noll, R.J., 2008. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev* 27, 661–699. <https://doi.org/10.1002/mas.20186>
- Peudon, A., Edel, S., Terrissol, M., 2006. Molecular basic data calculation for radiation transport in chromatin. *Radiat Prot Dosimetry* 122, 128–135. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl452>
- Pietrowska, M., Wlosowicz, A., Gawin, M., Widlak, P., 2019. MS-Based Proteomic Analysis of Serum and Plasma: Problem of High Abundant Components and Lights and Shadows of Albumin Removal. *Adv Exp Med Biol* 1073, 57–76. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12298-0_3
- Piñeiro, M., Andrés, M., Iturralde, M., Carmona, S., Hirvonen, J., Pyörälä, S., Heegaard, P.M.H., Tjørnehøj, K., Lampreave, F., Piñeiro, A., Alava, M.A., 2004. ITIH4 (Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain 4) Is a New Acute-Phase Protein Isolated from Cattle during Experimental Infection. *Infection and Immunity* 72, 3777–3782. <https://doi.org/10.1128/iai.72.7.3777-3782.2004>
- Pluder, F., Barjaktarovic, Z., Azimzadeh, O., Mörtl, S., Krämer, A., Steininger, S., Sarioglu, H., Leszczynski, D., Nylund, R., Hakanen, A., Sriharshan, A., Atkinson, M.J., Tapio, S., 2011. Low-dose irradiation causes rapid alterations to the proteome of the human endothelial cell line EA.hy926. *Radiat Environ Biophys* 50, 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00411-010-0342-9>
- Ponemone, V., Fayad, R., Gove, M.E., Pini, M., Fantuzzi, G., 2010. Effect of adiponectin deficiency on intestinal damage and hematopoietic responses of mice exposed to gamma radiation. *Mutat Res* 690, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.06.014>
- Qin, X., Swertfeger, D., Zheng, S., Hui, D., Tso, P., 1998. Apolipoprotein AIV: A potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *The American journal of physiology* 274, H1836–40. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1836>
- Raffaelli, A., Saba, A., 2003. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 22, 318–331. <https://doi.org/10.1002/mas.10060>
- Rahman, N., Khan, R., Badshah, S., 2018. Effect of x-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review. *Cell Tissue Bank* 19, 457–472. <https://doi.org/10.1007/s10561-018-9736-8>
- Rahman, N., Khan, R., Hussain, T., Ahmed, N., 2020. Investigation of the mechanism of gamma irradiation effect on bovine bone. *Cell Tissue Bank* 21, 249–256. <https://doi.org/10.1007/s10561-020-09817-4>
- Ranc, V., Havlí, V., Bedná, P., 2007. Desorpční elektrosprej: moderní metoa analýzy organických povrchů. *Chem. Listy* 6.
- Reeves, G.I., Ainsworth, E.J., 1995. Description of the chronic radiation syndrome in humans irradiated in the former Soviet Union. *Radiat Res* 142, 242–243. <https://doi.org/10.2307/3579035>
- Reitamo, S., Klockars, M., Adinolfi, M., Osserman, E.F., 1978. Human lysozyme (origin and distribution in health and disease). *Ric Clin Lab* 8, 211–231.
- Resovi, A., Pinessi, D., Chiorino, G., Taraboletti, G., 2014. Current understanding of the thrombospondin-1 interactome. *Matrix Biology, Matricellular Proteins* 37, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.01.012>
- Reza Khorramzadeh, M., Saadat, F., 2020. Animal models for human disease. *Animal Biotechnology* 153–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00008-2>
- Rini, B.I., Small, E.J., 2005. Biology and Clinical Development of Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. *JCO* 23, 1028–1043. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.01.186>
- Rithidech, K.N., Honikel, L., Rieger, R., Xie, W., Rithidech, K.N., Honikel, L., Rieger, R., Xie, W., Fischer, T., Simon, S.R., 2009. Protein-expression profiles in mouse blood-plasma following acute whole-body exposure to ¹³⁷Cs γ rays. *International Journal of Radiation Biology* 85, 432–447. <https://doi.org/10.1080/09553000902820390>

- Rockwood, A.L., Kushnir, M.M., Clarke, N.J., 2018. Mass Spectrometry, in: Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry. Elsevier, pp. 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5>
- Romm, H., Wilkins, R.C., Coleman, C.N., Lillis-Hearne, P.K., Pellmar, T.C., Livingston, G.K., Awa, A.A., Jenkins, M.S., Yoshida, M.A., Oestreicher, U., Prasanna, P.G.S., 2011. Biological Dosimetry by the Triage Dicentric Chromosome Assay: Potential Implications for Treatment of Acute Radiation Syndrome in Radiological Mass Casualties. *rare* 175, 397–404. <https://doi.org/10.1667/RR2321.1>
- Röst, H.L., Rosenberger, G., Navarro, P., Gillet, L., Miladinović, S.M., Schubert, O.T., Wolski, W., Collins, B.C., Malmström, J., Malmström, L., Aebersold, R., 2014. OpenSWATH enables automated, targeted analysis of data-independent acquisition MS data. *Nat Biotechnol* 32, 219–223. <https://doi.org/10.1038/nbt.2841>
- Roth, J., Vogl, T., Sorg, C., Sunderkötter, C., 2003. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends in Immunology* 24, 155–158. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00062-0)
- Ryan, J.L., 2012. Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 985–993. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.411>
- Ryan, P.B., Burke, T.A., Cohen Hubal, E.A., Cura, J.J., McKone, T.E., 2007. Using Biomarkers to Inform Cumulative Risk Assessment. *Environ Health Perspect* 115, 833–840. <https://doi.org/10.1289/ehp.9334>
- Rybkina, V.L., Azizova, T.V., 2016. [The Influence of the Ionizing Radiation on the Development of Atherosclerosis]. *Radiats Biol Radioecol* 56, 44–55.
- Ryu, J.-W., Jung, I.-H., Park, E.-Y., Kim, K.-H., Kim, K., Yeom, J., Jung, J., Lee, S.-W., 2022. Radiation-induced C-reactive protein triggers apoptosis of vascular smooth muscle cells through ROS interfering with the STAT3/Ref-1 complex. *J Cell Mol Med* 26, 2104–2118. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17233>
- Sack, G.H., 2020. Serum Amyloid A (SAA) Proteins, in: Hoeger, U., Harris, J.R. (Eds.), *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and Other Body Fluid Proteins, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 421–436. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_17
- Santivasi, W.L., Xia, F., 2014. Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxidants & Redox Signaling* 21, 251–259. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5668>
- Sawada, M., Kiyono, T., Nakashima, S., Shinoda, J., Naganawa, T., Hara, S., Iwama, T., Sakai, N., 2004. Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced ceramide formation in human glioma cells: P53-mediated oxidant stress-dependent and -independent pathways. *Cell Death Differ* 11, 997–1008. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401438>
- Schieferdecker, H.L., Schlaf, G., Koleva, M., Götze, O., Jungermann, K., 2000. Induction of functional anaphylatoxin C5a receptors on hepatocytes by in vivo treatment of rats with IL-6. *J Immunol* 164, 5453–5458. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5453>
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249, 1429–1431. <https://doi.org/10.1126/science.2402637>
- Scigelova, M., Makarov, A., 2006. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *Proteomics* 6, 16–21. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600528>
- Seaver, L.C., Imlay, J.A., 2004. Are Respiratory Enzymes the Primary Sources of Intracellular Hydrogen Peroxide? *. *Journal of Biological Chemistry* 279, 48742–48750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408754200>
- Segrest, J.P., Garber, D.W., Brouillette, C.G., Harvey, S.C., Anantharamaiah, G.M., 1994. The Amphipathic α Helix: A Multifunctional Structural Motif in Plasma Apolipoproteins, in: Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eisenberg, D.S. (Eds.), *Advances in Protein Chemistry, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Lipases*. Academic Press, pp. 303–369. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60643-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60643-9)

- Serhatlioglu, S., Gursu, M.F., Gulcu, F., Canatan, H., Godekmerdan, A., 2003. Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. *Cell Biochemistry & Function* 21, 371–375. <https://doi.org/10.1002/cbf.1042>
- Sharapov, M.G., Novoselov, V.I., Penkov, N.V., Fesenko, E.E., Vedunova, M.V., Bruskov, V.I., Gudkov, S.V., 2019. Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation. *Free Radic Biol Med* 134, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.032>
- Sharma, M., Halligan, B.D., Wakim, B.T., Savin, V.J., Cohen, E.P., Moulder, J.E., 2008. The Urine Proteome as a Biomarker of Radiation Injury. *Proteomics Clin Appl* 2, 1065–1086. <https://doi.org/10.1002/prca.200780153>
- Shen, B., Smith, R.S., Hsu, Y.-T., Chao, L., Chao, J., 2009. Kruppel-like Factor 4 Is a Novel Mediator of Kallistatin in Inhibiting Endothelial Inflammation via Increased Endothelial Nitric-oxide Synthase Expression. *J Biol Chem* 284, 35471–35478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.046813>
- Shen, H., Yu, H., Liang, P.H., Cheng, H., XuFeng, R., Yuan, Y., Zhang, P., Smith, C.A., Cheng, T., 2012. An acute negative bystander effect of γ -irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. *Blood* 119, 3629–3637. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373621>
- Shiau, A.-L., Teo, M.-L., Chen, S.-Y., Wang, C.-R., Hsieh, J.-L., Chang, M.-Y., Chang, C.-J., Chao, J., Chao, L., Wu, C.-L., Lee, C.-H., 2010. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin. *BMC Cancer* 10, 245. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-245>
- Shimmura, S., Suematsu, M., Shimoyama, M., Tsubota, K., Oguchi, Y., Shimurai, Y., 1996. Subthreshold UV Radiation-induced Peroxide Formation in Cultured Corneal Epithelial Cells: The Protective Effects of Lactoferrin. *Experimental Eye Research* 63, 519–526. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0142>
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Singh, V.K., Romaine, P.L.P., Newman, V.L., Seed, T.M., 2016. Medical countermeasures for unwanted CBRN exposures: part II radiological and nuclear threats with review of recent countermeasure patents. *Expert Opin Ther Pat* 26, 1399–1408. <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1231805>
- Sjöblom, B., Polentarutti, M., Djinović-Carugo, K., 2009. Structural study of X-ray induced activation of carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 10609–10613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904184106>
- Slouka, V., 1959. *Biologické účinky záření.*, 1. vydání. ed. Orbis, Praha.
- Sobott, F., Watt, S.J., Smith, J., Edelmann, M.J., Kramer, H.B., Kessler, B.M., 2009. Comparison of CID versus ETD based MS/MS fragmentation for the analysis of protein ubiquitination. *J Am Soc Mass Spectrom* 20, 1652–1659. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.04.023>
- Sohrabnezhad, S., Ochbelagh, D.R., Biroon, M.K., 2012. Gamma ray effects on optical properties of CoS nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 96, 796–800. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.07.092>
- Sproull, M., Shankavaram, U., Camphausen, K., 2019. Comparison of Proteomic Biodosimetry Biomarkers Across Five Different Murine Strains. *Radiat Res* 192, 640–648. <https://doi.org/10.1667/RR15442.1>
- Srinivas, U.S., Tan, B.W.Q., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D., 2018. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Srivastava, A., Leighton, X., Eidelman, O., Starr, J., Jozwik, C., Srivastava, M., Pollard, H.B., Singh, V.K., 2015. Personalized Radioproteomics: Identification of a Protein Biomarker Signature for Preemptive Rescue by Tocopherol Succinate in CD34+ Irradiated

- Progenitor Cells Isolated from a Healthy Control Donor. *J Proteomics Bioinform* 8, 23–30. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000349>
- Stafford, G.C., Kelley, P.E., Syka, J.E.P., Reynolds, W.E., Todd, J.F.J., 1984. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 60, 85–98. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(84\)80077-4](https://doi.org/10.1016/0168-1176(84)80077-4)
- Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., 1997. Platelet-activating Factor Acetylhydrolases *. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17895–17898. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.17895>
- Stuhlmeier, K.M., Kao, J.J., Wallbrandt, P., Lindberg, M., Hammarström, B., Broell, H., Paigen, B., 2003. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. *Eur J Biochem* 270, 334–341. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03393.x>
- Sun, D., Sato, M., Yoshida, T., Shimizu, H., Miyatake, H., Adachi, S., Shiro, Y., Kikuchi, A., 2000. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a rat biliverdin reductase. *Acta Cryst D* 56, 1180–1182. <https://doi.org/10.1107/S0907444900008520>
- Sur, I., Neumann, S., Noegel, A.A., 2014. Nesprin-1 role in DNA damage response. *Nucleus* 5, 173–191. <https://doi.org/10.4161/nucl.29023>
- Surace, L., Lysenko, V., Fontana, A.O., Cecconi, V., Janssen, H., Bicvic, A., Okoniewski, M., Pruschy, M., Dummer, R., Neefjes, J., Knuth, A., Gupta, A., van den Broek, M., 2015. Complement Is a Central Mediator of Radiotherapy-Induced Tumor-Specific Immunity and Clinical Response. *Immunity* 42, 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.009>
- Sur-Erdem, I., Hussain, M.S., Asif, M., Pinarbasi, N., Aksu, A.C., Noegel, A.A., 2020. Nesprin-1 impact on tumorigenic cell phenotypes. *Mol Biol Rep* 47, 921–934. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05184-w>
- Švec, J., 2005. Radioaktivita a ionizující záření, 1. vydání. Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství, Ostrava.
- Swartz, H.M., Williams, B.B., Flood, A.B., 2014. Overview of the principles and practice of biodosimetry. *Radiat Environ Biophys* 53, 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00411-014-0522-0>
- Sztalryd, C., Brasaemle, D.L., 2017. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 1862, 1221–1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2017.07.009>
- Taferner, A., Micutkova, L., Hermann, M., Jansen-Dürr, P., Pircher, H., 2011. Purification and characterization of native human insulin-like growth factor binding protein-6. *J Cell Commun Signal* 5, 277–289. <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0126-2>
- Takawale, A., Sakamuri, S.S.V.P., Kassiri, Z., 2015. Extracellular matrix communication and turnover in cardiac physiology and pathology. *Compr Physiol* 5, 687–719. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140045>
- Taniguchi, M., Miura, K., Iwao, H., Yamanaka, S., 2001. Quantitative Assessment of DNA Microarrays—Comparison with Northern Blot Analyses. *Genomics* 71, 34–39. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6427>
- Tapio, S., Hornhardt, S., Gomolka, M., Leszczynski, D., Posch, A., Thalhammer, S., Atkinson, M.J., 2010. Use of proteomics in radiobiological research: current state of the art. *Radiat Environ Biophys* 49, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00411-009-0263-7>
- Techniques for the Study of Ion-Molecule Reactions | Wiley [WWW Document], n.d. . Wiley.com. URL <https://www.wiley.com/en-us/Techniques+for+the+Study+of+Ion+Molecule+Reactions-p-9780471848127> (accessed 9.30.20).
- Thiel, S., 2007. Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Molecular*

- Immunology, XIth European meeting on Complement in Human Disease 44, 3875–3888. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.06.005>
- Thomas, G., 2001. The effect of hemoglobin level on radiotherapy outcomes: The Canadian experience. *Seminars in Oncology, Evolving Issues in Oncology: What is the @'Optimal@' Hemoglobin Level? Part one* 28, 60–65. [https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(01\)90215-5](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90215-5)
- Thomas, S.N., 2019. Chapter 10 - Mass spectrometry, in: Clarke, W., Marzinke, M.A. (Eds.), *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Academic Press, pp. 171–185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00010-7>
- Titov, L.P., Kharitonic, G.D., Gourmanchuk, I.E., Ignatenko, S.I., 1995. Effects of radiation on the production of immunoglobulins in children subsequent to the Chernobyl disaster. *Allergy Proc* 16, 185–193. <https://doi.org/10.2500/108854195778666838>
- Trott, K.-R., Kamprad, F., 2006. Estimation of cancer risks from radiotherapy of benign diseases. *Strahlenther Onkol* 182, 431–436. <https://doi.org/10.1007/s00066-006-1542-8>
- Tseng, C.F., Lin, C.C., Huang, H.Y., Liu, H.C., Mao, S.J.T., 2004. Antioxidant role of human haptoglobin. *Proteomics* 4, 2221–2228. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300787>
- Tu, C., Rudnick, P.A., Martinez, M.Y., Cheek, K.L., Stein, S.E., Slebos, R.J.C., Liebler, D.C., 2010. Depletion of Abundant Plasma Proteins and Limitations of Plasma Proteomics. *J. Proteome Res.* 9, 4982–4991. <https://doi.org/10.1021/pr100646w>
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., Ferraro, A., 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* 193, 154–163. <https://doi.org/10.1002/jcp.10172>
- Tyagi, R., Maan, K., Khushu, S., Rana, P., 2020. Urine metabolomics based prediction model approach for radiation exposure. *Sci Rep* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72426-4>
- Ueno, A.M., Vannais, D.B., Gustafson, D.L., Wong, J.C., Waldren, C.A., 1996. A low, adaptive dose of gamma-rays reduced the number and altered the spectrum of S1- mutants in human-hamster hybrid AL cells. *Mutat Res* 358, 161–169. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(96\)00117-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(96)00117-0)
- United Nations (Ed.), 2010. Sources and effects of ionizing radiation: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR 2008 report to the General Assembly, with scientific annexes. United Nations, New York.
- UNSCEAR 2006 report - Vol. I: Effects [WWW Document], n.d. URL https://www.unscear.org/unscear/en/publications/2006_1.html (accessed 3.27.20).
- Van Dieck, J., Teufel, D.P., Jaulent, A.M., Fernandez-Fernandez, M.R., Rutherford, T.J., Wyslouch-Cieszynska, A., Fersht, A.R., 2009. Posttranslational Modifications Affect the Interaction of S100 Proteins with Tumor Suppressor p53. *Journal of Molecular Biology* 394, 922–930. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.002>
- Van Langenhove, A., Costello, C.E., Biller, J.E., Biemann, K., Browne, T.R., 1981. A gas chromatographic/mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of 5,5-diphenylhydantoin (phenytoin), its para-hydroxylated metabolite and their stable isotope labelled analogs. *Clinica Chimica Acta* 115, 263–275. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90240-0](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90240-0)
- Velkova, A., Carvalho, M.A., Johnson, J.O., Tavtigian, S.V., Monteiro, A.N.A., 2010. Identification of Filamin A as a BRCA1-interacting protein required for efficient DNA repair. *Cell Cycle* 9, 1421–1433. <https://doi.org/10.4161/cc.9.7.11256>
- Venter, A., Nefliu, M., Graham Cooks, R., 2008. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.010>
- Vladan, O., 2013. *Základy radiobiologie (Vladan Ondřej) / 978-80-244-3426-1, 1. vydání. ed. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.*

- Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M., 2002. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation [WWW Document]. <https://doi.org/10.1021/ac00091a044>
- Wang, C.-C., Lai, Y.-H., Ou, Y.-M., Chang, H.-T., Wang, Y.-S., 2016. Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption/ionization– time-of-flight mass spectrometry. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 374. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0371>
- Wang, F., Kohan, A.B., Kindel, T.L., Corbin, K.L., Nunemaker, C.S., Obici, S., Woods, S.C., Davidson, W.S., Tso, P., 2012. Apolipoprotein A-IV improves glucose homeostasis by enhancing insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 9641–9646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201433109>
- Wang, X.S., Lee, B.J., Zha, S., 2020. The recent advances in non-homologous end-joining through the lens of lymphocyte development. *DNA Repair (Amst)* 94, 102874. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102874>
- Wang, Y., Zhang, M., Middleton, F.A., Horton, J.A., Pritchard, M., Spadaro, J.A., Farnum, C.E., Damron, T.A., 2007. Connective Tissue Growth Factor and Insulin-Like Growth Factor 2 Show Upregulation in Early Growth Plate Radiorecovery Response following Irradiation. *Cells Tissues Organs* 186, 192–203. <https://doi.org/10.1159/000105673>
- Wang, Z.-Y., Li, H.-Y., Wang, H., Chi, Q., Liu, Y., Li, X.-M., 2018. Bladder Cancer–Specific Nuclear Matrix Proteins-4 May Be a Potential Biomarker for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Detection. *Disease Markers* 2018, e5609395. <https://doi.org/10.1155/2018/5609395>
- Ward, J.F., 1988. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35, 95–125. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60611-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60611-x)
- Watson, J.T., Sparkman, O.D., 2007. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. John Wiley & Sons.
- Webb-Robertson, B.-J.M., Wiberg, H.K., Matzke, M.M., Brown, J.N., Wang, J., McDermott, J.E., Smith, R.D., Rodland, K.D., Metz, T.O., Pounds, J.G., Waters, K.M., 2015. Review, Evaluation, and Discussion of the Challenges of Missing Value Imputation for Mass Spectrometry-Based Label-Free Global Proteomics. *J Proteome Res* 14, 1993–2001. <https://doi.org/10.1021/pr501138h>
- Wie, S.M., Wellberg, E., Karam, S.D., Reyland, M.E., 2017. Tyrosine Kinase Inhibitors Protect the Salivary Gland from Radiation Damage by Inhibiting Activation of Protein Kinase C- δ . *Molecular Cancer Therapeutics* 16, 1989–1998. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0267>
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., Warscheid, B., 2007. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7, 340–350. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600422>
- Wild, D., 2013. *The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Newnes.
- Wirtz, Karel.W.A., 1997. Phospholipid transfer proteins revisited. *Biochemical Journal* 324, 353–360. <https://doi.org/10.1042/bj3240353>
- Wittenberg, J.B., Wittenberg, B.A., 2003. Myoglobin function reassessed. *Journal of Experimental Biology* 206, 2011–2020. <https://doi.org/10.1242/jeb.00243>
- Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J., Poole, L.B., 2003. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28, 32–40. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)00003-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)00003-8)
- Woodbine, L., Gennery, A.R., Jeggo, P.A., 2014. The clinical impact of deficiency in DNA non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst)* 16, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.02.011>

- Woolbright, B., Ramage, S., Silcox, J., Maiti, A., Beckman, M., n.d. Insulin-Like Growth Factor Stimulates Spp24 Gene Expression in Mesenchymal Stem Cells and Progenitor Cell Lines and Decreases Spp24 in the Mature Osteoblast 1.
- Wypasek, E., Undas, A., 2013. Protein C and protein S deficiency - practical diagnostic issues. *Adv Clin Exp Med* 22, 459–467.
- Xiao, X., Hu, M., Liu, M., Hu, J., 2016. 1H NMR Metabolomics Study of Spleen from C57BL/6 Mice Exposed to Gamma Radiation. *Metabolomics (Los Angel)* 6, 1–11. <https://doi.org/10.4172/2153-0769.1000165>
- Xiao, X., Luo, H., Vanek, K.N., LaRue, A.C., Schulte, B.A., Wang, G.Y., 2015. Catalase Inhibits Ionizing Radiation-Induced Apoptosis in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells and Development* 24, 1342–1351. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0402>
- Yamaguchi, M., Tataru, Y., Nugraha, E.D., Sato, Y., Miura, T., Hosoda, M., Syaifudin, M., Tokonami, S., Kashiwakura, I., 2022. Serum Proteomic and Oxidative Modification Profiling in Mice Exposed to Total Body X-Irradiation. *Antioxidants* 11, 1710. <https://doi.org/10.3390/antiox11091710>
- Young, S.G., 1990. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation* 82, 1574–1594. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.5.1574>
- Yu, Y., Song, G., 2020. Lipopolysaccharide-Binding Protein and Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Lipid Metabolism and Cardiovascular Diseases. *Adv Exp Med Biol* 1276, 27–35. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8_3
- Yue, J., Lu, H., Liu, J., Berwick, M., Shen, Z., 2012. Filamin-A as a marker and target for DNA damage based cancer therapy. *DNA Repair, DNA damage research in China* 11, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.10.019>
- Zhang, J., Wu, Q., Zhu, L., Xie, S., Tu, L., Yang, Y., Wu, K., Zhao, Y., Wang, Y., Xu, Y., Chen, X., Ma, S., Zhang, S., 2022. SERPINE2/PN-1 regulates the DNA damage response and radioresistance by activating ATM in lung cancer. *Cancer Letters* 524, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.10.001>
- Zhang, L., Kim, M., Choi, Y.H., Goemans, B., Yeung, C., Hu, Z., Zhan, S., Seth, P., Helman, L.J., 1999. Diminished G1 Checkpoint after γ -Irradiation and Altered Cell Cycle Regulation by Insulin-like Growth Factor II Overexpression. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13118–13126. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13118>
- Zhang, Y., Fonslow, B.R., Shan, B., Baek, M.-C., Yates, J.R., 2013. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* 113, 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
- Zhao, Y., Zhang, Y.S., Wang, Y.X., Zhang, M., Shi, H.J., Li, J., 2021. [Effects of Huaihuasan and baitouweng formular on rats with acute radiation proctitis and its mechanism]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 37, 313–317. <https://doi.org/10.12047/j.cjap.6052.2021.016>
- Zhong, Y., Johnson, A.J., Byrd, J.C., Dubovsky, J.A., 2014. Targeting Interleukin-2-Inducible T-cell Kinase (ITK) in T-Cell Related Diseases. *Postdoc J* 2, 1–11.
- Zhou, S., Li, Y., He, L., Chen, M., Li, W., Xiao, T., Guan, J., Qi, Z., Wang, Q., Li, S., Zhou, P., Wang, Z., 2022. Haptoglobin is an early indicator of survival after radiation-induced severe injury and bone marrow transplantation in mice. *Stem Cell Research & Therapy* 13, 461. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03162-x>
- Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.-M., 2009. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics [WWW Document]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1155/2010/840518>
- Zinati-Saeed, S., Shakiba, E., Rahimi, Ziba, Akbari, M., Najafi, F., Bahrehmand, F., Vaisi-Raygani, A., Rahimi, Zohreh, Ebrahimi, A., Rahimi, M., 2020. The Insulin-like Growth Factor-1 (G>A) and 5,10-methylenetetrahydrofolate Reductase (C677T) Gene Variants and the Serum Levels of Insulin-like Growth Factor-1, Insulin, and Homeostasis Model

Assessment in Patients with Acne Vulgaris. *Iran J Pathol* 15, 23–29.
<https://doi.org/10.30699/IJP.2019.105695.2098>

Zweigner, J., Schumann, R.R., Weber, J.R., 2006. The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes and Infection* 8, 946–952.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.10.006>

6 Přehled souvisejících publikačních činností

Kultová, G., Řehulková, H., Myslivcová-Fučíková, A., Tichý, A. Plasma proteins as new biomarkers of irradiation in humans. in: Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie 2019. pardubice: 2019. isbn 978-80-7560-216-9.

Kultová, G. Plasma proteins as new biomarkers of irradiation in humans. Zurich 2019.

Kultová, G., Jeličová, M., Čížková, J., Šinkorová, Z., Tichý, A. Biologická dozimetrie a moderní (-omické) metody. Časopis lékařů českých. 2020, 159 (7-8), 281-285. issn 0008-7335.

Kultová, G., Tichý, A., Řehulková, H., Myslivcová-Fučíková, A. The hunt for radiation biomarkers: current situation. International journal of radiation biology. 2020, 96 (3), 370-382. issn 0955-3002. doi: 10.1080/09553002.2020.1704909

Ostheim, P., Tichý, A., Sirak, I., Davidkova, M., Stastna Markoa, M., Kultova, G., Paunesku, T., Woloschak, G., Majewski, M., Port, M., Abend, M. Overcoming challenges in human saliva gene expression measurements. Sci Rep 10, 11147 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67825-6>

Ostheim, P., Alemu, S.W., Tichý, A., Sirak, I., Markova Stastna, M., Kultova, G., Schuele, S., Paunesku, T., Woloschak, G., Ghandhi, A. S., Amundson, A.S., Haimerl, M., Stroszcynski, C., Port, M., Abend, M. Examining potential confounding factors in gene expression analysis of human saliva and identifying potential housekeeping genes. Sci Rep 12, 2312 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05670-5>

Rydlova, G., Vozandychova, V., Re hulka, P., Re hulko va, H., Sirak, I., Davidkova, Dm., Markova, M., Myslivcova-Fucikova, A., Tichy, A., 2024. Discovering the Radiation Biomarkers in the Plasma of Total-Body Irradiated Leukemia Patients. Radiat Res. <https://doi.org/10.1667/RADE-23-00137.1>

7 Přílohy



Etická komise Ústavu hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
Předseda EK: MUDr. Markéta Šťastná-Marková, CSc.
Tel: +420 221977111, Fax: +420 221977249
e-mail: eticka@uhkt.cz

STANOVISKO ETICKÉ KOMISE KE KLINICKÉMU HODNOCENÍ LÉČIV *Opinion of the Ethics Committee on Clinical Trial on Human Medicinal Products*

- Multicentrické KH, je požadováno stanovisko multicentrické EK pro všechna centra/*Multi-centric clinical trial, opinion issued by Ethics Committee for Multi-Centric Clinical Trials is required*
 Multicentrické KH, je požadováno stanovisko EK pro místní centrum (centra)/ *Multi-centric clinical trial, opinion issued by local Ethics Committee(s) is required*
 KH prováděné v jednom centru, požadováno stanovisko EK pro místní centrum (centra)/ *Clinical trial conducted in a single site, opinion of a local EC is required*

Číslo jednací/Reference number: 10/02/2017

Identifikační číslo KH/EudraCT number: -
Číslo protokolu/Protocol Code Number: -

Zadavatel/Sponsor: Ministerstvo obrany - Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Katedra radiobiologie

Žadatel/Applicant: doc. PharmDr. Aleš Tichý, Ph.D.

Název KH/Full Title of Clinical Trial: **Nové přístupy v diagnostice a terapii ozářených osob/ New approaches in diagnostics and therapy of irradiated personnel**

Datum doručení žádosti/Date of submission of the Application Form: 16.01.2017

Datum jednání EK/Date of Ethics Committee's session: 16.02.2017

U multicentrického KH adresa multicentrické EK, ke které bylo KH předloženo/ For multi-centric clinical trials give address of the Multi-Centric Ethics Committee to which the application was submitted : Etická komise FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

Úhrada nákladů spojených s posouzením žádosti a vydáním stanoviska /Reimbursement of costs related to assessment and issue of the EC opinion:

- Ano/Yes Ne , zdůvodnění/ No, reasons: akademická studie, academic project

Vyjádření EK/ Ethics Committee's opinion:

- EK vydává souhlasné stanovisko/EC issues favourable opinion
 EK vzala na vědomí/Taken into account

Lhůta pro podání písemné zprávy o průběhu KH od jeho zahájení/ Time schedule for submission of the written Annual Report from the CT commencement:

- 1x ročně/Once a year Jiná lhůta/ Other

Seznam míst hodnocení s označením míst, ke kterým se EK vyjádřila jako místní EK a kde vykonává dohled/List of clinical trial sites in the Czech Republic where EC has given its opinion and will perform supervision:

Místo hodnocení/ Jméno zkoušejícího Trial Site / Name of Investigator	Místní EK Local EC	Adresa místní EK Address
Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2 / MUDr. Markéta Marková, CSc	<input checked="" type="checkbox"/>	Etická komise, Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1,

Strana 1 (celkem 2)

Obr. 2.1a Stanovisko etické komise 1. část

	128 20 Praha 2
--	----------------

Seznam hodnocených dokumentů/List of all submitted documents:

Název dokumentu, verze, datum <i>Document title, version, date</i>	Schváleno <i>/Approved</i>		Vzato na vědomí / <i>Taken into account</i>	
	ANO <i>Yes</i>	NE <i>No</i>	ANO <i>Yes</i>	NE <i>No</i>
<i>Submission letter</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Návrh a realizace studie</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Informace pro pacienta</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Informovaný souhlas pacienta</i>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Seznam členů etické komise/ List of the Ethics Committee Members:

Jméno a příjmení <i>First name and surname</i>	Muž/ Žena <i>Male/ Female</i>	Odbornost <i>Specialism</i>	Zaměstnanec zřizovatele EK* <i>Employee of EC</i>		Funkce v EK <i>Role in EC</i>	Přítomen <i>Attendance</i>		Hlasoval <i>Voted</i>	
			Ano <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>		Ano <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>	Ano <i>Yes</i>	Ne <i>No</i>
MUDr. Markéta Šťastná, CSc.	Ž/F	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Předseda/ Chairperson	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
MUDr. Jana Sajdová	Ž/F	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Místopředseda/ Vice-chairperson	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc.	M/M	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RNDr. Marie Dobrovolná	Ž/F	Výzkumník/ Research	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doc. MUDr. Zdeňka Gašová, CSc.	Ž/F	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lenka Havlová	Ž/F	Úředník/Clerk	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
JUDr. Martina Cianci	Ž/F	Právník/Lawyer	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Hana Klamová, CSc.	Ž/F	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Jan Loužil	M/M	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RNDr. Šárka Němečková, CSc.	Ž/F	Výzkumník/ Research	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ivana Picková	Ž/F	Sestra/Nurse	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
MUDr. Antonín Vitek	M/M	Lékař/Physician	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Člen/Member	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

(pozn: *Zaměstnanec zřizovatele EK/ Employee of EC appointing authority)

Etická komise prohlašuje, že byla ustavena a pracuje podle jednacního řádu v souladu se správnou klinickou praxí (GCP) a platnými právními předpisy/The Ethics Committee hereby declares that it was established and operates in accordance with its Rules of Procedure in compliance with Good Clinical Practice and valid legal regulations:

Ano/Yes Ne/No

Komentář/Comments: Mr. Šťastná Marková Markéta, MD, CSc. nehlasující pro účast na studii/ Not Voting as Being Involved in the Study

Datum/Date: 16.02.2017

Rozdělovník/Distribution list:

Žadatel
Archiv
MEK, SUKL

Strana 2 (celkem 2)

MUDr. Markéta Šťastná Marková, CSc.
předsedkyně EK/Chairperson



Obr. 2.1b Stanovisko etické komise 2. část

2



Ministerstvo zemědělství
Odbor živočišných komodit

Spisová značka: 16OZ28119/2015-17214
Č.j.: 69233/2015-MZE-17214

69233/2015-MZE-17214/2



000238420946

Vyřizuje: Mgr. Kateřina Konečná
Telefon: 221812346
E-mail: Katerina.Konecna@mze.cz
ID DS: yphaax8

Adresa: Těšnov 65/17, Nové Město, 110 00 Praha 1

V Praze dne 7. 1. 2016

ROZHODNUTÍ

Ministerstvo zemědělství, odbor živočišných komodit (dále jen „Ministerstvo zemědělství“), které je příslušným orgánem ochrany zvířat k rozhodování o udělení, změně, pozastavení nebo odnětí oprávnění k používání pokusných zvířat podle § 20 odst. 1 písm. g) zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon na ochranu zvířat“), v řízení zahájeném na základě žádosti podané Ministerstvem obrany, zastoupeným ve správním řízení MVDr. Věrou Radochovou, na základě plné moci ze dne 13. 7. 2015, podle ustanovení § 44 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu, v platném znění, na základě ustanovení § 20 odst. 1 písm. g) zákona na ochranu zvířat ve věci žádosti o udělení oprávnění k používání pokusných zvířat rozhodlo takto:

Uděluje se oprávnění k používání pokusných zvířat

podle § 15b, § 20 odst. 1 písm. g) zákona na ochranu zvířat **Ministerstvu obrany, se sídlem Tychonova 221/1, 160 00 Praha 6 - Hradčany, IČ 60162694** (dále jen „žadatel“)

k provozování zařízení

- Centrální vivárium Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové:
 - Vivarium I – místnosti: č. 4 vyšetřovna, č. 7 umývárna, č. 9 sklad, č. 10 ustájení potkanů – 250 ks, č. 11 ustájení myší – 880 ks, č. 12 ustájení myší – 880 ks, č. 13 ustájení králíků a morčat, č. 14b ustájení myší v IVC – 240 ks, č. 14c ustájení potkanů – 250 ks, č. 15 sklad zdravotnického materiálu, č. 19a – sklad krmiv, č. 19b sklad čisté podestýlky;
 - Vivarium II – místnosti: č. 4 přípravná/pitevna, č. 5 sklad krmiv pro prasata, č. 7 sklad zdravotnických materiálů, č. 8 sklad dezinfekce, č. 104 strojovna

S- 2016

Obr. 2.3a Souhlas výboru pro práva zvířat při Ministerstvu obrany ČR 1.část

vzduchotechniky, č. 105 operační sál velký, č. 106 přípravná zvířat, č. 107 operační sál malý, č. 108 sklad léčiv, č. 116 ustájení prasat;

- Vivárium Fakulty vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie a vojenské farmacie, Šimkova 878, 500 38 Hradec Králové, místnosti: č. 2 ustájení myší – 200 ks, č. 3 přípravná, č. 4 ustájení potkanů - 150 ks, č. 5 umývárna, sklad krmiva a sklad podestýlky,

a to na dobu 5 let ode dne právní moci tohoto rozhodnutí,

pro účely podle § 18 odst. 1 písm. a) a f) zákona na ochranu zvířat, tedy:

- základní výzkum,
- vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí,

v zařízení Centrální vivárium Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové:

při použití druhu pokusných zvířat:	hmotnostní kategorie:	při maximálním denním stavu:
myš laboratorní	20 - 25g	2 000 ks
potkan laboratorní	180 – 200g	500 ks
morče domácí	200 – 300g	100 ks
králík domácí	do 5 kg	15 ks
prase domácí	do 150 kg	7 ks
prase domácí	do 100 kg	21 ks,

v zařízení Vivárium Fakulty vojenského zdravotnictví, katedra toxikologie a vojenské farmacie – Šimkova 878, 500 38 Hradec Králové:

při použití druhu pokusných zvířat:	hmotnostní kategorie:	při maximálním denním stavu:
myš laboratorní	20 - 25g	200 ks
potkan laboratorní	180 – 200g	150 ks.

Osobou odpovědnou za péči o pokusná zvířata ve výše uvedeném zařízení je MVDr. Věra Radochová, narozena 27. 2. 1984 v Novém Městě na Moravě, trvale bytem Kvasiny 423, 517 02 Kvasiny, číslo osvědčení o odborné způsobilosti podle § 15d odst. 3 zákona na ochranu zvířat CZ 03013.

Určeným veterinárním lékařem je MVDr. Věra Radochová, narozena 27. 2. 1984 v Novém Městě na Moravě, trvale bytem Kvasiny 423, 517 02 Kvasiny, číslo osvědčení o odborné způsobilosti podle § 15d odst. 3 zákona na ochranu zvířat CZ 03013.

Osobou odpovědnou za dodržování zákona na ochranu zvířat je brigádní generál prof. Ing. Bohuslav Příkryl, Ph.D., narozen 12. 7. 1961 v Kroměříži.

ODŮVODNĚNÍ

Řádně vyplněná žádost o udělení oprávnění k používání pokusných zvířat podle § 15b odst. 1 zákona na ochranu zvířat a podle § 2 odst. 1 vyhlášky č. 419/2012 Sb.,

o ochraně pokusných zvířat (dále jen „vyhláška“), byla Ministerstvu zemědělství doručena dne 23. 9. 2015. Tímto dnem bylo zahájeno správní řízení.

Ministerstvo zemědělství písemně pověřilo k posouzení výše uvedeného zařízení žadatele v souladu s § 15c odst. 5 zákona na ochranu zvířat posuzovatele MVDr. Tomáše Svobodu, CSc. a Andreje Litvince, Ph.D. Posuzovatelé posoudili zařízení žadatele fyzickou kontrolou na místě, včetně stanovené dokumentace, o zjištěných skutečnostech zpracovali písemný posudek, který dne 14. 12. 2015 předložili v souladu s § 15c odst. 6 písm. a) bodem 2 zákona na ochranu zvířat Ministerstvu zemědělství, v posudku doporučili udělení oprávnění k používání pokusných zvířat na dobu 5 let. Posuzovatelé nezjistili závady a nedostatky v předložené dokumentaci ani v technickém vybavení zařízení.

Na základě předložené žádosti, zpracovaného posudku a na základě vyhodnocení spisového materiálu Ministerstvo zemědělství rozhodlo o udělení oprávnění k používání pokusných zvířat žadateli na dobu 5 let, a to vzhledem ke splnění stanovených podmínek chovu a použití pokusných zvířat, které jsou v souladu se zákonem na ochranu zvířat a vyhláškou.

V souladu s ustanovením § 15b odst. 3 zákona na ochranu zvířat bylo žadateli uděleno oprávnění k používání pokusných zvířat na dobu 5 let, neboť se jedná o další udělení oprávnění.

Žadatel nehradil správní poplatek podle položky 74 písm. c) sazebníku poplatků – přílohy k zákonu č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve výši 10.000 Kč, neboť se na něj vztahuje osvobození od poplatku. Podle § 8 odst. 1 písm. a) zákona o správních poplatcích jsou od poplatků osvobozeny státní orgány a státní fondy.

Z výše uvedených důvodů bylo rozhodnuto tak, jak je uvedeno ve výrokové části tohoto rozhodnutí.

Tímto rozhodnutím se nahrazuje rozhodnutí Ministerstva zemědělství ze dne 30. 12. 2010, č.j. 25895/2010-17210, o udělení akreditace Ministerstvu obrany, se sídlem Tychonova 1, 160 00 Praha 6 - Hradčany, IČ 60162694.

Příslušným státním orgánem ke schvalování projektů pokusů výše uvedeného žadatele je v souladu s § 23 odst. 1 zákona na ochranu zvířat Ministerstvo obrany.

POUČENÍ ÚČASTNÍKŮ

Proti tomuto rozhodnutí lze podle § 152 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu, v platném znění, do 15 dnů ode dne oznámení rozhodnutí podat rozklad k ministru zemědělství, a to podáním učiněným u Ministerstva zemědělství – odboru živočišných komodit.

Ing. Jiří Hojer
ředitel odboru

Otisk úředního razítka

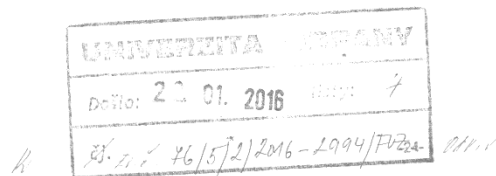
Rozdělovník

1. Účastník řízení – žadatel (datovou schránkou) – Ministerstvo obrany, se sídlem Tychonova 221/1, 160 00 Praha 6 - Hradčany, IČ 60162694, zastoupený MVDr. Věrou Radochovou, ID DS hjaavk (VZ 2994 Hradec Králové)

Dotčené orgány státní správy dle § 15b odst. 5 zákona na ochranu zvířat, kterým se zasílá rozhodnutí o udělení oprávnění na vědomí:

2. Ministerstvo obrany, Sekce podpory MO – Odbor správních činností, Oddělení zdravotních agend, Buzulucká 897, 500 02 Hradec Králové
3. Ústřední vojenský veterinární ústav, Opavská 28, 748 11 Hlučín

Vypraveno dne



69233/2015-MZE-17214

4

Obr. 2.3d Souhlas výboru pro práva zvířat při Ministerstvu obrany ČR 4.část

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / 0G	P-hodnota: 24h / 0G	Relativní poměr: K24h/0h	P-hodnota: 24h / 0h	Funkce
P30043	Flavinová reduktáza (NADPH)	BLVRB	2,587	6,94E-06	0,979	3,17E-01	oxidoreduktáza
P21333	Filamin-A	FLNA	2,223	1,57E-04			oprava dna
P02042	Hemoglobinová podjednotka delta	HBD	1,974	1,28E-03			transport kyslíku
P10124	Serglycin	SRGN	1,964	1,39E-03			regulace sekrece proteáz, apoptóza
P02776	Destičkový faktor 4	PF4	1,889	2,58E-03			chemotakticky působí na neutrofile a monocyty.
P67936	Tropomyosinový alfa-4 řetězec	TPM4	1,857	3,37E-03			regulace kontrakcí příčně pruhozaného svalstva
Q9NZK5	Adenosinová deamináza 2	ADA2	1,788	5,88E-03			regulace buněčné proliferace a diferenciac
P02788	Laktotransferin	LTF	1,755	7,69E-03			antimikrobiální aktivita, vliv na produkci prozánětlivých cytokinů
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	1,676	1,43E-02	1,099	1,54E-01	detoxikace peroxidů
P04040	Kataláza	CAT	1,662	1,60E-02	1,224	3,01E-02	detoxikace peroxidů
P00915	Karbonická anhydráza 1	CA1	1,556	3,57E-02	0,728	1,46E-01	katalytická aktivita
Q15485	Fikolin-2	FCN2	1,512	4,94E-02			imunitní odpověď
P14618	Pyruvát kináza P	PKM	0,604	1,85E-02			ovlivňuje glykolýzu
P01877	Řetězec imunoglobulinu alfa 2	IGHA2/TUBA1A	0,587	1,28E-02			imunitní odpověď
Q08881	Tyrozín-proteinkináza ITK/TSK	ITK	0,349	7,58E-07			cytoprotektivní reakce včetně oprav dna
Q76LX8	Protein obsahující dezintegrinovou a metaloproteinázovou doménu	ADAMTS 13	0,244	3,20E-11			ovlivňuje tvorbu trombů

Tab. 3.3 Vybrané biomarkery lidské plasmy z data setu LFQ1 po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot Kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / 0G	P-hodnota: 24h / 0G	Relativní poměr: K24h/0h	P-hodnota: 24h / 0h	Funkce
P80511	Protein S100-A12	S100A12	11,557	1,98E-02	-	-	regulace zánětlivých procesů a imunitní odpovědi
Q08554	Desmokolin-1	DSC1	7,586	8,35E-13	-	-	adheze buněk
Q8NF91	Nesprin-1	SYNE1	2,590	7,47E-05	-	-	cytoskeletární uspořádání
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	2,589	7,47E-05	-	-	detoxikace peroxidů
P02741	C-reaktivní protein	CRP	2,049	1,16E-04	0,626	-	zánětlivá odpověď
P81605	Dermcidin	DCD	1,910	5,06E-04	-	-	antimikrobiální aktivita
P01040	Cystatin-A	CSTA	1,812	2,96E-02	-	-	adheze buněk
Q9NZT1	Kalmodulinu podobný protein 5	CALML5	1,751	2,60E-03	1,654	-	diferenciace keratinocytů
P18428	Protein vázající lipopolysacharidy	LBP	1,585	1,33E-02	1,021	3,14E-01	vrozená imunitní odpověď
Q13790	Apolipoprotein F	APOF	1,543	1,97E-02	0,912	9,60E-01	regulátor transportu cholesterolu
P55058	Fosfolipidový transférový protein	PLTP	1,543	2,19E-05	0,868	1,67E-01	přenos fosfolipidů
P05543	Globulin vázající tyroxin	SERPINA7	1,527	2,29E-02	0,995	3,99E-01	transportní protein hormonů štítné žlázy
P01031	Komplement C5	C5	1,494	3,11E-02	0,857	1,31E-01	komplementový systém
P08185	Globulin vázající kortikosteroidy	SERPINA6	1,461	4,16E-02	1,014	4,28E-01	transport glukokortikoidů
P05109	Protein S100-A8	S100A8	0,689	4,54E-02	1,144	-	regulace zánětlivých procesů a imunitní odpovědi
P11277	Spektrínový beta řetězec, erytrocytární	SPTB	0,684	4,14E-02	-	-	regulace složek plasmatické membrány
P01857	Řetězec imunoglobulinu gama 1	IGHG1	0,670	3,14E-02	-	-	imunitní odpověď
Q02413	Desmoglein-1	DSG1	0,668	2,99E-02	1,061	-	adheze buněk
P61626	Lysozym C	LYZ	0,654	2,22E-02	1,064	7,23E-01	imunitní odpověď
P16930	Fumarylacetoacetáza	FAH	0,636	1,48E-02	-	-	rozklad tyrosinu

P04406	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	GAPDH	0,623	1,08E-02	-	-	imunitní odpověď
Q9H7P6	Podjednotka 12B multivesikulárního tělíska	MVB12B	0,622	1,07E-02	-	-	regulátor procesu vezikulárního transportu
P68871	Hemoglobinová podjednotka beta	HBB	0,621	1,03E-02	-	-	transport kyslíku
Q86U17	Serpin A11	SERPINA11	0,570	9,09E-03	-	-	Inhibitor serinových proteáz
P69905	Hemoglobinová podjednotka alfa	HBA2	0,558	1,73E-03	1,781	1,74E-01	transport kyslíku
P0DJ19	Sérový amyloid A-2	SAA2	0,501	2,04E-04	-	-	akutní fáze imunitní odpovědi
P02730	Transportní aniontový protein skupiny 3	SCL4A1	0,472	5,49E-05	-	-	katalytická aktivita
P02775	Protein krevních destiček	PPBP	0,456	2,43E-05	0,83	1,48E-01	koagulace
P00918	Karbonická anhydráza 2	CA2	0,438	8,91E-06	-	-	diferenciace osteoklastů
P02776	Destičkový faktor 4	PF4	0,424	3,92E-06	-	-	chemotakticky působí na neutrofile a monocyty. inhibuje proliferaci endoteliálních buněk
P0DJ18	Sérový amyloid A-1	SAA1	0,424	3,94E-06	-	-	akutní fáze imunitní odpovědi
P02042	Hemoglobinová podjednotka delta	HBD	0,398	7,29E-07	-	-	transport kyslíku
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	0,392	4,66E-07	0,606	-	koagulace
P30043	Flavinová reduktáza (NADPH)	BLVRB	0,181	2,85E-11	0,979	3,17E-01	oxidoreduktáza

Tab. 3.4 Vybrané biomarkery lidské plasmy z data setu LFQ2 po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / OG	P-hodnota: 24h / OG	Relativní poměr: K24h/0h	P-hodnota: 24h / 0h	Funkce
Q13093	Destičky aktivující faktor acetyl-hydroláza	PLA2G7	2,022	9,03E-05	-	-	katabolismus fosfolipidů během zánětlivé a oxidativní stresové odpovědi
P00918	Karbonická anhydráza 2	CA2	1,917	3,27E-04	0,872	8,09E-02	diferenciace osteoklastů
Q8WUA8	Tsukushi	TSKU	1,911	3,49E-04	-	-	katabolismus fosfolipidů během zánětlivé a oxidativní stresové odpovědi, hojení ran
P06703	Protein S100-A6	S100A6	1,883	4,89E-04	1,115	4,98E-01	regulace buněčných funkcí, odpověď na stres
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	1,849	7,38E-04	1,099	1,54E-01	detoxikace peroxidů
Q9Y5Y7	Endoteliální receptor kyseliny hyaluronové 1	LYVE1	1,848	7,41E-04	1,085	1,12E-02	usnadňuje adhezi a migraci buněk přes lymfatický endotel
Q15485	Fikolin-2	FCN2	1,795	1,39E-03	-	-	imunitní odpověď
P00915	Karbonická anhydráza 1	CA1	1,762	2,03E-03	0,728	1,46E-01	katalytická aktivita
P11226	Manóza vázající protein C	MBL2	1,651	7,15E-03	1,379	4,51E-01	aktivace lektinové dráhy
P0DUB6	Alfa-amyláza 1A	AMY1A	1,618	1,01E-02	-	-	metabolismus sacharidů
Q9UHG3	Prenylcystein oxidáza 1	PCYOX1	1,602	1,21E-02	-	-	degradace prenylovaných proteinů
P06702	Protein S100-A9	S100A9	1,549	2,12E-02	1,101	2,72E-01	imunitní odpověď, zánětlivé reakce
A6NMY6	Putativní protein podobný anexinu A2	ANXA2P2	1,475	4,45E-02	-	-	vazebný protein, reaguje na tepelný stres
P04406	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza	GAPDH	1,468	4,75E-02	-	-	imunitní odpověď
P04040	Kataláza	CAT	1,463	4,97E-02	1,224	3,01E-02	detoxikace peroxidů
Q9UNW1	Inositol polyfosfát fosfatáza 1	MINPP1	0,749	3,71E-02	1,006	6,45E-01	reguluje buněčné hladiny inositol pentakisfosfátu a inositol hexakisfosfátu
P10645	Chromogranin	CHGA	0,693	1,08E-02	-	-	působí jako vychytávač volných radikálů
P30101	Protein disulfid-izomeráza A3	PDIA3	0,586	3,69E-04	-	-	disulfidické vazby-stabilita proteinů

P01344	Růstový faktor podobný inzulinu II	IGF2	0,418	2,01E-08	1,12	1,97E-01	metabolismus glukózy
--------	---------------------------------------	------	-------	----------	------	----------	----------------------

Tab. 3.5 Vybrané biomarkery lidské plasmy z data setu TMT1 po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / 0G	P-hodnota: 24h / 0G	Relativní poměr: K24h/0h	P-hodnota: 24h / 0h	Funkce
P0DUB6	Alfa-amyláza 1A	AMY1A	3,326	1,80E-13	-	-	metabolismus sacharidů
P02741	C-reaktivní protein	CRP	2,100	1,05E-05	0,626	-	zánětlivá odpověď
P11279	Membránový glykoprotein asociovaný s lyzozomy	LAMP1	1,880	2,20E-04	-	-	imunitní odpověď
Q9NZT1	Kalmodulinu podobný protein 5	CALML5	1,815	5,24E-04	1,654	-	diferenciace keratinocytů
Q9UHG3	Prenylcystein oxidáza 1	PCYOX1	1,679	3,02E-03	-	-	degradace prenylovaných proteinů
Q99969	Protein 2 s receptorem pro kyselinu retinovou	RARRES2	1,594	8,49E-03	-	-	zánětlivá reakce
P01031	Komplement C5	C5	1,586	9,27E-03	0,857	1,31E-01	komplementový systém
Q99650	Onkostatin M specifický receptor podjednotky	OSMR	1,581	9,83E-03	-	-	imunitní odpověď
Q9NZK5	Adenozinová deamináza 2	ADA2	1,549	1,43E-02	-	-	regulace buněčné proliferace a diferenciace
P02743	Sérový amyloid P	APCS	1,545	1,49E-02	0,868	1,67E-01	ochrana amyloidních fibril
P55058	Fosfolipidový transférový protein	PLTP	1,494	2,65E-02	-	-	přenos fosfolipidů
Q13508	Ecto-ADP-ribosyltransferáza 3	ART3	1,490	2,78E-02	-	-	-
P00740	Koagulační faktor IX	F9	1,475	3,30E-02	0,95	4,37E-03	koagulace
Q96S96	Protein vázající fosfatidyletanolamin 4	PEBP4	1,472	3,40E-02	-	-	proliferace a přežívání buněk
P81605	Dermcidin	DCD	1,469	3,49E-02	1,41	1,85E-01	antimikrobiální aktivita
P16157	Ankyrin-1	ANK1	0,775	4,55E-02	-	-	zánětlivá reakce
P61626	Lysozym C	LYZ	0,770	4,11E-02	1,064	7,23E-01	imunitní odpověď
P00918	Karbonická anhydráza 2	CA2	0,751	2,74E-02	0,872	8,09E-02	diferenciace osteoklastů
Q13740	CD166 antigen	ALCAM	0,735	1,89E-02	-	-	Imunitní odpověď

P06702	Protein S100-A9	S100A9	0,732	1,76E-02	1,101	2,72E-01	imunitní odpověď, zánětlivé reakce
P05109	Protein S100-A8	S100A8	0,722	1,38E-02	1,144	-	regulace zánětlivých procesů a imunitní odpovědi
P10720	Destičkový faktor 4	PF4V1	0,721	1,35E-02	-	-	chemotakticky působí na neutrofile a monocyty. Inhibuje proliferaci endoteliálních buněk
P69891	Hemoglobinová podjednotka gama 1	HBG1	0,718	1,26E-02	-	-	transport kyslíku
P00915	Karbonická anhydráza 1	CA1	0,688	5,54E-03	0,728	1,46E-01	katalytická aktivita
Q9BUF5	Tubulinový beta řetězec 6	TUBB6	0,687	5,42E-03	-	-	hlavní složka mikrotubulů
P07996	Thrombospondin 1	THBS1	0,630	8,37E-04	0,606	-	koagulace
P06703	Protein S100-A6	S100A6	0,566	5,59E-05	1,115	4,98E-01	regulace buněčných funkcí, odpověď na stres
P02775	Protein krevních destiček	PPBP	0,562	4,68E-05	0,83	1,48E-01	koagulace

Tab. 3.6 Vybrané biomarkery lidské plasmy z data setu TMT2 po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	TMT2		LFQ2		Relativní poměr: (K24h) / (K0h)	P hodnota: (K24h) / (K0h)
			Relativní poměr: (24h) / (0h)	P hodnota: (24h) / (0h)	Relativní poměr: (24h) / (0h)	P hodnota: (24h) / (0h)		
P02741	C reaktivní protein	CRP	2,1	1,05E-05	2,049	1,16E-04	0,725	1,00E+00
P0DUB6	Alfa amyláza 1A	AMY1A	3,326	1,80E-13	100	1,00E-17	-	-
P11226	Manóza vázající protein C	MBL2	1,229	3,35E-01	1,213	2,99E-01	1,079	4,51E-01
P55058	Fosfolipidový transférový protein	PLTP	1,494	2,65E-02	1,543	1,98E-02	0,868	1,67E-01
P01031	Komplement C5	C5	1,586	9,27E-03	1,494	3,11E-02	0,857	1,31E-01
P24592	Protein vázající inzulinu podobný růstový faktor 6	IGFBP6	1,35	1,18E-01	1,281	1,83E-01	-	-
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB	1,219	3,63E-01	1,225	2,75E-01	0,923	9,86E-01
Q13790	Apolipoprotein F	APOF	1,341	1,28E-01	1,543	1,97E-02	0,956	1,00E+00
P61626	Lysozym C	LYZ	0,77	4,11E-02	0,654	2,22E-02	1,064	7,23E-01
P18428	Lipopolysacharidový vazebný protein	LBP	1,406	6,77E-02	1,585	1,33E-02	1,222	1,40E-01
Q01459	Di-N-acetylchitobiáza	CTBS	1,242	3,03E-01	1,431	1,19E-01	1,006	7,23E-01
O75636	Fikolin-3	FCN3	1,419	5,91E-02	1,377	8,56E-02	1,026	1,00E+00
P29622	Kalistatin	SERPINA4	1,215	3,74E-01	1,234	2,59E-01	1,132	4,52E-01
P04070	Protein C závislý na vitaminu K	PROC	1,261	2,60E-01	1,234	2,59E-01	1,07	8,95E-01
Q15848	Adiponektin	ADIPOQ	1,269	2,43E-01	0,946	7,63E-01	0,669	2,06E-01

Tab. 3.7 Finální biomarkery ozáření z lidské plasmy po zpracování data setů TMT1, TMT2, LFQ1 a LFQ2 1/2 (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	TMT1		LFQ1		Relativní poměr: (K24h) / (K0h)	P hodnota: (K24h) / (K0h)
			Relativní poměr: 24h / 0G	P hodnota: 24h / 0G	Relativní poměr: 24h / 0G	P hodnota: 24h / 0G		
P02741	C reaktivní protein	CRP	1,351	1,39E-01	1,455	7,47E-02	0,725	1,00E+00
P0DUB6	Alfa amyláza 1A	AMY1A	1,618	1,01E-02	1,023	9,01E-01	-	-
P11226	Manóza vázající protein C	MBL2	1,651	7,15E-03	1,274	2,46E-01	1,079	4,51E-01
P55058	Fosfolipidový transférový protein	PLTP	1,453	5,47E-02	1,113	6,03E-01	0,868	1,67E-01
P01031	Komplement C5	C5	1,337	1,56E-01	1,206	3,69E-01	0,857	1,31E-01
P24592	Protein vázající inzulínu podobný růstový faktor 6	IGFBP6	1,287	2,34E-01	1,438	8,37E-02	-	-
P04114	Apolipoprotein B-100	APOB	1,316	1,86E-01	1,246	2,93E-01	0,923	9,86E-01
Q13790	Apolipoprotein F	APOF	1,015	8,06E-01	1,402	1,08E-01	0,956	1,00E+00
P61626	Lysozym C	LYZ	0,955	5,40E-01	0,744	1,68E-01	1,064	7,23E-01
P18428	Lipopolysacharidový vazebný protein	LBP	0,963	5,72E-01	1,219	3,43E-01	1,222	1,40E-01
Q01459	Di-N-acetylchitobiáza	CTBS	1,133	6,77E-01	1,25	2,85E-01	1,006	7,23E-01
O75636	Fikolin-3	FCN3	1,278	2,52E-01	1,096	6,53E-01	1,026	1,00E+00
P29622	Kalistatin	SERPINA4	1,208	4,22E-01	1,131	5,50E-01	1,132	4,52E-01
P04070	Protein C závislý na vitamínu K	PROC	1,404	8,66E-02	1,177	4,33E-01	1,07	8,95E-01
Q15848	Adiponektin	ADIPOQ	1,233	3,54E-01	1,201	3,80E-01	0,669	2,06E-01

Tab. 3.8 Finální biomarkery ozáření z lidské plasmy po zpracování data setů TMT1, TMT2, LFQ1 a LFQ2 2/2 (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / OG	P hodnota: 24h / OG	Funkce
A0A287AIJ3	Glutation peroxidáza	GPX3	1,61	1,97E-03	ochrana před oxidačním poškozením peroxidem vodíku
Q711S8	Sekretovaný fosfoprotein 24	SPP2	1,579	1,97E-03	remodelace kostí
A0A5G2QM19	Peptidáza D	PEPD	1,474	8,98E-02	rozklad dipeptidů na C-konci s prolinovým zbytkem
P18650	Apolipoprotein E	APOE	1,436	3,21E-02	metabolismus lipidů
A0A287AFQ4	Komplement C8	C8G	1,326	4,08E-02	regulace komplementové kaskády, imunitní reakce
A0A286ZYQ3	Fibrinogen 1	FGL1	1,313	8,98E-02	inhibice aktivity antigenně specifických T-buněk
A2SW51	Monocytární diferenciační antigen CD14	CD14	1,275	2,80E-02	imunitní odpověď
P04366	Protein AMBP	AMBP	1,27	2,63E-02	prekurzor proteinu vázající hem
P50447	Alfa-1-antitrypsin	SERPINA1	1,268	2,36E-02	inhibitor serinových proteáz
A0A286ZYZ5	Protein obsahující doménu SERPIN	LOC106504547	1,252	2,63E-02	zabraňuje nebo snižuje aktivitu serinových endopeptidáz
A0A5G2RA87	Properdin	CFP	1,22	3,21E-02	regulace komplementové kaskády, imunitní reakce
A0A286ZT99	Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	ITIH4	1,212	2,63E-02	reakce na akutní zánět
A0A5G2QSF4	Protein C závislý na vitaminu K	PROC	0,889	7,51E-02	koagulace, vazba vápenatých iontů
F1S567	Protein vaskulární buněčné adheze 1	VCAM1	0,754	4,04E-03	imunitní reakce, přesun leukocytů do místa zánětu
K7GQL2	Koagulační faktor XIII A	F13A1	0,745	8,98E-02	koagulace
Q1KS52	Kyselá labilní podjednotka	IGFALS	0,663	3,46E-03	účast na udržení aktivity IGF
A0A287B6M0	Karbonická anhydráza	CA2	0,462	9,40E-02	proliferace hepatocytů
A0A286ZND5	Peroxiredoxin-1	PRDX1	0,425	7,18E-02	redukce peroxidů
I3LQH7	Biliverdin reduktáza B	BLVRB	0,335	8,98E-02	redoxní regulace

Tab. 3.10 Vybrané biomarkery prasečí plasmy z data setu LFQ po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / 0G	P hodnota: 24h / 0G	Funkce
A0A287AWR7	Paraoxonáza	PON1	2,286	2,26E-01	antioxidační účinky
A0A287BM29	Apolipoprotein A IV	APOA4	2,065	3,07E-01	metabolismus lipidů, antioxidační účinky
A0A5G2QEF4	Perilipin 5	PLIN5	2,043	2,77E-01	metabolismus lipidů
Q711S8	Sekretovaný fosfoprotein 24	SPP2	2,014	3,28E-01	remodelace kostí
A0A5G2RIC7	Koagulační faktor XIII A	F13A1	1,983	2,67E-01	koagulace
P16293	Koagulační faktor IX	F9	1,975	2,48E-01	koagulace
P29700	Alfa 2 HS glykoprotein	AHSG	1,813	6,33E-01	imunitní odpověď
A0A287AIM8	Komplement C5A	C5	1,718	2,27E-01	komplementová kaskáda
F1SS24	Fibronektin	FN1	1,640	5,86E-02	buněčná adheze, cytoprotektivní účinek před IZ
A0A5G2R8T9	Komplement C6	C6	1,567	2,93E-01	komplementová kaskáda
P18648	Apolipoprotein A I	APOA1	1,545	4,66E-01	metabolismus lipidů
F1SFI6	Fetuin B	FETUB	1,524	2,60E-01	zánětlivá reakce, resorpce kostí
A0A287AIJ3	Glutathion peroxidáza	GPX3	1,490	6,81E-02	ochrana před oxidačním poškozením peroxidem vodíku
A0A287AYJ8	Serpin F1	SERPINF1	1,479	3,16E-01	inhibice endopeptidáz
A0A287AFQ4	Komplement C8	C8G	1,458	1,18E-01	komplementová kaskáda
K7GQR1	Properdin	CFP	1,456	2,58E-01	komplementová kaskáda
F1RK01	Karboxypeptidáza B2	CPB2	1,448	2,78E-01	hydrolýza proteinů
P18650	Apolipoprotein E	APOE	1,438	2,67E-01	metabolismus lipidů
A0A5K1UCV8	Angiotensin 1	AGT	1,375	3,55E-01	Regulace krevního tlaku
A0A286ZT99	Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce h4	ITIH4	1,354	2,80E-01	odpověď na akutní zánětlivou reakci
Q29545	Inhibitor karbonické anhydrázy	TF	1,353	5,78E-01	inhibice karbonické anhydrázy
F1RMN7	Hemopexin	HPX	1,341	2,47E-01	transport hemu
A0A286ZUY9	Alfa 1B glykoprotein	A1BG	1,324	5,37E-01	imunitní odpověď
F1SFI5	Glykoprotein bohatý na histidin	HRG	1,311	9,79E-01	koagulace, imunitní odpověď
F1RX37	Fibrinogen beta	FGB	1,285	2,83E-02	koagulace

A0A287A6Q0	Protein S závislý na vitaminu K	PROS1	1,281	2,32e-01	metabolismus vápníku
A0A5G2QZH2	Kininogen 1	KNG1	1,266	6,42e-01	koagulace
P04366	Protein AMBP	AMBP	1,252	3,16e-01	prekurzor proteinu vázající hem
F1SIB1	Protrombin	F2	1,230	5,10e-01	koagulace
A0A286ZYZ5	Protein obsahující doménu serpin	LOC106504547	1,221	1,14e-01	inhibice endopeptidáz
P09571	Serotransferin	TF-2	0,782	9,49e-02	transport železa
I3LJW2	Řetězec fibrinogenu gama	FGG	0,765	7,55e-01	složka fibrinogenu
A0A5G2QXX3	Sulfhydryl oxidáza	QSOX1	0,701	9,82e-01	oxidace sulfhydrylových skupin
P50390	Transtyretin	TTR	0,693	1,63e-01	transport tyroxinu
A0A287BRF1	Protein obsahující doménu C1Q	LOC110258309	0,676	7,47e-02	komplementová kaskáda
P50447	Alfa 1 antitrypsin	SERPINA1	0,658	1,22e-01	inhibitor serinových proteáz
A0A287A3T6	Protein obsahující doménu IG	A0A287A3T6	0,588	2,82e-01	imunitní odpověď
A0A5G2QRW3	Hemoglobinová podjednotka beta	-	0,562	6,02e-02	transport kyslíku
F1RGX4	Protein obsahující doménu globin	-	0,506	9,61e-02	imunitní odpověď

Tab 3.11 Vybrané biomarkery prasečí plasmy z data setu TMT1 (H2) po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Uniprot kód	Název	Zkratka	Relativní poměr: 24h / 0G	P hodnota: 24h / 0G	Funkce
F1SS24	Fibronektin	FN1	1,593	1,43E-01	buněčná adheze, cytoprotektivní účinek před IZ
Q8SPS7	Haptoglobin	HP	1,399	7,24E-03	antioxidační účinky, imunitní odpověď
A0A286ZT99	Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	ITIH4	1,340	2,97E-01	odpověď na akutní zánětlivou reakci
Q28833	Von Willebrandův faktor	VWF	1,283	2,43E-01	koagulace
F1SGG3	Cytokeratin 1	KRT1	1,247	4,36E-01	aktivace komplementu
A0A5G2Q7Q6	Protein obsahující doménu Ig	-	1,229	5,13E-01	imunitní odpověď
A0A286ZQJ9	Protein obsahující doménu c1q	LOC110258310	1,228	4,89E-01	komplementová kaskáda
F1RQ75	Faktor IX	F9	1,226	4,03E-01	koagulace
P14477	Fibrinogen beta (fragment)	FGB	1,211	6,36E-01	koagulace
P79263	Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	ITIH4	1,211	6,04E-01	odpověď na akutní zánětlivou reakci
F1RX37	Fibrinogen beta	FGB	1,207	5,66E-02	koagulace
A0A287ASX3	Adiponektin C1Q	ADIPOQ	0,797	1,92E-01	protizánětlivé účinky
A0A287AQ20	Preproprotein	CFI	0,795	9,91E-02	komplementová kaskáda
F1SCF1	Protein obsahující doménu Serpin	SERPINA6	0,755	1,09E-02	inhibice endopeptidáz serinového typu
A0A5G2QRW3	Hemoglobinová podjednotka beta	-	0,582	2,77E-01	transport kyslíku
F1RGX4	Protein obsahující doménu globin	LOC100737768	0,429	1,66E-01	přenos kyslíku do tkání

Tab. 3.12 Vybrané biomarkery prasečí plasmy z data setu TMT2 (H4) po splnění kritérií (www.uniprot.com)

Název	Prasečí plasma			Lidská plasma			
	LFQ	TMT1	TMT2	LFQ1	LFQ2	TMT1	TMT2
Sekretovaný fosfoprotein 24	1,579	2,014	0,886	0,852	1,211	1,224	1,161
Glutation peroxidáza	1,61	1,490	1,013	1,046	1,061	1,145	1,276
Fibronektin		1,640	1,593	0,971	0,967	0,938	0,993
Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	1,212	1,354	1,340		0,972	1,039	1,062
Protein AMBP	1,27	1,252	1,068	1,094	1,125	1,111	1,055
Apolipoprotein E	1,436	1,438	1,082	1,066	0,993	1,050	0,933
Hemoglobinová podjednotka beta		0,562	0,582	1,460	0,621	1,133	0,895
Komplement C8	1,326	1,458	1,034			1,002	
Alfa 2HS glykoprotein		1,813	0,983	0,729	0,850	0,909	0,998
Fetuin B		1,524		0,939	1,010	1,021	1,210
Haptoglobin		0,994	1,399	0,943	1,004	1,078	0,895
Kininogen 1		1,266	0,943	0,921	0,958	0,960	1,061
Paraoxonáza		2,286	0,992				
Protein vaskulární buněčné adheze	0,754			0,886	0,959	0,954	1,015

Tab. 3.14 Relativní poměry u vybraných kandidátů z prasečí plasmy v porovnání s lidskými

Název	Prasečí plasma					Lidská plasma	
	LFQ	TMT1	TMT2	LFQ1	LFQ2	TMT1	TMT2
Sekretovaný fosfoprotein 24	1,97E-03	5,89E-01	7,30E-01	4,60E-01	3,03E-01	8,84E-01	9,40E-01
Glutation peroxidáza	1,97E-03	5,89E-01	4,00E-01	8,19E-01	7,52E-01	9,73E-01	7,78E-01
Fibronektin	2,63E-02	5,89E-01	4,00E-01	8,19E-01	7,52E-01	9,73E-01	7,78E-01
Inhibitor inter-alfa-trypsinu těžkého řetězce H4	2,63E-02	5,89E-01	2,97E-01		8,77E-01	9,85E-01	9,94E-01
Protein AMBP	2,63E-02	5,89E-01	1,43E-01	9,03E-01	8,57E-01	9,40E-01	9,70E-01
Apolipoprotein E	3,21E-02	5,89E-01	2,64E-01	7,50E-01	9,68E-01	9,86E-01	8,48E-01
Hemoglobinová podjednotka beta	2,63E-02	5,89E-01	2,97E-01		8,77E-01	9,85E-01	9,94E-01
Komplement C8	4,08E-02	5,89E-01	9,07E-01			9,77E-01	
Alfa 2HS glykoprotein	2,63E-02	5,89E-01	5,76E-01	6,58E-01	5,29E-01	9,81E-01	9,94E-01
Fetuin B		5,89E-01		7,81E-01	9,57E-01	9,85E-01	8,37E-01
Haptoglobin	3,21E-02	5,89E-01	2,64E-01	7,50E-01	9,68E-01	9,86E-01	8,48E-01
Kininogen 1		8,19E-01	5,55E-01	7,12E-01	8,16E-01	9,40E-01	9,98E-01
Paraoxonáza		5,89E-01	2,77E-01	7,18E-02	1,03E-02	9,73E-01	8,37E-01
Protein vaskulární buněčné adheze	4,04E-03			5,81E-01	8,19E-01	9,40E-01	9,70E-01

Tab. 3.15 P hodnoty u vybraných kandidátů z prasečí plasmy v porovnání s lidskými

Název	Prasečí plasma			Lidská plasma			
	LFQ	TMT1	TMT2	LFQ1	LFQ2	TMT1	TMT2
C reaktivní protein	1,143	1,069	0,918	1,455	2,049	1,351	2,1
Alfa amyláza 1A	0,863			1,023	100	1,618	3,326
Manóza vázající protein C				1,274	1,213	1,651	1,229
Fosfolipidový transférový protein				1,113	1,543	1,453	1,494
Komplement C5	0,934	1,718	1,001	1,206	1,494	1,337	1,586
Protein vázající inzulinu podobný růstový faktor 6				1,438	1,281	1,287	1,35
Apolipoprotein B-100	1,077	1,179	1,175	1,246	1,225	1,316	1,219
Apolipoprotein F	0,633			1,402	1,543	1,015	1,341
Lysozym C	0,705			0,744	0,654	0,955	0,77
Lipopolysacharidový vazebný protein	1,468			1,219	1,585	0,963	1,406
Di-N-acetylchitobiáza				1,25	1,431	1,133	1,242
Fikolin-3				1,096	1,377	1,278	1,419
Kalistatin				1,131	1,234	1,208	1,215
Protein C závislý na vitaminu K	0,889	0,898	0,937	1,177	1,234	1,404	1,261
Adiponektin		1,200	0,797	1,201	0,946	1,233	1,269

Tab. 3.16 Relativní poměry u vybraných kandidátů z lidské plasmy v porovnání s prasečím

Název	Prasečí plasma			Lidská plasma			
	LFQ	TMT1	TMT2	LFQ1	LFQ2	TMT1	TMT2
C reaktivní protein	6,02E-01	9,84E-01	2,70E-01	7,47E-02	1,16E-04	1,39E-01	1,05E-05
Alfa amyláza 1A				9,01E-01	1,00E-17	1,01E-02	1,80E-13
Manóza vázající protein C				2,46E-01	2,99E-01	7,15E-03	3,35E-01
Fosfolipidový transférový protein				6,03E-01	1,98E-02	5,47E-02	2,65E-02
Komplement C5	3,82E-01	2,27E-01	5,31E-01	3,69E-01	3,11E-02	1,56E-01	9,27E-03
Protein vázající inzulínu podobný růstový faktor 6				8,37E-02	1,83E-01	2,34E-01	1,18E-01
Apolipoprotein B-100	8,98E-01	3,86E-02	4,35E-02	2,93E-01	2,75E-01	1,86E-01	3,63E-01
Apolipoprotein F	2,69E-01			1,08E-01	1,97E-02	8,06E-01	1,28E-01
Lysozym C	2,15E-01			1,68E-01	2,22E-02	5,40E-01	4,11E-02
Lipopolysacharidový vazebný protein	2,56E-01			3,43E-01	1,33E-02	5,72E-01	6,77E-02
Di-N-acetylchitobiáza				2,85E-01	1,19E-01	6,77E-01	3,03E-01
Fikolin-3				6,53E-01	8,56E-02	2,52E-01	5,91E-02
Kalistatin				5,50E-01	2,59E-01	4,22E-01	3,74E-01
Protein C závislý na vitamínu K	5,46E-03	8,26E-01	5,13E-01	4,33E-01	2,59E-01	8,66E-02	2,60E-01
Adiponektin		2,06E-01	1,92E-01	3,80E-01	7,63E-01	3,54E-01	2,43E-01

Tab.3.17 P hodnoty u vybraných kandidátů z lidské plasmu v porovnání s prasečími

Prezentace výsledků

28. - 30. 5. 2019 46. ročník konference Průmyslová toxikologie a ekotoxikologie (Kouty nad Desnou)

Kultová, G., Řehulková, H., Myslivcová Fučíková, A., Tichý, A. Plasma proteins as new biomarkers of irradiation in humans. Pardubice: 2019. 2s. ISBN: 978-80-7560-216-9.

22. - 25. 5. 2019 Annual swiss proteomics meeting (Švýcarsko, Ženeva)

Kultová, G., Rehulkova, H., Sirak, I., Davidkova, D., Markova-Stastna, M., Myslivcová Fučíková, A., Tichý, A Plasma proteins as new biomarkers of irradiation in humans. Annual Swiss Proteomics Meeting. Zurich, 2019. 2p

Účast na projektech a financování

Hlavní řešitel

SV 2106/2019 Analýza markerů ozáření v krevní plasmě leukemických pacientů

SV 2108/2020 Cílená proteomická analýza potenciálních markerů ozáření v lidské plasmě

SV 2105/2021 Analýza potenciálních biomarkerů ozáření v leukocytech

Spoluřešitel

2017-2020 (Zakázka VH20172021010 MV ČR) Nové přístupy v diagnostice a terapii ozářených osob

Studijní stáž a vzdělávací kurzy

4.10. – 3. 12. 2021: Doktorská odborná stáž (Nitra, Slovensko), projekt ERASMUS+ Univerzita Konstantina Filozofa v Nitře, Přírodovědecká fakulta, Katedra zoologie a antropologie, mentor: RNDr. Martin Morovič, Ph.D.

8. - 13. 9. 2019: 20. Letní škola hmotnostní spektrometrie Špindlerův mlýn

13. - 18. 9. 2020: 21. Letní škola hmotnostní spektrometrie Srní

2019 AKK Odborné přípravy s laboratorními zvířaty (ČZU, Praha)

2019 AKK Odborné zdravotnické laboratorní metody (Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha)