

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA JADERNÁ A FYZIKÁLNĚ INŽENÝRSKÁ

KATEDRA JADERNÉ CHEMIE



**CHEMICKÉ METODY OCHRANY ŽIVÝCH BUNĚK
PŘED ÚČINKY RTG ZÁŘENÍ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VOJTĚCH KAZDA

AKADEMICKÝ ROK: 2023/2024

VEDOUCÍ PRÁCE: ING. IVETA TEREZIE HOŠNOVÁ

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Kazda** Jméno: **Vojtěch** Osobní číslo: **495536**
Fakulta/ústav: **Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská**
Zadávací katedra/ústav: **Katedra jaderné chemie**
Studijní program: **Aplikace přírodních věd**
Studijní obor: **Jaderná chemie**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Chemické metody ochrany živých buněk před účinky RTG záření

Název bakalářské práce anglicky:

Chemical methods for protection of living cells against the effects of X rays

Pokyny pro vypracování:

1. Rešeršní práce: přehled používaných metod na ochranu buněk vůči rentgenovému záření, přehled dávkových příkonů, dávek RTG záření používaných v praxi
2. Chemická dozimetrie místního rentgenového ozařovače, porovnání a nalezení vhodného chemického dozimetru pro RTG záření
3. Práce v mikrobiologické laboratoři, specifické zacházení s buňkami, které na katedře jsou k dispozici (sterilita prostředí, kultivace buněk)
4. Sledování ochrany buněk pomocí vychytávačů radikálů před účinky RTG záření v závislosti na dávce a dávkovém příkonu
5. Vyhodnocení získaných dat a sepsání práce.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Motl, A. Úvod do radiační chemie, 2. vyd. Praha: Vydavatelství ČVUT, 2004, 219 s. ISBN 80-01-02929-8.
- [2] Patrick, M. H. Repair-induced Changes in Yeast Radiosensitivity. Journal of Bacteriology, 1968, vol. 95, str. 1350-1354.
- [3] Hirayama, R.; Ito, A.; Noguchi, M.; Matsumoto, Y.; Uzawa, A.; Kobashi, G.; Okayasu, R.; Furusawa, Y. OH Radicals from the indirect action of X – rays induced cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. Radiation Research, 2013, vol. 180, str. 514-523.
- [4] Můčka, V.; Bláha, P.; Čuba, V.; Červenák, J. Influence of various scavengers of OH radicals on the radiation sensitivity of yeast and bacteria. International Journal of Radiation Biology, 2013, vol. 89, str. 1045-1052.

Jméno a pracoviště vedoucí(ho) bakalářské práce:

Ing. Iveta Terezie Hošnová katedra jaderné chemie FJFI

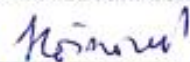
Jméno a pracoviště druhé(ho) vedoucí(ho) nebo konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Barbora Neužilová katedra jaderné chemie FJFI

Datum zadání bakalářské práce: **20.10.2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **02.08.2023**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.10.2024**



Ing. Iveta Terezie Hošnová
podpis vedoucí(ho) práce



podpis vedoucí(ho) ústavu/katedry



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



III. PŘEVZETÍ ZADÁNÍ

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

29.10.2022

Datum převzetí zadání



Podpis studenta

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Chemické metody ochrany živých buněk před účinky RTG záření“ vypracoval samostatně pod odborným vedením Ing. Ivety Terezie Hošnové. Dále prohlašuji, že všechny zdroje informací byly řádně citovány a jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Praze dne: 2. 8. 2024



.....
Vojtěch Kazda

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji všem, kteří mně pomohli s vypracováním této práce, především Ing. Ivetě Terezii Hošnové za výborné vedení a odbornou pomoc v průběhu celé práce, Ing. Barboře Neužilové za názorné vysvětlení práce v mikrobiologické laboratoři a Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za konzultaci k vypracování práce.

Vojtěch Kazda

Název práce: Chemické metody ochrany živých buněk před účinky RTG záření

Autor: Vojtěch Kazda

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Iveta Terezie Hošnová, České vysoké technické učení v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra jaderné chemie

Konzultant práce: Ing. Barbora Neužilová, České vysoké technické učení v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, Katedra jaderné chemie

Abstrakt:

Tato práce se zabývá vlivem přítomnosti ethanolu, jakožto vychytávače $\text{OH}\cdot$ radikálů, na radiační citlivost buněk *Saccharomyces cerevisiae* na rentgenové záření.

Snížení radiační citlivosti buněk lze využít při ochraně buněk před účinky ionizujícího záření, naopak zvýšení radiační citlivosti se uplatní například při sterilizačních procesech. Zvolené koncentrace ethanolu byly 0; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 a 2 mol · dm⁻³. Pro tyto koncentrace bylo zvoleno proudové nastavení na rentgence jako 12; 16 a 20 mA při napětí 195 kV. Pro zjištění hodnoty dávkového příkonu, a tudíž i dávky, byla provedena chemická dozimetrie pomocí Frickeho dozimetru. Používané *Saccharomyces cerevisiae* byl haploidní kmen DBM 272 párovacího typu *a*.

Získané výsledky byly prezentovány jako závislost ochranné účinnosti ethanolu σ , definované jako podíl logaritmů přeživších frakcí buněk bez ethanolu (S_0) a s ethanolem (S_S), na vychytávací účinnosti ethanolu Q , definované jako součin rychlostní konstanty reakce ethanolu s $\cdot\text{OH}$ radikálem (k_{OH}) a koncentrace ethanolu (C_{EtOH}). Z této závislosti byly lineárním proložením získány směrnice pro každý dávkový příkon. Tyto směrnice v závislosti na dávkovém příkonu poté prezentují závislost radiační citlivosti na dávkovém příkonu.

Klíčová slova: *Saccharomyces cerevisiae*, rentgenové záření, vychytávače $\cdot\text{OH}$ radikálů

Title: Chemical methods for protection of living cells against the effects of X-rays

Author: Vojtěch Kazda

Field of study: Nuclear chemistry

Type of thesis: Bachelor degree project

Supervisor: Ing. Iveta Terezie Hošnová, Czech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry

Consultant: Ing. Barbora Neužilová, Czech Technical University in Prague, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Department of Nuclear Chemistry

Abstract:

This bachelor's degree project deals with the effect of the presence of ethanol, as a scavenger of OH· radicals, on radiation sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* cells to X-rays.

A decrease in the radiation sensitivity of cells can be used to protect cells from the effects of ionizing radiation, while an increase in radiation sensitivity can be used, for example, in sterilization processes. The ethanol concentrations selected were 0; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 and 2 mol · dm⁻³. For these concentrations, the current setting on the X-ray tube was chosen as 12; 16 and 20 mA at a voltage of 195 kV. Chemical dosimetry was performed to determine the value of the dose rate and therefore the dose. For this purpose, a Fricke dosimeter was used. The *Saccharomyces cerevisiae* used was the haploid strain DBM 272 of mating type *a*.

The obtained results were presented as a dependence of the protective efficiency of ethanol σ , defined as a quotient of logarithms of the surviving fractions of cells without ethanol (S_0) and with ethanol (S_S), on the scavenging efficiency of ethanol Q , defined as the product of the rate constant of the reaction of ethanol with the ·OH radical (k_{OH}) and concentration of ethanol (C_{EtOH}). From this dependence, slopes for each dose rate were obtained by linear fitting. These slopes, depending on the dose rate, present the dependence of the radiation sensitivity on the dose rate.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, X-ray, scavengers of ·OH

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část	11
2.1	Mikroorganismy	11
2.1.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.1.2	Růstové křivky	12
2.1.3	Stanovení počtu buněk	14
2.2	Ionizující záření.....	15
2.2.1	Rentgenové záření	15
2.2.2	Vliv rentgenového záření na živé buňky	16
2.3	Chemická dozimetrie	18
2.3.1	Radiolýza vody	18
2.3.2	Frickeho dozimetr	19
2.4	Přehled dávkových příkonů a dávek RTG záření v praxi	20
2.5	Chemické metody na ochranu buněk před RTG zářením	21
2.5.1	Vychytávače ·OH radikálů	23
3	Experimentální část	25
3.1	Použité mikroorganismy a chemikálie	25
3.2	Příprava živných půd, fyziologických roztoků a sterilizace	25
3.3	Přeočkování kultury a počítání kolonií	28
3.4	Průběh experimentu se <i>S. cerevisiae</i>	28
3.5	Příprava Frickeho dozimetru a chemická dozimetrie	32

3.6	Vyhodnocování experimentálních dat.....	33
3.6.1	Frickeho dozimetrie	33
3.6.2	Ochranná účinnost EtOH	34
4	Výsledky a diskuze.....	35
4.1	Dozimetrie RTG zdroje	35
4.2	Ochranná účinnost EtOH.....	40
5	Závěr	51
6	Literatura.....	52
7	Příloha.....	58
7.1	Ukázka závislosti absorpance na dávce	58
7.2	Ukázka počtu kolonií	58

1 ÚVOD

Ionizující záření je všudypřítomné v celém vesmíru. Jeho studium umožnilo lidstvu obrovský posun v mnoha odvětvích. Příkladem budiž uvedena jaderná energetika, lékařství (radiofarmaka, ozařování tumorů, zobrazovací techniky), průmyslové technologie (defektoskopie), zemědělské a potravinářské technologie (sterilizace) a jiné.

Ionizující záření, jak je z názvu patrné, způsobuje při interakci s živými buňkami ionizaci atomů či molekul; samozřejmě dochází i k dalším jevům, jako je například excitace. Ionizované atomy či molekuly poté mohou narušit strukturu součástí buněk a tím způsobit jejich poškození nebo zničení. K ionizaci atomů či molekul může dojít přímo v některé struktuře buňky. Na důležité struktury buňky může ovšem ionizující záření působit i nepřímo, a to působením produktů z radiolýzy vody. Při tomto procesu dochází ke vzniku volných radikálů, mezi které patří $\cdot\text{OH}$ radikály. Některé chemické sloučeniny, příkladem lze uvést amifostin, methanol, ethanol a dimethylsulfoxid mohou za určitých podmínek chránit buňky před ionizujícím zářením. Jedním z možných vysvětlení této ochrany je schopnost reagovat se vzniklými $\cdot\text{OH}$ radikály, tedy snižovat množství interakcí radikálů se strukturami živých buněk, a tudíž i snižovat jejich radiační citlivost. (Múčka, 2013) Tyto látky jsou poté označovány jako vychytávače $\cdot\text{OH}$ radikálů.

Radiační citlivost živých buněk má své uplatnění jak při jejím zvýšení, tak i snížení. Zvýšení radiační citlivosti je výhodné tam, kde chceme letální účinky ionizujícího záření zvýšit, například sterilizační procesy. Naopak její snížení je chtěné v procesech, ve kterých nechceme živé buňky poškodit působením ionizujícího záření.

Cílem této práce je zjistit závislost radiační citlivosti živých buněk kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* vůči rentgenovému záření na koncentraci ethanolu působícího jako vychytávač $\cdot\text{OH}$ radikálů v suspenzi s kvasinkami. Toto téma navazuje na dlouholetý výzkum bioradiační chemie na Katedře jaderné chemie při FJFI ČVUT v Praze. Pro jednotlivé koncentrace ethanolu včetně nulové byly počítány přeživší frakce buněk po ozáření. Přeživší frakce byly stanoveny počítáním životaschopných kolonií. Jako zdroj ionizujícího záření byl použit rentgenový zdroj SCIOX Beam s napěťovým nastavením 195 kV a třemi proudovými nastaveními 12, 16 a 20 mA. K charakterizaci byla provedena chemická dozimetrie Frickeho dozimetrem.

Tato práce byla řešena v rámci projektu OP VVV č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000778, CAAS – Centrum pokročilých aplikovaných věd a grantu studentské grantové soutěže ČVUT, SGS23/189/OHK4/3T/14 - Nanokompozitní materiály: syntéza, modifikace a využití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroorganismy

Za mikroorganismy považujeme organismy neviditelné pouhým okem. Tato běžná definice ovšem neplatí pro všechny mikroorganismy. Například některé chlebové plísně, které tvoří shluky buněk, nebo některé obří bakterie jsou viditelné pouhým okem. Mikroorganismy jsou obvykle jednobuněčné, ovšem i zde existují výjimky. Od běžných mnohobuněčných organismů je poté v tomto případě odlišuje absence diferencovatelných tkání. K mikroorganismům se také často zařazují nebuněčné entity, jako jsou například viry či viroidy. Dodnes nejpoužívanější základní dělení mikroorganismů vychází z vlastní struktury buněk. Dle ní můžeme dělit mikroorganismy na prokaryotní a eukaryotní. (Willey, 2020)

V moderním systému se organismy dělí na tři domény. Prokaryota jsou rozdělena na domény Archea a Bakterie. Prokaryotní buňky nemají pravé (od okolí dobře ohraničené) jádro a většinou ani jiné membránami oddělené organely. Prokaryotická DNA tvoří komplex s bílkoviny nazývaný nukleoid, označován často jako kruhová DNA.

Eukaryota zastupují poslední třetí doménu. Jejich buňky mají ohraničené, tzv. pravé jádro. Obsahují membránami oddělené organely, mezi něž patří například mitochondrie, chloroplasty či endoplasmatické retikulum. (Kodíček, 2018)

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří do domény eukaryot, říše hub, kmenu vřeckovýtrusných (*Ascomycota*), podkmenu *Saccharomycota*. Vědecký název odkazuje na tvorbu reprodukčních struktur – vřecek (z lat. *ascus*). Askomycety vytvářejí hyfy s přepážkami, jednotlivé buňky tedy sdílejí jednu cytoplazmu. Jsou významnými rozkladači v přírodě, jsou schopny degradovat např. celulózu, lignin, kolagen. Také jsou velmi významné i pro člověka, negativně jakožto plísně potravin či původci nemocí rostlin nebo živočichů včetně lidí, ale i pozitivně jako zdroje potravin nebo nezbytnou součástí jejich výroby. *S. cerevisiae* jsou schopné alkoholového kvašení, které se využívá při výrobě piva či vína a vznikající oxid uhličitý zase v pekárenském odvětví. Některé askomycety mají pouze kvasinkovou formu, zatímco jiné jsou schopny tvorby vláken – plísňové formy.

S. cerevisiae známé jako pivovarské či pekařské kvasnice střídají haploidní a diploidní stavy. Jejich životní cyklus je poměrně dobře prozkoumán. Existují dva párovací typy označované jako "a" a "α". Při dostatku živin podléhají haploidní (tj. typ *a* nebo *α*) i diploidní (tj. typ *a/α*) buňky mitóze (samotný proces dělení je označován jako pučení).

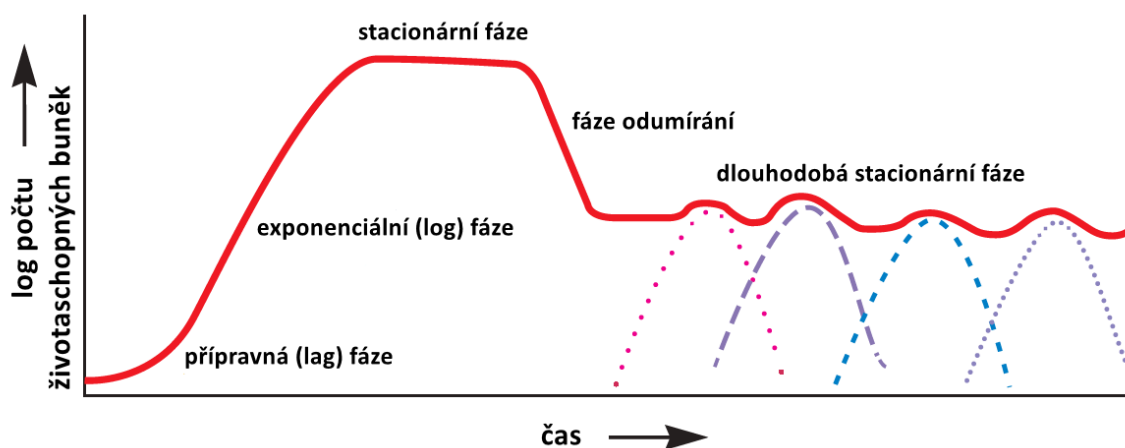
Vzniklé dceřiné buňky mají kompletní sadu chromozomů. Každá dceřiná buňka zanechá po pučení na mateřské buněčné stěně tzv. jizvu. Pokud již není na buněčné stěně žádné místo bez jizvy, tak buňka již není schopna se rozmnožit a zaniká. Pokud je nedostatek živin, podstoupí pouze diploidní buňky meiózu za tvorby 4 haploidních buněk. Při navrácení optimálních podmínek může dojít k splynutí párovacích typů, kterýžto proces je ovlivňován feromony. (Willey, 2020)

S. cerevisiae jsou nesmírně cenným modelovým organismem. Patří mezi snadno dostupné eukaryotické organismy, které se staly významnými například pro studium buněčného cyklu. (Müller, 2010) Obrovská výhoda je lehká manipulovatelnost genů na plazmidech či uvnitř chromozomů a následné pozorování fenotypu. K neposlední řadě lze také zmínit krátkou dobu dělení buněk (při optimálních podmínkách cca 90 minut). (Duina, 2014)

2.1.2 Růstové křivky

V mikrobiologii je růstem mikroorganismů většinou myšlen růst celkové populace daných mikroorganismů než růst samotných buněk, přestože i ten je v některých odvětvích výzkumu důležitý. Populační růst se běžně analyzuje v tekuté (bujónové) kultuře. V laboratořích jsou mikroorganismy obvykle inkubovány v uzavřené nádobě. Čerstvé médium není průběžně poskytováno, a tudíž dochází k jeho postupné spotřebě a tvorbě odpadních látek.

Populační růst mikroorganismů množících se binárním štěpením lze vyjádřit jako počet životaschopných buněk (obvykle v logaritmicím měřítku) v závislosti na čase. Výsledná křivka má několik fází, obvykle se vyznačuje pět až šest fází. Modelová růstová křivka je vidět na Obr. 2.1. Přestože křivka vyobrazuje situaci v laboratoři, tak i v přirozených a mnoha lidmi vytvořených podmínkách (např. fermentační nádoba) se průběh růstu o mnoho neliší. Pochopení růstové křivky je tedy zásadním prvkem při studiu mikrobiologie a příbuzných oborů.



Obr. 2.1: Růstová křivka mikroorganismů v uzavřeném systému (převzato z Willey, 2020)

První fáze je označována jako lag fáze. V této fázi nedochází k rychlému množení buněk, spíše probíhá syntéza buněčných komponent z důvodu stáří nebo poškození buněk, nedostatku ATP, esenciálních kofaktorů a ribosomů. Následně dochází k replikaci DNA a dělení buněk.

Během exponenciální fáze dochází k masivnímu nárůstu počtu daných mikroorganismů, který je omezen pouze vlastní genetickou výbavou a okolními podmínkami. Rychlost přírůstku je konstantní, dochází k pravidelnému zdvojení. V této fázi je populace nejvíce chemicky a fyziologicky jednotná, čehož se využívá v některých experimentech. Rychlost růstu je velmi závislá na množství živin v médiu. Ovšem při vysokých koncentracích živin dochází k saturaci a rychlost růstu dosahuje své limitní hodnoty i přes dostatek živin.

Následná fáze nazývaná jako stacionární se projevuje zastavením populačního růstu. K tomu může docházet z mnoha důvodů. Jedním z důvodů je nedostatek živin. Pro aerobní organismy je také limitní dostatek kyslíku. Problémem může být i akumulace odpadních látek. Někdy je omezení růstu dáno dosažením kritického množství buněk. Například některé bakterie dosahují v sádkové kultuře počtu 10^9 buněk na mililitr, kdežto protisté zhruba 10^6 buněk na mililitr. V této fázi dochází buď k vyrovnání množství nově vzniklých a mrtvých buněk, anebo k zastavení replikace.

Při vyčerpání živin a nahromadění toxických produktů nakonec buňky vstoupí do fáze odumírání. Počet buněk se snižuje exponenciálně, kde rychlost úbytku nabývá konstantní hodnoty.

Některé mikroorganismy, zejména bakterie, přecházejí po určité době fáze odumírání do dlouhodobé stacionární fáze. V této fázi se velikost populace až na malé výkyvy drží konstantní několik měsíců až let. Tato fáze je zajímavá vývojem

mikroorganismů, při kterém dochází k přirozenému výběru geneticky odlišných variant. Daná varianta je v určitou chvíli schopna se nejlépe přizpůsobit podmínkám, tudíž se i množit. Po nějaké době ovšem dojde k převaze jiné varianty. Tento proces způsobuje zmiňované výkyvy ve velikosti populace. (Willey, 2020)

2.1.3 Stanovení počtu buněk

Při mikrobiologických experimentech je velmi často zapotřebí zjistit počet buněk daných mikroorganismů, například pro stanovení letálních účinků ionizujícího záření či prostého určení počtu v potravinářství. Pro zjišťování počtu mikrobiálních buněk se využívá přímé či nepřímé počítání. Jinou možností je také stanovení buněčné hmoty či sledování biochemické aktivity příslušných mikroorganismů. Nejpřesnější jsou metody zjišťující počet buněk. Stanovení buněčné hmoty se používá spíše v kulturách mikroorganismů, tím mohou být kvasné procesy v potravinářském průmyslu. Pozorování biochemické aktivity je vhodné pro rychlé stanovení mikrobiologické čistoty.

Jednou z nepřímých možností stanovení počtu buněk je elektronické počítání buněk. To je založeno na nasávání elektrolytu do nevodivé trubice. Přítomnost buněk v elektrolytu změní vodivost a tato změna je poté zaznamenána přístrojem. Další možností je nefelometrické stanovení počtu buněk. Tato metoda spočívá ve zjištění počtu buněk v čiré kapalině na základě intenzity světla rozptýleného na jednotlivých buňkách.

Jednou z možností přímého počítání buněk, která byla použita i v této práci, je počítání pod mikroskopem na Bürkerově komůrce. Tato komůrka je vlastně speciálně upravené podložní sklíčko s vrypy 0,1 mm hlubokými tvořícími síť čtyřúhelníků. Problémem této metody je potřeba vysoké hustoty mikroorganismů a neodlišitelnost živých a mrtvých buněk (to se týká zejména bakterií), nicméně toto lze vyřešit vhodným obarvením preparátu.

Pro stanovení počtu životaschopných buněk po vlastním experimentu (např. ozáření ionizujícím zářením) lze použít metodu kultivace mikroorganismů. Metoda spočívá v přenášení buněk na vhodnou živnou půdu, kde jsou schopny rozmnožování, a tudíž tvorby kolonií. Výhodou metody je použití pro libovolnou hustotu mikroorganismů, nevýhodou je potřeba delšího času na kultivaci (řádově dny). Další nevýhodou je také fakt, že se počítá počet vzniklých kolonií, nikoliv buněk. Jedna kolonie nemusí vzniknout z jedné buňky nebo v některých případech nemusíme být schopni zajistit vhodné podmínky všem přítomným buňkám, například ve směsi více druhů bakterií. (Demnerová, 2001)

2.2 Ionizující záření

Mezi ionizující záření obecně řadíme všechny druhy záření, které jsou schopné vytvořit v ozářené látce mimo excitovaných stavů i ionizace, tudíž tvorbu párů kladný iont a elektron. Dle vzniku ionizace lze toto záření dělit na přímo a nepřímo ionizující. Mezi přímo ionizující záření patří např. protony, elektrony a těžké ionty. Tyto částice nesou elektrický náboj a jsou tedy schopné přímo vyrážet a strhávat ionty z atomů a molekul ozařované látky. Mezi nepřímo ionizující záření řadíme fotony a neutrony. Tyto částice nemají náboj a k tvorbě nabitých částic dochází až po jejich interakci s ozařovanou látkou. Vzniklé sekundární částice jsou již schopné přímé ionizace. (Motl, 1990)

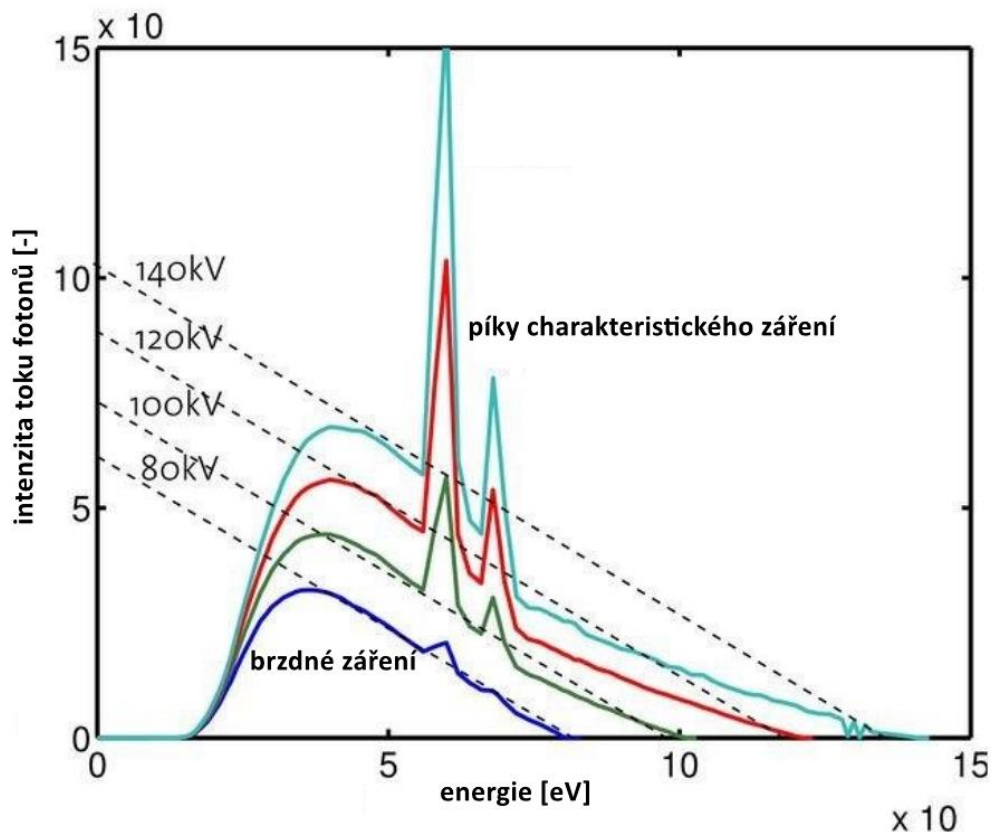
2.2.1 Rentgenové záření

Rentgenové záření je elektromagnetické vlnění s vlnovou délkou v rozsahu zhruba 10^{-12} až 10^{-8} m. Důležitým faktem je, že toto záření vzniká při interakci s elektronovým obalem, a tudíž se nejedná o jaderné záření. (Mikla, 2014)

Rentgenové záření běžně vzniká po dopadu elektronů s vysokou energií nejčastěji na atomy nějakého kovu. Dělí se na dva typy, a to záření brzdné, označované německým názvem Bremsstrahlung a charakteristické. Brzdné záření vzniká vychýlením elektronu atomovým jádrem, a tedy uvolnění části jeho kinetické energie ve formě fotonu. Vyznačuje se spojitým energetickým spektrem. Energie tohoto záření závisí na energii dopadajících elektronů. Charakteristické záření lze ve spektru pozorovat ve formě několika ostrých píků. Tyto píky jsou důsledkem srážky dopadajících elektronů s elektrony vnitřních hladin atomů prvku. Srážka vyrazí elektron z vnitřní hladiny a na jeho místo přeskočí elektron z energeticky vyšší hladiny, jehož přebytečná energie se vyzáří ve formě fotonu. Podle toho, na jakou hladinu elektron seskočí se toto záření značí např. K_{α} ($n = 1$) nebo $L_{\beta 1}$ ($n = 2$) apod. (n značí hlavní kvantové číslo). Indexy ve formě řeckých písmem poté obvykle vyjadřují rozdíl mezi vyšší a nižší hladinou, tudíž v případě K_{α} se jedná o $n = 2$ a v případě $L_{\beta 1}$ došlo k seskoku z hladiny $n = 4$. Každý prvek se vyznačuje odlišným charakteristickým zářením. (Atkins, 2013)

Obecně je vhodné poznamenat, že při interakci elektronu v obalu atomu s dopadajícím elektronem nemusí dojít pouze k tvorbě charakteristického rentgenového záření. Foton uvolněný při přechodu elektronu z vyšší hladiny může být pohlcen jiným elektronem v obalu, který se poté z obalu uvolní. Takto emitované elektrony se nazývají Augerovy. Vyšší poměr emise Augerových elektronů oproti charakteristickému záření je zaznamenán u lehčích prvků. (Majer, 1981)

Na obrázku 2.2 je vzorové spektrum rentgenového záření pro 4 různá napěťová nastavení (80, 100, 120 a 140 kV). Hodnota nastaveného napětí vynásobená hodnotou elementárního náboje udává maximální energii fotonů rentgenového záření. Jsou zde také vyznačeny píky charakteristického záření a brzdné záření. Při použití filtru dojde k absorpci fotonů o nízké energii (fotony s velmi nízkou energií absorbuje samotný zdroj). Vyšší hodnoty nastaveného proudu na zdroji zvyšují celkovou intenzitu toku fotonů. (Kareliotis, 2015)



Obr. 2.2: Spektrum rentgenového záření pro různé hodnoty napětí (převzato z Kareliotis, 2015)

2.2.2 Vliv rentgenového záření na živé buňky

Jak bylo zmíněno v předcházející kapitole, rentgenové záření je nepřímo ionizující. Není tedy schopno primárně narušit atomovou strukturu ozařované látky. Ovšem absorpce energie tohoto záření následně způsobuje tvorbu excitovaných a ionizovaných atomů či molekul. Tyto struktury jsou zodpovědné za poškození živých buněk.

Proces, jakým jsou fotony rentgenového záření absorbovány závisí na jejich energii a chemickém složení ozařované látky. Při vysokých energiích, typických např. pro urychlovače, dominuje Comptonův jev. Při tomto procesu interaguje foton s elektronem o slabé vazebné energii v porovnání s energií fotonu. Tento foton předá část své energie

elektronu ve formě kinetické energie a dále pokračuje ve změněné dráze jako rozptýlený foton s delší vlnovou délkou. Úhel rozptylu závisí na množství předané energie elektronu. Tato hodnota se pohybuje v rozmezí od 0 % do zhruba 80 %. Interagující elektron je tímto urychlen a další interakce urychleného elektronu nebo rozptýleného fotonu závisí na jejich energii.

Při nižších energiích fotonů nabývá na významu fotoelektrický jev. V tomto případě interaguje foton s elektronem vázaným v slupce K, L nebo M a předá mu veškerou svou energii. Část energie je využita na překonání vazebné energie elektronu k opuštění orbitalu a zbylá část zůstane ve formě kinetické energie. Poté co elektron opustí příslušnou energetickou hladinu, dochází k přesunu elektronu z vyšší energetické hladiny na místo vzniklé vakance za uvolnění přebytečné energie ve formě charakteristického záření. V měkkých tkáních má toto charakteristické záření nízkou energii (běžně okolo 0,5 keV) a nemá velký význam v biologickém poškození.

Při využívání rentgenového záření v radiodiagnostice se uplatňují oba procesy. Je důležité zdůraznit závislost jejich hmotnostního absorpčního koeficientu. Zatímco hmotnostní absorpční koeficient pro Comptonův jev je nezávislý na atomovém čísle Z ozařovaného materiálu, tak naopak fotoelektrický jev vykazuje závislost odpovídající přibližně Z^3 . Právě tento fakt zapříčiňuje skutečnost, že rentgenové záření o nižší energii je ve vyšší míře absorbováno v kostech, kde se nachází více prvků s vyšším atomovým číslem jako např. vápník. V radioterapii je preferován Comptonův jev, aby byla absorpce v rozdílných typech tkání přibližně stejná. Proto se v radioterapii obvykle využívají fotony o energii v řádu MeV. Je vhodné podotknout, že většina energie fotonů je přeměněna na kinetickou energii urychlených elektronů a absorpční procesy nemají v radiobiologii velký význam.

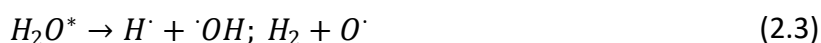
Biologický efekt ionizujícího záření primárně spočívá v poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Toto poškození může způsobit usmrcení buňky, karcinogenezi či mutaci. Záření může interagovat přímo s DNA, to je častější pro záření o vysoké hodnotě lineárního přenosu energie (LET) kam se řadí neutrony či částice α . Druhou možností je interakce záření s jinými atomy či molekulami v buňce, zejména s vodou, jelikož buňka průměrně obsahuje 80 % vody. Popis radiolýzy vody je popsán v kapitole 2.3.1. Vzniklé radikály způsobují většinu biologického poškození, z nichž nejvýznamnější jsou $\cdot\text{OH}$ radikály. Je odhadováno, že dvě třetiny veškerého poškození rentgenovým zářením v savčích buňkách způsobují právě $\cdot\text{OH}$ radikály. Tento závěr byl podložen experimenty s vycytávači $\cdot\text{OH}$ radikálů, které jsou popsány v kapitole 2.5.1. (Hall, 2012)

2.3 Chemická dozimetrie

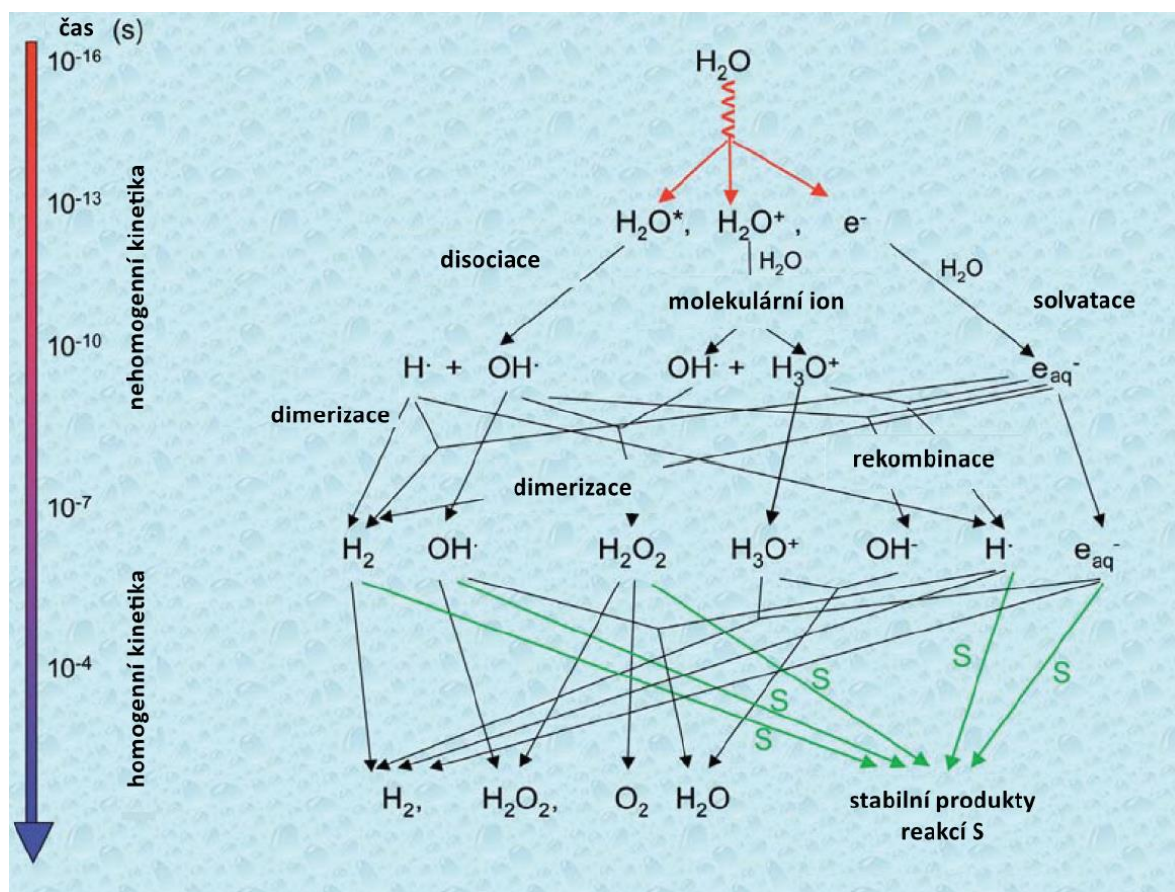
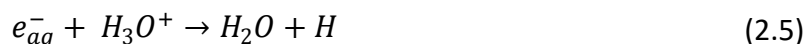
Chemická dozimetrie využívá k určení dávky chemické změny v látce vyvolané ionizujícím zářením. Chemickou dozimetrii lze využít např. v případě radiobiologických studií nebo mapování dávkového příkonu. Mezi chemické dozimetry lze řadit např. ceričito-ceritý dozimetr, který se používá při měření velkých dávek a je považován za referenční při dávce nad 500 Gy. (Kohan, 2014) Za další lze zmínit například alaninový dozimetr. Aminokyselina alanin vytváří při interakci s ionizujícím zářením stabilní radikály, které lze změřit pomocí elektronové spinové rezonanční spektroskopie. (Chen, 2008) Ovšem nejnámější chemický dozimetr je Frickeho dozimetr. Frickeho dozimetrie je široce používaná metoda vhodná i ke stanovení dávky rentgenového záření ve vodných roztocích. Tento dozimetr také prokázal velký potenciál při měření absorbované dávky od zdroje ^{192}Ir , používaného v brachyterapii. (Rosado, 2020)

2.3.1 Radiolýza vody

Při ozařování naředěných vodných roztoků (uvádí se koncentrace rozpuštěné látky do 10 % hmotnosti) ionizující záření interaguje primárně s molekulami vody a pozorované chemické změny jsou důsledkem reakcí vzniklých produktů z procesu radiolýzy vody. Proces radiolýzy vody s kaskádou reakcí je poměrně složitý a je částečně znázorněn na obrázku 2.3. Hlavní reakce jsou uvedeny níže.



Při vystavení vody ionizujícímu záření dochází k tvorbě ionizovaných a excitovaných molekul vody a také volných elektronů, vizte rovnici 2.1. Ionizované molekuly vody dále reagují za vzniku hydroxylových radikálů, vizte rovnici 2.2. Rovnice 2.3 popisuje reakce excitovaných molekul vody. Jejich chemický význam na okolí je ovšem menší než v případě ionizovaných molekul. Vznik tzv. solvatovaného elektronu je znázorněn rovnicí 2.4. Za většinu chemických změn v ozářených roztocích jsou zodpovědné vzniklé radikály, z nichž nejvýznamnější jsou hydroxylové. Co se týče molekulárních produktů, tak vzniklý vodík je prakticky nereaktivní a většinou uniká pryč a peroxid vodíku reaguje poměrně pomalu. Výtěžky produktů uvedených reakcí jsou závislé na pH. Např. při pH 0,46 (což je pH kyseliny sírové při koncentraci $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, tudíž koncentrace odpovídající Frickeho dozimetru) reagují solvatované elektrony okamžitě s oxoniovými ionty, vizte rovnici 2.5. (Gehring, 1997)



Obr. 2.3: Reakce při radiolýze vody (převzato z Spothheim-Maurizot, 2008)

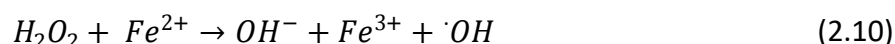
2.3.2 Frickeho dozimetr

Frickeho dozimetr je spolehlivý a nespočtem experimentů prověřený dozimetr. Běžně se jedná o roztok síranu amonno-železnatého (například ve formě hexahdrátu) o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, kyseliny sírové o koncentraci $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a chloridu sodného o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Lze také připravit variantu tzv. super Frickeho dozimetru, kdy je zvýšena koncentrace Fe^{2+} iontů na $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tato verze je vhodná pro vyšší obdržené dávky. (Costa, 2012) Při manipulaci je zapotřebí brát v potaz možnost ozáření roztoku ze slunečního záření, a tudíž ho uchovávat v temnu. Tento dozimetr se dá připravit i v gelové formě přidáním agarózy či želatiny. (Schreiner, 2004)

Kyselina sírová primárně vytváří vhodné pH roztoku, vizte kapitolu 2.3.1, a chlorid sodný potlačuje oxidaci železnatých iontů zejména organickými nečistotami. (Fregene, 1967) Při ozáření dochází k oxidaci iontů Fe^{2+} na ionty Fe^{3+} . Tato závislost je úměrná obdržené dávce záření. Radiačně chemický výtěžek iontů Fe^{3+} je závislý na teplotě (Klassen, 1999) a energii ionizujícího záření. Závislost radiačně chemického výtěžku na

energii záření pro případ této práce byla získána proložením literárních dat G pro záření o různé energii Ing. Ivetou Terezií Hošnovou. (Rosado, 2020), (Salata, 2015), (Muñoz Arango, 2020)

Oxidace Fe^{2+} iontů probíhá několika způsoby. Základní reakce vizte níže.



Rovnice 2.6 popisuje vznik hydroperoxylového radikálu. K tomuto procesu je zapotřebí přístupu kyslíku, proto se Frickeho dozimetr nechává před použitím sytit kyslíkem. V rovnici 2.7 lze pozorovat následnou oxidaci železnatých iontů hydroperoxylovým radikálem. Vzniklý hydroxylový anion dále reaguje za vzniku peroxidu vodíku (rovnice 2.8). Další možnosti oxidace Fe^{2+} iontů lze pozorovat v rovnicích 2.9 a 2.10. (Adamovics, 2019)

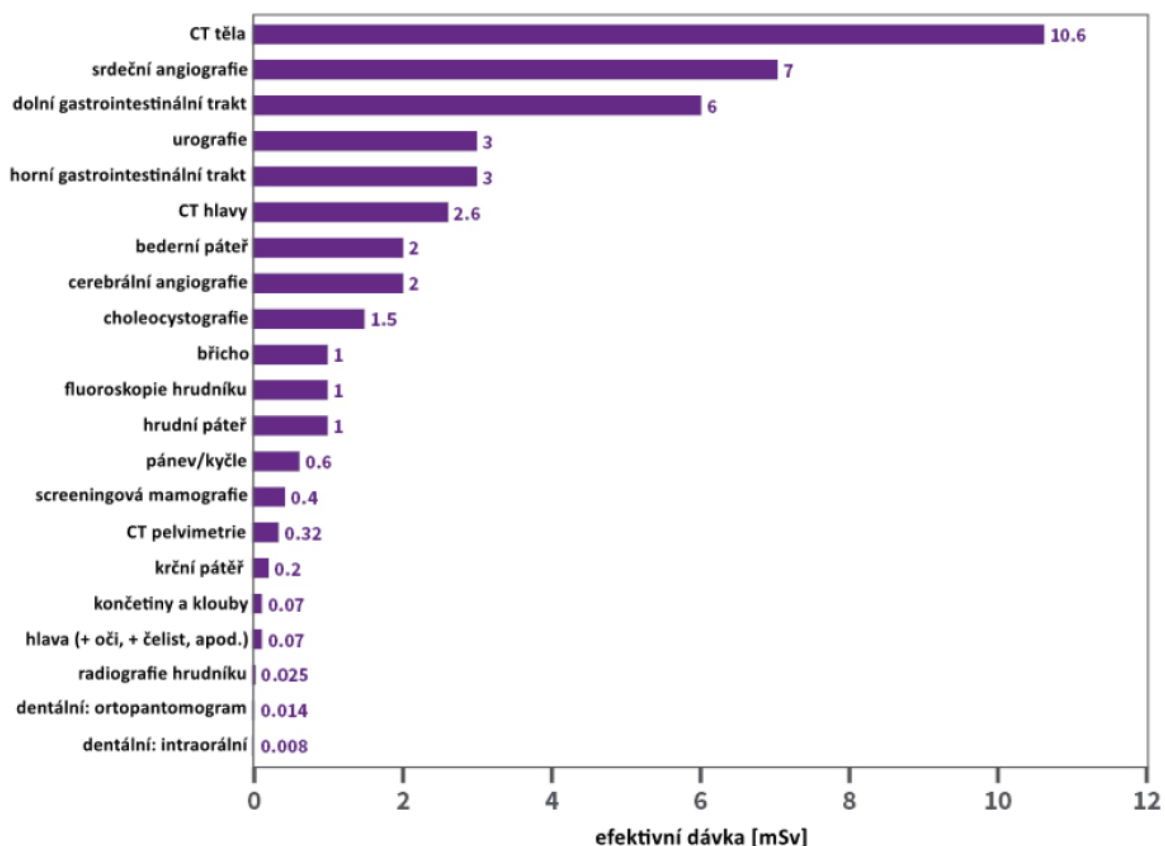
2.4 Přehled dávkových příkonů a dávek RTG záření v praxi

Rentgenové záření má široké užití pro zdravotnické, průmyslové a výzkumné účely. Typické hodnoty efektivních dávek pro vybraná lékařská vyšetření vizte na obrázku 2.4. K nejvýznamnějším přispěvatelům lékařského ozáření patří CT těla, jehož efektivní dávka cca 10 mSv odpovídá zhruba 4 letům ozáření z přírodních zdrojů, jehož celosvětový průměr je asi 2,4 mSv za rok. Individuální roční efektivní dávka lékařského ozáření činí přibližně 0,62 mSv. (UNEP, 2016) Typický dávkový příkon při použití CT se pohybuje v jednotkách $mGy \cdot s^{-1}$. (Novák, 2014) Nejvyšší dávkové příkony jsou dosahovány při použití rentgenové fluoroskopie, a to až $200 mGy \cdot min^{-1}$. (Sherer, 2018)

I v průmyslu je využíváno rentgenové záření v radiografii. Využívá se např. při kontrole zavazadel a kontejnerů. Dalším případem je využití rentgenového záření při defektoskopii.

Mezi využití rentgenového záření ve výzkumu patří např. rentgenová krystalografie a fluoroskopie. (ARPANSA, 2024) Při rentgenové krystalografii se obdržená dávka pohybuje až do hodnoty cca 30 MGy. Takto vysoká dávka může být problém např. pro proteiny, a proto se při jejich analýze používají nižší hodnoty. (Zeldin, 2013), (Borshchevskiy, 2014) Hodnoty dávkového příkonu se poté pohybují až v jednotkách $MGy \cdot s^{-1}$. (Warren, 2019)

typické hodnoty efektivních dávek pro různé lékařské RTG záření



Obr. 2.4: Efektivní dávky pro různé použití RTG záření v lékařství (převzato z ARPANSA, 2024)

2.5 Chemické metody na ochranu buněk před RTG zářením

Existuje široká škála látek, které prokázaly určité účinky ochrany před ionizujícím zářením. První skupinu, která není považována za opravdové radioprotektory, lze potenciálně vymezit jako skupinu látek schopných zajistit hypoxické podmínky, např. vazokonstrikcí, pro buňky v kritických orgánech. Do této skupiny lze zařadit kyanid sodný, oxid uhelnatý, epinefrin či serotonin. (Hall, 2012) Je totiž prokázána snížená radiační citlivost buněk za hypoxických podmínek. Nepřímé poškození DNA způsobené radikály je fixováno za přítomnosti kyslíku tvorbou hůře opravitelných radikálů, vizte rovnici 2.11, kde R^\cdot je poškozená část DNA. (Halliwell, 2015) Bez přítomnosti kyslíku naopak dochází k rychlejší opravě s pomocí např. thiolových skupin, dále popsáno v kapitole 2.5.1. (Hirayama, 2013)



Opravdové radioprotektory lze rozdělit podle mechanismu účinku. Jedním z možných rozdělení je na následujících pět skupin:

1. vychytávače volných radikálů,

2. látky podporující opravu DNA,
3. protizánětlivé látky,
4. látky podporující regeneraci krvetvorných buněk,
5. látky cílící na molekulární úroveň.

Vychytávače volných (zejména $\cdot\text{OH}$) radikálů jsou popsány v kapitole 2.5.1. Látky podporující opravné procesy DNA mohou zmírnit již způsobené poškození. Jde zejména o opravu SSB (single-strand breaks) a DSB (double-strand breaks) způsobených ionizujícím zářením. (Mun, 2018) Mezi tyto látky lze zařadit glutathion či enzym ribonukleotid reduktázu. (Thelander, 2007)

Působení ionizujícího záření často spouští rozsáhlou zánětlivou reakci imunitního systému. K potlačení lze použít steroidní dexamethason (Chow, 2015) či jiné látky schopné potlačit některé prozánětlivé cytokiny a faktory, např. látky obsažené ve lněném semínku prokázaly určitý vliv ochrany. (Christofidou-Solomidou, 2011)

Modulace regenerace krvetvorných buněk je účinnou terapeutickou strategií pro překonání poškození ionizujícím zářením. Bylo zjištěno, že různé endogenní sloučeniny, jako jsou imunomodulátory, růstové faktory apod. mohou působit jako radioprotektory. Např. erythropoietin či faktor kmenových buněk (SCF) podporují repopulaci krvetvorné kostní dřeně.

Výzkumy zaměřující se na pochopení apoptotických a signalizačních drah, které se podílejí na poškození ionizujícím zářením, prokázaly klíčovou roli některých látek při tomto procesu a že jejich snížená či zvýšená exprese ovlivňuje radiační citlivost. Pro příklad rosiglitazon zvyšuje signalizaci ionizujícím zářením indukované apoptózy v lidských buňkách. Naopak pifithrin- μ prokázal ochranou účinnost před ionizujícím zářením indukovanou apoptózou u myši. (Mun, 2018)

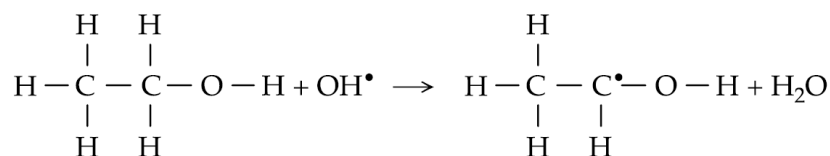
Použití většiny uvedených látek je ve fázi výzkumu. Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) prozatím schválil jen velmi malé množství různých chemických látek k použití jako radioprotektory. Mezi tyto látky patří: pruská modř (zvaná též pařížská, berlínská či brandeburská), jodid draselný, granisetron, amifostin a palifermin. Pruská modř účinkuje jako chelatační činidlo pro některé kovy (např. ^{137}Cs). Jodid draselný je všeobecně známou látkou používanou k ochraně před ionizujícím zářením, nicméně chrání jen před radionuklidy jódu a jeho účinek je tedy vázán na štítnou žlázu, jelikož funguje jako saturátor jódu. Nasycená štítná žláza poté nemá tendenci přijímat radioaktivní jód (^{131}I , ^{125}I). Účinek granisteronu spočívá ve snížení dávivých stavů po akutním ozáření. (Armbruster, 2021) Palifermin stimuluje dělení, podporuje opravu DNA a používá se zejména k léčbě orální mukositivity v souvislosti s chemoterapií. (Sadeghi, 2021) Amifostin

je popsán v kapitole 2.5.1, jelikož působí jako vychytávač volných radikálů a je tedy jediný FDA schválený obecně působící radioprotektor.

2.5.1 Vychytávače ·OH radikálů

Nejvýznamnější skupinou radioprotektorů jsou thiolové sloučeniny. Nejjednodušší z nich je cystein. Jeho ochranný účinek byl objeven již v roce 1948. Zhruba ve stejnou dobu se prokázal ochranný účinek cysteaminu neboli merkaptoethylaminu. Tato látka má při koncentraci $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dávkový redukční faktor (dose reduction factor – DRF) 1,8 pro rentgenové záření. DRF uvádí kolikanásobek dávky bez použití ochranné látky má stejné účinky při použití ochranné látky. Většina thiolových sloučenin, které prokázaly ochranný vliv proti ionizujícímu záření, se vyznačuje přítomností thiolové (-SH) skupiny na jedné straně molekuly se silně bazickou skupinou (amin, guanidin) na straně druhé. Tyto sloučeniny ukazují největší ochranný vliv vůči rentgenovému a γ záření, naopak neprokázaly silný ochranný efekt vůči α záření. Jejich účinek je totiž nepřímo úměrný hodnotě lineárního přenosu energie pro dané záření.

Princip ochranného účinku thiolových sloučenin spočívá zejména ve vychytávání volných radikálů a také v jejich funkci jakožto donoru vodíku pro usnadnění opravy DNA, vizte rovnici 2.12, kde jakožto donor vodíku figuruje glutathion (GSH). Přímé vychytávání volných radikálů je znázorněno na obrázku 2.5. Ethanol zde figuruje jako vychytávač ·OH radikálů a vzniká již méně reaktivní hydroxyethylový radikál. (Halliwell, 2015)



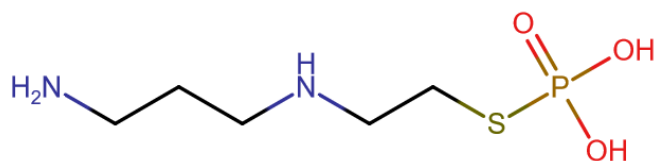
Obr. 2.5: Reakce ethanolu s ·OH radikálem (Halliwell, 2015)



Vzhledem k událostem v Hirošimě a Nagasaki na konci druhé světové války započala americká armáda velký výzkum v oblasti ochrany před ionizujícím zářením. Dávka cysteinu dostatečná k ochraně před ionizujícím zářením je toxická a projevuje se výraznými vedlejšími účinky. Armádní výzkum došel ke zjištění, že při "krytí" -SH skupiny fosfátovou skupinou dochází ke snížení toxicity a projevů vedlejších účinků. Takto bylo připraveno několik použitelných sloučenin. První z nich, cystafos, označovaný jako WR-638, byl prý běžně nošen sovětskými vojáky během studené války. Druhá z nich, již zmíněný amifostin, označovaný jako WR-2721, byl pravděpodobně použit jako potenciální ochrana pro při

misích na Měsíc. Vzorec amifostinu vizte na obrázku 2.6. Při dávce $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ hodnota DRF pro amifostin dosahuje teoretického maxima 3. Amifostin se dnes používá např. pro prevenci xerostomie při léčbě nádorů hlavy či krku. Je důležité podotknout, že aby se amifostin účinně dostal do buněk, je nejprve nutná enzymatická defosforylace alkalickou fosfatázou, která je přirozeně přítomná v tkáních. Přestože amifostin prostupuje do nádorů pomaleji než do normálních tkání, tak nenašel časté použití kvůli potenciálnímu snížení účinku ozáření na daný nádor. (Hall, 2012)

Existuje velké množství experimentálních vychytávačů $\cdot\text{OH}$ radikálů. Několik studií prokázalo ochranný vliv ethanolu, methanolu a formiátu draselného pro bakterie *E. coli* a kvasinky *S. cerevisiae* před účinky záření γ . (Múčka, 2015), (Ondrák, 2019), (Múčka, 2018)



Obr. 2.6: Vzorec amifostinu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy a chemikálie

Vybraný mikroorganismus pro tuto práci byla kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* haploidního kmene DBM 272 párovacího typu *a*. Kultura mikroorganismů byla získána z Ústavu biochemie a mikrobiologie z Fakulty potravinářské a biochemické technologie z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Tyto kvasinky byly kultivovány na selektivní Sabouraudově agarové živné půdě s obsahem chloramfenikolu. K přípravě suspenzí k ozáření byl využit 100% ethanol a laboratorně připravený fyziologický roztok (0,9% vodný roztok NaCl).

Pro přípravu Frickeho dozimetru byl využit hexahydrát síranu amonno-železnatého, chlorid sodný a 96% kyselina sírová. V tabulce níže jsou uvedeny specifikace použitých chemikálií.

Tab. 3.1: Specifikace použitých chemikálií

Název chemikálie (chemická značka)	Výrobce	Čistota	Velikost balení	Šarže
Sabouraud Chloramphenicol Agar (-)	HiMedia Laboratories GmbH	-	500 g	0000275509
Ethanol absolutní (CH ₃ CH ₂ OH)	Ing. Petr Švec - PENTA s. r. o.	p. a.	1000 ml	2506270622
Natriumchlorid (NaCl) - pro fyziologický roztok	Carl Roth GmbH + Co. KG	≥99,8 %	1 kg	158267492
Kyselina sírová 96% P. A. (H ₂ SO ₄)	Lach-ner, s. r. o.	p. a.	1000 ml	PP/2013/05676
Chlorid sodný p. a. (NaCl) - pro Frickeho dozimetr	Ing. Petr Švec - PENTA s. r. o.	p. a.	1000 g	2211241117
Ammonium iron(II) sulfate hexahydrate ((NH ₄) ₂ FeSO ₄ · 6 H ₂ O)	Sigma-Aldrich s. r. o.	≥99,0%	1 kg	BCBR4564V

3.2 Příprava živných půd, fyziologických roztoků a sterilizace

Pro sterilizační procesy byl využíván autokláv 2540M od společnosti Tuttnauer, vizte Obr. 3.1. Pro všechny sterilizační procesy v autoklávu byla používána teplota 121 °C.

Rozlévání půd metodou lití ploten bylo prováděno v laminárním boxu Aura Mini od společnosti BioAir, vizte Obr. 3.2.

Použitá prášková směs selektivních živných půd obsahovala jako antibakteriální složku chloramfenikol. Živné půdy byly připraveny do 500ml Erlenmeyerových baněk odvážením 16,3 g práškové půdy a rozpuštěním v 250 ml demineralizované vody. Hrdlo Erlenmeyerovy baňky bylo poté uzavřeno zátkou z buničiny a překryto hliníkovou fólií. Takto připravené baňky byly sterilizovány po dobu 40 min v autoklávu. Ještě horké a tekuté půdy byly rozlity v laminárním boxu. Jednorázové Petriho misky byly sterilizovány již z výroby. Petriho misky byly uchovávány v termostatu Q-Cell 140 od společnosti Pol-Lab, vizte Obr. 3.3, kvůli předsušení na experiment po dobu alespoň 2 dní. Pro dlouhodobé skladování byla zvolena chladnička, aby naopak nedošlo k přílišnému vysušení. Živné půdy, včetně těch s mikroorganismy, byly uchovávány dnem vzhůru, aby nedošlo ke stékání kondenzované vody zpět na živnou půdu.



Obr. 3.1: Autokláv 2540M

Fyziologický roztok byl připravován rozpuštěním 2,7 g NaCl v 300 ml demineralizované vody v 500ml Erlenmeyerových baňkách. Hrdla baněk byla opatřena zátkou z buničiny a zakryta hliníkovou fólií. Poté byly baňky s roztoky sterilizovány v autoklávu po dobu 35 min. Připravené fyziologické roztoky byly uchovávány buďto v Erlenmeyerových baňkách, anebo v předem v autoklávu sterilizovaných lahvičkách ve skříni v temnu.

Špičky pro automatické pipety od společnosti Eppendorf ve velikosti 200 μ l, 1000 μ l, 5000 μ l a 10000 μ l v příslušných boxech byly stejně jako takzvané hokejky sterilizovány v autoklávu po dobu 35 min. Pod pojmem hokejka je myšlena skleněná tyčinka zahnutá v

plameni kahanu do tvaru písmena L. K indikaci sterilizace lahvíček na fyziologické roztoky a špiček na pipety byla používána indikační sterilizační páska.

Laminární box byl před započítím práce sterilizován vytřením vnitřního prostoru 70% roztokem ethanolu, případně i 1,5% roztokem ajatinu a pomocí UV záření po dobu 25 min.



Obr. 3.2: Laminární box Aura Mini



Obr. 3.3: Termostat Q-Cell 140

3.3 Přeočkování kultury a počítání kolonií

Kultura *S. cerevisiae* byla přeočkovávána ve dvou případech. Zaprvé k udržení vitální kultury, která byla skladována na Petriho miskách zatažených parafilmem v krabici v lednici. Druhý případ byl k získání mikroorganismů na experiment. Petriho misky s mikroorganismy na experiment byly kultivovány v termostatu po dobu 4 (pro dávkový příkon 150 a 90 Gy · h⁻¹) nebo 7 dní (pro dávkový příkon 120 Gy · h⁻¹) při teplotě 30 °C. Přeočkování kultury probíhalo v laminárním boxu. Pomocí očka, které bylo předem opálené v lihovém kahanu, byla přeočkována kultura z misky z lednice na připravenou novou misku s živnou půdou. Očko vizte na Obr. 3.4.



Obr. 3.4: Očko na kvasinky

Petriho misky s vyrostlými koloniemi byly po 2 dnech kultivace v termostatu počítány pomocí počítačky kolonií Schütt Count od společnosti Schuett-Biotec, vizte Obr. 3.5. Počítačka zaznamenává dotyky fixem na vloženou Petriho misku.



Obr. 3.5: Počítačka kolonií Schütt Count

3.4 Průběh experimentu se *S. cerevisiae*

Nejprve byly do laminárního boxu umístěny potřebné předměty (boxy se špičkami na pipety, stojánky se zkumavkami a jiné), které byly předtím otřeny 70% ethanolem. Všechny používané zkumavky byly sterilizovány již z výroby. Do připravených zkumavek

bylo napipetováno potřebné množství absolutního ethanolu a fyziologického roztoku tak, aby byly zkumavky připraveny na napipetování suspenze s kvasinkami. Celkový objem suspenze byl 10 ml a zvolené koncentrace ethanolu byly 0; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5; 1,75 a 2 mol · dm⁻³.

Kultura *S. cerevisiae* z Petriho misky z termostatu byla pomocí očka přesunuta do 50ml zkumavky s 30 ml fyziologického roztoku. K zajištění homogenní suspenze byla používána třepačka typu vortex MS 3 basic od společnosti IKA Works, vizte Obr. 3.6. Třepačka byla používána pokaždé před pipetováním suspenze. Vhodná počáteční koncentrace buněk je řádově 10⁷ buněk na 1 ml a byla počítána pomocí Bürkerovy komůrky na mikroskopu DN 45 od společnosti Lambda Praha, vizte Obr. 3.7. Snahou bylo dosáhnout počtu okolo 150 až 200 buněk ve čtverci. K výpočtu buněk na 1 ml (závislá proměnná x) lze využít vzorec

$$x = \frac{a \cdot 1000}{n \cdot V}, \quad (3.1)$$

kde a je napočítaný počet buněk, n je počet počítaných čtverců a V je objem čtverce. Po dosazení 200 napočítaných buněk v jednom spočítaném čtverci o objemu 0,004 mm³ vychází počet buněk na 5 · 10⁷ buněk na 1 ml. Připravená suspenze s kvasinkami byla napipetována v objemu 1 ml do příslušných zkumavek, jejichž celkový objem byl již zmíněných 10 ml, těsně před ozářením. Tím došlo k naředění počtu buněk na 5 · 10⁶ buněk na 1 ml.



Obr. 3.6: Třepačka typu vortex MS 3 basic



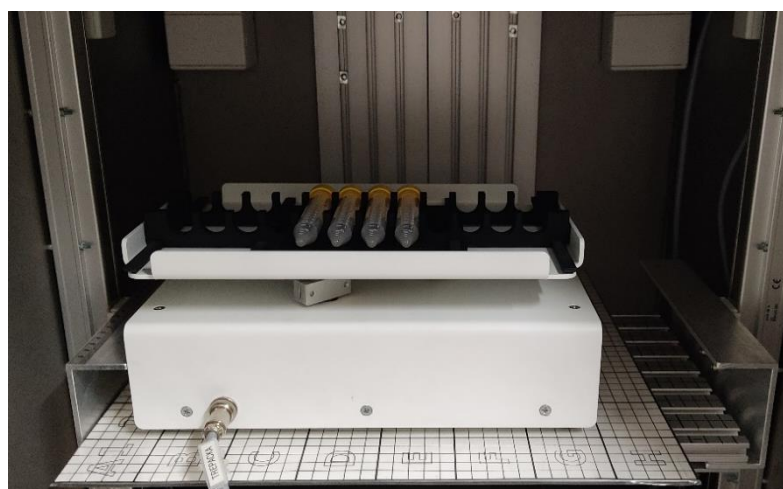
Obr. 3.7: Mikroskop DN 45

Vždy bylo připraveno osm koncentrací ethanolu, včetně nulové. Od každé koncentrace byla připravena zkumavka určená k ozáření a zkumavka neurčená k ozáření, která zastupovala toxické účinky ethanolu a jiné vlivy. Tento postup byl rozdělen na dvě série. Do rentgenového ozařovače SCIOX Beam od společnosti MICO Vision s. r. o., vizte Obr. 3.8, byly vždy umístěny 4 zkumavky. Třepačka byla nastavena na 20 otáček za minutu, v rentgenovém zdroji byla použita filtrace záření ve formě dvou 2mm hliníkových plechů, celková tloušťka stínění tedy byla 4 mm. Nastavení poličky pro vysokoenergetickou rentgenku bylo 526 mm, to odpovídalo vzdálenosti vzorků od zdroje záření rovné 400 mm. Do celkové výšky byla totiž započtena výška třepačky (118 mm) a stojánku na zkumavky (8 mm). Nastavení napětí bylo 195 kV. Proudová nastavení 12, resp. 16, resp. 20 mA určovala tři dávkové příkony 112; resp. 155; resp. 185 Gy · h⁻¹ stanovené pomocí Frickeho dozimetru, vizte kap. 4.1. Doba ozařování byla nastavena tak, aby vzorky obdržely přibližně stejné dávky, tedy 124; resp. 129; resp. 129 Gy. Geometrické umístění v rentgenovém zdroji vizte na Obr. 3.9. I když použitá rentgenka má široký vyzařovací úhel (40°), byly vzorky vždy pečlivě umísťovány do přesné pozice. Třepačka byla zarovnaná s

levým do místnosti bližším rohem poličky, stínítko pod třepačkou přesahovalo jedním velkým čtvercem poličku. Zkumavky byly umístěny na pozice 5 až 8 s víčky směřujícími dovnitř ozařovače a přiraženými k stojánku zkumavek.



Obr. 3.8: Rentgenový zdroj SCIOX Beam



Obr. 3.9: Umístění zkumavek v ozařovači

Při ozařování první série byla napipetována série druhá. Bylo tedy připraveno 16 zkumavek a pro každou byl po ozáření použit dvoukrokový systém ředění. K tomuto postupu byly v laminárním boxu již předem napipetované dvě zkumavky s fyziologickým roztokem. Z ozářené zkumavky se odpipetovalo 200 μl suspenze do první ředící zkumavky, z té se poté odpipetovalo 500 μl suspenze do druhé ředící zkumavky, v případě neozářené zkumavky se jednalo o 100 μl a 500 μl . Celkové ředění vzorků bylo 1000krát v případě ozářených a 2000krát v případě neozářených vzorků. Z druhé ředící zkumavky bylo napipetováno 100 μl suspenze na připravenou živnou půdu, tedy ≈ 500 , resp. 250 buněk.

Následně pomocí "hokejky", sterilizované namočením do ethanolu a jeho zapálením tak, aby dohořel až v laminárním boxu, byla suspenze rozetřena po povrchu živné půdy s pomocí Petriturn-M od společnosti Schuett-Biotec, vizte Obr. 3.10. Od každé zkumavky byly vyočkovány 4 Petriho misky, které poté byly umístěny do termostatu. Zde byly ponechány 2 dny k inkubaci.



Obr. 3.10: Petriturn-M

3.5 Příprava Frickeho dozimetru a chemická dozimetrie

Frickeho dozimetr byl připravován jako roztok $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ Fe}^{2+}$ ve formě $(\text{NH}_4)_2\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ a $0,4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_2\text{SO}_4$. Tento roztok byl připravován do 1000ml odměrné baňky. Nejprve byla do baňky nalita demineralizovaná vody (cca 75 % objemu), poté byla přilita kyselina sírová a na závěr nasypán chlorid sodný společně s hexahydrátem síranu amonno-železnatého. Následně byla baňka dolita demineralizovanou vodou po rysku a umístěna do temna na jednu hodinu s otevřenou zátkou kvůli sycení vzdušným kyslíkem. Po nasycení byl roztok Frickeho dozimetru napipetován do všech potřebných zkumavek. Tyto zkumavky byly uchovány v temnu a odebírány postupně dle plánu experimentu.

Dozimetrie rentgenové zdroje byla provedena pro proudové nastavení 8, 12, 16 a 20 mA. Vždy bylo použito osm 15ml zkumavek s objemem Frickeho dozimetru 10 ml umístěných na stojánku na třepačce v rentgenovém zdroji. Na tomto stojánku bylo využito 8 prostředních pozic. Ostatní nastavení a uspořádání rentgenového zdroje bylo totožné jako v případě experimentu se *S. cerevisiae* popsáném v kapitole 3.4. Pro každé proudové nastavení bylo zvoleno sedm časů ozařování včetně nulového. V případě 20 a 16 mA se jednalo o 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min a v případě 12 a 8 mA se jednalo o 15, 30, 45, 60, 75 a 90 min. Ozářené zkumavky byly analyzovány ve spektrofotometru UV-Vis Cary 100 od společnosti Varian. K tomuto účelu byly použity křemenné kyvety, jelikož rozsah měření byl 270 až 570 nm.

3.6 Vyhodnocování experimentálních dat

3.6.1 Frickeho dozimetrie

Výpočet dávky D na základě získaných hodnot absorbance byl určen dle rovnice

$$D = \frac{c_{Fe^{3+}}}{\rho \cdot G_{Fe^{3+}}}, \quad (3.2)$$

kde $c_{Fe^{3+}}$ je koncentrace železitých iontů v roztoku Frickeho dozimetru vypočtená dle Lambert-Beerova zákona, ρ je hustota Frickeho dozimetru získaná z webové aplikace DENS1 Calculator (Drefahl, 2024) jako $1,022 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $G_{Fe^{3+}}$ je radiačně chemický výtěžek s korekcí na teplotu během ozařování vzorku. Níže je uvedena rovnice pro G^* udávající počet molekul na 100 eV

$$G^* = 0,57953 \cdot \ln(x) + 11,44642, \quad (3.3)$$

kde x je střední energie záření (v této práci $\approx 72 \text{ keV}$). Nejistota stanovení μ_{G^*} je 0,03815 molekul na 100 eV. $G_{Fe^{3+}}$ s korekcí na teplotu byl vypočten dle rovnice

$$G_{Fe^{3+}} = G^* \cdot (1 + \Delta T \cdot 0,0012), \quad (3.4)$$

kde ΔT je diference průměrné teploty během ozařování oproti $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Dávkový příkon \dot{D} byl určen pomocí funkce LINREGRESE v programu Excel ze závislosti dávky na čase. Dle Gaussova zákona šíření chyb byly vypočteny odchylky pro získané hodnoty dávkového příkonu dle rovnice

$$\mu_{\dot{D}} = \dot{D} \cdot \sqrt{\frac{\mu_{lin}^2}{\dot{D}^2} + \frac{\mu_{G^*}^2}{G^{*2}}}, \quad (3.5)$$

kde μ_{lin} je chyba získaná z funkce lineární regrese. Odchylka průměrných hodnot dávkového příkonu pro jednotlivé pozice a také odchylka průměrného dávkového příkonu pro ozařovací pozice při daném nastavení ozařovače byla vypočtena pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR.S v programu Excel, která je dána předpisem

$$\mu = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}, \quad (3.6)$$

kde x je x -tý prvek, \bar{x} je průměrná hodnota souboru a n je počet prvků v souboru.

3.6.2 Ochranná účinnost EtOH

Pro každý vzorek byla suspenze s buňkami vyočkována na 4 Petriho misky s živnou půdou. Získané hodnoty spočtených kolonií na jednotlivých miskách byly podrobeny Dean-Dixonovu testu (Skoog, 2019), hodnoty nesplňující kritéria byly vyloučeny k následnému vyhodnocování. Zbylé hodnoty byly přepočteny na počet životaschopných buněk na 1 ml původního roztoku, kvůli rozdílnému ředění jednotlivých vzorků, a zprůměrovány. Následně byly získány jednotlivé odchylky dle funkce SMODCH.VÝBĚR.S v programu Excel, vizte rovnici 3.6.

Ochranná účinnost EtOH σ byla vypočtena dle rovnice

$$\sigma = \frac{\ln\left(\frac{b}{a_0}\right)}{\ln\left(\frac{c}{a_s}\right)}, \quad (3.7)$$

kde jednotlivé proměnné značí průměrnou koncentraci buněk v jednotlivých suspenzích. b je ozářená suspenze bez EtOH, a_0 je neozářená suspenze bez EtOH, c je ozářená suspenze s EtOH a a_s je neozářená suspenze s EtOH. (Múčka, 2013) Odchylka μ_σ je rovna výrazu

$$\sqrt{\left(-\frac{1}{a_0 \cdot \ln\left(\frac{c}{a_s}\right)}\right)^2 \cdot \mu_{a_0}^2 + \left(\frac{\ln\left(\frac{b}{a_0}\right)}{\ln\left(\frac{c}{a_s}\right)^2 \cdot a_s}\right)^2 \cdot \mu_{a_s}^2 + \left(\frac{1}{b \cdot \ln\left(\frac{c}{a_s}\right)}\right)^2 \cdot \mu_b^2 + \left(-\frac{\ln\left(\frac{b}{a_0}\right)}{\ln\left(\frac{c}{a_s}\right)^2 \cdot c}\right)^2 \cdot \mu_c^2} \quad (3.8)$$

získanému z Gaussova zákona šíření chyb. Ochranná účinnost byla vynášena do grafu v závislosti na vychytávací účinnosti Q dané rovnicí

$$Q = k_{OH} \cdot c_{EtOH}, \quad (3.9)$$

kde k_{OH} značí rychlostní konstantu reakce $\cdot OH$ radikálů s ethanolem (je rovna $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) a c_{EtOH} značí koncentraci ethanolu. (Múčka, 2013)

Závislost hodnot σ na Q byla zpracována v programu Excel metodou vážené lineární regrese. Zvolenou vahou byla μ_σ^{-2} . Hodnoty směrnic ze společných vyhodnocení experimentů pro jednotlivé dávkové příkony včetně jejich standardních odchylek byly vyneseny do grafu v závislosti na dávkovém příkonu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Dozimetrie RTG zdroje

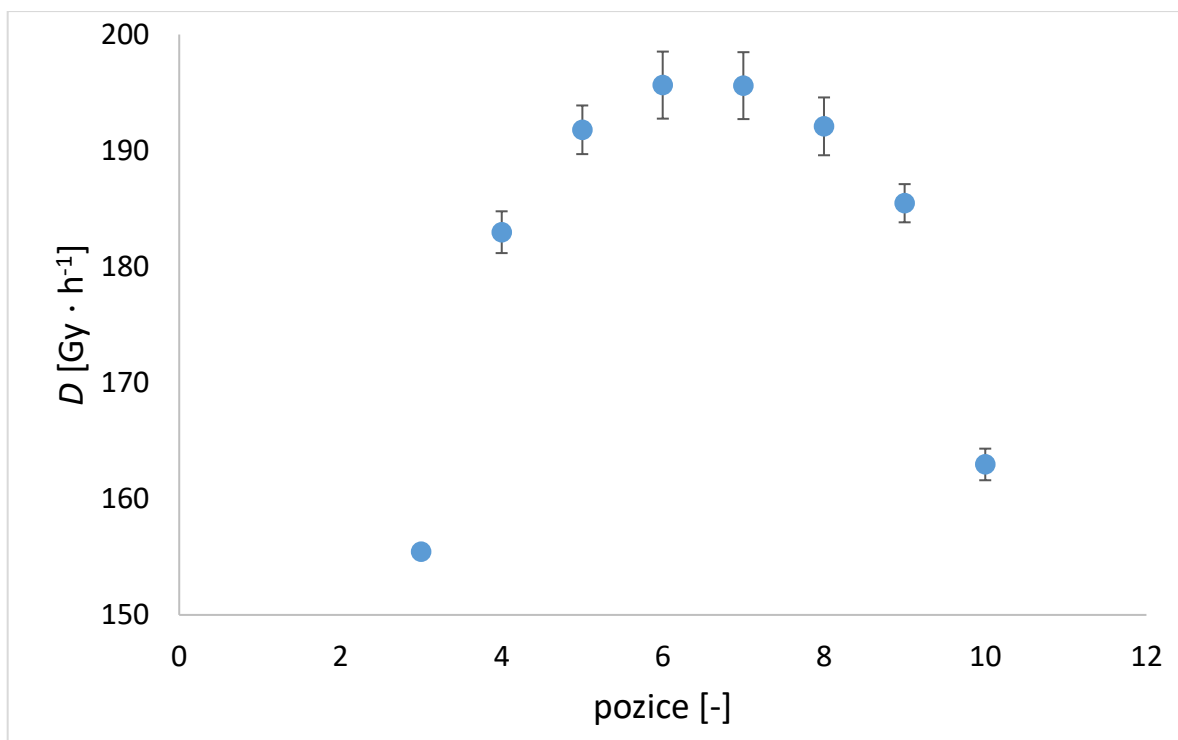
Byla provedena chemická dozimetrie pomocí Frickeho dozimetru pro 4 různá proudová nastavení, konkrétně se jednalo o 20, 16, 12 a 8 mA. Ostatní nastavení ozařovače byla vždy stejná. Napětí bylo nastaveno na 195 kV, ke stínění byly použity 4 mm hliníkového plechu. Geometrii ozařování vizte v kap. 3.5. Pro každé proudové nastavení byl vyhodnocen dávkový příkon pro jednotlivé pozice 3 až 10 na stojánku třepačky. Toto bylo vždy třikrát zopakováno a na závěr byl vypočten průměrný dávkový příkon ze všech měření na pozicích 5 až 8, jež pak byly využívány k ozařování vzorků *S. cerevisiae*. Ze všech třech experimentů byl také vypočten průměrný dávkový příkon na pozici 3 až 10. Odchylka hodnoty dávkového příkonu byla vypočtena jako směrodatná odchylka ze třech experimentálních hodnot. Průměrné dávkové příkony získané pro pozice 5 až 8 byly vyneseny do grafu v závislosti na proudovém nastavení.

Pro proudové nastavení 20 mA byl průměrný dávkový příkon na pozicích 5 až 8 stanoven jako $185 \pm 2,8 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Vyhodnocení dávkového příkonu pro jednotlivé experimenty vizte v tabulce 4.1. Pro závislost dávkového příkonu na pozici vizte graf 4.1.

Některé datové body v uvedených grafech mají v daném měřítku odchylku menší, než je velikost bodu, a tudíž není zřetelná.

Tab. 4.1: Hodnoty dávkového příkonu pro nastavení 20 mA

pozice	dávkový příkon [$\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$]		
	1. měření	2. měření	3. měření
3	$155 \pm 2,3$	$127 \pm 14,5$	$156 \pm 4,4$
4	$182 \pm 2,2$	$153 \pm 14,4$	$184 \pm 4,3$
5	$190 \pm 2,1$	$162 \pm 14,8$	$193 \pm 4,6$
6	$194 \pm 2,5$	$166 \pm 14,8$	$198 \pm 4,6$
7	$194 \pm 2,0$	$171 \pm 10,9$	$198 \pm 4,3$
8	$190 \pm 1,6$	$168 \pm 10,9$	$194 \pm 4,8$
9	$184 \pm 2,4$	$161 \pm 11,9$	$187 \pm 4,7$
10	$162 \pm 2,0$	$141 \pm 10,7$	$164 \pm 4,4$



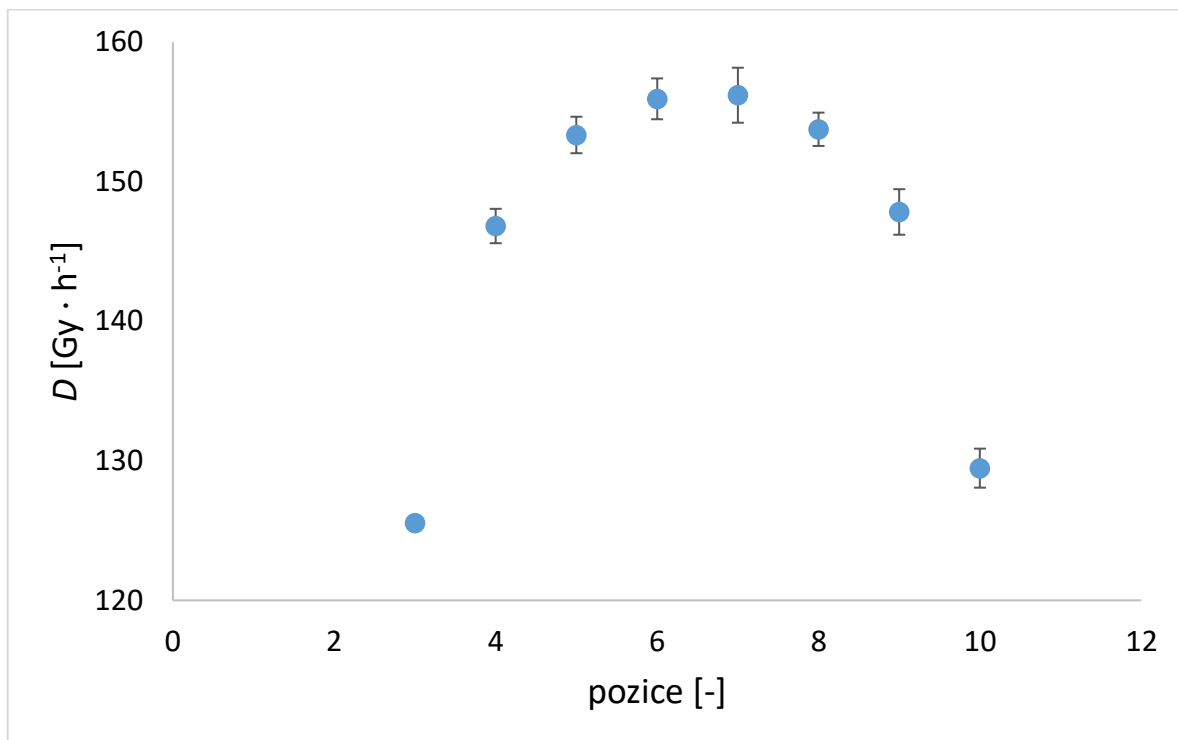
Graf 4.1: Stanovená závislost dávkového příkonu na pozici pro nastavení 20 mA

Pro proudové nastavení 20 mA je vidět výraznější odchylka dávkového příkonu pro 2. měření. V tomto případě bych doporučil chemickou dozimetrii zopakovat pro získání přesnějších výsledků. Vzhledem k dlouhodobé závadě na ozařovači SCIOX Beam toto nebylo v rámci této práce možné.

Pro proudové nastavení 16 mA byl průměrný dávkový příkon na pozicích 5 až 8 spočten jako $155 \pm 1,9 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Vyhodnocení dávkového příkonu pro jednotlivé experimenty vizte v tabulce 4.2. Pro závislost dávkového příkonu na pozici vizte graf 4.2.

Tab. 4.2: Hodnoty dávkového příkonu pro nastavení 16 mA

pozice	dávkový příkon [Gy · h ⁻¹]		
	1. měření	2. měření	3. měření
3	126 ± 2,9	126 ± 2,5	125 ± 4,3
4	148 ± 2,7	145 ± 2,3	148 ± 4,1
5	155 ± 2,8	152 ± 2,2	154 ± 4,1
6	157 ± 2,7	154 ± 2,1	156 ± 3,9
7	158 ± 2,1	154 ± 2,3	156 ± 3,9
8	155 ± 2,5	153 ± 2,4	154 ± 3,7
9	149 ± 2,6	146 ± 2,5	148 ± 3,8
10	131 ± 2,8	128 ± 2,6	130 ± 3,8

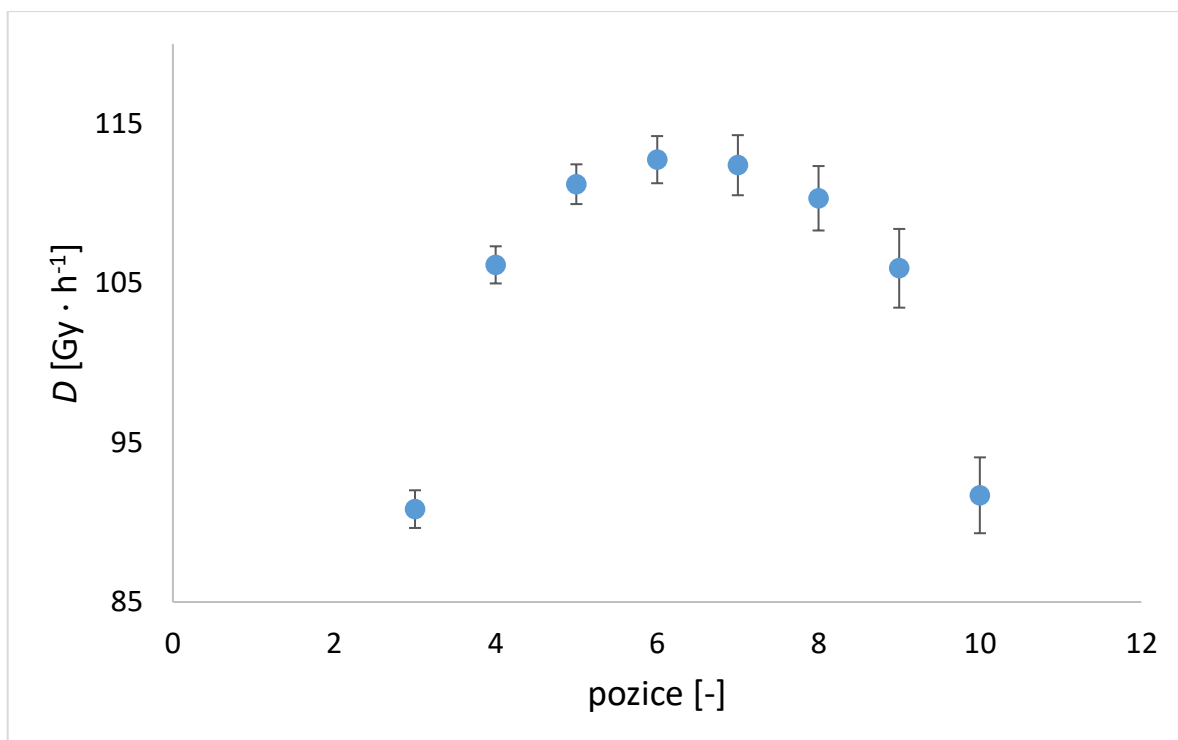


Graf 4.2: Stanovená závislost dávkového příkonu na pozici pro nastavení 16 mA

Pro proudové nastavení 12 mA byl průměrný dávkový příkon na pozicích 5 až 8 spočten jako $112 \pm 1,8 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Vyhodnocení dávkového příkonu pro jednotlivé experimenty vizte v tabulce 4.3. Pro závislost dávkového příkonu na pozici vizte graf 4.3.

Tab. 4.3: Hodnoty dávkového příkonu pro nastavení 12 mA

pozice	dávkový příkon [Gy · h ⁻¹]		
	1. měření	2. měření	3. měření
3	90 ± 3,0	90 ± 1,7	92 ± 2,2
4	106 ± 2,4	105 ± 1,8	107 ± 2,2
5	112 ± 2,3	110 ± 1,9	112 ± 2,2
6	114 ± 2,3	111 ± 1,6	114 ± 2,4
7	114 ± 2,1	110 ± 1,6	114 ± 2,4
8	111 ± 2,1	108 ± 1,6	111 ± 2,2
9	107 ± 1,9	103 ± 1,6	107 ± 2,2
10	94 ± 1,9	89 ± 1,6	92 ± 2,3

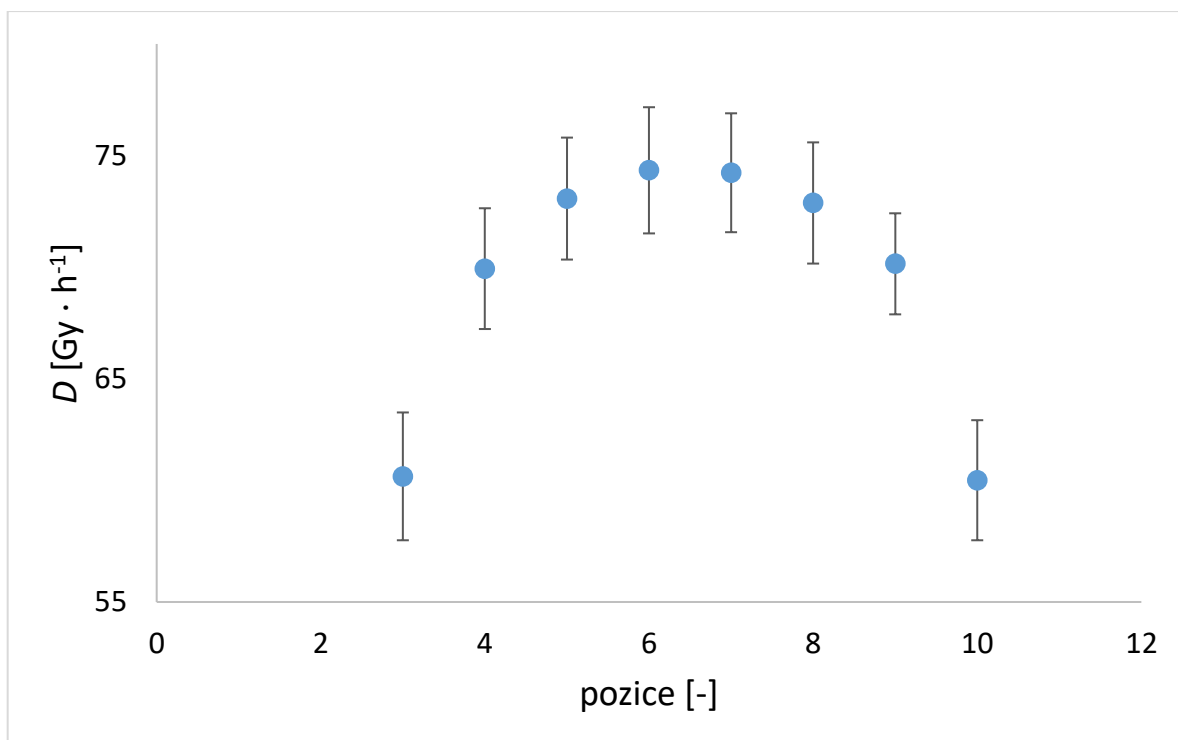


Graf 4.3: Stanovená závislost dávkového příkonu na pozici pro nastavení 12 mA

Pro proudové nastavení 8 mA byl průměrný dávkový příkon na pozicích 5 až 8 spočten jako $74 \pm 2,4 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Vyhodnocení dávkového příkonu pro jednotlivé experimenty vizte v tabulce 4.4. Pro závislost dávkového příkonu na pozici vizte graf 4.4.

Tab. 4.4: Hodnoty dávkového příkonu pro nastavení 8 mA

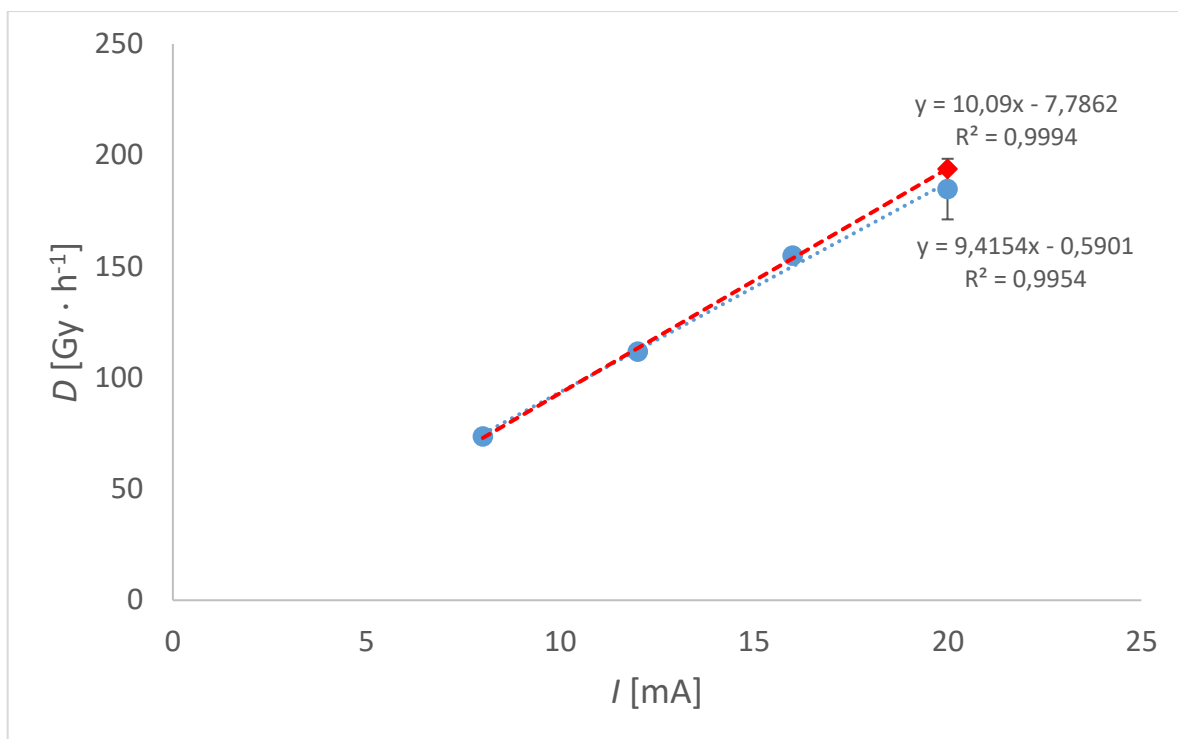
pozice	dávkový příkon [Gy · h ⁻¹]		
	1. měření	2. měření	3. měření
3	57 ± 2,0	63 ± 2,0	62 ± 1,2
4	67 ± 2,1	72 ± 1,7	71 ± 1,4
5	70 ± 2,1	75 ± 1,7	74 ± 1,1
6	71 ± 2,1	77 ± 1,6	75 ± 1,0
7	71 ± 2,0	76 ± 1,6	75 ± 1,1
8	70 ± 2,0	75 ± 1,4	73 ± 0,9
9	68 ± 1,8	72 ± 1,5	71 ± 1,0
10	57 ± 2,1	63 ± 1,1	61 ± 0,9



Graf 4.4: Stanovená závislost dávkového příkonu na pozici pro nastavení 8 mA

Z grafů 4.1 až 4.4 lze pozorovat, že všech 4 případech bylo nejvyšších dávkových příkonů dosaženo ve středu třepačky na pozicích 6 a 7, od nichž hodnoty spojitě klesají na obě strany. Pravděpodobnou příčinou je jak pokles intenzity záření se vzdáleností od zdroje, tak možnost, že se okrajové zkumavky při rotačním třepání nenacházely ve svazku záření po celou dobu ozařování. Kvůli tomuto fenoménu byly zvoleny k ozařování *S.cerevisiae* pozice 5 až 8, kde není natolik velký rozdíl v hodnotách dávkového příkonu.

Průměrné hodnoty dávkového příkonu na ozařovacích pozicích 5 až 8 pro jednotlivá proudová nastavení byly vyneseny do grafu v závislosti nastaveném proudu, vizte graf 4.5.



Graf 4.5: Stanovená závislost dávkového příkonu na proudu

Z grafu 4.5 je vidět lineární závislost dávkového příkonu na nastaveném proudu, která je ve shodě s očekáváním (Bruno, 2017) a umožňuje tak zvolit libovolnou dávkovou rychlost volbou hodnoty proudu (do max. 20 mA). Pro porovnání je zde uveden i bod pro nastavení 20 mA s vyloučením druhého měření, které se výrazně lišilo od ostatních. K němu je znázorněn i příslušný lineární fit s rovnicí a intervalem spolehlivosti R^2 . Je zřetelné, že při vyloučení druhého měření je lineární závislost přesnější, jelikož hodnota R^2 je bližší 1.

4.2 Ochranná účinnost EtOH

Pro proudová nastavení 12; resp. 16; resp. 20 mA, což odpovídá dávkovému příkonu 112; resp. 155; resp. 185 $\text{Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ (vizte kap. 4.1) a zároveň také obdržené dávce 124; resp. 129; resp. 129 Gy odpovídající době ozařování 4000 s; resp. 3000 s; resp. 2400 s, byla stanovena ochranná účinnost EtOH. Jednotlivé koncentrace EtOH a tomu odpovídající vychytávací účinnost Q lze vidět v tabulce 4.5. Pro každý dávkový příkon byly provedeny 3 experimenty. V uvedených grafech je mimo experimentálních bodů znázorněn interval spolehlivosti na hladině 95 % a lineární fit. Zpracování dat a vyhodnocení ochranné účinnosti je popsáno v kapitole 3.6.2.

Tab. 4.5: Koncentrace EtOH a odpovídající vychytávací účinnost EtOH

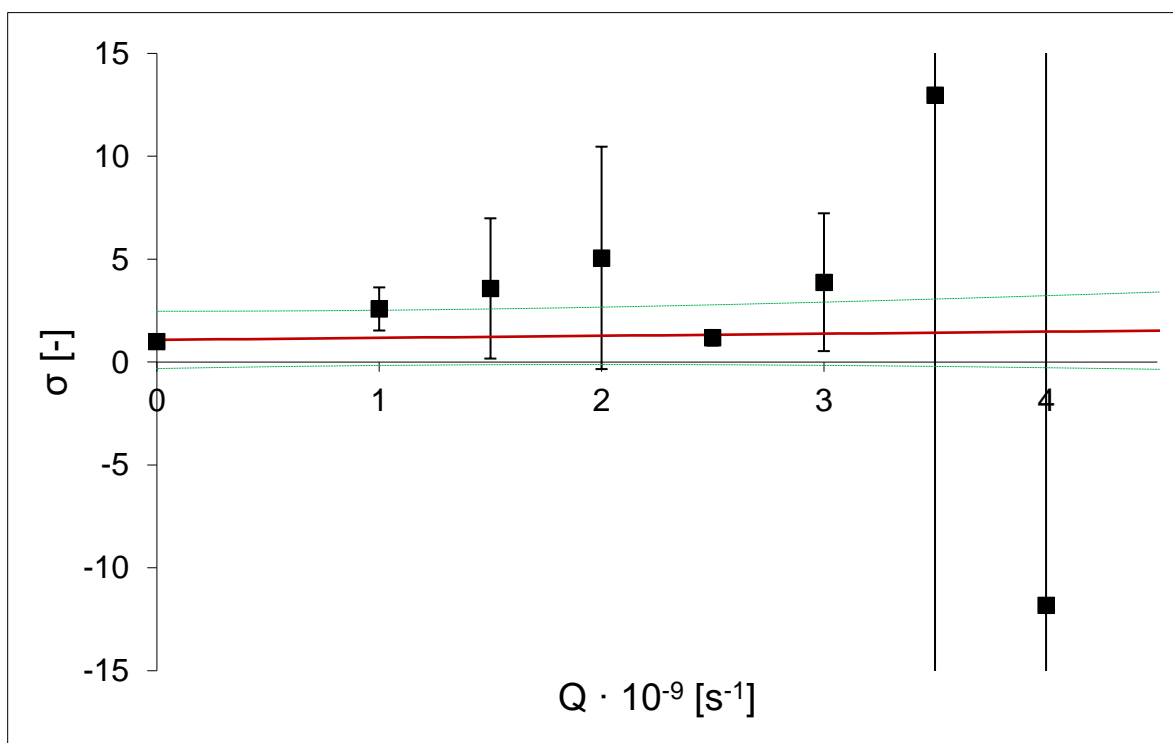
c_{EtOH} [mol · dm ⁻³]	0	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2
$Q \cdot 10^{-9}$ [s ⁻¹]	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4

Vyhodnocení jednotlivých experimentů pro dávkový příkon 185 Gy · h⁻¹ vizte na grafech 4.6 až 4.8. Společné vyhodnocení vizte na grafu 4.9. Hodnoty ochranné účinnosti jsou uvedeny v tabulce 4.6.

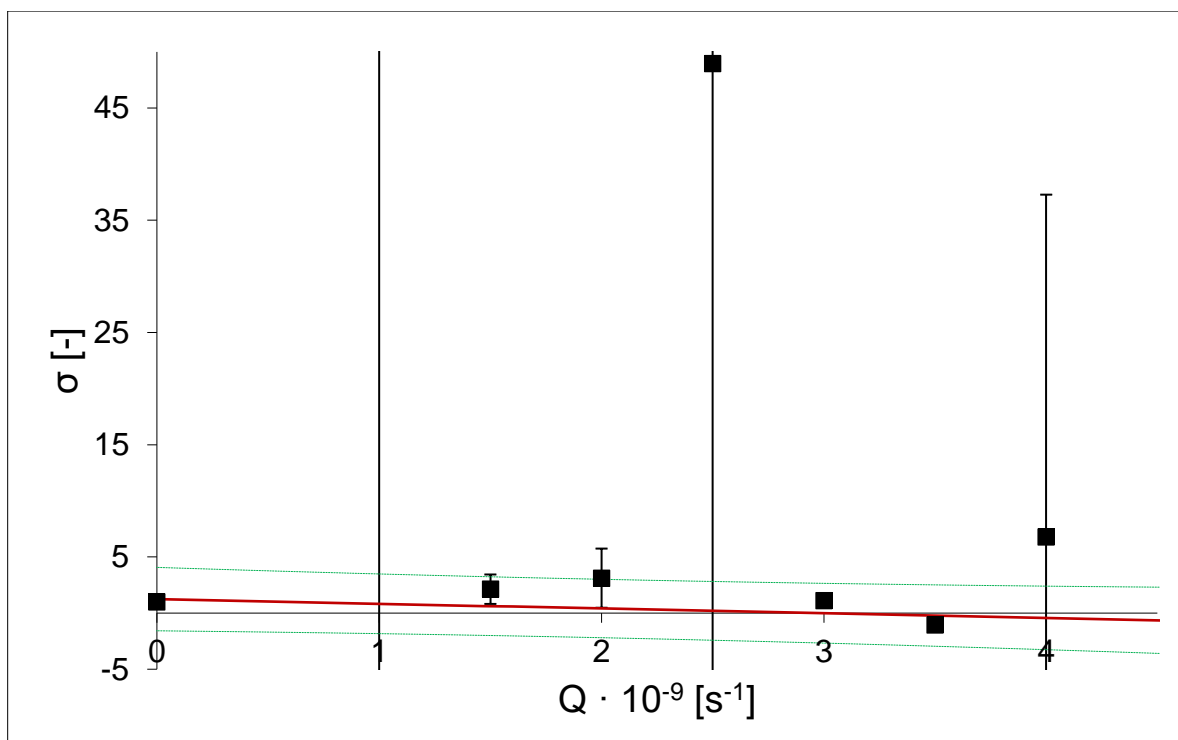
Některé datové body v uvedených grafech mají v daném měřítku odchylku menší, než je velikost bodu, a tudíž není zřetelná. Některé body mají naopak odchylku větší, a tudíž není znázorněná v celé velikosti.

Tab. 4.6: Hodnoty ochranné účinnosti EtOH pro dávkový příkon 185 Gy · h⁻¹

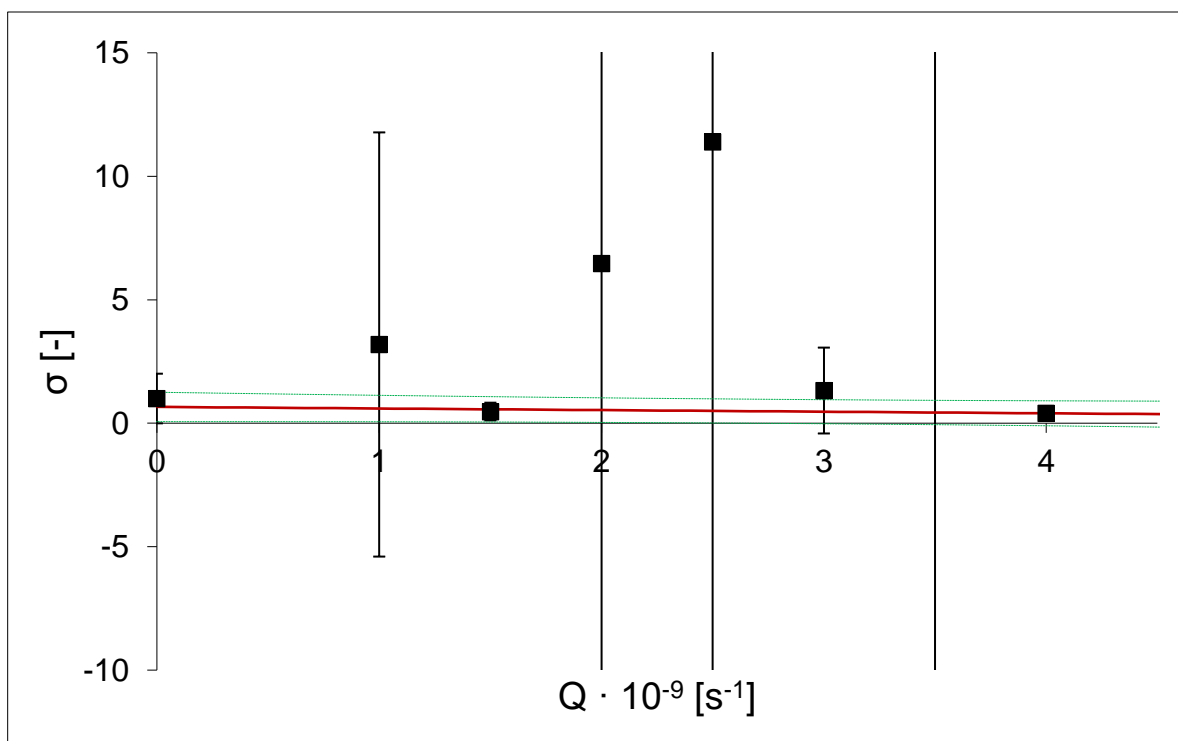
$Q \cdot 10^{-9}$ [s ⁻¹]	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
σ (1. měření) [-]	1,00	2,58	3,58	5,06	1,18	3,88	13,0	-11,8
σ (2. měření) [-]	1,00	397	2,13	3,11	48,9	1,09	-1,07	6,77
σ (3. měření) [-]	1,00	3,18	0,47	6,46	11,4	1,32	-96,9	0,40



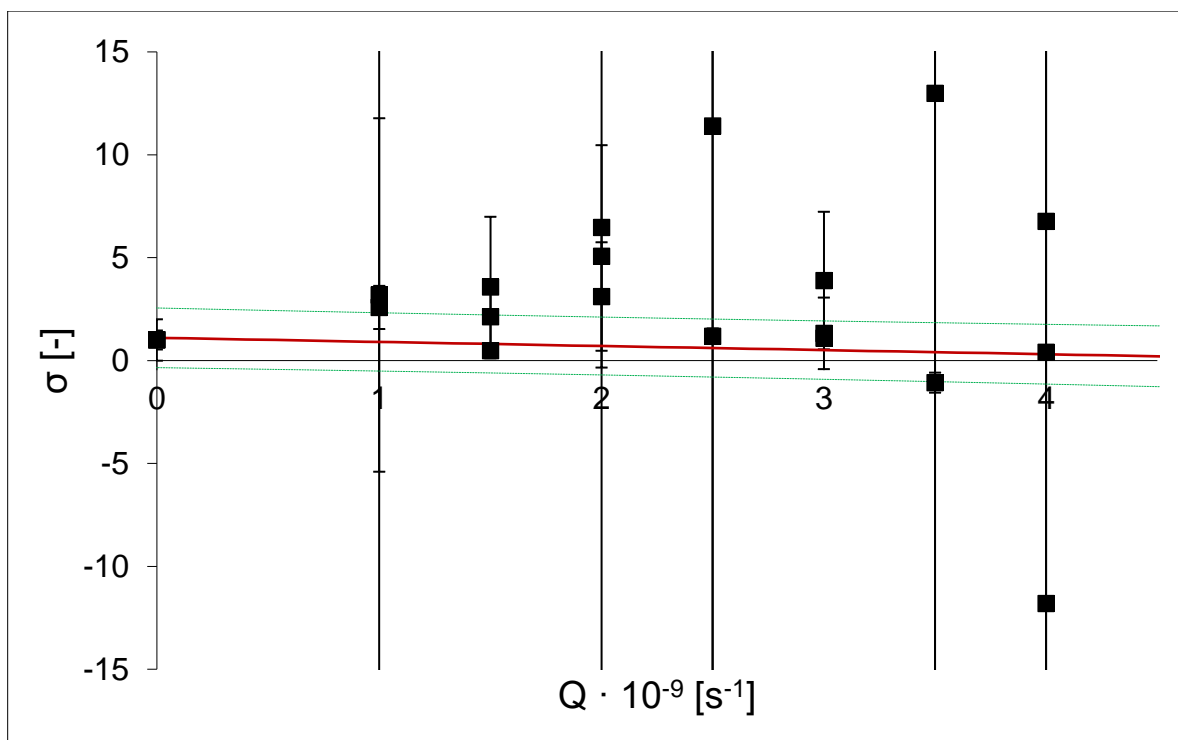
Graf 4.6: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - 185 Gy · h⁻¹ (1. měření)



Graf 4.7: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $185 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ (2. měření)



Graf 4.8: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $185 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ (3. měření)

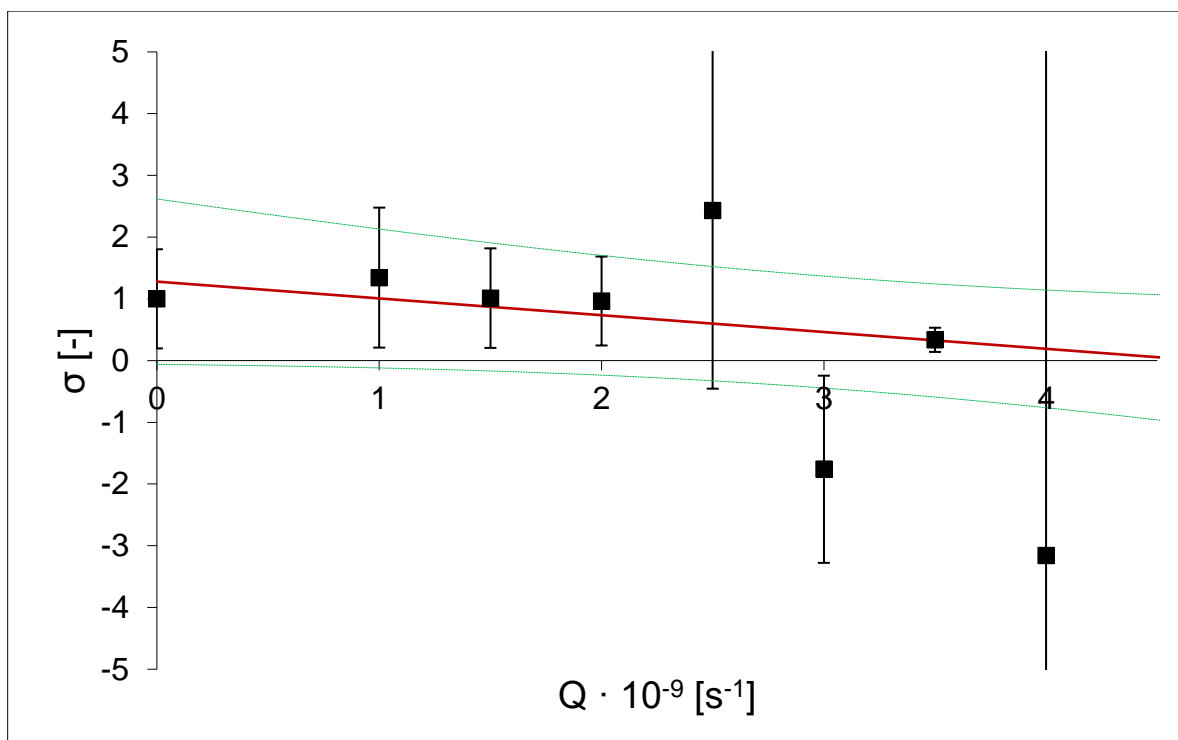


Graf 4.9: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $185 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$

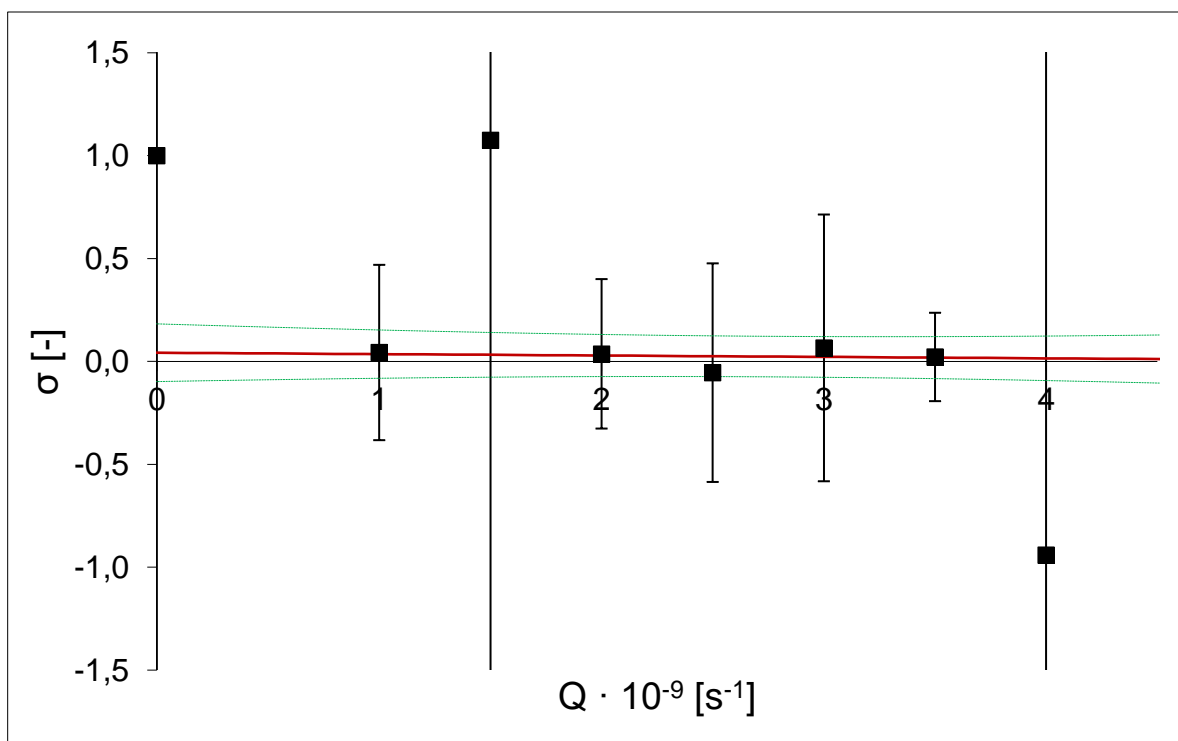
Vyhodnocení jednotlivých experimentů pro dávkový příkon $155 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ vizte na grafech 4.10 až 4.12. Společné vyhodnocení vizte na grafu 4.13. Hodnoty ochranné účinnosti jsou uvedeny v tabulce 4.7.

Tab. 4.7: Hodnoty ochranné účinnosti EtOH pro dávkový příkon $155 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$

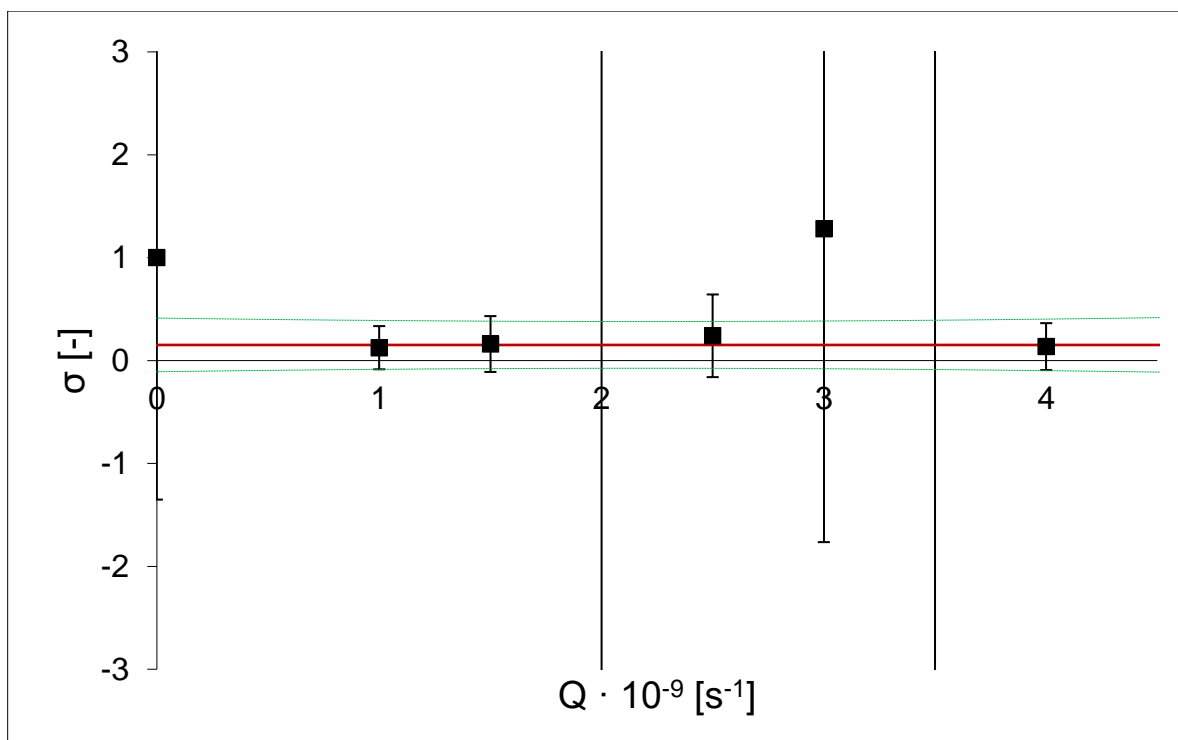
$Q \cdot 10^{-9} [\text{s}^{-1}]$	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
σ (1. měření) [-]	1,00	1,34	1,01	0,96	2,43	-1,76	0,34	-3,16
σ (2. měření) [-]	1,00	0,04	1,07	0,04	-0,05	0,07	0,02	-0,94
σ (3. měření) [-]	1,00	0,13	0,16	-0,14	0,24	1,28	10,9	0,14



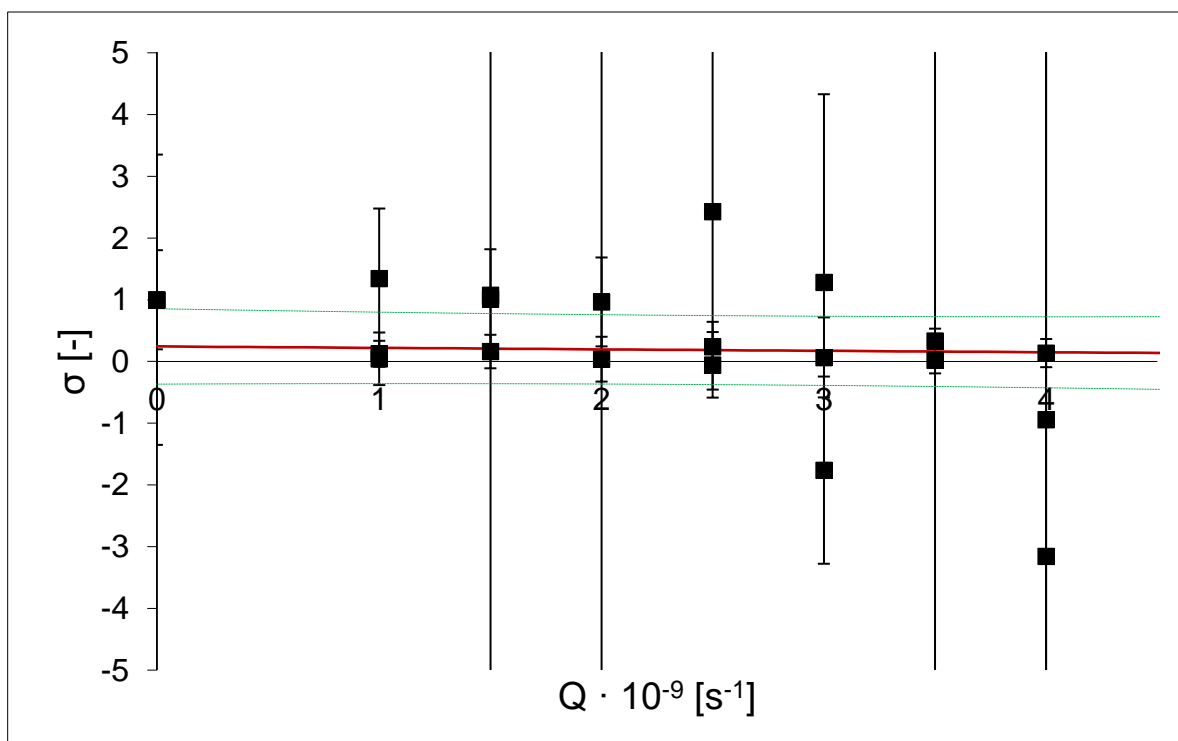
Graf 4.10: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - 155 Gy · h⁻¹ (1. měření)



Graf 4.11: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - 155 Gy · h⁻¹ (2. měření)



Graf 4.12: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $155 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ (3. měření)

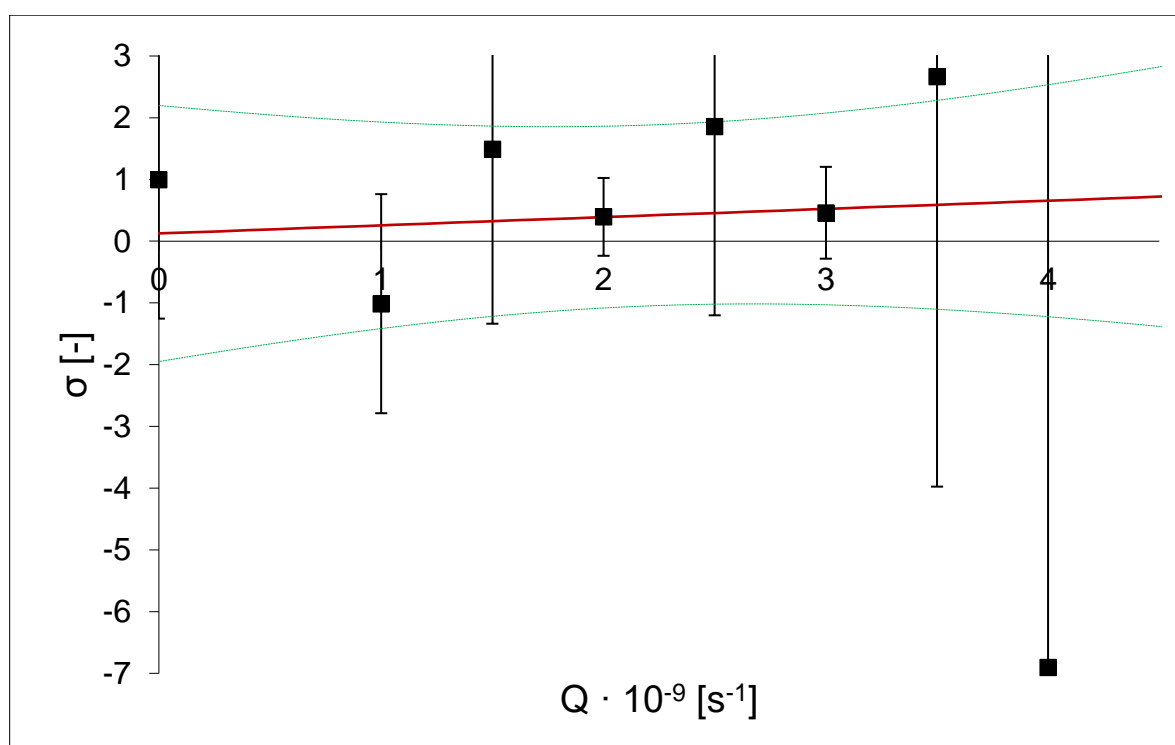


Graf 4.13: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $155 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$

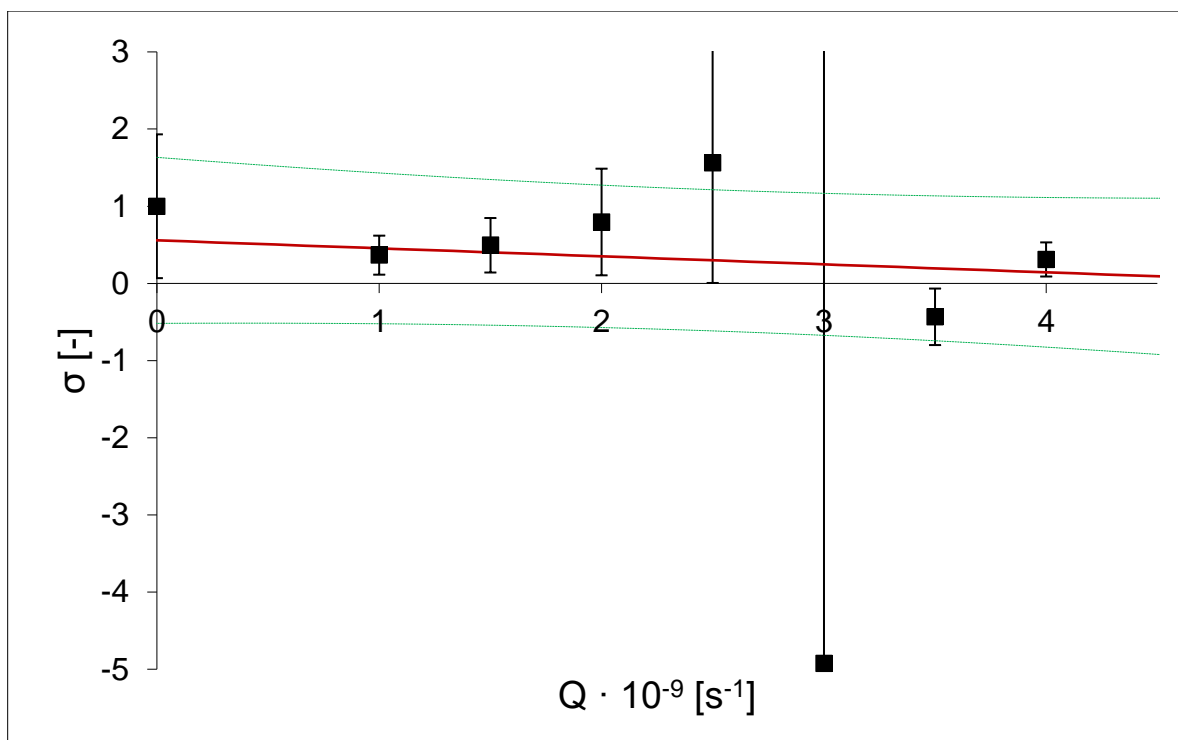
Vyhodnocení jednotlivých experimentů pro dávkový příkon $112 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ vizte na grafech 4.14 až 4.16. Společné vyhodnocení vizte na grafu 4.17. Hodnoty ochranné účinnosti jsou uvedeny v tabulce 4.8.

Tab. 4.8: Hodnoty ochranné účinnosti EtOH pro dávkový příkon $112 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$

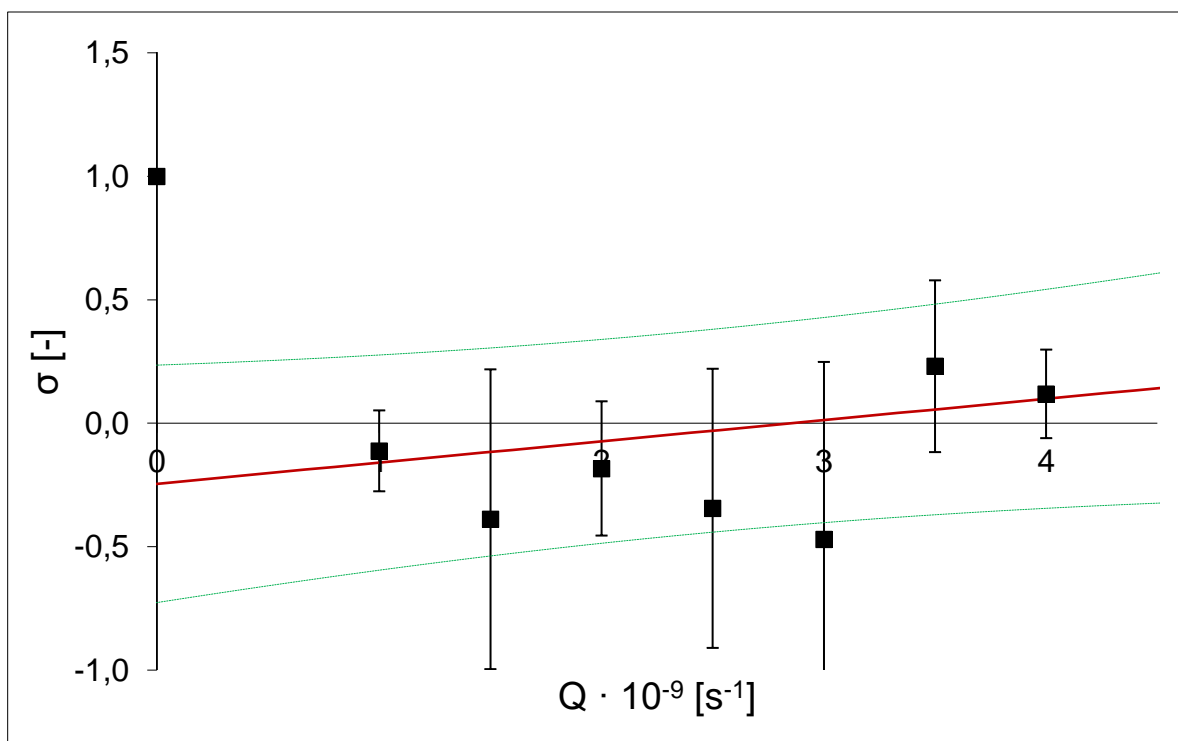
$Q \cdot 10^{-9} [\text{s}^{-1}]$	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
σ (1. měření) [-]	1,00	-1,01	1,48	0,39	1,86	0,46	2,66	-6,90
σ (2. měření) [-]	1,00	0,37	0,49	0,80	1,56	-4,93	-0,43	0,31
σ (3. měření) [-]	1,00	-0,11	-0,39	-0,18	-0,34	-0,47	0,23	0,12



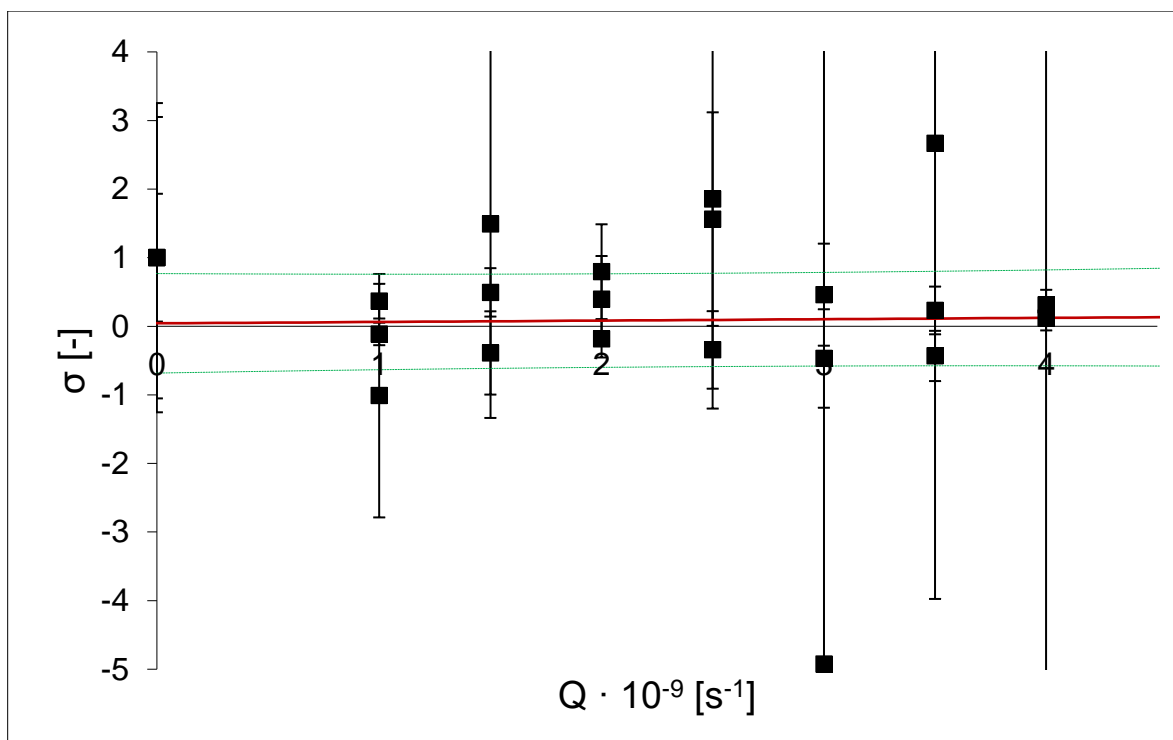
Graf 4.14: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $112 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ (1. měření)



Graf 4.15: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - 112 Gy · h⁻¹ (2. měření)



Graf 4.16: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - 112 Gy · h⁻¹ (3. měření)



Graf 4.17: Závislost ochranné účinnosti EtOH na vychytávací účinnosti - $112 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$

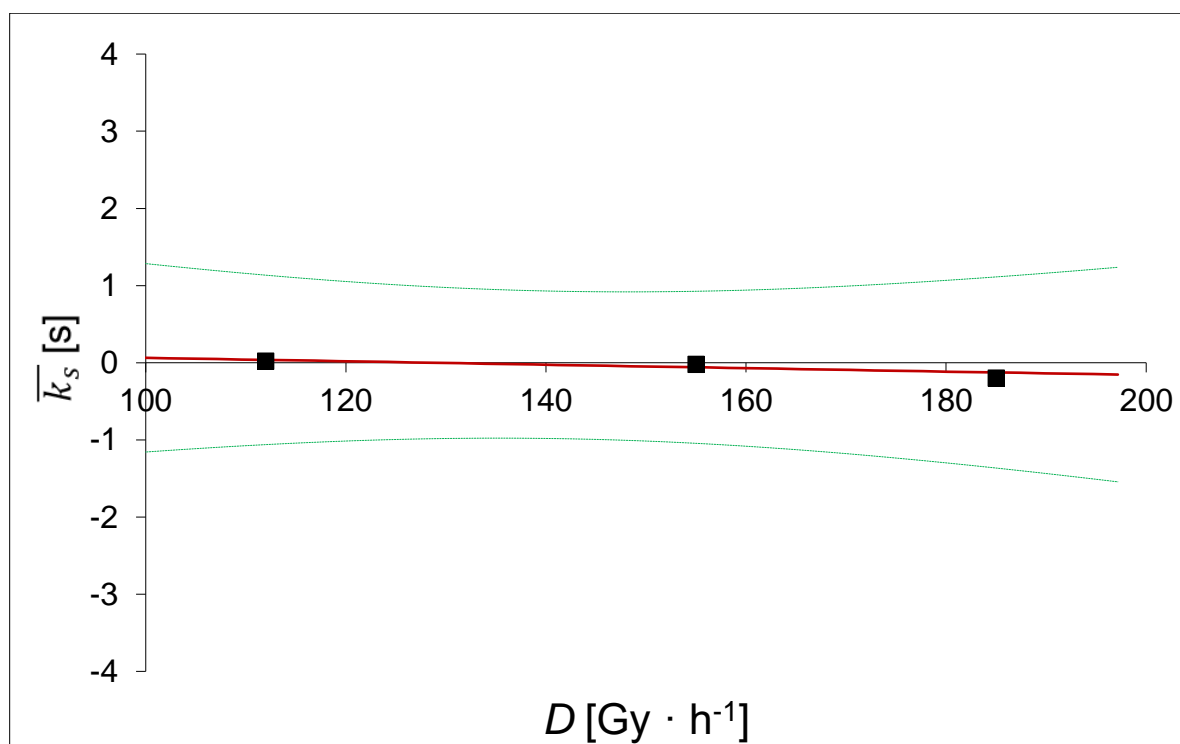
Provedené experimenty neprokázaly žádnou ochrannou účinnost EtOH jakožto vychytávače $\cdot\text{OH}$ radikálů. Téměř nulová hodnota směrnic k_s značí absenci ochranného faktoru a ochranná účinnost tudíž neprojevuje prakticky žádnou závislost na vychytávací účinnosti. K tomuto výsledku se dospělo i přes fakt, že zvolený dávkový příkon a obdržená dávka nezpůsobí zahubení naprosté většiny živých buněk ve vzorku, vizte kapitolu 7.2. Pro budoucí výzkum by bylo možná vhodné zaměřit se na proces pipetování vzorků. V případě této práce byly ozářené vzorky rozpipetovány a vyočkovány na Petriho misky postupně, což vedlo k časovému prodlení vyočkování mezi jednotlivými vzorky, během něhož mohlo docházet k odumírání buněk kvůli toxicitě EtOH. Pro budoucí výzkum by bylo možná vhodnější nejprve všechny vzorky naředit a poté postupně vyočkovat. Velké hodnoty chybových úseček jsou způsobeny výrazně rozdílnými hodnotami napočítaných kolonií na vyočkováných miskách. V několika případech také došlo k nárustu počtu kolonií pro neozářený vzorek s vyšší koncentrací EtOH (což je v rozporu s toxicitou EtOH vůči buňkám *S. cerevisiae*). Hypoteticky by v tomto případě mohlo docházet k určité ochraně i za laboratorních podmínek či vytvoření vhodnějšího prostředí pro buňky při přítomnosti EtOH. V jiných případech byla napočítána vyšší hodnota počtu kolonií pro ozářený vzorek oproti vzorku neozářenému při stejné koncentraci EtOH (to je zase v rozporu s letálními účinky rentgenového záření). V tomto případě lze uvažovat, zda-li může mít na buňky

určitý vliv vyšší teplota (cca 30 - 40 °C) ve zdroji rentgenového záření během ozařování. Tato teplota by mohla napomáhat reparačním procesům v buňkách.

Z hodnot směrnic závislosti ochranné účinnosti na vychytávací účinnosti \bar{k}_s získaných pro jednotlivé dávkové příkony byla sestrojena závislost těchto směrnic na dávkovém příkonu, vizte graf 4.18. Hodnoty směrnic k_s včetně jejich standardních odchylek s_{k_s} vizte v tabulce 4.8.

Tab. 4.8: Hodnoty směrnic k_s v závislosti na dávkovém příkonu \dot{D}

\dot{D} [Gy · h ⁻¹]	k_s [s]			\bar{k}_s [s]	s_{k_s} [s]
	1. měření	2. měření	3. měření		
112	0,13	-0,10	0,09	0,02	0,05
155	-0,27	-0,01	0,00	-0,02	0,05
185	0,10	-0,42	-0,06	-0,20	0,09



Graf 4.18: Závislost směrnic \bar{k}_s na dávkovém příkonu

Z grafu 4.18 je zřejmé, že závislost směrnic \bar{k}_s na dávkovém příkonu prakticky nulová. Ovšem vzhledem k neprokázání ochranné účinnosti EtOH by bylo vhodné provést detailnější výzkum pro více rozdílných hodnot dávkového příkonu.

Závislost ochranné účinnosti na obdržené dávce nebyla v rámci této práce prozkoumána, jelikož nebyla zjištěna žádná ochranná účinnost EtOH při dávce 129; resp. 124 Gy (dávkový příkon 155 a 185; resp. 112 Gy · h⁻¹). Obdobné studie zabývající se ochrannou účinností EtOH vůči záření γ ovšem našly prokazatelné hodnoty ochranné účinnosti při dávce 152 Gy (dávkový příkon 70 Gy · h⁻¹). (Múčka, 2013)

5 ZÁVĚR

Byla provedena chemická dozimetrie rentgenového ozařovače SCIOX Beam pomocí Frickeho dozimetru pro 4 rozdílná proudová nastavení a konstantní urychlovací napětí 195 kV. Také byla zjištěna geometrická charakterizace ozařovače, která umožnila vhodné zvolení pozic pro ozařování *S. cerevisiae*. Pro tento účel byly zvoleny pozice 5 až 8. Pro proudové nastavení 8 mA; resp. 12 mA; resp. 16 mA; resp. 20 mA byl stanoven průměrný dávkový příkon na pozicích 5 až 8 jako $74 \pm 2,4 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$; resp. $112 \pm 1,8 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$; resp. $155 \pm 1,9 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$; resp. $185 \pm 2,8 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ ($194 \pm 2,8 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ v případě vyloučení druhého měření, které se výrazně lišilo od ostatních). Tímto byla potvrzena lineární závislost dávkového příkonu na nastaveném proudu.

Provedené experimenty se *S. cerevisiae* neprokázaly žádnou ochrannou účinnost EtOH jakožto vycytávače $\cdot\text{OH}$ radikálů před rentgenovým zářením pro žádnou hodnotu dávkového příkonu. Získané hodnoty ochranné účinnosti neprojevují závislost na vycytávací účinnosti (směrnice k_s vykazují téměř nulovou hodnotu). Taktéž průměrné směrnice \bar{k}_s získané z jednotlivých experimentů neprokázaly prakticky žádnou závislost na dávkovém příkonu, což nicméně koresponduje s téměř nulovou ochrannou účinností pro jednotlivé experimenty. Ovšem vzhledem k tomu, že experimenty z předchozích prací prokázaly ochrannou účinnost EtOH pro záření gama, je vhodné pokračovat v systematickém výzkumu této problematiky. Bylo by možná vhodné zaměřit se na proces ředění a vyočkování vzorků, tak aby vyočkování všech vzorků proběhlo v co v nejkratší možné době. Také by bylo přínosné prověřit závislost buněk *S. cerevisiae* na teplotě během ozařování, která se pohybovala v rozmezí cca 30 - 40 °C.

6 LITERATURA

ADAMOVICS, John A a Robert J COAKLEY, 2019. Chemical dosimeters. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 1305(1) [cit. 2024-07-07]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1305/1/012028

ARMBRUSTER, Shannon D., Bryan M. FELLMAN, Anuja JHINGRAN, Patricia J. EIFEL, Ann H. KLOPP, Robert L. COLEMAN, Lois M. RAMONETTA a Michael FRUMOVITZ, 2021. A phase III study of transdermal granisetron versus oral ondansetron for women with gynecologic cancers receiving pelvic chemoradiation. *Supportive Care in Cancer* [online]. 29(1), 213-222 [cit. 2024-07-13]. ISSN 0941-4355. Dostupné z: doi:10.1007/s00520-020-05484-z

ARPANSA, 2024. In: ARPANSA [online]. [cit. 2024-08-01]. Dostupné z: <https://www.arpansa.gov.au/understanding-radiation/what-is-radiation/ionising-radiation/x-ray>

ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA, 2013. *Fyzikální chemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-830-6.

BORSHCHEVSKIY, Valentin, Ekaterina ROUND, Ivan EROFEEV et al., 2014. Low-dose X-ray radiation induces structural alterations in proteins. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* [online]. 70(10), 2675-2685 [cit. 2024-08-01]. ISSN 1399-0047. Dostupné z: doi:10.1107/S1399004714017295

BRUNO, A. Colello, S.J. MAZARO, L.L. AMARAL, E.M. REGO, H.F. OLIVEIRA a J.F. PAVONI, 2017. Biological X-ray irradiator characterization for use with small animals and cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 50(3) [cit. 2024-07-07]. ISSN 1414-431X. Dostupné z: doi:10.1590/1414-431x20165848

COSTA, Cedric, Johan VANDENBORRE, Francis CRUMIÈRE, Guillaume BLAIN, Rachid ESSEHLI a Massoud FATTAHI, 2012. Chemical Dosimetry during Alpha Irradiation: A Specific System for UV-Vis &in Situ Measurement. *American Journal of Analytical Chemistry* [online]. 03(01), 6-11 [cit. 2024-07-10]. ISSN 2156-8251. Dostupné z: doi:10.4236/ajac.2012.31002

DEMNEROVÁ, Kateřina, 2001. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0415-7.

Drefahl, 2024. In: DREFAHL, Axel. *DENS1: Aqueous Solution Densities* [online]. [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: https://www.axeleratio.com/calc/solution_density/form/dens1.htm

DUINA, Andrea A, Mary E MILLER a Jill B KEENEY, 2014. Budding Yeast for Budding Geneticists. *Genetics* [online]. 197(1), 33-48 [cit. 2022-12-12].

FREGENE, A. O., 1967. *Calibration of the Ferrous Sulfate Dosimeter by Ionometric and Calorimetric Methods for Radiations of a Wide Range of Energy* [online]. 256-272 [cit. 2024-07-10]. Dostupné z: <https://www-jstor-org.ezproxy.techlib.cz/stable/3572325?seq=1>

GEHRINGER, Peter, 1997. Radiation Processing of Aqueous Systems. *Siebersdorf Report*.

HALL, Eric J., 2012. *Radiobiology for the radiologist*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott. ISBN 978-1-60831-193-4.

HALLIWELL, Barry a John M.C GUTTERIDGE, 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th Ed. Oxford: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-871747-8.

HIRAYAMA, Ryoichi, Atsushi ITO, Miho NOGUCHI, Yoshitaka MATSUMOTO, Akiko UZAWA, Gen KOBASHI, Ryuichi OKAYASU a Yoshiya FURUSAWA, 2013. OH Radicals from the Indirect Actions of X-Rays Induce Cell Lethality and Mediate the Majority of the Oxygen Enhancement Effect. *Radiation Research*. 180(5), 514-523.

CHEN, Felipe, Patrícia NICOLUCCI a Oswaldo BAFFA, 2008. Enhanced sensitivity of alanine dosimeters to low-energy X-rays: Preliminary results. *Radiation Measurements* [online]. 43(2-6), 467-470 [cit. 2024-07-07]. ISSN 13504487. Dostupné z: doi:10.1016/j.radmeas.2007.11.066

CHOW, Edward, Ralph M MEYER, Keyue DING et al., 2015. Dexamethasone in the prophylaxis of radiation-induced pain flare after palliative radiotherapy for bone metastases: a double-blind, randomised placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*

Oncology [online]. 16(15), 1463-1472 [cit. 2024-07-12]. ISSN 14702045. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(15)00199-0

CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, Melpo, Sonia TYAGI, Kay-See TAN et al., 2011. Dietary flaxseed administered post thoracic radiation treatment improves survival and mitigates radiation-induced pneumonopathy in mice. *BMC Cancer* [online]. 11(1) [cit. 2024-07-13]. ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2407-11-269

KARELIOTIS, Georgios, 2015. *STUDY OF kVp AND mAs EFFECT ON RADIATION DOSE AND IMAGE QUALITY IN COMPUTED TOMOGRAPHY* [online]. [cit. 2024-07-31]. Dostupné z: doi:10.13140/RG.2.2.32266.06083

KLASSEN, N V, K R SHORTT, J SEUNTJENS a C K ROSS, 1999. Fricke dosimetry: The difference between G(Fe³⁺) for ⁶⁰Co γ-rays and high-energy x-rays. *Physics in Medicine and Biology* [online]. 44(7), 1609-1624 [cit. 2024-06-08]. Dostupné z: doi:10.1088/0031-9155/44/7/303

KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK, 2018. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*. 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-013-3.

KOHAN, Leila Mirsaleh, Jintana MEESUNGNOEN, Sunuchakan SANGUANMITH, Ridthee MEESAT a Jean-Paul JAY-GERIN, 2014. Effect of Temperature on the Low-Linear Energy Transfer Radiolysis of the Ceric-Cerous Sulfate Dosimeter: A Monte Carlo Simulation Study. *Radiation Research* [online]. 181(5), 495-502 [cit. 2024-07-07]. ISSN 0033-7587. Dostupné z: doi:10.1667/RR13592.1

MAJER, Vladimír, 1981. *Základy jaderné chemie*. 2., přeprac. vyd. Bratislava: Alfa.

MIKLA, V. I. a V. V. MIKLA, 2014. Advances in Imaging from the First X-Ray Images. In: *Medical Imaging Technology*. 1. London: Elsevier, s. 1-22. ISBN 9780124170216.

MOTL, Alois, 1990. *Úvod do radiační chemie*. První. V Praze: Vydavatelství ČVUT. ISBN 80-01-00273-X.

MÚČKA, V., J. ČERVENÁK, V. ČUBA a P. BLÁHA, 2015. Determination of the survival of yeast and bacteria under the influence of gamma or UV radiation in the presence of some scavengers of OH radicals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 304(1), 237-244.

MÚČKA, Viliam, Pavel BLÁHA, Václav ČUBA a Jaroslav ČERVENÁK, 2013. Influence of various scavengers of •OH radicals on the radiation sensitivity of yeast and bacteria. *International Journal of Radiation Biology* [online]. 89(12), 1045-1052 [cit. 2022-11-23].

MÚČKA, Viliam, Jaroslav ČERVENÁK, Dan REIMITZ, Václav ČUBA, Pavel BLÁHA a Barbora NEUŽILOVÁ, 2018. Effects of irradiation conditions on the radiation sensitivity of microorganisms in the presence of OH-radical scavengers. *International Journal of Radiation Biology*. 94(12), 1142-1150.

MÜLLER, Bruno a Ueli GROSSNIKLAUS, 2010. Model organisms — A historical perspective. *Journal of Proteomics* [online]. 73(11), 2054-2063 [cit. 2022-12-05].

MUN, Gil-Im, Seoyoung KIM, Eun CHOI, Cha Soon KIM a Yun-Sil LEE, 2018. Pharmacology of natural radioprotectors. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 41(11), 1033-1050 [cit. 2024-07-12]. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-018-1083-6

MUÑOZ ARANGO, Erika, Arissa PICKLER, Andrea MANTUANO, Camila SALATA a Carlos Eduardo DE ALMEIDA, 2020. Feasibility study of the Fricke chemical dosimeter as an independent dosimetric system for the small animal radiation research platform (SARRP). *Physica Medica* [online]. 71, 168-175 [cit. 2024-07-10]. ISSN 11201797. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmp.2020.03.006

NOVÁK, Leoš, 2014. *Radiační ochrana a dávky při výkonech vedených pod CT kontrolou* [online]. In: . [cit. 2024-08-01]. Dostupné z: https://sujb.gov.cz/fileadmin/sujb/docs/radiacni-ochrana/seminare/4_CT_intervence_Novak.pdf

ONDRÁK, Lukáš, Jana VACHELOVÁ, Marie DAVÍDKOVÁ, Barbora NEUŽILOVÁ, Václav ČUBA a Viliam MÚČKA, 2019. RADIOPROTECTIVE EFFECT OF HYDROXYL RADICAL SCAVENGERS

ON PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC CELLS UNDER VARIOUS GAMMA IRRADIATION CONDITIONS. *Radiation Protection Dosimetry*. 186(2-3), 186-190.

ROSADO, Paulo Henrique, Camila SALATA, Mariano Gazineu DAVID, Andrea MANTUANO, Arissa PICKLER, Carla Lemos MOTA a Carlos E. DE ALMEIDA, 2020. Determination of the absorbed dose to water for medium-energy x-ray beams using Fricke dosimetry. *Medical Physics* [online]. 47(11), 5802-5809 [cit. 2024-07-07]. ISSN 0094-2405. Dostupné z: doi:10.1002/mp.14473

SADEGHI, Solmaz, Hourieh KALHOR, Mohammad PANAHI et al., 2021. Keratinocyte growth factor in focus: A comprehensive review from structural and functional aspects to therapeutic applications of palifermin. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 191, 1175-1190 [cit. 2024-07-13]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.09.151

SALATA, C, M DAVID, P ROSADO a C DE ALMEIDA, 2015. SU-F-BRA-10: Fricke Dosimetry: Determination of the G-Value for Ir-192 Energy Based On the NRC Methodology. *Medical Physics* [online]. 42(626), 3535-3535 [cit. 2024-07-10]. ISSN 00942405. Dostupné z: doi:10.1118/1.4925221

SHERER, M. A. S., P. J. VISCONTI, E. R. RITENOUR a K. W. HAYNES, 2018. *RADIATION PROTECTION IN MEDICAL RADIOGRAPHY*. 8th. ISBN 978-0-323-44666-2.

SCHREINER, L J, 2004. Review of Fricke gel dosimeters. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 3, 9-21 [cit. 2024-07-10]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/3/1/003

SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH, 2019. *Analytická chemie*. Vydání: první. Přeložil Karel NESMĚRÁK, přeložil Václav ČERVENÝ, přeložil Tomáš KŘÍŽEK, přeložil Eliška NOVÁKOVÁ. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-043-0.

THELANDER, Lars, 2007. Ribonucleotide reductase and mitochondrial DNA synthesis. *Nature Genetics* [online]. 39(6), 703-704 [cit. 2024-07-12]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng0607-703

UNEP, 2016. *Ionizující záření: účinky a zdroje*. ISBN 978-92-807-3600-7.

WARREN, Anna J., Danny AXFORD a Robin L. OWEN, 2019. Direct measurement of X-ray-induced heating of microcrystals. *Journal of Synchrotron Radiation* [online]. 26(4), 991-997 [cit. 2024-08-01]. ISSN 1600-5775. Dostupné z: doi:10.1107/S1600577519003849

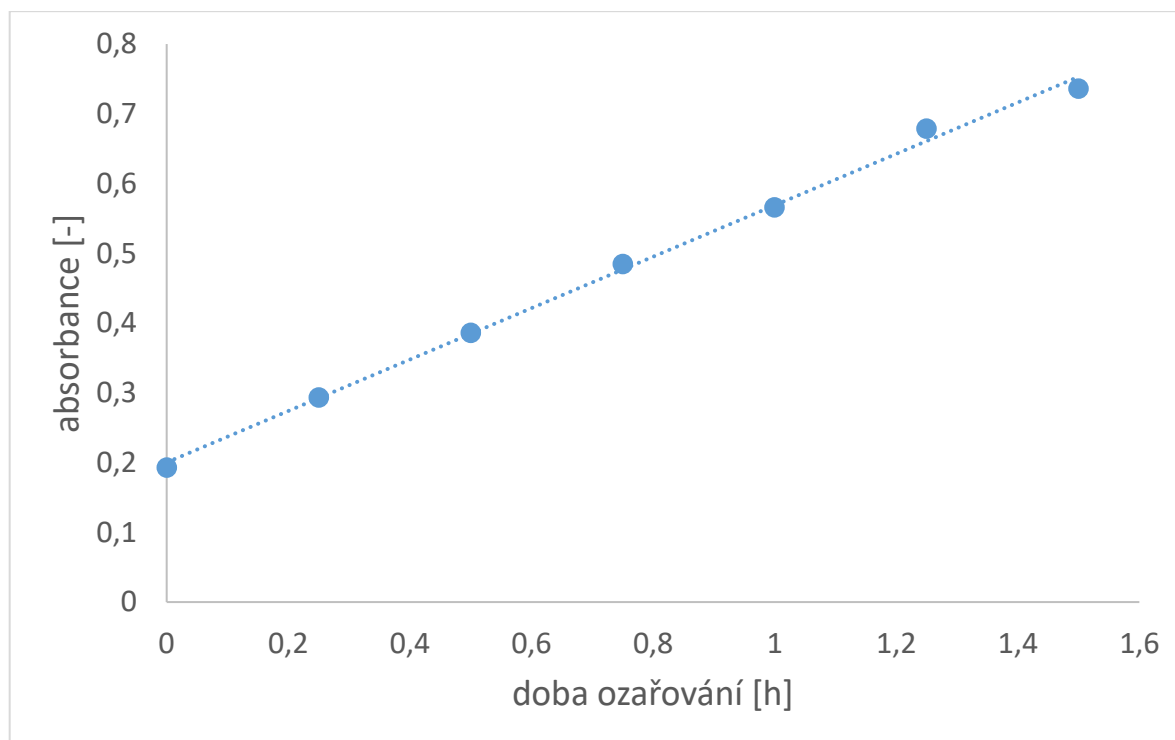
WILLEY, Joanne M., Kathleen M. SANDMAN a Dorothy H. WOOD, 2020. *Prescott's Microbiology: Eleventh Edition*. 11th ed. New York: McGraw-Hill Education. ISBN 978-1-260-21188-7.

ZELDIN, Oliver B., Markus GERSTEL a Elspeth F. GARMAN, 2013. Optimizing the spatial distribution of dose in X-ray macromolecular crystallography. *Journal of Synchrotron Radiation* [online]. 20(1), 49-57 [cit. 2024-08-01]. ISSN 0909-0495. Dostupné z: doi:10.1107/S0909049512044706

7 PŘÍLOHA

7.1 Ukázka závislosti absorbance na dávce

V grafu 7.1 je znázorněna ukázková závislost naměřené absorbance na době ozařování, tudíž dávce. Hodnoty jsou uvedeny pro proudové nastavení 12 mA, to odpovídá $112 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$, na pozici 4.



Graf 7.1: Závislost absorbance na době ozařování pro nastavení 12 mA na pozici 4

7.2 Ukázka počtu kolonií

Níže je uvedena tabulka 7.1 jakožto příkladná tabulka počtu životaschopných buněk, a tudíž spočtených kolonií. Uvedené hodnoty platí pro 3. experiment při proudovém nastavení 16 mA, tudíž $155 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$. Počet buněk v 1 ml vzorku je uveden kvůli rozdílnému ředění jednotlivých vzorků. Číslo u popisu vzorku odpovídá koncentraci EtOH v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, písmeno *n* značí neozářený vzorek a písmeno *o* vzorek ozářený.

Tab 7.1: Počet kolonií pro dávkový příkon 155 Gy · h⁻¹

vzorek	1. miska	2. miska	3. miska	4. miska	průměr	počet buněk v 1 ml vzorku
0 - <i>n</i>	116	121	137	141	129	2575000
0 - <i>o</i>	230	240	240	257	242	2417500
0,5 - <i>n</i>	121	138	140	145	136	2720000
0,5 - <i>o</i>	145	162	175	175	164	1642500
0,75 - <i>n</i>	144	146	151	154	149	2975000
0,75 - <i>o</i>	170	207	208	219	201	2010000
1 - <i>n</i>	93	96	98	100	97	1935000
1 - <i>o</i>	177	193	199	213	196	1955000
1,25 - <i>n</i>	134	135	141	143	138	2765000
1,25 - <i>o</i>	208	213	214	216	213	2127500
1,5 - <i>n</i>	102	113	119	124	115	2290000
1,5 - <i>o</i>	215	219	220	<u>263</u>	218	2180000
1,75 - <i>n</i>	96	97	112	128	108	2165000
1,75 - <i>o</i>	185	200	234	242	215	2152500
2 - <i>n</i>	<u>111</u>	122	123	124	123	2460000
2 - <i>o</i>	133	149	166	170	155	1545000

Podtržené hodnoty byly vyloučeny k následnému zpracování výsledků na základě Dean-Dixonova testu.