

České vysoké učení technické v Praze
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Vojtěch Scheinpflug

Vliv teploty na radiačně chemické reakce a radiobiologické procesy

Katedra jaderné chemie

Vedoucí diplomové práce: Ing. Libor Juha, CSc.
Konzultant: doc. Václav Čuba, Ph.D.
Konzultant: Ing. Luděk Vyšín, Ph.D.
Konzultant: Ing. Tomáš Burian, Ph.D.
Konzultant - specialista: Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.
Konzultant - specialista: prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc.
Studijní program: Jaderná chemie

Praha 2024

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Scheinflug** Jméno: **Vojtěch** Osobní číslo: **494822**
Fakulta/ústav: **Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská**
Zadávající katedra/ústav: **Katedra jaderné chemie**
Studijní program: **Jaderná chemie**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Vliv teploty na radiačně chemické reakce a radiobiologické procesy

Název diplomové práce anglicky:

Effect of temperature on radiochemical reactions and radiobiological processes

Pokyny pro vypracování:

1. Obecná (teoretická) část práce: zde budou shrnuty a diskutovány výsledky publikované v pracích jiných autorů o elementárních procesech poškození biomolekulárních a mikrobiálních struktur ionizujícím a neionizujícím zářením a o závislostech mechanismů a výtěžků radiačně chemických reakcí a radiobiologických procesů na teplotě.
2. Speciální (experimentální) část práce bude sestávat z následujících částí:
 - 2 a) Bude experimentálně prostudováno radiační poškození plazmidové DNA při různých teplotách již ověřenou metodikou,
 - 2 b) Bude vyvinuta a implementována metodika a instrumentace pro sledování teplotních závislostí radiačního poškození mikroorganismů,
 - 2 c) Budou proměřeny křivky přežití nebo inaktivační křivky vybraného mikroorganismu vhodného pro studium radiačního poškození za různých teplot.
3. Práce bude zakončena částí obsahující diskusi, interpretaci a zobecnění získaných výsledků.

Seznam doporučené literatury:

1. A. Meents et al.: Origin and temperature dependence of radiation damage in biological samples at cryogenic temperatures, PNAS 107, 1094-1099 (2010).
2. G. V. Buxton, F. C. R. Cattell, F. S. Danton: Effect of temperature on the early stages of radiolysis, part 1, Trans. Faraday Soc. 67, 687-700 (1970).
3. R. Trujillo, V. L. Dugan: Synergetic inactivation of viruses by heat and ionizing radiation, Biophys. J. 12, 92-113 (1972).
4. I. Stefanic, J. A. La Verne: Temperature dependence of the hydrogen peroxide production in the γ -radiolysis of water, J. Phys. Chem. A106, 447-452 (2002).
5. E. S. Kempner, R. Wood, R. Salovey: The temperature dependence of radiation sensitivity of large molecules, J. Polym. Sci. B 24, 2337-2313 (1986).
6. D. J. Fluke: Temperature dependence of ionizing radiation effect on deoxyribonuclease, Radiat. Res. 28, 677-893 (1966).
7. K. Kuerzinger: Temperature-dependence of radiation sensitivity in the dry state: A model derived from experiments using atomic hydrogen, Part I and Part II, Int. J. Radiat. Biol. 16, 1-13 (1969) and 19, 45-50 (1971).
8. E. S. Kempner, A. S. Verkman: Direct effects of ionizing-radiation unique to macromolecules, Rad. Phys. Chem. 32, 341-347 (1988). "

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Libor Juha, CSc. Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., oddělení radiační a chemické fyziky


Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) diplomové práce:

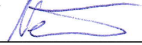
doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D. katedra jaderné chemie FJFI

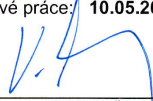
Datum zadání diplomové práce: **20.10.2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **10.05.2024**

Platnost zadání diplomové práce: **20.10.2025**


Ing. Libor Juha, CSc.
podpis vedoucí(ho) práce


podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry


doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.
podpis děkana(ky)

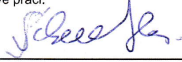
III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

Diplomant bere na vědomí, že je povinen vypracovat diplomovou práci samostatně, bez cizí pomoci, s výjimkou poskytnutých konzultací. Seznam použité literatury, jiných pramenů a jmen konzultantů je třeba uvést v diplomové práci.

31.10.2023

Datum převzetí zadání




Podpis studenta

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

V Praze dne 06.05.2024

Podpis autora:

Poděkování

Rád bych zde poděkoval Ing. Liborovi Juhovi, CSc. za odborné vedení a čas, který mi věnoval při vypracování této práce. Dále děkuji Ing. Ludkovi Vyšínovi, Ph.D. za uvedení do problematiky, odbornou pomoc při praktické části a za cenné připomínky při sepisování této práce. Ing. Tomášovi Burianovi, Ph.D. vděčím za pomoc s interakčními a ozařovacími experimenty na chlazeném i nechlazeném terči. Jsem zavázán i dalším zaměstnancům Fyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i za jejich pomoc a za vytvoření příznivých podmínek při vypracování této práce.

Dále bych rád poděkoval kolegům z Biologického centra AV ČR, v.v.i v Českých Budějovicích. Jmenovitě prof. RNDr. Karlovi Petrzikovi, CSc. a Mgr. Ondřejovi Lenzovi, Ph.D. za poskytnutí biologických vzorků určených k experimentům, poskytnuté zázemí při vyhodnocování vzorků během experimentální části práce a také neocenitelné rady a pomoc při sepisování této diplomové práce.

Název práce: Vliv teploty na radiačně chemické reakce a radiobiologické procesy

Autor: Bc. Vojtěch Scheinpflug

Obor: Jaderná chemie

Vedoucí práce: Ing. Libor Juha, CSc.

Oddělení radiační a chemické fyziky, Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Konzultant: doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D.

Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT.

Břehová 78/7, 115 19 Praha 1

Konzultant: Ing. Luděk Vyšín, Ph.D.

Oddělení radiační a chemické fyziky, Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Konzultant: Ing. Tomáš Burian, Ph.D.

Oddělení radiační a chemické fyziky, Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i.

Na Slovance 2, 182 21 Praha 8

Konzultant - specialista: prof. RNDr. Karel Petrzik, CSc.

Oddělení rostlinné virologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

Branišovská 1160/31, 37005 České Budějovice

Konzultant - specialista: Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.

Oddělení rostlinné virologie, Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

Branišovská 1160/31, 37005 České Budějovice

Abstrakt: V obecné části práce je nejdříve popsán současný stav poznatků o radiačním a fotochemickém poškození nukleových kyselin. Dále jsou zde shrnuty a kriticky diskutovány výsledky publikované v pracích jiných autorů věnovaných teplotní závislostí mechanismů a výtěžků radiačně chemických reakcí a křivek přežití mikrobiálních soustav vystavených působení ionizujícího záření (XUV/rtg. a gama záření, energetickým nabitým částicím, aj.). Experimentální část popisuje přípravu ozařovacího uspořádání využívajícího svazku XUV laseru pracujícího s pinčujícím kapilárním výbojem v argonu. Dále je popsána implementace zařízení umožňujícího nastavovat teplotu ozařovaného vzorku na teploty nižší, než je laboratorní teplota, a provedeny ozařovací experimenty s chlazením a při laboratorní teplotě. Radiobiologické terče představovaly následující species: plazmidová DNA, bakteriofág a rostlinný virus (fytovirus). Výtěžky dvojných zlomů plazmidové DNA vykazovaly teplotní závislost dobře interpretovatelného charakteru, zatímco tvorba jednoduchých zlomů probíhala v daném teplotním rozsahu s konstantním výtěžkem. Poškození virových vzorků se ukazuje jako komplikovanější úloha. Při jejím řešení byly získány cenné zkušenosti, které se uplatní v dalším výzkumu.

Klíčová slova: plazmidová DNA, jednoduché a dvojné zlomy, extrémní ultrafialové záření, teplotní závislosti, radiační poškození, Peltierův článek, virová DNA, bakteriální virus (bakteriofág), rostlinný virus (fytovirus), radiační citlivost

***Title:* Effect of temperature on radiochemical reactions and radiobiological processes**

Author: Bc. Vojtěch Scheinpflug

Study Programme: Nuclear Chemistry

Abstract: In the general part of the thesis, the current knowledge on radiation and photochemical damages to nucleic acids is introduced. Furthermore, the results of experiments performed and published by other authors devoted to temperature dependences of mechanisms and yields of radiation-chemical reactions and survival curves of microbial systems exposed to ionizing radiation (XUV/x-ray and gamma radiation, energetic charged particles, etc.) are summarized and critically discussed. The experimental part describes the development and setting up of an irradiation setup using an XUV laser beam generated by a pinching capillary discharge in argon. Furthermore, the implementation of a device allowing to adjust the temperature of an irradiated sample to temperatures below the room temperature is described and results of irradiation experiments with cooling and at the room temperature are reported. The radiobiological targets were the following species: plasmid DNA, bacteriophage and plant virus (phytovirus). The yields of plasmid DNA double strand breaks exhibited a temperature dependence of a well-interpretable nature, while the formation of single strand breaks proceeded within a given temperature range with a constant yield. Damage to viruses appears to be a more complicated task. Valuable experience was gained in working on it, which will be applied in forthcoming experience.

Key words: plasmid DNA, single strand breaks, double strand breaks, extreme ultraviolet radiation, radiation damage, temperature dependence, Peltier module, viral DNA, bacterial virus (bacteriophage), plant virus (phytovirus), radiation sensitivity

Obsah

Obsah	1
Úvod	3
1 Teoretická část	5
1.1 Deoxyribonukleová kyselina	6
1.1.1 Struktura složek nukleových kyselin	6
1.1.2 Struktura a funkce DNA	7
1.1.3 Plazmidová DNA	9
1.1.4 Virová DNA	10
1.2 Fotochemie nukleových kyselin	13
1.2.1 Obecné aspekty	13
1.2.2 Fotochemické změny vyvolané UV zářením	14
1.3 Radiační chemie nukleových kyselin	18
1.3.1 Obecné aspekty	18
1.3.2 Poškození vyvolané ionizujícím zářením	18
1.3.3 Primární procesy při poškození DNA vlivem záření	20
1.4 Extrémní ultrafialové a měkké rentgenové záření	25
1.5 Nízkoenergetické elektrony	26
1.6 Účinek záření na plazmidovou DNA	28
1.7 Účinek záření na polymery	31
1.8 Teplotní závislosti	32
1.8.1 Vliv teploty na radiační citlivost enzymů	32
1.8.2 Vliv teploty na radiační citlivost virů	34
1.8.3 Vliv teploty na radiační citlivost plazmidů	35
1.8.4 Vliv teploty na radiační citlivost polymerů	37
2 Experimentální část	39
2.1 Model DNA a RNA	39
2.1.1 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin	39
2.2 Experimentální zdroj ionizujícího záření	40
2.2.1 Charakterizace laserového svazku	41
2.3 Peltierův článek	42
2.4 Princip zónové gelové elektroforézy	45
2.4.1 Příprava gelů a vzorků	46
2.4.2 Analýza vzorků po agarózové elektroforéze	46
2.5 Plaková metoda	48
2.6 Mechanický přenos rostlinného viru	48
2.7 Izolace celkové (totální) RNA	49
2.8 Metoda reverzní transkripce	49
2.9 PCR - polymerázová řetězová reakce	50
2.10 qPCR - kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase	52

3	Výsledky	53
3.1	Závislost výtěžků SSB a DSB plazmidové DNA na fluenci CDL pulsů . .	53
3.2	Biologické testování ozářených bakteriofágů	58
3.3	Výsledky qPCR	59
3.4	Mechanický přenos rostlinného viru - ZYMV	61
4	Shrnutí a závěry	62
	Literatura	64
	Příloha A: Model McMahona a Currela	71
	Příloha B: Model pro stanovení fluence fotonů	73

Úvod

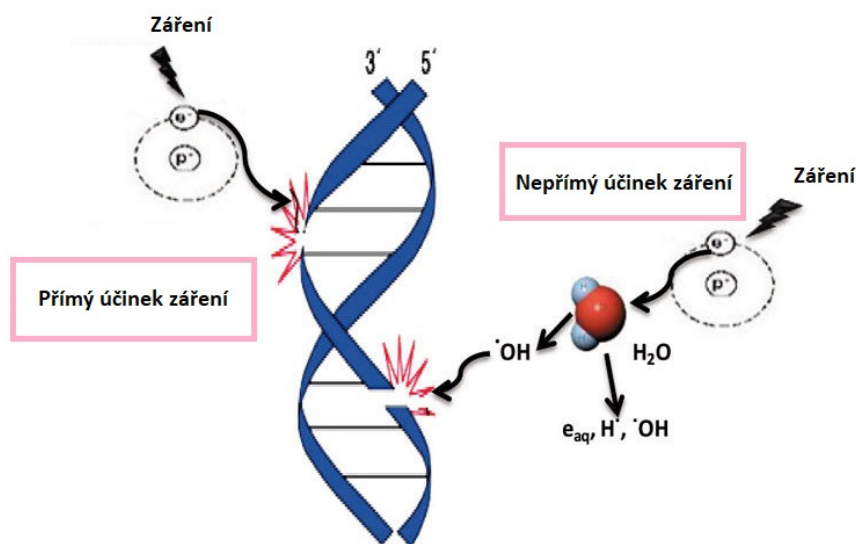
Uplynulo více než století od roku 1895, kdy Wilhelm Röntgen objevil rentgenové záření, a od roku 1896, kdy Henri Becquerel objevil přirozenou radioaktivitu. Od počátku těchto významných událostí se mnoho studií zaměřilo na výzkum a pochopení charakteristik ionizujícího záření (z angl. ionizing radiation) a jeho účinků na biologické, resp. biomolekulární systémy. Záření se na jedné straně stalo základním diagnostickým a terapeutickým nástrojem moderní medicíny, na straně druhé jsou známa jeho rizika a karcinogenní vlastnosti. Různé typy záření mohou způsobit široké spektrum poškození DNA (z angl. deoxyribonucleic acid), např. jednoduché (z angl. single strand breaks - SSB) a dvojné (z angl. double strand breaks - DSB) zlomy, poškození nukleotidových bází či zesíťování řetězců (z angl. cross-linking) DNA. Mezi závažné důsledky zmíněných typů poškození biologických systémů se řadí buněčná smrt či indukce mutací, které vedou k rakovině vyvolané expozicí zářením [1]. Správná ochrana před ionizujícím zářením je tedy důležitá jak pro lidský organismus, tak pro jiné živočišné druhy. Jacobi [2] jako první vyvinul koncept „efektivní dávky“ v roce 1975. Od té doby jej používá Mezinárodní komise pro radiologickou ochranu (ICRP) jako klíčové měření při vyhodnocování rizik stochastických účinků radiační expozice (dědičné účinky a karcinogeneze). Ionizující záření deponuje energii přímo do jakékoliv ozařované hmoty a množství této deponované energie je vyjádřeno veličinou nazývanou absorbovaná dávka, která charakterizuje celkové působení ionizujícího záření na látku. Jednotkou této veličiny je Gy (gray). Jednotka gray je definována jako jeden joule absorbované zářivé energie na kilogram hmoty. Z pohledu radiačně biologického není tato veličina sama o sobě uspokojivým indikátorem biologické odpovědi, protože odpovědi mohou být řízeny mnoha doprovodnými faktory. Pro účely zohlednění stochastických radiologických rizik, ICRP a Mezinárodní komise pro radiační jednotky a měření navrhly zavedení pojmu dávkového ekvivalentu, který je součinem dávky a střední hodnoty jakostního faktoru Q . Jakostní faktor je bezrozměrné číslo, které charakterizuje účinné pohlcování záření živou tkání. V této práci probíhá ozařování extrémním ultrafialovým (XUV) zářením. Toto hustě ionizující záření má hodnotu Q typicky vysokou.

Cílem předložené diplomové práce je literární rešerše a experimentální výzkum vlivu teploty jako potenciálně významného parametru na radiačně chemické reakce a radiobiologické procesy. Tato skutečnost souvisí s tím, že radiační citlivost mnoha makromolekul a biologických systémů se s klesající teplotou prostředí snižuje. Lze tedy očekávat, že snížení teploty reaktantů (až ke kryogenním hodnotám) umožňuje získat slibný prostředek k regulaci biologických účinků záření, přestože všechny způsoby, jimiž změna teploty ovlivňuje odolnost (z angl. radiation resistance) vůči ionizujícímu záření, nejsou dosud plně objasněny.

Pro názornost ukažme například na vliv teploty na radiační senzitivitu enzymů. Tento jev byl pozorován v práci Kempnera a Haiglera [3]. Z výsledků jejich měření vyplynulo, že když jsou enzymy vystaveny ionizujícímu záření při nízkých teplotách, dochází k progresivnímu poklesu radiační citlivosti (z angl. radiation sensitivity). To znamená, že po obdržení stejné dávky záření si vzorek zachová podstatně větší enzymatickou aktivitu je-li ozářen při nízké teplotě, než byl-li vystaven působení záření při laboratorní teplotě. Na druhé straně je s rozvojem pulzních zdrojů velmi intenzivního ionizujícího záření, umožňujících studovat a potenciálně i využívat tzv. FLASH efekt, třeba počítat s nezanedbatelným ohřevem vzorku v důsledku termalizace jisté části absorbované energie záření. Zkoumání závislosti radiačně chemických a molekulárně radiobiologických procesů na teplotě je věnována stále větší pozornost. Je snahou předložené diplomové práce tento trend zachytit a k řešení problému teplotních závislostí přispět jak vývojem instrumentace (kompaktní a versatilní peltierovské chlazení vzorku), tak původními výsledky (porovnání radiačního poškození plazmidové DNA, bakteriofágů a fytovirů) za laboratorní a snížené teploty.

1. Teoretická část

Výzkum účinků ionizujícího a UV záření na biomolekulární struktury, a především DNA patří do náplně studia vědeckých oborů fotochemie a radiační chemie. Různé druhy záření (fotony, neutrony či nabitě částice) mohou interagovat buď přímo se základními složkami nukleové kyseliny a způsobit ionizaci či excitaci, a iniciovat tak sled událostí, které vedou v určitém časovém horizontu k biologické odezvě. Tento jev se označuje jako **přímý účinek záření**. Záření může také interagovat s jinými atomy či molekulami v okolí (např. molekuly vody) za vzniku volných radikálů, které jsou schopny difundovat na vzdálenostech dostatečných k iniciaci interakce s kritickými cíli a způsobit jejich poškození. V tomto případě se jedná o **nepřímý účinek záření**.



Obrázek 1.1: Přímý a nepřímý účinek záření. V případě přímého účinku sekundární elektron reaguje přímo s cílem za vyvolání biologického efektu. Nepřímý účinek záření je vyvolán reakcí produktů radiolýzy vodních molekul se základními složkami DNA [4].

Pro úplnost lze dodatečně definovat i **účinek kvazipřímý**. Kvazipřímý účinek je definován jako takový účinek, při kterém probíhají ionizace v blízkém hydratačním obalu DNA a takto vzniklé elektrony a díry mohou migrovat přímo na kostru a báze [5]. Obvykle se řadí mezi přímé účinky, neboť je velmi často obtížné jej odlišit.

Obecně lze vlastní citlivost DNA k fotochemickým a radiačně-chemickým změnám přisoudit řadě faktorů. Jedná se zejména o faktory biologické (struktura heterochromatinu, fáze buněčného cyklu, schopnost reparačních procesů), chemické (pH) a fyzikální (stupeň hydratace, nízké teploty).

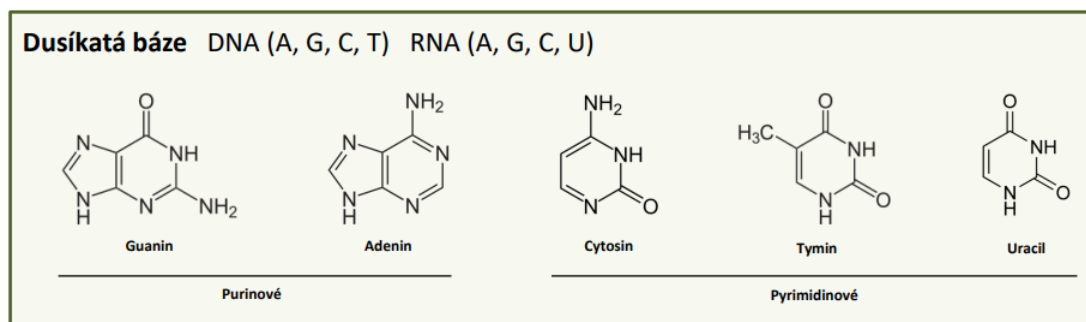
1.1 Deoxyribonukleová kyselina

Materiálním nosičem genetické informace jsou nukleové kyseliny. Nukleové kyseliny poprvé izoloval v 30. letech 19. století francouzský lékárník Braconnot z vinných kvasinek. V letech 1868-1869 pak Miescher extrahoval z jader leukocytů izolovaných z hnisu látku, kterou nazval nuklein. O tři roky později izoloval nuklein z mlíčí rýnského lososa. Později další pracovníci ověřili, že z nukleinu je možné oddělit bílkovinný podíl. Zbylá nebílkovinná látka pak byla pojmenována nukleová kyselina a postupně byla nalezena ve všech živých systémech [6]. S poznáním funkce této látky v buněčném jádře (nukleus) se stabilizovalo označení nukleová kyselina a mezinárodní zkratka NA (z angl. Nucleic Acid).

Chemická analýza NA postupovala poměrně pomalu, což bylo dáno úrovní izolačních i analytických postupů, které na tak náročný úkol byly ještě příliš hrubé. Přesto byly v NA prokázány dusíkaté heterocyklické báze: adenin, guanin, cytosin, uracil a thymin, dále pentózový cukr D-ribóza a 2-deoxy-D-ribóza a zbytek kyseliny fosforečné. Souběžně s rozvojem poznání chemického složení NA postupoval rozvoj genetiky a genetického inženýrství. Základ genetické teorie položil mezitím (1856-1866, čili dva roky před Miescherovou izolací nukleinu) Mendel a její další rozvoj pak postupně přinesl poznání úlohy NA (především pak DNA) jako materiálního základu dědičných vlastností.

1.1.1 Struktura složek nukleových kyselin

Nukleové kyseliny obsahují tři základní komponenty: (a) dusíkaté báze (pyrimidinové a purinové), (b) sacharid (D-ribóza a 2-deoxy-D-ribóza), (c) kyselinu fosforečnou. Podle sacharidové složky se dělí na ribonukleové kyseliny (RNA, z angl. Ribonucleic Acid) a deoxyribonukleové kyseliny (DNA, z angl. Deoxyribonucleic Acid). Toto rozdělení NA se používá proto, že chemickému rozdílu odpovídá i rozdílná biologická funkce. DNA uskládá základní genetické informace a nachází se u eukaryot především v buněčném jádru a v mitochondriích; u rostlin i v chloroplastech. U prokaryotních organismů pak v odpovídajících strukturách v cytozolu. RNA se účastní vybavení a realizace genetických informací a bezprostředně je řídí. U některých virů ovšem RNA slouží také k vlastnímu uchování genetické informace (tzv. RNA viry). Obě nukleové kyseliny jako celek zajišťují úschovu a předávání genetické informace (tzv. centrální dogma molekulární biologie).



Obrázek 1.2: Přehled dusíkatých bází. Převzato a upraveno z [7].

Základem pyrimidinových bází je šestičlenný heterocyklus se dvěma dusíkovými heteroatomy. Pyrimidinové báze obsažené v nukleových kyselinách mají v poloze 2 vždy kyslíkovou funkční skupinu a v poloze 4 kyslíkovou nebo aminovou skupinu. Pentóza se váže N-glykosidovou vazbou na dusíkový atom v poloze 1. Nejdůležitější pyrimidinové báze jsou cytosin, uracil a thymin (5-methyluracil). Uracil se vyskytuje výhradně v ribonukleových kyselinách a thymin naopak v DNA. Druhou skupinou jsou purinové báze odvozené od heterocyklické sloučeniny purinu, který byl poprvé získán při purifikaci kyseliny močové.

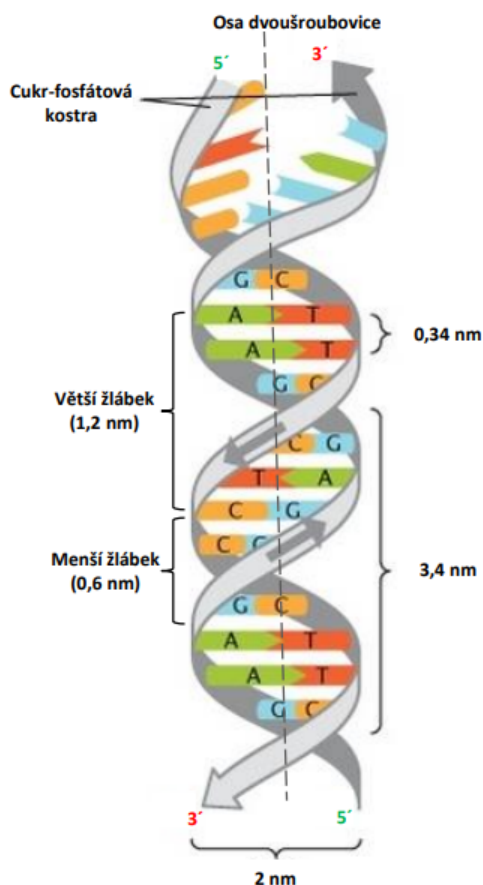
Je to heterocyklus se dvěma kruhy (pyrimidinovým a imidazolovým) a čtyřmi dusíkovými heteroatomy. Nejdůležitější purinové báze jsou adenin a guanin. Pentóza tvoří N-glykosid vazbou na dusíkový atom v poloze 9. V nukleových kyselinách jsou jednotlivé nukleosidy spojeny diesterovou vazbou kyseliny fosforečné. Tím vzniká lineární makromolekulární řetězec, v němž se pravidelně střídá zbytek pentózy se zbytkem kyseliny fosforečné.

1.1.2 Struktura a funkce DNA

Strukturu a funkci DNA (a podobně i RNA) nelze chápat a studovat izolovaně. Jejich funkce vyplývá ze struktury jak ve významu prostorovém (architektura molekul), tak ve významu chemickém (reaktivita molekul či jejich funkčních skupin). Podobně jako u bílkovin i zde je základním elementem primární (kovalentní) chemická struktura určená sledem nukleotidových zbytků a její pevnost je dána pevností kovalentních vazeb, v tomto případě nejen mezi nimi, ale i mezi jejich složkami. Diesterové vazby fosfátu v DNA jsou velmi stabilní vůči hydrolýze. Hydrolýzou v kyselém prostředí se poměrně snadno odštěpují volné báze; N-glykosidová vazba purinových bází je labilnější než vazba bází pyrimidinových. Na celkovém tvaru molekul NA, a zejména jejich funkci se více než u bílkovin podílejí struktury vyšších řádů, založené především na vodíkových vazbách. Princip sekundární struktury je u obou NA stejný; u DNA je však tato struktura jednotlívým principem stavby celé molekuly. Je proto velmi pravidelná a její poznání se stalo základem i pro vyřešení sekundární struktury RNA. Strukturu DNA vyřešili v roce 1953 Watson a Crick [8] na základě výzkumu Rosalind Franklinové [9] a jejich objev byl oceněn Nobelovou cenou. Při svém výzkumu vyšli z několika v té době známých faktů: Poměr bází není nahodilý a vykazuje několik zákonitostí: (a) celkový obsah purinových nukleosidů se rovná celkovému obsahu pyrimidinových nukleosidů, a tím tedy $(A + G) = (T + C)$, (b) obsah adenosinu se rovná obsahu thymidinu, guanosinu pak cytidinu, $A = T$; $G = C$, (c) celkový obsah nukleosidů s aminovou funkční skupinou se rovná celkovému obsahu nukleosidů s oxoskupinou $(A + C) = (G + T)$. Nativní, šetrně izolovaná DNA se v roztoku hydrodynamicky chová jako ohebné vlákno, které změnou podmínek mění nejen optické, ale i hydrodynamické vlastnosti. Rentgenové difrakční záznamy již v roce 1938 i při nízkém rozlišení umožnily sestavit první model DNA, připomínající sloupec mincí.

Watsonův a Crickův model vychází z principu spojování nejstabilnějších tautomerů bází vodíkovými vazbami. Tím vznikají dva stabilní páry pyrimidinové a purinové báze, které jsou nezaměnitelné. První dvojici vytváří adenin s thyminem pomocí dvou vodíkových vazeb, druhou cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových vazeb. V těchto párech jsou všechny vodíkové vazby maximálně pevné, neboť každý vodíkový atom směřuje přímo k akceptorovému atomu.

Nezaměnitelnost bází v jednotlivých párech vede ke komplementaritě vláken, která se mohou spojit jen tehdy, je-li ve sledu nukleosidů jednoho vlákna např. adenosin proti thyminu ve sledu nukleosidů druhého vlákna. Sterické uspořádání řetězce polynukleotidu vylučuje spojení dvou pyrimidinových nebo dvou purinových bází a donor-akceptorové vlastnosti substituentů vylučují „chybné“ spojení (např. A - C). Princip komplementarity je základem funkce nukleových kyselin. Schéma dvojšroubovice DNA je uvedeno na Obr. 1.3. Uvažujeme-li sled nukleotidových zbytků v jednom řetězci dvojšroubovice od 5'-konce k 3'-konci, pak druhý řetězec je orientován opačně. Průběh obou vláken pentóza-fosfátového řetězce je antiparalelní. Konvenční dvojšroubovice se vyskytuje v určitých geometrických formách, z nichž nejdůležitější jsou A, B a Z. Všechny tyto jinak se lišící formy mají několik společných charakteristik. Tak oba pentóza-fosfátové řetězce jsou na vnější straně šroubovice.



Obrázek 1.3: Schéma dvojšroubovice DNA. Převzato a upraveno z [10]

Jelikož volné hydroxylové skupiny diesterově vázaného zbytku fosforečné kyseliny jsou v neutrálním prostředí plně ionizovány, vnější část molekuly nese záporný náboj. Báze jsou srovnány uvnitř dvojšroubovice, kde jsou chráněny před stykem s vodou. Za těchto podmínek je pak síla vodíkových vazeb mezi spárovanými bázemi maximální. Vzhledem k asymetrickému uspořádání páru spojených bází v rovině vytvářejí se na povrchu šroubovice dva nestejně hluboké a široké zářezy (žlábký), oddělující oba pentóza-fosfátové řetězce. Predominantní forma DNA, kterou lze nalézt v majoritní části živých buněk, je B-forma DNA, která je pravotočivá.

1.1.3 Plazmidová DNA

Plazmidy řadíme mezi extrachromozomální, autonomně se replikující genetické elementy dvojšroubovicové DNA o velikosti 1000 bp až přes 2 Mbp [11] (z angl. base pair = bázových párů). Jsou obsaženy téměř ve všech bakteriálních kmenech, jak grampozitivních, tak gramnegativních, v kvasinkách (fylogeneticky nižší eukaryota), i u některých vyšších eukaryot [12].

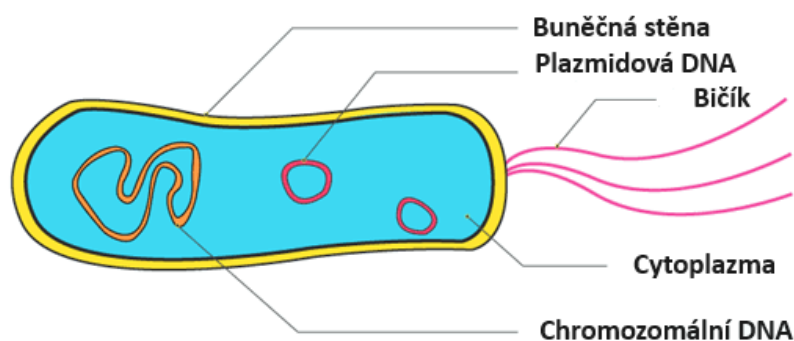
Většinou jsou schopny replikace pouze v úzce vymezeném okruhu hostitelských buněk. Na rozdíl od chromozomů nesou pouze geny kódující druhotné znaky, mezi které řadíme rezistenci k různým antibiotikům (např. ampicilinu, streptomycinu a tetracyklinu), které buňce pomáhají přežít za nestandardních podmínek. Naopak jiné geny kódují rezistenci k toxickým látkám, produkci enterotoxinů, kolicinů, restričních a modifikačních enzymů nebo schopnost degradace komplexních organických sloučenin. Přehled komerčně nejdostupnějších a nejpoužívanějších plazmidů, jejich délek a molekulových hmotností je uveden v Tab. 1.1.

Tabulka 1.1: Přehled typů plazmidů používaných v radiobiologických experimentech a jejich charakteristiky

Plazmid	Počet bází	GC:AT	M_m [kDa]
pBR322	4361 bp	1,16	2 683
PCDNA3	5446 bp	1,06	3 341
pGEM 3Zf(-)	3199 bp	1,01	1 972
pBS	2961 bp	1,02	1 825
pMSG-CAT	8405 bp	0,82	5 175
pUC19	2686 bp	1,03	1 655

Plazmidy se replikují nezávisle na replikaci chromozomální DNA. Jejich replikační cyklus může, ale nemusí být s replikací bakteriálního chromozomu a s cyklem buněčného dělení synchronizován. V této situaci může počet plazmidů v buňce dosáhnout až několika set kopií. Takové plazmidy jsou poté vhodné pro genové inženýrství, protože mohou být z buněk izolovány ve velkých množstvích [13].

Pro účely této práce byla plazmidová DNA zvolena jako výchozí molekulární struktura (modelový nosič genetické informace) při sledování teplotní závislosti na poškození ozařovaného vzorku. Důvodem je skutečnost, že v rámci bioradiační chemie a radiační fyziky jsou plazmidy často využívány jako typičtí představitelé jednoduchého modelu DNA díky své snadné manipulaci a kvantifikaci změn po ozáření (tvorba jednoduchých a dvojných zlomů). Mezi další výhody patří, že izolovaná plazmidová DNA po ozáření nepodléhá reparačním a opravným procesům (při vhodném skladování), což implikuje schopnost uchovat informaci o míře degradace molekuly. Samotná kvantifikace změn spočívá ve využití elementární elektromigrační metody - gelové elektroforézy. Na Obr. 1.4 lze vidět schéma bakteriální buňky s extrachromozomální plazmidovou DNA.



Obrázek 1.4: Schéma bakteriální buňky s plazmidovou DNA. Převzato a upraveno z [14].

1.1.4 Virová DNA

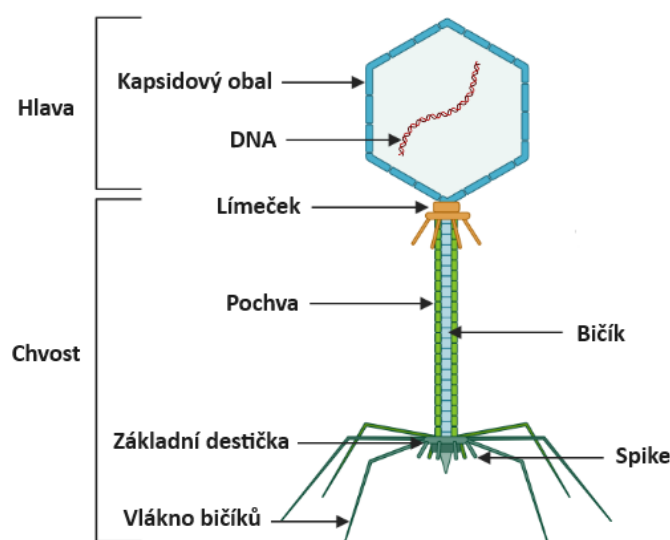
Viry jsou infekční submikroskopické částice, které se nemohou samy bez pomoci hostitele reprodukovat. Většinou jejich velikost kolísá od 15 do 300 nm, ale najdeme taktéž skupinu obrovských virů (tzv. Giry, z angl. Gigantic viruses), které tuto velikost řádově překračují (650 - 1000 nm). Také jejich tvar je různý, od kulového až po tyčinkový. Přestože se jedná o tak malé částice, mají (za určitých podmínek) schopnost samostatné replikace a mutace. Nesou tedy veškerou informaci, která je nutná k jejich existenci a reprodukci, ale nemají vlastní metabolismus.

Důsledkem toho musí využívat metabolismus hostitelských buněk. Podle druhu hostitele lze rozlišit živočišné viry, rostlinné viry a viry bakterií čili bakteriofágy (zkráceně fágy). Podle typu obsažené nukleové kyseliny se rozlišují DNA- a RNA- viry. Bývají často tříděny i podle typu replikace nebo z epidemiologického hlediska. Viry se liší nejen v otázce velikosti, ale i složením. Na rozdíl od buněk, které obsahují DNA i RNA, jednotlivé viry obsahují jen daný typ nukleových kyselin, který je přítomen buď v jednořetězcové, nebo dvojřetězcové formě. Nukleová kyselina je vždy umístěna uvnitř virové částice (tzv. virion) a je uzavřena ochranným proteinovým obalem (tzv. kapsidou).

U virů větších rozměrů mohou být tyto obaly z několika vrstev složených z většího počtu odlišných proteinů, v některých případech i lipoproteinů nebo glykoproteinů. Proteinový obal nukleových kyselin virů se nazývá kapsida a je většinou složen z velkého počtu identických podjednotek nazvaných kapsomery. Ze způsobu a postupu skládání kapsomer vyplývá i daná symetrie kapsidu, která je buď kubického tvaru či šroubovicová. Složitější viry (např. většina výše zmíněných bakteriofágů) mají komplexní symetrii [15].

Bakteriální viry - bakteriofágy

Nejčastější je kubická symetrie kapsidu. Tuto symetrii mají pravidelné mnohostěny, z nichž se vyskytuje tetraedr se 4 trojúhelníkovými plochami, dodekaedr s 12 pětiúhelníkovými plochami a ikosaedr s 20 trojúhelníkovými plochami. V elektronovém mikroskopu se jeví jako kulovité částice. V případě virů se šroubovicovou symetrií vytvářejí válcovité částice, které se v elektronovém mikroskopu jeví jako tyčinky nebo ohebná vlákna. Viry s komplexní izomerií jsou nejsložitější a zpravidla mají část kubicky a část šroubovicově symetrickou. Tento typ izomerie je nejčastější u bakteriofágů. Schéma jejich stavby je na Obr. 1.5.

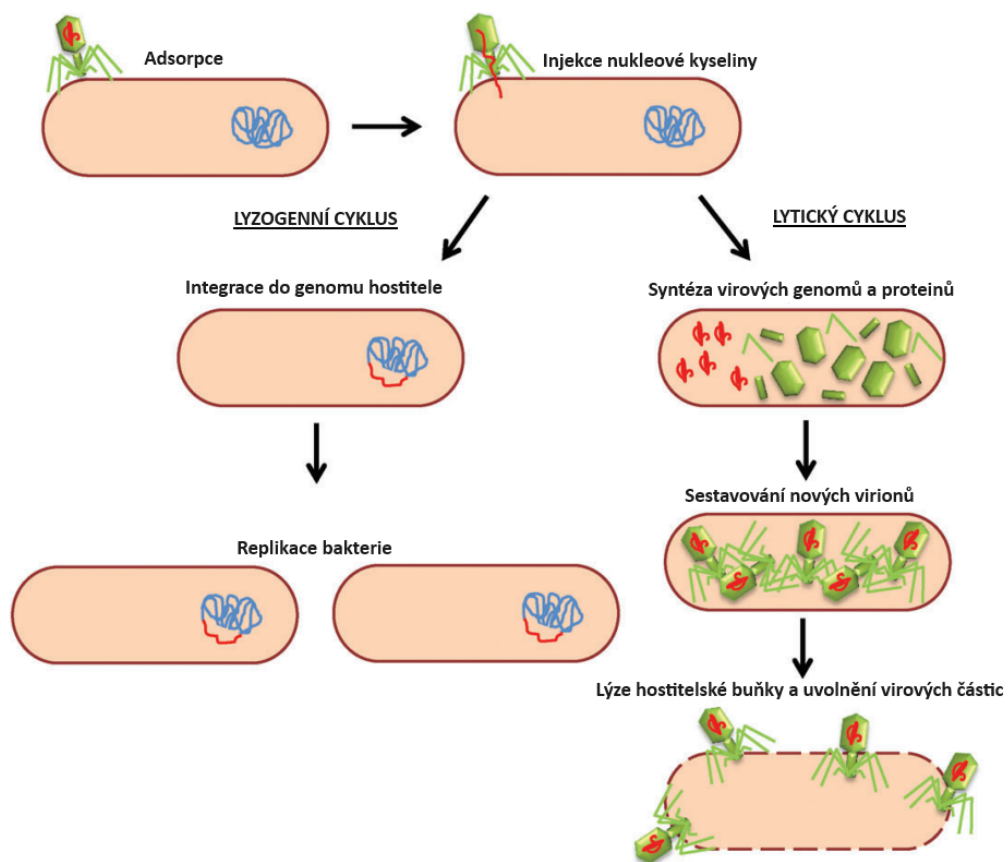


Obrázek 1.5: Struktura bakteriofága. Převzato a upraveno z [16].

Například fág T_2 má hlavu o průměru přibližně 65 nm a výšce 95 nm; její obal je složen z bílkovinných podjednotek, vnitřek je vyplněn virovou DNA. K hlavě je připojen 95 nm dlouhý kontraktilní bičík, který je tvořen jádrem o průměru asi 8 nm, obalený pochvou. Bičík je zakončen spodní destičkou se šesti hroty, ze které vyčnívá 6 bičíkovitých vláken sloužících k uchycení fága na stěnu bakterie.

Jelikož viry nemají vlastní replikační systém, musí využívat systém buněk hostitele. Proto je na rozdíl od jiných mikroorganismů (např. bakterií, fylogeneticky nižší houby apod.) nelze pěstovat na živných půdách (např. agarových plotnách), ale pouze v živých buňkách.

Proces infekce bakteriální buňky je zahájen přichycením fága na povrch buněčné stěny bakterie pomocí hrotů základní destičky. Při samostatné interakci se uplatňují specifické receptory buněčné stěny bakterie, který slouží jako „vodítko“ pro nalezení vhodného povrchu. Ze základní desky bičíku se uvolňuje lysozym, který slouží k perforaci buněčné stěny bakterií. V dalším kroku nastává silná kontrakce bičíkové pochvy, takže nekонтahované jádro bičíku je zatlačeno do vzniklého otvoru. Z hlavy fágu je genetická informace injektována jádrem bičíku do vnitřku napadené buňky [17]. V závislosti na dalším průběhu infekce se rozdělují fágy na lytické (tzv. virulentní) a lyzogenní (tzv. temperované či mírné). Virulentní bakteriofágy se projevují lytickým životním cyklem, při kterém dle centrálního dogmatu dochází k replikaci nukleové kyseliny a k syntéze strukturních proteinů. Výsledkem takového cyklu je vznik nových virových částic (až 50 - 200), tzv. virionů. Tyto nové fágové částice jsou roztroušeny do okolního prostředí, což může vést k dalším lytickým cyklům a tím k úspěšné likvidaci bakteriální populace. Alternativní cestou je přechod fágů do lyzogenního cyklu, při kterém dochází k integraci fágového genomu do genetické informace bakterie (vzniká tzv. profág). Při standardní replikaci bakteriálního genomu probíhá i replikace profága zajišťující jeho přítomnost v dceřinných buňkách a dalších generacích. V důsledku změn v okolí může dojít k vyčlenění profága z bakteriálního genomu a k zahájení lytického cyklu [18]. Životní cyklus bakteriofága je zobrazen na Obr. 1.6.



Obrázek 1.6: Životní cyklus bakteriofága. Převzato a upraveno z [18].

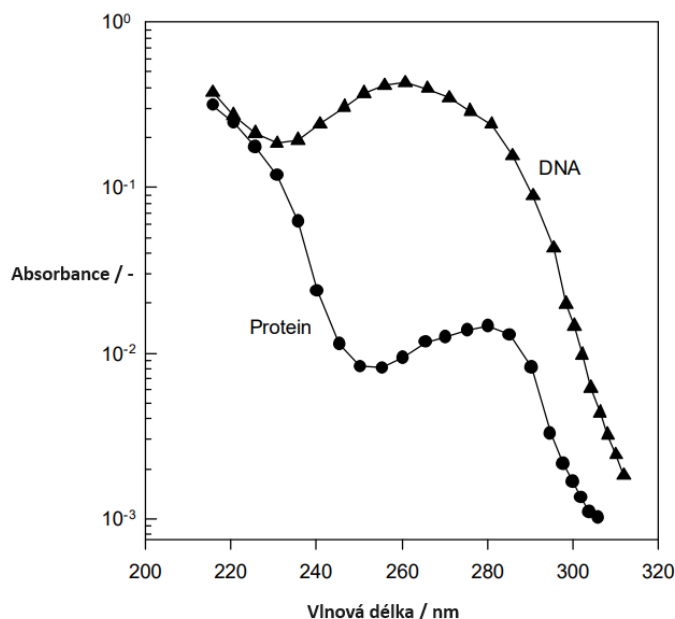
Rostlinné viry - fytoviry

Fytoviry řadíme mezi rostlinné viry, které až na výjimky nemají schopnost pronikat celulóзовou buněčnou stěnou. Buněčnou stěnu rostlinných buněk překonávají fytoviry pomocí tzv. vektorů neboli přenašečů. Takovým vektorem může být například hmyz nebo houba. Virus se do buňky může dostat také mechanickým poškozením. Pokud k infekci hostitelské buňky dojde (v místě infekce se začnou objevovat lokální příznaky), dochází ke změnám v jejím metabolismu a vir se začíná reprodukovat (výskyt systémových příznaků). Z již napadené buňky se rostlinné viry mohou šířit do dalších pomocí spojů mezi buňkami (tzv. plazmodezmata), v rámci rostliny pak některé z nich mohou využít i cévní svazky. Projev choroby se vyznačuje množením viru, poškozením funkcí rostliny a dalších symptomů. Přítomnost infekce se projevuje také vizuálními příznaky, jako jsou barevné změny, mozaiky, žloutenky, pruhy a jiné, které mohou, ale také nemusí být charakteristické pro daný virus a druh rostliny. Tyto příznaky lze lokalizovat na částech rostliny, nebo na celých rostlinách. Objevují se nejen na úrovni makroskopické, ale také histologické a cytologické [19].

1.2 Fotochemie nukleových kyselin

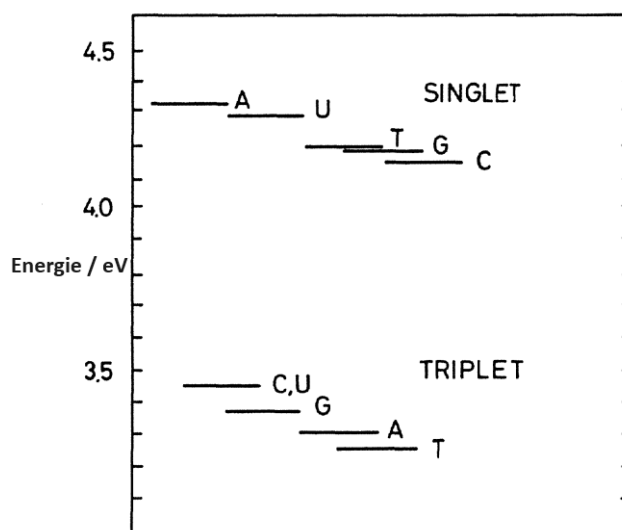
1.2.1 Obecné aspekty

Deoxyribonukleová kyselina, která je materiálním nosičem genetické informace, představuje nepochybně, ale ne výlučně, hlavní cíl pro poškození buněčných struktur zářením. Absorpční spektrum DNA v UV spektrálním oboru je uvedeno na Obr. 1.7. Maximum absorpce leží v oblasti vlnové délky 260 nm. Absorpční spektrum proteinů je výrazně odlišné. Tato skutečnost umožňuje vymezit relativní význam těchto dvou tříd biomolekul pro fotobiologické účely pomocí metod absorpční spektroskopie.



Obrázek 1.7: Absorpční spektrum DNA a proteinu. Převzato a upraveno z [20].

Absorpce molekul DNA je způsobena přítomností heterocyklických bází a jejich interakcí vrstvením (tzv. base stacking), ostatní základní složky DNA - sacharid a fosfát - k absorpci v UV-VIS spektrálním oboru nepřispívají. Molekuly absorbují energii v kvantech přičemž dochází ke třem typům excitace v závislosti na vlnové délce dopadajícího záření: rotační, vibrační a elektronové. Absorpce infračerveného záření (IČ) je spojena přechody mezi vibračními nebo rotačními stavy. Absorpcí ultrafialového (UV) a viditelného (VIS) světla dochází k elektronové excitaci molekuly, tj. vytvoření vysoce energetického stavu, aniž by musely proběhnout postupné procesy rotační a vibrační excitace. Výsadou fotochemických reakcí je ta skutečnost, že probíhají z excitovaných elektronových stavů. Tato skutečnost stojí za samotnou podstatou fotochemie jako vědního oboru, který studuje procesy od absorpce fotonu až po chování (reaktivitu) elektronově excitovaných molekul [21]. V případě DNA lze porovnat excitační energie prvních singletních a tripletních stavů mononukleotidů, jak ukazuje Obr. 1.8.



Obrázek 1.8: Excitační energie prvního excitovaného singletního a tripletního stavu mononukleotidů DNA. Převzato a upraveno z [22].

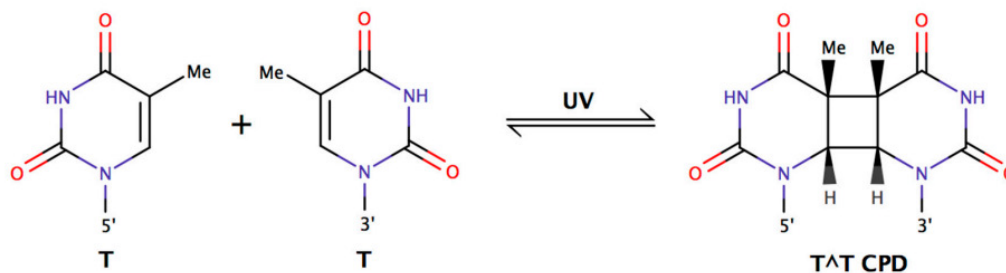
1.2.2 Fotochemické změny vyvolané UV zářením

Účinky ozařování molekul DNA v rozsahu vlnových délek mezi 200 a 300 nm ovlivňují pouze báze nukleových kyselin. Fosfát ani deoxyribóza nejsou přímo zářením ovlivněny. Řada experimentálních studií [23] svědčí o tom, že se důsledek absorpce zářivé energie jednou z bází DNA nemusí projevit lokálně, ale vlivem migrace náboje po polynukleotidovém řetězci se může projevit ve vzdálenosti až několika párů bází. Nejpravděpodobnější je migrace náboje za účasti tripletních stavů bází. Jak bylo uvedeno výše, energie tripletních stavů klesá v řadě $C > G > A > T$. Pravděpodobnost, že finálním akceptorem bude thymin, je tedy značně vysoká.

V současné době je známo několik fotochemických reakcí, které vedou k poškození DNA. Jedná se zejména o tvorbu dimerů pyrimidinů, hydratace pyrimidinů, vznik kovalentní vazby mezi DNA a bílkovinou a dále přerušení vazby cukr-fosfátové kostry. Jedním z nejdůležitějších typů fotoproduktů, které mají konečný biologický důsledek při účinku UV záření, jsou cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPD) [24].

UVA záření indukuje poškození DNA pouze nepřímo dvojitým mechanismem: buď oxidací - reakcí se singletním kyslíkem, tedy molekulárním kyslíkem v excitovaném stavu $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), či jednoelektronovou oxidací (nebo vodíkovou abstrakcí) za tvorby radikálu, či kationt radikálu [25].

Cyklobutanové pyrimidinové dimery (CPD) tvoří nejpočetnější skupinu fotoproduktů DNA vystavených působení UVB záření. Principem mechanismu tvorby CPD je vznik kovalentní vazby mezi bázemi thyminu a cytosinu. Existují tedy kombinace TT, TC, CT a CC. Vznik je podmíněn cykloadicí dvojných vazeb uhlíků C5 a C6 přilehlých pyrimidinových bází, vytvářející cyklobutanový kruh sdílený oběma sousedícími molekulami - jedná se o tzv. cyklobutanový typ dimeru. Reakční mechanismus je znázorněn na Obr. 1.9.

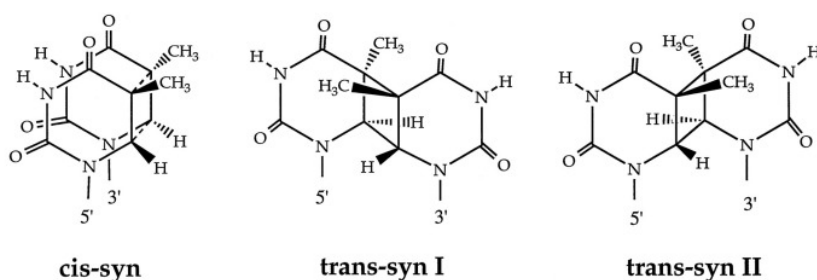


Obrázek 1.9: Reakční mechanismus tvorby thyminových dimerů. Absorbací složky UV záření dochází k tvorbě dimeru ve formě cyklobutanového kruhu vlivem cykloadice dvojných vazeb uhlíků C5 a C6 DNA. Převzato z [26].

Základním principem tvorby dimerů je předcházející excitace do prvního tripletního stavu. Molekula kyslíku a paramagnetické ionty, které destabilizují tripletní stav zabraňují i fotodimerizaci. Výtěžky dimerů jsou obecně nízké při pokojové teplotě, ale značně se zvyšují v prostředí zmrazeného roztoku. Tento jev je vysvětlován výhodnou prostorovou konfigurací thyminových bází pro dimerizaci. Jak bylo uvedeno výše, dimery se netvoří pouze mezi thyminy, ale existují i jiné kombinace. Dokonce i T-U, či C-U. V druhém případě je uracil tvořen deaminačním procesem hydrátů cytosinu jako důsledek hydrolytické substituce aminokyseliny uhlíku C4 za hydroxylovou skupinu.

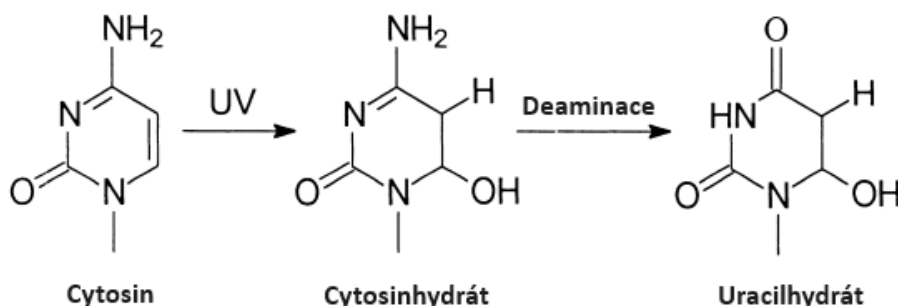
Výtěžky jednotlivých dimerů se liší. Nejpočetnější jsou T-T dimery. Trend tvorby dimerů závisí na vlnové délce, kdy relativní příspěvek thyminových dimerů s jejím zvyšováním klesá.

Samotná tvorba dimerů je proces reverzibilní, kde rovnovážná konstanta je funkcí vlnové délky. Absorpční pásmo kolem 265 nm je dáno přítomností dvojně vazby mezi uhlíky C5 a C6, která při tvorbě dimeru zaniká. Proces přímé i zpětné reakce lze libovolně řídit změnou energie zdroje UV záření. Dimery mohou mít různé sterické konformace (izomery dimerů), jak ukazuje Obr. 1.10. Celkem bylo nalezeno šest možných izomerů pyrimidinových dimerů. Konformace závisí na pozici pyrimidinového zbytku vzhledem k cyklobutanovému kruhu (cis-trans) a na relativní orientaci dvou C5-C6 vazeb (syn-paralelní/anti - antiparalelní orientace). Díky sterickým faktorům lze v DNA nalézt pouze konfiguraci syn izomerů.



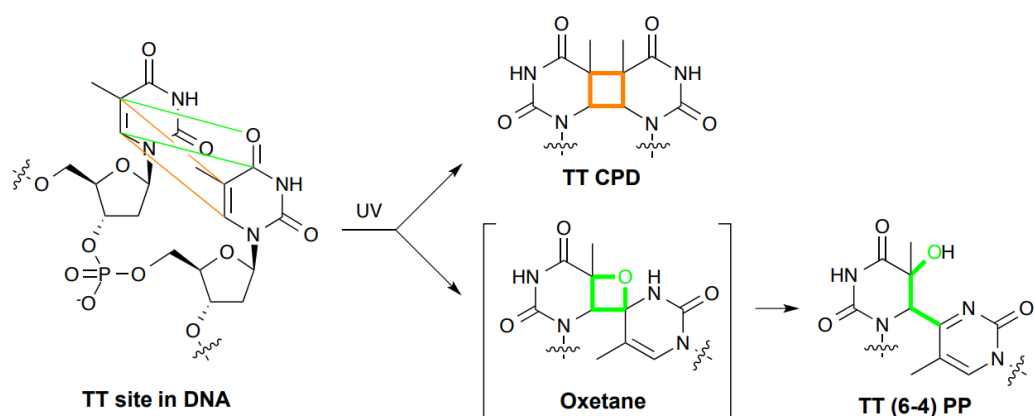
Obrázek 1.10: Izomery thyminových dimerů. Převzato z [27].

Ke tvorbě hydrátů dochází adicí molekuly vody na dvojnou vazbu uhlíků C5 a C6 pyrimidinových bází. Na rozdíl od dimerů jsou poměrně nestabilní a snadno probíhá zpětná reakce při změnách pH či teploty. Cytosinhydrát (hydroxy-cytosin) může ztratit aminoskupinu za tvorby uracilu, jak je schematicky znázorněno na Obr. 1.11 . Pokud k takové reakci dojde na kodogenním vlákně při replikaci DNA, může vést ke vzniku mutací. Vliv a mechanismus tohoto typu poškození v buňkách není dosud spolehlivě znám. Hydráty cytosinu (případně i uracilu) vznikají nejen ve vodných roztocích bází, ale také u příslušných nukleosidů a nukleotidů, oligonukleotidů, polynukleotidů, RNA a DNA. Rychlost procesu fotohydratace vzrůstá u jednovláknové DNA a RNA a klesá při záměně H_2O za D_2O .



Obrázek 1.11: Formace a deaminace cytosinhydrátu. Převzato a upraveno z [28].

Dalším typem fotoproduktu je pyrimidin (6-4) pyrimidon, nebo též tzv. (6-4) fotoprodukt. Jedná se o druhou nejvíce zastoupenou formu CPD indukovanou UVB zářením zahrnující účast excitovaného singletního stavu. Tvoří se [2+2] cykloadicí zahrnující dvojnou vazbu mezi uhlíky C5 a C6 na 5'-konci pyrimidinu s uhlíkem C4 karbonylové skupiny 3'-konce thyminu. V samotném procesu ozáření DNA dochází nejdříve ke tvorbě oxacyklobutanu (oxetanu), který se posléze spontánně přeskupí na (6-4) fotoprodukt. Případné další ozáření vede ke konverzi tohoto produktu na tzv. Dewarův valenční izomer. [29]. Jeho výtěžek je menší než výtěžek dimerů (přibližně 1:3) [30]. Na Obr 1.12 je znázorněno sumární schéma fotoiniciačních reakcí tvorby CPD a (6-4) produktů.



Obrázek 1.12: Struktura dvou hlavních fotoproduktů vytvořených na dithyminových centrech v DNA. Převzato z [31].

1.3 Radiační chemie nukleových kyselin

1.3.1 Obecné aspekty

Radiační chemie nukleových kyselin byla obecně studována za účelem pochopení chemických modifikací indukovaných v DNA (RNA) ionizujícím zářením. Předpokládá se, že různé biologické účinky ionizujícího záření *in vivo* jsou důsledkem těchto komplexních chemických modifikací DNA. Buňky mají dobře vyvinuté reparační systémy pro opravu poškození DNA, které jsou nezbytné pro zachování integrity genomu. Existuje mnoho různých opravných mechanismů, které buňky používají, aby se vyrovnaly s poškozením DNA. K rozpoznání a opravě alterace (poškození) DNA však nedochází vždy s náležitou přesností, takže některá poškození DNA vedou k chromozomálním aberacím, indukci mutací či karcinogenezi [32].

V neposlední řadě se poškození DNA způsobené ionizujícím zářením podílí na procesech buněčné signalizace, jako je např. apoptóza. Jedná se o proces prevence množení geneticky aberantních buněk, které se projevují vysokou úrovní poškození DNA. Buněčná smrt, radiační mutageneze, radiační karcinogeneze a nestabilita genomu jsou některé z biologických účinků, o kterých se předpokládá, že vznikají radiací indukovanými změnami na úrovni DNA [33].

Dvě z hlavních oblastí výzkumu, k nimž znalost radiačně indukovaných modifikací DNA významně přispěla, je radiační onkologie a radiační ochrana. Tyto dvě vědní disciplíny uzavírají interakci mezi biofyziky, chemiky a molekulárními biology, kteří zkoumají procesy a mechanismy vedoucí ke konečným biologickým důsledkům ionizujícího záření.

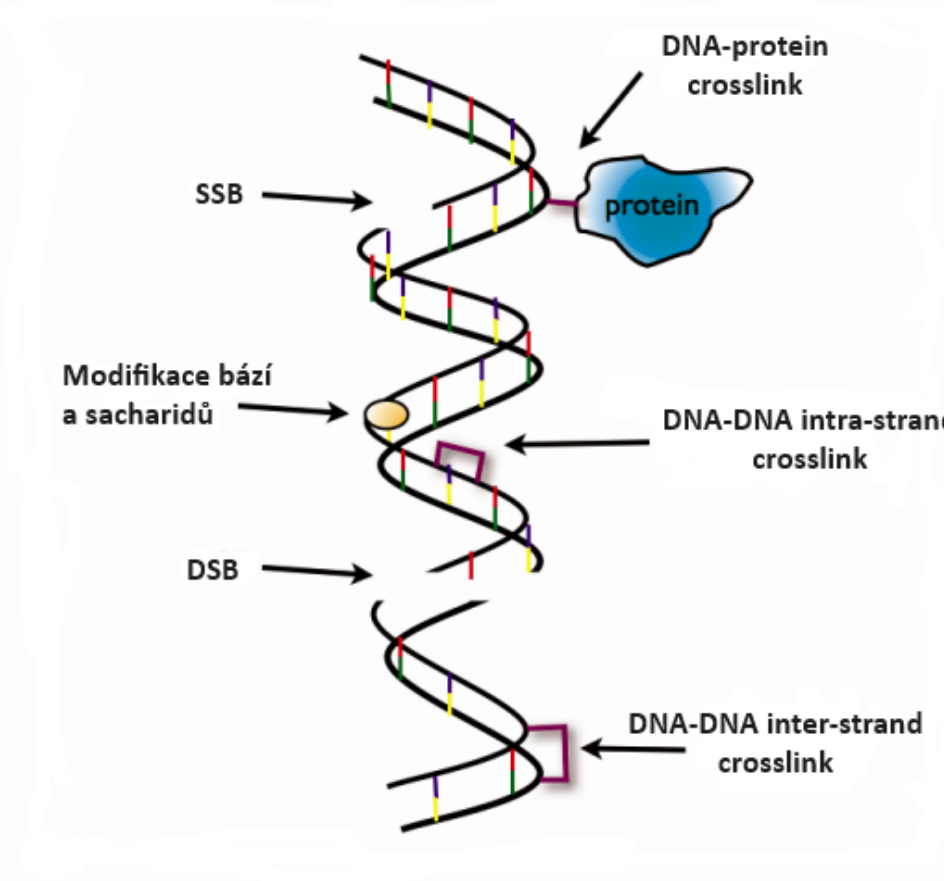
Dosud většina informací o poškození DNA vyvolaných ionizujícím zářením pochází z použití zdroje záření s nízkým lineárním přenosem energie (LET, z angl. linear energy transfer), jako je záření γ , vysokoenergetické rentgenové záření a vysokoenergetické elektrony (LET představuje množství energie uložené na jednotkové délce dráhy paprsku ionizujícího záření). Další mezník ve výzkumu byl objev techniky pulzní radiolýzy („pump probe“) sloužící k získání kvantitativních informací o typech a reaktivitě vzniklých radikálů DNA.

Jiné techniky (např. elektronová spinová rezonance) poskytly informace o typech poškození způsobených přímou depozicí energie v makromolekule DNA [34].

V poslední době se objevují data o chemických charakteristikách poškození DNA využívající záření s vysokým lineárním přenosem energie. Tyto informace by měly poskytnout užitečný pohled na identifikaci „nových“ typů lézí a alterací vyvolaných tímto zářením.

1.3.2 Poškození vyvolané ionizujícím zářením

Ionizující záření náhodně indukuje různé typy poškození DNA. Nejčastějšími typy alterací jsou jednoduché (SSB) a dvojné (DSB) zlomy, modifikace bází a deoxyribózy a v neposlední řadě vznik zesítnění vazeb DNA-protein (cross-links) [35]. Schéma různých typů poškození je znázorněno na Obr. 1.13.



Obrázek 1.13: Ionizující záření způsobuje mnoho různých typů poškození DNA přímým i nepřímým účinkem. Mezi tato poškození řadíme jednoduché alterace, jako jsou modifikace báze či cukerné složky, interakce DNA-protein (cross-link), až po složité alterace typově dvojitě vlákenné zlomy DNA. Převzato a upraveno z [36].

Při studiu buněčné DNA se předpokládá, že poškození vyvolané zářením je způsobeno přímou depozicí energie ve stavebních složkách DNA a v jejím prvním hydratačním obalu nebo nepřímými účinky prostřednictvím vodních radikálů, zejména HO^\bullet radikálů. Tyto radikály se tvoří ve vzdálenosti asi 3-4 nm od DNA [37], difundují a při interakci s DNA způsobují poškození. U nízkého LET záření přispívá nepřímý účinek asi 60 % k celkovému účinku, u vysokého LET záření je to podstatně méně.

Tuto hypotézu lze experimentálně potvrdit ozařováním vzorků DNA s rostoucí koncentrací libovolné látky uplatňující se v roli vychytávače (z angl. scavenger) HO^\bullet radikálů. Při vysoké koncentraci vychytávače lze veškeré způsobené poškození přisoudit přímému účinku.

Buněčná DNA a její okolní molekuly vody se považují za potenciálně kritické cíle, jejichž poškození iniciuje biologické účinky záření. Mnoho druhů poškození je rozpoznáno a odstraněno buněčnými reparačními systémy, což vede k restituci stability genomu. Na druhou stranu se předpokládá, že právě neopravené DSB jsou hlavním typem alterací vedoucích k reprodukční buněčné smrti [38].

1.3.3 Primární procesy při poškození DNA vlivem záření

Obecně je většina energie deponovaná ionizujícím zářením odnášena sekundárními elektrony, vytvořenými ionizacemi, při kterých za sebou zanechávají kladně nabitý iont. Elektron je emitován z příslušného orbitalu do kontinua s dostatečnou energií, způsobit další ionizace, případně excitace. Například u 10 MeV elektronu je přibližně 76 % energie uloženo v tzv. spurách a zbytek v tzv. blobech. Rozdělení těchto stopových entit do specifických energetických domén je čistě libovolné. Poškození typu DSB jsou převážně produkována nízkoenergetickými elektrony. Vzhledem k tomu, že biologické účinky záření jsou důsledkem přímých a nepřímých účinků a buňka obsahuje přibližně 80 % vody, u záření s nízkým LET se předpokládá, že většina nepřímého účinku vzniká působením volných radikálů [39].

Interakce ionizujícího záření vede přes excitaci a ionizaci molekul vody ke vzniku tří primárních radikálů HO^\bullet , H^\bullet a e^- , který procesem solvatace v čase 10^{-11} vytvoří e_{aq}^- (solvatovaný elektron). Čtvrtý kation-radikál H_2O^+ reaguje s molekulami vody okolního prostředí v čase kratším než 10^{-14} s za tvorby HO^\bullet a H_3O^+ . Ozařováním čisté vody v uzavřeném systému zářením o nízké hodnotě LET vede k ustavení rovnovážného vztahu, ve kterém budou v nízkých koncentracích přítomny molekulární produkty radiolýzy - H_2 , O_2 , H_2O_2 .

Následující schémata 1.1 - 1.4 ukazují základní mechanismus radiolýzy vody.

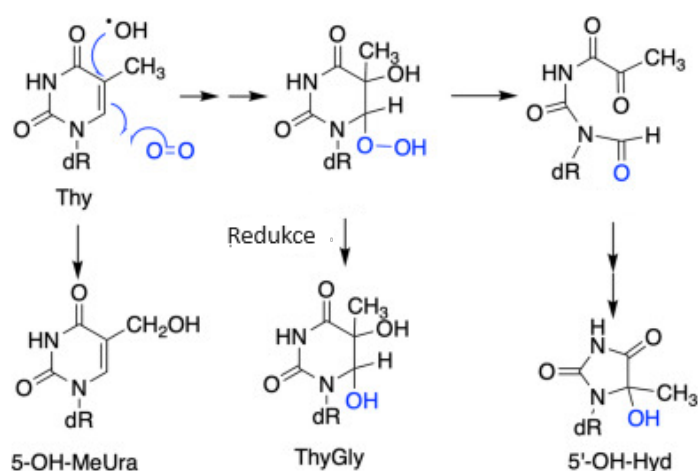


Rychlostní konstanty pro reakci HO^\bullet radikálu, e_{aq}^- a H^\bullet s polynukleotidy a jednovláknovou a dvojitou vláknovou DNA jsou řádově $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Radikály HO^\bullet a reakce, kterých se zúčastní, lze klasifikovat následovně (dle [40]): (a) přenos elektronu organických a anorganických sloučenin (např. tvorba $\text{Cl}_2^{\bullet-}$), (b) abstrakce vodíkového atomu vázaného na uhlík, (c) adice na dvojnou vazbu. Hydroxylový radikál se řadí mezi hlavní oxidující radikály a je schopen vytvořit řadu sekundárních radikálů s vysokou reaktivitou, což lze dokázat již výše zmíněním radikálem $\text{Cl}_2^{\bullet-}$. V souvislosti s relativně vysokou koncentrací chloridových iontů v cytoplazmatické membráně, hraje $\text{Cl}_2^{\bullet-}$ radikál podstatnou roli v procesu poškození buněčných membrán HO^\bullet radikálem.

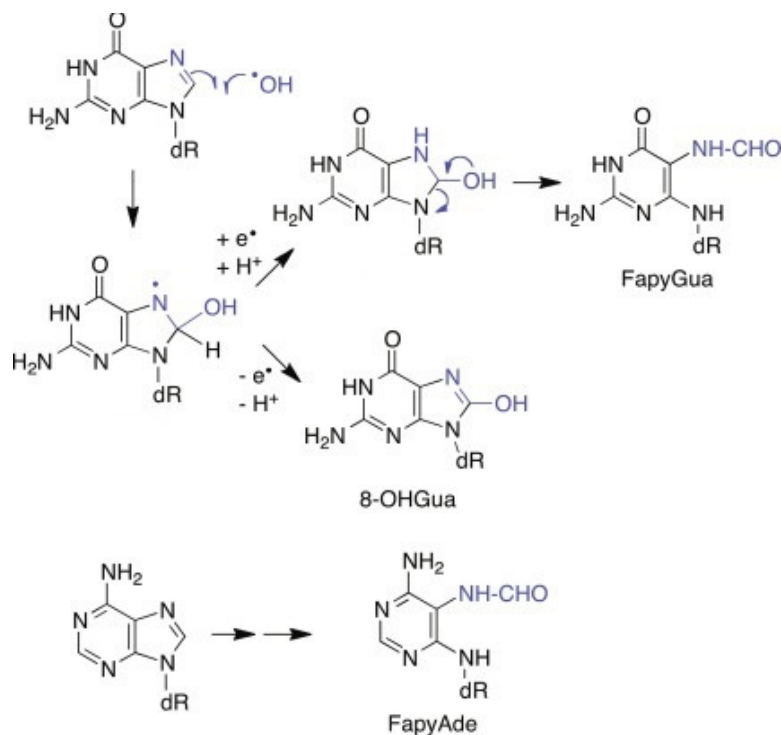
Poškození bází v důsledku působení HO[•] radikálů

Jak již bylo řečeno, vykazuje HO[•] radikál z vytvořených radikálů největší reaktivitu. HO[•] radikál je elektrofilní povahy interagující procesem adice s nenasycenými systémy v místech s vysokou elektronovou hustotou. Reakční rychlost interakce tohoto radikálu se čtyřmi bázemi a souvisejícími nukleosidy je řízena difúzí. Hlavní reaktivní místa HO[•] radikálů na nukleobázích jsou dvojně vazby heterocyklů. V souladu s tím adice HO[•] radikálu v poloze uhlíku C8 adeninu a guaninu poskytuje odpovídající redukující 8-hydroxy-7,8-dihydropurin-7-ylový radikál. Oxidace tohoto meziproduktu vede k tvorbě příbuzných 8-hydroxypurinů, které jsou v dynamické rovnováze se svou stabilnější tautomerní formou 8-oxo-7,8-dihydropurinu. Kompetitivní redukce posledně uvedeného purinového radikálu dává vzniknout sloučeninám s otevřeným imidazolovým kruhem: tzv. formamidopyrimidinovým (Fapy) derivátům. Adice HO[•] radikálu do polohy uhlíku C4 struktury nukleobáze, což je ve skutečnosti převládající radikálová reakce, vzniká oxidační radikál oxylového typu po rychlém dehydratačním procesu. Adicí superoxidového radikálu k posledně uvedenému meziproduktu vznikne imidazolový produkt, který je kvantitativně hydrolyzován na svůj oxazolový derivát [41].

V případě pyrimidinových nukleobází se HO[•] radikál přednostně aduje na uhlík v pozici C5 a v menší míře v pozici C6 thyminu a cytosinu. Získané adukty HO[•] radikálů mohou rychle reagovat s molekulárním kyslíkem. Redukcí výsledných peroxylových radikálů vznikají příbuzné hydroperoxy, které pak redukci spolu s produkty přeskupení kruhů a fragmentace dávají vzniknout konečným stabilním produktům, jako jsou 5,6-hydroxy-5,6-dihydropyrimidin (glykoly; ThdGly pro thymidin). Thymin může také podléhat abstrakci vodíku ze své methylové skupiny, čímž po spojení s HO[•] radikálem vzniká 5-(hydroxymethyl)uracil (5-OH-MeUra). V přítomnosti kyslíku vede vzniklý radikál ke vzniku hydroperoxidu, 5-(hydroperoxymethyl)-2'-deoxyuridinu. Dva konečné stabilní produkty této degradační cesty jsou odpovídající alkohol a aldehyd, konkrétně 5-(hydroxymethyl)-2'-deoxyuridin (HMdUrd) a 5-formyl-2'-deoxyuridin (FordUrd) [42].



Obrázek 1.14: Schéma oxidačních produktů pyrimidinové nukleové báze thyminu. Převzato a upraveno z [43].

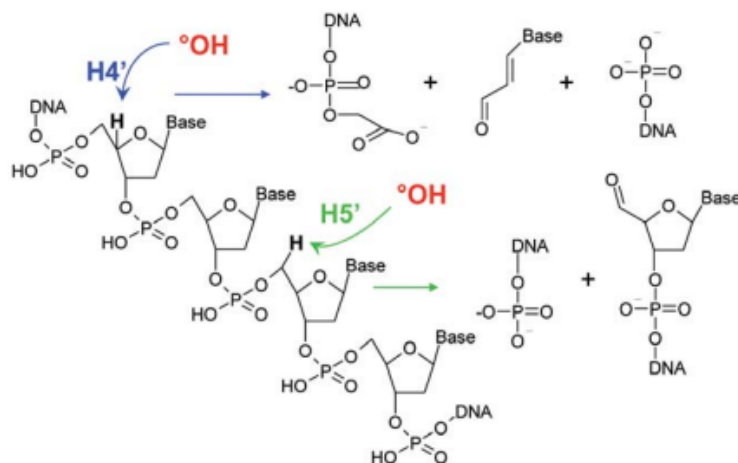


Obrázek 1.15: Schéma oxidačních produktů purinových nukleových bází. Převzato z [43].

Tvorba zlomů v důsledku působení HO• radikálů

Prekurzorem pro vznik jednoduchých a dvojných zlomů je poškození cukr-fosfátové kostry, konkrétně tvorba radikálů cukerných zbytků. V následujících odstavcích je podrobně rozebrán princip vzniku zlomů působením HO• radikálů a následně vliv přímých účinků na tvorbu zlomů DNA. Radikály HO• reagují s cukernou částí řetězce DNA abstrakcí vodíkového atomu. Nejreaktivnějším místem cukerného kruhu je uhlík C4'. V přítomnosti molekulárního kyslíku výsledný uhlíkově centrováný radikál dává vzniknout peroxylovému meziproduktu, který se může rozkládat převážně na fosfoglykolát za uvolňování báze propenalu [44].

Abstrakce vodíku v poloze 5' je také běžnou reakcí, která za aerobních podmínek poskytuje kromě jiných oxidačních produktů i 5'-aldehydový derivát. Tyto reakce, stejně jako další minoritní reakce zahrnující abstrakci vodíku z poloh 2' a 3', vedou k přímým zlomům vláken DNA. Naproti tomu abstrakce vodíku z polohy 1' v přítomnosti kyslíku vede ke vzniku 2-deoxyribonolaktону bez štěpení cukr-fosfátové kostry. Toto oxidované abazické (dojde k vyštěpení báze) místo je nestabilní i za mírně alkalických podmínek, což vede též k přetržení vlákna [45]. Na Obr. 1.16 je uvedeno schéma jednořetězcových zlomů DNA produkovaných po abstrakci vodíku iniciovaných HO• radikálem. Atak na vodík v poloze uhlíku C4' indukují uvolnění báze propenalu a tvorbu fosfoglykolátu, zatímco abstrakce vodíku v poloze uhlíku C5' vede k tvorbě 5'-aldehydu.

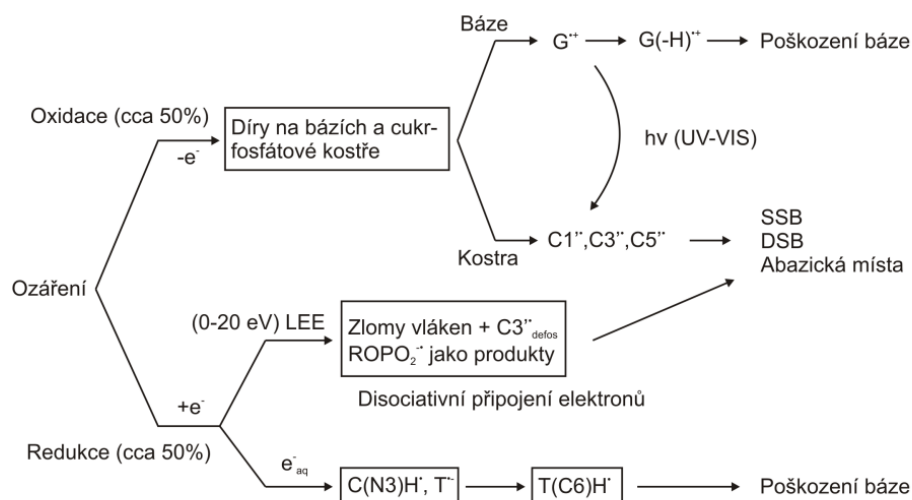


Obrázek 1.16: Schéma jednořetězcových zlomů DNA produkovaných po abstrakci vodíku iniciovaných reakcí s HO^\bullet radikálem [46].

Poznatky o mechanismu vzniku dvojných zlomů nejsou dosud ucelené. Tento druh zlomů může být vyvolán buď přímo, nebo nepřímo. V prvním případě dojde k DSB prostřednictvím přenosu radikálů mezi komplementárními vlákny DNA. Nepřímé účinky předpokládají nehomogenní depozici energie ve vodě tak, že se tvoří shluky radikálů. Každý DSB by pak byl výsledkem dvou blízkých SSB indukovaných dvěma samostatnými radikály z takového shluku HO^\bullet radikálů [47]. Zlomy jednoho řetězce (SSB) mohou představovat vážné poškození *in vivo*, nicméně za podmínek, kdy druhý řetězec zůstává zachován, může být poškození opraveno reparačními mechanismy relativně bezchybně. SSB tedy nejsou většinou letální. Radiačně indukovaná buněčná smrt je způsobena především dvojnými zlomy (DSB). Reparace tohoto typu zlomů je obtížná, neboť pro ni chybí templát (předloha). Mechanismy vzniku DSB jsou různé: (a) jeden zásah DNA vede k přímému vzniku DSB v komplementárních místech řetězce, (b) jeden zásah DNA může vést k tzv. kooperativnímu vzniku DSB v blízkých místech obou řetězců, (c) dva nezávislé zásahy komplementárních řetězců v místech vzdálených od sebe max. 10 bází. Při větší vzdálenosti udrží dvojšroubovici vcelku vodíkové i jiné vazby [48].

Tvorba zlomů v důsledku přímého účinku

Přímá ionizace DNA vytváří místa s lokální absencí elektronu (díra nebo radikálový kation) a místa elektronového přebytku (radikálový aniont). Tyto radikálové formy představují většinu poškození pozorovaných v DNA vlivem přímého účinku. Další část energie se deponuje ve formě excitací, které přinejmenším u záření s nízkým LET zřejmě nezpůsobují významné chemické poškození. Elektrony jsou obvykle zachyceny pyrimidinovými bázemi a výskyt děr bez ohledu na jejich počáteční umístění je lokalizován a zachycen guaninovými bázemi v důsledku procesu migrace náboje, produkující guaninový kation radikál Gua^{*+} . Tato forma je v reverzibilní rovnováze se svou deprotonovanou formou $\text{G}(\text{N}_1-\text{H})^*$. Guanin má nejnižší redoxní potenciál ze všech čtyř bází DNA, a proto nejčastěji podléhá oxidačnímu poškození [49]. Z experimentálních studií vyplývá, že hlavním faktorem, který ovlivňuje relativní výtěžky radikálů bází DNA, je rozdíl ionizačních potenciálů a elektronová afinita bází DNA. Kromě toho je výtěžnost radikálů ovlivněna druhem (vláknitostí = ssDNA či dsDNA) DNA. Přenos jak díry, tak přebytečného elektronu je snadnější přes naskládané báze v dsDNA (dvojřetězcová DNA) než v ssDNA (jednořetězcová DNA), kde je vrstvení bází narušeno [50]. Důležité reakční dráhy vyplývající z ionizace DNA jsou uvedeny na Obr. 1.17.



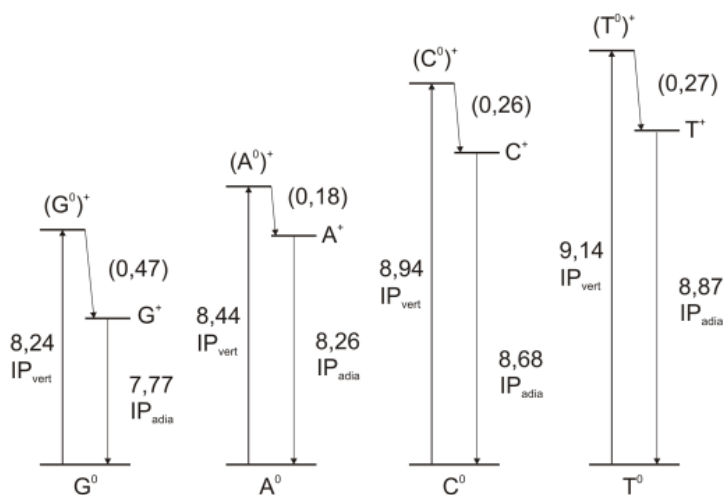
Obrázek 1.17: Reakční mechanismy oxidace a redukce vzhledem k ionizačnímu aktu molekuly DNA. Převzato z [51].

Předpoklad, že radikály bází DNA mohou abstrahovat atom vodíku z cukr-fosfátové kostry a vytvořit tak zlom v molekule, se ukázal být chybným. Současné teoretické práce [52] ukazují, že abstrakce vodíku z cukerné složky DNA radikály bází je ve většině případů termodynamicky nevýhodná. Je pravděpodobné, že zlomy vláken jsou z velké části způsobeny přímou ionizací cukr-fosfátové kostry, konkrétně ionizací a tvorbou cukerných radikálů [53]. V současné době jsou známy dva mechanismy tvorby poškození DNA v případě přímého účinku.

První typ je oxidační cesta: vlivem ionizačního aktu dojde k uvolnění elektronu a vzniku páru elektron-díra. V časovém horizontu kratší než 1 ns může pár rekombinovat za vzniku singletního excitovaného stavu molekuly DNA. V čase větší než 1 ns díra dále migruje po polynukleotidovém řetězci a stabilizuje se na bázích (z výše uvedené skutečnosti se jedná nejčastěji o bázi guanin) nebo na cukr-fosfátové kostře, kde tvoří radikály deoxyribózy s následujícím poškození báze, jednoduchého či dvojného zlomu, případně tvorby abazického místa. Druhý typ mechanismu představuje redukční cestu, jejíž principem je připojení (redukce) elektronu na molekulu DNA. Další reakce úzce závisí na energii redukujícího elektronu. V rozsahu energií (0 - 20 eV) se jedná o tzv. nízkoenergetický elektron a dochází zpravidla k tzv. disociativního záchytu elektronu (z angl. Dissociative Electron Attachment - DEA) a následně k produkci jednoduchého zlomu viz kap. 1.5. Mezi konkurující reakce k DEA řadíme redukci bází thyminu a cytosinu za vzniku jejich anion radikálů. V případě, je-li elektron hydratován, dochází zpravidla ke vzniku modifikace báze či cukr-fosfátové kostry [54].

1.4 Extrémní ultrafialové a měkké rentgenové záření

V oblasti mezi ionizujícím a neionizujícím zářením leží spektrální obor extrémního UV záření. Hodnota ionizačního potenciálu pro vznik ionizace makromolekuly DNA ve vakuu činí přibližně 9 eV (138 nm), jak znázorňuje Obr. 1.18. Přechod mezi energetickou excitací makromolekuly DNA a ionizací vnějších hladin při interakci fotonového záření s makromolekulou je pokryt energií VUV a XUV fotonů (VUV - daleké, XUV - extrémní fotony).



Obrázek 1.18: Experimentálně změřené vertikální a adiabatické ionizační potenciály pro jednotlivé nukleotidy. V závorce je uvedena jaderná relaxační energie, která tvoří dodatečnou bariéru pro přenos děr v DNA. Převzato z [55].

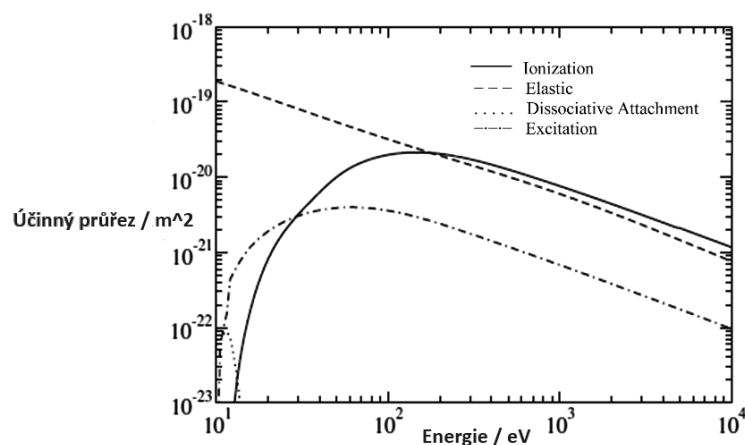
Pro fotony s většími vlnovými délkami (UVA, UVB až UVC) jsou charakteristická poškození DNA tzv. dimerizace a fotoprodukty (CPD, (6-4)PPs). S rostoucí energií fotonů jsou tato poškození nahrazena těmi produkty, které lze nalézt při ozařování rentgenovým, tedy ionizujícím zářením.

Mezi tato poškození patří typicky tvorba jednoduchých a dvojných zlomů dvojšroubovice DNA. Zásadní roli pro přechod mezi typem poškození hraje ionizační potenciál thyminu, neboť je součástí dimerových fotoproduktů, které tvoří majoritní část poškození DNA. Pokud je dosaženo ionizačního potenciálu thyminu (přibližně 9 eV), začnou převládat poškození a léze způsobená měkkým rentgenovým zářením, a tedy i zářením gama [56]. Například dle [57] při energii 6 eV je jeden z primárních dominantních UV fotoproduktů nahrazen produktem typickým pro ionizující záření. Cis-syn CPD a (6-4) fotoprodukty byly detekovány až do energie 8,3 eV, zatímco se zvyšováním energie do 10 eV byla pozorována produkce CPD (typu TT), zároveň však narostl výtěžek produktů typických pro ionizující záření: 5-hydroxymethyluracil (5-OHMeUra) a 5-formyluracil (5-formylUra). Fotony s energií převyšující 20 eV již výlučně tvoří stejný typ poškození jako ionizující záření [58]. Absorpční spektrum DNA ve VUV a XUV oblasti obsahuje maximum na 15,5 eV s přidruženými pásy, jako je známé absorpční maximum na 260 nm (4,8 eV). Ve spektru jsou též znatelné absorpční pásy odpovídající ionizacím vnitřních slupek stavebních konstituentů DNA [59]. Absorpční maxima mezi energiemi 4,8 a 6,5 eV korespondují s nízkoenergetickými přechody $\pi \rightarrow \pi^*$. Mezi 6,5 a 15,5 eV se nacházejí energetičtější přechody $\pi \rightarrow \pi^*$ stejně tak jako $\sigma \rightarrow \sigma^*$. Nárůst absorpce mezi 6,5 eV a 15,5 eV je dán především ionizacemi cukr-fosfátové kostry, k ionizacím bázím dochází při vyšších energiích [60].

1.5 Nízkoenergetické elektrony

Genotoxické účinky ionizujícího záření (β , ionty, rentgenové či γ) v živých systémech nejsou způsobeny primární interakcí těchto kvant vysokoenergetického záření s cílovými strukturami biomolekul. Příčinou výsledného účinku jsou sekundární reaktivní species, které jsou generovány v důsledku interakcí primárního ionizujícího záření v okolí ozařovaného objektu. Mezi tyto species řadíme radikály, ionty a sekundární elektrony. Z této skupiny jsou právě elektrony nejhojněji zastoupeným sekundárním produktem. Konkrétně mají největší zastoupení elektrony s energií v rozsahu 1-25 eV, tyto elektrony nazýváme tzv. nízkoenergetické elektrony (z angl. low-energy electrons - LEE) [61]. Vznikem a reakcemi sekundárních elektronů se zabývá např. práce [62].

Na Obr. 1.19 jsou v grafu znázorněny závislosti účinných průřezů pro daný děje na energii sekundárního elektronu.



Obrázek 1.19: Závislost účinných průřezů pro excitaci, ionizaci, pružný rozptyl, DEA na energii elektronů v kapalně vodě. Převzato a upraveno z [62].

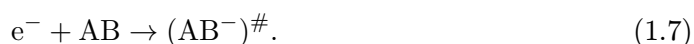
Z grafu jsou patrné čtyři možné reakční mechanismy interakce nízkoenergetických elektronů s hmotou. V případě nejnižších energií elektronů dochází k pružnému rozptylu, kdy se kinetická energie nemění v jiný druh energie:



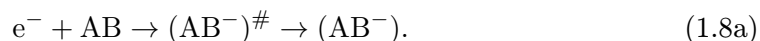
Dále dochází k nepružnému rozptylu, kdy nastává vibrační, rotační, či elektronická excitace molekuly:



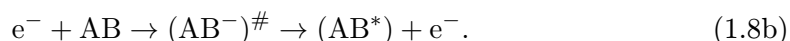
nebo k záchytu elektronu a vzniku přechodného záporného iontu:



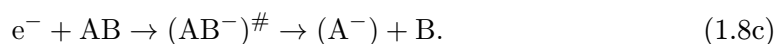
Tento komplex se může posléze stabilizovat za vzniku stabilního aniontu (tzv. associative attachment):



Druhý způsob je rozpad komplexu za odtržení elektronu (tzv. autodetachment):

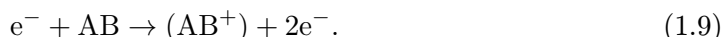


Třetí způsob může vést k rozpadu za vzniku fragmentů (tzv. dissociative electron attachment).

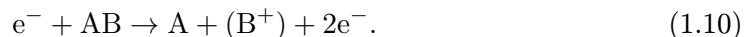


V případě vyšších energiích nastávají elektronové ionizace:

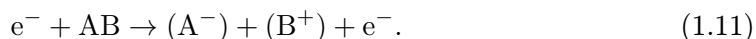
1. celé molekuly:



2. disociativní:



3. za tvorby iontového páru:



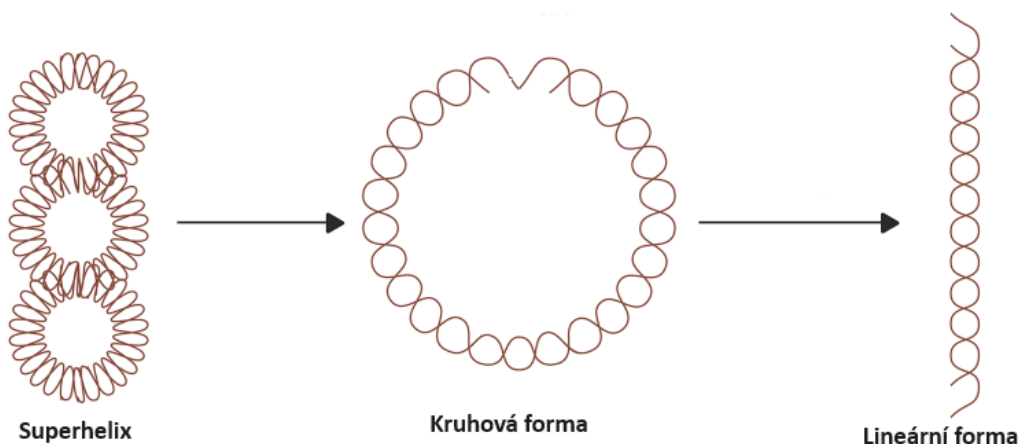
V této práci jsou mechanismy poškození vlivem nízkoenergetických elektronů klíčové, protože interakcí XUV záření s látkovým prostředím dochází účinkem fotoelektrického jevu k emisi fotoelektronu, který již sám o sobě je LEE s energií 26 eV (z kap. 1.4 je zřejmé, že ionizační potenciál DNA je přibližně 9 eV), a tvorbě sekundárních elektronů s kinetickými energiemi v rozmezí 1-100 eV. Práce Huelse a kol. [63] zabývající se interakcí nízkoenergetických elektronů (3-50 eV) s nukleovými kyselinami ukázaly, že i tyto elektrony mohou způsobit díky rezonančním procesům jednoduché a dvojně zlomy. Ukázalo se také, že nízkoenergetické elektrony mohou indukovat fragmentaci molekul vody, modifikovat a přeměnit cukry v cukr-fosfátové kostře a báze v DNA procesem disociativního zachytu elektronů (angl. Dissociative Electron Attachment - DEA) [64].

1.6 Účinek záření na plazmidovou DNA

Plazmidy získané při extrakci z bakterií mají stočenou (z angl. supercoiled, superhelix) formu díky enzymu DNA gyráza. V ideálním případě by této formy měly nabývat všechny neozářené plazmidy ve vzorku. Po ozařovacím procesu stočené plazmidové DNA dochází při vzniku jednoduchého zlomu k její relaxaci (ztráta nadšroubovicového vinutí). Takto vzniknuvší molekula je cyklická a má kruhový tvar. V případě, kdy na takto poškozené molekulární strukturu vznikne další doplňkový jednoduchý zlom, tak nedochází ke změně topologické formy.

Výjimkou je případ, kdy tento doplňkový zlom vznikne na druhém řetězci v blízkosti místa, kde již jednoduchý zlom existuje. Tato skutečnost vede ke vzniku dvojného zlomu. Při produkci dvojného zlomu se tvar plazmidové DNA změní z formy stočené (případně relaxované) na formu lineární. Dochází tím tedy ke ztrátě nadšroubovicového vinutí DNA i kruhového tvaru. Tato forma se působením dalších přímých zlomů již nemění, neboť vlivem doplňkového dvojného zlomu dochází pouze k rozdělení na dvě kratší lineární molekuly (fragments).

Na Obr. 1.20 je znázorněno schéma různých konformací plazmidové DNA.



Obrázek 1.20: Schéma různých konformací plazmidové DNA. Převzato a upraveno z [65].

Bylo vyvinuto několik matematických modelů pro výpočet pravděpodobnosti vzniku SSB a DSB v závislosti na dávce. Často používaný model byl navržen Cowanem a kol. [66]. Tento model byl primárně vyvinut k popisu přechodu mezi konformacemi plazmidů během ošetření opravnými enzymy, což odpovídá dynamice procesu po ozáření dávkou (D). Plná verze modelu je obtížně realizovatelná kvůli své složitosti a její použití je minimální.

Z Obr. 1.20 různých konformací plazmidové DNA lze odvodit schéma a sestavit soustavu diferenciálních rovnic kvantitativně popisujících změny plazmidové DNA v závislosti na fluenci fotonů, či dávce. McMahon a Currel navrhli v [67] robustní model schopný tyto změny hodnověrně popsat. Do tohoto modelu zavádí parametr ρ , který představuje tvorbu DSB ze dvou přidružených SSB, *SSB. Soustava bude mít následující tvar:

$$\frac{dS(D)}{dD} = -(\beta_S + \beta_D)S(D), \quad (1.12a)$$

$$\frac{dC(D)}{dD} = \beta_S S(D) - \beta_D C(D) - \rho \beta_S^2 D (S(D) + C(D)), \quad (1.12b)$$

$$\frac{dL(D)}{dD} = \beta_D \cdot (S(D) + C(D)) + \rho \beta_S^2 D (S(D) + C(D)), \quad (1.12c)$$

kde β_S a β_D jsou koeficienty představující pravděpodobnost vzniku SSB, respektive DSB vyjádřených v jednotkách $\text{Gy}^{-1} \text{plazmid}^{-1}$. Parametr ρ lze získat z relace (10/ l), kde číslo 10 značí počet párů bází, v jehož rozmezí lze dva jednoduché zlomy brát jako zlom dvojný a l je celková délka plazmidu.

Ve výpočtech se pracuje s dvojnásobkem jeho délky, neboť se jedná o plazmidovou DNA obsahující dva řetězce (strands) bází. Integrovanou formu výše uvedených diferenciálních rovnic je následující:

$$S(D) = S_0 e^{-(\beta_S + \beta_D)D}, \quad (1.13a)$$

$$C(D) = e^{-\beta_D D} \left[C_0 e^{-\frac{1}{2}\beta_S^2 \rho D^2} + S_0 \left(e^{-\frac{1}{2}\beta_S^2 \rho D^2} - e^{-\beta_S D} \right) \right] \quad (1.13b)$$

$$L(D) = 1 - (C_0 + S_0) e^{-(\beta_D D + \frac{1}{2}\beta_S^2 \rho D^2)}, \quad (1.13c)$$

kde hodnoty S_0 , C_0 jsou výchozí četnosti superhelikální a kruhové formy. Výchozí hodnota četnosti L_0 je v dána hodnotou ve výrazu:

$$L(0) = 1 - (C_0 + S_0) \quad (1.14)$$

Při zanedbání fragmentovaných forem plazmidu lze psát podmínku, kdy:

$$S(D) + C(D) + L(D) = 1 \quad (1.15)$$

Analytické vyjádření vztahů 1.13a - 1.13c slouží k získání parametrů pravděpodobnosti vzniku jednoduchých a dvojných zlomů, pokud jsou těmito funkcemi proložena naměřená data pro $S(D)$, $C(D)$ a $L(D)$.

Na závěr je nutné uvést tu skutečnost, že předešlé analytické vztahy v sobě nezahrnují problematiku velmi silné absorpce XUV záření v prostředí. Tento jev se charakterizuje tzv. atenuační délkou záření vyjadřující pokles fluence v materiálu na hodnotu $1/e$, tedy asi na 37 %. V případě, že ozařovaný vzorek tvoří několik vrstev, je tloušťka vzorku mnohem větší, než je atenuační délka fotonů s danou energií. Je tedy účelné do analytických vztahů tento faktor zahrnout. Diferenciální rovnice zahrnující tento faktor mají totožný tvar jako předchozí analytická vyjádření 1.13a - 1.13c, s tím rozdílem, že člen popisující změnu superhelikální formy s dávkou $S(D)$, bude v části, obsahující pouze koeficienty β_S a β_D nahrazen parametrem $S_{sat}(D)$ zahrnujícím saturační faktor f v následujícím tvaru:

$$S_{sat}(D) = S(D) - S_0 f, \quad (1.16)$$

kde S_0 je výchozí frakce superhelikální formy.

Soustava rovnic v integrálním tvaru pak bude:

$$S(D) = S_0(1 - f)e^{-(\beta_S + \beta_D)D} + S_0f, \quad (1.17a)$$

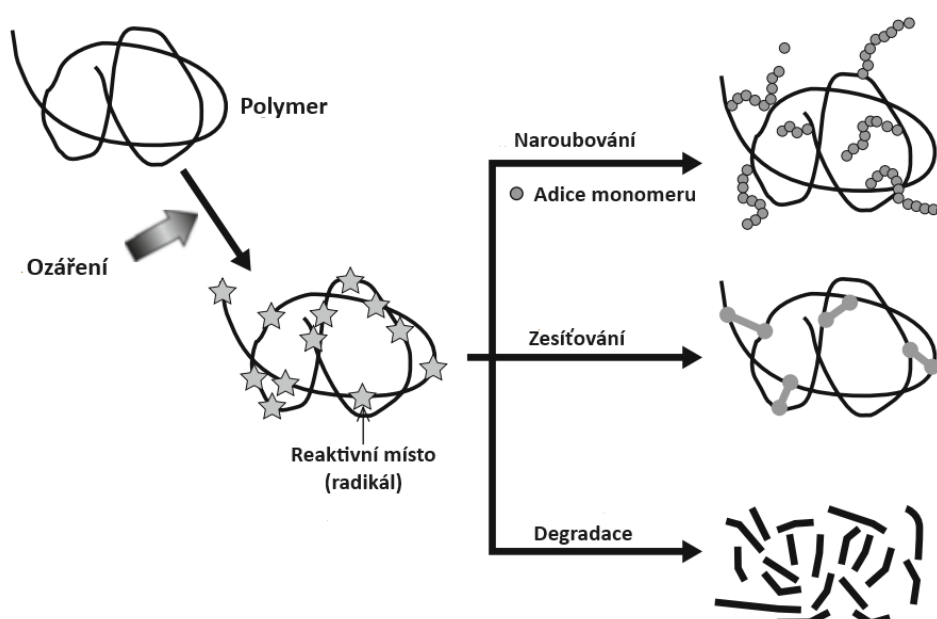
$$C(D) = (C_0 + S_0)(1 - f)e^{-\left(\frac{1}{2}\beta_S^2\rho D^2 + \beta_D D\right)} - S_0(1 - f)e^{-(\beta_S + \beta_D)D} + C_0f \quad (1.17b)$$

$$L(D) = (C_0 + S_0)(1 - f) \left[1 - e^{-\left(\frac{1}{2}\beta_S^2\rho D^2 + \beta_S D\right)} \right] + L_0, \quad (1.17c)$$

Implementace robustního modelu pro soustavu diferenciálních rovnic kvantitativně popisujících změny plazmidové DNA v závislosti na fluenci fotonů byla provedena pomocí programovacího jazyku Python.

1.7 Účinek záření na polymery

Při interakci polymerů s ionizujícím zářením dochází k radiačně chemickým procesům, které lze principiálně rozdělit na tři případy. V prvním případě dojde k vytvoření prostorové sítě polymeru (síťování) - jedná se o způsob interakce, kdy dochází k abstrakci atomů nebo skupiny atomů při zachování základního řetězce a následné reakci se sousedními řetězci stejných základních polymerních molekul. V druhém případě dochází k degradaci polymeru, kdy v důsledku ozáření dochází k přetržení vazby na základním polymerním řetězci. Třetí případ nastává tehdy, když reaktivní místo ozářeného polymeru zreaguje s jinou složkou - tzv. dochází k jejímu naroubování na základní polymer [68]. Jednotlivé typy procesů jsou znázorněny na Obr. 1.21.



Obrázek 1.21: Schéma jednotlivých typů procesů při ozáření. Převzato a upraveno z [69].

V případě síťování (z angl. cross-linking) v místě odtržení většinou zůstávají nepárové elektrony, které jsou zodpovědné za následné reakce s okolními molekulami ozařovaného polymeru. Tímto způsobem dochází k tvorbě příčných vazeb mezi molekulami vedoucích ke vzniku třírozměrné prostorové sítě. Při degradaci naopak dochází v důsledku ozáření k rozštěpení (z angl. chain scission) určité vazby v základním řetězci. V důsledku tohoto procesu se zmenšuje průměrná délka řetězce polymeru a jeho molekulová hmotnost. U síťovaného polymeru bude naopak molekulová hmotnost vyšší. Cesta ozařovacího procesu závisí především na charakteru ozařovaného polymeru, ale také na způsobu a podmínkách ozařování.

1.8 Teplotní závislosti

Motivace pro výzkum a současný stav problematiky

Tato diplomová práce si klade za cíl experimentálně studovat vliv teploty během ozařování biomolekulárních soustav za účelem porozumění změny mechanismu a výtěžku radiačně chemických a radiobiologických reakcí.

Autoři dosud publikovaných prací (např. [70]) se shodují v názoru, že primární interakce záření s hmotou bývá změnou teploty ovlivněna jen málo, nebo vůbec. Důvod tohoto jevu je evidentní. Energie a rychlosti spojené s tepelným pohybem v molekulární soustavě jsou ve srovnání s energiemi a rychlostmi energetických fotonů nebo rychlých nabitých částic zanedbatelně malé. Za teplotní závislosti výtěžků a mechanismů radiačně chemických reakcí a radiobiologických procesů jsou tedy zodpovědné spíše sekundární děje následující až po prvotních interakčních procesech. Prvotní závěry z výzkumů teplotních závislostí uvažují mechanismus, kdy deponovaná energie při primárním ionizačním aktu je distribuována ve velmi krátkém časovém intervalu v cílové molekule a je superponována na již přítomnou tepelnou energii. V časovém průběhu mohou statistické fluktuace v rovnovážném rozložení energie vést k lokálnímu oblastem molekuly, které nashromáždily dostatek energie k předběžné abstrakci atomu vodíku. Pravděpodobnost, že fluktuace způsobí podmínky energeticky příznivé pro emisi atomů vodíku, by pak z nezanedbatelné části závisely na množství tepelné energie ve vzorku již přítomné [71].

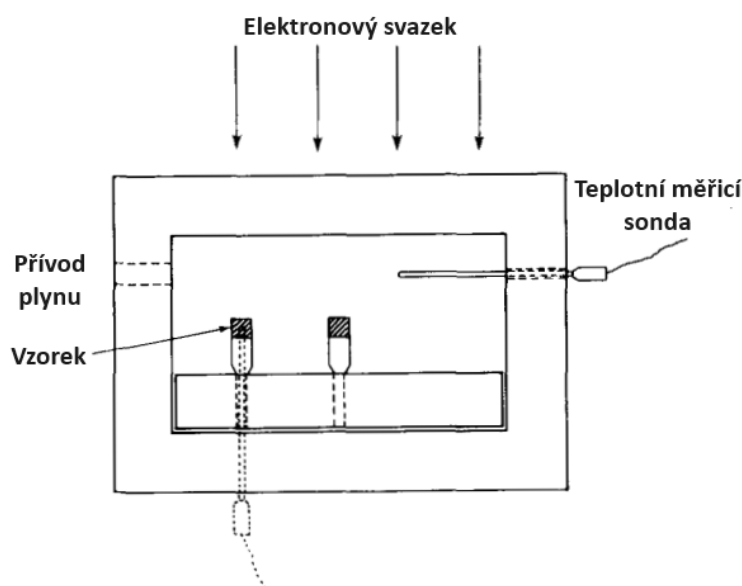
Principy mechanismů v závěrech, ke kterým autoři ve svých pracích docházejí, jsou často nejednoznačné a někdy až protichůdné. Výzkumu těchto závislostí, zejména u biologických systémů, je v současné době věnována jen malá pozornost.

1.8.1 Vliv teploty na radiační citlivost enzymů

Vliv teploty na aktivitu enzymů byl pozorován v práci Kempnera a Haiglera [3]. Z výsledků jejich experimentů plyne, že při vystavení enzymů ionizujícímu záření při nízkých teplotách, dochází k progresivnímu poklesu radiační citlivosti. To znamená, že při obdržení stejné dávky záření zůstává podstatně více enzymatické aktivity při nízké teplotě ve srovnání s teplotou pokojovou.

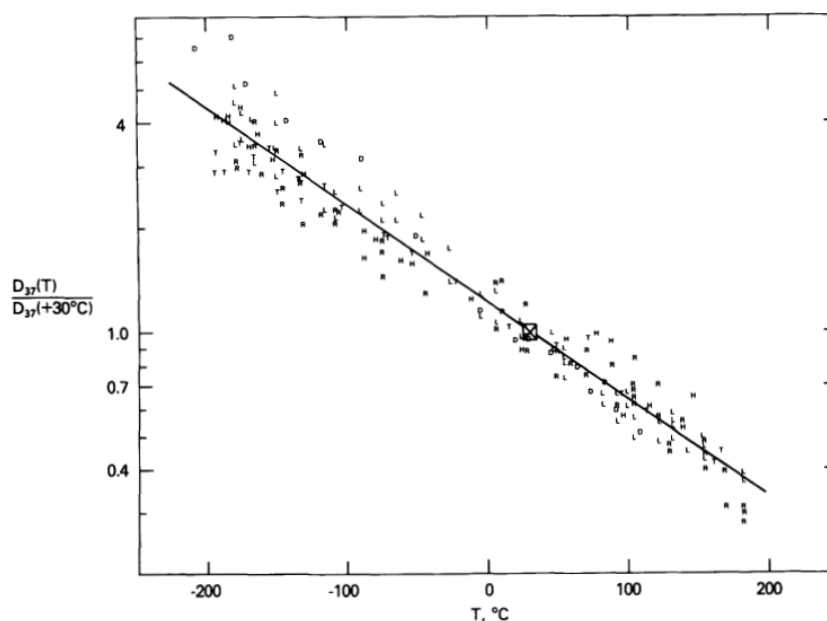
Při experimentu bylo studováno 25 různých enzymů pro nalezení vztahu mezi radiační stabilitou a teplotou během expozice. Zvláštní důraz byl kladen na redoxní enzym zvaný malátdehydrogenáza, u něhož se předpokládala nezávislost radiační citlivosti na teplotě. Teplota, při které jsou vzorky ozařovány, může být často obtížně stanovitelná. Například, ačkoliv ozařovací komora může být udržována na konstantní teplotě, vzorky mohou být ochlazeny na nižší teplotu např. těsným kontaktem s chladnějším povrchem, ať již v důsledku nerovnoměrného chladicího mechanismu nebo zahřívání v důsledku absorpce ionizujícího záření. Ve starších publikacích [72, 73] byly vzorky chlazeny tak, že byly deponovány na hliníkové destičky, které byly následně umístěny na kostky suchého ledu nebo velké kovové bloky udržované na požadované teplotě. Pro zlepšení kontaktu (tepelné vodivosti) mezi držákem vzorku a blokem bylo často použito vazelíny, oleje či jiného materiálu. V této studii [3] byla teplota v objemu měřena a termostaticky řízena teplotně citlivou sondou drženou v plynné dusíkové fázi bezprostředně před vzorky. Sonda zavedená přes zadní stěnu komory byla umístěna ve zmrzlém vzorku uvnitř skleněné lahvičky. Bylo zjištěno, že teplota vzorku je stejná jako teplota stanovená v plynné fázi, tedy $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Změna teploty vzorku v důsledku absorpce ionizujícího záření během expozice byla přibližně stanovena na hodnotu $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Schéma ozařovací komory v experimentu je uvedeno na Obr. 1.22.



Obrázek 1.22: Příčný řez ozařovací komorou se vzorky v tenkostěnných skleněných kyvetách. Převzato a upraveno z [3].

Byly provedeny série ozařovacích experimentů při různých teplotách a u každého enzymu byla stanovena dávka D_{37} (jedná se o dávku záření, která zredukuje enzymatickou aktivitu na 37 % ($1/e$) výchozí hodnoty. Výsledky těchto studií jsou uvedeny na Obr. 1.23, kde jsou vyneseny relativní hodnoty $D_{37}(T)/D_{37}(30\text{ °C})$ jako funkce teploty. Ze souboru získaných dat pro všech 25 enzymů byl vyvozen závěr, že inaktivace enzymů je silně závislá na teplotě během ozařovacího procesu.



Obrázek 1.23: Graf znázorňující změnu radiační citlivosti enzymů s teplotou. Pro každý enzym byly hodnoty D_{37} normalizovány na hodnotu uváděnou při 30 °C. Převzato z [3].

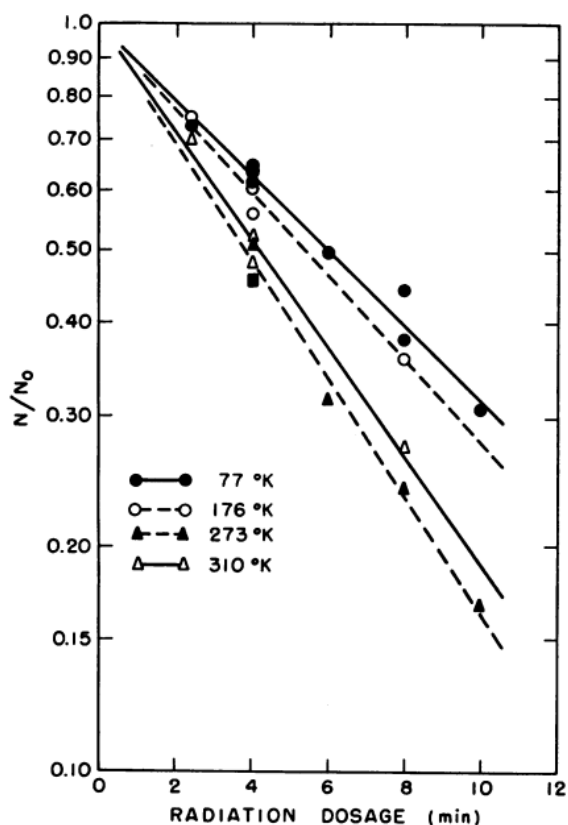
1.8.2 Vliv teploty na radiační citlivost virů

V poslední dekádě se v základním radiobiologickém výzkumu věnuje značná část pozornosti virům jako modelovým objektům. Bioradiační chemie a radiobiologie našly na tomto poli dobré uplatnění, protože pomocí záření může blíže vysvětlit některé základní vlastnosti virů, jejich strukturu, velikost aj.

V práci autorů Bachofera a kol. [74] byl studován vliv teploty během ozařování pomocí rtg. záření na přežití T-bakteriofága. Suspenze vzorků T-fágů byly vysušeny v hliníkových kyvetách, ozářeny ve vakuu při kontrolovaných teplotách a frakce přežití testována na buněčné kolonii *E. coli*. Součástí ozařovacího zařízení s komerčním názvem Picker machine byla 50 kV. rentgenová trubice. K hlavě trubice byla připevněna komora ve tvaru koblihy tzv. „donut“ o průměru 20 mm. Na jednom konci otvoru bylo berylliové okénko a na druhém konci nádobka na vzorek. Ozařované vzorky byly umístěny ve vzdálenosti 10 cm od terče rentgenové trubice. Evakuace komory byla prováděna přes boční rameno připojené k otvoru a monitorována manometrem. Během expozičního intervalu byl tlak udržován na méně než 0,1 mm rtuťového sloupce (13,33 Pa).

Teplota na dně kelímku byla monitorována pomocí termočlánku umístěného na jeho vnějším povrchu, zatímco celá vzorková miska byla ponořena do vhodného izotermického média v Dewarově nádobě. Použitá izotermická média byla kapalný dusík (77 K), pevný oxid uhličitý-aceton (176-182 K), ledová voda (273 K). Po ozáření byly fágové částice resuspendovány v pufru, naředěny a pomocí plakové metody byl stanoven počet přeživších virových částic.

Z naměřených hodnot přežití fágů pro jednotlivé teploty byly vytvořeny inaktivační křivky, které jsou zobrazeny na Obr. 1.24.



Obrázek 1.24: Křivky přežití T-bakteriofága při různých teplotách. Převzato z [74].

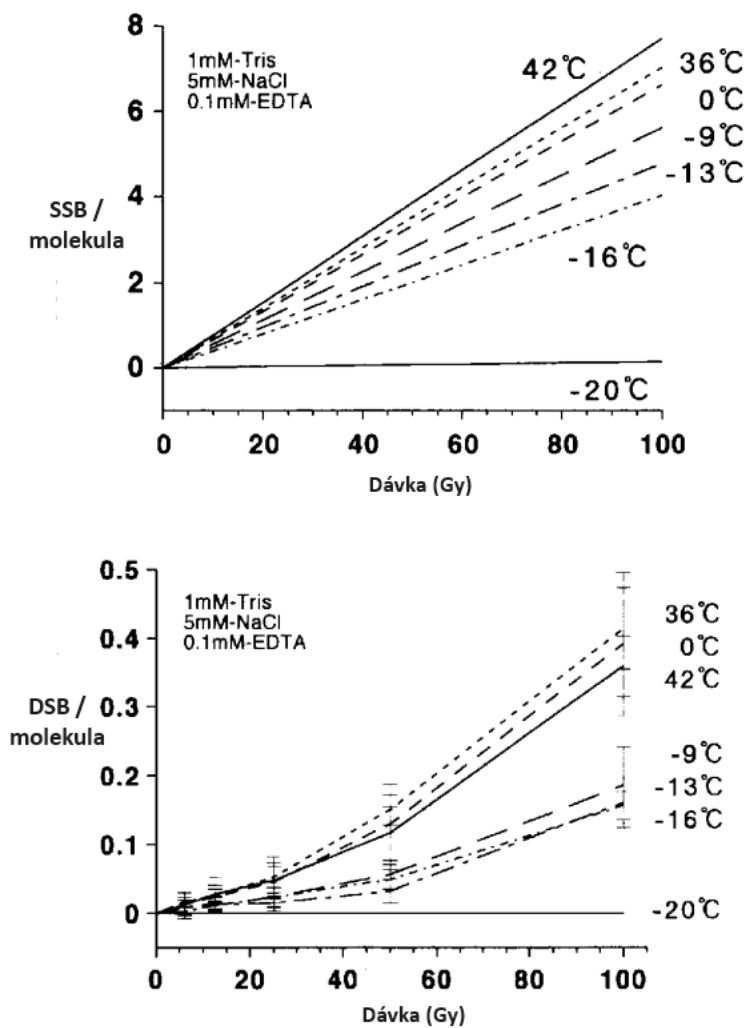
1.8.3 Vliv teploty na radiální citlivost plazmidů

V práci autorů Tomita a kol. [75] byl studován vliv teploty na produkci zlomů při ozáření vodního roztoku plazmidové DNA. K účelům ozáření byla použita plazmidová DNA pBR322 (4361 párů bází), která byla skladována a ozářována v TE (Tris/EDTA) pufru. Roztoky plazmidové DNA o koncentraci $29,75 \mu\text{g ml}^{-1}$ byly ozářeny pomocí ^{60}Co aerobně v 500 μl polypropylenových zkumavkách ponořených do ledové lázně při nižších teplotách (-20, -16, -13, -9, -3 a 0 °C) nebo teplé lázni při vyšších teplotách (20, 25, 36 a 42 °C) v přítomnosti vychytávače HO^{\bullet} radikálů (Tris, EDTA). Teplota lázně byla měřena termočlánkem před i po ozáření. Kvantifikace jednoduchých a dvojných zlomů byla provedena po ozáření pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Množství jednoduchých (SSB) a dvojných (DSB) přímých zlomů vztažených na jeden plazmid, lze získat dle následujících vztahů:

$$x = \ln [(1 - L)/S] \quad (1.18)$$

$$y = L/(1 - L) \quad (1.19)$$



Obrázek 1.25: Účinky teploty na relativní výtěžky SSB a DSB indukované gama zářením ^{60}Co ve zředěném vodním roztoku. Převzato a upraveno z [75].

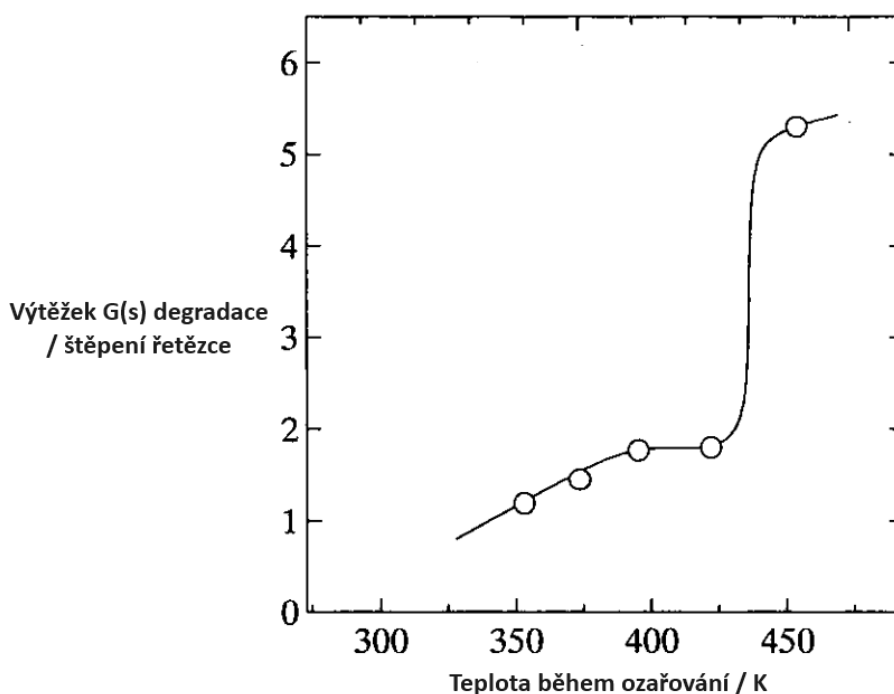
V těchto vztazích se vychází z procentuálního zastoupení jednotlivých forem plazmidové DNA. Vztah 1.18 je určen pro výpočet průměrného počtu SSB na jeden plazmid a vztah 1.19 pak průměrnému počtu DSB opět vztažený na jeden plazmid. Neznámá hodnota S udává procentuální zastoupení detekovaných molekul stočené formy plazmidu (tedy nepoškozené frakce DNA) a L je zastoupení lineárních forem plazmidu.

1.8.4 Vliv teploty na radiační citlivost polymerů

Změna radiační citlivosti v závislosti na teplotě je kvantitativně stejná pro biologické makromolekuly i syntetické polymery. Opět lze říci, že mechanismy tohoto účinku jsou způsobeny sekundárními procesy, které probíhají po primární ionizaci a jsou spojeny s přítomností volných radikálů [76].

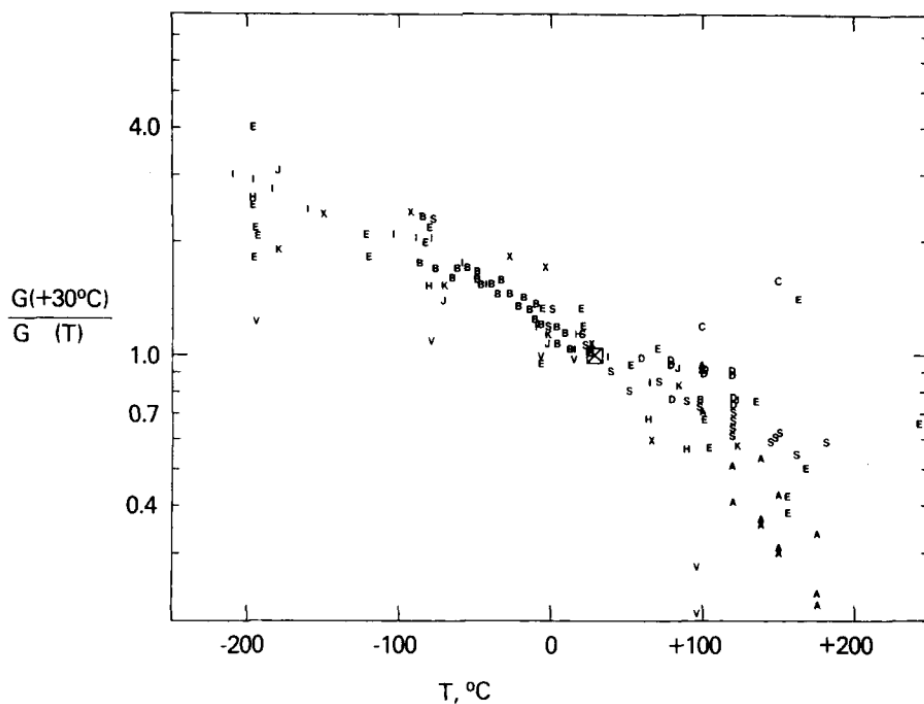
Účinek záření na polymery významně souvisí s chemickou a fyzikální strukturou polymerů. Chemická struktura představuje konstituci (typ a uspořádání strukturních jednotek), dále konfiguraci a konformaci makromolekul. Chemická struktura tedy předurčuje realizaci vzájemného uspořádání jednotlivých makromolekul - fyzikální strukturu polymerů. Konfigurace definuje vzájemné prostorové uspořádání atomů a substituentů v makromolekulách. Z chemického pohledu je toto uspořádání trvalé a nelze jej změnit bez přerušení chemické vazby. Konformace na druhou stranu odpovídá jednomu z možných prostorových uspořádání atomů, nebo skupin atomů, které se může změnit v důsledku rotace atomů kolem jednoduchých vazeb, při zachování valenčních úhlů. Konformace je tedy jev teplotně závislý [77]. Je nutné podotknout, že radiační efekty závisí také na morfologickém stavu daného polymeru, jestli je ve stavu krystalickém, amorfním nebo plastickém, dále na hodnotě skelného přechodu.

Tabata a Oshima [78] studovali radiační citlivost na teplotě u polypropylénu. Zdrojem ionizujícího záření byl kobaltový zářič ^{60}Co . V jejich práci sledovali závislost výtěžku degradace polymeru, který v tomto případě představoval štěpení vazeb v základním řetězci v závislosti na teplotě. Graf této závislosti lze vidět na Obr. 1.26.



Obrázek 1.26: Vliv teploty na štěpení řetězce izotaktického polypropylénu. Ozařování bylo provedeno gama zářením ze zdroje ^{60}Co ve vakuu. Převzato a upraveno z [78].

Mezi další referativní články patří práce Kempnera a kol. [79], kteří v dané době shrnuli dosavadní výsledky závislosti radiační citlivosti různých druhů polymerů na teplotě. Linearita a směrnice těchto výtěžků různých radiačně chemických procesů o polymerech se překvapivě podobají údajům získaných z enzymové analýzy. Graf je znázorněn na Obr. 1.27.



Obrázek 1.27: Změna relativní radiační citlivosti s teplotou prostředí během ozařování. (J) ztráta dvojné vazby v polybutadienu, (K) crosslinking polybutadienu, (I) degradace polybutadienu, (H) degradace polyisobutylenu, (S) degradace poly(methymetakrylátu), (E) crosslinking v polyethyleny, (V) crosslinking v poly(vinylchloridu), (X) uvolnění molekuly HCl z poly(vinylchloridu), (B) bělení modrého celofánu, (G) crosslinking a degradace v polyethyleny [79].

2. Experimentální část

Za účelem nalezení vlivu teploty na chemické účinky ionizujícího záření u biologických soustav byly provedeny experimenty, ve kterých: (a) bylo prostudováno radiační poškození plazmidové DNA při různých teplotách již ověřenou metodikou, (b) byla vyvinuta a implementována metodika a instrumentace pro sledování teplotních závislostí radiačního poškození mikroorganismů, (c) byly proměřeny křivky přežití nebo inaktivační křivky vybraného mikroorganismu vhodného pro studium radiačního poškození za různých teplot.

2.1 Model DNA a RNA

V první fázi byla jako molekulární struktura použita komerčně připravená plazmidová DNA (New England Biolabs). Konkrétně se jednalo o plazmid pBR322 (4361 bp). Výrobce udávaná koncentrace činí $1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Pro přípravu vzorků určených k ozařování byl naředěn zásobní roztok na pracovní koncentraci $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a ověřen spektrofotometrickým měřením absorbance. Ve druhé fázi byl pro účely výzkumu použit bakteriální virus (fág). Konkrétní kmen bakteriofága (T4) a jeho příslušná hostitelská kultura byly poskytnuty Biologickým centrem AV ČR v Českých Budějovicích. V poslední části byly provedeny experimenty s izolací celkové RNA z rostlinných částí a pokus o izolaci RNA rostlinného viru ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus). Vzorky o objemu $1 \mu\text{l}$ byly vždy deponovány na podložné diamantové (CVD) sklíčko o rozměrech $4,4 \times 4,4 \text{ mm}$. Sklíčka se vzorky byla ponechána k odpaření vody po dobu 1 hodiny.

2.1.1 Spektrofotometrické stanovení nukleových kyselin

Mezi primárně používané techniky pro stanovení čistoty a koncentrace nukleových kyselin patří spektrofotometrické stanovení v ultrafialové (UV) oblasti spektra. Za absorpci v oblasti UV jsou zodpovědné heterocykly bází nukleových kyselin s maximem v okolí vlnové délky 260 nm . Koncentraci nukleových kyselin lze vypočítat dle empirického vztahu, kdy u nativní dvojřetězcové (ds) DNA jednotková absorbance při 260 nm odpovídá koncentraci $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Tato hodnota je závislá na chemickém složení (zastoupení AT a GC párů bází) analyzované DNA, u denaturované (jednořetězcové) DNA je absorbance přibližně o 40 % vyšší než dvojřetězcové molekuly a RNA, která absorbuje ve stejném rozsahu vlnových délek odpovídá koncentraci $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ [80].

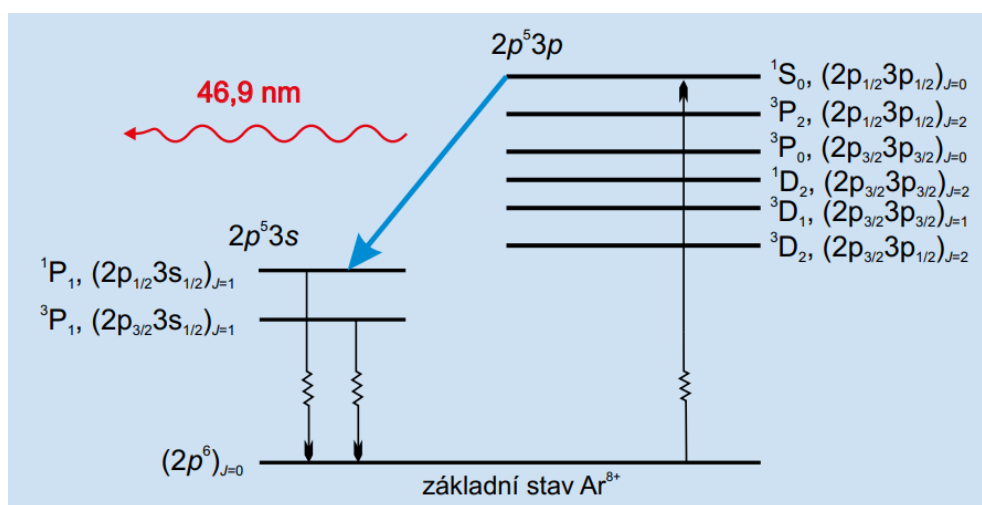
Měřítka stupně čistoty nukleové kyseliny je možné stanovit na základě poměru absorbance při 260 a 280 nm . Tento poměr $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ udává míru kontaminace izolované nukleové kyseliny proteiny a RNA. A dále poměr $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ udává míru znečištění nukleové kyseliny nízkomolekulárními látkami - např. EDTA [81].

2.2 Experimentální zdroj ionizujícího záření

V rámci experimentální části práce bylo pro účely ozařování plazmidové DNA a fágů extrémním ultrafialovým zářením (XUV) zvoleno laserové zařízení, které generuje koherentní záření s vlnovou délkou 46,9 nm (tj. s energií fotonů 26,4 eV). První prototyp tohoto zařízení byl zkonstruován na Coloradské státní univerzitě pro potřeby katedry chemie pod vedením J.J. Roccy a jeho spolupracovníků [82].

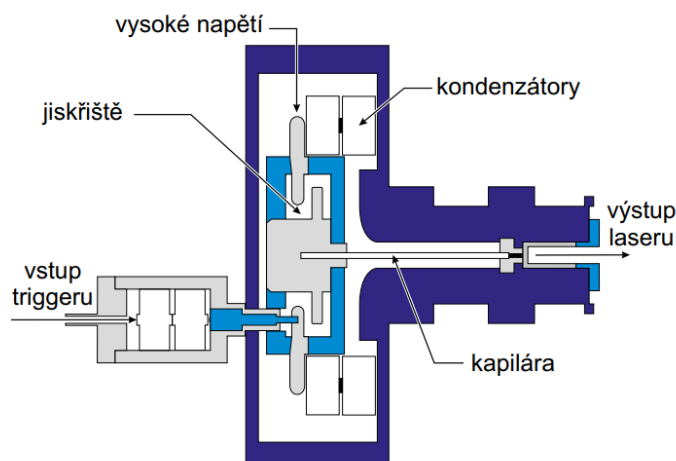
Základním principem generování koherentního záření v tomto zařízení je výboj v úzké dlouhé kapiláře naplněné argonem, kde díky průchodu elektrického proudu dochází k nárůstu populace neonu podobných iontů argonu (Ar^{8+}). Rozdělení náboje ionizovaných atomů v plazmatu je popsáno Sáhovým rozdělením. Jedná se o rozdělení popisující poměrné zastoupení iontů různé násobnosti v plazmatu. Díky vhodné úpravě parametrů, jako je délka kapiláry, tlak argonu, elektrický proud, tvar vysokonapěťového impulsu a jeho načasování, lze nastavit takové optimální podmínky, že lze očekávat nejvyšší pravděpodobnost výskytu právě neonu podobných argonových iontů. Elektrický proud tekoucí podél osy kapiláry vytváří v plazmatu vlastní silné magnetické pole, které v důsledku působení Lorentzovy síly směřuje a urychluje nabitě částice směrem k ose kapiláry.

Tento jev se nazývá magnetický pinč (z angl. pinch = stisk). Plazma se tedy pomocí proudu smršťuje směrem k ose kapiláry, což vede k nárůstu hustoty a teploty elektronů a iontů. Poměr délky kapiláry ku průměru stlačeného sloupce dosahuje hodnot až 10^3 . Vysoká hustota a teplota elektronů zapříčiní, že dochází vlivem kolizní excitace k čerpání neonu podobných iontů argonu na horní laserovou hladinu $^1S_0(2p_{1/2}3p_{1/2})_{J=0}$ a její následné deexcitaci na dolní hladinu $^1P_1(2p_{1/2}3s_{1/2})_{J=1}$ za emise fotonu s vlnovou délkou 46,9 nm. Dolní laserová hladina okamžitě relaxuje do základního stavu osmkrát ionizovaného argonu [83]. Schéma laserového čerpání a deexcitace je zobrazeno Grotrianovým diagramem na Obr. 2.1.



Obrázek 2.1: Grotrianův diagram energetických hladin iontů Ar^{8+} . Převzato z [84].

Na Obr. 2.2 je schéma laserové hlavy zařízení. Kanál kapiláry je zhotoven z oxidu hlinitého (korundu) a je naplněn argonem na tlak 48 Pa. Plyn je předionizován impulzem o nízkém proudu a následně zahřát pomocí rychlého vysokonapěťového impulsu vytvořeným vybitím soustavy keramických kondenzátorů s nízkou indukčností. Kondenzátory jsou vybíjeny přes jiskřiště k tvorbě proudového pulzu s amplitudou přibližně 21 kA. Jiskřišťový spínač je naplněn syntetickým vzduchem k modulaci průrazného napětí. Průchod proudu kapilárou je monitorován souose umístěnou Rogowského cívkou. Celý prostor laserové hlavy je naplněn olejem, který je cirkulován oběhovým čerpadlem. Funkce oleje je dvojitá: slouží jako dielektrikum a zároveň poskytuje účinné chlazení elektrickým komponentám zařízení. Maximum elektronové hustoty je při procesu výboje dosaženo v ose plazmového sloupce s konvexním profilem klesající elektronové hustoty směrem ke stěnám kapiláry. Laserový svazek je vyveden pomocí katody do prostoru spojeného s vakuovou komorou, kde dochází k následným interakcím se vzorkem. Vakuová komora je vyčerpána na tlak 5×10^{-3} Pa. Na Obr. 2.3 je pak celkový pohled na instalované zařízení.

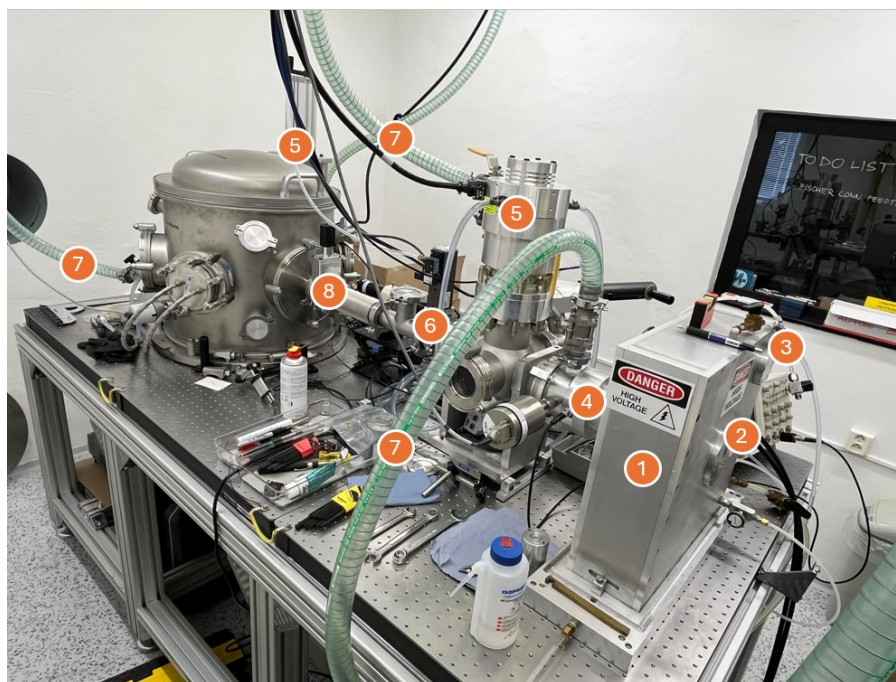


Obrázek 2.2: Schéma stolního repetičního XUV laseru využívajícího kapilární výboj v argonu jako aktivního prostředí. Převzato z [84].

2.2.1 Charakterizace laserového svazku

Mezi charakteristické znaky XUV záření se řadí jeho silná absorpce téměř v jakémkoliv materiálu, a proto je nezbytné veškeré výzkumné úkony a laboratorní experimenty provádět za sníženého tlaku, zde ~ 1 mPa. K detekci záření o vlnové délce 46,9 nm byla využita kamera Pixelink PL-A74IBL, na jejíž CMOS čip byla nadeponována 5 μm vrstva keramického scintilátoru P43 $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S:Tb}$. Takto upravený systém kamery umožňoval detekci a zaměření laserového svazku pro experimentální měření.

Vstup interakční komory byl opatřen záměrným křížem zhotoveným z tenkého drátu, který sloužil jako referenční bod při rovnání směru laserového svazku. Pomocí referenčního He-Ne laseru byl na protilehlé straně interakční komory nalezen bod, v němž je umístěn vržený stín záměrného kříže spolu s rozptýleným světlem.



Obrázek 2.3: Celkový pohled na instalované zařízení stolního kapilárního laseru: 1 - laserová hlava, 2 - přívod vysokého napětí, 3 - přívod oleje, 4 - umístění kapiláry a katoda, 5 - turbomolekulární vývěva, 6 - bezpečnostní elektromagnetický ventil, 7 - vakuové rozvody, 8 - ventil oddělování interakční komory.

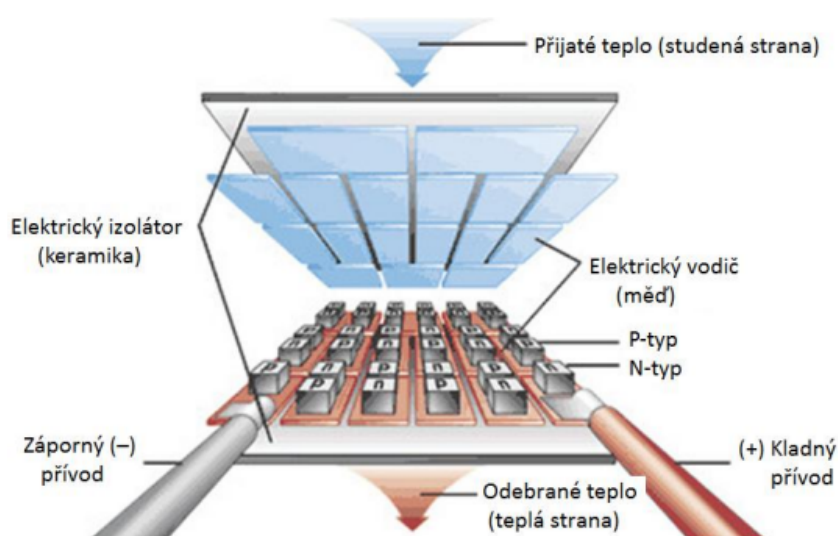
Do tohoto svazku laseru pak byla do interakční komory v určité vzdálenosti od výstupní apertury umístěna kamera na motorizovaném x-y-z posuvném stolku. Obraz příčného elektromagnetického profilu byl nasnímán a poloha interakční komory následně upravena takovým způsobem, aby spojnice středu kříže a středu nasnímaného profilu ležela v ose svazku.

Elektromagnetický profil souvisí s maximální elektronovou hustotou, která je při výboji dosažena v ose plazmového sloupce s konvexním profilem klesající elektronové hustoty směrem ke stěnám kapiláry. Takto vzniklá radiální distribuce indexu lomu představuje následný specifický příčný elektromagnetický profil TEM (z angl. Transverse Electromagnetic Mode) laserového svazku, tzv. „Donut“. Ke stanovení fluence fotonu byl využit model uvedený v příl. 4. Ozařování probíhalo v místě svazku s největší intenzitou. Průměr vzorku deponovaného na CVD sklíčko byl 1,9 mm.

2.3 Peltierův článek

Pro účely nastavení teploty vzorku při ozařování byl použit Peltierův článek. Jedná se o elektrický obvod, který využívá termoelektrického jevu k chlazení nebo ohřevu. Skládá se z několika vodičů nebo polovodičů spojených v obvodu a připojených ke zdroji elektrického proudu. Každý prvek v Peltierově článku je tvořen dvěma vrstvami vodiče nebo polovodiče, které jsou navzájem odděleny tenkou vrstvou izolantu.

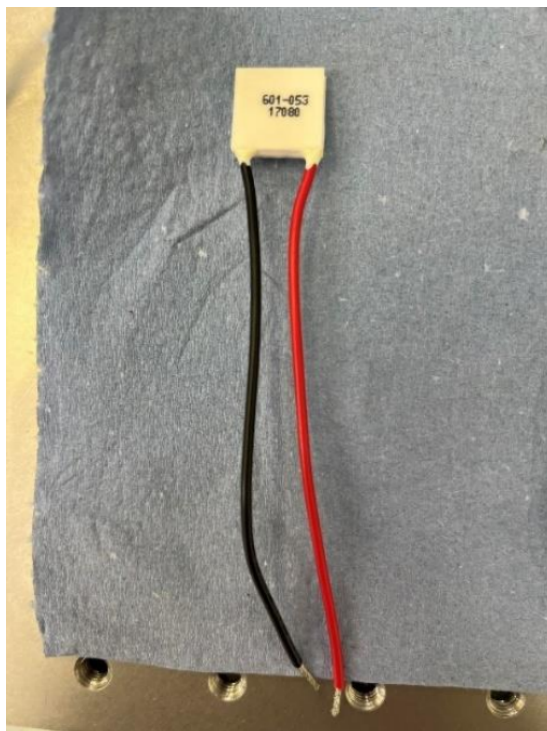
Na jedné straně článku jsou prvky připojeny ke zdroji proudu, na straně druhé jsou odděleny. Při zapojení do zdroje vzniká v článku teplotní gradient mezi jeho konci. Elektronové vodiče nebo polovodiče migrují směrem k místu, kde jsou připojeny ke zdroji proudu, a na místě uvolňují teplo. Naopak na místě, kde jsou odpojeny, elektrony rekombinují s kladně nabitými atomy vodiče nebo polovodiče a tím dochází k lokálnímu ochlazení místa [85]. Při chlazení je nezbytné dbát na to, aby byl Peltierův článek co nejlépe chlazen pro dostatečný odvod tzv. Jouleova tepla. V otázce ohřevu je situace opačná a článek musí být co nejlépe izolován, aby teplo zůstalo uvnitř. Nákres Peltierova modulu je na Obr. 2.4.



Obrázek 2.4: Nákres Peltierova článku. Převzato a upraveno z [86].

Ozařování vzorků v interakční komoře se řídilo následujícím postupem: V případě plazmidové DNA se vzorky k ozařování připravily tak, aby každý obsahoval přibližně 100 ng plazmidové DNA. Roztoky byly deponovány v množství 1 μ l na podložní sklíčka, a následně ponechána na vzduchu k vysušení.

V dalším kroku bylo podložní sklíčko upevněno na kovovou podložku a ta byla svisle zachycena na posuvný stojan umístěný ve vakuové komoře. Ke každé sadě vzorků byl rovněž přiložen kontrolní (referenční) vzorek, který nebyl ozařován. V případě bakteriálního viru byl odpipetován 1 μ l výchozího roztoku a zředěn destilovanou vodou na poměr 1:10 pro celkový objem 10 μ l. Roztoky byly deponovány na sklíčka ve stejném množství, jako v případě ozařování plazmidů. Snímek Peltierova článku je uveden na Obr. 2.5 a snímek pohledu do interakční komory je uveden na Obr. 2.6.



Obrázek 2.5: Model Peltierova článku.

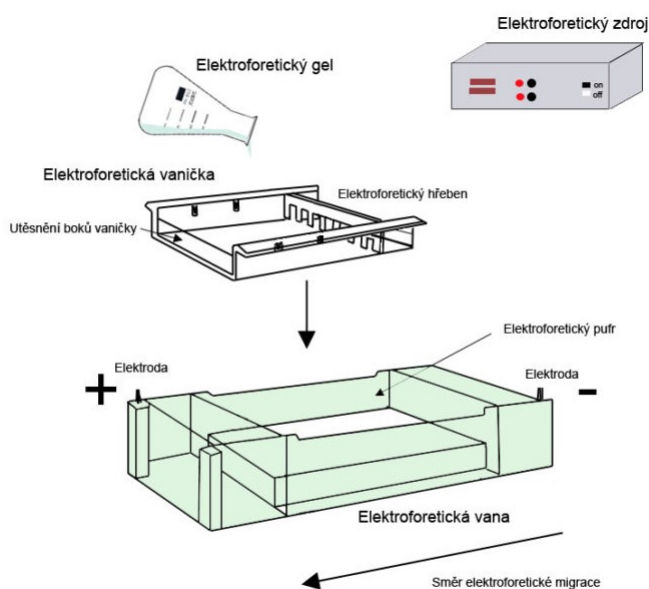


Obrázek 2.6: Pohled do interakční komory: 1 - vstupní apertura se záměrným křížem, 2 - držák filtrů, 3 - x-y-z posuvné stolky, 4 - držák.

2.4 Princip zónové gelové elektroforézy

Elektroforéza se řadí mezi elementární separační metody, které se používají pro separaci a analýzu látek. Řadí se mezi kritickou součást mnoha protokolů molekulární biologie, protože se této metody používá zejména pro dělení a kvantifikaci nukleových kyselin.

Analyzovaný materiál je deponován do stejnosměrného elektrického pole a vlivem různých elektroforetických mobilit prvků je materiál separován a analyzován. Agarózová elektroforéza je druhem elektroforézy, kde je jako separačního prostředí využit agarózový gel. Samotný princip separace jednotlivých forem DNA v agarózovém gelu spočívá v jejich tvarových a velikostních odlišnostech [87]. Schéma aparatury pro agarózovou elektroforézu je uvedeno na Obr. 2.7.



Obrázek 2.7: Schéma aparatury pro agarózovou elektroforézu [88].

Po připojení stejnosměrného napětí se všechny formy DNA začnou pohybovat směrem ke kladné elektrodě (anodě), neboť nukleové kyseliny mají záporný náboj. Matrice agaru klade odpor úměrný velikosti molekuly (analytu) a díky tomu dochází k separaci jednotlivých složek.

Gely jsou při elektroforéze ponořeny v zásobním roztoku pufru TAE, TBE či TE, apod. Funkce pufru je chránit gel před vysušením, udržuje optimální hodnotu pH a poskytuje vodivé spojení. Součástí gelu je také interkalační barvivo SYBR Green I, které se interkaluje mezi nukleotidové páry DNA.

V následujících dvou podkapitolách 2.4.1 - 2.4.2 je uveden laboratorní protokol, pomocí kterého byla analyzována míra poškození a degradace plazmidové DNA včetně softwarového zpracování pro kvantifikaci indukovaných zlomů specifického charakteru.

2.4.1 Příprava gelů a vzorků

V této práci byly gely připravovány pomocí 0,8 % agarózy. Navážené množství agarózy bylo zalito odpovídajícím množstvím 0,5x TAE pufru (se složením: 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM kyselina octová). Tento pufr byl připraven ředěním z 50x TAE koncentrovaného výchozího roztoku. Roztok byl v kádince přiveden k varu a následně zakrytý folií vařen po dobu 3 minut. V dalším kroku byla kádinka sejmuta z ploténky a k roztoku bylo přidáno fluorescenční barvivo SYBR Green o takovém objemu, aby jeho koncentrace odpovídala 1x. SYBR Green je komerčně dodáván v roztoku DMSO o koncentraci 10000x. V dalším kroku byl gel nalit do gelových formiček a následně byly vloženy hřebínky pro vytvarování jamek v gelu. Standardní gel o objemu 20 ml tedy obsahoval: 0,16 g agarózy, 20 ml 0,5x TAE pufru a 2 μ l fluorescenčního barviva SYBR Green I. Po vytvrzení gelu (přibližně 1 hodina) byl gel vložen do elektroforetické lázně a zalit 0,5x TAE pufrům po vyznačené hrany. V této práci byl pro horizontální elektroforézu využit kompaktní přístroj Mupid ExU fy (Helixx Can).

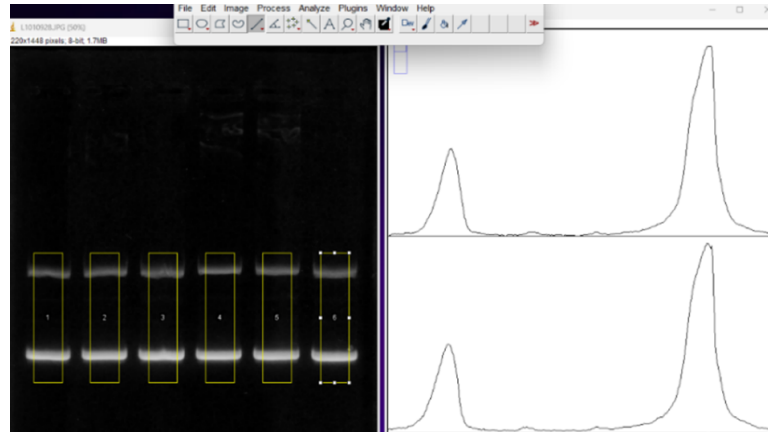
Vzorky DNA byly deponovány do jamek v množství nepřesahující 100 ng, přičemž objem jamky činí při objemu gelu 40 ml přibližně 15 μ l. Množství gelu bylo voleno tak, aby 100 ng plazmidové DNA bylo obsaženo v objemu 10 μ l. K tomuto objemu byly napipetovány 2 μ l sledovacího roztoku 6x Loading Dye (ThermoFisher, CZ) se složením 10 mM Tris-HCl, 0,03 % bromfenolová modř, 0,03 % xylen cyanol FF, 60 % glycerol a 60 mM EDTA. Cílem přidání tohoto sledujícího roztoku je to, že díky glycerolu dochází k udržení molekul DNA na dně jamky agarózového gelu a dále k vizuální kontrole migrace fragmentů. Vzorky v gelu byly ponechány migrovat po dobu 75 minut při napětí 100 V.

2.4.2 Analýza vzorků po agarózové elektroforéze

Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické vany. Pro analýzu vzorků se používá UV záření. Jako zdroj byl použit transiluminační stolek (UVITEC, VB). Gely emitující fluorescenční záření na vlnové délce 520 nm byly vyfotografovány v zatemnělé místnosti pomocí fotoaparátu Leica V-Lux 2 s nastavením $f = 1/3$ s, clonové číslo $f / 3,2$ a ISO 400. Tyto snímky byly posléze upraveny a vyhodnoceny pomocí softwarového rozhraní ImageJ.

V rozhraní ImageJ byla upravena hloubka barev snímku na 8-bit a následně vyrovnána hodnota pozadí algoritmem Rollin Ball nastaveným na hodnotu poloměru 400, což koreluje se světelnými podmínkami snímání gelu na transiluminačním stolku pro největší možný kontrast.

V dalším kroku se jednotlivé pásy označily obdélníkovým výběrem a byl vynesena jejich intenzitní profil. Posléze pomocí nástroje „Tracing tool“ byly vybrány přímo plochy pod píky, a tím bylo možné vyhodnotit zastoupení jednotlivých forem poškození plazmidové DNA, jak je uvedeno na Obr. 2.8.



Obrázek 2.8: Vyhodnocení snímků agarózového gelu pomocí ImageJ.

Plocha pod píkem P příslušné formy F je označena jako funkce dávky $P_F(D)$. Relativní zastoupení dané formy (konformace) jako funkce dávky, $F(D)$, lze vyjádřit následujícím vztahem:

$$F(D) = \frac{A_F(D)}{\sum_F A_f(D)}, \quad (2.1)$$

kde příslušné formy jsou množinou $F = \{S, C, L\}$. Tímto způsobem byla získána naměřená data pro relativní četnosti forem $S(D)$, $C(D)$, $L(D)$.

2.5 Plaková metoda

Přítomnost životaschopných částic fágů lze rychle demonstrovat tak, že se na povrch agarové plotny se živinami, na níž rostou bakterie citlivé vůči danému fágu, přidá roztok, obsahující patričný virus. Jestliže v něm nejsou přítomny žádné virové partikule, rychle se dělicí bakterie utvoří na plotně jednoduše rovinný povrch. Avšak jestliže je přítomna alespoň jedna částice, připojí se na bakterii a pomnoží se, čímž vznikne několik set nových virových částic, které se náhle uvolní rozpuštěním (proces lýze) buněčné stěny. K tomu dochází asi 15 až 60 minut po začátku fágové infekce. Každá z několika set částic potomstva se pak může připojit k nové bakterii a rozmnožit se. Po několika cyklech připojení, rozmnožení a uvolnění jsou všechny bakterie v blízkosti původní virové částice usmrceny. Tyto oblasti usmrcených bakterií vypadají jako volná kruhová místa (tzv. plaky) v ploše zarostlé zdravými bakteriemi.

2.6 Mechanický přenos rostlinného viru

Mechanickým přenosem lze otestovat nejen to, zda je virus tímto způsobem přenosný (některé rostlinné viry takto přenést nelze), ale také - v případě mechanické přenositelnosti - připravit nemocné rostliny a dostatečné množství viru pro další experimenty. Tento způsob inokulace je také užitečný pro identifikaci rozsahu hostitelů rostlinných virů. Mechanický přenos může nastat různými způsoby, jako je tření rostlinných částí, kontakt mezi infikovanými a zdravými rostlinami, okusem pomocí hmyzu, mechanizací, zemědělskými nástroji, apod. Při mechanickém přenosu není zapojena biologická interakce nebo specifická. Tento typ přenosu zahrnuje zavedení infekčního viru nebo biologicky aktivního viru na vhodné místo v živých buňkách prostřednictvím poškození povrchu rostliny. Po průniku virového genomu se virus úspěšně usazuje v buňce rostliny a nastává rozvoj infekce. Experimentální mechanická inokulace obvykle probíhá rozemletím infikované listové tkáně ve fosfátovém pufru a následným třením extraktu na listy rostlin. Povrchy listů jsou potřeny práškem z karborundu, aby se poškodil povrch listů rostlin a usnadnil se proces průniku virových částic skrz kutikulu a epidermis zdravého listu. U očkováných rostlin se mohou projevit různé typy reakcí, jako jsou nekrotické lokální léze na očkováných listech a systémové symptomy na neočkováných listech, které se projevují například skvrnami, mozaikou, deformací listů a nekrózou. Na Obr. 2.9 je pohled na přípravu mechanického přenosu.

Tento typ mechanického přenosu s využitím fosfátového pufru a karborundu byl využit i v této experimentální práci.



Obrázek 2.9: Pohled na přípravu mechanického přenosu rostlinného viru

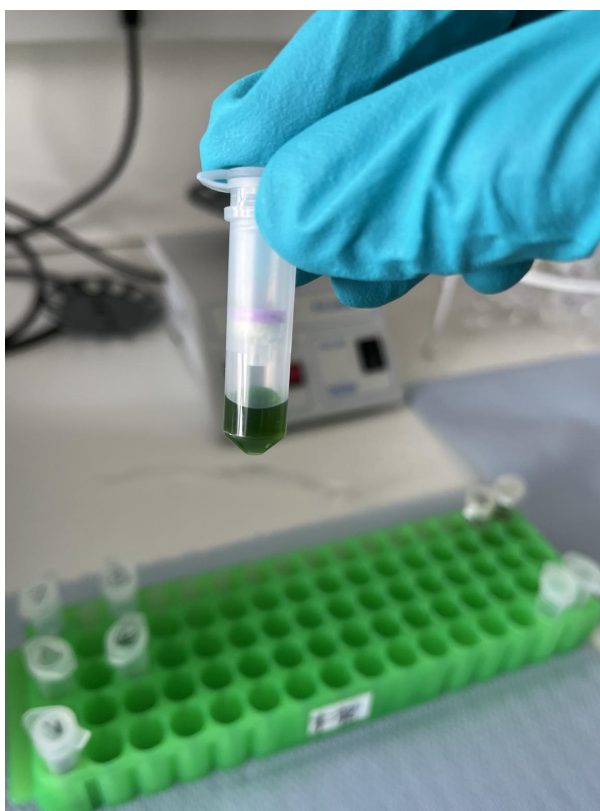
2.7 Izolace celkové (totální) RNA

Vzorek listu byl rozetřen v třecí misce společně s roztokem složeným z 500 μ l pufru RAP (guanidin-chlorid) a 7 μ l β -merkapt ethanolu. Následně byly ze vzorku odfiltrovány zbytky buněčné stěny pomocí speciální mikroz kumavky a centrifugací při 11 000 x g. Přefiltrovaná fáze byla odpipetována do nové zkumavky a doplněna 500 μ l ethanolu. Směs byla promíchána, přepipetována na zachycovací kolonku a stočena 1 minutu při 11 000 x g. Filtrát se odlil do odpadní kádinky, zachycená RNA byla promyta 500 μ l pufru MDB (guanidin thiokyanát, ethanol) a stočena 30 sekund při 11 000 x g. Filtrát byl opět odstraněn, do kolonky bylo přidáno 95 μ l roztoku DNAsy (pro rozštěpení případně DNA) a směs byla ponechána inkubovat 15 minut při pokojové teplotě. Následně byl filtr promyt postupně 200 μ l pufru RAW2 (guanidin-chlorid, ethanol) a 600 μ l pufru RA3. Po každém promytí byla směs stočena vždy 30 sekund při 11 000 x g. Poslední promytí bylo pomocí 250 μ l pufru RA3 a směs byla stočena 2 minuty při 11 000 x g. Výsledná celková RNA zachycená na filtru byla vymyta pomocí 60 μ l RNase-free vody do nové mikroz kumavky. Na Obr. 2.10 je uveden záběr na mikroz kumavku při procesu izolace total RNA ze vzorku listu.

2.8 Metoda reverzní transkripce

Z důvodu výhodného procesu amplifikace DNA oproti RNA - využívá se metody reverzní transkripce pro transkripci (přepis) RNA do DNA (tzv. copy-DNA, cDNA). Při této metodě se využívá buď specifického primeru o známé sekvenci, jestli je známé pořadí bází v úseku, které chceme přepsat, nebo lze použít nespecifické náhodné primery, které mají náhodné pořadí bází. Rozdíl spočívá v tom, že se při specifické reverzní transkripci získá vždy pouze jedna cDNA odpovídající RNA, se kterou se shoduje sekvence použitého primeru, zatímco u nespecifické reverzní transkripce se dostane řada různých cDNA.

Specifická reverzní transkripce se prováděla komerčním kitem M-MLC RT-kit (TopBio). Nеспецифická reverzní transkripce byla provedena pomocí kitu iScript (ThermoScientific).



Obrázek 2.10: Pohled na mikrozkuhavku s filtrační kolonkou během procesu izolace celkové RNA.

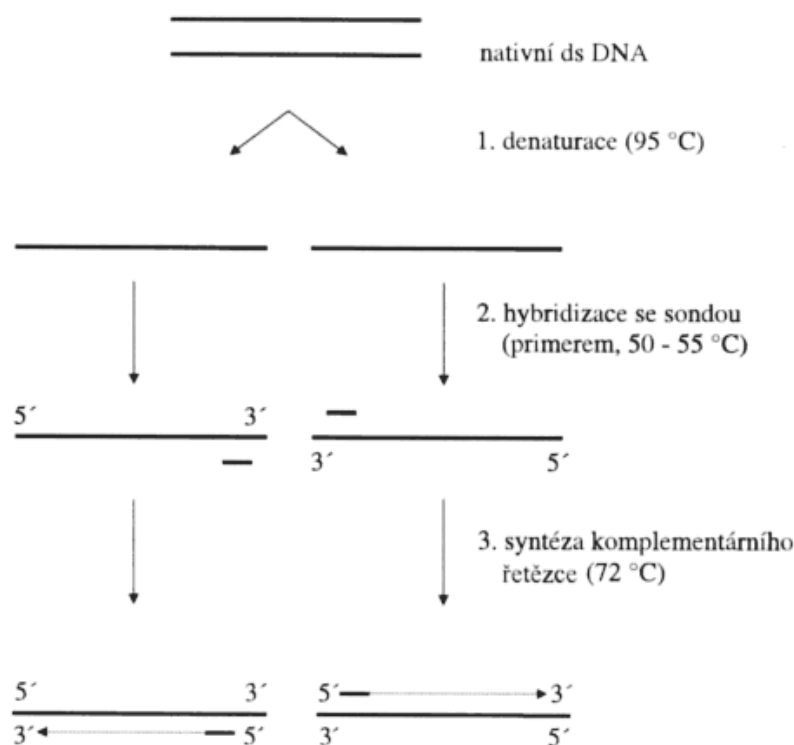
2.9 PCR - polymerázová řetězová reakce

Pro molekulární analýzu je často potřebné získat poměrně velké množství určitého úseku DNA. Až do roku 1983 existovala jediná metoda této analýzy, jak úseky DNA namnožit, pokud nebylo možné je v dostatečném množství přímo izolovat z odebraného materiálu: a to vnést je do bakteriálního plazmidu a klonovat. Dnes se totéž dělá ve stále rostoucím měřítku zcela *in vitro* pomocí polymerázové řetězové reakce (z angl. polymerase chain reaction, PCR). Reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler, které mění teplot v požadovaných teplotních intervalech. Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvojřetězcové DNA a následná renaturace oddělených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku [89]. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA. Samotný proces amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři fáze: (a) Denaturace. Zahřátím DNA na teplotu kolem 95 °C zanikají vodíkové vazby mezi vlákny DNA, čímž se dsDNA rozdělí na ssDNA. (b) Hybridizace (navázání primerů). V literatuře se tato fáze označuje anglickým termínem annealing (z angl. to anneal - žíhat, kalit kov, tj. po rozpálení prudce ochladit. Probíhá nejčastěji při teplotách 45 - 60 °C).

Molekuly jednořetězcové DNA po ochlazení opět renaturují. Pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické oligonukleotidy, budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší.

Teplota, při které hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritickým parametrem a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primeru. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na sekvence, kterou jsou komplementární jen z částí, a vytvoří se tak nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě zase budou primery málo hybridizovat a produktu se nevytvoří dostatečné množství. (c) Elongace nukleotidových řetězců. Na 3'-konce navázaných primerů nasedá DNA-polymeráza, která k primerům připojuje nové nukleotidy, a tím prodlužuje řetězec ve směru 5' - 3'. Tímto způsobem se vytváří základ budoucího fragmentu DNA, který chceme získat [90].

Uvedené fáze představují pouze první cyklus PCR, jenž by sám o sobě nestačil k amplifikaci zkoumaného úseku DNA. Popsaný postup je třeba vícekrát zopakovat. Teprve ve třetím cyklu se vytvářejí také dvojřetězcové fragmenty DNA o délce odpovídající amplifikovanému úseku. Aby se jich vytvořilo dostatečné množství, provádí se zpravidla 20 - 40 na sebe navazujících cyklů. Princip metody je uveden na Obr. 2.11.



Obrázek 2.11: Princip polymerázové řetězové reakce (tři fáze 1. cyklu). Převzato a upraveno z [91].

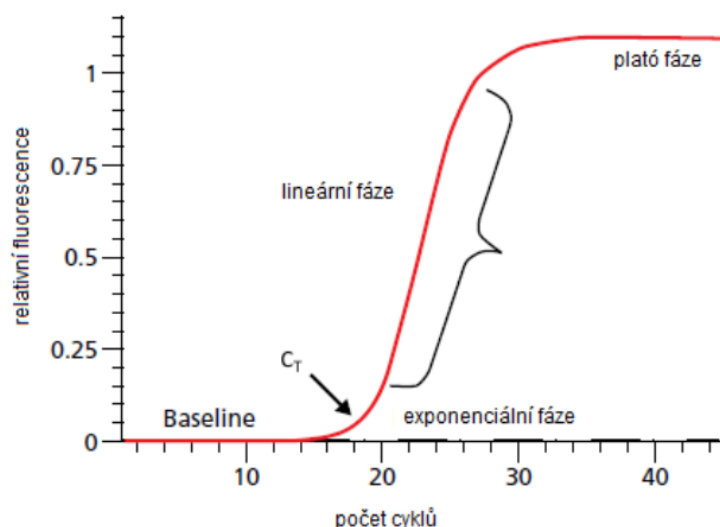
Ve všech mikrozkušavkách bylo postupně smícháno 10 μ l PPP-mastermixu (s obsahem Taq - polymerázy), společně s 6 μ l vody, 1 μ l forward a 1 μ l reverse specifických primerů a 2 μ l cDNA. Pro analýzu amplifikovaných úseků DNA se použila metoda gelové elektroforézy.

2.10 qPCR - kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase

Real-time neboli kvantitativní PCR (qPCR, z angl. quantitative PCR) je významnou variantou PCR, která umožňuje přímé stanovení PCR produktu v průběhu reakce. Principem qPCR je rychlá a přesná registrace produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém cyklu PCR. Ta je založena na vnesení určitých fluorescenčních látek, které se váží na vznikající PCR produkt, a stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace.

Existují tři hlavní způsoby, jak detekovat nárůst množství PCR produktu v jednotlivých cyklech amplifikace. Prvním je využití fluorescenčních barviv, která se váží na dsDNA - tzv. interkalační barviva (Ethidium bromid, SYBR Green I). Problémem této varianty je nízká specifičnost. Další možností je využití fluorescenčně značených oligonukleotidových sond, které specificky hybridizují s jednovláknovou DNA a různými mechanismy dochází k emisi jejich fluorescence (tzv. FRET - fluorescenční rezonanční přenos energie). Detekovaný fluorescenční signál je pak úměrný množství templátu. Dalším způsobem je využití specifických fluorescenčně značených primerů [92]. V této práci byla využita klasická SYBR-Green metoda.

Intenzita fluorescence přímo koreluje s koncentrací přítomného produktu v reakční směsi. Naměřená fluorescence je zobrazena v závislosti na odpovídajícím cyklu, což vytváří tzv. amplifikační křivku. Matematická analýza této křivky umožňuje kvantifikaci produktů. Vzor amplifikační křivky je uveden na Obr. 2.12. Zásadní hodnotou celé qPCR analýzy je hodnoty C_T (z angl. threshold cycle). Jedná se o cyklus, ve kterém intenzita fluorescence dosáhne prahové hodnoty detekce. Platí, že čím vyšší je počáteční koncentrace templátu v reakční směsi, tím dříve je detekována zvyšující se fluorescence produktu a tím nižší je hodnota C_T [93].



Obrázek 2.12: Standardní amplifikační křivka. Převzato a upraveno z [94].

3. Výsledky

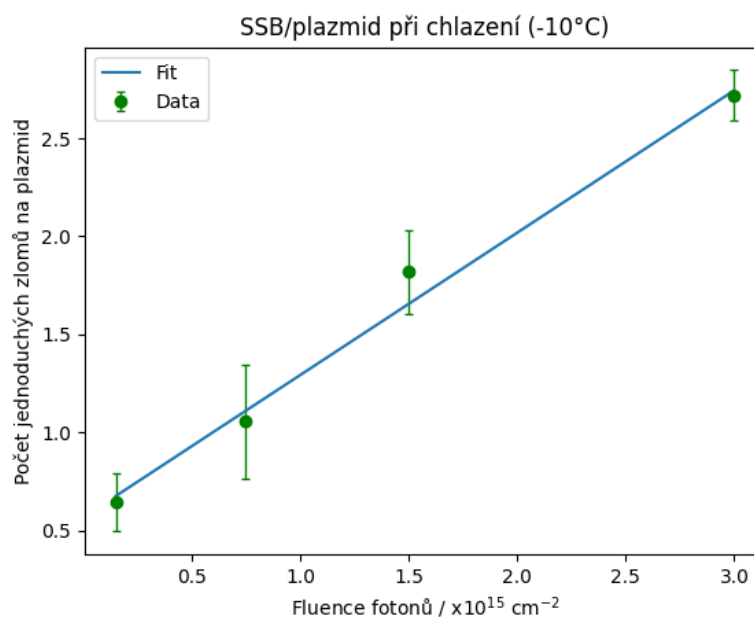
3.1 Závislost výtěžků SSB a DSB plazmidové DNA na fluenci CDL pulsů

Plazmid pBR322 byl vhodný systém pro studium biologického působení XUV záření na molekulární struktury DNA, který umožňuje měření SSB i DSB v daném vzorku. Ozařování vysušeného plazmidu ve vakuu fotony o energii 26,5 eV vedlo ke ztrátě výchozí superhelikální formy DNA a k tvorbě relaxované a lineární formy plazmidu v závislosti na fluenci fotonů.

Pro získání těchto výsledků byly provedeny tři sady experimentů při chlazení na teplotu $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při laboratorní teplotě $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po separaci exponovaných vzorků bylo určeno poměrné zastoupení jednotlivých forem plazmidů a pomocí vztahů 1.18 - 1.19 byl stanoven počet SSB a DSB na plazmid. V následujících tabulkách a grafech jsou uvedeny výsledky jednotlivých experimentů. Tabulky obsahují střední hodnoty a směrodatné odchylky pro stanovení chyb. Hodnoty pro tvorbu SSB při chlazení jsou uvedeny v Tab. 3.1 a výsledky jsou vyneseny v grafu na Obr. 3.1

Tabulka 3.1: Statistika počtu SSB na plazmid při chlazení vzorku na teplotu $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Počet pulzů	Fluence fotonů / $\times 10^{15}\text{ cm}^{-2}$	Průměr SSB/plazmid	σ
100	0,15	0,64	0,15
500	0,75	1,06	0,29
1000	1,50	1,82	0,21
2000	3,00	2,72	0,13

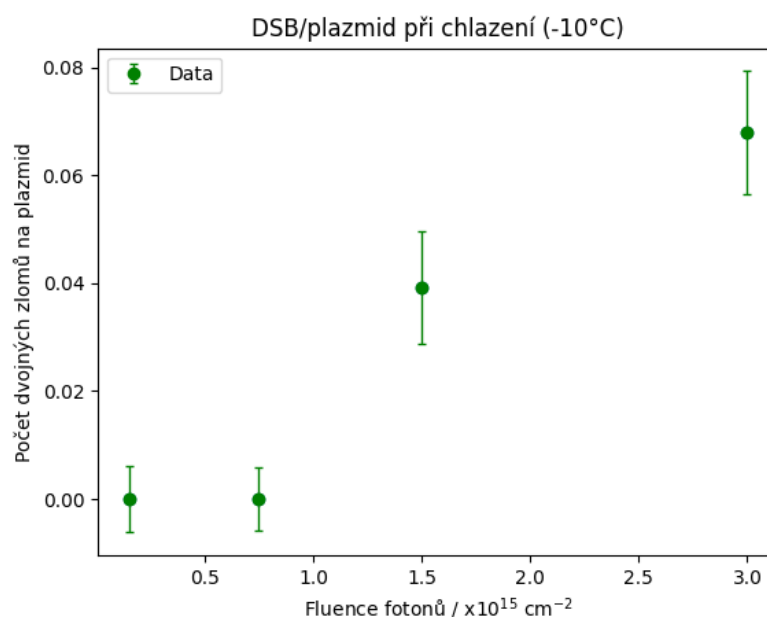


Obrázek 3.1: Závislost jednoduchých zlomů na fluenci fotonů při chlazení ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Hodnoty pro tvorbu DSB při chlazení jsou uvedeny v Tab. 3.2 a výsledky jsou vyneseny v grafu na Obr. 3.2

Tabulka 3.2: Statistika počtu DSB na plazmid při chlazení vzorku na teplotu $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Počet pulzů	Fluence fotonů $/\times 10^{15}\text{ cm}^{-2}$	Průměr DSB/plazmid	σ
100	0,15	-	-
500	0,75	-	-
1000	1,50	0,04	0,01
2000	3,00	0,07	0,01



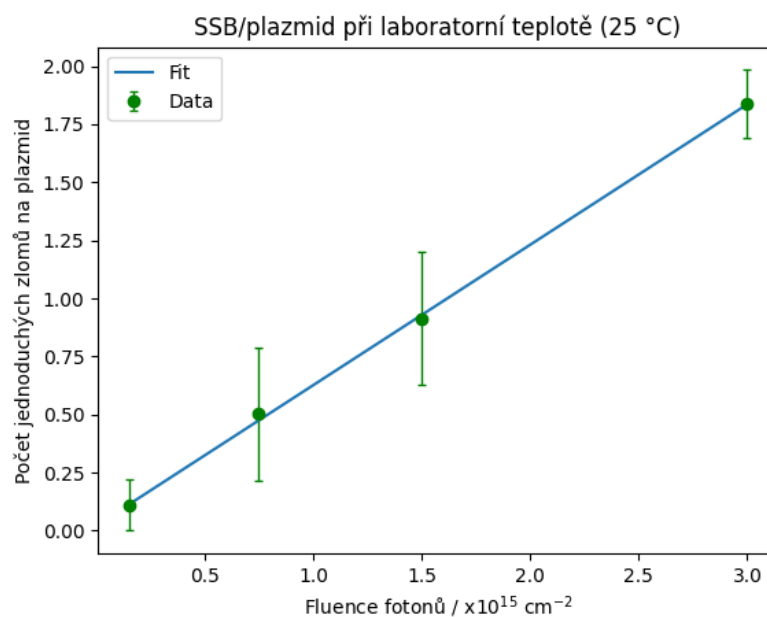
Obrázek 3.2: Závislost dvojných zlomů na fluenci fotonů při chlazení ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Hodnoty pro tvorbu SSB při laboratorní teplotě ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) jsou uvedeny v Tab. 3.3 a výsledky jsou vyneseny v grafu na Obr. 3.3

Tabulka 3.3: Statistika počtu SSB na plazmid při laboratorní teplotě ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Počet pulzů	Fluence fotonů $/\times 10^{15}\text{ cm}^{-2}$	Průměr SSB/plazmid	σ
100	0,15	0,11	0,11
500	0,75	0,50	0,29
1000	1,50	0,91	0,29
2000	3,00	1,84	0,15

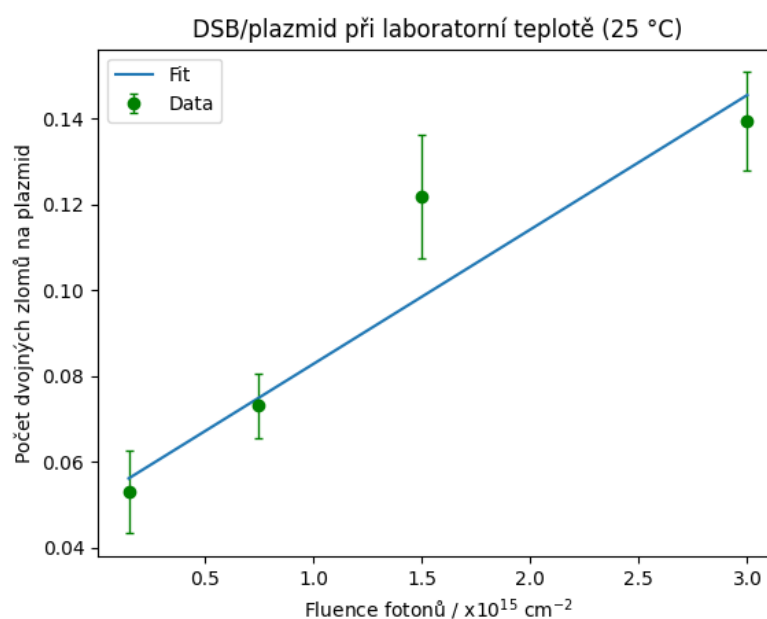
Hodnoty pro tvorbu DSB při laboratorní teplotě ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) jsou uvedeny v Tab. 3.4 a výsledky jsou vyneseny v grafu na Obr. 3.4. V kap. 1.6 byla odvozena soustava diferenciálních rovnic kvantitativně popisujících změny plazmidové DNA v závislosti na fluenci fotonů. Tento model odvozený McMahanem a Currelem byl aplikován na výsledky dosažené v této práci a jsou uvedeny na Obr. 3.5 a Obr. 3.6.



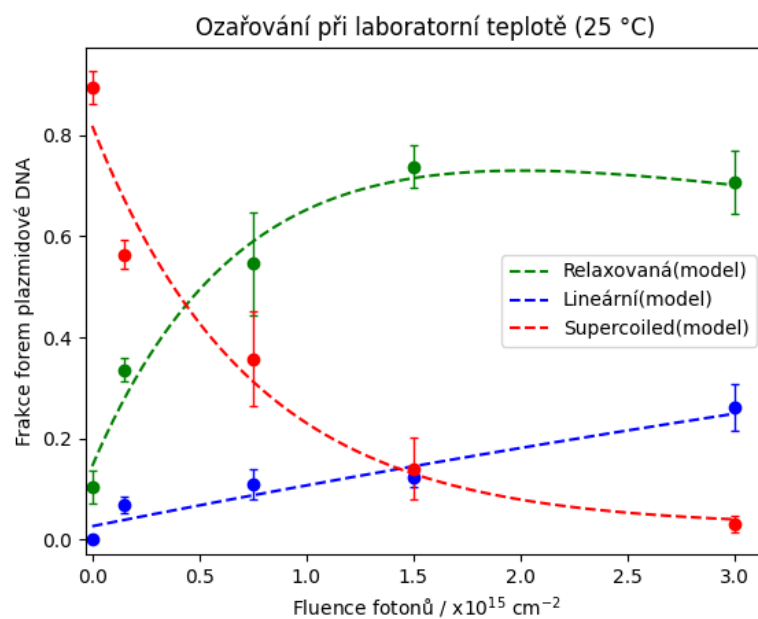
Obrázek 3.3: Závislost jednoduchých zlomů na fluenci fotonů při laboratorní teplotě (25 °C).

Tabulka 3.4: Statistika počtu DSB na plazmid při laboratorní teplotě (25 °C)

Počet pulzů	Fluence fotonů / $\times 10^{15} \text{ cm}^{-2}$	Průměr DSB/plazmid	σ
100	0,15	0,05	0,01
500	0,75	0,07	0,01
1000	1,50	0,12	0,01
2000	3,00	0,14	0,01



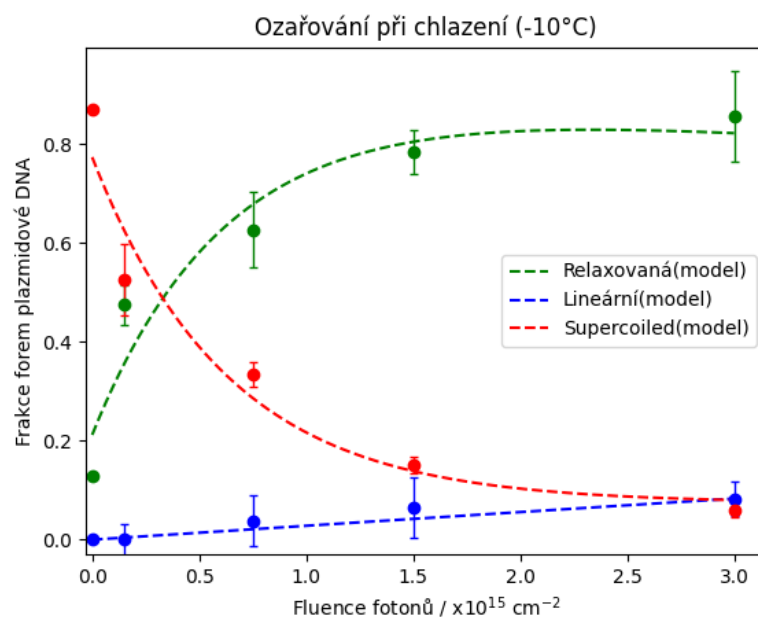
Obrázek 3.4: Závislost dvojných zlomů na fluenci fotonů při laboratorní teplotě (25 °C).



Obrázek 3.5: Naměřené závislosti frací plazmidové DNA jako funkce fluence fotonů pro plazmidovou DNA při laboratorní teplotě (25 °C).

Tabulka 3.5: Počet pulzů potřebných k iniciaci jednoho SSB, či jednoho DSB v jedné molekule plazmidu při -10 °C.

D_{37}^{SSB} [pulzů]	D_{37}^{DSB} [pulzů]
558	17675



Obrázek 3.6: Naměřené závislosti frací plazmidové DNA jako funkce fluence fotonů pro plazmidovou DNA při chlazení na (-10 °C).

Tabulka 3.6: Počet pulzů potřebných k iniciaci jednoho SSB, či jednoho DSB v jedné molekule plazmidu při laboratorní teplotě.

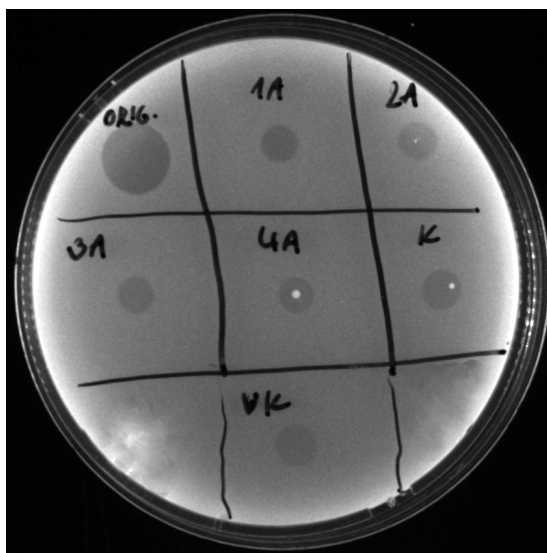
D_{37}^{SSB} [pulzů]	D_{37}^{DSB} [pulzů]
571	7347

Získané výsledky naznačují lineárně rostoucí závislost množství jednoduchých zlomů na plazmid se zvyšující se fluencí fotonů. V případě ozařování při laboratorní teplotě se hodnoty SSB/plazmid pohybovaly od 0,110 pro počet pulzů 100 až po 1,836 pro počet pulzů 2000. V celém rozsahu fluencí fotonů převládá množství jednoduchých zlomů. DSB/plazmid nabýval pro nejnižší hodnotu fluence energie dvakrát nižší hodnotu ve srovnání s SSB/plazmid. Se zvyšující se fluencí fotonů se poměr měnil až na hodnotu poměru SSB:DSB 13:1, kdy dvojné zlomy dosahovaly hodnoty 0,140. Ve druhém případě, kdy byl terč se vzorky chlazený na teplotu - 10°C se hodnoty SSB/plazmid pohybovaly od 0,644 pro počet pulzu 100 až po 2,720 pro počet pulzů 2000. Zároveň lze poznamenat, že při chlazení tvorba DSB/plazmid nemá lineárně rostoucí charakter. DSB/plazmid nabývaly pro první dvě hodnoty fluence fotonů nulových hodnot. Tuto skutečnost lze lépe znázornit pomocí výsledných hodnot v Tab. 3.5 - Tab. 3.6. DSB redukční faktor $D_{37}^{\text{DSB}}[-10\text{ °C}] : D_{37}^{\text{DSB}}[\text{lab. teplota}]$ je roven 141 %. V případě SSB je hodnota D_{37}^{SSB} přibližně shodná při obou teplotách.

3.2 Biologické testování ozářených bakteriofágů

Na Obr. 3.7 je uveden výsledek z biologického testování ozářených fágů. Z výsledku vyplynulo, že fágy nebyly kompletně inaktivovány, protože indukovaly tvorbu plaků. Plocha zóny korelovala s koncentrací fága, ale rozdíly velikostí ploch mezi rozdílnými dávkami ozáření nebyly nijak zásadní. Důvodem mohlo být to, že k inaktivaci došlo pouze u části fágů, přičemž zbývající (neaktivované) fágy stále dosahovaly koncentrací PFU's (z angl. plaque forming units = jednotky vytvářející plaky), které vytvoří plak (a vzhledem k nějaké plateau fázi růstu/množení fágů vždy za stejný čas stejně velký). Řešením této situace v budoucnu by bylo využít většího ředění základního fágového roztoku a/nebo vyšších dávek záření.

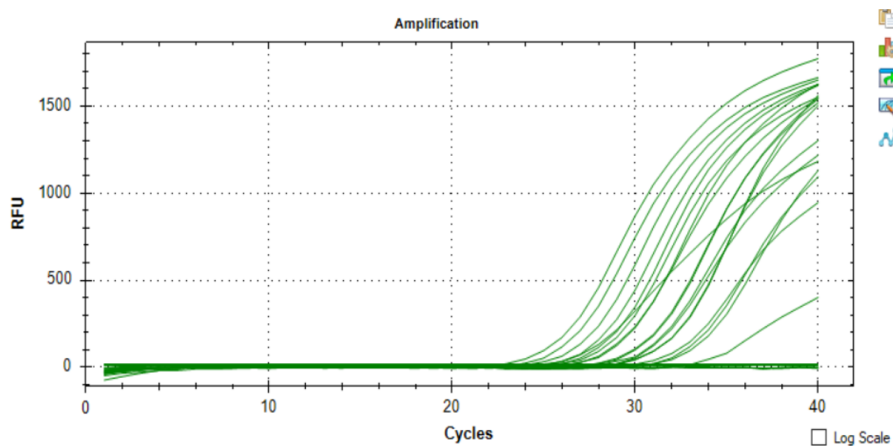
Z biologického testování je také vidět vliv zpracování vzorků, protože originál fágů tvoří jinak velký plak než kontrolní vzorky "VK" a "K", se kterými bylo manipulováno, ale nebyly ozařovány (vzorek "VK" byl ponechán volně na vzduchu, vzorek "K" byl evakuován). Je možné, že právě touto manipulací byla ovlivněna nikoliv integrita DNA, ale např. schopnost adsorpce fágů na bakterie, a tím pádem je kolonie menší. V různých pracích se uvádí možné vlivy na velikost kolonií. Velikost plaku závisí na difuzivitě fága, přičemž s rostoucí rychlostí difuze velikost plaku roste. Bylo zjištěno, že příliš vysoká nebo příliš nízká rychlost adsorpce na bakterie obvykle vede k menší velikosti plaku. Dalším parametrem je tzv. fágový výnos (z angl. burst size). Tento termín označuje maximální počet virionů průměrně vytvořených v jedné buňce. Růstu fágového výnosu odpovídá také zvětšující se velikost plaku [95].



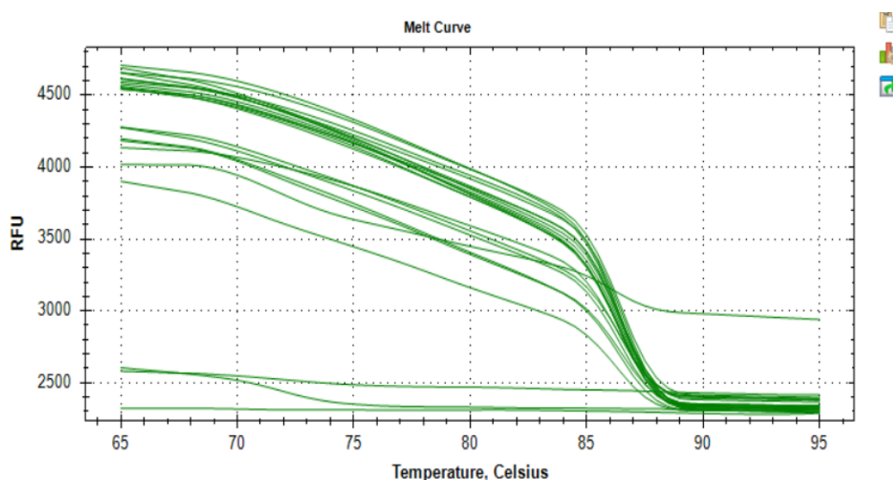
Obrázek 3.7: Biologické testování ozářených fágů. Orig. = jeden mikrolitr fága, který neprodělal žádnou manipulaci a byl stále v roztoku. Další sektory na misce obsahují vždy jeden mikrolitr fágů, které byly ozářeny dávkou pořadě: 1A = 100 pulzů, 2A = 500 pulzů, 3A = 1000 pulzů a 4A = 2000 pulzů. K znamená referenční (neozařovaný vzorek) přítomný ve vakuové interakční komoře, VK pak vzorek ponechaný volně na vzduchu.

3.3 Výsledky qPCR

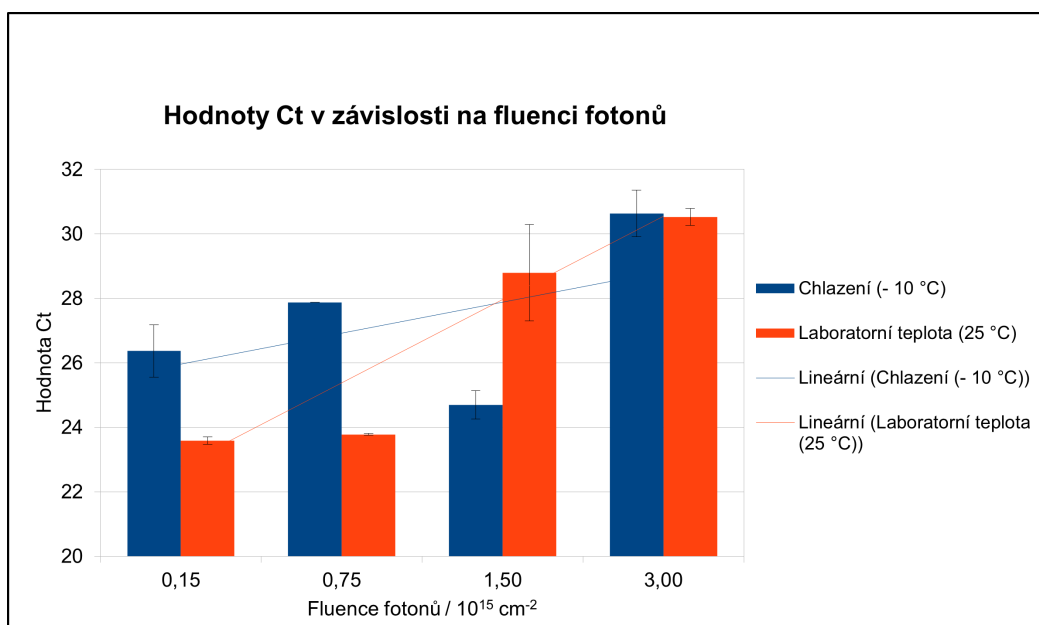
V Tab. 3.7 a Tab. 3.8 jsou uvedeny získané hodnoty Ct. Pro každý vzorek byla provedena dvě měření pro eliminaci pipetovací chyby. Amplifikační křivka na Obr. 3.8 ilustruje postupné zesílení signálu s každým dalším cyklem, zatímco křivka tání na Obr. 3.9 naznačuje pokles signálu během postupného zahřívání amplifikovaného vzorku o 0,5 °C krokem. Přítomnost jediného denaturačního maxima při teplotě přibližně 86,5 °C dokazuje vznik jediného amplifikačního produktu a tím i specifitu PCR. Z průběhu amplifikačních křivek (resp. hodnot Ct) je patrné, že se zvyšujícím se počtem pulzů roste počet inaktivovaných fágů (viz Obr. 3.8). Absolutní hodnoty Ct u prvních dvou pulzních hodnot (100 a 500) sice indikují nižší míru inaktivace při teplotě 25 °C, při vyšších hodnotách pulzů (1000) je ale méně inaktivovaných fágů při teplotě - 10 °C. Pokud proložíme grafem lineární křivku trendu, pak je míra inaktivace nižší u chlazených vzorků - tedy potvrzuje původní předpoklad (viz Obr. 3.10). Poslední hodnota grafu (2000 pulzů) naznačuje, že by při této hodnotě mohly rozdíly mezi různými teplotami přestat hrát roli. Pro jednoznačný závěr o vlivu chlazení na průběh inaktivace by ale bylo třeba provést sérii experimentů s vyššími pulzy.



Obrázek 3.8: Záznamy z real-time PCR



Obrázek 3.9: Záznamy z real-time PCR



Obrázek 3.10: Naměřené hodnoty Ct jako funkce fluence fotonů

Tabulka 3.7: Stanovené hodnoty Ct při chlazení (-10 °C).

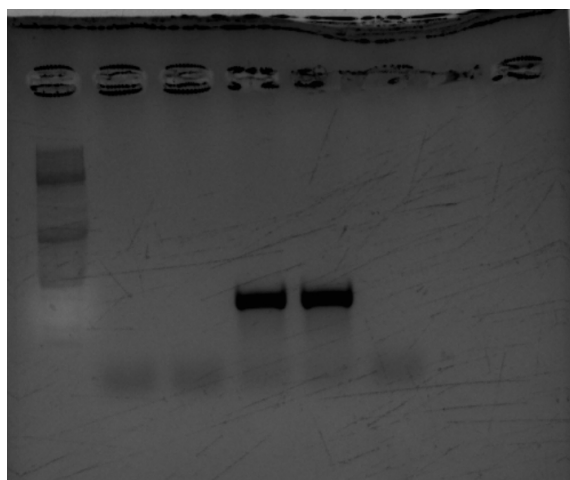
Počet pulzů	Průměrná hodnota Ct	σ
0	28,3	0,8
100	26,4	-
500	27,9	0,4
1000	24,7	0,7
2000	30,6	0,1

Tabulka 3.8: Stanovené hodnoty Ct při laboratorní teplotě (25 °C).

Počet pulzů	Průměrná hodnota Ct	σ
0	25,6	0,1
100	23,6	-
500	23,8	1,5
1000	28,8	0,3
2000	30,5	0,9

3.4 Mechanický přenos rostlinného viru - ZYMV

Pro testování vlivu záření na fytoviry je nezbytné nejprve tyto viry namnožit. Zatímco u fágů je tento proces relativně jednoduchý, u fytovirů je nezbytné jejich namnožení v rostlinách, což je časově náročnější proces. Pro tento účel byl vybrán virus (Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) dvakrát inokulován do rostlin ze zamraženého izolátu. Tyto přenosy probíhaly po dobu vždy tří týdnů, po které následovalo sledování vývoje příznaků. Poté byly provedeny testy přítomnosti viru v rostlině metodou RT-PCR. Na testovaných rostlinách nedošlo k rozvoji žádných příznaků a RT-PCR testy na ZYMV byly negativní. Virus ZYMV se tedy nepodařilo přenést a namnožit v dostatečném množství pro ozařovací experimenty, nicméně byl vyzkoušen postup mechanické inokulace viru, izolace RNA a následného testování přítomnosti viru metodou RT-PCR. Tyto výsledky dobře ilustrují časovou náročnost podobných experimentů s rostlinnými viry a jejich pracnost ve srovnání s předchozí prací s bakteriofágy.



Obrázek 3.11: PCR amplifikace cDNA ze vzorků. Zleva: 1 = marker (DNA dělena pravidelně po 100 bp - silnější bandy odpovídají 500, 1000 a 1500 bp), 2 = testovaný vzorek, 3 = kontrolní rostlina (přenos šťávy ze zdravé rostliny), 4 = pozitivní kontrola (cDNA ze zamraženého pozitivního materiálu - připravena specifickým primerem), 5 = pozitivní kontrola (cDNA ze zamraženého pozitivního materiálu připravena random primery), 6 = negativní kontrola PCR (voda místo cDNA).

4. Shrnutí a závěry

V základních kurzech radiační chemie a molekulární radiobiologie si jejich frekventanti mohou snadno vytvořit představu téměř úplné dominance netepelných procesů, tj. ionizací a elektronových excitací, v těchto oborech. To někdy vede k podněcování vlivu teploty na výtěžky a mechanismy poškození chemických a biologických soustav iniciovaných ionizujícím zářením. V teoretické části práce byl proto podán přehled prací věnovaných studiu vlivu teploty na procesy vyvolané v molekulárních systémech ionizujícím zářením publikovaných jinými autory. I když je toto téma stále v radiačních oborech vnímáno spíše jako marginální (významných prací vztahujících se k této problematice jsou desítky, nikoli stovky nebo tisíce, jako je tomu v jiných, preferovanějších výzkumných směrech), jde o dobře definovaný podobor, o němž zde byla shromážděna a představena relevantní literatura.

Cílem instrumentální části práce bylo vyvinout a použít ozařovací sestavu umožňující nastavit a udržovat teploty vzorku na hodnotách nižších než laboratorní teplota. Zdrojem ionizujícího záření byl kompaktní repetiční XUV laser s kapilárním výbojem v argonu poskytující nanosekundové pulzy záření o vlnové délce 46,9 nm. Vzhledem k energii fotonů 24,6 eV jde o ionizující záření, jež je silně absorbováno ve vzduchu. Ozařovací uspořádání je tedy nutno provozovat ve vakuové interakční komoře. Aby se omezilo problémům s kryogenními kapalinami, které by mohly nastat při umístění zařízení ve vakuu, jako chladicí terč byl použit Peltierův článek. Měření aktuální teploty vzorku zajišťoval termočlánek. Toto zařízení bylo využito ke stanovení výtěžku jednoduchých a dvojných zlomů plazmidové DNA ozářené mnoha pulzy XUV laserového zařízení při teplotách $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bylo zjištěno, že výtěžek jednoduchých zlomů se v tomto teplotním intervalu v rámci experimentální chyby s teplotou nemění, avšak výtěžek dvojných zlomů je při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ výrazně nižší, než ten naměřený při laboratorní teplotě. Z literatury je známo, že ke generaci dvojných zlomů nepřímým účinkem ionizujícího záření je třeba výrazně vyšší lokální koncentrace reaktivních intermediátů (např. hydroxylových radikálů), než pro tvorbu jednoduchých zlomů. Obdržené výsledky by tedy mohly být vysvětlitelné tím, že nízkou pohyblivostí reaktivních species vytvořených radiolýzou vody v pevném stavu, který můžeme očekávat při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zvýšením pravděpodobnosti jejich místně podmíněné (např. geminální) rekombinace.

Ozařovací zařízení s peltierovským chlazením vzorku bylo dále testováno pro posouzení možností studia teplotních závislostí radiačního poškození bakteriofágů a fytovirů. Zatímco ozařování plazmidové DNA probíhalo v blízkosti elektroforetického analyzátoru zlomů a fáze experimentu na sebe navazovaly bez prodlev, byly mikrobiologické experimenty před ozářením připravovány a po ozáření analyzovány na jiném pracovišti (Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České Budějovice) a tím pádem s delší prodlevou. Celý řetězec od přípravy mikrobiologického vzorku přes jeho ozáření za různých teplot až po analýzu poškození byl v rámci této práce realizován a podrobně popsán, nicméně jeho výsledky naznačily, že k relevantním závěrům by bylo nutné provést celou řadu dalších experimentů.

Ke snížení vlivu výše popsaných prodlev na výsledky experimentu by též bylo vhodnější umístit kultivační boxy a zařízení nutná k vyhodnocení křivek přežití případně genetických změn v mikrobiologickém materiálu v blízkosti zdroje záření, nebo je třeba zdroj záření dočasně umístit přímo do mikrobiologické laboratoře. S XUV kapilárním laserem se to jeví jako jen obtížně realizovatelný úkol. Rýsují se však možnosti použít kompaktní pulzní krátkovlnné UV záření emitující diody (mid-UV LED). Tím se ovšem posuneme od radiobiologie směrem k fotobiologii.

Závěrem lze konstatovat, že vyvinuté a zprovozněné ozařovací uspořádání umožňuje reprodukovatelně studovat teplotní závislosti výtěžků radiačního poškození biomolekulárních soustav. Jeho využití pro výzkum účinku na viry, případně jiné mikrobiologické entity, by patrně vyžadoval delší časové možnosti a více experimentálního prostoru, než bylo k dispozici v této práci.

Literatura

- [1] J. B. Little. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **21**(3):397–404, (2000).
- [2] W. Jacobi. The concept of the effective dose a proposal for the combination of organ doses. *Radiation and Environmental Biophysics*, **12**(2):101–109, (1975).
- [3] E. S. Kempner and H. Haigler. The influence of low temperature on the radiation sensitivity of enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **257**(22):13297–13299, (1982).
- [4] R. Ridolfi. *Study of the track reconstruction in the FOOT experiment for Hadron-therapy*. Diploma thesis, Department of Physics and Astronomy, School of Science, University of Bologna, (2018).
- [5] D. Becker, A. Adhikary, and M. Sevilla. *The Role of Charge and Spin Migration in DNA Radiation Damage*. Springer, Berlin, Heidelberg, (1970).
- [6] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer. *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg, (2018).
- [7] M. K. Campbell and S. O. Farrell. *Biochemistry*. Brooks Cole; 6th edition, (2009).
- [8] F. Crick. The structure of the hereditary material. *Scientific American*, **191**(4):54–61, (1954).
- [9] R. Franklin and R. Gosling. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, **171**(4356):740–741, (1953).
- [10] L. Pray. Discovery of DNA structure and function: Watson and crick. *Nature Education*, **1**(1):100, (2008).
- [11] M. Shintani, Z. Sanchez, and K. Kimbara. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, **6**:242, (2015).
- [12] J. Falkinham and J. Crawford. Plasmids. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*, pages 185–198, (1994).
- [13] R. K. Murray, D. K. Granner, P. Mayes, and V. Rodwell. *Illustrated biochemistry*. McGraw-Hill Medical; 32th edition, (2003).
- [14] M. Stawowczyk, S. Van Scoy, K. Kumar, and N. Reich. The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(9):7257–7266, (2011).
- [15] Z. Šípál and P. Anzenbacher. *Biochemie*. Státní pedagogické nakladatelství, (1992).
- [16] C. Samaniego Velasco. *The Post-antibiotic Era: Looking for alternatives*. Diplomová práce, Department of Microbiology and Parasitology, Pharmacy Faculty, Sevilla University, (2021).

- [17] S. T. Abedon. *Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses*. Cambridge University Press; 1st edition, (2008).
- [18] P. Domingo-Calap, P. Georgel, and S. Bahram. Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *The Official Journal of the European Federation for Immunogenetics*, **87**(3):133–140, (2016).
- [19] G. Agrios. *Plant Pathology*. Academic Press; 5th edition, (2005).
- [20] P. Rettberg and L. Rothschild. Ultraviolet radiation in planetary atmospheres and biological implications. *Astrobiology. The Quest for the Conditions of Life*, pages 233–243, (2002).
- [21] P. Klán. *Organická fotochemie*. Vydavatelství MU, Brno, (2001).
- [22] R Latarjet. Interaction of radiation energy with nucleic acids. *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, **8**(1):1–38, (1972).
- [23] J. L. Pecourt, J. Peon, and B. Kohler. DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides. *Journal of the American Chemical Society*, **123**(42):10370–10378, (2001).
- [24] RG. Ahmed. Damage pattern as function of various types of radiations. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, **15**(4):135–147, (2005).
- [25] Ch. S. Foote. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, **54**(5):659–659, (1991).
- [26] D. Jones and B. Baxter. Bipyrimidine signatures as a photoprotective genome strategy in g+ c-rich halophilic archaea. *Life*, **6**(3):37, (2016).
- [27] A. McCullough, M. Romberg, S. Nyaga, Y. Wei, T. Wood, J. Taylor, J. Van Eten, M. Dodson, and R. Lloyd. Characterization of a Novel cis-synandtrans-syn-(II)Pyrimidine Dimer Glycosylase/AP Lyase from a Eukaryotic Algal Virus, *Paramecium bursaria chlorellaVirus-1*. *Journal of Biological Chemistry*, **273**(21):13136–13142, (1998).
- [28] J. Ravanat, T. Douki, and J. Cadet. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **63**(1-3):88–102, (2001).
- [29] J. S. Taylor and M. P. Cohrs. DNA, Light, and Dewar pyrimidinones: the structure and biological significance to TpT3. *Journal of the American Chemical Society*, **109**(9):2834–2835, (1987).
- [30] J. Kiefer. *Biological Radiation Effects*. Springer Science and Business Media; 1st edition, (2012).
- [31] J. Jakhlal, C. Denhez, S. Coantic-Castex, A. Martinez, D. Harakat, T. Douki, D. Guillaume, and P. Clivio. SN-and NS-puckered sugar conformers are precursors of the (6–4) photoproduct in thymine dinucleotide. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **20**(11):2300–2307, (2022).

- [32] C. von Sonntag. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London, (1987).
- [33] R. Wood. DNA repair in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, **65**(1):135–167, (1996).
- [34] D. Goodhead. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology*, **65**(1):7–17, (1994).
- [35] M. Frankenberg-Schwager. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiotherapy and Oncology*, **14**(4):307–320, (1989).
- [36] J. Kavanagh, K. Redmond, G. Schettino, and K. Prise. DNA double strand break repair: a radiation perspective. *Antioxidants and Redox Signaling*, **18**(18):2458–2472, (2013).
- [37] R. Roots and S. Okada. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in X-ray-induced DNA strand breaks or killing of mammalian cells. *Radiation Research*, **64**(2):306–320, (1975).
- [38] E. Friedberg, G. Walker, W. Siede, and R. Wood. *DNA repair and mutagenesis*. American Society for Microbiology Press; 2nd edition, (2005).
- [39] S. Botchway, D. Stevens, M. Hill, T. Jenner, and P. O’neill. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in Chinese hamster V79-4 cells irradiated with characteristic aluminum K and copper L ultrasoft X rays. *Radiation Research*, **148**(4):317–324, (1997).
- [40] G. Stark. The effect of ionizing radiation on lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, **1071**(2):103–122, (1991).
- [41] J. Millard, M. Weidner, S. Raucher, and P. Hopkins. Determination of the DNA crosslinking sequence specificity of reductively activated mitomycin C at single-nucleotide resolution: deoxyguanosine residues at CpG are crosslinked preferentially. *Journal of the American Chemical Society*, **112**(9):3637–3641, (1990).
- [42] W. Lennarz and M. Lane. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Academic Press; 2nd edition, (2013).
- [43] C. Avendaño and J. Menendez. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Elsevier Science; 2nd edition, (2015).
- [44] B. Balasubramanian, W. Pogożelski, and T. Tullius. DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(17):9738–9743, (1998).
- [45] B. Aydoğan, W. Bolch, S. Swarts, J. Turner, and D. Marshall. Monte Carlo simulations of site-specific radical attack to DNA bases. *Radiation Research*, **169**(2):223–231, (2008).

- [46] K. Sharma, S. Swarts, and W. Bernhard. Mechanisms of direct radiation damage to DNA: the effect of base sequence on base end products. *The Journal of Physical Chemistry B*, **115**(16):4843–4855, (2011).
- [47] M. Porro and M. Greenberg. DNA double strand cleavage via interstrand hydrogen atom abstraction. *Journal of the American Chemical Society*, **135**(44):16368–16371, (2013).
- [48] M. Porro, Ch. Saint-Pierre, D. Gasparutto, and J. Ravanat. Solid-phase synthesis of branched oligonucleotides containing a biologically relevant dCyd341 interstrand crosslink DNA lesion. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **18**(10):1892–1899, (2020).
- [49] J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, and J. Ravanat. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **531**(1-2):5–23, (2003).
- [50] A. Colson and M. Sevilla. Application of molecular orbital theory to the elucidation of radical processes induced by radiation damage to DNA. *Theoretical and Computational Chemistry*, **8**:245–277, (1999).
- [51] L. Vyšín. *Vliv dávkového příkonu na radiační poškození biologických soustav hustě a řídky ionizujícím zářením*. Dizertační práce, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, (2019).
- [52] A. Adhikary, A. Malkhasian, S. Collins, J. Koppen, D. Becker, and M. Sevilla. UVA-visible photo-excitation of guanine radical cations produces sugar radicals in DNA and model structures. *Nucleic Acids Research*, **33**(17):5553–5564, (2005).
- [53] M. Debije and W. Bernhard. Thermally stable sites for electron capture in directly ionized DNA: free radicals produced by the net gain of hydrogen at C5/C6 of cytosine and thymine in crystalline oligodeoxynucleotides. *The Journal of Physical Chemistry A*, **106**(18):4608–4615, (2002).
- [54] P. O’Neill, A. Al-Kazwini, E. Land, and EM. Fielden. Early chemical events in the development of radiation damage of DNA—novel approaches. *Radiation Research*, pages 125–140, (1991).
- [55] M. Greenberg. *Radical and Radical Ion Reactivity in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley and Sons, 1st edition, (2009).
- [56] K. Hieda. DNA damage induced by vacuum and soft X-ray photons from synchrotron radiation. *International Journal of Radiation Biology*, **66**(5):561–567, (1994).
- [57] S. Mikio. Wavelength dependence of the photodecomposition of 2-deoxythymidylyl-(3’→5’)-2’-deoxythymidine, dTpdT, irradiated by monochromatic vacuum-UV photons above 50 nm. *Photochemistry and Photobiology*, **57**:950–957, (1993).

- [58] H. Yamada and K. Hieda. Wavelength dependence (150–290 nm) of the formation of the cyclobutane dimer and the (6–4) photoproduct of thymine. *Photochemistry and Photobiology*, **55**(4):541–548, (1992).
- [59] T. Inagaki, R. Hamm, E. Arakawa, and L. Painter. Optical and dielectric properties of DNA in the extreme ultraviolet. *The Journal of Chemical Physics*, **61**(10):4246–4250, (1974).
- [60] W. Sontag and K. Weibezahn. Absorption of DNA in the region of vacuum-uv (3–25 eV). *Radiation and Environmental Biophysics*, **12**(3):169–174, (1975).
- [61] S. Pimblott and J. LaVerne. Production of low-energy electrons by ionizing radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, **76**(8-9):1244–1247, (2007).
- [62] E. Alizadeh and L. Sanche. Precursors of solvated electrons in radiobiological physics and chemistry. *Chemical Reviews*, **112**(11):5578–5602, (2012).
- [63] P. Dugal, M. Huels, and L. Sanche. Low-energy (5-25 ev) electron damage to homo-oligonucleotides. *Radiation Research*, **151**(3):325–333, (1999).
- [64] M. Folkard, K. Prise, B. Vojnovic, S. Davies, M. Roper, and B. Michael. Measurement of DNA damage by electrons with energies between 25 and 4000 eV. *International Journal of Radiation Biology*, **64**(6):651–658, (1993).
- [65] X. Lu, T. He, Z. Han, Y. Ding, L. Zhao, G. Liu, F. De Smet, X. Huang, D. Chen, and F. Qi. Production of lentiviral vectors in suspension cells using low proportion of supercoiled circular plasmid deoxyribonucleic acid. *Cytotechnology*, **72**(6):897–905, (2020).
- [66] R. Cowan, Ch. Collis, and G. Grigg. Breakage of double-stranded DNA due to single-stranded nicking. *Journal of Theoretical Biology*, **127**(2):229–245, (1987).
- [67] S. McMahon and F. Currell. A robust curve-fitting procedure for the analysis of plasmid DNA strand break data from gel electrophoresis. *Radiation Research*, **175**(6):797–805, (2011).
- [68] V. Múčka. *Aplikace radiačních metod*. České vysoké učení technické, skripta FJFI, Praha, (1992).
- [69] M. Tamada. Radiation processing of polymers and its applications. *Radiation Applications*, **7**:63–80, (2018).
- [70] D. Fluke. Temperature dependence of ionizing radiation effect on dry lysozyme and ribonuclease. *Radiation Research*, **28**(3):677–693, (1966).
- [71] W. Falconer and R. Salovey. Comparison of Radical and Nonradical Processes in the Condensed-Phase Radiolysis of n-Hexadecane. *The Journal of Chemical Physics*, **44**(9):3151–3161, (1966).
- [72] C. Fewtrell, E. Kempner, G. Poy, and H. Metzger. Unexpected findings from target analysis of immunoglobulin E and its receptor. *Biochemistry*, **20**(23):6589–6594, (1981).

- [73] R. Vollmer and D. Fluke. Temperature dependence of ionizing radiation effect on dry hyaluronidase. *Radiation Research*, **31**(4):867–875, (1967).
- [74] C. Bachofer, C. Ehret, S. Mayer, and E. Powers. The influence of temperature upon the inactivation of a bacterial virus by X-rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **39**(8):744–750, (1953).
- [75] H. Tomita, M. Kai, T. Kusama, and Y. Aoki. Strand break formation in plasmid DNA irradiated in aqueous solution: effect of medium temperature and hydroxyl radical scavenger concentration. *Journal of Radiation Research*, **36**(1):46–55, (1995).
- [76] E. Kempner, R. Wood, and R. Salovey. The temperature dependence of radiation sensitivity of large molecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **24**(10):2337–2343, (1986).
- [77] I. Prokopová. *Makromolekulární chemie*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, (2004).
- [78] Y. Tabata and A. Oshima. Temperature dependence of radiation effects on polymers. *Journal of Polymer Science*, 143:337–358, (1999).
- [79] E. Kempner, R. Wood, and R. Salovey. The temperature dependence of radiation sensitivity of large molecules. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, **24**(10):2337–2343, (1986).
- [80] S. Rosypal. *Úvod do molekulární biologie*. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity; 2. vydání, (1997).
- [81] J. Keer and L. Birch. *Essentials of Nucleic Acid Analysis: a robust approach*. Royal Society of Chemistry; 1st edition, (2008).
- [82] S. Heinbuch, M. Grisham, D. Martz, and J. Rocca. Demonstration of a desktop size high repetition rate soft X-ray laser. *Optics Express*, **13**(11):4050–4055, (2005).
- [83] L. Vyšín, T. Burian, J. Chalupský, M. Grisham, V. Hájková, S. Heinbuch, K. Jakubczak, D. Martz, T. Mocek, and P. Pira. Characterization of the focused beam of desktop 10-hz capillary-discharge 46.9-nm laser. *The International Society for Optical Engineering*, **7361**:164–171, (2009).
- [84] J. Chalupský, T. Burian, M. Grisham, V. Hájková, S. Heinbuch, K. Jakubczak, L. Juha, T. Mocek, P. Pira, J. Polan, J. J. Rocca, B. Rus, J. Sobota, and L. Vyšín. Fokusaný svazek stolního repetičního kapilárního laseru na 46,9 nm. *Československý časopis pro fyziku*, **58**(5):234–237, (2008).
- [85] D. Ficek. *Regulátor teploty laboratorní testovací komory*. Bakalářská práce, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Univerzita Pardubice, (2023).
- [86] H. Lee. *Thermoelectrics: Design and Materials*. John Wiley and Sons Inc; Illustrated edition, (2023).

- [87] J. Timms and R. Cramer. Difference gel electrophoresis. *Proteomics*, **8**(23 - 24):4886–4897, (2008).
- [88] S. Rosypal. *Úvod do molekulární biologie*. Brno; 2. vydání, (2005).
- [89] E. Kočárek. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. Scientia, (2008).
- [90] K. Mullis. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262**(4):56–65, (1990).
- [91] Ch. Bengra, Th. Mifflin, Y. Khripin, P. Manunta, S. Williams, P. Jose, and R. Felder. Genotyping of essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogeneous pcr method with universal energy transfer primers. *Clinical Chemistry*, **48**(12):2131–2140, (2002).
- [92] I. Valášková and L. Lysková. *Real-time PCR a jeho využití v klinické molekulární diagnostice*. Bakalářská práce, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, (2008).
- [93] Ch. Sibley, G. Peirano, and D. Church. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**(3):505–521, (2012).
- [94] B. Tomanová. *PCR v reálném čase a její využití v potravinářství*. Bakalářská práce, Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Brno, (2015).
- [95] R. Gallet, S. Kannoly, and I. Wang. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. *BMC Microbiology*, **11**:1–16, (2011).

Příloha A: Model McMahona a Currella

V této příloze je zahrnutý Python kód pro provedení fitu:

```
import numpy as np
import pandas as pd
from scipy.optimize import fmin
from matplotlib import pyplot as plt

# datafile must be in the same directory as the script
file = 'plazmid_chlazený_test.txt'

data = pd.read_csv(file, sep = ",")
x = data["Pulses"].to_numpy()
Measured_data = data[['REL', 'LIN', 'SUP']].to_numpy()
y0 = Measured_data[0,:]

def model(x,y0,params):

    R0, L0, S0 = y0
    f, alpha, beta = params
    rho = 2.29E-04
    S0 = 0.774
    R0 = 0.212
    L0 = 0.0

    S = S0*(1-f)*np.exp(-(alpha+beta)*x)+S0*f
    R = (R0+S0)*(1-f)*np.exp(-(0.5*alpha**2*rho*x**2+beta*x))-
    S0*(1-f)*np.exp(-(alpha+beta)*x)+R0*f
    L = (R0+S0)*(1-f)*(1-np.exp(-(0.5*alpha**2*rho*x**2+beta*x)))+L0

    return np.array([R,L,S]).T

def ChiSq(params):
    # returns chi square difference between experimental and modelled
    data
    Model_data = model(x,y0,params)
    return ((Model_data-Measured_data)**2).sum()

# f, alpha, beta (initial values for fitting)
params = (0, 1.79E-3, 5.66E-5)
```

```

Model_data = model(x,y0,params)

# fitting (minimizes the ChiSq output)
opt_params = fmin(ChiSq, params, full_output=0, disp=1)

# smooth data for plotting
x_smooth = np.linspace(x.min(), x.max(), 2000)
Model_data_opt = model(x_smooth,y0,opt_params)

lab = ('Relaxovaná', 'Lineární', 'Supercoiled')
e = '(experimentální)'
m = '(model)'

# plot data
#plt.plot(data['Pulses'], data['REL'], 'go', label=lab[0]+e)
plt.errorbar(data['Pulses'], data['REL'],
yerr=data["error_C"].tolist(),fmt="o", color='g', lw=1, capsize=2)
#plt.plot(data['Pulses'], data['LIN'], 'bo', label=lab[1]+e)
plt.errorbar(data['Pulses'], data['LIN'],
yerr=data["error_L"].tolist(),fmt="o", color='b', lw=1, capsize=2)
#plt.plot(data['Pulses'], data['SUP'], 'ro', label=lab[2]+e)
plt.errorbar(data['Pulses'], data['SUP'],
yerr=data["error_S"].tolist(), fmt="o", color='r', lw=1, capsize=2)

# plot fitted function
plt.plot(x_smooth, Model_data_opt[:,0], 'g--', label=lab[0]+m)
plt.plot(x_smooth, Model_data_opt[:,1], 'b--', label=lab[1]+m)
plt.plot(x_smooth, Model_data_opt[:,2], 'r--', label=lab[2]+m)
plt.legend()
plt.xlabel('Fluence fotonů / x1015 cm-2')
plt.ylabel('Frakce forem plazmidové DNA')
plt.title('Ozařování při chlazení')
plt.xlim(-0.03)
plt.ylim(-0.03)
plt.show()

```

Příloha B: Model pro stanovení fluence fotonů

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.optimize import fmin
from scipy.integrate import.simps

def TEM(params):
    x0, y0, A, a, w, phi0 = params
    X, Y = np.meshgrid(x-x0,y-y0,indexing='ij')
    R = np.sqrt(X**2+Y**2)
    Phi = np.arctan2(Y,X)
    def tem00alt(a,w,phi0,r,phi):
        rho = 2*r**2/w**2
        tem = rho*(a*(np.cos(phi-phi0)-1)+1)*np.exp(-rho)
        return tem
    return A*tem00alt(a,w,phi0,R,Phi)

def ChiSq(params):
    return ((TEM(params)-real_tem)**2).sum()

imagefname = 'AVG_Stack_low_corr.jpg'
real_tem = plt.imread(imagefname)
real_tem = real_tem[:, :, :3].mean(axis=2) # to grayscale

# resolution (from CCD dimensions)
res = 0.067 # mm/px (with low resolution image)
# number of image points
nx, ny = real_tem.shape
# beam center
x0, y0 = 20, 20

x = np.linspace(-nx/2, nx/2, nx)
y = np.linspace(-ny/2, ny/2, ny)

iparams = (0,0,100,0.4,50,4.7)

# test_tem = TEM(iparams)

optparams = fmin(ChiSq, iparams, full_output=0, disp=1)
opt_tem = TEM(optparams)
```

```

opt_tem_norm = opt_tem/simps(simps(opt_tem, y-y0), x-x0)

plt.figure()
plt.set_cmap('viridis')
plt.subplot(121)
plt.axis('off')
plt.imshow(real_tem)
plt.title('CCD TEM image')
plt.subplot(122)
plt.axis('off')
plt.imshow(opt_tem)
plt.title('Fitted TEM')

sample = np.zeros([nx,ny])
sample_radius = 0.95 # mm
rs = int(sample_radius/res) # mm (sample size to coords)
# find maximum
xs0, ys0 = np.where(opt_tem_norm==np.max(opt_tem_norm))

# find fraction of normlized intensity over the sample
for xi in range(nx):
    for yi in range(ny):
        if (xi-xs0[0])**2 +(yi-ys0[0])**2 < rs**2:
            sample[xi,yi] = opt_tem_norm[xi,yi]

# integrate
int_frac = simps(simps(sample, y), x)

# calculate result
E = 2.5E-6 # J
Wl = 46.9 # nm
Fluence = int_frac*E/(np.pi*sample_radius**2)/1E-2 # J.cm-2.pulse-1
Flux = Fluence/1.602E-19/(1240/Wl) # photons.cm-2.pulse-1

print('Fraction of intensity over the sample:
{:.2f} %'.format(int_frac*100))
print('Fluence = {:.2f} uJ.cm-2.pulse-1'.format(Fluence*1E6))
print('Fluence = {:.2f} x1E12 photons.cm-2.pulse-1'.format(Flux*1E-12))

```