České vysoké učení technické v Praze

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium přímého a nepřímého účinku ionizujícího záření na spory *Bacillus subtilis* při různých dávkových příkonech

Autor: Bc. Martin Černík

Vedoucí práce: Ing. Luděk Vyšín, Ph.D.

Praha 2022

České vysoké učení technické v Praze

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie Akademický rok **2021/2022**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: **Bc. Martin Černík**

Studijní program: Aplikace přírodních věd

Specializace: Jaderná chemie

Název práce: Studium přímého a nepřímého účinku ionizujícího záření na spory *Bacillus subtilis* při různých dávkových příkonech

(česky)

Název práce: The study of direct and indirect effects of ionizing radiation on *Bacillus subtilis* spores irradiated at various dose rates

(anglicky)

Pokyny pro vypracování:

1. Literární rešerše současného stavu řešení této problematiky ve světě s důrazem na využití laserového plazmatu a urychlovačů nabitých částic jako zdrojů ionizujícího záření umožňujících dosažení vysokých dávkových příkonů.
2. Návrh ozařovacích experimentů poskytujících křivky přežití *Bacillus subtilis* v suspenzích obsahujících různé koncentrace vybraných vychytávačů volných radikálů.
3. Provedení ozařovacích experimentů se sporami *Bacillus subtilis* v lyofilizované formě poskytujících hodnoty decimačních dávek pro ohodnocení podílu přímého účinku ionizujícího záření na radiačním poškození spor.

4. Pomocí různých pokročilých pulzních zdrojů ionizujícího záření bude sledován vliv dávkového příkonu na přímý a nepřímý účinek.
5. Návrh a parametrizace modelu spory *Bacillus subtilis* v simulačním prostředí Geant4 a provedení počítačových simulací ozáření spory elektrony a fotony o různých energiích.

Doporučená literatura:

[1] A. Motl, Úvod do radiační chemie, Skripta FJFI ČVUT, Praha 1990.

[2] T. Alper, Cellular Radiobiology, Cambridge University Press, Cambridge 1979.

[3] F. Herčík a kol., Radiobiologické metody, Academia, Praha 1966.

[4] Radiation Chemistry: Principles and Applications (Eds Farhatazis, M. A. J. Rodgers), VCH Publishers, NY-Weinheim 1987.

[5] W. L. Nicholson et al., Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**(3), 548 (2010).

[6] N. Munakata et al., Inactivation action spectra of *Bacillus* subtilis spores with monochromatic soft X rays (0.1-0.6 nm) of synchrotron radiation, *Radiat. Res.* **131**(1), 72 (1992).

Jméno a pracoviště vedoucího práce:

Ing. Luděk Vyšín, Ph.D., Oddělení radiační a chemické fyziky, Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Na Slovance 2, 182 21 Praha 8; vysin@fzu.cz

Konzultanti:

Doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D. (KJCH FJFI ČVUT),

Ing. Libor Juha, CSc. (FZÚ AV ČR, v.v.i.)

Datum zadání diplomové práce: 20. 10. 2021

Termín odevzdání diplomové práce: 2. 5. 2022

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.

…….

Garant oboru

prof. Ing. Jan John, CSc.

……..

Vedoucí katedry

prof. Ing. Igor Jex, DrSc.

……..

Děkan

V Praze dne 20. října 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci „*Studium přímého a nepřímého účinku ionizujícího záření na spory Bacillus subtilis při různých dávkových příkonech* ” vypracoval samostatně s použitím literatury, která je uvedena na konci práce.

V Praze dne…… Podpis……

Poděkování

Mé největší poděkování patří vedoucímu diplomové práce Ing. Luďku Vyšínovi, Ph.D., který mi byl vždy nápomocný a naučil mě spoustu nových věcí, které využiji v profesním životě.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Liborovi Juhovi, CSc., který mne během sepisování diplomové práce finančně podporoval a umožnil mi vycestovat do Varšavy, kde jsem mohl doplnit experimentální data do této práce.

Velký dík patří také Ing. Daniele Krajčíkové, CSc., která připravila suspenze spor, které byly použity ve všech experimentech.

Rád bych poděkoval RNDr. Imrichu Barákovi, DrSc., za poskytnutí dat z STEM/EDS, díky nimž bylo možné provést simulace ozařování.

Jedním z užitých zdrojů záření v mé práci je mikrotron MT25, proto bych velmi rád poděkoval jeho obsluze, konkrétně Ing. Davidu Chvátilovi a Ing. Václavu Olšanskému za poskytnutý čas k ozařování a za pomoc s experimenty.

Druhým použitým zdrojem záření je zdroj záření ve vodním okně, proto bych rád poděkoval prof. dr hab. inż. Henrykovi Fiedorowiczovi z Vojenské technické univerzity ve Varšavě, který zajistil možnost ozařování na tomto zařízení.

V poslední řadě bych rád poděkoval Bc. Tereze Herokové za korekci při sepisování této práce.

Název práce: Studium přímého a nepřímého účinku ionizujícího záření na spory *Bacillus subtilis* při různých dávkových příkonech.

Autor: Bc. Martin Černík

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Luděk Vyšín, Ph.D.

Abstrakt

Bakteriální spory představují formu jednoho z nejodolnějších organismů v biosféře. Zároveň dokážou být některé kmeny bakteriálních spor pro člověka toxické, což vede k požadavku jejich dostatečné inaktivace či eliminace vhodnými metodami. Jedním z prostředků, jak tohoto cíle dosáhnout je užití ionizujícího či UV záření. Diplomová práce se zabývá studiem interakce ionizujícího záření se sporami kmene *Bacillus subtilis* a vlivem ozařování na míru inaktivace těchto spor při použití různých dávkových příkonů. Teoretická část práce rozebírá popis bakteriálních spor a jejich rezistence vůči ionizujícímu záření. V rešeršní části práci jsou podrobně popsány dosud provedené experimenty s ionizujícím zářením a diskutovány jejich výsledky. Na základě znalosti prvkového rozložení v částech spory *Bacillus subtilis* je představen model bakteriální spory a jejích částí. Pomocí tohoto modelu je simulována interakce ionizujícího záření ve formě fotonů a elektronů se sporou. Výstupem simulací jsou efektivní hmotnostní součinitelé absorpce pro fotony a hmotnostní lineární brzdné schopnosti pro elektrony reprezentující jednotlivé části spory. V experimentální části jsou provedeny ozařovací experimenty s plazmidovou DNA k ověření dávkového rozsahu účinku použitého radikálového vychytávače. Výsledky z těchto měření jsou aplikovány v experimentech s urychlenými elektrony s nízkým dávkovým příkonem, při kterých byly ozařovány suspenze spor spolu s proměnnou koncentrací vychytávače. Pro studium účinku vysokých dávkových příkonů na inaktivaci spor je využit zdroj záření ve vodním okně. Tento zdroj je charakterizován dávkovým příkonem dosahujícím $2{,}9\times10^{11}$ Gy·s^{-1}. Z provedených experimentů jsou zkonstruovány křivky přežití a stanoveny hodnoty decimačních dávek. Rozdílné hodnoty decimačních dávek pro různé použité dávkové příkony jsou diskutovány v závěru práce.

Klíčová slova

Bacillus subtilis, dávkový příkon, Geant4, plazmidová DNA, spory, vodní okno, urychlené elektrony

Abstract

Bacterial spores represent form of one of the most resistant organisms in the biosphere. At the same time, some strains can be toxic to humans, which leads to the requirement for their sufficient inactivation or elimination by appropriate methods. One of the approaches to reach this goal is to use ionizing or UV radiation. Scope of this thesis is to give a description of the interaction of ionizing radiation with spores of *Bacillus subtilis* strain and the effect of irradiation on the extent of inactivation of these spores by using different dose rates. The theoretical part of the thesis describes bacterial spores and their resistance to ionizing radiation. The research part of the thesis gives detailed description of the experiments that has been conducted to date using ionizing radiation and discusses their results. Based on the knowledge of the elemental distribution in the components of *Bacillus subtilis*, a model of the bacterial spore and its parts is presented. Using this model, the interaction of ionizing radiation in the form of photons with the spore model is simulated. The output of this simulation represents effective mass photo absorption coefficients for photons and mass stopping power coefficients for electrons for the spore components. In the experimental part, irradiation experiments with plasmid DNA are performed to verify the dose ranges of the effect of the radical scavenger used. Results from these measurements are applied in experiments using accelerated electrons with low dose rates in which spore suspensions were irradiated along with variable concentrations of the scavenger. To study the effect of high dose rates on the spore inactivation a source with the emission in the water window is used. This source is characterized by a dose rate reaching 2.9×10^{11} Gy·s^{-1}. From the experiments performed, survival curves are constructed, and decimation dose values are determined. The different values of the decimation doses for the different dose rates used are discussed in the conclusion of the thesis.

Keywords

Bacillus subtilis, dose rate, Geant4, plasmid DNA, spores, water window, accelerated electrons

Obsah

1 Úvod 12
2 Teoretická část 13
2.1. Interakce ionizujícího záření s hmotou 13
2.1.1. Teorie stop 13
2.1.2. Interakce fotonů s hmotou 13
2.1.3. Radiolýza vody 15
2.1.4. Chemická dozimetrie 16
2.1.5. Přímý a nepřímý účinek 18
2.2. Bakteriální spora 19
2.3. Morfologie spory 22
2.4. Rezistence spor *B. subtilis* 24
2.4.1. Gama záření 24
2.4.2. Ultrafialové záření 24
2.5. Zásahová teorie a křivky přežití 25
2.6. Současný stav problematiky 27
2.6.1. UV a extrémní ultrafialové záření 27
2.6.2. Gama a rentgenové záření 29
2.6.3. Urychlené elektrony 31
2.7. Plazmidová DNA 32
2.7.1. Gelová elektroforéza 34
3 Experimentální část 37
3.1. Simulace ozařování 37
3.1.1. Model spory 37
3.1.2. Simulace ozařování fotony 39
3.1.3. Simulace ozařování elektrony 42
3.2. Použité přístroje, materiály a metody 44
3.2.1. Zdroj urychlených elektronů 44
3.2.2. Zdroj gama záření 44
3.2.3. Zdroj záření ve vodním okně 45
3.2.4. Ostatní přístroje a zařízení 48
3.2.5. Použité chemikálie 48
3.3. Metodické postupy 48
3.3.1. Příprava zásobního roztoku spor 49
3.3.2. Stanovení koncentrace zásobního roztoku spor 49
3.3.3. Příprava zásobních roztoků 50
3.4. Vyhodnocení 51

3.4.1. Smývání 51
3.4.2. Očkování 51
3.4.3. Gelová elektroforéza 52
3.5. Charakterizace zdrojů 53
3.5.1. Gammacell GC 220 53
3.5.2. Mikrotron MT25 54
3.5.3. Zdroj záření ve vodním okně 55
3.6. Ozařovací experimenty 56
3.6.1. Plazmidová DNA v prostředí vychytávače OH radikálů 56
3.6.2. Spory v prostředí vychytávače OH radikálů 58
3.6.3. Ozařování spor vysokým dávkovým příkonem 58
4 Výsledky a diskuse 60
4.1. Plazmidová DNA v prostředí vychytávače OH radikálů 60
4.2. Spory v prostředí vychytávače OH radikálů 62
4.3. Ozařování vysokým dávkovým příkonem 65
5 Závěr 68
6 Použitá literatura 70

Seznam použitých zkratek

CFU – Z anglického „Colony Forming Units“, počet jednotek tvořící kolonie

DPA – Kyselina dipikolinová (pyridin-2,6-dikarboxylová kyselina)

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

SP – Z anglického „Spore Photoproduct“ (thyminyl-thymin addukt)

SASP – Z anglického „Small Acid-Soluble Proteins“ (malé, v kyselině rozpustné proteiny typu α/β)

UV – Ultrafialové záření a jeho dělení

UV-A (315-400 nm)

UV-B (280-315 nm)

UV-C (100-280 nm)

STEM/EDS – Z anglického „Scanning Transmission Electron Microscopy/Energy Dispersion Spectroscopy“ (transmisní elektronová mikroskopie s energiově disperzní spektroskopií)

SSB a DSB – jednoduchý a dvojný zlom

1 Úvod

V potravinářském, medicinském a vědním odvětví je kladen důraz na sterilitu prostředí, která dopomáhá ke správnému provedení ozkoušených postupů. Některé kontaminanty lze eliminovat technologicky jednoduchými procesy, ale existují takové, které odolávají nepříznivým podmínkám po velmi dlouho dobu. Jedním ze zástupců této kategorie jsou bakterie, které jsou schopné vytvářet spory. Spora je dormantní fáze bakterie, vznikající v případě nedostatku nutrientů v okolí bakterií, která se projevuje utlumeným metabolismem a nízkým obsahem vody, díky čemuž je schopná odolávat nepříznivým podmínkám.

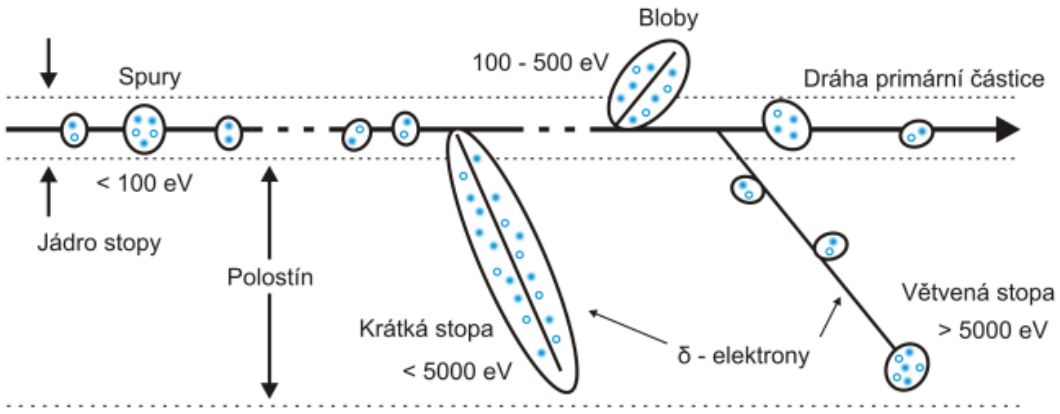
Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši studia inaktivace bakteriálních spor, především *Bacillus subtilis*, různými ozařovacími technikami a ozařovacími podmínkami, provést počítačové simulace depozice energie záření v jednotlivých částech spory, ozářit divoký kmen *B. subtilis* různými dostupnými druhy záření a z naměřených výsledků zkonstruovat křivky přežití.

2 Teoretická část

2.1. Interakce ionizujícího záření s hmotou

2.1.1. Teorie stop

Nabitá částice, která prolétá daným prostředím předává svoji energii do okolí po kvantech, takže podél její dráhy vzniká prostor s vysokou hustotou excitací a ionizací, při kterých vznikají sekundární elektrony, které získanou energii předávají dál do okolí. Taková dráha částice v prostředí se obecně nazývá stopa. Přenos energie probíhá v různých energetických rozsazích, které lze dělit na: spury (od 6 do 100 eV), bloby (100 až 500 eV) a krátké stopy (500 až 5000 eV). Při předání většího množství energie než 5 keV dochází ke vzniku sekundárního elektronu vytvářejícího vlastní stopu, která se označuje jako větvená stopa [1]. Jednotlivé útvary jsou zobrazeny na Obr. 1.

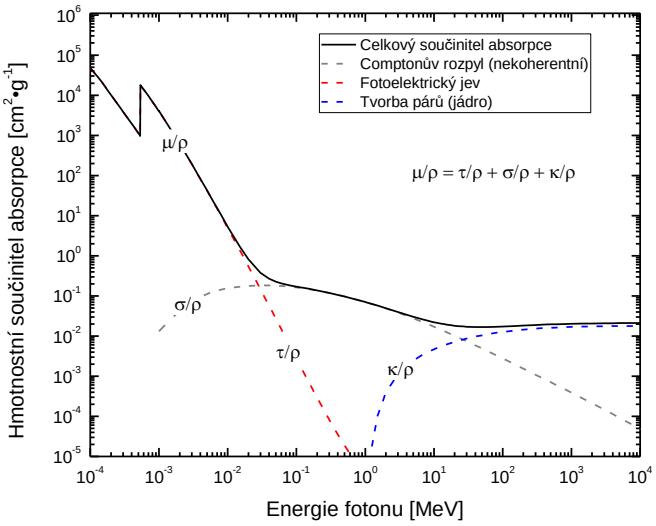


Obr. 1: Schéma stopy nabité částice v prostředí. Převzato z [2].

Z Obr. 1 je patrné, že v závislosti na velikosti předané energie ve stopě se odvíjí dráha doletu sekundárních elektronů. V případě krátkých stop se sekundární elektrony nazývají delta elektrony a jsou schopny dále v prostředí vytvářet svou vlastní stopu, podobně jako primární částice, avšak pouze ve velmi omezené míře, kvůli nízké absorbované energii. U blobů sekundární elektrony získávají dostatečnou energii k ionizace okolí, avšak nově uvolněné elektrony ztrácí energii nedaleko místa vzniku, a tím se objem blobů značně snižuje. Spury jsou objemově nejmenší entity, u kterých dochází pouze k ionizaci od primární částice. Dle Mozumder a Magee [3] v případě interakce elektronu o energii 1 MeV s prostředím 65 % energie vytvoří spury, 15 % bloby a 20 % krátké stopy.

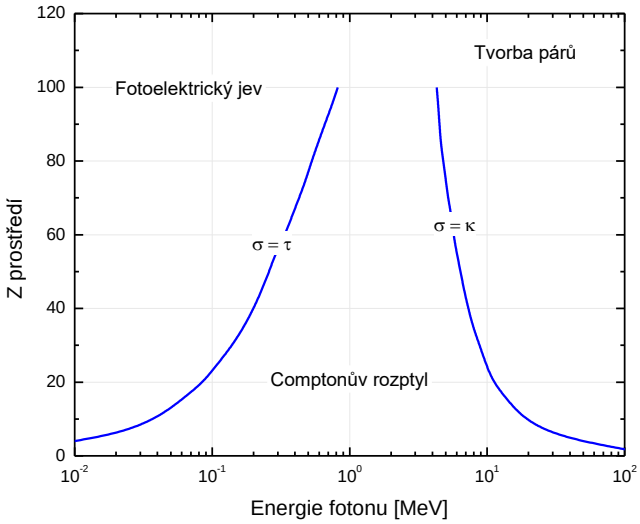
2.1.2. Interakce fotonů s hmotou

Interakce fotonového záření nebo nabité částice s prostředím vede k široké škále procesů, které jsou principiálně založené na předání kinetické energie okolí. U fotonů o energiích v oblastech extrémního ultrafialového, měkkého a tvrdého rentgenového nebo záření gama dochází k předání kinetické energie třemi procesy. Jedná se o fotoelektrický jev (tzv. fotoefekt), Comptonův rozptyl a tvorba elektron-pozitronového páru. Energie se primárně předává interakcemi fotonů s elektrony, které jsou vázány v prostředí, přičemž při fotoefektu a tvorbě párů se interagující foton úplně absorbuje. K vychýlení fotonu a následnému poklesu jeho energie dochází při Comptonově rozptylu nepružnou srážkou s elektronem. Celkové zastoupení těchto procesů v elektromagnetickém spektru je znázorněno pomocí jejich hmotnostních součinitelů absorpce na Obr. 2.



Obr. 2: Průběh hmotnostních součinitelů absorpce ve vodě v závislosti na energii dopadajících fotonů.

Z Obr. 2 je patrné, že celkový hmotnostní součinitel absorpce je tvořen příspěvky jednotlivých procesů. Pro prvky o různém protonovém čísle *Z* lze na základě průsečíků hmotnostního součinitele absorpce prvků pro jednotlivé procesy vytvořit závislost, z níž je možné rozhodnout, který z procesů bude pro danou energii fotonu dominantní. Takováto závislost je uvedena na Obr. 3.



Obr. 3: Hraniční oblasti protonového čísla *Z* a energie fotonu oddělující dominantní procesy absorpce.

Z pohledu zdrojů záření užitých v praktické části této práce je důležité se zaměřit pouze na fotoelektrický jev.

Fotoefekt je dominantním procesem v oblasti extrémního ultrafialového a měkkého rentgenového záření. Pokud energie dopadajícího fotonu je rovna či přesahuje vazebnou energii elektronu, vede tato interakce k emisi daného elektronu z jeho orbitalu do oblasti kontinua. Vyražený elektron (fotoelektron) opouští orbital s kinetickou energií rovnou rozdílu energie dopadajícího fotonu a jeho vazebné energie. V případě, že je elektron vyražen fotonem z atomu a navíc opouští povrch ozařovaného materiálu, je třeba ještě od jeho výsledné kinetické energie potřeba odečíst tzv. výstupní práci elektronu, kterou lze definovat jako energii potřebnou pro přenos elektronu z materiálu do vakua [2]. Vakantní místo v orbitalu je rychle zaplněno elektronem z vyšších orbitalů elektronového obalu za současné emise charakteristického záření (fluorescence) či emise Augerova elektronu. Tyto dva procesy si mezi sebou

konkurují a jsou závislé od protonového čísla *Z* atomu, ve kterém probíhají. Pro materiály o nízkém *Z* (2-30) je dominantním procesem emise Augerova elektronu.

2.1.3. Radiolýza vody

Většina roztoků a živých systému obsahuje ve vysokém procentuálním zastoupení kapalnou vodu, díky čemuž se dostala voda do popředí zájmu studia radiačních chemie. Interakcí ionizujícího záření s vodou vede k její radiolýze. Obecně je radiolýza definována jako radiačně chemický proces, při kterém dochází, vlivem účinku záření, k rozkladným chemickým reakcím ve studovaném systému a následnému vzniku nové chemické látky [4].

Při seznamování s radiolýzou vody je vhodné také definovat měřítko chemických změn způsobených účinkem ionizujícího záření, tzv. radiačně chemický výtěžek. Radiačně chemický výtěžek lze definovat vztahem:

$$G\,(x) = \frac{n\,(x)}{\bar{\varepsilon}}, \tag{1}$$

kde *G* (x) [mol·J^{-1}] je radiačně chemický výtěžek, *n* (x) [mol] je látkové množství entit *x*, u kterých došlo k nějaké změně předáním středního množství energie $\bar{\varepsilon}$ [J] [2].

Radiolýza vody se časově rozděluje do tří po sobě následujících fází, podle procesů, které zrovna probíhají, přičemž celý proces lze zapsat souhrnně:

$$H_2O \rightarrow\ e_{aq}^{-}, HO\cdot, H\cdot, H_2O_2, H_3O^+, OH^-, H_2, HO_2\cdot, \tag{2}$$

kde e^-_{aq}, H· a HO· jsou považovány za nejvíce reaktivní produkty.

První fáze se nazývá fyzikální a probíhá do 10^{-15} s od počátku radiolýzy. Tato fáze se vyznačuje počáteční ionizací, ukládáním energie a následnou rychlou relaxací molekul. Během této fáze vznikají ionizované molekuly vody (H_2O^+), excitované molekuly vody (H_2O^*) a volné elektrony (e^-).

Následuje fyzikálně-chemická fáze, která probíhá v čase 10^{-15} až 10^{-12} s po interakci. Během fyzikálně-chemické fáze dojde k solvataci volného elektronu z fyzikální fáze:

$$e^- \rightarrow\ e_{aq}^{-}, \tag{3}$$

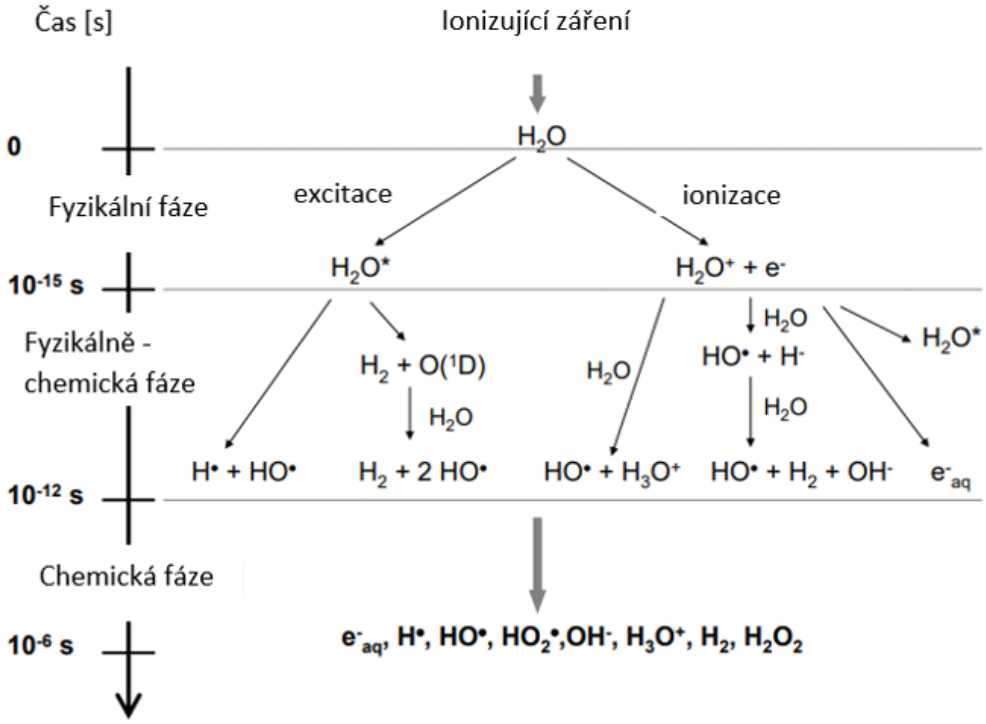
k iontově-molekulové reakci ionizovaných molekul:

$$H_2O^+ +\ H_2O \rightarrow\ \ HO\cdot + H_3O^+ \tag{4}$$

a disociaci excitovaných molekul:

$$H_2O^* \rightarrow\ \ HO\cdot + H\cdot. \tag{5}$$

Poslední fáze trvající 10^{-12} až 10^{-6} s se nazývá chemická. Látky v této fázi reagují sami se sebou ve stopách, ze kterých následně difundují do roztoku, kde mohou reagovat s okolními molekulami. Celkové schéma radiolýzy vody je znázorněno na Obr. 4 [5].



Obr. 4: Schéma radiolýzy vody. Přeloženo z [5].

Schéma na Obr. 4 lze považovat pouze za orientační, protože radiolýza vody je závislá na pH, teplotě, přítomnosti kyslíku a jiných faktorech, které vedou k rozdílům dílčích reakcí, avšak primární výtěžky produktů radiolýzy jsou v rozpětí pH 2-12 konstantní [6].

Například rozdílné reakce lze pozorovat v kyselém prostředí, kde dochází k rychlé reakci oxoniového iontu se solvatovaným elektronem dle rovnice

$$e_{aq}^{-} + H_3O^{+} \rightarrow H\cdot + H_2O. \qquad (6)$$

Tuto extrémně rychlou reakci, jejíž rychlostní konstanta dosahuje $2{,}3\times10^{10}$ $M^{-1}\cdot s^{-1}$ využívá např. Frickeho dozimetr, o kterém se v textu práce zmíním později [7].

2.1.4. Chemická dozimetrie

Ke stanovení deponované dávky ionizujícím zářením v materiálu jsou v radiační chemii využívány různé dozimetrické metody. Jednou z takovýchto metod je využití chemických systémů, ve kterých po absorpci ionizujícího záření dochází ke vzniku definovaných reakcí. Tyto systémy se nazývají chemické dozimetry. Aby bylo možné takovéto dozimetry ke sledovaní deponované dávky použít, je vhodné, aby byl radiačně chemický výtěžek konstantní neboli koncentrace produktů radiolýzy lineárně rostla s absorbovanou dávkou. V případě, že by tato podmínka nebyla splněna, je nutné nejprve vytvořit kalibrační křivku, pomocí které lze následně daný dozimetr kalibrovat. Přestože byla objevena velká řada takovýchto chemických systémů, použití některých z nich komplikují faktory, jako např.: teplotní stabilita produktu, dávkový rozsah detekce a stabilita radiačně chemického výtěžku vůči koncentraci primární složky [8]. Vhodným chemickým dozimetrem, jenž splňuje výše zmíněné podmínky a není ovlivněn komplikujícími faktory je Frickeho dozimetr.

Frickeho dozimetr je jedním z nejvíce využívaných chemických dozimetrů vůbec. Proces detekce je založen na principu oxidace železnatých iontů (Fe^{2+}) na železité (Fe^{3+}) v kyselém prostředí vlivem absorpce ionizujícího záření v roztoku dozimetru. Celý proces je možné zjednodušeně popsat následujícími reakcemi [9]:

$$\begin{matrix} OH + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{-}\,, \\ OH^{-} + H^{+} \rightarrow H_2O\,, \end{matrix} \tag{7}$$

$$\begin{matrix} HO_2 \cdot + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO_2^{-}, \\ HO_2^{-} + H^{+} \rightarrow H_2O_2, \end{matrix} \tag{8}$$

$$\begin{matrix} H_2O_2, + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + HO \cdot + OH^{-}\,, \\ OH^{-} + H^{+} \rightarrow H_2O, \end{matrix} \tag{9}$$

$$H \cdot + O_2 \rightarrow HO_2 \cdot \tag{10}$$

Přičemž je bráno v potaz, že veškeré e^-_{aq} zreagují s volnými protony v nadbytku za vzniku vodíkového atomu, viz reakce č. (6). Podle poslední uvedené reakce je důležité, aby byl dozimetr dostatečně nasycen vzdušným kyslíkem.

Koncentraci vzniklých železitých iontů je následně možné spektrofotometricky zjistit měřením absorbance při vlnové délce 304 nm.

Pro výpočet radiačně-chemického výtěžku železitých iontů Frickeho dozimetru, který je nasycený kyslíkem lze použít rovnici:

$$G\,(Fe^{3+}) = 2\,G(H_2O_2) + 3[G(H\cdot) + G(HO_2\cdot) + G(e^-_{aq})\,] + G(HO\cdot), \tag{11}$$

V případě elektronů o energii 15 MeV, které byly použity v této práci, jsem použil hodnotu výtěžku železitých iontů 1,6 μmol·J^{-1} [10].

Standardně připravovaný Frickeho dozimetr obsahuje 1mM $FeSO_4$; 1mM NaCl, a 0,4M H_2SO_4. Před použitím je vhodné roztok dostatečně dlouho promíchat se vzduchem, aby došlo k nasycení vzdušným kyslíkem, který je esenciální pro samotný proces detekce. Takto připravený dozimetr je schopný detekovat v pracovním rozpětí dávek 5-400 Gy, pro dávkový příkon dosahující hodnoty 10^6 Gy·s^{-1}. Největší nevýhodou Frickeho dozimetru je vysoká citlivost na nečistoty, které mohou být v roztoku přítomny, a které působí jako vychytávače hydroxylových radikálů, což vede k nelineární odezvě na dávku. Tuto nelinearitu je možné eliminovat filtrací dozimetru po jeho připravení [11], nebo případným předozářením na několik desítek Gy.

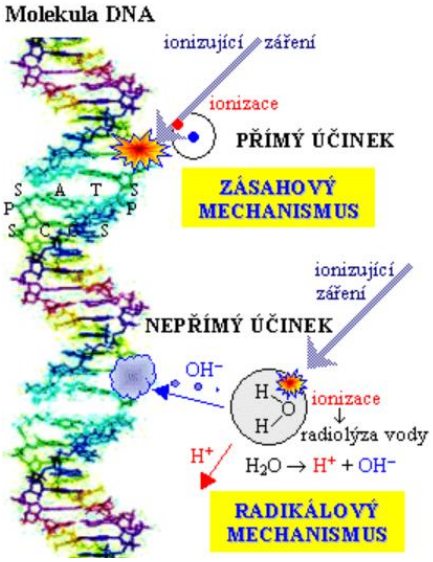
Pro výpočet dávky *D* [Gy], která byla deponovaná v daném objemu Frickeho dozimetru lze použít vztah

$$D = \frac{N_a(A - A_0)}{\varepsilon_{Fe^{3+}} G(Fe^{3+}) f \rho l}, \tag{12}$$

kde *A* je absorbance ozářeného roztoku; A_0 je absorbance neozářeného roztoku; $\varepsilon_{Fe^{3+}}$ jsou molární absorpční koeficienty Fe^{3+} iontů (ε_{Fe3+} = 2164 dm^3·mol^{-1}·cm^{-1} při 304 nm); f je převodní koeficient (6,24·10^{18} eV·J^{-1}); ρ je hustota roztoku (1,024 g·cm^{-3}) a *l* je optická dráha kyvety [cm] (běžně 1 cm).

2.1.5. Přímý a nepřímý účinek

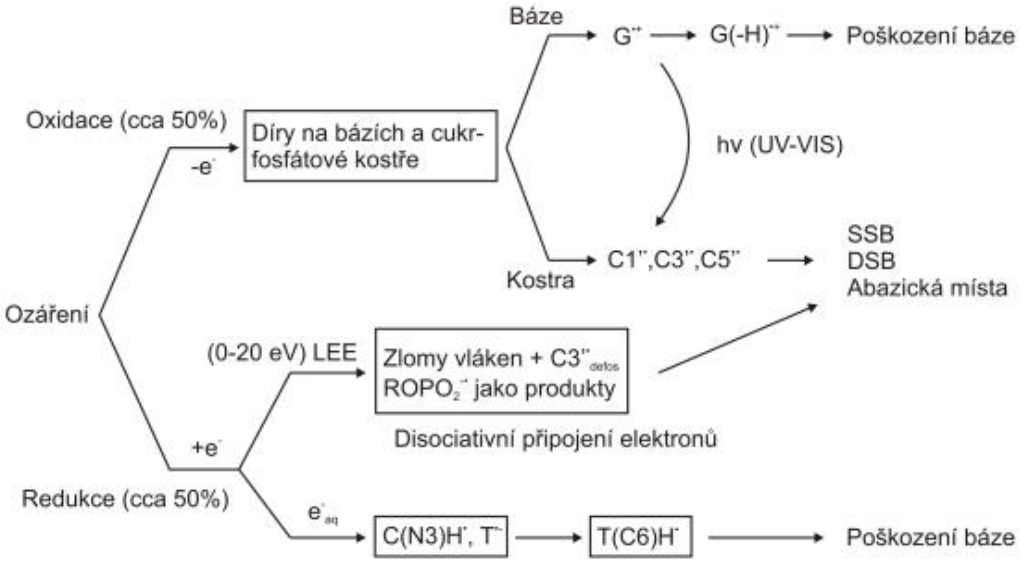
V případě poškození buněk ionizujícím zářením je nutné rozlišovat původce poškození. K depozici energie sice dochází principiálně stejně, pomocí excitací a ionizací, ale rozdíl je v koncovém akceptoru, kterým může být prostředí nebo přímo biologická entita. Pokud depozice energie probíhá ve vodním prostředí, dochází ke vzniku radikálů, tak jak bylo popsáno výše, které následně mohou vstupovat do reakcí, které vedou k poškození nebo modifikaci biologicky aktivních molekul. V takovém případě hovoříme o nepřímém účinku záření, též někdy označovaném jako radikálový mechanismus. V případě, že k depozici energie a následné modifikaci dojde přímo v entitě, jedná se o účinek přímý, někdy označovaný jako zásahový mechanismus. K lepšímu pochopení je problematika graficky zpracována na Obr. 5 pomocí účinků na molekulu DNA.



Obr. 5: Schéma přímého a nepřímého účinku. Převzato z [12].

Jak je patrné z Obr. 5, vlivem přímého účinku došlo k ionizaci na řetězci DNA, která může vést k modifikacím bází či fosfátové kostry. V případě nepřímého účinku způsobují poškození především hydroxylové radikály.

Přímý účinek lze rozdělit na dvě možné cesty poškození, podle procesů, které probíhají. Prvním z nich je tzv. oxidační cesta, která probíhá na principu vzniku páru volného elektronu a díry, zatímco druhá tzv. redukční funguje na principu elektronového záchytu. Obě cesty jsou znázorněny na Obr. 6.



Obr. 6: Oxidační a redukční cesta poškození DNA přímým účinkem. Převzato z [2].

Ke vzniku oxidační cesty dochází (horní větev na Obr. 6) během ozařování DNA, kdy lze pozorovat ionizaci na všech bázích a cukr-fosfátových kostrách, kde dojde k uvolnění elektronu a vzniku díry. V případě bází dochází k rychlému transportu děr směrem k bázi s nejnižší ionizační energií (guaninu), kde se díry stabilizují a báze tímto poškozují. Díry, které vznikají na cukr-fosfátových kostrách, způsobují deprotonaci deoxyribózy jako konkurenční reakce k transportu po bázích. Poškození cukr-fosfátové kostry může vést k jednoduchým (SSB) a dvojným (DSB) zlomům, popřípadě k tvorbě abazického místa [13].

Druhým typem je cesta redukční (spodní větev na Obr. 6), při které dochází k vazbě elektronu na DNA. V závislosti na konečném akceptoru a energii elektronu lze rozlišovat dva možné případy. V prvním případě je elektron zachycen bázemi s největší elektronovou afinitou, což je thymin a cytosin. Redukcí těchto bází vznikají jejich aniontové radikály, které vedou k jejich poškození. Druhý případ platí pouze pro elektrony o nižší energii (0-10 eV), které se zachycují na cukr-fosfátové kostře, kde dochází k tzv. disociativnímu záchytu elektronu, který následně způsobuje SSB [13].

Tím, že je DNA obklopena vodním prostředím, je vhodné stanovit poměr efektivnosti inhibice DNA mezi přímým a nepřímým účinkem. Pomocí matematického modelu [14] bylo odhadnuto, že 31 % poškození DNA v buňce je způsobeno přímým účinkem. Model je však nutné zpřesnit, protože je v něm započítán vliv hydratovaného elektronu, který je v běžném prostředí pohlcen kyslíkem za vzniku kyslíkového aniontu O_2^-. Po korekci bylo stanoveno zastoupení přímého účinku na 45 %.

Z hlediska nepřímého účinku je tedy dobré se zaměřit především na hydroxylové radikály, které jsou zodpovědné za většinu poškození. Poškození probíhá odtržením vodíku na libovolném uhlíku deoxyribózy, díky čemuž mohou vznikat SSB a DSB [15].

2.2. Bakteriální spora

Při vzniku nepříznivých podmínek pro růst a množení bakterií může u některých druhů docházet k tzv. sporulaci. Sporulace je proces přechodu bakterie z fyziologicky aktivní - vegetativní buňky na spící - dormantní, která se vyznačuje utlumeným metabolismem a vysokou odolností vůči vnějším vlivům [16]. V tomto stádiu jsou buňky schopny přežít velmi dlouho dobu (až miliony let) bez potřeby vnějších nutrientů [17]. Je to dáno tím, že neprodukují žádné vysoce energetické složky jako je například

adenozintrifosfát (ATP) nebo redukovanou formu nikotinamidadenindinukleotidu (NADH) a nevykazují žádnou metabolickou, či enzymatickou aktivitu [18].

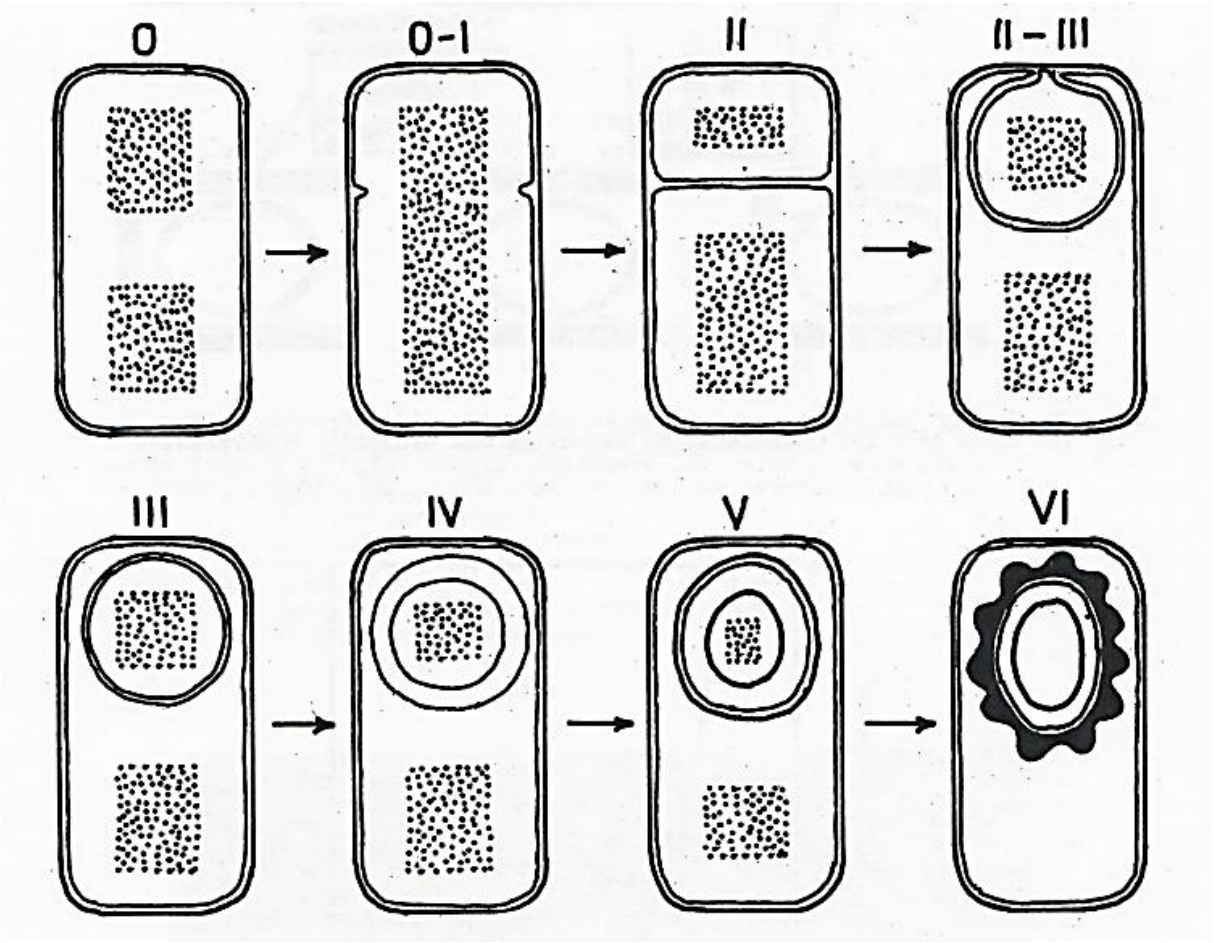
U bakterií je možné rozlišovat dvě základní klidové formy – endospory, vznikající uvnitř mateřské buňky, která po vytvoření endospory zaniká a exospory, které vznikají z vnějšku mateřské buňky [16]. V rámci této práce se budu zabývat pouze endosporami. Endospory vytváří především zástupci rodů *Bacillus, Clostridium* a *Desulfotomaculum*, které patří do bakteriálního kmene Firmicutes. Někteří zástupci z těchto rodů jsou patogenní, např. *Bacillus anthracis, B. cereus, Clostridium difficile* a *C. botulinum*, zatímco jiní, jako např. *B. subtilis* nebo *C. acetobutylicum* známky patogenity nevykazují [19].

B. subtilis je gram pozitivní rod nepatogenních bakterií tvořící endospory, vyznačující se vysokou odolností vůči teplu a ostatním nepříznivým vlivům. Lze je nalézt například v půdě, nebo trávicí soustavě přežvýkavců a lidí. Rod *B. subtilis* byl pojmenován v roce 1872 Ferdinandem Cohnem, který demonstroval schopnost tvořit tepelně odolné spory. Dodnes bylo pozorováno a posbíráno několik stovek kmenů *B. subtilis.*, které jsou schopny produkovat přes dvě desítky unikátních antibiotik [20], [21].

B. subtilis může růst v prostředí s minimálním obsahem potřebných nutrientů, mezi které patří esenciální soli, uhlík, dusík a fosfor. Jako zdroj uhlíku mohou posloužit jednoduché a složité cukry, cukerné alkoholy, popřípadě aminokyseliny. Jako zdroj dusíku pak slouží nitráty, močovina, ale také již zmíněné aminokyseliny. Jako zdroj fosforu slouží především fosforečnany. Díky těmto nenáročným vlastnostem se v laboratorním prostředí ke kultivaci používají živná média obsahující jako základ přírodní polysacharid (agar) s příměsí živných látek. Jedním ze zástupců může být například LB agar obsahující polypeptid pepton, kvasnicový extrakt a chlorid sodný. Kultivace *B. subtilis* na LB agaru probíhá při teplotách okolo 35 °C.

Aby mohla být zajištěna životaschopnost a reprodukce organismu je nutné zajistit příjem nezbytných živin. V případě *B. subtilis* dochází k přijímaní nutrientů z okolí pomocí transportního systému skládajícího se z několika kanálů v buněčné stěně. Přenos cukrů přes buněčnou stěnu zajišťuje především fosfotransferázový systém tvořený lipoproteiny a je doprovázen fosforylací přenášených látek. Průchod kationtů přes buněčnou stěnu je řízen elektrochemickým gradientem, který je orientovaný směrem dovnitř buňky, kde se nachází parciální negativní náboj. Tento průchod probíhá, dokud není v buňce nakoncentrované dostatečné množství kationtů ke správné funkci metabolismu v buňce. V případě, že by došlo k přesycení buňky kationty, mohlo by dojít k inhibici buněčného metabolismu, a tím k úmrtí buňky. V případě aniontů vyžaduje přenos přes buněčnou stěnu složitý transportní systém, neboť import do buňky probíhá proti elektrochemickému gradientu. Pro *B. subtilis* je nejdůležitějším aniontem fosfát, který slouží jako prekurzor některých důležitých koenzymů [22].

Samotný proces sporulace je studován již několik desítek let a je morfologicky velmi dobře popsán. Přestože se jedná o plynulý proces trvající přibližně 10 hodin, bývá v literatuře rozdělován pro větší přehlednost na několik po sobě navazujících kroků. Grafické znázornění vzniku spory *B. subtilis* je na Obr. 7 a jednotlivá stádia jsou zde označeny římskými číslicemi [16].

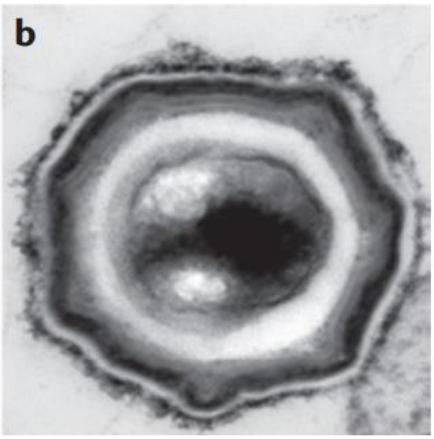


Obr. 7: Vznik endospory *B. subtilis* rozdělený do jednotlivých stádií. Převzato z [16].

Proces sporulace začíná buňkou ve vegetativním stádiu, jejíž jádro se morfologicky mění z kulovitého tvaru na vláknitý (stádium 0 a I). Poté následuje rozdělení jádra na dvě asymetrické poloviny pomocí dvojité cytoplazmatické membrány. V tomto kroku (II) se jádro rozdělí na původní mateřskou buňku (větší jádro), též označovanou jako sporangium a budoucí sporu (menší jádro). Následuje pohlcení budoucí spory mateřskou buňkou a vznik tzv. předospory, která je již samostatnou buňkou uvnitř mateřské. V případě úspěšného vzniku předospory (III) se stává sporulace ireversibilním procesem, který již nelze zvrátit vnějšími vlivy, např. změnou nutrientů v prostředí. Ve stádiu (IV) vzniká v prostoru mezi vnější a vnitřní membránou předospory peptidoglykan, též označovaný jako kortex. Kortex nejprve vzniká na vnitřní straně membrány, kde je jeho složení shodné s peptidoglykanem buněčné stěny mateřské buňky. Z této vrstvy vzniká buněčná stěna vegetativní buňky při klíčení spory. V této fázi také dochází k postupné akumulaci kyseliny dipikolinové (DPA) a kovových iontů, především Ca^{2+} ve spoře. Syntéza DPA probíhá v mateřské buňce pomocí proteinů SpoVFA a SpoVFB a do předospory je přenášena pomocí kanálů tvořených ze SpoVa proteinů. Předposlední stádium (V) sporulace je doprovázeno vytvořením bílkovinné vrstvy nad vnější membránou, která vytváří plášť spory. Během tohoto stádia stále dochází k akumulaci DPA a kovových iontů. V poslední fázi (VI) vzniká kompletní dehydratovaná spora se svými typickými fyzikálně-chemickými vlastnostmi: refrakce světla, odolnost vůči vysokým teplotám, vysychání a chemicky toxickým látkám. Sporulace je ukončena lýzou mateřské buňky a uvolněním spory ze sporangia. Takto vzniklá spora je schopna přejít znovu do vegetativního stádia v případě vyhovujících podmínek v okolním prostředí [16], [19], [23].

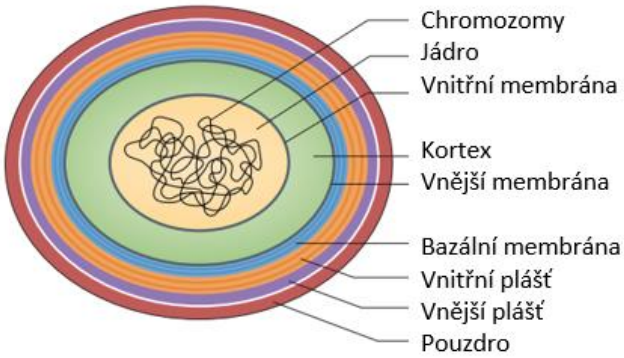
2.3. Morfologie spory

Vzhledem k rozměrům, které se pohybují v rozmezí ~0,5 µm na šířku a 0,5 – 1,5 µm na délku, je vhodné k pozorování spor využít zobrazovací metodu, díky níž je možné identifikovat jednotlivé části tak, jak jsou vidět na Obr. 8. Velmi vhodnými moderními metodami pro tyto účely jsou skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM) s mapováním pomocí energiově disperzní spektroskopie (EDS), nebo skenovací transmisní rentgenová mikroskopie (STXM), které jsou schopné společně se snímky zároveň zobrazit prostorovou distribuci prvkového složení spory [19].



Obr. 8: Snímek spory *B. subtilis* pořízený elektronovým mikroskopem. Převzato z [24].

Vlastní struktura spory *B. subtilis* je schematicky zobrazena na Obr. 9.

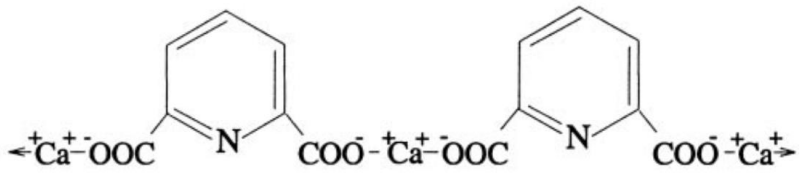


Obr. 9: Strukturní popis vrstev *B. subtilis.* Převzato a přeloženo z [24].

Jak je z Obr. 9 patrné, jádro spory je chráněno několika různými vrstvami. Jádro spory je částečně dehydratované a přibližně 70 % vody je v něm nahrazena nerozpustným komplexem Ca^{2+}-DPA. Chemická struktura komplexu Ca^{2+}-DPA je zobrazena na Obr. 10. Koncentrace vápenatých kationtů se odhaduje až na 1 M, přičemž poměr DPA a dvojmocných kationtů Ca^{2+} na 1:1, díky čemuž dochází k imobilizaci biomolekul nacházejících se v jádře spory. Během dormantní fáze je pH v jádře udržováno přibližně na hodnotě 1. Podíl DPA ve spoře se pohybuje mezi 5 a 15 % její celkové hmotnosti. Při přechodu spory do vegetativního stádia se vyplavuje DPA z jádra do okolí. Ve vegetativní buňce již proto DPA není přítomna [16], [18], [24].

Během sporulace dochází v jádru také k syntéze α/β-malých, v kyselině rozpustných (tzv. SASP) proteinů**.** Jedná se o proteiny vázající se do malého žlábku DNA jako dimer, které při přechodu do vegetativní fáze buňky fungují jako zdroj uhlíku pro růst [25]. Přestože je jejich obsah přibližně okolo

4 % z celkového množství proteinů, je toto množství dostatečné pro saturaci DNA. DPA i SASP proteiny přispívají k obraně DNA před okolními vlivy jako je např. zvýšená teplota nebo UV záření. [24], [26], [27].



Obr. 10: Chemická struktura komplexu Ca^{2+}-DPA. Převzato z [26].

Jádro a kortex odděluje fosfolipidová membrána (vnitřní membrána), která se během germinace stává buněčnou stěnou. Během dormantní fáze je vnitřní membrána stlačena kortexem, což způsobuje sníženou mobilitu lipidů, zároveň je velmi omezená propustnost pro vodu, díky čemuž jádro zůstává v dehydratovaném stavu. [27]

Peptidoglykan (kortex) má specifickou strukturu, která dopomáhá k unikátním vlastnostem spor. Při přechodu buňky do dormantní fáze je kortex syntetizován pomocí proteinů nacházejících se na vnější membráně a při zpětném přechodu rychle zaniká. Hlavní modifikací sporového kortexu je transformace 50 % kyseliny N-acetylmuramové do muramického δ-lactamu, který nepřímo přispívá ke zvýšené odolnosti spor, a také hlavně slouží jako determinant pro autolytické enzymy při degradaci kortexu během klíčení. Díky transformaci kyseliny N-acetylmuramové se v dormantní formě sníží index zesítění přibližně 10x, což může způsobovat zvýšenou tepelnou odolnost [28], [29].

Plášť spory *B. subtilis* se skládá ze tří různých bílkovinných vrstev: vnitřního pláště; vnějšího pláště a pouzdra. Plášť zastává několik životně důležitých funkcí pro existenci spory. Například přispívá k chemické a fyzické ochraně. K chemické ochraně spory přispívá vytvářením pigmentu, který je podobný melaninu, jež chrání sporu před účinky peroxidů a UV záření. Pigment deaktivuje kyslíkové radikály, které mohou díky dopadu UV záření vznikat. Z fyzikálního hlediska chrání sporu před predátory a jinými možnými defekty. Dále je zodpovědný za transport nutrientů potřebných ke klíčení v případě jejich výskytu v okolí spory. Přestože je tato funkce spíše pasivní, jedná se o klíčovou funkci v životním cyklu spory [24].

2.4. Rezistence spor *B. subtilis*

Vzhledem k nízké úrovni enzymové aktivity a metabolismu, která je pro spory typická, nejsou schopny spory (v dormantní fázi) opravit poškození makromolekul jako jsou například proteiny nebo DNA. K opravě makromolekul dochází až při zpětném přechodu do vegetativní fáze, která je doprovázena obnovou metabolismu. V případě, že během dormantní fáze dojde k příliš velké akumulaci poškození, které přesáhne kapacitu opravného systému, dojde k úmrtí spory [18].

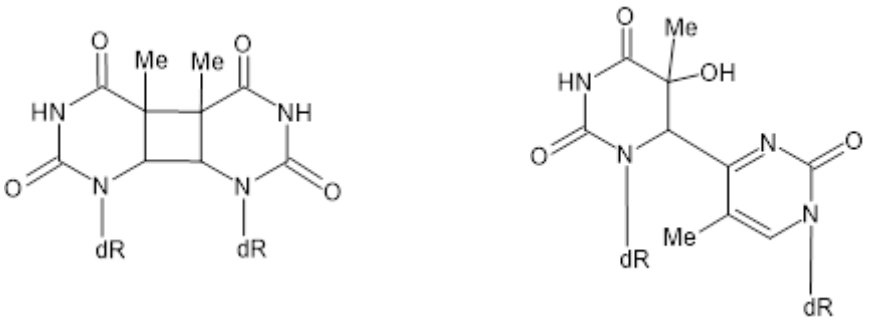
2.4.1. Gama záření

Spory jsou více odolné vůči účinkům gama záření než vegetativní buňky. Přesto, že tato oblast není ještě dopodrobna probádána, shoduje se odborná veřejnost na tom, že hlavní příčinou nižšího poškození dormantních buněk je nízký obsah vody, kvůli kterému dochází k omezenému vzniku nebezpečných OH radikálů a jejich následné difúzi. Omezená produkce OH radikálů může přispívat ke snížené tvorbě zlomů a jiných modifikací DNA [18].

2.4.2. Ultrafialové záření

Vzhledem k výše zmíněným vlastnostem jsou spory přibližně 10x až 50x více rezistentní vůči ultrafialovému (UV) záření v porovnání s vegetativními buňkami [18]. Vzhledem k tomu, že DNA má absorpční maximum v oblasti UV-C záření (260 nm), je inaktivace v oblasti UV-C záření velmi efektivní. Kratší nebo delší vlnové délky jsou v inaktivaci spor také efektivní, avšak k dosažení stejného výsledky je třeba spory vystavit vyšší fluenci záření, či zvýšit fluenční příkon. Z těchto znalostí se s velkou výhodou v laboratorních prostředích využívají nízkotlaké rtuťové výbojky s hlavní emisní linií na vlnové délce 253,7 nm [30].

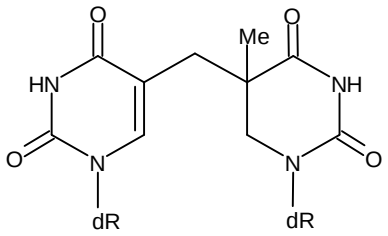
Hlavním důvodem, proč jsou spory více rezistentní vůči UV záření je především rozdílná fotochemie DNA bází ve srovnání s vegetativními buňkami [18]. Důsledek absorpce zářivé energie jednou z bází DNA se nemusí projevit lokálně, ale vlivem migrace náboje po polynukleotidovém řetězci se může projevit v okolí až několika párů bází. Jelikož nejčastěji probíhá migrace náboje za účasti tripletních stavů, jejichž energie pro nukleové báze klesá v pořadí cytosin (C) > guanin (G) > adenin (A) > thymin (T), tak nejpravděpodobnějším konečným akceptorem se stává thymin [31]. Právě díky této skutečnosti jsou hlavními fotoprodukty při UV ozařování nukleových kyselin v živých buňkách thyminové dimery spojené cyklobutanovým kruhem a thyminové dimery spojené vazbou na pozici 6 a 4 (6-4 fotoprodukt). Oba typy fotoproduktů jsou znázorněny na obr. 11 [18].



Obr. 11: Struktura cyklobutanového dimeru (vlevo) a 6-4 dimeru sousedních thyminových bází [18].

U spor je situace nepatrně odlišná. Při ozařování spor, vzhledem k nízkému obsahu vody, dochází na stejném vlákně DNA ke vzniku dimeru 5-thymidyl-5,6-dihydrothyminu (Spore Photoproduct - SP) (viz Obr. 12) na úkor cyklobutanového dimeru [32]. Hlavním funkčním rozdílem mezi těmito fotoprodukty je, že SP je pro spory daleko méně nebezpečný, protože při přechodu do vegetativní fáze je spora schopná tyto thyminové modifikace opravit pomocí enzymů, které převedou reverzně SP zpět na dva nezávislé thyminy [33]. Přestože je oprava SP dimerů hlavním důvodem zvýšené resistence spor oproti

vegetativním buňkám, jsou zde i další faktory, které resistenci přispívají. Patří mezi ně například: saturace DNA SASP proteiny; malý obsah vody a vysoký obsah kyseliny dipikolinové v jádru spory. [18]



Obr. 12: Struktura dimeru 5-thymidyl-5,6-dihydrothyminu (SP) [18].

2.5. Zásahová teorie a křivky přežití

V potravinářském průmyslu, ve zdravotnictví a v dalších vědecko-technických oborech se k vyjádření účinnosti sterilizačních cyklů využívá sledování úbytku zkoumaného mikroorganismu v závislosti na čase, popř. dávce v semilogaritmickém měřítku. Z výsledků těchto pozorování lze zkonstruovat tzv. křivky přežití, ze kterých lze odvodit, po jaké době, popř. dávce je prostředí dostatečně sterilní vůči zkoumanému mikroorganismu, či skupině mikroorganismů. Mezi sterilizační procesy, které vedou ke zničení mikroorganismů patří sterilizace pomocí tepla, pomocí radiace, chemická sterilizace případně kombinace těchto metod [34].

Čas, popř. dávka, které jsou potřeba k redukci populace mikroorganismu za daných podmínek o jeden řád, tedy k úbytku populace o 90 %, se nazývá decimační redukční čas, či dávka (D_{10}). Obecně platí, že každý mikroorganismus, který předmětem zkoumání sterilizačních procesů má vlastní specifickou hodnotu D_{10}. Určení této hodnoty vyžaduje experimenty za přesně stanovených podmínek, neboť hodnota D_{10} pro jednotlivé mikroorganismy je závislá na vybraném sterilizačním procesu a jeho podmínkách [35].

Průběh křivek přežití, které jsou vyjádřeny jako závislost efektu na dávce (čase) lze vysvětlit na základě zásahové teorie. Jedná se o matematické odvození absorpce záření v hmotě bez ohledu na biologickou formu ozařované látky. K odvození se využívá následujícího předpokladu: dochází k ozařování biologické jednotky o objemu V [cm^3] dávkou D, která je měřena v počtech zásahů na 1 cm^3 (za zásah lze považovat interakci s látkou, při které dochází k ionizaci, excitaci, popř. jiným procesům). V biologické jednotce tedy proběhne $V \times D$ zásahů, avšak záření není homogenní, takže distribuce zásahů sleduje Poissonovo rozdělení. Určení pravděpodobnosti P, že daný objem V byl zasažen n zásahy při předpokládaném počtu $V \times D$ zásahů, je možné na základě rovnice [36]:

$$P = \frac{(VD)^n \, e^{-VD}}{n!}. \tag{13}$$

Součtem analogických jednotek, které byly zasaženy různým počtem zásahů (n = 1, 2, 3, 4 …) lze získat zlomek jednotek, které nebyly zasaženy víckrát než (n-1):

$$\frac{N}{N_0} = e^{-VD} \sum_{k=0}^{n-1} \frac{(VD)^k}{k!}. \tag{14}$$

V případě, že ke zničení každé části citlivého objemu je potřeba právě jeden zásah, tedy $n = 1$, pak lze rovnici (2) pro část populace, která je zasažena, zjednodušit do tvaru:

$$\frac{N^*}{N_0} = (1 - e^{-vD})^m, \tag{15}$$

kde m je počet cílů. Pro část populace, ve které se zasažení neprojevilo ve tvaru:

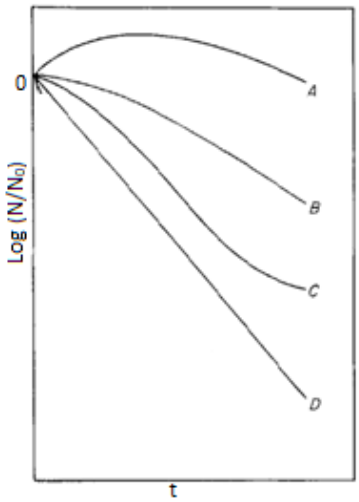
$$\frac{N}{N_0} = 1 - (1 - e^{-vD})^m. \tag{16}$$

Z křivek (15) a (16) lze snadno odečítat konstanty v a m, přičemž získané výsledky, jak již bylo uvedeno, jsou vynášeny v semilogaritmické závislosti. Pro $m = 1$ lze získat přímku, která protíná osu Y v bodě $N/N_0 = 1$, což odpovídá 100 % přeživších. Pro hodnoty $m \neq 1$ lze získat křivku, která v oblasti vysokých dávek má tvar přímky (exponenciály), přičemž při rozvinutí řady a zanedbání vyšších mocnin přechází rovnice (16) do tvaru:

$$\log \frac{N}{N_0} = \log m - vD \log e. \tag{17}$$

Z výše uvedené rovnice je patrné, že v je směrnice přímky závislosti log N/N_0 na dávce D (čase). V případě, že se $D = 0$, poté přímka protíná osu Y v bodě log m. Součin vD lze vyjádřit jako $v = 1/D_0$, kde D_0 značí dávku potřebnou k usmrcení potřebného množství zkoumané populace. Jak již bylo uvedeno výše, využíváme D_{10}, která vypovídá úbytku populace o 90 % [36].

V případě samotného tvaru křivek přežití lze rozeznat několik tvarů, které jsou zobrazeny na Obr. 13.



Obr. 13: Ukázka různých tvarů semilogaritmických křivek přežití - závislosti logaritmu úbytku relativní koncentrace zkoumané látky na čase t. Dostupné z [34].

Křivky A a B na Obr. 13 mají takzvané rameno. Tuto vlastnost vykazují většinou savčí buňky. Ke vzniku „ramena“ dochází naakumulováním poškození předtím, než dojde ke ztrátě schopnosti reprodukce buněk a tím k jejich zániku. Křivka C se nazývá sigmoidní, též někdy označovaná jako s-křivka. S-křivka je ideálním modelem všech sterilizačních cyklů. Křivka D nejvíce odpovídá chování mnoha

biologických molekul při použití ozařování jako sterilizačního procesu. Z tvaru křivky D lze předpokládat, že v ozařovaném systému dochází k mírnému úmrtí již při podání nízkých dávek [37].

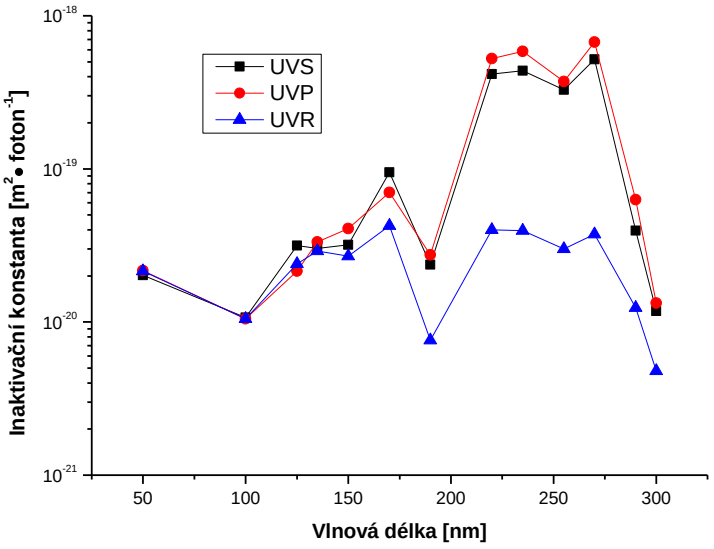
2.6. Současný stav problematiky

V této části se budu věnovat popisu experimentálních prací, které sledovaly odezvu spor *B. subtilis* vystaveným účinkům ionizujícího a neionizujícího záření v různých podmínkách.

2.6.1. UV a extrémní ultrafialové záření

V práci autorů Munakata a kol. [38] bylo ozařováno pět typů *B. subtilis* třinácti různými vlnovými délkami v rozsahu 50 až 300 nm a poté byly z naměřených výsledků zkonstruovány křivky přežití poměrem počtu přeživších ozářených vůči počtu původních neozářených. Kmeny označené UVS a UVP měly inaktivovaný reparační mechanismus, kmeny označené RCE a RCF měly inaktivovány rekombinační mechanismy, kmen označený UVR je divokého typu. Ozařování probíhalo v suché formě ve vakuové komoře, vždy po 6 vzorcích. Nejprve byla připravena kapalná sporová suspenze o koncentraci 2 x 10^7, ze které bylo odebráno 5 µl na obdélníkové sklíčko o rozměru 3 x 5 mm. Ozařování probíhalo pomocí synchrotronového záření. K filtraci vlnových délek byl využit monochromátor.

Vyhodnocování probíhalo nejprve ponořením ozářených sklíček do 1 ml vody. Vrstva spor byla v této suspenzi narušena pomocí ultrazvuku při 75 °C po dobu 15 minut. Poté byla část rozetřena na agarové misky. Z naměřených křivek přežití pro jednotlivé vlnové délky byly vytvořeny inaktivační spektra, která jsou zobrazena na Obr. 14.

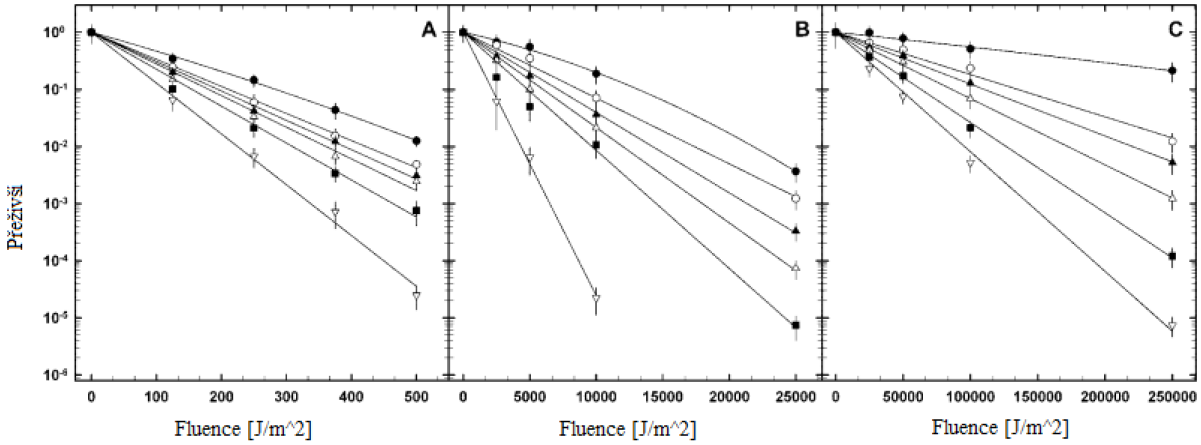


Obr. 14: Inaktivační spektra pro jednotlivé kmeny spor *B. subtilis*. Převzato z [38].

Z výsledků studie autorů Munakata a kol. [38] vyplývá, že k největší inaktivaci dochází v oblastech od 150 do 170 nm a poté v oblasti od 220 do 270 nm, avšak záleží na typu spor. Například v oblasti 135-170 nm lze pozorovat velké rozdíly mezi jednotlivými druhy. Maximum v oblasti 260 nm napovídá, že by hlavním účinkem inaktivace mohla být modifikace či poškození DNA, která vykazuje maximum absorpce právě v tomto spektrálním oboru. Všechny získané křivky přežití vykazují exponenciální pokles bez vzniku ramena nebo podobných útvarů. V článku bohužel nejsou uvedeny hodnoty D_{10}, takže není možné výsledky porovnat s pracemi jiných autorů.

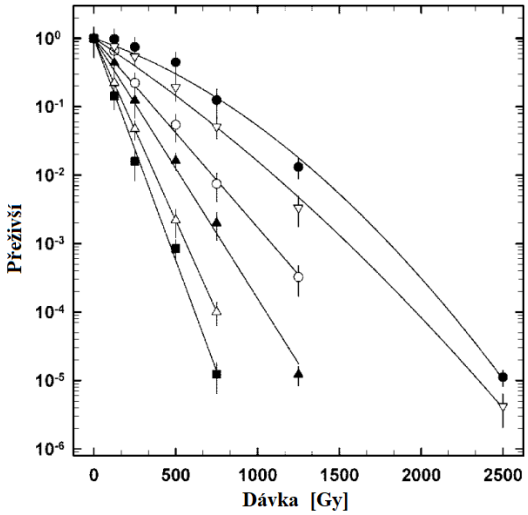
Na předchozí pozorování lze navázat prací autorů Moeller a kol. [39], kde byly prezentovány křivky přežití různých typů *B. subtilis*, které byly ozařovány v suché monovrstvě pomocí UV záření v rozsahu vlnových délek 254 - 400 nm a rentgenového záření. Spory byly imobilizovány na křemenných sklíčkách o průměru 7 mm v koncentraci 2 x 10^7 spor na sklíčko. V případě UV byly vzorky ozařovány monochromatizovaným zářením pocházejícího z nízkotlaké rtuťové lampy s hlavní emisní linií v 254 nm, popřípadě polychromatickým zářením, pro které byla využita xenonová výbojka o výkonu 1000 W. K dosažení potřebných vlnových délek byly využity optické filtry. Rentgenové záření bylo generováno pomocí rentgenky Mueller MG 150 (150 keV).

Po ozáření byla sklíčka překryta 10% roztokem polyvinylalkoholu. Po vysušení byl vzniklý film setřen a převeden do 1 ml sterilní destilované vody. Následně byl roztok zředěn na potřebnou koncentraci a očkován na agarové misky. Misky byly ponechány inkubaci přes noc při 37°C. Po inkubaci byly spočteny kolonie přeživších a byl vypočten poměr N/N_0. Naměřené křivky přežití jsou zobrazeny na Obr. 15A a 15B.



Obr. 15A: Křivky přežití pro různé kmeny *B. subtilis* při ozařování vlnovými délkami 254-nm (A); 290 – 400 nm (B) a 320-400 nm (C), kde osa označená přeživší značí poměr N/N_0. Převzato a přeloženo z [39].

Z Obr. 15A je vidět, že v případě UV-C (A) docházelo k rychlé inaktivaci všech kmenů *B. subtilis*. Nejvyšší hodnoty D_{10} byly pozorovány u přírodního kmene *B. subtilis*, u nichž došlo k inaktivaci při 273,1 J·m^{-2}. Přibližně třikrát nižší a zároveň nejnižší hodnoty D_{10} byly pozorovány u kmenu *splB*, kde inaktivace 90 % populace bylo dosaženo po vystavení 91,7 J·m^{-2}. V případě vyšších vlnových délek (B a C) byl pozorován obdobný trend, co se vzájemného chování kmenů týče, avšak k inaktivaci docházelo po mnohonásobně vyšším dávkovém příkonu. Například v případě kombinace UV-B a UV-A (B) bylo hodnoty D_{10} dosaženo pro přírodní typ při 11,4 kJ·m^{-2} a v případě UV-A 364,5 kJ·m^{-2}. Pro *splB* tyto hodnoty činily 2,2 (UV-A) a 43,9 kJ·m^{-2} (UV-B). Zvýšená odolnost v případě vyšších vlnových délek je způsobena jiným fotochemickým procesem, kdy nedochází k významnému vzniku SP produktů, ale k jednoduchému nebo dvojitému zlomu na vláknu DNA.

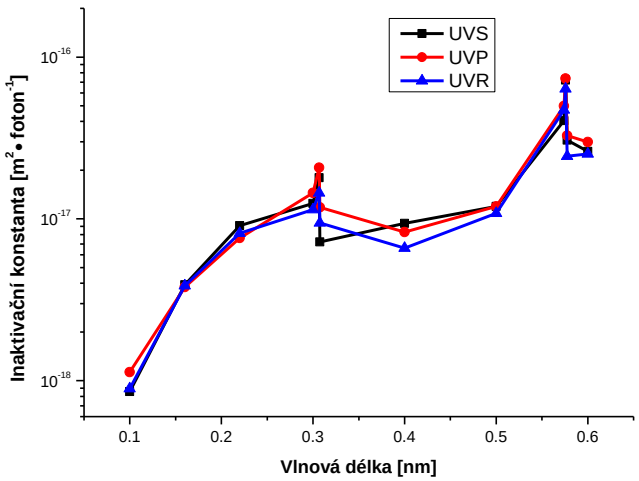


Obr. 15B: Křivky přežití pro různé kmeny *B. subtilis* vystavené rentgenovému záření, kde osa označená přeživší značí poměr N/N_0 [39].

Jak je vidět z Obr. 15B, u ozařování rentgenovým zářením nedochází u žádného z kmenů k lineárnímu poklesu přeživších jako tomu bylo v případě UV. V případě přírodního kmene je u křivky přežití patrný lehký náznak ramena. Vzhledem k charakteru rentgenového záření, kdy dochází k přímému účinku nebo vzniku radikálů, tak inaktivace spor probíhá pomocí jednoduchých nebo dvojných zlomů na vláknech DNA. Nejvyšší hodnota D_{10}, která byla pozorována u divokého typu spor, dosahuje 840 Gy, nejnižší 147 Gy naopak u spor typu yKoU a yKoV, které měly neaktivní reparační mechanismus pro nehomologní spojování konců.

2.6.2. Gama a rentgenové záření

V práci Munakata a kol. [40] byly ozařovány tři kmeny *B. subtilis* ve vakuu měkkým rentgenovým zářením. Označení spor odpovídalo experimentu s UV zářením [38].Ozařování probíhalo synchrotronovým zářením v rozsahu vlnových délek 0,1 nm (12,4 keV) až 0,6 nm (2,066 keV). Spory byly ozařovány v suchém stavu na membránových filtrech. Po ozáření byly spory zředěny a očkovány na agary, kde byly ponechány k růstu. Po vyhodnocení bylo sestaven inaktivační spektrum, které je na Obr. 16.



Obr. 16: Inaktivační spektra pro jednotlivé kmeny spor *B. subtilis*. Převzato z [40].

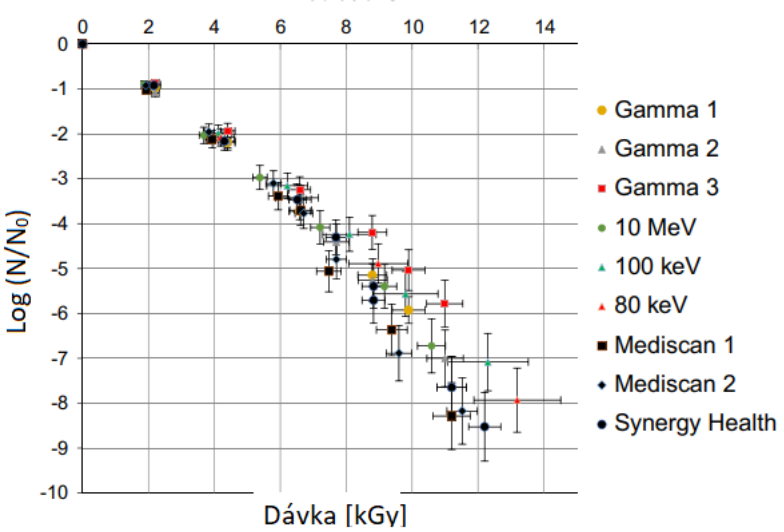
Z Obr. 16 je patrné, že se zvyšující se vlnovou délkou se zvyšuje efektivnost inaktivace. Na spektru lze také zaznamenat dvě lokální maxima, které odpovídají absorpční K-hraně fosforu (0,578 nm; 2145 eV) a vápníku (0,307 nm; 4038 eV). Z těchto pozorování autoři usuzují, že k inaktivaci spor v tomto rozpětí vlnových délek dochází především díky absorpci záření těmito prvky přítomnými ve spoře v jádře (Ca^{2+}-DPA) a v DNA (fosfátová kostra).

Z některých dosud shrnutých poznatků v odborných pracích, které používaly k inaktivaci ionizující záření vyplývá, že nezáleží na dávkovém příkonu, popř. na druhu zdroje záření, ale na dávce deponované na sporách. Jednou z takových prací je japonská studie [41], v níž autoři ozařovali *B. subtilis* na laboratorních sklíčkách třemi různými zdroji záření. K ozařování použili zdroje γ, β^- a rentgenového záření. Po vyhodnocení došli k závěru, že decimační dávka D_{10} se pohybuje v rozmezí 1,4 – 1,5 kGy nezávisle na druhu použitého záření.

Druhé pozorování [42], které se provádělo se suspenzemi bakteriálního kmene *B. pumilus*, došlo k podobnému závěru. Bylo vyzkoušeno několik ozařovacích metod, konkrétně ozařovaní: ^{60}Co; 80, 100 keV a 10 MeV elektrony a brzdné záření generované urychlenými elektrony s energií 7 MeV. Po vyhodnocení byly sestrojeny křivky přežití, které lze vidět na Obr. 17. Z jejich pozorování vyplývá, že decimační dávky se pohybují kolem hodnoty 2 kGy, což opět naznačuje, že poškození není závislé na druhu použitého ionizujícího záření, ale celkové deponované dávce.

Vzhledem k tomu, že hodnoty decimačních dávek publikované v těchto dvou obsáhlých studiích, provedených jak na suchých sporách, tak na suspenzích, jsou velmi podobné (~2 kGy), a je tedy vysoce pravděpodobné, že míra nepřímého účinku v procesu poškození bakteriální spory ve vodním prostředí je zanedbatelná.

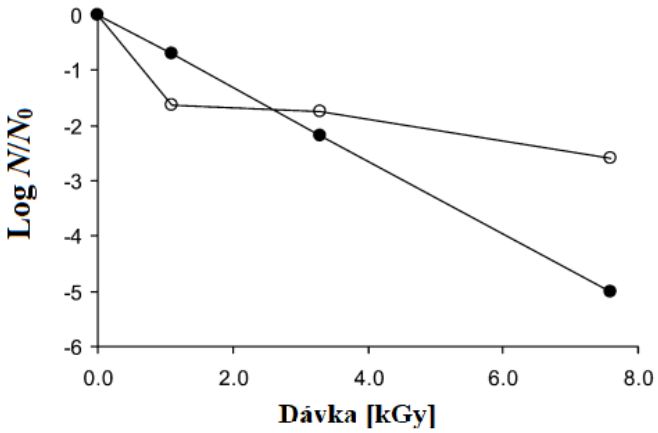
Tuto hypotézu lze jednoznačně potvrdit ozařováním suspenzí s rostoucí koncentrací libovolné látky sloužící jako efektivní vychytávač OH radikálů. Při dosti vysoké koncentraci vychytávače již budou veškeré OH radikály odstraněny reakcí s vychytávačem a jediné možné poškození bude zprostředkováno přímým účinkem. Takovéto studie byly provedeny se suspenzemi *B. megaterium* s příměsemi methanolu, ethanolu, glycerolu nebo mravenčanu [43].



Obr. 17: Výsledné křivky přežití naměřené v [42], přeloženo.

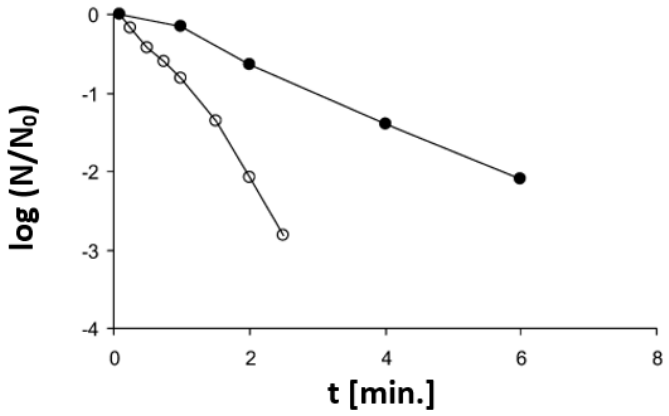
2.6.3. Urychlené elektrony

Odezvu přežití spor *B. subtilis* po ozáření urychlenými elektrony byl pozorován například v práci autorů De Lara a kol. [44]. Křivky přežití byly měřeny nejprve po ozáření elektrony a poté byla vyzkoušena kombinace elektronů a zvýšené teploty. K ozáření byl použit jeden kmen *B. subtilis*. Jako zdroj spor byly použity misky s dvěma různými agary, na kterých byly pěstovány a množeny vegetativní buňky zkoumaného kmene, odkud poté byly jímány a ponechány bez živin, čímž vznikly samotné spory. Finálním produktem tohoto procesu byl roztok spor o koncentraci 10^9 spor·ml^{-1}. Před samotným ozářením byly spory naředěny a po 1 ml převedeny do polyethylenových lahviček. Následně byly ozařovány svazkem urychlených elektronů o energii 10 MeV. Ozařování probíhalo duplicitně a celkové dávky činili 1,1; 3,3 a 7,6 kGy. V případě druhého experimentu se zvýšenou teplotou byla připravena vodní lázeň o objemu 350 ml, která byla ohřívána na 105 °C. Po dosažení požadované teploty byl do lázně přidán zásobní roztok suspenze spor o objemu 0,2 ml. V zadaných časových intervalech byl odebírán vždy 1 ml z vodní lázně. Experiment probíhal duplicitně, ve slepém experimentu se po odebrání vzorek rovnou vyhodnocoval a ve vlastním experimentu byl ozářen 3,3 kGy. Vyhodnocování všech popsaných experimentů probíhalo na agarových miskách, které byly inkubovány 24 h při 30 °C. Výsledné křivky přežití jsou zobrazeny na Obr. 18A a 18B.



Obr. 18A: Křivky přežití *B. subtilis* po ozáření elektrony s energií 10 MeV pro spory připravené na dvou různých agarech, prázdné symboly značí PCA a plné NA agar. Převzato a přeloženo z [44].

Na Obr. 18A. jsou křivky přežití *B. subtilis* v závislosti na deponované dávce. V prvním případě, kdy spory byly pěstované na NA agaru lze vidět ukázkový lineární pokles. Hodnota D_{10} byla stanovena na 1,5 kGy. V případě spor pěstovaných na PCA agaru nejprve docházelo k prudkému poklesu do deponované dávky 1,5 kGy. Následné zvyšování deponované dávky již nezpůsobovalo takové poškození, takže docházelo k velmi pozvolné inaktivaci. Hodnota D_{10} činí 1,3 kGy. V obou případech lze prohlásit, že po deponované dávce 3,6 kGy došlo ke snížení přeživších spor na jednu tisícinu, tzv. dva log-cykly. Rozdíl mezi NA a PCA agarem je ve složení. NA agar obsahuje pepton, agar a hovězí extrakt, zatímco PCA obsahuje agar, glukózu, pepton a kvasinkový extrakt.



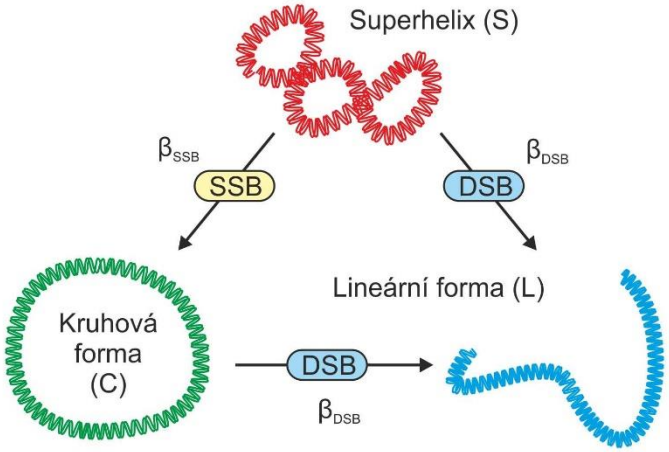
Obr. 18B: Křivky přežití *B. subtilis* po zahřátí na 105 °C (plné symboly) a následném ozáření 3,3 kGy (prázdné). Převzato a přeloženo z [44].

Výsledky experimentu se zvýšenou teplotou v kombinaci s ozářením, který byl prováděn se sporami pěstovanými na NA agaru, je uveden na Obr. 18B. V případě sterilizace pouze pomocí tepla docházelo k pozvolnému úhynu a hodnota D_{10} je v tomto případě 2,7 minut. V případě kombinace zvýšené teploty a následného ozáření 3,3 kGy byl pozorován prudký pokles a hodnota D_{10} klesla na 0,88 minuty.

2.7. Plazmidová DNA

K pozorování účinků neionizujícího a ionizujícího záření na DNA lze využít plazmidovou DNA, též označovanou jako plazmid. Jedná se o malé kruhovité dvoušroubovice DNA, které se nachází v bakteriální buňce, kde jsou schopné samostatné replikace. Pro buňku nejsou plazmidy esenciální, avšak nesou geny, které například dopomáhají bakteriím ke zvýšené rezistenci vůči antibiotikům. Díky jednoduché manipulaci a dobré reprodukovatelnosti vyhodnocení jsou plazmidy využívány jako jednoduché modely DNA k pozorování jednoduchých a dvojných zlomů řetězce DNA. Při dobrém skladování je izolovaný plazmid schopný dlouho uchovávat informace o způsobeném poškození, protože nedochází k reparačním procesům [45].

Jak bylo zmíněno v úvodu, plazmidy mají kruhovitou formu nadšroubovice, též označovanou jako superhelix (S, z anglického Supercoiled). Vlivem ionizujícího záření, které způsobí jediný SSB, dojde k rotaci plazmidu, která změní podobu superhelixu na formu kruhovou (C, z anglického Circular). V případě, že ionizující záření na řetězci superhelixu způsobí DSB, dojde k přerušení řetězce, molekula se přeruší a vznikne forma lineární (L). Přechod mezi jednotlivými formami je naznačen na Obr. 19.



Obr. 19: Schéma přechodu mezi jednotlivými formami plazmidové DNA vlivem jednoduchých (SSB) a dvojných (DSB) zlomů, koeficienty β_{SSB} a β_{DSB} příslušné pravděpodobnosti poškození.

Ze schématu na Obr. 19 lze sestavit tři diferenciální rovnice, které popisují změnu zastoupení jednotlivých forem v závislosti na absorbované dávce D v následujícím tvaru:

$$\frac{dS\,(D)}{dD} = -(\beta_{SSB} + \beta_{DSB})\,S(D)\,, \tag{18A}$$

$$\frac{dC\,(D)}{dD} = \beta_{SSB}\,S(D) - \beta_{DSB}C(D), \tag{18B}$$

$$\frac{dL\,(D)}{dD} = \beta_{DSB}\,(S(D) + C(D)), \tag{18C}$$

kde β_{SSB} a β_{DSB} jsou parametry charakterizující pravděpodobnosti vzniku jednoduchých a dvojných zlomů, tedy C a L formy plazmidu, v závislosti na dávce. Integrací rovnice 18A – 18C obdržíme:

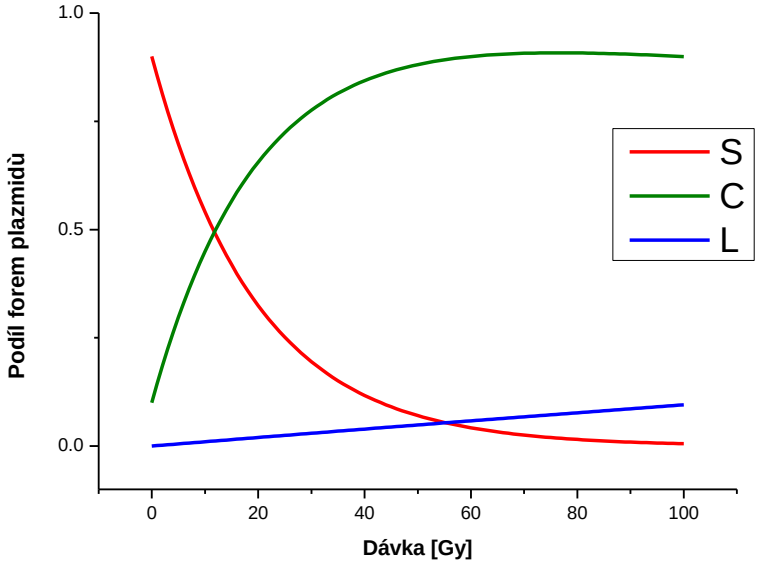
$$S\,(D) = S_0\,e^{-(\beta_{SSB}+\beta_{DSB})D}\,, \tag{19A}$$

$$C\,(D) = (S_0 + C_0)e^{-\beta_{SSB}\,D} - S_0\,e^{-(\beta_{SSB}+\beta_{DSB})D}\,, \tag{19B}$$

$$L\,(D) = (S_0 + C_0)\left(1 - e^{-\beta_{SSB}\,D}\right) + L_0\,, \tag{19C}$$

kde S_0, C_0 a L_0 jsou počáteční koncentrace forem plazmidů před začátkem ozařování. Zároveň platí vztah $C + S + L = 1$.

Jednotlivé formy mají různou molekulovou hmotnost a je tedy možné je separovat pomocí gelové elektroforézy. Ukázka průběhu jednotlivých forem z rovnic 19A – 19C v závislosti na dávce je znázorněn na Obr. 20.



Obr. 20: Zastoupení jednotlivých forem plazmidů v závislosti na dávce se vstupními parametry: S_0 = 0,9; C_0 = 0,1; L_0 = 0; β_{SSB} = 0,05 Gy^{-1} a β_{DSB} = 0,001 Gy^{-1}.

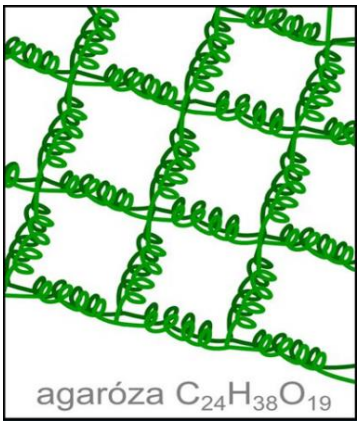
2.7.1. Gelová elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda založená na migraci nabitých částic v podpůrném médiu (kapalném nebo gelovém) vlivem vnějšího elektrického pole. Elektroforézní systém se skládá ze dvou elektrod (katody a anody), které jsou propojeny daným médiem. Separace studovaných látek probíhá na základě rozdílné rychlosti v, která je závislá na jejich mobilitě m a síle elektrického pole E podle rovnice

$$v = mE. \tag{20}$$

Mobilita separované částice je závislá na její velikosti, tvaru, náboji a teplotě během separace. Tato hodnota nabývá konstantních hodnot během přesně definovaných podmínek. V zásadě lze tyto podmínky rozdělit na elektrické (proud, napětí, výkon) a neelektrické (iontová síla, pH, viskozita, porozita a další faktory popisující podpůrné médium). Obecně lze konstatovat, že elektroforézní metody se nejvíce potýkají s problémem změny teploty během separace vlivem generovaného tepla způsobeného elektrickým odporem média. Teplotní změny způsobují odchylky v rychlosti migrace jednotlivých molekul, což má za následek zkreslení výsledných pásem dělených molekul. I přes tyto problémy je možné touto metodou separovat od malých nabitých organický nebo neorganický iontů, až po složitější entity jako jsou například nabité polykondenzáty (DNA nebo proteiny) a mikroorganismy [46], [47].

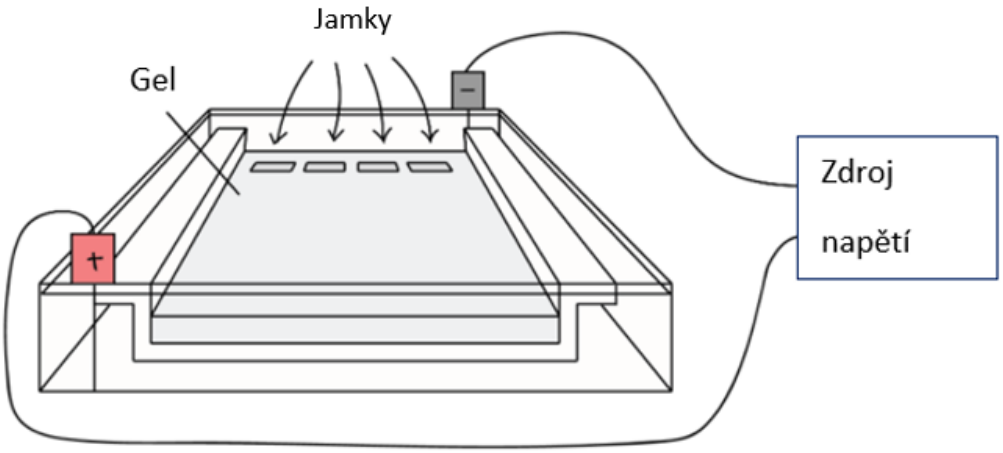
Gelová elektroforéza je metoda používaná především k separaci fragmentů DNA nebo jiných makromolekul (RNA a proteinů) na základě jejich rozdílné velikosti a rozdílného náboje. Díky elektrickému proudu, který prochází gelovým médiem cestují fragmenty různou rychlostí, a tak je možné je od sebe oddělit. Jak již vyplývá z názvu, v případě gelové elektroforézy se využívá gelové matrice především na bázi agarózového gelu, jehož struktura je naznačena na Obr. 21 [46].



Obr. 21: Zjednodušené schéma struktury agarózového gelu. Převzato z [48].

Směsi na gely jsou prodávané v suché práškovité podobě. Po smíchání a zahřátí tohoto prášku s vhodným kapalným prostředím (nejčastěji destilovaná voda s přídavkem soli) je roztok vylit do formy, do tzv. gelového boxu a schlazen. Po ochlazení směs vytvoří pevný, lehce zvlněný gel, který je schopný vést elektrický proud a může na něm probíhat separace. Na molekulární úrovni je gelová matrice pohromadě držena vodíkovými můstky s drobným póry.

Při experimentech jsou nejprve na gelový box přiloženy elektrody, v případě Obr. 22 je anoda přidělána k místu aplikace vzorku, k tzv. jamkám, které v gelu vzniknou vložením tzv. „hřebenu“ při vylívání gelu, kam se aplikují jednotlivé vzorky.



Obr. 22: Uspořádání experimentu při gelové elektroforéze DNA. Přeloženo z [49].

Jakmile je aparatura připravena, je možné začít se samotným experimentem. V závislosti na počtu jamek je možné separovat více vzorků najednou. Na elektrody je přivedeno elektrické napětí, které spustí samotnou separaci. Rychlost separace je závislá na vloženém napětí. Menší ionty cestují gelem rychleji, takže za určitý čas urazí v gelu větší vzdálenost. Doporučené je aplikace napětí 5–10 V na 1 cm vzdálenosti mezi elektrodami, aby separace probíhala pozvolnou rychlostí a zároveň nedocházelo k rozpouštění gelu vlivem zvýšené teploty. Po uplynulé době je možné přejít k vyhodnocení [49], [50].

V případě určování podílu forem plazmidové DNA ve vzorku dochází vlivem záporného náboje DNA k separaci ve směru od anody ke katodě. V průběhu separace cestují agarózovým gelem nejrychleji superhelixy, poté lineární forma a nejpomaleji forma kruhová. K vyhodnocení je potřeba jednotlivé

fragmenty zviditelnit, k čemuž se používá značení fluorescenčním interkalačním barvivem, které se do gelu přidává před samostatným zavedením vzorků do gelové matrice. Po ukončení migrace je gel podsvícen UVA zářivkou, díky čemuž se zviditelní jednotlivé obarvené fragmenty.

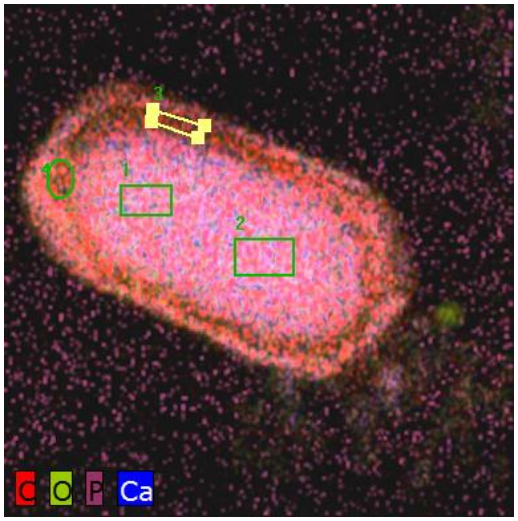
3 Experimentální část

3.1. Simulace ozařování

Pro odhad distribuce deponované dávky ve spoře od vybraných druhů ionizujícího záření jsem využil simulační prostředí Geant4 [51]. Jedná se o programový nástroj umožňující simulovat průchod částic hmotou metodou Monte Carlo. Obsahuje velké množství funkčních prvků jako např. trasování dráhy částic, tvorbu komplexní geometrie objektů nebo různé fyzikální modely interakcí. Je výsledkem celosvětové spolupráce fyziků a softwarových inženýrů a byl vytvořen využitím objektově orientovaného programování v jazyce C++. Je hojně aplikován ve vědních oblastech jako je částicová fyzika, jaderná fyzika, konstrukce urychlovačů nebo medicínská fyzika. V roce 2008 vznikl výzkumný projekt, věnující se implementaci radiačně chemických procesů do programového prostředí Geant4 pod názvem Geant4-DNA [52], umožňující sledovat procesy interakce ionizujícího záření na úrovni DNA molekul.

3.1.1. Model spory

Geant4 umožňuje definovat simulovaný objekt pomocí jeho prvkového složení a jeho příslušným hmotnostním zastoupením. Pro tyto účely jsem využil data poskytnutá RNDr. Imrichem Barákem, DrSc. z Ústavu molekulární biologie SAV v Bratislavě získaná pomocí metody STEM/EDS na sporách *B. subtilis* (divoký typ). Data obsahují podrobné prvkové procentuální zastoupení v jednotlivých částech spory. Na Obr. 23 jsou zachyceny oblasti zájmu v jednotlivých částech z analyzované spory pomocí metody STEM/EDS. Části lze v principu rozdělit na tři důležité celky: jádro, kortex a plášť. Jejich procentuální prvkové složení je uvedeno v Tab. 1.

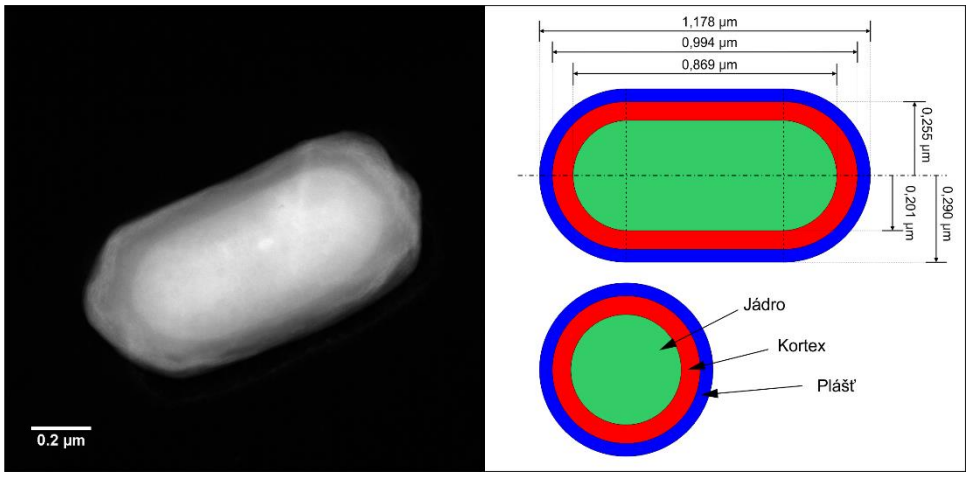


Obr. 23: STEM/EDS snímek s oblastmi zájmu v analyzované spoře *B. subtilis*, ze kterých byla získána data prvkového složení. S laskavým svolením I. Baráka.

Tab. 1: Hmotnostní procentuální prvkové zastoupení jednotlivých částí spory *B. subtilis*. Data z STEM/EDS.

	Jádro	Plášť	Kortex
		%	
C	48,26	70,06	56,81
O	18,32	10,75	15,44
Ca	15,79	4,20	5,22
N	11,58	9,5	16,14
S	2,98	2,13	1,30
P	2,80	2,90	4,68
K	0,28	0,43	0,40

Zbývající informace, kterou bylo třeba pro konstrukci modelu spory získat, byla geometrie průměrné spory rodu *B. subtilis*. Rozměry spory jsem odečetl ze snímků získaných pomocí elektronové mikroskopie. Výsledné rozměry jsou průměry pěti měření z dvaceti různých snímků. Model byl zjednodušen tak, aby bylo možné jej zkonstruovat pomocí předdefinovaných geometrických objektů v prostředí Geant4. Model jádra spory proto tvořil válec, na jehož podstavy byly umístěny polokoule tak, že roviny jejich řezu byly identické s podstavami. Model kortexu spory byl vytvořen tak, že objekt jádra byl příslušně zvětšen a následně byl jeho objem redukován o objekt jádra odečtením pomocí logické „boolean“ operace. Stejným způsobem byl zkonstruován i model pláště spory s tím rozdílem, že z příslušného zvětšeného objektu jádra byl logicky odečten jak objekt jádra, tak objekt kortexu. Snímek spory z STEM a její model je ukázán na Obr. 24.



Obr. 24: STEM snímek spory (vlevo) a její zjednodušený model v pro implementaci v Geant4 (vpravo).

Dále bylo pro model potřeba stanovit, jakou má daná část spory hustotu. Jelikož v současné době není na toto téma publikována téměř žádná práce, rozhodl jsem se použít hodnotu, odpovídající průměrné hustotě spory *B. subtilis*: 1,3 g/cm^3 [53] a tuto hodnotu přiřadil jako hustotu kortexu. Dalším předpokladem bylo, že jádro, vzhledem k absenci vody a vysoké kompaktnosti DNA a SASP může mít hustotu srovnatelnou se suchým stavem DNA, tedy asi 1,4 g/cm^3 [54]. Hustotu pláště jsem zvolil nižší než předchozí dvě části a to 1,2 g/cm^3.

Tab. 2: Fyzikální vlastnosti jednotlivých částí modelu spory.

	hustota	Objem	Hmotnost	Hmotnostní zlomek	Plocha	Povrchová hustota
	g/cm^3	um^3	kg		um^2	g/cm^2
Jádro	1,4	0,093	$1{,}31\times10^{-16}$	0,441	0,314	$4{,}15\times10^{-13}$
Kortex	1,3	0,071	$9{,}20\times10^{-17}$	0,310	0,441	$2{,}09\times10^{-13}$
Plášť	1,2	0,062	$7{,}38\times10^{-17}$	0,249	0,535	$1{,}38\times10^{-13}$

Pro ozařování jsem zvolil zdroj se čtvercovou aperturou o rozměrech 2x2 μm^2 emitující částice kolmo na hlavní osu modelu. Výchozí poloha částic v okně apertury byla generována náhodně s rovnoměrným rozdělením. Velikost plochy jsem volil tak, aby emitované částice mohly pokrýt celý model spory. Počet částic generovaných během jednoho běhu simulace byl vždy 10^4. Fluence tedy byla $2{,}5\times10^{11}$ částic cm^{-2}. Okolní prostředí spory tvořilo ultra vysoké vakuum (tlak cca 10^{-18} Pa), aby bylo umožněno sledovat interakci i s velmi nízkými energiemi fotonů. Simulována byla interakce fotonů pro různé hodnoty energií. Pro nízkoenergetické simulace, které byly stěžejní pro tuto práci jsem použil fyzikální model: G4EmLivermorePhysics a G4EmLowEPPhysics. Pro každý běh simulace je program schopen zaznamenat energii deponovanou ve stanovené části modelu a převést na odpovídající dávku v Gy. Získaný soubor dat reprezentoval deponovanou dávku v jednotlivých částech spory na energii simulovaného záření.

Zdrojové kódy pro implementaci v Geant4 včetně datových souborů obsahujících spočtené hmotnostní součinitele absorpce a lineární brzdné schopnosti jsou součástí elektronické přílohy diplomové práce.

3.1.2. Simulace ozařování fotony

V případě simulace interakce fotonů s modelem spory jsem generoval fotony s energiemi v rozsahu $10 - 10^4$ eV. Jedná se o oblast energií, kde fotony interagují přednostně fotoelektrickým jevem. Pro energie vyšší než 10^4 eV již vzhledem k rozměrům spory nebyla detekována žádná deponovaná energie.

Pro výpočet dávky je běžně používán obecný vztah:

$$D = \int_{E_0}^{E_{max}} \Psi(E) \left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right) dE, \tag{21}$$

kde $\Psi(E)$ je fluence energie daných fotonů s energií E a $\left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)$ je hmotnostní součinitel absorpce energie, který je funkcí energie E a protonového čísla Z. Integrace se provádí od nejnižší energie ve spektru E_0 do hodnoty maximální E_{max}. Pokud má být dávka vyjádřená v Gy, musí být veličiny vyjádřeny v jednotkách SI. Ze znalosti absorbované dávky a fluence energie lze spočítat tzv. efektivní hmotnostní součinitele absorpce energie pro jednotlivé části spory podle vztahu:

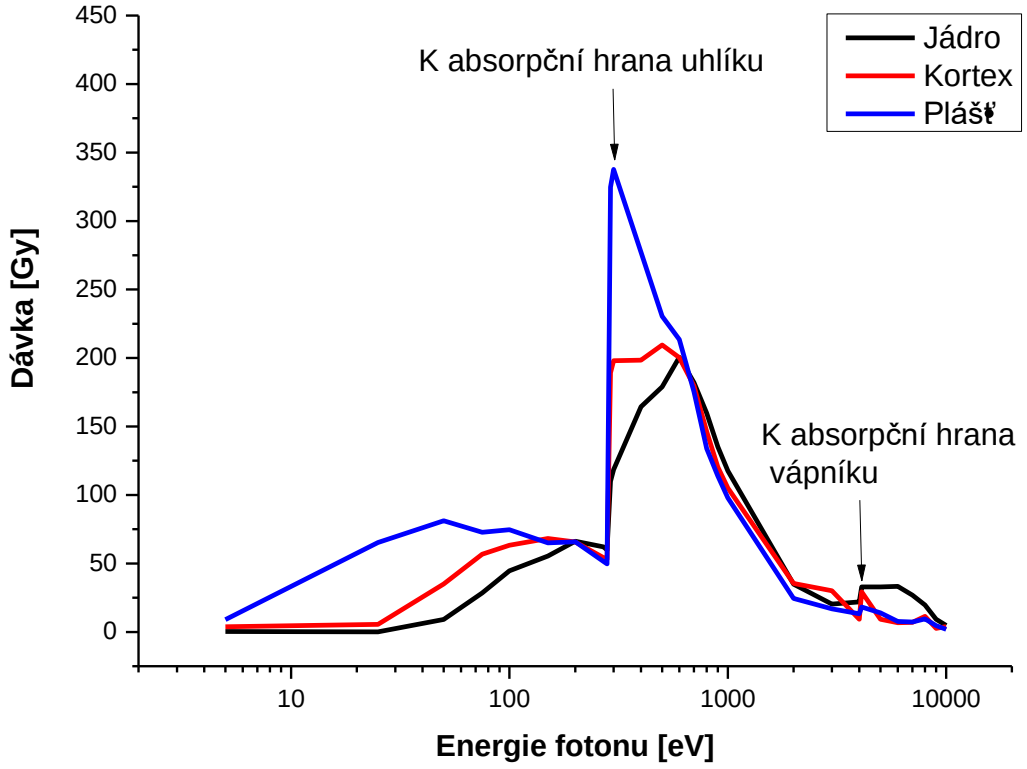
$$\left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_{eff} = \frac{D(E)}{\Psi(E)}. \tag{22}$$

Geant4 vždy po každém běhu vrací hodnotu dávky v jednotlivých částech modelu spory, která byla použita při výpočtu efektivních hmotnostních absorpčních koeficientů. Pro hodnotu simulované fluence pak platí: $\Psi(E) = E \cdot 2{,}5 \times 10^{11}$ [J·cm^{-2}]. Takto vypočtené efektivní součinitele absorpce lze následně

použít pro odhad dávky a její distribuce v jednotlivých částech spory ze známé fluence energie. Pro výpočet součinitelů absorpce složených materiálů nebo molekul se používá tzv. Braggovo pravidlo směšování, kde se výsledný hmotnostní součinitel absorpce materiálu získá jako vážený průměr hmotnostních součinitelů absorpce jednotlivých prvků, kde váhu tvoří hmotnostní zlomek daného prvku v materiálu (molekule). Lze jej vyjádřit vztahem:

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right) = \sum_i w_i \left(\frac{\mu}{\rho}\right)_i . \tag{23}$$

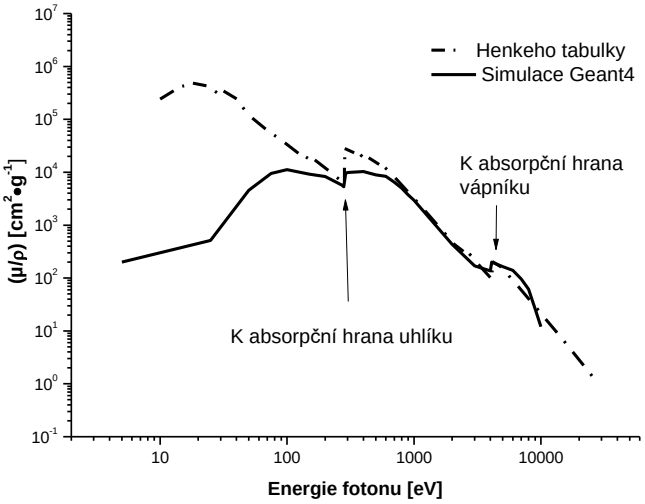
Pro jednotlivé části spory lze tedy hmotnostní součinitele absorpce spočíst výše uvedeným vztahem ze znalosti prvkového složení uvedeného v Tab. 1 a následně použít pro výpočet dávky. Hodnoty pro hmotnostní součinitele absorpce lze získat např. z databáze [55] (tzv. Henkeho tabulky). Takto získané hodnoty hmotnostních součinitelů absorpce jsem poté použil k porovnání s hodnotami efektivních hmotnostních součinitelů absorpce získaných výpočtem z obdržené dávky pro každý běh simulace v Geant4. Jelikož se jedná o simulace typu Monte Carlo, průměroval jsem vždy obdržené dávky z pěti nezávislých běhů programu. Výsledky simulací jsou uvedeny na Obr. 24, kde je sledována absorbovaná dávka v jednotlivých částech spory v závislosti na energii fotonů. Na Obr. 25A-25C jsou zobrazeny průběhy hmotnostních součinitelů absorpce jednotlivých částí spory získaných výpočtem (8) pomocí hodnot z databáze [55] a průběhy efektivních absorpčních koeficientů získaných na základě informace o depozici dávky ze simulací v programovém prostředí Geant4.



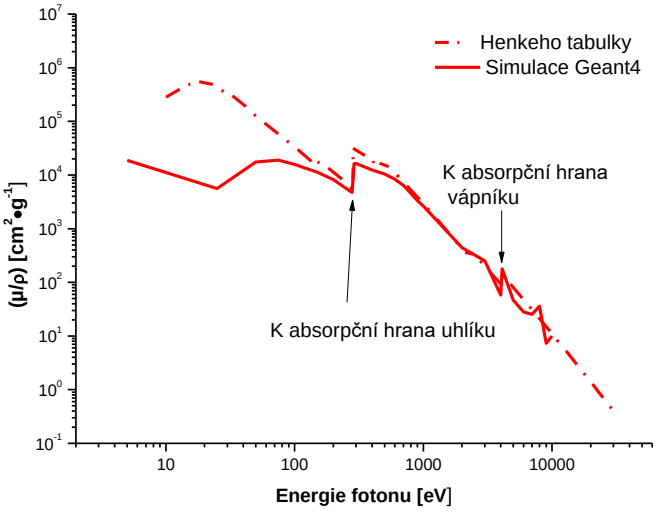
Obr. 24: Absorbovaná dávka v jednotlivých částech spory jako funkce energie fotonů. Fluence na povrchu spory $2{,}5\times10^{11}$ fotonů·cm^{-2}.

Ze simulovaných průběhů depozice dávky je patrné, že mezi energiemi fotonů 10 – 100 eV dochází k pozvolnému nárůstu deponované dávky především v plášti spory, neboť fotony nemají ještě dostatečnou energii, aby pronikly ke kortexu nebo jádru. Od zhruba 20 eV již dochází k nárůstu depozice

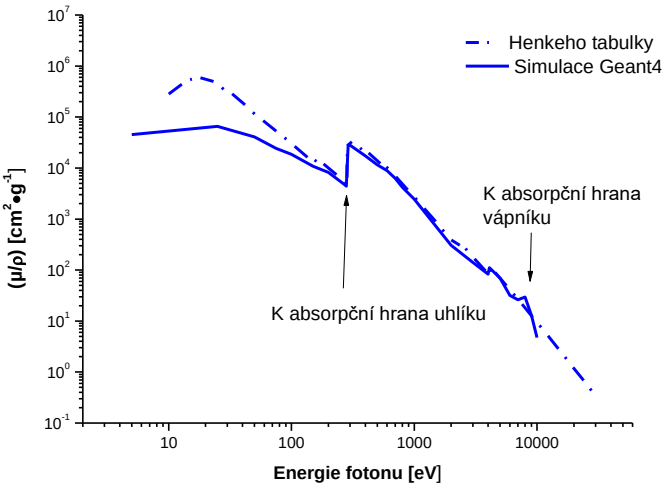
energie i v jádře a kortexu do 200 eV kde již jsou fotony energetické natolik, aby pronikaly sporou se stejnou účinností. Prudký nárůst kolem energie fotonů 284 eV způsobuje relativně vysoké hmotnostní procento uhlíku v jednotlivých částech spory. Rozdíl v depozici energie do 700 eV odpovídá procentuálnímu zastoupení uhlíku v jednotlivých částech, viz. Tab. 1. S narůstající energií fotonů klesá deponovaná energie monotónně až ke K hraně vápníku kolem 4038 eV. Zde dochází k drobnému rozdílu v depozici energie v jádře především díky tomu, že jádro obsahuje největší podíl vápníku (~16 %).



Obr. 25A: Hmotnostní součinitelé absorpce jádra spory.



Obr. 25B: Hmotnostní součinitelé absorpce kortexu spory.



Obr. 25C: Hmotnostní součinitelé absorpce pláště spory.

Rozdílné hodnoty hmotnostních součinitelů absorpce pro jednotlivé části spory spočtených z tabelovaných dat a odvozených ze simulací jsou nejvíce markantní u jádra a kortexu. Obecně lze konstatovat, že rozdíly v celém spektru energií fotonů jsou především dány konečnými rozměry spory v případě provedené simulace. Např. odchylky od teoretických hodnot v oblasti energií 10 – 100 eV u jádra jsou způsobeny díky nedostatečné energii fotonů, které vykazují menší pronikavost, jak bylo diskutováno výše. Pro malé hodnoty energií fotonů zůstává největší podíl deponované energie především na exponované straně spory. Tato distribuce dávky není v současné implementaci modelu zohledněna. Realistický se jeví odhad dávek (tedy homogenně distribuované absorbované energie) v oblasti energií fotonů od 150 – 200 eV, kde již atenuační délka v uhlíku dosahuje rozměrů spory, tedy 0,5 až 1 μm.

Podobně lze komentovat rozdíl u K hrany uhlíku, kde fotony dosahují energie 284 eV. Dále je třeba zohlednit i rozdílnou hustotu jednotlivých částí spory, která má vliv na celkovou deponovanou dávku a která v teoretickém výpočtu zohledněna není. Zde je ukázáno, že Braggovo pravidlo směšování platí od energií fotonů zhruba 1 keV dále, neboť v této oblasti již teoretické a spočtené hmotnostní součinitelé absorpce nabývají velmi podobných hodnot.

Z výše zmíněných zjištění lze tedy provést závěr, že nejcitlivější bude spora zřejmě v oblasti vlnových délek 284 – 700 eV. Jedná se o oblast energií fotonů označovaná též jako tzv. vodní okno. Specificky je vodní okno definováno jako rozsah energií 284 – 543 eV, tedy mezi absorpční hranou uhlíku a kyslíku. Jedním z perspektivních zdrojů schopných generovat fotony právě ve vodním okně ke studiu senzitivity spor je plazmový zdroj měkkého rentgenového záření schopný toto záření deponovat do kapalných vzorků [56].

3.1.3. Simulace ozařování elektrony

Simulace ozařování elektrony byla provedena ve stejné konfiguraci jako s fotony. Fluence částic byla opět $2{,}5\times10^{11}$ [el.·cm^{-2}]. Generovány byly elektrony s energiemi v rozsahu 10 keV – 1 GeV. Tento rozsah energií byl zvolen vzhledem k možnosti porovnání tabelovaných hodnot hmotnostních lineárních brzdných schopností z databáze estar (NIST) [57].

Pro výpočet dávky elektronů lze použít vztah:

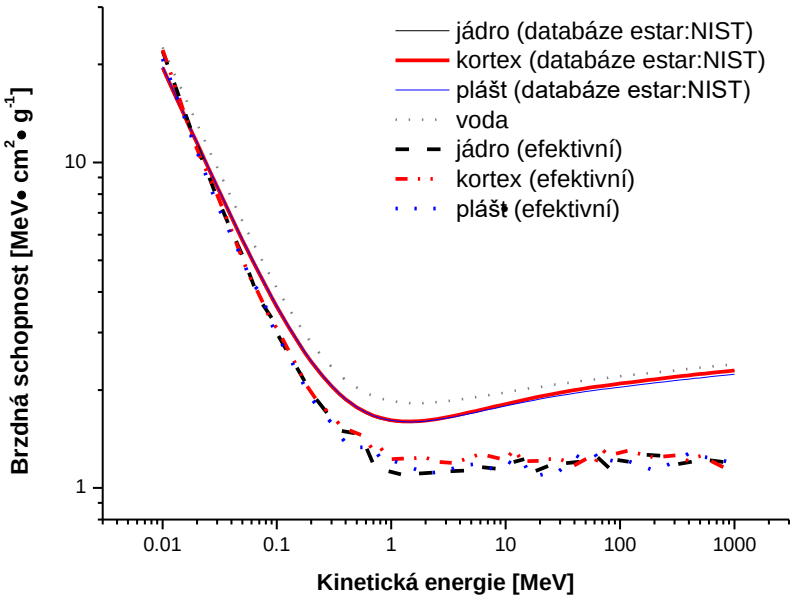
$$D = \int_{E_0}^{E_{max}} \phi(E) \left(\frac{S_{coll}(E)}{\rho} \right) dE, \tag{24}$$

kde $\Phi(E)$ je spektrální fluence elektronů (částic) a $(S_{coll}\ (E)/\rho)$ je hmotnostní srážková lineární brzdná schopnost prostředí. Integrace se opět provádí přes spektrum v rozsahu energií E_0 až do maximální hodnoty E_{max}. Pokud má být dávka vyjádřená v Gy, musí být veličiny vyjádřeny v jednotkách SI. Pro výpočet hmotnostní srážkové lineární brzdné schopnosti prostředí složených materiálů lze použít obdobný vztah jako pro součinitele absorpce (8).

Ze znalosti absorbované dávky a fluence částic lze spočítat tzv. efektivní hmotnostní lineární brzdné schopnosti pro jednotlivé části spory podle vztahu:

$$\left(\frac{S_{coll}(E)}{\rho} \right)_{eff} = \frac{D(E)}{\phi(E)}. \tag{25}$$

Takto vypočtené efektivní hmotnostní lineární brzdné schopnosti lze následně použít pro odhad dávky a její distribuce v jednotlivých částech spory ze známé fluence částic. Získaná data, která jsou porovnávána s tabelovanými hodnotami jsou na Obr. 26.



Obr. 26: Lineární brzdné schopnosti elektronů v závislosti na energii pro jednotlivé části spory, kde čárkovaně jsou označeny efektivní hmotností lineární brzdné schopnosti získané simulací v programu Geant4.

Z Obr. 26 lze vidět, že v oblasti od přibližně 0,1 MeV dochází k odchýlení teoreticky vypočtených hodnot od hodnot získaných ze simulací. Tento jev může být způsoben rozměrem spory, kdy se pro rychlejší elektrony spora stává transparentní a deponovaná dávka je snížena na úkor sekundárních

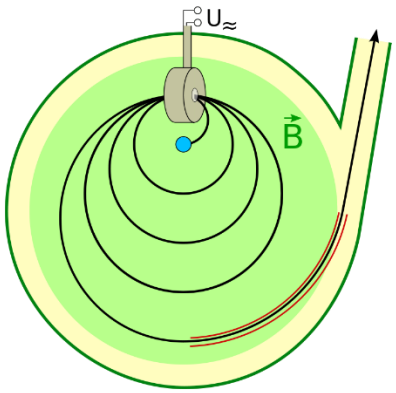
elektronů, které sporu opouštějí. Od energie 1 MeV již pozorujeme plato, kde inaktivace spor by neměla být závislá na použité energii při ozařování v rámci rozpětí 0,5 MeV až 1 GeV.

3.2. Použité přístroje, materiály a metody

3.2.1. Zdroj urychlených elektronů

Spory patří k velmi odolným organismům, o čemž svědčí poměrně vysoké hodnoty decimačních dávek uvedených v rešeršní části této práce. K deponování vyšších dávek lze použít zařízení, která ve vakuovém systému pomocí vysokofrekvenčního elektrického pole urychlují nabité částice. Pokud je urychlující částice pomocí magnetického pole hnána po kruhové dráze, zařízení se nazývá cyklický urychlovač neboli cyklotron. Pokud by hmotnost částice byla konstantní, tak by perioda a frekvence obíhání zůstala stejná, avšak vlivem relativistických jevů dochází při urychlování částic k nárůstu jejich hmotnosti, díky čemuž dochází ke snížení frekvence obíhání. S tímto problémem se potýká většina těžkých nabitých částic, avšak v případě elektronu lze snížení frekvence obejít. Cyklotrony urychlující elektrony tímto způsobem se nazývají mikrotrony [58].

V mikrotronu jsou do kruhové komůrky přiváděny mikrovlny, které v terčovém krystalu dutinového rezonátoru udělí elektronům ve valenčních vrstvách počáteční energii. Vybuzené elektrony začnou, díky indukovanému magnetickému poli, vykonávat kruhový pohyb. Při průchodu dutinovým rezonátorem mohou být urychleny. Každé urychlení dodá elektronu energii rovnou celočíselnému násobku jeho klidové energie, která je rovna 0,511 MeV, díky čemuž se perioda oběhu zvýší o celočíselný násobek původní velikosti. Při dosažení požadované energie je svazek vyveden k interakci. Schéma mikrotronu je znázorněné na Obr. 27.



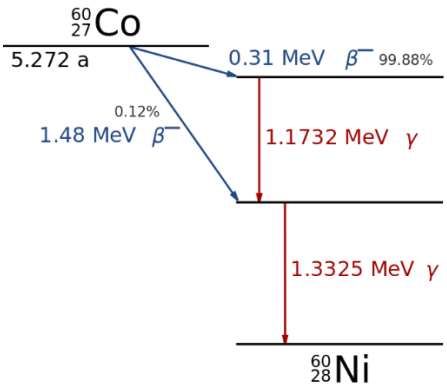
Obr. 27: Schéma mikrotronu. Převzato z [59].

Jak je vidět na Obr. 27 elektrony díky výše zmíněnému způsobu urychlování obíhají po kruhových drahách se společným tečným bodem v místě, kde se nachází dutinový rezonátor.

V této práci jsem využil mikrotron MT25 provozovaný Ústavem jaderné fyziky Akademie věd ČR v Řeži. Tento mikrotron je schopný urychlovat elektrony na maximální energii 25 MeV, energii lze měnit po 1 MeV v rozsahu 12 až 25 MeV a o 0,5 MeV v rozsahu 6 až 15 MeV [60].

3.2.2. Zdroj gama záření

K ozařování vzorků pomocí γ záření po stanovenou dobu lze využít kontinuální zdroj Gammacell GC 220 na Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské. Gammacell se skládá ze 48 ocelových tyčí v nichž je ve formě pelet umístěn radionuklid ^{60}Co. ^{60}Co podléhá β rozpadu na stabilní nuklid ^{60}Ni s poločasem přeměny 5,27 let dle schématu na Obr. 28.



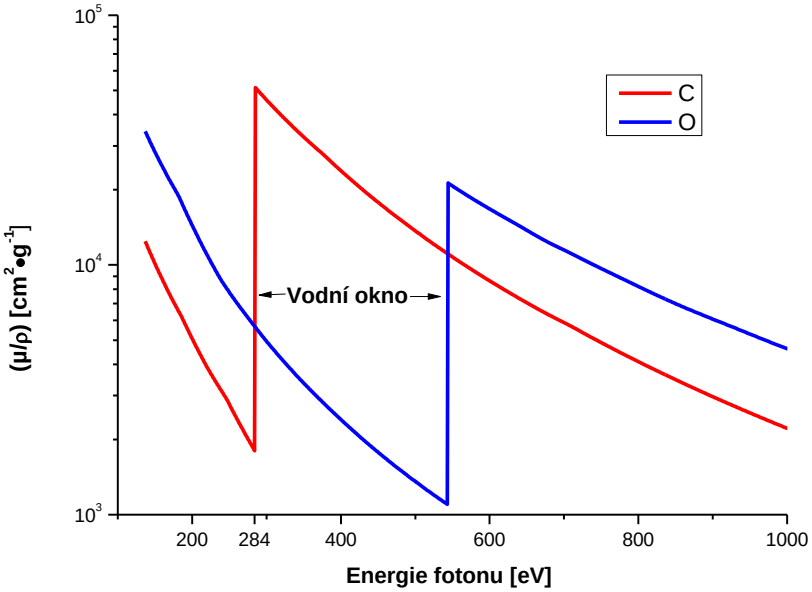
Obr. 28: Schéma přeměny ^{60}Co. Převzato z [61]

Jak je patrné ze schématu na Obr. 28, rozpadem ^{60}Co dochází k vyzáření částice β^- a dvou kvant γ s energiemi 1,17 a 1,33 MeV. Ozařování vzorků probíhá v ose zařízení v ozařovací komoře, kolem které jsou umístěny koaxiálně ocelové tyče, která se vpouští do ozařovacího prostoru pomocí elektromotoru. Při ozařování jsou vzorky stíněny, takže dochází k deponování pouze γ záření. Zdroj záření je umístěn ve stíněné části, takže nedochází k ozáření operátora při práci. Snímek zařízení je na Obr. 29.

Obr. 29: Gammacell GC 220 na Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské.

3.2.3. Zdroj záření ve vodním okně

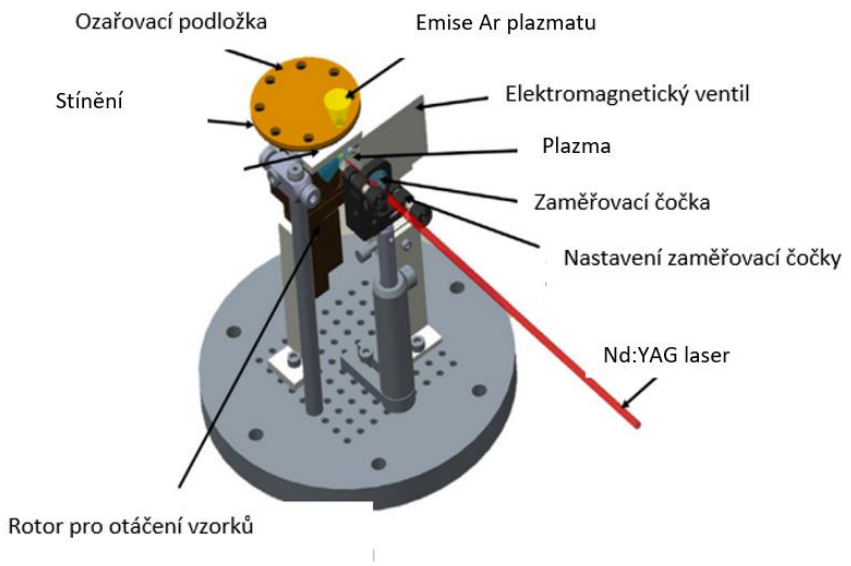
Z výsledků simulací ozařování modelu bakteriální spory vyplynulo, že absorpce největší dávky při konstantní fluenci fotonů probíhá právě ve spektrální oblasti vodního okna. Vodní okno je definováno jako oblast elektromagnetického spektra nacházející se mezi K absorpční hranou uhlíku (284 eV; 4,4 nm) a kyslíku (543 eV; 2,3 nm). Zde vykazuje uhlík téměř o řád vyšší absorpci oproti kyslíku, díky čemuž je voda v této spektrální oblasti transparentní a k absorpci záření dochází především ve strukturách bohatých na uhlík. Grafické znázornění vodního okna je na Obr. 30.



Obr. 30: Spektrální oblast vodního okna (284 – 543 eV) znázorněná pomocí hmotnostních součinitelů absorpce uhlíku a kyslíku.

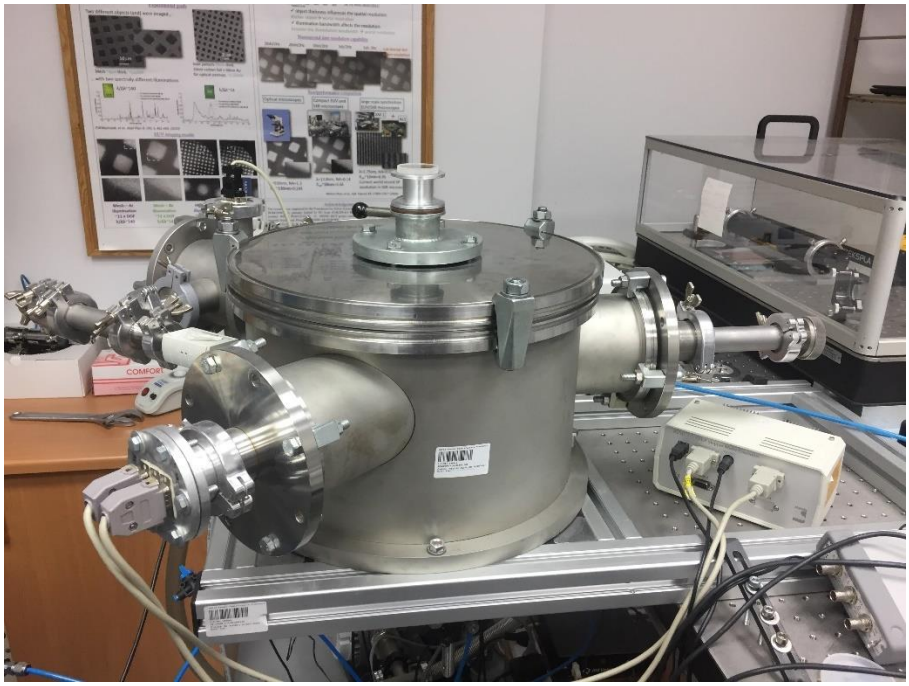
Graf na Obr. 30. byl vytvořen na základě dat dostupných v Henkeho tabulkách [55] a je z něj patrné, že kyslík oproti uhlíku vykazuje téměř o řád nižší absorpci.

Zdroj fotonů s energiemi ve vodním okně se nachází na Ústavu optoelektroniky při Vojenské technické univerzitě ve Varšavě. K ozařování se využívá čerpání argonového plazmatu infračerveným Nd:YAG (neodymem dopovaný yttrito-hlinitý granát) laser o vlnové délce λ = 1064 nm. Délka jednoho pulsu je 4 ns s energií 650 mJ s opakovací frekvencí až 10 Hz. Vygenerovaný svazek je veden přes sérii zrcadel přes vstupní okénko do interakční komory, kde je udržováno hrubé vakuum o přibližné hodnotě 1 Pa. Přivedený laserový svazek je fokusován bikonvexní čočkou, jejíž ohnisko se nachází 2 mm nad ústím plynové trysky, odkud je vháněn do systému argon. Ventil argonu a laser jsou synchronizovány, tak aby došlo k optimálním parametrům emise argonového svazku [2]. Ozařovat je možné až osm vzorků najednou, schéma ozařovací komory je na Obr. 31.



Obr. 31: Schéma ozařovací komory. Převzato a přeloženo z [62].

Ozařování probíhá za sníženého tlaku. Osm vzorků se nejprve rozmístí na ozařovací podložku viz Obr. 31 tak, aby ozařovaná plocha se vzorkem směrovala dolů. V případě špatného umístění vzorku by mohlo dojít k pohlcení veškeré energie v podložce vzorku. Poté, co je ozařovací komora uzavřena a utěsněna, může být spuštěno odčerpání vzduchu, které trvá přibližně 20 minut. Následně je možné ozařovat. Vzorky, které byly rozmístěny na ozařovací podložku je možné měnit díky rotoru, který otáčí s celou podložkou kolem své osy. Aby nedocházelo během k ozařování jednoho vzorku k ozáření ostatních, je ozařovací podložka odstíněna pomocí fólie, ve které je otvor pouze pro jedno okénko, takže je ozařován pouze jeden vzorek. Pro účely kontroly experimentálního rozvržení ozařovaní je na víku ozařovací komory umístěn skleněný otvor. Pohled na ozařovací komoru z venku je na Obr. 32.



Obr. 32: Uzavřená ozařovací komora.

Po dokončení ozařování byla komora zavzdušněna a vzorky vyjmuty.

3.2.4. Ostatní přístroje a zařízení

- Autokláv (Tuttnauer 2540M)
- Bürkerova počítací komůrka, typ Neubauer d = 0,01 mm (Hecht Assistent)
- Magnetická míchačka (Velp Scientifica)
- Mikroskop BX51M (Olympus)
- Pipety: 100 µl,1000 µl, 200 µl a 20 µl (Eppendorf)
- Laboratorní váhy (KERN ABT 220-5DM)
- Inkubátor (termostat) (Lovibond)
- Laminární box (Bioair Instruments)
- Ultrazvuková lázeň Transsonic TS 540 (P-Lab)
- Spektrofotometr (Shimadzu UV2600)
- Počítačka kolonií Schutt Count (Schuett-Biotec)
- Horizontální elektroforéza Mupid ExU (Helixx)
- Optický filtr Wratten 15 (Kodak)
- Fotodioda AXUV-100 (Optodiode Corporation)

3.2.5. Použité chemikálie

- LB agar (složení: Kvasnicový extrakt (5 $g \cdot l^{-1}$); Chlorid sodný (5 $g \cdot l^{-1}$); Agar-Agar (15 $g \cdot l^{-1}$); Pepton (10 $g \cdot l^{-1}$) (Roth)
- Heptahydrát síranu železnatého ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný (Roth)
- Kyselina sírová (Penta)
- Agaróza pro molekulární biologii (Serva)
- EDTA (Komplexon II, Penta)
- Tris-HCl (Roth)
- Kyselina octová (Penta)
- Izopropylalkohol (propan-2-ol; 99,99%; Chromasolv LC MS) (Honeywell)
- Plazmid pRB322 (New England Biolabs)
- Fluorescenční barvivo SYBRGreen I (10000X) (Sigma-Aldrich)
- Sledovací roztok 6x Loading Dye (ThermoFisher)

3.3. Metodické postupy

Pro ověření funkce izopropanolu jako vychytávače OH radikálů jsem zvolil dobře dostupný a prostudovaný plazmid pBR322 (New England Biolabs) se 4361 páry bází. Pro použití plazmidové DNA je dobré použít zdroj s nízkým dávkovým příkonem, aby bylo možné dobře rozlišit deponované dávky.

Roztoky *B. subtilis*, použité ve všech experimentech, byly poskytnuty Ústavem molekulární biologie Slovenské akademie věd v Bratislavě. Koncentrace zásobní suspenze byla stanovena dvojím způsobem: počítáním spor ve specificky naředěných roztocích pomocí Bürkerovy komůrky (typ Neubauer o hloubce 0,01 mm) a pomocí očkování specificky naředěných roztoků na agarové misky. Cílem samotných experimentů bylo sledovat úbytek populace spor iniciovaný vlivem vybraného druhu záření, především měkkého rentgenového záření a elektronů v závislosti na době ozařování, respektive dávce a koncentraci vychytávače hydroxylových radikálů. Z naměřených údajů byly zkonstruovány křivky přežití.

3.3.1. Příprava zásobního roztoku spor

Zásobní roztok spor *B. subtilis* kmene PY79 [63], který byl použit pro všechny ozařovací experimenty, byl připraven vysazením jedné kolonie do 10 ml LB (Luria-Bertani) agaru s následnou inkubací po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Takto připravená kultura byla následně použita k naočkování dalších 10 ml čerstvého LB agaru do absorbance 0,05 při vlnové délce 600 nm. Bakterie byly poté ponechány růst do hodnoty absorbance 1. Následně bylo odebráno 200 µl vyrostlé kultury, kterou byl naočkován sporulační agar [64], na kterém následně kultura rostla dva dny při teplotě 37 °C. Po uplynulé době byl agar vyjmut z termostatu a byl ponechán pět dní za laboratorní teploty, dokud většina buněk nedosáhla zralého stádia, které bylo možné určit pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem. Po dozrání bylo možné vyrostlé buňky sklidit, čímž začnou vznikat spory.

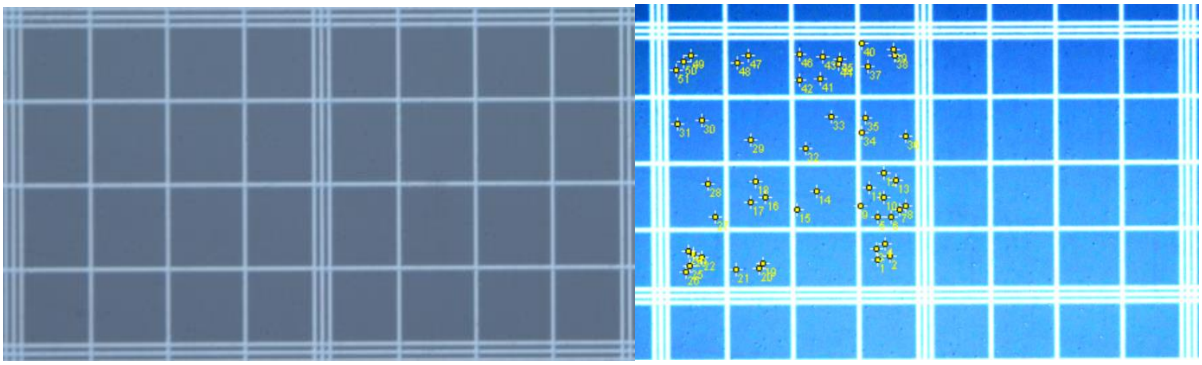
Po sklizení byly spory převedeny do ledové sterilní vody, ve které byly promývány. Promývání probíhá pomocí centrifugace po dobu 20 minut při 10000 g a teplotě 4 °C, kde následně dochází k odebírání supernatantu a doplňováním jeho odebraného objemu ledovou vodou, přičemž dochází k odstranění buněčných zbytků a buněk. Promývání probíhalo několikrát po dobu dvou týdnů, výsledný roztok byl skladován při 4 °C.

3.3.2. Stanovení koncentrace zásobního roztoku spor

Před samotným ozařováním bylo nejprve nutné stanovit koncentraci obou zásobních roztoků, které byly k ozařování použity. Metody byly použity dvě, aby bylo možné ověřit jejich přesnost a získat co nejpřesněji hledanou koncentraci.

První metodou bylo počítání spor pomocí Bürkerovy komůrky, což je malé speciální podložní sklíčko, které se používá ke stanovení počtu biologických entit ve vzorku. Na Bürkerově komůrce je vygravírován rastr malých a velkých čtverečků s definovanými rozměry, díky nimž je možné spočíst počet entit v předem definovaném objemu. Princip stanovení je založen na mikroskopickém pozorování komůrek. Vzhledem k rozměrům spor je vhodné použít takovou komůrku, kde není možné rozložení spor do více vrstev, což by mohlo mít za následek zkreslení výsledku. Použil jsem proto komůrku typu Neubauer s tloušťkou zkoumané vrstvy 0,01 mm.

V praxi je nutné nejprve připravit sérii vzorků o známém faktoru ředění, aby bylo možné zpětně výchozí koncentraci dopočítat. Následně se postupně jednotlivé vzorky v objemu 5 µl nanáší do Bürkerovy komůrky. Poté jsou překryty krycím sklíčkem, aby nedošlo ke vzniku vzduchových bublin v preparátu. Takto připravený preparát je pozorován mikroskopem s následným pořízením záznamu. Snímek komůrky je následně vyhodnocen pomocí počítačového programu umožňující počítání ručně vložených bodů, například ImageJ. Ukázka počítaní pomocí programu ImageJ je na Obr. 33.



Obr. 33A a 33B: Fotografie z Bürkerovy komůrky DIC mikroskopem (vlevo) a její následné upravení a vyhodnocení v programu ImageJ (vpravo).

Z Obr. 33A a 33B je patrné, že fotografii pořízenou v mikroskopu je nutné nejprve upravit. Úpravou jasu a kontrastu lze jednotlivé spory více zviditelnit, takže je snazší jejich následné počítání. Na upravené fotce vpravo je také vidět postup pro počítání, kdy se každá spora označí ručně.

Druhá metoda stanovení koncentrace je založena na očkování ředěných roztoků na agarové misky. Stejně jako v případě Bürkerovy komůrky je nejprve nutné vytvořit sérii vzorků o známém faktoru ředění, s kterými se následně pracuje stejně jako to je popsáno v kapitole 3.4 *Vyhodnocení*.

Výchozí koncentrace použitých zásobních suspenzí spor byla stanovena pomocí očkování na LB agar. Výsledná koncentrace roztoků činila $4{,}5 \times 10^{10}$ CFU·ml^{-1} v případě očkování a v případě počítání Bürkerovou komůrkou 5×10^{10} spor·ml^{-1}.

3.3.3. Příprava zásobních roztoků

Pro všechny experimenty byla použita destilovaná voda, která byla před použitím sterilizována v autoklávu. Sterilizace probíhala po dobu 45 minut při 131 °C v uzavřených sklenicích. Po temperaci na laboratorní teplotu byla následně sterilní voda uložena do lednice, kde byla skladována při teplotě 7 °C.

Pro pozorování přímého a nepřímého účinku ionizujícího záření na biologické struktury byl použit zásobní roztok plazmidů o koncentraci 10 ng·µl^{-1}. Z roztoku bylo odebráno vždy 50 µl, které byly následně zředěny sterilní vodou a různě koncentrovaným izopropanolem na roztok o výsledném objemu 500 µl. Vzorky byly skladovány v mrazicím boxu a přenášeny v přenosném chladicím boxu, aby se omezilo jejich tepelné poškození.

Pro ozařování spor ve vodním prostředí byl připraven roztok o koncentraci 2×10^8 CFU·ml^{-1}, zředěním zásobního roztoku, ve kterém byla stanovena koncentrace viz kapitola 3.3.2 *Stanovení koncentrace zásobního roztoku spor*. Vzorky byly skladovány při teplotě 7 °C.

K ozařování spor v suchém stavu byl připraven zásobní roztok o koncentraci $4{,}5 \times 10^8$ CFU·ml^{-1}, který byl následně skladován v při teplotě 7 °C.

Pro účely gelové elektroforézy byl připraven zásobní pufr 50x TAE, který obsahuje: 50 mM EDTA; 1 M kyseliny octové a 2 M Tris-HCl. Před smícháním s gely bylo vždy odebráno požadované množství, které bylo naředěno faktorem 100.

3.4. Vyhodnocení

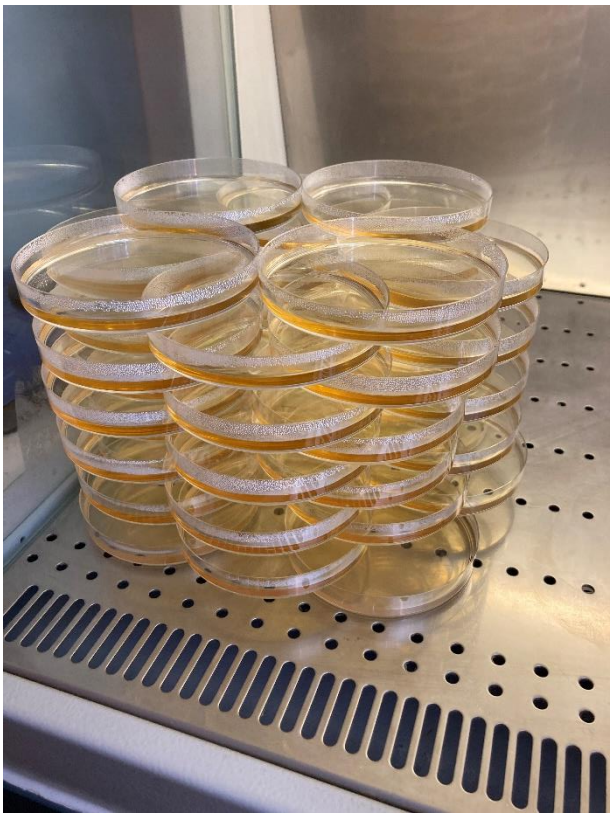
3.4.1. Smývání

V případě využití zdroje záření ve vodním okně bylo nutné vytvořit metodu, při které by bylo možné spory ozařovat v suché formě a následně je smýt, aby je bylo možné očkovat na agarové misky. K vyzkoušení převedení spor do suché formy byly na laboratorní sklíčka deponovány různě velké objemy (1, 2, 3, 4, 5 a 10 µl) roztoků pomocí pipety. Sklíčka byla ponechána schnout ve stínu za laboratorní teploty, dokud se na nich nevytvořil sporový film. Následně byla sklíčka pinzetou přendána do zkumavek, ve kterých bylo předem napipetováno 500 µl sterilní vody. Zavřené zkumavky byly ponechány po dobu jedné minuty ve ultrazvukové vodní lázni Transsonic TS 540. Sklíčka byla následně opatrně vyndána pinzetou, aby v roztoku zůstalo, co nejvíce spor. Takto připravené roztoky byly zředěny dle potřeby a vysázeny na agarová média.

Po inkubační době byly spočteny kolonie. Na základě výsledků pozorování bylo rozhodnuto, že optimální objem bude 5 µl zásobního roztoku.

3.4.2. Očkování

Pro vyhodnocení křivek přežití je nutné zjistit, kolik spor v rámci ozařování přežilo. K zjištění počtu přeživších spor slouží sčítání kolonií na agarových miskách. Pro tuto metodu je nejprve nutné připravit vhodné agarové médium. V tomto případě byl využit LB agar od firmy Carl Roth. Do Erlenmeyerovy baňky se odváží 8,75 g LB agaru dle návodu, ke kterému je následně přidáno 250 ml destilované vody. Roztok se promíchá a Erlenmeyerova baňka se uzavře víčkem vyrobeným z buničiny a alobalu. Následně se roztok vloží do autoklávu, kde je při 131 °C po dobu 45 minut sterilizován. Po uplynulé době je roztok z autoklávu vyjmut, a ještě za horka je v laminárním boxu vylit do plastových Petriho misek. Agar je možné ponechat schnout v uzavřených Petriho miskách, avšak konzistence výsledného agarového média je vlhká a špatně se do něj vpíjí vzorky, takže bylo využito schnutí v otevřených miskách v laminárním boxu viz Obr. 34.

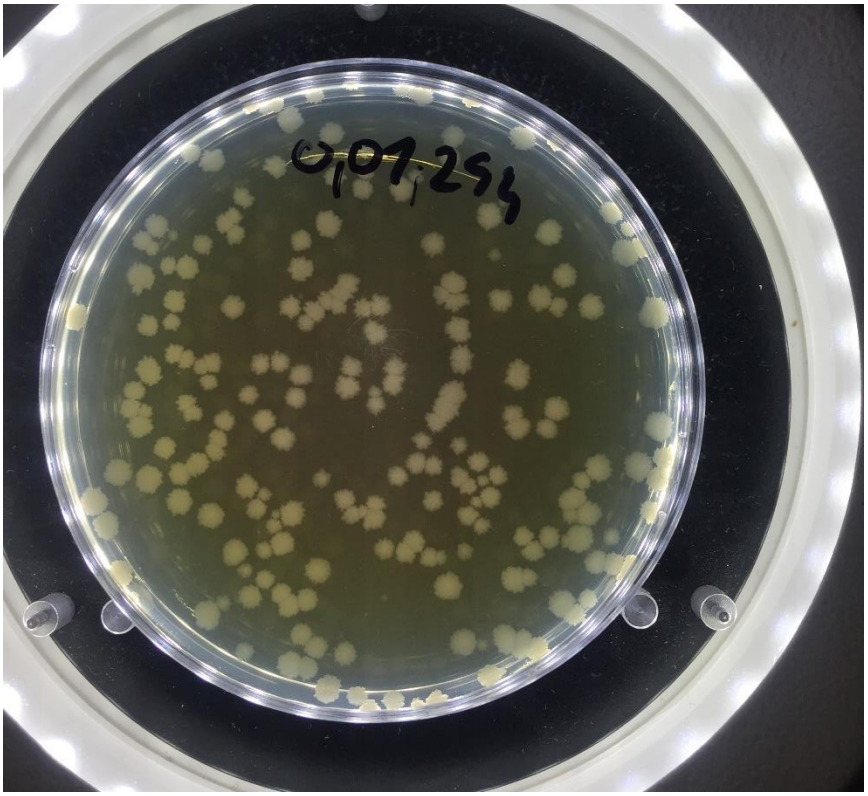


Obr. 34: Ukázka sušení agarového média v otevřených Petriho miskách.

Způsob na Obr. 34 zajišťuje, že výsledné médium neobsahuje přebytečnou vodu a je lépe schopné nasát vzorek. Tím, že médium rychleji vyschne je také možné takto připravené misky použít do 30 minut od nalití. Největší nevýhodou této metody je možnost kontaminace, která se může projevit vznikem nežádoucích kolonií.

Jakmile je agarové médium ztuhlé, může dojít k samostatnému očkování. V případě této práce byly zředěné vzorky spor deponovány po 100 µl na agar pomocí sterilního kovového očka. Očko bylo před každým roztíráním sterilizováno plamenem a před kontaktem se vzorkem ještě schlazeno o agarové médium. Vzorky byly ředěny na přibližnou koncentraci 3000 $CFU \cdot ml^{-1}$ tak, aby bylo na jednotlivé misky očkováno maximálně 300 kolonií. Po rozetření vzorku byla Petriho miska uzavřena a ponechána přibližně pět minut schnout. Následně byla Petriho miska horizontálně otočena o 180° a vložena do inkubátoru, kde byla ponechána 24 hodin při 37 °C.

Po uplynulé době byla miska vyndána a spočetl se počet kolonií. K usnadnění práce byla využita počítačka kolonií Schutt Count. Následně byl vynásoben počet kolonií faktorem ředění, aby bylo možné zjistit zastoupení živých spor v původním vzorku. Na Obr. 35 je ukázka vyrostlých kolonií na Petriho misce.



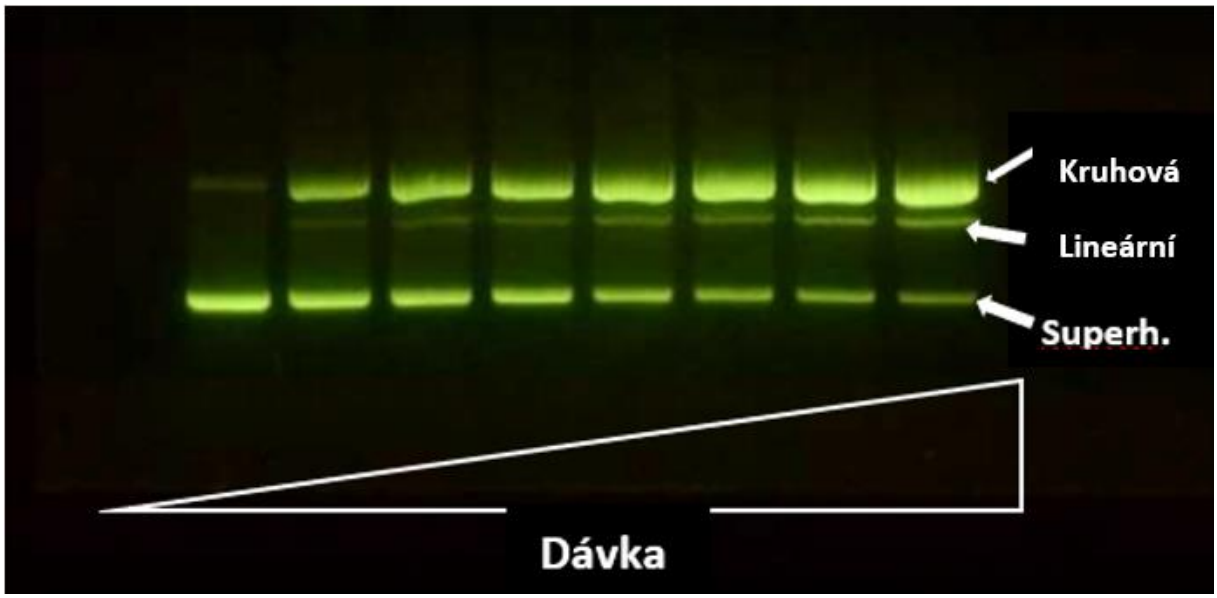
Obr. 35: Narostlé kolonie *B. subtilis* na LB agaru v Petriho misce.

3.4.3. Gelová elektroforéza

Pro účely gelové elektroforézy byly připraveny gely z 0,8% agarózy a pufru 0,5x TAE, který byl připraven stonásobným ředěním koncentrovaného zásobního roztoku 50x TAE. Takto připravený roztok byl přiveden k varu a následně vařen po dobu jedné minuty. Následně je roztok odejmut od zdroje tepla a je do něj přidáno fluorescenční barvivo SYBRGreen I s faktorem ředění 10000. Po promíchání se roztok nalil do formiček s hřebínky pro jamky, kde došlo přibližně po hodině k jeho vytvrzení.

Před vlastní elektroforézou je nutné připravit plazmidové vyhodnocovací roztoky. K 10 µl roztoku byly přidány 2 µl sledovacího roztoku (6X Loading Dye). Takto připravený roztok je schopný se udržet v agarové jamce a může být sledována jeho migrace po agarové matrici během elektroforézy.

Před použitím byl gel nejdříve vložen do vaničky pro elektroforézu, kde se zalil po rysku roztokem 0,5x TAE. Následně byla k vaničce připojena horizontální elektroforéza. Do jednotlivých jamek byly napipetovány připravené roztoky plazmidů, vanička se uzavřela a na soustavu bylo přivedeno elektrické pole o intenzitě $E = 5\ \mathrm{V \cdot cm^{-1}}$. Po 75 minutách bylo elektrické pole vypnuto, agar se vyjmul a položil na transiluminanční stolek, kde probíhalo jeho fotografování přes optický filtr Wratten 15. Snímek pořízený z transiluminančního stolku je na Obr. 36.



Obr. 36: Výsledný snímek, ze kterého lze stanovit poměr jednotlivých plazmidových forem.

Z Obr. 36 je vidět, jak se mění poměr jednotlivých forem v závislosti na deponované dávce. Fotografie byly následně upraveny a vyhodnoceny pomocí některého programu ImageJ. Získaná data z analýzy snímků je poté možné fitovat pomocí vztahů 19A – 19C k získání parametrů β_{SSB} a β_{DSB}.

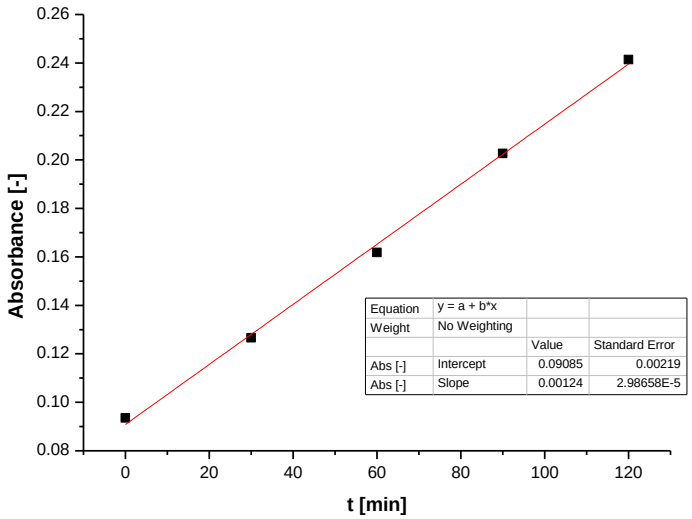
3.5. Charakterizace zdrojů

3.5.1. Gammacell GC 220

Pro charakterizaci Gammacellu GC 220 byl použit roztok Frickeho dozimetru. Frickeho dozimetr byl připraven ve zkumavce, která byla před použitím ponechána otevřena, aby došlo k nasycení vzdušným kyslíkem. Následně byl v uzavřené zkumavce roztok Frickeho dozimetru znovu protřepán a převeden po 500 μl do 1,5 ml zkumavek typu Eppendorf, ve kterých probíhalo následné ozařovaní. Charakterizace zdroje probíhala ve stejných zkumavkách a stejné geometrii jako následné ozařovaní vlastních vzorků, aby došlo k minimálním odchylkám měření. Celkem bylo připraveno 5 dozimetrů, které byly ozařovány po dobu: 0; 30; 60; 90 a 120 minut.

K vyhodnocení dozimetrie byl využit spektrofotometr Shimadzu UV2600. Byla měřena absorbance při vlnové délce 304 nm. Absorbovanou dávku D, vyjádřenou v Gy, respektive dávkový příkon zdroje v $\mathrm{Gy \cdot\ min^{-1}}$, lze následně dopočítat na základě vztahu (12) a lineární regresí rostoucí dávky jako funkci času. Vzhledem k vysoké absorbanci, kterou vykazuje super Frickeho dozimetr díky vysoké koncentraci železitých iontů, jsem ozářené vzorky před vyhodnocením ředil faktorem 10 pomocí 0,4M H_2SO_4.

Jak bylo zmíněno výše, k výpočtu je třeba znát směrnici hodnot absorbancí při 304 nm pro jednotlivé časy ozařování. Tu lze vypočítat lineární regresí jako je tomu na Obr. 37.



Obr. 37: Lineární regrese hodnot absorbancí při 304 nm.

Z lineární regrese dat na Obr. 37 vyplývá, že hodnota směrnice je 0,00124 min^{-1}, takže lze dopočíst (dle rovnice č. 12) hodnotu dávkového příkonu $\dot{D}$ ve tvaru

$$\dot{D} = \frac{0{,}00124 \cdot 60}{2197 \cdot 1{,}61 \cdot 1{,}024} = 20{,}5\ \mathrm{Gy} \cdot \mathrm{h}^{-1}. \tag{26}$$

Z vypočítaných hodnot tedy vyplývá, že v těchto ozařovacích podmínkách dochází k deponování 20,5 Gy za hodinu ozařování.

3.5.2. Mikrotron MT25

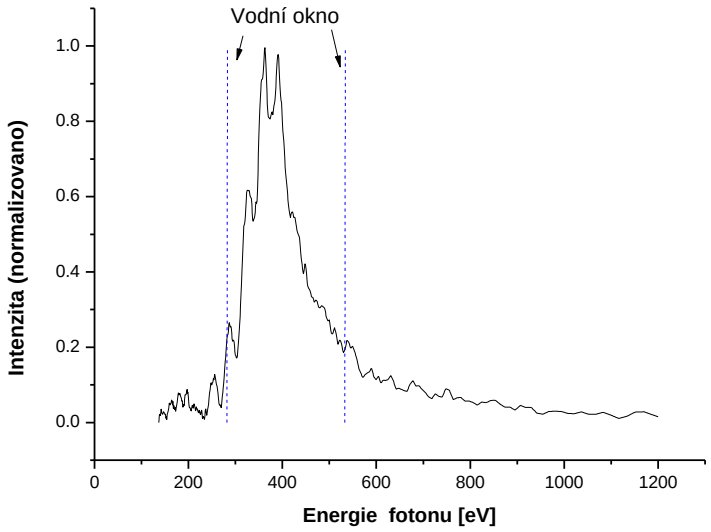
K ozařování pomocí urychlených elektronů byl využit mikrotron MT25 provozovaný Ústavem jaderné fyziky Akademie věd ČR v Řeži. Ke stanovení dávky elektronového svazku mikrotronu byl využit Frickeho dozimetr, respektive jeho modifikovanou verzi, tzv. super Frickeho dozimetr, a to vzhledem k vysokým dávkovým příkonům, které je mikrotron MT25 schopen dosáhnout. Metoda je založená na stanovení absorbované dávky v roztoku obsahujícího železnaté ionty. Super Frickeho dozimetr je složen z 10mM $FeSO_4$ a 0,4M H_2SO_4. Princip a vyhodnocení probíhá stejně jako v případě standardního Frickeho dozimetru.

Nejprve byl připraven roztok Frickeho dozimetru ve zkumavce, která byla přes noc ponechána otevřena k umožnění saturace roztoku vzdušným kyslíkem. Následně bylo do polypropylenových zkumavek napipetováno po 1 ml roztoku. Měření probíhalo ve stejných zkumavkách, ve kterých probíhalo následné ozařovaní, tedy typ Eppendorf o objemu 1,5 ml. Před samotným ozářením byly zkumavky protřepány, aby došlo k saturaci roztoku kyslíkem. Následně byly zkumavky ozařovány svazkem urychlených elektronů mikrotronem MT25 a přibližně po 2 minutách byly postupně odebírány. Jeden roztok zůstal vždy neozářený a sloužil jako kontrolní vzorek. Takto měření probíhalo celkem třikrát v různých vzdálenostech od výstupního okénka mikrotronu. K ozařování byly využity elektrony urychlené na energii 15,2 MeV.

Obvyklé použité dávkové příkony od takto urychlených elektronů se pohybovaly od 5 do 10 $Gy \cdot s^{-1}$.

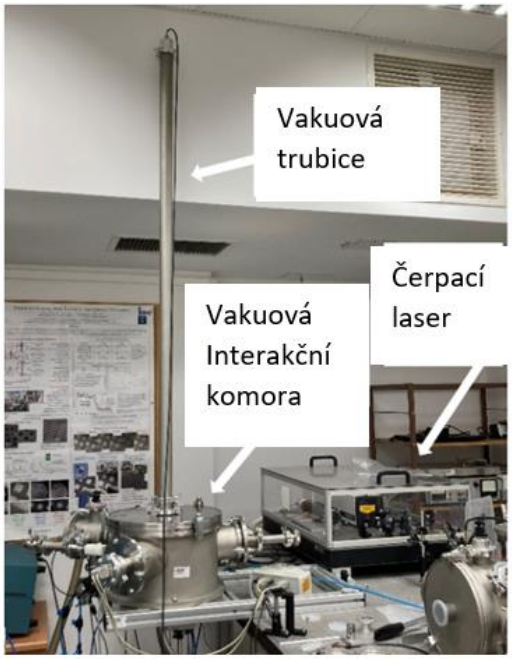
3.5.3. Zdroj záření ve vodním okně

Ke správnému odhadu deponované dávky ve vzorku je třeba znát spektrální rozložení intenzity záření. Ta byla získána z práce [2] a její průběh je na Obr. 38.



Obr. 38: Spektrum rozložení intenzity záření s barevně vyznačeným vodním oknem.

Dále je potřeba stanovit spektrální fluenci energie K tomu byla využita křemíková fotodiody AXUV-100, která byla umístěna pomocí vakuové trubice 1,66 m od zdroje záření, tak jak je to vyfoceno na Obr. 39. Fotodioda je povrstvena 200 nm Ti a 50 nm amorfního uhlíku. Fotodioda byla umístěna tak, aby byla ozařována celá její detekční plocha 10x10 mm^2.



Obr. 39: Experimentální rozvržení pří charakterizaci zdroje záření ve vodním okně.

Protože s počtem zvyšujících se výstřelů dochází ke zvýšení tlaku v ozařovací komoře, signál byl zaznamenán vždy po posledním výstřelu z určité série. Bylo zaznamenáno několik výstřelů pro různě dlouhé série. Fluenci energie v $J \cdot cm^{-2}$ je možné vypočíst vztahem

$$\Psi(\mathrm{E}) = \frac{\mathrm{w(E)E}}{ZT_{Ti}T_C QEA_{det}} \int_{t_1}^{t_2} Udt, \tag{27}$$

kde w(E) je distribuční funkce intenzity počítaná z intenzitního spektra (Obr. 38), Z je impedance obvodu (50 Ω), E je energie fotonu [eV], T_{Ti} a T_C jsou transmise titanové a uhlíkové vrstvy fotodiody, QE je kvantová účinnost v [el.·foton^{-1}] a A_{det} je plocha detektoru (1 cm^2). Integrace napěťového signálu z fotodiody se provádí v rozmezí časů t_1 a t_2 záznamu signálu. Poté již bylo potřeba pouze upravit hodnotu fluence ve vzdálenosti detektoru na vzdálenost zdroje ke vzorku, tedy 7,3 cm. Vypočtená fluence měla hodnotu $6{,}9\times10^{-5}$ $J \cdot cm^{-2}$ pro jeden laserový impulz. Dávku ve vzorku lze pak určit následujícím vztahem:

$$\mathrm{D} = \int_{E_0}^{E_{max}} \Psi(E) \left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_{eff} dE, \tag{28}$$

kde se použijí již spočtené efektivní hmotnostní absorpční koeficienty pro libovolnou část spory (jádro, kortex, plášť). Pro obdržení jednotky dávky v Gy je třeba vyjádřit absorpční koeficienty v jednotkách $kg \cdot cm^{-2}$.

Pokud vezmeme v úvahu délku pulzu budícího laseru 4 ns bude dávkový příkon dodaný jediným pulzem dosahovat hodnot $2{,}9\times10^{11}$ $Gy \cdot s^{-1}$ v jádře, $1{,}9\times10^{11}$ $Gy \cdot s^{-1}$ v kortexu a $2{,}8\times10^{11}$ $Gy \cdot s^{-1}$ v plášti spory. Oproti urychleným elektronům generovaným mikrotronem MT25 se tedy bude jednat o ultra vysoký dávkový příkon.

3.6. Ozařovací experimenty

3.6.1. Plazmidová DNA v prostředí vychytávače OH radikálů

V přítomnosti vychytávače OH radikálu je nepřímé poškození DNA ovlivněno tak, že vychytáváč reaguje s OH radikály generovanými ve spurách a vytváří se tak konkurenční reakční schéma mezi vychytávačem a DNA. Pokud stoupne koncentrace vychytávače na maximální možnou hodnotu, dojde k reakci mezi vychytávačem a OH radikálem již v samotné spuře, nebo v jejím bezprostředním okolí a veškeré poškození DNA, které by bylo možné detekovat, bude způsobeno pouze vlivem přímého účinku [65]. Konkurující si reakce lze shrnout následujícím schématem:

$$OH + DNA \rightarrow DNA\cdot, \tag{29}$$
$$OH + S \rightarrow P, \tag{30}$$

kde při reakci s OH radikálem a DNA vzniká radikál nukleové kyseliny a reakcí OH radikálu s vychytávačem (S) vzniká jejich produkt (P).

Jako vychytáváč byl zvolen izopropanol (propan-2-ol; 2-PrOH) vzhledem k tomu, že v literatuře nebyla dosud publikována studie, která jej jako vychytáváč používá v souvislosti s ozařováním bakteriálních spor či DNA ionizujícím zářením. Probíhající reakci lze popsat následujícím schématem:

$$OH + 2 - PrOH \rightarrow H_2O + (CH_3)_2COH. \quad (31)$$

Rychlostní konstanta této reakce je k = 1.9×10^9 $M^{-1}\cdot s^{-1}$ [66]. Vzhledem k tomu, že vychytávač je v roztoku proti koncentraci OH radikálu v nadbytku, jedná se o kinetiku pseudoprvního řádu, proto lze součinem rychlostní konstanty a koncentrace vychytávače vyjádřit tzv. vychytávací účinnost (angl. Scavenging capacity): $\sigma = k[S]$. Celková vychytávací účinnost je pak dána součtem součinů jednotlivých koncentrací přítomných vychytávačů s příslušnými rychlostními konstantami [67].

Pro ověření účinku izopropylalkoholu lze využít plazmidovou DNA. K ozařování byl použit typ plazmidů pBR322 (New England Biolabs) se 4361 páry bází. Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.3 *Příprava zásobních roztoků*, ze zásobního roztoku plazmidů o koncentraci 10 $ng\cdot\mu l^{-1}$ bylo odebráno vždy 50 µl a následně zředěno na výsledný roztok o objemu 500 µl a koncentraci 1 $ng\cdot\mu l^{-1}$. Takto připravených vzorků bylo vždy 6 – 8 do série podle doby ozařování (v případě delších ozařovacích časů bylo připraveno méně vzorků z časových důvodů), přičemž jeden z nich zůstal vždy neozářený. Následně byly vzorky ozařovány určitou dobu podle Tab. 3 v závislosti na koncentraci izopropanolu. Při koncentraci, která již vyžadovala setrvání jednoho vzorku v ozařovací komoře Gammacellu časy delší než 60 minut, jsem zvolil možnost ozáření na zařízení MT25, naladěné na energii, která poskytuje stejné hodnoty lineárního přenosu energie, tj. 0,23 $keV\cdot\mu m^{-1}$.

Tab. 3: Ozařovací časy pro série plazmidů s různou koncentrací izopropanolu.

$c_{prop.}$ $[mol\cdot l^{-1}]$	t [min.]							
0	0	2	4	6	8	10	12	14
$\mathbf{10^{-5}}$	0	2	4	6	8	10	12	14
$\mathbf{10^{-4}}$	0	6	12	18	24	30	36	42
$\mathbf{10^{-3}}$	0	20	40	60	80	100	120	140
$\mathbf{10^{-2}}$	0	60	120	180	240	300		

Ozařování probíhalo ve stejné experimentální konfiguraci jako tomu bylo v případě Frickeho dozimetru, takže lze počítat, s ohledem na dlouhý poločas ^{60}Co, s dávkovým příkonem 20,5 $Gy\cdot h^{-1}$. S ohledem na dávkový příkon lze Tab. 3 převést na hodnoty deponované dávky viz Tab. 4.

Tab. 4: Deponované dávky *D* Gammacellem GC220 pro série plazmidů s různou koncentrací izopropanolu c_{prop} z Tab. 3.

$c_{prop.}$ $[mol\cdot l^{-1}]$	D [Gy]							
0	0	0,7	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	4,8
$\mathbf{10^{-5}}$	0	0,7	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	4,8
$\mathbf{10^{-4}}$	0	2,1	4,1	6,2	8,2	10,3	12,3	14,4
$\mathbf{10^{-3}}$	0	6,8	13,7	20,5	27,3	34,2	41,0	47,8
$\mathbf{10^{-2}}$	0	20,5	41,0	61,5	82,0	102,5		

Pro dlouhé ozařovací časy plazmidové DNA, které by bylo obtížné realizovat v Gammacellu vzhledem k nízkému dávkovému příkonu, byl využit mikrotron jako alternativní zdroj. V Tab. 5 jsou uvedené použité koncentrace izopropanolu a deponované dávky během jejich ozařování.

Tab. 5: Deponované dávky *D* mikrotronem MT25 pro série plazmidů s různou koncentrací izopropanolu c_{prop}.

$c_{prop.}$ [mol·l^{-1}]	D [Gy]							
10^{-1}	0,0	103,9	214,2	326,9	437,2	547,4	657,7	767,9
1	0,0	516,0	998,1	1541,7	2076,1	2598,2	3138,7	3648,5

Ozářené vzorky byly následně vyhodnoceny metodou dle kapitoly 3.4.3 *gelová elektroforéza*.

3.6.2. Spory v prostředí vychytávače OH radikálů

Jelikož mikrotron umožňuje depozici velmi vysokých dávek (>10^6 Gy), bylo možné prostudovat chování spor v přítomnosti vychytávače OH radikálů a ověřit tak, do jaké míry je inaktivace spor způsobena přímým a do jaké nepřímým účinkem. Teoretický předpoklad byl ověřen na plazmidové DNA.

V případě ozařování urychlenými elektrony na mikrotronu MT25 byl ozařován zásobní roztok spor o koncentraci 10^8 CFU·ml^{-1} s různou koncentrací izopropanolu. V každé sérii bylo připraveno několik vzorků o objemu 1 ml, ve kterých byla deponována předem definovaná dávka. Ozařování jednotlivých roztoků o dané koncentraci izopropanolu probíhalo třikrát. V prvním ozařování bylo dávkové rozpětí zájmu proměřeno větším počtem bodů, tedy více vzorky o menších rozdílech deponovaných dávek tak, aby byla stanovena přibližná hodnota D_{10}. Druhé a třetí ozařování probíhalo s menším množstvím vzorků a sloužilo k potvrzení již pozorovaného trendu. Obě ozařování probíhaly na otočném držáku 65 cm od výstupního okénka mikrotronu. Držák byl zároveň otáčen tak, aby během každého ozařování došlo alespoň ke dvěma otočením kolem osy držáku a díky tomu k homogennímu ozáření vzorků. Deponované dávky v prvním ozařování činily: 0; 200; 400; 600; 800; 1000; 2000; 4000; 6000; 8000 a 10000 Gy, zatímco v druhém a třetím: 0; 200; 1000; 2000 a 10000 Gy.

3.6.3. Ozařování spor vysokým dávkovým příkonem

Jelikož byl vyzkoušen vliv vychytávače OH radikálů na inhibici spor, bylo možné použít zdroj se zvýšeným dávkovým příkonem, kterým byl zdroj záření ve vodním okně, kde je také potlačen vliv nepřímého účinku, protože ozařované vzorky jsou v suché formě za sníženého tlaku. Spektrální vlastností vodního okna, dle získaných efektivních absorpčních koeficientů z provedených simulací, je nejvyšší účinný průřez absorpce ve všech částech spory. Tím je zaručeno, že absorbovaná dávka ve spoře bude při použití jednotkové fluence fotonů největší ve spoře a jejích částech bude největší, viz Obr. 24.

Ozařování zdrojem ve vodním okně probíhalo se vzorky v suchém stavu. Na každé ozařované sklíčko bylo deponováno 5 µl zásobního roztoku o koncentraci 4,5·10^8 CFU·ml^{-1}. Po vysušení za laboratorní teploty byla sklíčka po sériích o devíti sklíčkách vkládána do ozařovací komory na ozařovací podložku, kterou je možné otáčet pomocí elektrického rotoru. Ozařováno bylo vždy pouze osm sklíček, deváté sloužilo jako kontrolní, aby bylo možné ověřit, zda nedochází k úhynu spor i jiným způsobem, například sníženým tlakem. Desáté sklíčko bylo ponecháno na vzduchu a následně bylo vyhodnoceno společně s celou sérií. Jednotlivé série byly ozařovány různým počtem pulsů. Použitý ozařovací plán je uveden v Tab. 6.

Tab. 6: Ozařovací plán pro zdroj ve vodním okně, kde Vzorek číslo „*V0*“ značí neozářený vzorek, který byl ponechán na vzduchu a „0“ značí vzorek, který byl společně s celou sérií v ozařovací komoře.

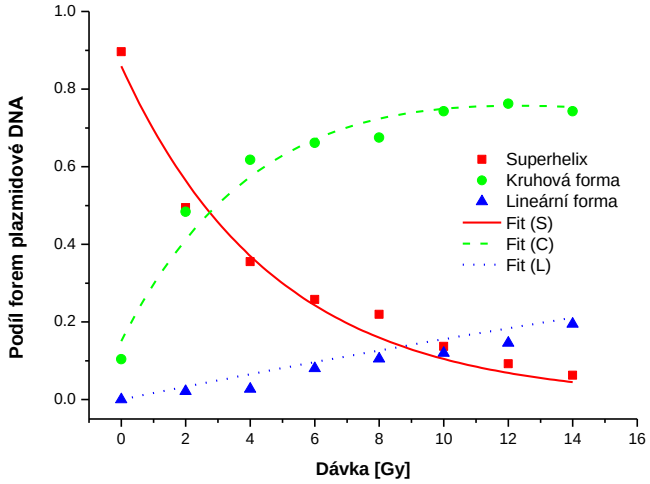
Série:	**počet pulsů**									
A1X1	0	2	4	6	8	10	12	14	16	V0
A1X2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	V0
A1X3	0	2	4	6	8	10	12	14	16	V0
A2X1	0	20	40	60	80	100	120	140	160	V0
A2X2	0	20	40	60	80	100	120	140	160	V0
B2X3	0	20	40	60	80	100	120	140	160	V0
B2X4	0	20	40	60	80	100	120	140	160	V0
B3X1	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	V0
B3X2	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	V0
B3X3	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	V0

Po ozařování byly vzorky následně zpracovány, tak jak bylo popsáno v kapitolách 3.4.1 *Smývání* a 3.4.2 *Očkování*.

4 Výsledky a diskuse

4.1. Plazmidová DNA v prostředí vychytávače OH radikálů

Ozařováním pomocí záření gama byl proměřen vliv koncentrace izopropanolu na přímý a nepřímý účinek pomocí plazmidové DNA. Z každého ozařovaní vznikla série, která byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy a následně zpracována pomocí programu ImageJ, kde byly zjištěni poměry jednotlivých plazmidových forem. Migrace gelovou matricí pro každou sérii byla provedena duálně. Data z jednotlivých sérií byla proložena křivkami a byly zjištěny hodnoty β_{SSB} a β_{DSB}, které jsou uvedeny v Tab. 7. Jednotky pravděpodobností zlomů odpovídají Poissonovu rozdělení s jednotkou počtu zlomů na Gy vyjádřenou na jednu molekulu plazmidu. Ukázka z jedné analýzy výsledků ozařování je na Obr. 40.



Obr. 40: Výsledky ozařování plazmidu ve vodním prostředí.

Tab. 7: Hodnoty pro β_{SSB} a β_{DSB} získané fitováním poměrů jednotlivých forem jako funkce dávky.

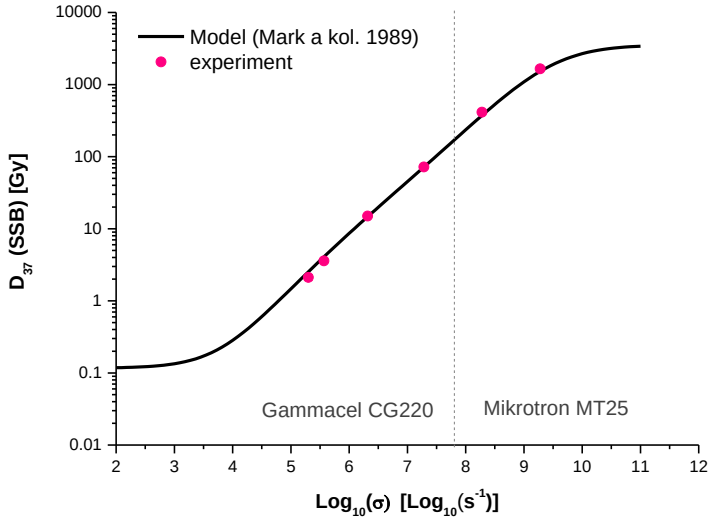
c_{prop}	β_{SSB}		β_{DSB}	
	I	II	I	II
[mol·l^{-1}]	[Gy^{-1}·pl.$^{-1}$]	[Gy^{-1}·pl.$^{-1}$]	[Gy^{-1}·pl.$^{-1}$]	[Gy^{-1}·pl.$^{-1}$]
0	$3{,}82\times10^{-1}$	$4{,}97\times10^{-1}$	$2{,}23\times10^{-2}$	$4{,}30\times10^{-2}$
1×10^{-5}	$4{,}54\times10^{-1}$	$3{,}77\times10^{-1}$	$1{,}37\times10^{-2}$	$3{,}32\times10^{-2}$
1×10^{-4}	$2{,}33\times10^{-1}$	$2{,}57\times10^{-1}$	$1{,}36\times10^{-2}$	$9{,}45\times10^{-3}$
1×10^{-3}	$5{,}63\times10^{-2}$	$6{,}07\times10^{-2}$	$1{,}84\times10^{-3}$	$2{,}57\times10^{-3}$
1×10^{-2}	$1{,}21\times10^{-2}$	$1{,}23\times10^{-2}$	$7{,}41\times10^{-4}$	$1{,}23\times10^{-3}$
1×10^{-1}	$2{,}51\times10^{-3}$	$2{,}32\times10^{-3}$	$9{,}68\times10^{-5}$	$1{,}98\times10^{-4}$
1	$5{,}84\times10^{-4}$	$6{,}27\times10^{-4}$	$5{,}48\times10^{-5}$	$4{,}72\times10^{-5}$

Z průměrných hodnot pro jednotlivá měření v Tab. 7 lze vypočíst dávku D_{37}, při které přežije pouze 37 % ozařované populace. Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Hodnoty pro D_{37} získané výpočtem z Tab. 7.

c_{prop} [mol·l^{-1}]	D_{37} (SSB) [Gy]	D_{37} (DSB) [Gy]
0	2,0 ± 0,3	29,1 ± 11,3
1×10^{-5}	2,1 ± 0,3	38,6 ± 16,3
1×10^{-4}	3,6 ± 0,3	77,1 ± 13,0
1×10^{-3}	15,0 ± 0,6	404,9 ± 75,4
1×10^{-2}	71,9 ± 0,3	958,0 ± 207,6
1×10^{-1}	414,1 ± 16,3	6782,2 ± 2330,2
1	1652,2 ± 58,2	19605,6± 1457,9

Z hodnot v Tab. 8 je vidět, že s rostoucí koncentrací izopropanolu dochází ke zvýšení plazmidové rezistence vůči deponované dávce, z čehož lze usuzovat, že dochází k postupnému snižování podílu nepřímého účinku. Z vypočtených hodnot D_{37_SSB} je možné sestrojit křivku v závislosti na vychytávací účinnosti prostředí, které se odvíjí od koncentrace vychytávačů v roztoku. Sestrojená závislost je na Obr. 41.



Obr. 41: Dávka potřebná pro indukci SSB v plazmidové DNA jako funkce vychytávací účinnosti prostředí. Plnou čarou jsou teoreticky vypočtené hodnoty pomocí sférického modelu dle [68]. Vertikální čára odděluje data získaná ozařováním gama zářením a urychlenými elektrony.

Závislost na Obr. 41 byla proložena teoreticky vypočtenými hodnotami sférického modelu podle [68]. Tímto experimentem bylo ověřeno, že izopropanol skutečně působí jako efektivní vychytávač OH radikálů do vysokých hodnot absorbovaných dávek (~3 kGy). Dalším krokem tedy bylo stanovit vliv koncentrace izopropanolu na hodnotu decimační dávky pro suspenze spor *B. subtilis*.

4.2. Spory v prostředí vychytávače OH radikálů

Během provedených experimentů byly ozařovány *B. subtilis* ve vodním prostředí a následně v prostředí různě koncentrovaného izopropanolu elektrony urychlenými na mikrotronu MT25. Vzorky byly následně zředěny a očkovány na agarové misky. Po inkubační době byly spočteny kolonie, které byly převedeny, za znalosti faktoru ředění, na počet přeživších ve vzorku. Z výsledků pro jednotlivé dávky byly hodnoty zprůměrovány. Naměřené hodnoty včetně chyb jsou uvedeny v Tab. 9A a 9B.

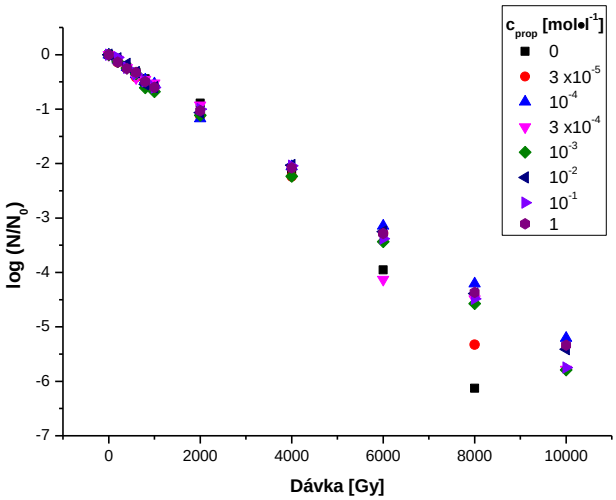
Tab. 9A: Vypočítaný počet přeživších spor v závislosti na deponované dávce *D*, kde c_{prop} [mol·l^{-1}] je koncentrace izopropanolu v roztoku.

D	**c_{prop} [mol·l^{-1}]**			
[Gy]	**0**	**3x10^{-5}**	**10^{-4}**	**3x10^{-4}**
0	(1,9 ± 0,1)×10^8	(1,9 ± 0,1)×10^8	(2,0 ± 0,1)×10^8	(1,8 ± 0,1)×10^8
600	(1,1± 0,1)×10^8	(9,1± 0,6)×10^7	(9,7± 0,5)×10^7	(9,1± 0,5)×10^7
1000	(4,1± 0,2)×10^7	(3,6± 0,2)×10^7	(4,3± 0,2)×10^7	(4,1± 0,2)×10^7
2000	(1,2± 0,6)×10^7	(6,7± 0,3)×10^6	(6,4± 0,3)×10^6	(1,0± 0,5)×10^7
10000	(5,5± 0,2)×10^2	(1,0± 0,1)×10^3	(1,0± 0,5)×10^3	(8,7± 0,4)×10^2

Tab. 9B: Vypočítaný počet přeživších spor v závislosti na deponované dávce *D*, kde c_{prop} [mol·l^{-1}] je koncentrace izopropanolu v roztoku.

D	**c_{prop} [mol·l^{-1}]**			
[Gy]	**10^{-3}**	**10^{-2}**	**10^{-1}**	**1**
0	(2,2 ± 0,1)×10^8	(2,0 ± 0,1)×10^8	(2,1 ± 0,1)×10^8	(2,2 ± 0,1)×10^8
600	(1,2± 0,1)×10^8	(1,2± 0,1)×10^8	(1,2± 0,1)×10^8	(1,2± 0,1)×10^8
1000	(4,4± 0,2)×10^7	(4,2± 0,2)×10^7	(4,6± 0,2)×10^7	(4,8± 0,2)×10^7
2000	(9,9± 0,5)×10^6	(9,3± 0,5)×10^6	(1,2± 0,1)×10^6	(1,1± 0,1)×10^7
10000	(1,6± 0,1)×10^3	(1,3± 0,1)×10^3	(2,9± 0,1)×10^3	(2,7± 0,01)×10^3

Pro lepší vizualizaci byl z naměřených hodnot sestaven graf, který je na Obr. 42.



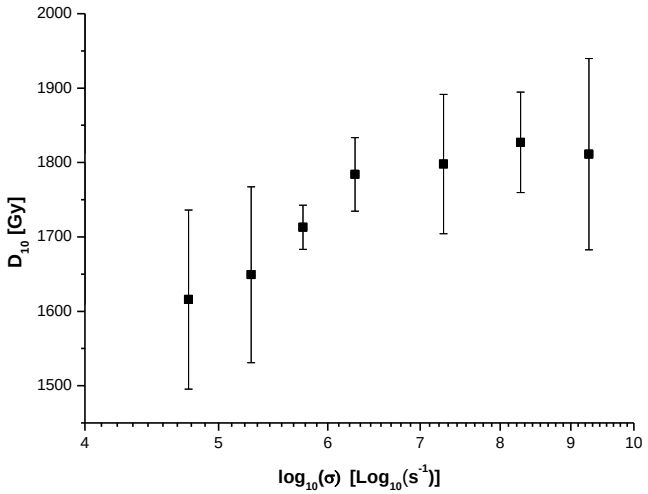
Obr. 42: Křivky přežití spor *B. subtilis* ozařovaných elektrony o nižší intenzitě s různou koncentrací izopropanolu.

Z grafu na Obr. 42 lze vidět, že dochází k exponenciálnímu poklesu živých spor v závislosti na deponované dávce, což je v souladu s poznatky, které byly shrnuty v literární rešerši. Zároveň nebylo pozorováno raménko křivky, což naznačuje jedno zásahový proces. Ke zjištění podílu přímého a nepřímého účinku je vhodné vynést hodnoty decimačních dávek D_{10}, které lze vypočítat z exponenciální regrese jednotlivých křivek jako funkci vychytávací účinnosti. Vypočtené hodnoty decimačních dávek jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10: Hodnoty vypočtených decimačních dávek D_{10} a jednotlivé hodnoty vychytávací účinnosti prostředí.

c_{prop} [mol·l^{-1}]	0	3×10^{-5}	10^{-4}	3×10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1
D_{10} [Gy]	1806 ± 197	1616 ± 120	1649 ± 118	1713 ± 30	1784 ± 49	1798 ± 94	1827 ± 67	1811 ± 128

Z vypočtených hodnot je možné sestrojit graf závislosti na vychytávací účinnosti, která se odvíjí od koncentrace izopropanolu ve vzorku. Výsledný graf je na Obr. 43.



Obr. 43: Hodnoty D_{10} jako funkce vychytávací účinnosti prostředí.

Z grafu na Obr. 43 je patrné, že zvýšená koncentrace vychytávače OH radikálů, v rámci chyby stanovení, nemá vliv, z čehož lze usuzovat, že k inhibici spor dochází především vlivem přímého účinku.

Nárůst D_{10} s rostoucí koncentrací izopropanolu, tedy vychytávací účinnosti, byl již v minulosti pozorován s použitím různých vychytávačů OH radikálu, jak již bylo diskutováno v části práce věnované současnému stavu problematiky [43]. Protektivní účinek různých radikálových vychytávačů je dáván do souvislosti s rozpuštěným kyslíkem v roztoku. V souladu s těmito experimenty byl změřen nárůst hodnoty D_{10} do maximální hodnoty, při které již další zvyšování koncentrace izopropanolu již nemělo na tuto hodnotu vliv. Nižší hodnoty decimační dávky, který lze zaznamenat u nízkých koncentrací izopropanolu lze dát do souvislosti s rozpuštěným vzdušným kyslíkem, který je v roztoku přítomen v koncentraci < $2{,}5\times10^{-4}$ M. Při koncentraci izopropanolu > 10^{-3} M je však již vliv kyslíku potlačen a velikost D_{10} se přibližuje k hodnotě, kdy vychytávač OH radikálů není přítomen vůbec, či pouze v nepatrné zbytkové koncentraci, tj. k 1806 Gy.

Jeden z mechanismů, kterým je vysvětlován pozorovaný účinek je založen na hypotéze, že v přítomnosti vychytávače, který zároveň může reagovat se hydratovanými elektrony, je zpomalena reakce:

$$e_{aq}^{-} + HO \cdot \rightarrow OH^{-}, \tag{32}$$

čímž se umožní většímu množství OH radikálů reakce se sporou.

Další vysvětlení představuje hypotéza, že reakcí OH radikálu se sporou dojde k vytvoření radikálového místa v místě reakce s dlouhou dobou života, ne nějž se naváže kyslík za tvorby peroxylradikálu, který potom pro sporu působí toxicky. Je však možné, že pozorované změny jsou způsobeny kombinací obou těchto procesů.

Je třeba zdůraznit i výsledky práce [69], kde byly podobné procesy sledovány na bakteriích a kvasinkách. Autoři zde popisují rozdílné chování různých vychytávačů OH radikálů, jako v práci [43] se sporami a vysvětlují toto chování tak, že každý radikálový vychytávač se při ozařování chová zcela unikátně a jeho vychytávací účinnost nemusí být omezena pouze na OH radikál.

Situace by mohla být podobná pozorování provedené s plazmidovou DNA, kde vlivem zvýšené koncentrace izopropanolu dochází k reakci OH radikálů ve spurách mnohem dříve, než vstoupí do homogenní fáze reakcí v čase cca 10^{-6} s, čímž se nepřímý účinek zcela potlačí, viz Obr. (40). Zde je však třeba zdůraznit fakt, že největší rozdíl je pozorován v hodnotě D_{10} získané ozařováním roztoků obsahující maximální koncentraci vychytávače a roztoku bez vychytávače. Zatímco v případě ozařování plazmidové DNA pomocí gama záření a elektrony je maximální dávka pro výhradně přímý účinek rovna 3,4 kGy, pro účinek čistě nepřímý je odhadována modelem [68] na 0,1 Gy. Rozdíl tedy činí téměř čtyři řády. V případě suspenzí spor ozařovaných urychlenými elektrony je decimační dávka bez přítomnosti izopropanolu stanovena na 1806 Gy, pro maximální koncentraci činí decimační dávka 1811 Gy, což je v rámci chyby měření zcela zanedbatelný rozdíl.

Závěrem lze z daného pozorování usoudit, že nejpravděpodobnějším vysvětlením pozorovaného rozdílu mezi plazmidovou DNA a sporami v prostředí vychytávače OH radikálů je velmi omezená tvorba OH radikálů v jádře spory, kde je obsaženo omezené množství vody, a proto je i difúze OH radikálů značně omezena. Dalším důvodem je velmi kompaktní uspořádání DNA a její saturace SASP proteiny, které znesnadňují již tak omezeným OH radikálům napadení její struktury. Rovněž zde hraje roli i přítomnost Ca:DPA komplexu. Jak je diskutováno v práci [13] nebo [70], nejsou ionizované molekuly vody vznikající v těsné blízkosti DNA přeměněny na OH radikály a protony, ale dochází k přímému přesunu náboje na kostru DNA a jeho stabilizaci. Lze tedy takový typ poškození považovat za účinek přímého typu.

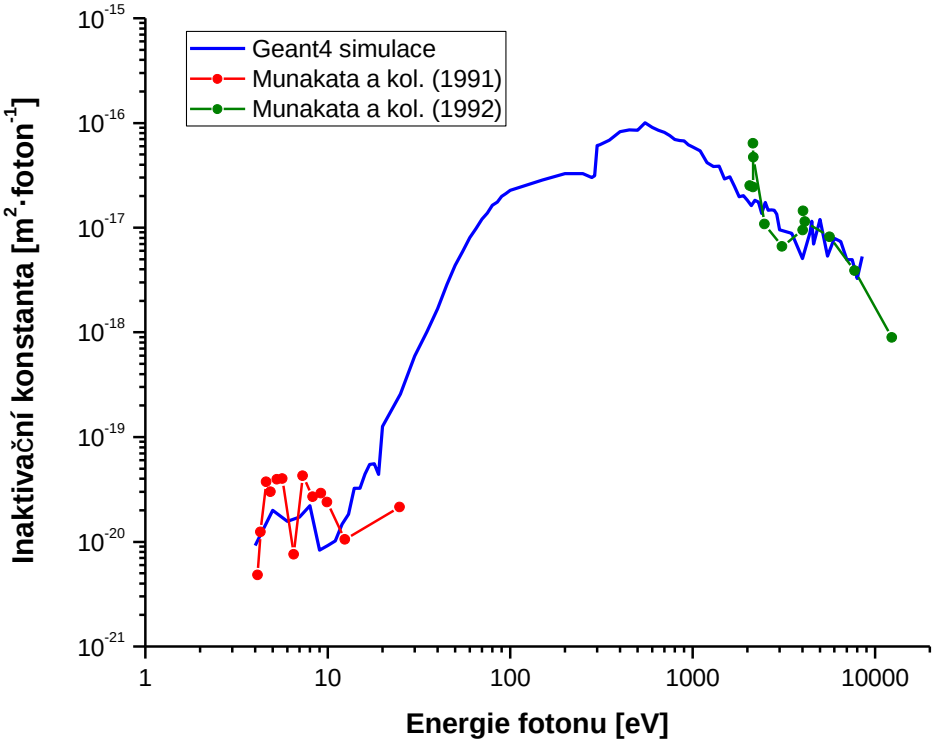
Vezmeme-li hodnoty inaktivačních konstant publikované v pracích Munakaty a kol. [38], [40] v oboru spektra jak měkkého rentgenového tak ultrafialového a extrémně ultrafialového záření, můžeme je porovnat s výsledky simulací provedených v celém oboru spektra od 3 do 10^4 eV a to konkrétně s využitím efektivních součinitelů absorpce jádra modelu spory. Hodnotu spektrální inaktivační konstanty k spory v jednotkách $m^2 \cdot foton^{-1}$ lze vyčíslit dle vztahu:

$$k(E) = \frac{1}{\phi_{37}(E)} = \frac{E\left(\frac{\mu(E)}{\rho}\right)_{eff}}{D_{37}}, \tag{33}$$

kde $\phi_{37}(E)$ je fluence fotonů s danou energií E a D_{37} je dávka odpovídající podílu 1/e přežívajících spor. Pro převod mezi D_{37} a D_{10} lze využít převodní vztah:

$$D_{10} = D_{37} \ln(10). \tag{34}$$

Uvážíme-li, že decimační dávka je konstantní v celém oboru spektra a nezávisí tak na energii fotonů, můžeme do vztahu (33) dosadit decimační dávku získanou z experimentálního pozorování. Jak bylo uvedeno výše, je decimační dávka pro spory v přítomnosti maximální koncentrace vychytávače rovna decimační dávce pro spory ve vodě a to zhruba 1800 Gy. Dosazením a přepočtením této dávky dle vztahu (34) na dávku D_{37} do vztahu (33) získáme data, která jsou uvedena na Obr. 44.



Obr. 44: Porovnání experimentálně získané inaktivační konstanty odvozené dle vztahu (33) z efektivních součinitelů absorpce jádra spory s experimentálními daty prací Munakaty a kol. [38], [40] pro divoký typ (UVR).

Z výsledků uvedených na Obr. 44 je patrné, že je velice pravděpodobné, že decimační dávka je nezávislá na energii použitého fotonového záření a závisí pouze na depozici energie do jádra spory. Je však nutno podotknout, že rozdíly mezi hodnotami simulovanými a hodnotami experimentálními jsou závislé na procesech, které již pomocí simulace v prostředí Geant4 není možné zahrnout. Jedná se především o fotochemické procesy, které mají za následek zvýšení absorpce v ultrafialové oblasti spektra díky přítomnosti DNA a to např. absorpce jednotlivých bází, či vliv řazení bází nad sebou (tzv. base stacking).

4.3. Ozařování vysokým dávkovým příkonem

Vzhledem k tomu, že poškození spor je téměř výhradně zprostředkováno přímým účinkem, lze porovnat deponované dávky, respektive decimační dávky jak v případě suspenzí, tak v případě spor v suchém stavu. Simulace naznačily, že největší absorpce, tedy maximální absorbovaná dávka s při zachování stejné fluence částic je možná za K-absorpční hranou uhlíku, tedy od energie 284 eV. Pro tento účel jsme ozářili vrstvy suchých spor na krycích sklíčkách zdrojem záření ve vodním okně.

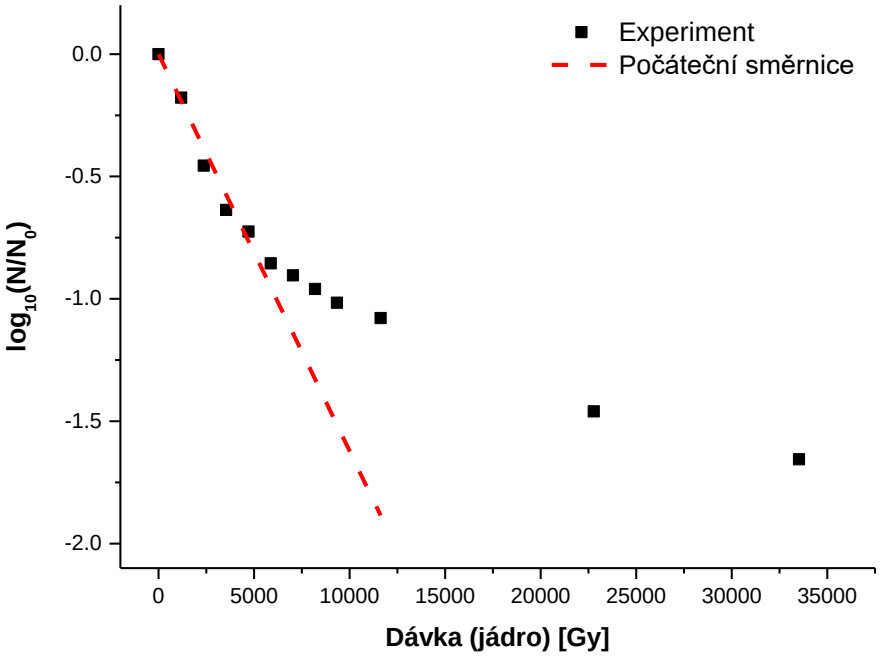
Během provedených experimentů byly ozářeny spory *B. subtilis* v suchém stavu, deponované na krycích sklíčkách. Vzorky byly ozařovány za sníženého tlaku (0,05 Pa). Vyhodnocování probíhalo pomocí

metod, které byly popsány v kapitole 3. Výsledek je průměrem třech ozařování, spočtené kolonie a příslušné chyby jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Spočtené kolonie *N* po ozařovaní různým počtem pulzů $N_{pulzů}$.

$N_{pulzů}$	N	$N_{pulzů}$	N
0	$(4{,}78\pm0{,}20)\times10^5$	**100**	$(2{,}60\pm1{,}10)\times10^3$
2	$(3{,}18\pm0{,}03)\times10^5$	**120**	$(1.93\pm1{,}20)\times10^3$
4	$(1{,}68\pm0{,}10)\times10^5$	**140**	$(1{,}99\pm2{,}20)\times10^3$
6	$(1{,}11\pm0{,}03)\times10^5$	**160**	$(1{,}63\pm0{,}20)\times10^3$
8	$(9{,}00\pm1{,}00)\times10^4$	**200**	$(1{,}87\pm0{,}20)\times10^3$
10	$(6{,}68\pm0.90)\times10^4$	**400**	$(7{,}19\pm3{,}14)\times10^2$
12	$(5{,}96\pm0{,}80)\times10^4$	**600**	$(6{,}68\pm1{,}60)\times10^2$
14	$(5{,}25\pm1{,}10)\times10^4$	**800**	$(2{,}59\pm1{,}30)\times10^2$
16	$(4{,}61\pm1{,}60)\times10^4$	**1000**	$(9{,}69\pm2{,}50)\times10^2$
20	$(3{,}99\pm0{,}30)\times10^4$	**1200**	$(2{,}04\pm0{,}40)\times10^2$
40	$(1{,}66\pm0{,}20)\times10^4$	**1400**	$(4{,}79\pm0{,}80)\times10^2$
60	$(1{,}06\pm0{,}50)\times10^4$	**1600**	$(2{,}21\pm0{,}20)\times10^2$
80	$(4{,}10\pm1{,}50)\times10^3$		

Z hodnot uvedených v Tab. 11 byla sestrojena křivka přežití, která je na Obr. 45.



Obr. 45: Sestrojená křivka přežití *B. subtilis* ozařovaných zdrojem záření ve vodním okně s osou X převedenou na deponovanou dávku v jádře spory.

Pro převedení počtu pulzů na akumulovanou dávku byl využit vztah (21), kde jako hmotnostní součinitel absorpce sloužil spočtený efektivní hmotnostní součinitel absorpce získaný simulací v Geant4. Počáteční dávka na pulz takto spočtená byla vyjádřena jako dávka v jádře spory a rovna 1185 Gy. Dávkový příkon činil $2{,}9\times10^{11}$ Gy·s^{-1}. K převedení počtu pulzů na dávku bylo třeba rovněž přihlédnout k akumulaci plynu v ozařovací komoře po každém výstřelu. Rychlá opakovací frekvence neumožnila včasné odčerpání argonu a helia, které se s každým pulzem uvolnilo do komory. Proto bylo nutné provést korekci na akumulaci plynu s každým pulzem a s tím spojeným poklesem transmise a tím i deponované dávky po každém výstřelu.

Pro získání hodnot decimační dávky D_{10}, jsem použil metodu počáteční směrnice, vzhledem k tvaru křivky přežití. Tento tvar je s největší pravděpodobností způsobený tloušťkou vzorku, jehož hodnota přesahuje atenuační délku použitého záření, proto zde zůstává kolem 0,001 vzorku neozářeno a k podílu N/N_0 konstantní hodnotou. Použitím metody počáteční směrnice jsem obdržel hodnotu D_{10} = 6165 Gy. Během 11 pulzů byla tedy populace redukována na 10 % původního počtu spor. Při použité ozařovací frekvenci 10 Hz byla decimační dávka dodána během 1 sekundy.

Tato dávka je podstatně vyšší, než dávka odvozená při experimentech s urychlenými elektrony a zároveň je podstatně vyšší než dávky pro suché spory z experimentů [38], [39], [41], [42]. Je však důležité to, že daný experiment byl proveden s ultra-vysokým dávkovým příkonem. Takovéto zvýšení decimační dávky při zvýšení dávkového příkonu by bylo očekáváno v případě přímého účinku, který byl potvrzen v předešlé části práce. Podobné závěry byly učiněny v práci [2], kde bylo experimentálně ověřeno, že se zvyšujícím se dávkovým příkonem je přímý účinek potlačen, a proto je potřebné pro stejný podíl poškození dodat do zkoumaného systému vyšší dávku. Tento jev je vysvětlován zvýšenou hustotou ionizací a excitací vyvolanou absorpcí vysoké intenzity záření v krátkém časovém úseku ve sledovaném systému. Tato vysoká hustota ionizace či excitace molekul vede zároveň k rychlé rekombinaci volných nábojů čímž je potlačena tvorba volných či vázaných radikálů v systému. Tímto mechanismem je tedy možné snížit výtěžek reaktivních molekul s čímž souvisí zvýšená dávka potřebná k dosažení stejného účinku jako použitím nízkého dávkového příkonu, neboť radiační výtěžek je nepřímo úměrný dávce [14] v kontextu přímého účinku.

5 Závěr

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši studia inaktivace bakteriálních spor kmene *Bacillus subtilis* různými ozařovacími technikami a ozařovacími podmínkami, provést počítačové simulace depozice energie záření v jednotlivých částech spory, ozářit divoký kmen *B. subtilis* různými druhy záření a z naměřených výsledků zkonstruovat křivky přežití.

Počítačové simulace byly provedeny v programu Geant4 na základě znalosti prvkového rozložení v jednotlivých částech spory. Nejprve byl vytvořen model spory, který odpovídal průměrným rozměrům spory *B. subtilis*, na kterém byla provedena simulace ozařování fotony s energií 10 – 10^4 eV a elektrony o energiích 10 keV – 1 GeV. Z výsledků simulací byly stanoveny efektivní hmotnostní součinitelé absorpce pro fotony a efektivní lineární brzdné schopnosti pro elektrony odpovídající jednotlivým částem spory. Tento model může v budoucnu posloužit ke sledování interakce libovolného druhu ionizujícího záření, které je program Geant4 schopen simulovat.

Během ozařovacích experimentů byl proměřen vliv koncentrace izopropanolu, jakožto vychytávače OH radikálů, na podíl nepřímého účinku při inaktivaci spor. K potvrzení principu vychytávání OH radikálů izopropanolem byla využita plazmidová DNA, na které je možné pozorovat poškození změnou její konformace v závislosti na deponované dávce. K ozařování plazmidové DNA byl použit Gammacell GC220, který je přístupný na Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské v Praze. K vyšším dávkám jsem použil urychlené elektrony generované miktoronem MT25. Ozářená plazmidová DNA byla následně analyzována pomocí gelové elektroforézy. Na průběhu dávek potřebných k indukci SSB bylo potvrzeno, že izopropanol je možné využít jako vychytávače OH radikálů do velmi vysokých dávek (> 2 kGy).

Následně byly provedeny ozařovací experimenty na sporách kmene *B. subtilis* pomocí zdroje urychlených elektronů s energií 15 MeV v prostředí izopropanolu. Jako zdroj urychlených elektronů byl použit mikrotron MT25. Použitý dávkový příkon zdroje při ozařování byl přibližně 2-7 $Gy \cdot s^{-1}$, v závislosti na konkrétním nastavení. K pozorování míry nepřímého účinku při inaktivaci spor, bylo ozařováno několik sérií, ve kterých se postupně měnila koncentrace izopropanolu. Následně byly ozářené suspenze zředěny a naočkovány na agarové misky. Z výsledných dat byly zkonstruovány křivky přežití pro jednotlivé ozařovací podmínky a byla stanovována hodnot D_{10}, která odpovídá úhynu 90 % populace vzorku.

Druhým zdrojem užitým k ozařování spor byl zdroj záření ve vodním okně provozovaný na Ústavu optoelektroniky při Vojenské technické univerzitě ve Varšavě. Tento zdroj má dávkový příkon přibližně $2{,}9 \times 10^{11}$ $Gy \cdot s^{-1}$, který byl odvozen pomocí měření toku fotonů v místě vzorku a pomocí hmotnostních součinitelů absorpce v jádře spory získaných simulací. Tímto zdrojem byly ozařovány spory v suché podobě, deponované na laboratorní sklíčka. Po ozáření byly spory smyty a vyhodnoceny stejným způsobem jako tomu bylo v případě mikrotronu, včetně konstrukce křivek přežití.

Z výsledků ozařování plazmidové DNA vyplývá, že izopropanol má vliv na podíl nepřímého účinku ionizujícího záření. Z výsledků experimentů s urychlenými elektrony bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace izopropanolu snižuje dávku potřebnou k dosažení hodnoty D_{10}, ale pouze v omezeném rozsahu koncentrací, což bylo v souladu s výsledky měření uvedených v literatuře. Hodnota decimační dávky *B. subtilis* byla stanovena totožná jak bez izopropanolu v roztoku, tak v jeho maximální koncentraci jako ~1800 Gy Tato hodnota je opět v souladu s publikovanými daty jiných autorů a vede k závěru, že inaktivace spor *B. subtilis* je způsobena výhradně přímým účinkem. Dále tato hodnota decimační dávky posloužila pro konstrukci inaktivační konstanty pomocí dat získaných simulací v Geant4 a to konkrétně hmotnostních součinitelů absorpce jádra, čímž se potvrdila shoda s již publikovanými daty pro extrémní UV a měkké rentgenové záření.

Z ozařování spor v suché formě pomocí záření ve vodním okně byla stanovena decimační dávka v jádře D_{10} = 6165 Gy, což odpovídá 11-ti pulzům při opakovací frekvenci 10 Hz. Tato dávka je podstatně vyšší

než dávka odvozená při experimentech s urychlenými elektrony. Toto zvýšení je vysvětlováno zvýšenou hustotou ionizací a excitací vyvolanou absorpcí vysoké intenzity záření v krátkém časovém úseku ve sledovaném systému, což vede zároveň k rychlé rekombinaci volných nábojů čímž je potlačena tvorba volných či vázaných radikálů v systému a tím snížena míra inaktivace.

6 Použitá literatura

[1] E. L. Alpen,“Radiation Biophysics“, Academic press, 1998. ISBN 0-12-053085-6.

[2] L. Vyšín, “Vliv dávkového příkonu na radiační poškození biologických soustav hustě a řídce ionizujícím zářením,” 2018. Disertační práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská.

[3] A. Mozumder, J. L. Magee, “Theory of Radiation Chemistry. VII. Structure and Reactions in Low LET Tracks,” J. Chem. Phys., vol. 45, no. 9, pp. 3332–3341, 1966.

[4] J. Teplý, “Základy radiačních technologií,” str. 146, 1985. Sborník přednášek pro kurs radiačních technologií ÚJV ŘEŽ.

[5] S. Le Caër, “Water radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H_2 Production under Ionizing Radiation,” Water, vol. 3, no. 1, pp. 235–253, 2011.

[6] J. W. T. Spinks, R. J. Woods, „An Introduction to Radiation Chemistry“, 1990. ISBN 978-04711614036

[7] I. G. Draganic, Z. D. Draganic, „The Radiation Chemistry of Water“. Academic press New York and London, 1971. ISBN 9780323158787

[8] V. Čuba, J. Bárta, L. Procházková, Praktikum z radiační chemie a fotochemie. Skriptum. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, 2018.

[9] G. G. Jayson, B. J. Parsons, A. J. Swallow, “The Mechanism of the Fricke Dosimeter,” Int. J. Radiat. Phys. Chem., vol. 7, no. 2–3, pp. 363–370, 1975.

[10] R. D. H. Chu, W. L. McLaughlin, A. Miller, P. H. G. Sharpe, “5. Dosimetry Systems,” J. ICRU, vol. 8, no. 2, pp. 29–70, 2008.

[11] C. E. deAlmeida, “A Feasibility Study of Fricke Dosimetry as an Absorbed Dose to Water Standard for ^{192}Ir HDR Sources,” PLoS One, vol. 9, no. 12, p. e115155, 2014.

[12] V. Ullmann, “Jaderná fyzika a fyzika ionizujícího záření.” [Online], [cit. 2022-05-1]. Dostupné z: https://astronuklfyzika.cz/RadiacniOchrana.htm.

[13] A. Adhikary, D. Becker, M. D. Sevilla, “Electron Spin Resonance of Radicals in Irradiated DNA,” Appl. EPR Radiat. Res., pp. 1–773, 2014.

[14] H. B. Michaels J. W. Hunt, “A Model for Radiation Damage in Cells by Direct Effect and by Indirect Effect : A Radiation Chemistry,” 1978. doi: 10.2307/3574754

[15] E. Shimizu, Y. Tokuyama, N. Okutsu, K. Nomura, V. I. Danilov, N. Kurita, “Attacking Mechanism of Hydroxyl Radical to DNA Base-pair: Density Functional Study in Vacuum and in water,” J. Biomol. Struct. Dyn., vol. 33, no. 1, pp. 158–166, 2015. doi: 10.1080/07391102.2013.864572

[16] F. Kapralek, “Fyziologie bakterií II.”. Státní pedagogické nakladatelství Praha. Univerzita Karlova v Praze, Fakulta přírodovědecká.

[17] R. H. Vreeland, W. D. Rosenzweig, D. W. Powers, “Isolation of a 250 million-year-old Halotolerant Bacterium from a Primary Salt Crystal,” Nature, vol. 407, no. 6806, pp. 897–900, Oct. 2000. doi: 10.1038/35038060

[18] P. Setlow, “Spores of Bacillus Subtilis: Their Resistance to and Killing by Radiation, Heat and Chemicals,” J. Appl. Microbiol., vol. 101, no. 3, pp. 514–525, 2006.

[19] J. Jamroskovic, P. P. Shao, E. Suvorova, I. Barak, R. Bernier-Latmani, “Combined Scanning Transmission X-ray and Electron Microscopy for the Characterization of Bacterial Endospores,” FEMS Microbiol. Lett., vol. 358, no. 2, pp. 188–193, 2014. doi: 10.1111/1574-6968.12539

[20] T. Stein, “Bacillus Subtilis Antibiotics: Structures, Syntheses and Specific Functions,” Mol. Microbiol., vol. 56, no. 4, pp. 845–857, 2005. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x

[21] P. Piggot, “Encyclopedia of microbiology,” Encycl. Microbiol., pp. 1–4600, 2009. ISBN: 978-

0-12-374980-2
[22] G. M. Weinstock, “BAC (Bacterial Artificial Chromosome),” Encycl. Genet., p. 135, 2001. doi: 10.1006/rwgn.2001.0099
[23] R. Moeller, M. Rohde, G. Reitz, „Effects of Ionizing Radiation on the Survival of Bacterial Spores in Artificial Martian Regolith.“ Icarus, vol. 206, no. 2, pp. 783–786, 2010. doi:10.1016/j.icarus.2009.11.014
[24] P. T. Mckenney, A. Driks, P. Eichenberger, “The Bacillus Subtilis Endospore: Assembly and Functions of the Multilayered Coat,” Nat. Rev. Microbiol., vol. 11, no. 1, pp. 33–44, 2013.
[25] K. S. Lee, D. Bumbaca, J. Kosman, P. Setlow, M. J. Jedrzejas, “Structure of a protein-DNA Complex Essential for DNA Protection in Spores of Bacillus Species,” Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 105, no. 8, pp. 2806–2811, 2008.
[26] S. Wohlgemuth, P. Kämpfer, “Bacteria: Bacterial Endospores,” Encycl. Food Microbiol. Second Ed., vol. 1, pp. 160–168, 2014.
[27] E. Abel-Santos, Endospores, Sporulation and Germination, vol. 1–3. Elsevier Ltd, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00009-3
[28] A. Atrih, S. J. Foster, “The role of Peptidoglycan Structure and Structural Dynamics During Endospore Dormancy and Germination,” Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol., vol. 75, no. 4, pp. 299–307, 1999.
[29] M. E. Gilmore, D. Bandyopadhyay, A. M. Dean, S. D. Linnstaedt, D. L. Popham, “Production of Muramic δ-Lactam in Bacillus Subtilis Spore Peptidoglycan,” J. Bacteriol., vol. 186, no. 1, pp. 80–89, 2004.
[30] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, P. Setlow, “Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments,” 2000. doi: 10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000
[31] V. Vondrejs, P. Mader, „Biofyzika 1: Úvod do molekulární fotobiologie“. Státní pedagogické nakladatelství Praha. Univerzita Karlova v Praze, Fakulta přírodovědecká.
[32] T. Douki, J. Cadet, “Formation of the Spore Photoproduct and other Dimeric Lesions between Adjacent Pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA,” Photochem. Photobiol. Sci., vol. 2, no. 4, pp. 433–436, 2003.
[33] R. Rebeil, “Molecular Characterization of the Bacillus Subtilis DNA Repair Enzyme Spore Photoproduct Lyase,” 2001. The University of Arizona. [cit. 2022-05-1]. Dostupné z: http://hdl.handle.net/10150/280620
[34] O. Cerf, “A Review Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores,” J. Appl. Bacteriol., vol. 42, no. 1, pp. 1–19, 1977.
[35] L. H. Channaiah, “Validation of a Nut Muffin Baking Process and Thermal Resistance Characterization of a 7-serovar Salmonella Inoculum in batter when Introduced via Flour or Walnuts,” Int. J. Food Microbiol., vol. 294, no. January, pp. 27–30, 2019.
[36] F. Herčík, „Radiobiologické metody“. 1996.
[37] E. L. Alpen,“Radiation Biophysics“, Academic press, 1998.ISBN 0-12-053085-6.
[38] N. Munakata, M. Saito, K. Hieda, “Inactiavion Action sSpectra of Bacillus Subtilis Spore in Extended Ultraviolet Wavelenghts (50–300nm) Obtainde with Synchrotron Radiation,” Photochem. Photobiol., vol. 54, no. 5, pp. 761–768, 1991.
[39] R. Moeller, “Role of DNA Repair by Nonhomologous-end Joining in Bacillus Subtilis Spore Resistance to Extreme Dryness, Mono- and Polychromatic UV, and Ionizing Radiation,” J. Bacteriol., vol. 189, no. 8, pp. 3306–3311, 2007.
[40] N. Munakata, K. Hieda, N. Usami, A. Yokoya K. Kobayashi, “Inactivation action spectra of Bacillus Subtilis Spores with Monochromatic soft X rays (0.1-0.6 nm) of Synchrotron Radiation.,” Radiat. Res., vol. 131, no. 1, pp. 72–80, 1992.

[41] J. Okhi, H. Ito, “Comparative Sensitivity of Endospores from Some Bacillus Species to Gamma-rays,X-rays and Electron Beam for Sterilization,” 1990.
[42] A. Tallentire, A. Miller, “Microbicidal effectiveness of X-rays used for sterilization purposes,” Radiat. Phys. Chem., vol. 107, pp. 128–130, 2015.
[43] D. Ewing, “Effects of some ·OH scavengers on the Radiation Sensitization of Bacterial Spores by p-nitroacetophenone and O_2 in Suspension,” Int. J. Radiat. Biol., vol. 30, no. 5, pp. 419–432, 1976.
[44] J. De Lara, P. S. Fernández, P. M. Periago, A. Palop, “Irradiation of spores of Bacillus Cereus and Bacillus Subtilis with Electron Beams,” Innov. Food Sci. Emerg. Technol., vol. 3, no. 4, pp. 379–384, 2002.
[45] B. Chlopková, “Optimalizace izolace plazmidové DNA pomocí magnetických částic,” 2019. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
[46] B. Gas, “Electrophoresis/Principles,” no. 1997, pp. 363–370, 2005. Karlova Univerzita v Praze.
[47] R. Fritch, I. Krause, “Electrophoresis.,” Encycl. Food Sci. Nutr., vol. 14, no. 5, pp. 101–102, 1956.
[48] “Elektroforéza.” [Online], [cit. 2022-05-1]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Elektroforéza.
[49] KHAN ACADEMY, “Gel electrophoresis.” [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis.
[50] E. Bártová, “Gelová Elektroforéza,” 2011. [Online], [cit. 2022-05-1]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz.
[51] S. Agostinelli a spol., “GEANT4 - A simulation toolkit,” Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A Accel. Spectrometers, Detect. Assoc. Equip., vol. 506, no. 3, pp. 250–303, 2003.
[52] M. G. Pia, “Geant4- DNA.” [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: http://geant4-dna.in2p3.fr/styled-5/index.html.
[53] L. S. Tisa, T. Koshikawa, a P. Gerhardt, “Wet and dry bacterial spore densities determined by buoyant sedimentation,” Appl. Environ. Microbiol., vol. 43, no. 6, pp. 1307–1310, 1982.
[54] M. Śmiałek a N. Jones, “Measuring the density of DNA films using ultraviolet-visible interferometry,” Phys. Rev. E, vol. 87, no. 6, p. 60701, 2013.
[55] B. L. Henke, E. M. Gullikson, J. C. Davis, “X-Ray Interactions: Photoabsorption, Scattering, Transmission, and Reflection at E = 50-30,000 eV, Z = 1-92,” At. Data Nucl. Data Tables, vol. 54, no. 2, pp. 181–342, 1993.
[56] L. Vyšín, “Chemical Dosimetry in the ‘Water Window’: Ferric Ions and Hydroxyl Radicals Produced by Intense Soft X Rays.,” Radiat. Res., vol. 193, no. 4, pp. 372–382, 2020.
[57] National Institute of Standards and Technology, “Stopping-power and range tables for electrons.” [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: https://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/ESTAR.html.
[58] V. Wagner, “Co to je mikrotron aneb poděkování profesoru Čestmíru Šimáně,” 2012. [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: https://www.osel.cz/6403-co-to-je-mikrotron-aneb-podekovani-profesoru-estmiru-imane.html.
[59] Wikipedia, “Mikrotron MT25,” 2021. [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Mikrotron_MT25.
[60] Ú. A. ČR, “Mikrotron MT25.” [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: http://www.ujf.cas.cz/cs/oddeleni/oddeleni-urychlovacu/microtron/.
[61] Wikipedia, “Cobalt-60 Decay Scheme.” [Online], [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Cobalt-60_Decay_Scheme.svg.
[62] D. Adjei, “Development of a compact laser-produced plasma soft X-ray source for

radiobiology experiments," Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms, vol. 364, pp. 27–32, 2015.
[63] A. J. Meeske, "MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in Bacillus subtilis," Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 112, no. 20, pp. 6437–6442, 2015.
[64] C. van Ooij, P. Eichenberger, R. Losick, "Dynamic Patterns of Subcellular Protein Localization during Spore Coat Morphogenesis in Bacillus subtilis," J. Bacteriol., vol. 186, no. 14, pp. 4441–4448, 2004.
[65] J. R. Milligan, J. A. Aguilera, J. F. Ward, "Variation of Single-Strand Break Yield with Scavenger Concentration for Plasmid DNA Irradiated in Aqueous Solution," Radiat. Res., vol. 133, no. 2, p. 151, 1993.
[66] G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, "Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals (·OH/·O − in Aqueous Solution," J. Phys. Chem. Ref. Data, vol. 17, no. 2, pp. 513–886, 1988.
[67] J. A. LaVerne, S. M. Pimblott, "Yields of Hydroxyl Radical and Hydrated Electron Scavenging Reactions in Aqueous Solutions of Biological Interest," Radiat. Res., vol. 135, no. 1, p. 16, 1993.
[68] F. Mark, U. Becker, J. N. Herak, D. Schulte-Frohlinde, "Radiolysis of DNA in aqueous solution in the presence of a scavenger: A kinetic model based on a nonhomogeneous reaction of OH radicals with DNA molecules of spherical or cylindrical shape," Radiat. Environ. Biophys., vol. 28, no. 2, pp. 81–99, 1989.
[69] V. Múčka, P. Bláha, V. Čuba, J. Červenák, "Influence of various scavengers of •OH radicals on the radiation sensitivity of yeast and bacteria," Int. J. Radiat. Biol., vol. 89, no. 12, pp. 1045–1052, 2013. doi: 10.3109/09553002.2013.817702
[70] M. D. Sevilla, D. Becker, "ESR studies of radiation damage to DNA and related biomolecules," in Electron Paramagnetic Resonance, Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp. 243–278.