

České vysoké učení technické

Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská

Katedra jaderné chemie

***Radiační poškození biomolekul
v poli ionizujícího nebo UV
záření***

*Radiation damage to the biomolecules in the field of ionizing or UV
radiation*



Eliška Holubová

Bakalářská práce

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením doc. Ing. Václava Čuby, Ph.D. a Ing. Xenie Popovič, Ph.D. Použité zdroje a literatura jsou řádně citovány.

V Praze dne 5. 1. 2022

.....

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří hlavně doc. Ing. Václavu Čubovi, Ph.D. a Ing. Xenii Popovič, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování věnovali. Také bych ráda poděkovala lidem, kteří mají zásluhu na tom, jak daleko jsem se dostala.

Těž děkuji Grantové Agentuře ČR za finanční podporu této práce, projekt GA20-06374S.

Název práce: Radiační poškození biomolekul v poli ionizujícího nebo UV záření

Autorka: Eliška Holubová

Obor: Jaderná chemie

Druh práce: Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Václav Čuba, Katedra jaderné chemie, České vysoké učení technické v Praze

Konzultant: Ing. Xenie Popovič, Ph.D., Katedra jaderné chemie, České vysoké učení technické v Praze

Abstrakt:

Bakalářská práce byla zaměřena na studium vlivu ionizujícího nebo UV záření na biomolekuly. Důraz byl kladen na biomolekuly fosfolipidu, proteinů a DNA. V úvodní části byla provedena literární rešerše, která se věnovala popisu těchto molekul a jejím interakcím se zářením. Experimentální část navazovala na probíhající výzkum týkající se radiačního účinku na molekuly protoporphyrinu IX (ppIX). V rámci experimentu byla biomolekula ppIX vystavena záření UV o vlnové délce 253,7 nm po různou dobu a zdroji gama záření ^{60}Co o dávkovém příkonu 14,920 Gy/hod. Poté byla měřena změna absorbance.

Klíčová slova:

Radiolýza, fotolýza, protoporphyrin IX, proteiny, UV záření, ionizující záření

Title: Radiation damage to the biomolecules in the field of ionizing or UV radiation

Author: Eliška Holubová

Branch: Nuclear Chemistry

Type of thesis: Bachelor thesis

Advisor: doc. Ing. Václav Čuba, Ph.D., Department of Nuclear Chemistry, Czech Technical University in Prague

Consultant: Ing. Xenie Popovič, Ph.D., Department of Nuclear Chemistry, Czech Technical University in Prague

Abstract:

This thesis was focused on the study of the influence of ionizing or UV radiation on biomolecules. An emphasis was given to phospholipids, proteins, and DNA. The introductory part contains survey of literature regarding the properties of these molecules and their interaction with radiation. The experimental part is a continuation of the ongoing research related to the radiation effect on protoporphyrin IX (ppIX) molecules. The experiment put the ppIX biomolecule under UV radiation with a wavelength of 253.7 nm for a varying amount of time and gamma rays from a 14.920 Gy/h ^{60}Co source. The change of absorbance was subsequently measured.

Key words:

Radiolysis, photolysis, protoporphyrin IX, proteins, UV radiation, ionizing radiation

Seznam použitých zkratek

AMK	aminokyselina
EtOH	ethanol
MeOH	methanol
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
pplX	protoporfyrin IX
UV	ultrafialové záření
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Cys	cystein
Lys	lysin
Thr	threonin
Pro	prolin
Glu	kyselina glutamová
Asp	kyselina asparagová
Arg	arginin
Met	methionin
SS vazba	disulfidická vazba
Tryp	triptofan
XUV	Měkké rentgenové záření
VUV	Vakuum UV záření
EUV	Extrémní UV záření
FUV	Daleké UV záření

UVC	Ultrafialové C záření
MUV	Střední UV záření
UVB	Ultrafialové B záření
NUV	Blízké UV záření
UVA	Ultrafialové A záření
LED	elektroluminiscenční dioda
SCOP	Strukturní klasifikace proteinů

Obsah

1. Úvod	10
2. Teoretická část	12
2.1. Biomolekuly a molekuly v buňce.....	12
2.1.1. Lipidy	12
2.1.2. Proteiny	14
2.1.3. DNA	15
2.1.4. Voda a vnitřní prostředí buňky	16
2.1.5. Protoporfyrin IX.....	16
2.2. Zdroje ionizujícího a UV záření.....	17
2.2.1. Zdroje ionizujícího záření	18
2.2.2. Zdroje UV záření.....	20
2.3. Radiolýza biomolekul	21
2.3.1. Radiolýza a fotolýza vody	21
2.3.2. Radiolýza fosfolipidů	23
2.3.3. Radiolýza proteinů	25
2.3.4. Radiolýza DNA.....	26
3. Experimentální část	28
3.1. Přístroje a metody.....	28
3.1.1. UV/VIS spektrofotometrie	28
3.1.2. Nízkotlaká rtuťová výbojka s optickou lavicí.....	28
3.1.3. Gammacell	29
3.1.4. Výběr rozpouštědla	30
3.1.5. Příprava vzorků pro měření na spektrofotometru.....	30
3.1.6. Seznam chemikálií.....	31
4. Výsledky a diskuze	32
4.1. Výběr vhodného rozpouštědla	32
4.2. 1. série experimentů	34
4.2.2. 2. série experimentů	38
4.2.3. 3. série experimentů	40
4.2.4. Shrnutí výsledků	45
5. Závěr	46
6. Použitá literatura	47

1. ÚVOD

Vliv ionizujícího záření na buněčné struktury a biomolekuly samotné je studován od samotného objevu radioaktivity. Dopady záření byly pozorovány běžně u lidí, kteří přicházeli do styku s radioaktivitou. V návaznosti na to začali vznikat první studie těchto jevů a byla snaha objasnit jejich původ.

Jedním ze zakladatelů oboru radiobiologie byl Douglas Lea, který v roce 1946 napsal knihu *Actions of Radiations on Living Cells*, která se věnovala vlivu záření na buňku (Gray, 1952). Na základě této knihy začaly vznikat studie, které zkoumaly vliv záření na jednotlivé biomolekuly (například peptidy, polypeptidy a proteiny (Garrison et al., 1987), proteiny (Garrison et al., 1962; Kumta et al., 1961), DNA (Mark et al., 1989) atd.).

Tyto studie byly důležité k pochopení chování buňky jako celku v poli ionizujícího záření. V rámci této práce byly pro studium zvoleny biomolekuly fosfolipidů, proteinů a DNA. Ty nebyly vybrány náhodně. Fosfolipidy jsou jednou z hlavních složek buněčné membrány. Proteiny mají širokou škálu funkcí (např. transportní, stavební, katalytickou ...) a DNA je nositelem genetické informace. Všechny tyto molekuly jsou pro správné fungování buňky důležité a lze je považovat za citlivé cíle. Poškozením těchto biomolekul může dojít k buněčné smrti. Cílené poškození buňky je žádoucí například během léčby rakoviny, kdy dochází k nekontrolovanému množení buněk. Fotodynamická terapie je jedna z metod, kde se tyto poznatky aplikují.

V praktické části byla provedena série pokusů s protoporfyrinem IX (ppIX), což je fotosenzibilizátor a prekurzor hemu. Hem je jedna ze dvou částí, ze kterých je složený hemoglobin, což je metaloprotein obsažený v červených krvinkách savců, jehož hlavní funkcí je transport kyslíku a oxidu uhličitého. Experimenty s touto molekulou navazují na disertační práci Ing. Xenie Popovič, Ph.D. (Popovich, 2020). V rámci její práce byl hlavním cílem návrh struktury, syntéza a stanovení vlastností multimodálních luminiscenčních nanokompozitních materiálů. Tyto materiály obsahují scintilující jádro. Jádro, na které byla navázaná biomolekula ppIX vykazovalo po vystavení vlivu gama zářením vyšší hodnoty absorbance. Tento jev byl navržen k další studii. Předpokládané vysvětlení jevu může být, že během radiolýzy vzniká radiolytický produkt, který má vyšší

absorbanci než původní molekula. V rámci této práce byl navržen experiment, během kterého je molekula ppIX vystavena jak gama záření, tak UV záření. Tím dojde k vyšetření chování samotné molekuly ppIX, která není součástí nanokompozitu. Takto je možné zjistit, co se s danou molekulou děje, když je vystavena záření.

Cíle této práce jsou:

1. Vypracování literární rešerše s důrazem na radiolýzu fosfolipidů, proteinů a DNA;
2. Porovnání účinků ozařování s různými parametry (energie, dávková rychlost, druh záření);
3. Orientační experimenty pro zhodnocení vlivu neionizujícího záření na vybrané biomolekuly;
4. Sepsání práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Biomolekuly a molekuly v buňce

Nejmenší jednotka živé hmoty, která může existovat sama o sobě, je buňka. Všechny rostliny a zvířata jsou nimi tvořeny (Hornby, 2021). Biomolekuly jsou jakékoli z mnoha látek, které produkují buňky a živé organismy (Rogers K., 2021). Tato definice není zcela kompletní. Je pravda, že v buňkách se vytváří biomolekuly, ale zároveň v některých procesech vznikají anorganické sloučeniny např. CO₂ nebo voda, a ty za biomolekuly nemohou být považovány. V encyklopedii biomedicínského inženýrství (Manivasagam G., 2019) definují biomolekuly takto: „Biomolekuly se vyjma buněk a strukturních proteinů řadí mezi biologické materiály za předpokladu, že jsou využívány ve formě přírodních látek“.

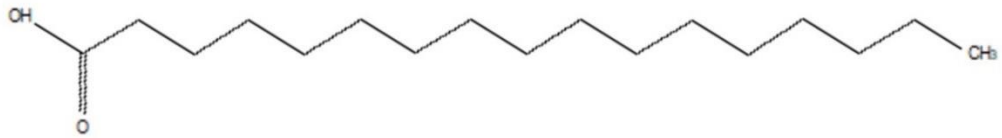
Biomolekuly mají širokou škálu velikostí a struktur, také plní mnoho funkcí. Čtyři hlavní makromolekulární typy biomolekul jsou sacharidy, lipidy, nukleové kyseliny a proteiny. Existují i malé biomolekuly, kam se řadí aminokyseliny, vitamíny, mastné kyseliny a enzymy. Biomolekuly hrají nepostradatelnou roli ve všech životních procesech, včetně vývoje onemocnění (Harekrishna et al., 2019). V případě že se jedná o zdravou buňku, lze během studia těchto molekul pochopit fyziologickou funkci, která reguluje správný růst a vývoj lidského těla (Suresh et al., 2019). Pokud dojde k ozáření biomolekul, tak v závislosti na množství a energii fotonů se změní jejich vlastnosti.

V rámci této práce se zaměřím na pozorování účinků ozáření s různými parametry a jeho následné využití.

2.1.1. Lipidy

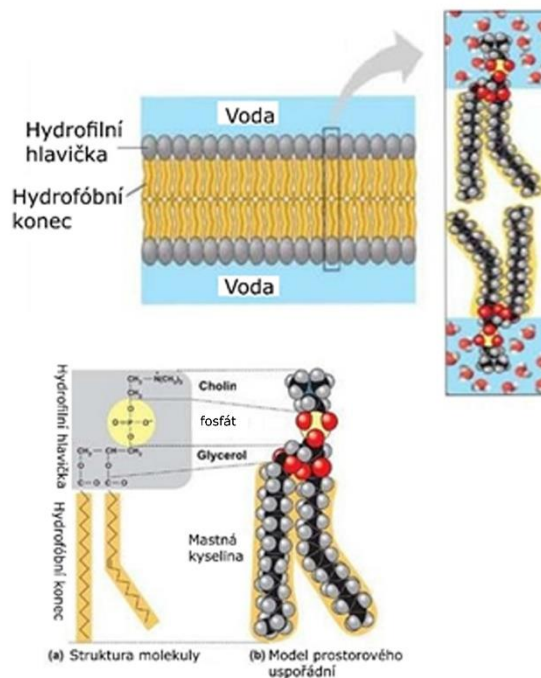
Lipidy jsou estery vyšších karboxylových kyselin (viz obrázek 1) a jejich společnou vlastností je hydrofobní povaha. Složené lipidy jsou amfipatické – část jejich struktury je hydrofilní a jiná část, obvykle větší část, je hydrofobní (Thompson et al., 2020). Hydrofobní a hydrofilní vlastnosti popisují chování molekul ve vodě. V případě, že je molekula polární, dobře se rozpouští v polárním rozpouštědle – vodě a nazývá se tak hydrofilní. Naopak, když je molekula nepolární, ve vodě se nerozpouští a jedná se tedy o hydrofobní molekulu. Polarita molekul je dána rozdílem elektronegativit atomů spojených kovalentní vazbou, v případě, že je výsledek mezi 0,4 – 1,7, je vazba polární, je-li výsledek menší než 0,4, jedná se o vazbu nepolární. Elektronegativita je tendence atomu přitahovat vazebné elektrony v molekule (Crichton et al., 2012).

Fosfolipidy jsou amfifilní molekuly stejné povahy jako povrchově aktivní látky – sestávají se z polární nebo nabitě hydrofilní hlavičky a hydrofobního konce, řetězce nasycených nebo nenasycených mastných kyselin (Pelcé et al., 2019). Nepolární hydrofobní část obsahuje řetězec organické kyseliny a polární hydrofobní část obsahuje



OBRÁZEK 1 MOLEKULA LIPIDU (Kyseliny heptadecylové), obsahující dlouhý hydrofobní řetězec uhlovodíku

fosfátovou skupinu, na kterou často může být navázaná další látka. Fosfolipidy se běžně vyskytují v buněčné membráně, jež je nazývána též fosfolipidovou membránou. Nejčastějšími fosfolipidy v membráně buněčné stěny jsou fosfatidylcholin (Alberts et al., 1998). Vrstvy fosfolipidů v buněčné membráně jsou k sobě otočeny hydrofobními – nepolárními konci. Hydrofilní – polární hlavičky směřují vně. Tyto vrstvy tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu, která je vidět na obrázku (2).



OBRÁZEK 2 V HORNÍ ČÁSTI JE ZOBRAZENA FOSFOLIPIDOVÁ DVOJVRSTVA. DOLNÍ ČÁST ZNÁZORŇUJE SAMOSTATNOU MOLEKULU FOSFOLIPIDU, JEJÍ STRUKTURÁLNÍ (A) A PROSTOROVÉ (B) USPOŘÁDÁNÍ (CAMPBELL ET AL., 2007)

Buněčná membrána má polotekutý charakter, jedná se o mezomorfní skupenství, což je stav mezi kapalinou a pevnou látkou. Membrána není homogenní a obsahuje další molekuly, které upravují její polotekutý charakter.

Kromě buněčné membrány se v buňce vyskytují organely, které mají vlastní membránu, odtud název membránové organely. Tyto membrány mají podobné složení jako buněčná membrána. Mezi membránové organely patří buněčné jádro, endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, lyzozomy, peroxisomy a mitochondrie. Membrány organel

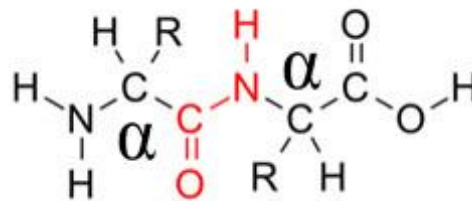
mají různou strukturu a funkci. Společnou vlastností je lipidová dvojvrstva obsahující proteiny.

Buněčné jádro je od okolí odděleno dvěma fosfolipidovými membránami, které navíc obsahují tzv. buněčné póry. Tyto póry jsou vytvořeny proteiny, přes které dochází k transportu konkrétních makromolekul zejména RNA. Uvnitř pórů se nachází chromatin, což je komplex DNA a proteinů.

Glykolipidy jsou tvořeny fosfolipidem, na jehož fosfátovou skupinu je navázán sacharidový řetězec. Vyskytují se na povrchu eukaryotických buněk (Sharon et al., 1997) jako součást buněčné membrány a fungují jako receptory. Také se účastní buněčné signalizace (Schnaar et al., 2004), což je způsob komunikace mezi buňkami.

2.1.2. Proteiny

Proteiny jsou makromolekuly, které jsou složeny ze strukturálních jednotek nazvaných aminokyseliny. Jednotlivé aminokyseliny jsou mezi sebou spojeny kovalentní peptidovou vazbou, která je zobrazena na obrázku (3).



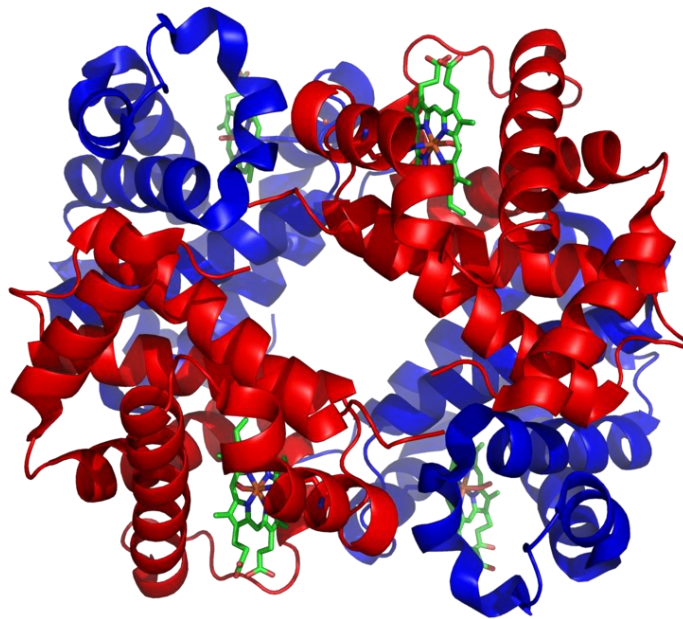
OBRAZEK 3 PEPTIDOVÁ VAZBA (VYZNAČENÁ ČERVENĚ) A PÍSMENEM ALFA NAD NEBO POD UHLÍKEM JE OZNAČENÝ ALFA UHLÍK

Aminokyseliny jsou molekuly, které obsahují karboxylovou kyselinu COO^- a amino skupinu NH_4^+ vázanou na alfa uhlík. Příklad nejjednodušší aminokyseliny je glycin (systematický název: aminoethanová kyselina). Existuje 20 základních aminokyselin (AMK), ze kterých se skládají proteiny (Alberts et al., 1998).

Popis struktury proteinů je rozdělen do čtyř skupin. Primární struktura popisuje pořadí aminokyselin, jak jsou pospojované peptidovou vazbou za sebou. Je popisována od N-konce k C-konci proteinu. Další struktury popisují prostorové uspořádání proteinů. Sekundární struktura je určena pomocí vodíkových můstků a dělí se na alfa helix, což je pravotočivá šroubovice anebo beta skládaný list, který připomíná složený list papíru. Terciální struktura určuje, jestli se jedná o fibrilární nebo globulární prostorové uspořádání proteinu. Toto uspořádání může být dáno tvorbou disulfidických můstků a dalších mezi molekulových interakcí. Uspořádání proteinových jednotek vůči sobě popisuje kvarterní skupina. Například krevní barvivo hemoglobin má kvartérní strukturu, která se skládá ze dvou párů různých proteinů. Tyto proteiny jsou označeny jako alfa a beta řetězce, viz obrázek (4). Alfa řetězec obsahuje 141 aminokyselin a beta řetězec 146

aminokyselin. Tyto jednotky jsou vázány pohromadě hydrofobními interakcemi, vodíková vazba a iontový pár (solné můstky) mezi opačně nabitými postranními řetězci aminokyselin (Ouellette et al., 2018).

Databáze klasifikace proteinů podle struktury, známá pod zkratkou SCOP, poskytuje podrobný popis vztahů známých proteinových struktur. Klasifikace je na hierarchických úrovních: první dvě úrovně, rodina a nadrodina, zobrazují vzdálené a blízké evoluční vztahy; třetí, obvyklé sbalení, též nazývané jako fold, popisuje geometrické vztahy v proteinu (Conte et al., 2000, Valenta, 2013).



OBRÁZEK 4 STRUKTURA LIDSKÉHO HEMOGLOBINU. ALFA A BETA PODJEDNOTKY JSOU ČERVENÉ, RESPEKTIVE MODRÉ A ZELENÉ HEMOVÉ SKUPINY OBSAHUJÍCÍ ŽELEZO. (WHEELER, 2007)

2.1.3. DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA), se nachází v jádře buňky. DNA je tvořeno dvěma vlákny a tvoří pravotočivou dvoušroubovici, které se skládají z aminokyselin. Jedná se o polymer.

Primární struktura DNA je určena stejně jako u proteinů, pořadím látek. V tomto případě se nejedná o jednotlivé aminokyseliny, ale o pořadí nukleových bází. Sekundární struktura je zde tvořena vodíkovými můstky s tím, že adenin se páruje dvěma můstky s thyminem a guanin třemi vodíkovými můstky s cytosinem.

Tento polymer se skládá z nukleotidů, které tvoří šroubovici.

Z aminokyselin se skládají nukleové báze. V DNA se nachází čtyři, dvě purinové (adenin, guanin) a dvě pyrimidinové (cytosin, thymin). Na tyto báze se váže sacharid 2-deoxy-D-ribóza, to tvoří nukleosid. Následnou fosforylací vznikne nukleotid, což je stavební kámen DNA. Fosfát se váže na uhlík C5 deoxyribózy (Alberts et al., 1998).

RNA je zkratka pro ribonukleovou kyselinu, stejně jako DNA se jedná o polymer složený v tomto případě z ribonukleotidů. Ribonukleotidy jsou složené z nukleové báze adeninu, guaninu, cytosinu nebo uracilu, sacharidu ribózy a kyseliny fosforečné.

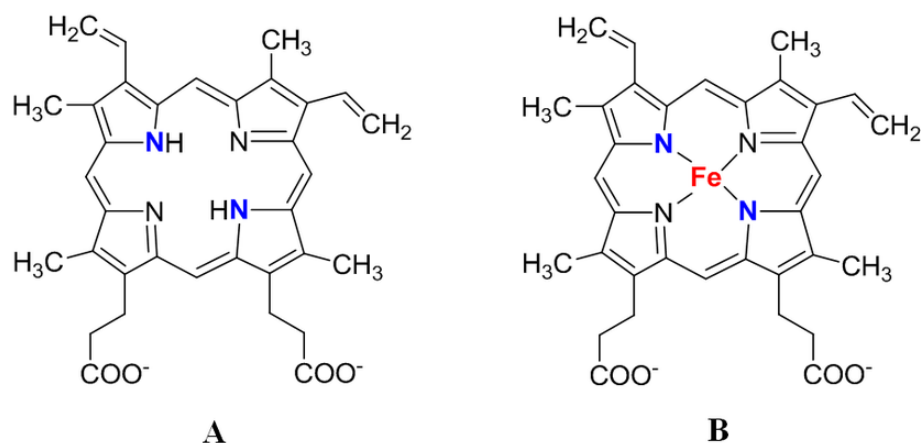
2.1.4. Voda a vnitřní prostředí buňky

Voda je anorganická molekula, ale její význam pro biomolekuly v buňce je naprosto zásadní. Hmotnost buňky je ze 70 % složená z vody (Cooper et al., 2000). Mezi základní funkce vody patří: transport látek, rozpouštění iontů, zprostředkovávání chemických reakcí, udržování stálého prostředí atd. Voda je obsazena v cytosolu, což je tekutá složka cytoplazmy. Cytoplazma je veškerý obsah buňky kromě jádra. V cytosolu se dále vyskytují ionty (K^+ , Na^+ , Cl^- ...), aminokyseliny a další z malých biomolekul.

Dále cytoplazmu prostupuje síť polymerních proteinů, tzv. cytoskelet. Ten může být tvořen mikrofilamenty, mikrotubuly a intermediálními filamenty. Z toho vyplývá, že buněčné prostředí je plné sférických překážek, které zpomalují difúzi a mají vliv na reakce uvnitř buňky (Luby-Phelps et al., 1999). Cytoskelet dále ovlivňuje uspořádání organel v buňce.

2.1.5. Protoporfyrin IX

Protoporfyrin (zkráceně ppIX) je řazen mezi malé biomolekuly. V lidském organismu se v malém množství objevuje ve všech buňkách. Slouží jako prekurzor k syntéze ferroprotoporfyrinu IX, který se označuje jako hem. V nepřítomnosti železa je ppIX silný fotosenzibilátor, který po fotoaktivaci účinně přeměňuje kyslík v základním stavu na singletový kyslík (1O_2) (Ding et al., 2011). Strukturní rozdíly mezi hemem a ppIX jsou malé a jsou vidět na obrázku (5). Hlavním rozdílem je obsah železa v tetrapyrrolovém jádře, proto se hem řadí do rodiny metaloproteinů. Hem je součástí proteinu hemoglobinu, což je protein vyskytující se v červených krvinkách.



OBRÁZEK 5 CHEMICKÁ STRUKTURA PROTOPORFYRINU IX A HEMOVÉ SKUPINY. (A) PŘEDSTAVUJE MOLEKULU PROTOPORFYRINU IX A (B) FERROPROTOPORFYRIN IX, ZNÁMÝ TĚŽ JAKO HEM. (DA SILVA ET AL. 2012)

PpIX je zajímavá biomolekula pro její možné aplikace v léčbě a diagnostice rakoviny, například fotodynamická terapie (PDT), která je založena na fotodynamických vlastnostech této molekuly (Kennedy et al., 1992; Sachar et al., 2015).

PpIX je hnědočervený prášek, který po rozpuštění způsobuje zbarvení roztoku. Díky této vlastnosti je možné měřit absorpanci v UV a viditelné oblasti. Charakteristický absorpční pík v případě protoporphyrinů je kolem 400 nm, též zvaný jako Soretův pás (Elder et al., 1994). Změnou fyzikálních nebo chemických parametrů lze pozorovat změny absorpance ppiX. Této vlastnosti bylo využito v experimentální části. Například absorpční spektrum je závislé na pH, v případě že je pH = 1, tak je hlavní pík v maximum 405 nm. V případě, že je pH mezi hodnotami 3–7 je široký absorpční pík s maximy 352 a 450 nm a v případě pH = 12 je maximum v hodnotě 382 nm. Tento jev je vysvětlený tím, že při nízkém pH se jedná o monomer. Při pH větší než 8 je ppiX ve formě dimeru (Hoseini et al., 2019).

2.2. Zdroje ionizujícího a UV záření

Elektromagnetické záření lze členit podle vlnové délky. UV záření odpovídá vlnové délce v rozmezí 400–10 nm. Existuje mnoho různých kategorií, do kterých je UV záření děleno. Tyto kategorie jsou uvedeny v tabulce (1). Záření, která má kratší vlnovou délku, než je 10 nm se nazývá ionizující záření. Spektrum gama záření a rentgenového záření se částečně překrývá, záření se rozlišuje v závislosti na původu vzniku fotonů daných vlnových délek. Fotony gama záření vznikají během procesů uvnitř jádra, rentgenové záření vzniká dvěma způsoby: brzdným zářením a charakteristickým rentgenovým zářením. Dělení záření odpovídá normě ISO-21348 (Tobiska et al., 2007).

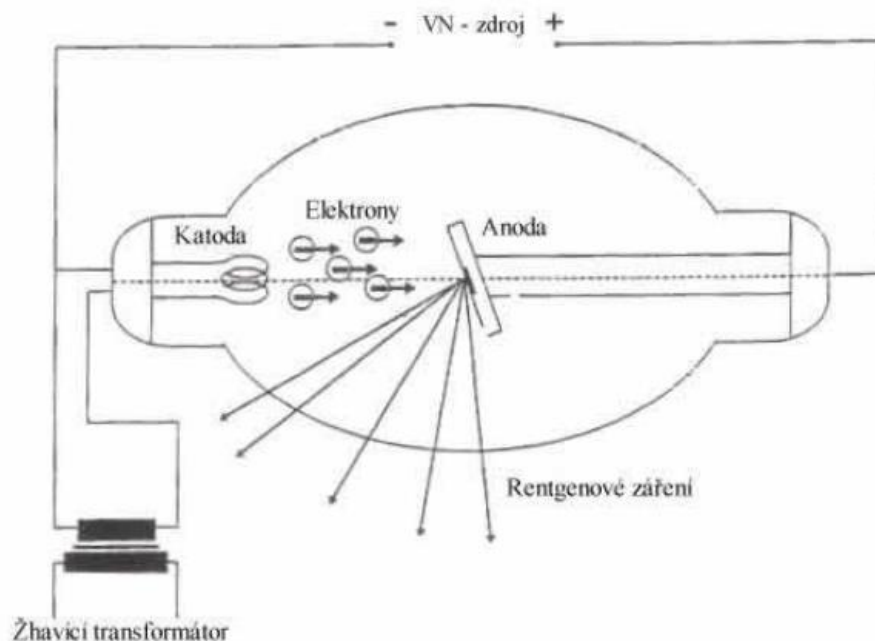
**TABULKA 1 ROZDĚLENÍ ELEKTROMAGNETICKÉ ZÁŘENÍ PODLE VLNOVÝCH DÉLEK DLE NORMY
ISO-21348**

Kategorie	Subkategorie	Vlnová délka [nm]	Poznámky
Gama paprsky		0,00001 > λ > 0,001	
Rentgenové záření		0,001 > λ > 0,1	Tvrdé
	XUV	0,1 > λ > 10	Měkké
Ultrafialové záření	UV	100 > λ > 400	Ultrafialové
	VUV	10 > λ > 200	Vakuum UV záření
	EUV	10 > λ > 121	Extrémní UV záření
	H Lyman α	121 > λ > 122	Spektrální line vodíku
	FUV	122 > λ > 200	Daleké UV záření
	UVC	100 > λ > 280	Ultrafialové C záření
	MUV	200 > λ > 300	Střední UV záření
	UVB	280 > λ > 315	Ultrafialové B záření
	NUV	300 > λ > 400	Blízké UV záření
	UVA	315 > λ > 400	Ultrafialové A záření

2.2.1. Zdroje ionizujícího záření

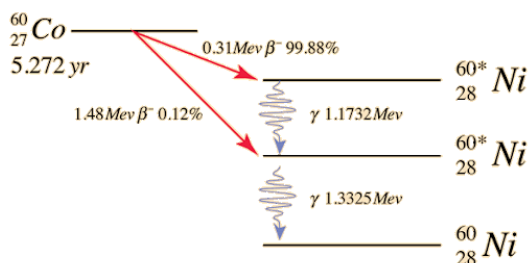
Zdroje ionizujícího záření se dělí na umělé a přírodní. Mezi hlavní umělé zdroje ionizujícího záření patří: rentgenová trubice, radionuklidy a urychlovače. Mezi přírodní zdroje se považuje přirozené pozadí, které se skládá z kosmického záření a přírodních radionuklidů.

Zdrojem vysokoenergetických rentgenových fotonů je rentgenová trubice. Tato trubice je vakuově uzavřená a v ní se nachází anoda a katoda. Ohřátím wolframového vlákna (katody), dochází k emisi elektronů, které jsou urychlené pomocí rozdílného vysokého napětí mezi katodou a anodou (viz obrázek (6)). Urychlené elektrony bombardují povrch anody. Po dopadu na anodu dochází k interakci s povrchem, kde dojde k brzdění elektronů a k emisi charakteristických rentgenových paprsků anodového materiálu a tepla (Kramar et al. 2017, Potts et al., 2005).



OBRÁZEK 6 SCHÉMA RENTGENKY (BRUNCLÍK, 2014)

Radionuklidy se samovolně rozpadají a uvolněná energie je vyzářena formou ionizujícího záření. V experimentální části této práce byl použit radionuklid ^{60}Co , jenž se přeměňuje beta rozpadem na $^{60*}\text{Ni}$, který téměř okamžitě deexcituje emisí gama záření, viz obrázek (7).



OBRÁZEK 7 ROZPADOVÉ SCHÉMA KOBALTU 60 (NAVE, 2017)

Urychlovače částic jsou dvojího typu: lineární a kruhové.

U lineárních urychlovačů je dráha, po které dochází k urychlení přímková. K urychlení nabitých částic dochází pomocí elektrického pole a využívá se k tomu svazek nabitých částic nebo sekundární částice vznikající při interakčních procesech na vhodných terčích. (Reichl et al., 2010)

U kruhových urychlovačů se využívá k urychlení a řízení částic elektromagnetické pole. Elektrody částice urychlují a elektromagnety usměrňují trajektorii částic. V urychlovači se částice urychlují pomocí elektrod, které mění svoji polaritu v závislosti na poloze urychlované částice. Elektromagnety slouží k vedení paprsku částic v prostoru urychlovače a k jeho tvarování. V kruhovém urychlovači elektromagnety slouží

k zakřivování trajektorie částice a při změně směru částice se produkuje elektromagnetické brzdné záření. V závislosti na velikosti energie v urychlovači lze vytvářet široké spektrum elektromagnetického záření. (CERN, 2021)

2.2.2. Zdroje UV záření

Zdroje UV záření se stejně jako u ionizujícího záření dělí na přírodní a umělé. Mezi přírodní zdroje patří Slunce. Spektrum slunečních paprsků dopadajících na planetu zasahuje do tří oblastí spektra: infračervené, viditelné a ultrafialové. Tyto oblasti se souhrnně nazývají optické záření. Z optického záření je 5 % v ultrafialové oblasti. (Diffey et al., 2002)

Umělé zdroje UV záření se dělí do tří skupin: výbojky, diody a lasery.

Výbojka je trubice naplněna plynným médiem, obvykle parami rtuti nebo sodíku, kterou prochází elektrický proud. Ten způsobuje excitaci iontů plynného média do vyšších energetických stavů. Tento stav není stabilní, a tak dochází k deexcitaci, během které je uvolněn foton.

Výbojky jsou dále dělené podle tlaku plynu v trubici na nízkotlaké, střednětlaké a vysokotlaké. U nízkotlakých je tlak nižší, než je tlak atmosférický. Zvyšování tlaku uvnitř pláště žárovky poskytuje možnost pro vyšší výstupní výkon (Elliott et al., 1995). Příkladem nízkotlaké výbojky je rtuťová výbojka, její emisní spektrum je čárové a poskytuje fotony o vlnové délce 184,9 nm a 253,7 nm (Claus, 2021).

Střednětlaké výbojky se využívají v průmyslu. Jejich účinnost je nižší než u nízkotlakých, ale jejich výhodou je, že se dají postavit o vyšším výkonu.

Vysokotlaké výbojky se využívají jako zdroj osvětlení.

Dalším typem zdroje UV záření byla již zmíněná dioda. Elektroluminiscenční dioda neboli světelná dioda, zkratka LED (z anglického Light Emitting Diode), je polovodičová součástka obsahující přechod PN, který emituje optické záření, je-li buzen průchodem elektrického proudu (ČSN IEC 50(845)). Tyto zářiče mají oproti výbojkám široké spektrum, ve kterém září. Nevýhodou této diody je, že fotony mají malou energii.

Poslední typ zářiče z výčtu jsou lasery. Laser se skládá ze tří částí: zdroje energie, rezonátoru a aktivního prostředí. Jako zdroj energie může sloužit například výbojka, nebo elektrický proud, je nutné vybudit elektrony aktivního prostředí ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu. Během deexcitace jsou produkovány fotony, ty vstupují do rezonátoru. Rezonátor je optická dutina vymezená zrcadli a využívá se k zesílení světla. Rezonátor opouští laserový paprsek, který je koherentní a monochromatický. (Thomas et al., 2011)

Energie (tedy i vlnová délka) emitovaného fotonu závisí na typu aktivního prostředí laseru. Významnou skupinou laserů, které emitují v UV oblasti jsou excimerové lasery nebo též excimerové. Jedná se o pulzní plynové lasery, které poskytují záření v několika spektrálních oblastech po celém ultrafialovém záření (Duarte et al., 1995). Tyto lasery používají kombinaci vzácného plynu a reaktivního plynu. Za vhodné stimulace a vysokého tlaku se vytvoří pseudomolekula zvaná exciplex, která není stabilní a rozpadá se za emise záření v UV oblasti.

2.3. Radiolýza biomolekul

Vlivem záření dochází k aktivaci některých molekul, které degradují, což má vliv na přežití buňky. Přežití buňky je definováno jako schopnost ozářených buněk produkovat dceřiné buňky (Bodgi et al., 2016). Aby se dalo popsat chování buňky je důležité znát chování jednotlivých biomolekul.

Existují dvě hlavní teorie, které popisují mechanismy chování záření v rámci biologických systémů: buněčná teorie cílů a radikálová teorie.

Buněčná teorie cílů je teorie, která předpokládá, že v buňce existují citlivé cíle, ve kterých po aktivaci dojde k trvalé změně, jež má přímý účinek na životní funkce buňky (Nomiya et al., 2013). Tato teorie považuje interakce záření s cíly, že se řídí Poissonovým rozdělením (Bodgi et al., 2016).

Aktivace v tomto případě znamená ozáření ionizujícím nebo UV zářením. Škodlivé účinky záření na buňku jsou pozorovány na jednoduchých modelových systémech. Příkladem je buněčná membrána, jež je prvním kontaktním cílem záření. Její funkce je chránit buňku před vnějšími vlivy. Po zasažení tohoto cíle může dojít k různým chemickým reakcím, které ruší buněčné signalizace a mohou vést až k buněčné smrti (Kiang et al., 2012). Nejprozkoumanější je mechanismus primárních účinků záření na DNA.

Pravděpodobnosti přímých zásahů je nízká, proto vznikla druhá teorie.

Radikálová teorie (Desouky et al., 2015) vychází z nepřímých účinků záření na biomolekuly v buňce. Většina buňky je vyplněna vodou, vlivem záření dochází k radiolýze vody. Produkty radiolýzy vody dále reagují s biomolekulami a dochází k jejich degradaci a následné buněčné smrti.

U člověka dávka větší než 35 Gy je život ohrožující a dávka nad 50 Gy je téměř s jistotou smrtelná a smrt nastává velmi rychle (Donnelly et al., 2010).

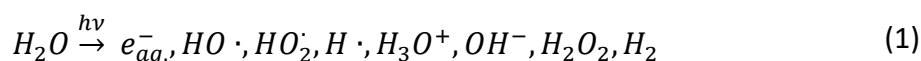
2.3.1. Radiolýza a fotolýza vody

Radikálová teorie vychází z nepřímých účinků záření. Buňka obsahuje až 70 % vody (Alberts et al., 1998). Po ozáření buňky ionizujícím nebo UV zářením dochází k degradaci

molekuly vody. Reakce, které jsou iniciovány zářením, se nazývají radiolýza nebo fotolýza v závislosti na tom, při jaké vlnové délce reakce probíhá.

Radiolýza vody probíhá v případě, že zdrojem energie k přerušení vazby je ionizující záření. V případě, že je zdrojem UV záření, jedná se o fotolýzu vody. Hranice mezi těmito dvěma chemickými procesy není zcela jasná.

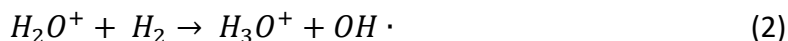
Radiolýzu lze zapsat rovnicí



Jak je z rovnice patrné, tímto rozkladem nevzniká molekula kyslíku O_2 a radikál $HO_2\cdot$ vzniká v zanedbatelném množství. Nejvýznamnější produkt je hydroxylový radikál $HO\cdot$. Tento produkt je značně nestabilní, a proto téměř okamžitě reaguje s okolím.

Radiolýza probíhá ve třech fázích, které se dají dělit podle časového horizontu od iniciace reakce.

První fáze je fyzikální, vzniká v 1 fs (tj. 10^{-15} s) po ozáření, dojde k tvorbě ionizovaných molekul H_2O^+ , excitovaných molekul H_2O^* a subexcitačních elektronů. Další fáze, fyzikálně chemická, začíná v čase 10^{-15} – 10^{-12} s a dochází k mnoha procesům včetně reakce iontových molekul, disociační relaxaci, autoionizaci excitovaných stavů, solvataci elektronu atd. (Le Caër et al., 2010)



V poslední části, nazvané chemické produkty, difundují do roztoku, reagují jak mezi sebou, tak s ostatními molekulami. To celé se děje v čase 10^{-12} – 10^{-6} s.

Když na vodu působí UV záření dochází k fotolytické reakci:



S klesající vlnovou délkou má záření vyšší energii, a tím roste počet vytvořených iontových párů a tím i výtěžek reakcí (Zvereva et al., 2010). Dále s klesající vlnovou délkou vzniká větší podíl ionizovaných meziproduktů než excitovaných.

Během fotolýzy vody při vlnové délce 257,7 nm je kvantový výtěžek 0,08. Kvantový výtěžek určuje množství absorpce světla hmotou. Odpovídá to rovnici (Pottier et al., 1991):

$$\phi = \frac{\text{počet zreagovaných molekul}}{\text{počet absorbovaných elektronů}} \quad (7)$$

Aby došlo k fotochemické reakci musí světlo být molekulou absorbováno, dochází k překrytí vlnových délek (Pottier et al., 1991).

U vlnové délky pod 185 nm vznikají radikál HO, pro vlnovou délku nad 200 nm chybí data (Tomanová et al., 2017).

2.3.2. Radiolýza fosfolipidů

Radiolýza fosfolipidů závisí na prostředí, ve kterém probíhá. V případě, že je fosfolipid ozářen ve vodném prostředí, vznikají hydroxylové radikály, a ty dále interagují s fosfolipidem radikálovou reakcí, která se skládá ze tří stádií: iniciace, propagace a degradace. Radikálovou reakci lze zapsat pomocí rovnic 7-10 (Tomanová et al., 2017):

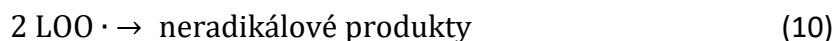
Iniciace:



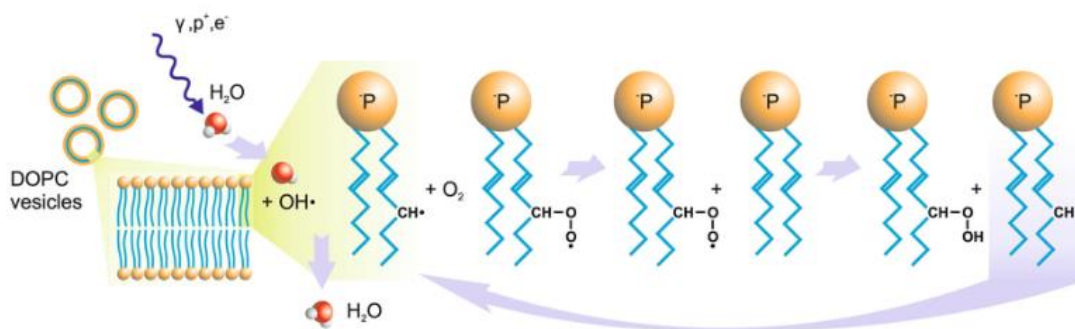
Propagace:



Degradace:



Graficky to poté odpovídá obrázku (8)



OBRÁZEK 8 SCHÉMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ RADIOLÝZY FOSFOLIPIDŮ VE VODNÉM PROSTŘEDÍ (VYŠÍN ET AL., 2017)

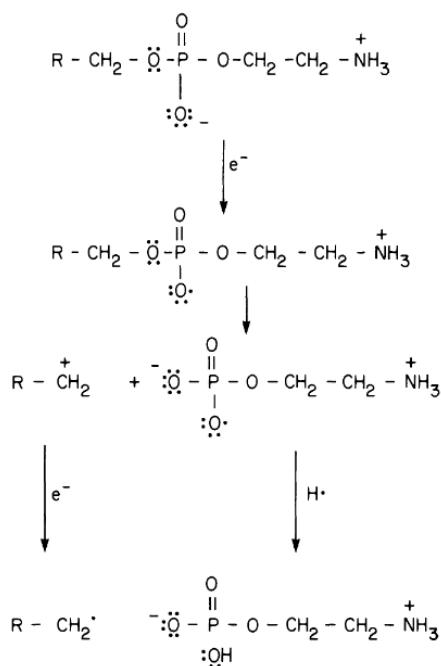
Ve výzkumu (Vyšín et al., 2017) je molekula fosfolipidu vystavena různým druhům záření. Jako zdroj gama záření byl použit ^{60}Co o dávkových příkonech 35 a 332 Gy/h. Dalšími zdroji záření byly urychlené elektrony a urychlené protony.

Výsledky po ozařování gama zdrojem potvrdili, že změna dávkového příkonu nemá vliv na tvorbu hydroperoxidů.

V případě ozařování zdrojem urychlených protonů byla energie 31 MeV a dávkový příkon se měnil během jednotlivých měření na 100, 400 a 800 Gy/hod. V tomto případě se chemické výtěžky hydroperoxidů snižují s rostoucím dávkovým příkonem, což bylo zdůvodněno tím, že může docházet k vyššímu množství rekombinací OH radikálu při vyšších dávkových příkonech.

Během studie (Marathe et al. 2002) vystavil membránu tvořenou fosfolipidy (dipalmitoylfosfatidylcholiny), která se nacházela ve vodném prostředí, záření gama. Zdrojem byl ^{60}Co o dávkovém příkonu 100 a 7,9 Gy/min. V rámci měření bylo zjištěno, že se měnila fluidita fosfolipidové membrány. Hlavním iniciátorem reakcí byl při obou dávkových příkonech radikál, který vznikl radiolýzou vody. Fosfolipidová membrána, která obsahovala navíc antioxidanty vykazovala menší poškození než membrána, která byla bez přítomnosti antioxidantů. Hlavní reakce, která probíhá během radiolýzy fosfolipidů, je tedy nepřímá.

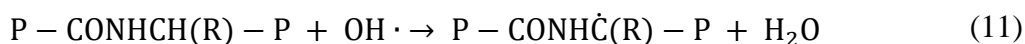
V případě, že se nejedná o vodné prostředí, dochází v průběhu ozařování gama zářením ke ztrátě elektronu, který následně iniciuje reakci. Během ozařování 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminu gama zářením zdrojem ^{60}Co o dávkovém příkonu 76800 Gy/hod (Handel et al., 1981) vznikaly radikály hydroperoxidů a alkylů. Reakce odpovídá schématu na obrázku (9).



OBRÁZEK 9 RADIOLÝZA FOSFOLIPIDU BEZ VODNÉHO PROSTŘEDÍ (HANDEL ET AL., 1981)

2.3.3. Radiolýza proteinů

Během radiolýzy proteinů dochází k jejich denaturaci, což znamená, že terciální struktura je narušená a dochází k jejímu přeskupení. Další typickou reakcí je oxidace, která způsobuje štěpení řetězce proteinu a modifikací postranních řetězců aminokyselin oxidačními reakcemi. Existuje více než 30 mechanismů oxidace (Garrison et al., 1987), jedním z nejčastějších iniciátorů je hydroxylový radikál (viz rovnice 11–13).



V článku (Garrison et al., 1987) je uvedeno několik dalších oxidačních rovnic, jejich stechiometrický ekvivalent odpovídá rovnici (13), která je shrnuje do jedné.



K dalším reakcím, ke kterým dochází vlivem ionizujícího záření je karbonylace, při které dochází k adici karbonylových skupin k postranním řetězcům AMK. Tato reakce je iniciována pomocí kovové katalýzy na zbytcích Lys, Thr, Pro, Glu, Asp a Arg (Maisonneuve et al., 2009).

Proteiny na rozdíl od lipidů jsou daleko komplexnější. a proto je obtížné obsáhnou všechny mechanismy radiolýzy proteinů v této práci. Některé mechanismy dále vysvětluje Garrison et al. (1987).

Gama záření ovlivňuje degradaci terciální struktury proteinu v důsledku rozpadu vodíkových a disulfidových můstků způsobených štěpením a síťováním makromolekulárních řetězců. V rámci denaturačních procesů proteinů ozářených gama zářením byla provedena rozsáhlá studie (Cieřla et al., 2000), která se věnovala radiolýze proteinů, jak ve vodném prostředí, tak za sucha. Vzorky (hovězí alfa a gama globuliny, hovězí hemoglobin a koňský myoglobin) byly vystaveny záření o dávkovém příkonu 1,86, 1,43 a 0,47 Gy/s. Efektivní dávka byla 30, 25, 24, 20, 3 a 2,5 kGy. Změny terciální struktury byly měřeny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrií. Denaturace proteinů v roztoku s vodou byla destruktivnější než u proteinů v pevném skupenství. To je vysvětleno radiolýzou vody, jejíž radikály reaguje s proteiny.

Během ozařování vzorků alfa a gama globulinu stejnými dávkami, byl zjištěn vliv dávkového příkonu. Pokud byl vzorek ozařován nižším dávkovým příkonem po delší dobu byla počáteční teplota denaturace proteinů nižší. K větší denaturaci proteinů docházelo za nižšího dávkového příkonu, jelikož doba ozařování, aby vzorek byl ozářen stejnou dávkou byla delší. Ozařováním metaloproteinů docházelo k transformaci terciální struktury.

Ve studii (Favaudon et al., 1990) byly zkoumány mechanismy poškození proteinů zdrojem gama záření (^{60}Co) a lineárním urychlovačem elektronů o energii 4,5 MeV. Proteiny byly urychlovačem elektronů vystaveny pulzům o intervalu 0,05 – 2,7 μs s maximální dávkou 60 Gy v rámci jednoho pulzu. Závěr, který vyplynul z této práce je uplatnění pulzní radiolýzy pro sekvenování proteinu a tím určení jejich primární struktury.

2.3.4. Radiolýza DNA

Nejčastější typy poškození DNA jsou jednoduchý a dvojitý zlom, modifikace bází a cukrů a křížové vazby DNA-protein (O'Neill et al., 2001). Během radiolýzy vzniká hydroxylový radikál, který převážně způsobuje tato poškození. Hydroxylový radikál nahrazuje atomy H od cukru a bází nebo se přidává k bázím všech nukleotidů, což vede k poškození DNA, jeho zlomům. Menší část interakcí je způsobena přímým účinkem, kdy vysokoenergetická částice zasáhne molekulu DNA (Mark et al., 1989; Spothem-Maurizot et al. 1996).

Jelikož je DNA velmi citlivý cíl, tak v rámci buňky existuje několik mechanismů, jak zabránit poškození této biomolekuly. Prvním typem ochrany DNA je ochrana proti reaktivním formám kyslíku přítomností antioxidantní molekuly (např. glutathionem) (Desouky et al., 2015). Druhým typem je oprava DNA, která přestává fungovat při dávkách vyšších než 0,5 Gy. Pokud opravy DNA selžou, dojde k poškození DNA a dochází k buněčné smrti nebo mutaci buňky. Při dávkách 0,01 – 0,5 Gy a dávkovém příkonu v rozmezí 0,01 – 1 Gy/min dochází k adaptivní odpovědi, to znamená, že buňka se přizpůsobí okolí a brání poškození DNA tím, že ho opravuje a vylučuje reaktivní formy kyslíku. Pokud je dávkový příkon vyšší než 1 Gy/min, tak dochází k nevratnému poškození (Asaithamby et al., 2009). Myší embrya vystavená dlouhodobé expozici 0,1 Gy byla chráněná nejen před mutagení transformací, ale i následné velké radiační expozici o dávce 4 Gy. Během dlouhodobé expozici se zvýšila četnost oprav zlomů v DNA a zdá se, že tato oprava byla u jednoduchých zlomů bezchybná (Azzam et al., 1994). Adaptované buňky jsou méně náchylné k radiací indukované rakovinné transformaci (Aurengo et al., 2005). Dále bylo adaptivní chování podpořeno studií (Iyera et al., 2002), kdy byly plicní fibroblasty vystaveny gama záření o dlouhodobé dávce 0,1 Gy a následná dávka 2 Gy a 4 Gy (Desouky et al. 2015). Adaptivní teorie není jediná, která se snaží popsat chování DNA při nízkých dávkách.

Druhou teorií je mimoterčový efekt. Buňka je ozářena nízkou dávkou a dojde k poškození DNA a buněčné smrti. Mezibuněčnou komunikací se okolní buňky začnou chovat jako ozářené (Nagasawa et al., 1992). Tento mimoterčový efekt je v rozporu s adaptivní teorií.

Během ozařování DNA gama zdrojem (^{60}Co) a rychlým neutronovým zdrojem o energii 34 MeV o stejné dávce byl rozdíl v tvorbě jednoduchých a dvojitých zlomů DNA. Jednoduché zlomy vznikají až 2x méně a dvojitě zlomy 1,5x více u zdroje rychlých neutronů než u zdroje gama. (Spotheim-Maurizot et al. 1996).

V případě, že je v buňce vyšší koncentrace ppIX, dochází po ozáření zdrojem gama k jednovláknovým zlomům v DNA (Hasegawa et al., 2020), což je vysvětleno tím, že po ozáření jsou generovány reaktivní formy kyslíku (např. hydroxylový radikál).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a metody

3.1.1. UV/VIS spektrofotometrie

Spektrofotometr je přístroj, který měří absorbanci elektromagnetického záření ve viditelné a UV oblasti, které prošlo vzorkem. Je měřena intenzita záření paprsku světla o dané vlnové délce před průchodem i po průchodu vzorkem. Podíl intenzity po průchodu a před průchodem je nazýván transmitance. Záporný dekadický logaritmus transmitance je absorpance.

Spektrofotometr Varian Cary 100 Conc, který byl použit pro měření byl dvoupaprskový, což umožňuje měřit slepý vzorek a zkoumaný vzorek najednou.

Vzorky byly měřeny v křemenných kyvetách, jelikož skleněné kyvety neumožňují měřit v UV oblasti a plastové kyvety se ukázaly jako nevhodné, protože s nimi interagovala rozpouštědla.



OBRÁZEK 10 UV/VIS SPEKTROFOTOMETR VARIAN CARY 100

3.1.2. Nízkotlaká rtuťová výbojka s optickou lavicí

Nízkotlaká rtuťová výbojka slouží jako zdroj UV záření. Poskytuje záření o vlnové délce 253,7 nm. Optická lavice umožňuje upevnit vzorek v konkrétní vzdálenosti od zdroje záření. Vzorky byly umísťovány do pozice 0, v této pozici byl proud fotonů stanoven na

$5,23 \cdot 10^{14}$ fot/s. Tok fotonů byl určen na základě protokolu vypracovaného v rámci



OBRÁZEK 11 NÍZKOTLAKÁ RTUŤOVÁ VÝBOJKA S OPTICKOU LAVICÍ, MODRÝ PŘÍSTROJ JE TŘEPAČKA IKA MS 3 BASIC

laboratorních praktik k datu 5.5. 2021 Bc. Jindřichem Fleišmannem.

3.1.3. Gammacell

Jako zdrojem ionizujícího záření byl použit Gammacell 220. Gama záření zde vzniká rozpadem ^{60}Co . Dávkový příkon stanovený pomocí Fricke-Hartova dozimetru činí $\dot{D}_{F-H}=14,920$ Gy/hod. Dávkový příkon byl určen na základě protokolu vypracovaného v rámci laboratorních praktik k datu 4. 5. 2021 Bc. Jindřichem Fleišmannem.



OBRÁZEK 12 GAMMACELL 220

3.1.4. Výběr rozpouštědla

Vzorky byly připraveny rozpuštěním ppIX v rozpouštědle. Prvně bylo nutné zjistit rozpouštědlo, které nezasahuje do Soretova pásu, je v něm ppIX dobře rozpustný a je vhodný pro biomedicínské účely. Protoporfyrin IX je ve vodě nerozpustný (Lee et al., 2009). Soretův pás je charakteristický absorpční pás pro porfyriny, dosahuje maxima kolem 400 nm (Elder et al., 1994). Na základě těchto parametrů byly vytipovány tři rozpouštědla: methanol, ethanol a isopropanol (Ding et al., 2011).

3.1.5. Příprava vzorků pro měření na spektrofotometru

Bylo odváženo 0,010 g PpIX do 10ml zkumavky. Zkumavka byla doplněna rozpouštědlem na objem 10 ml. Takto připravený roztok byl ponechán v ultrazvukové lázni Bandelin sonorex. Po 10 minutách z něj byly odpipetovány 4 ml, a ty byly přelity do 40 ml uzavíratelné zkumavky. Objem byl doplněn rozpouštědlem na 40 ml. V případě první a druhé série měření byly vzorky rozpouštěny v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut a v případě třetí série experimentů, byly následně vloženy do centrifugy na 10 minut při 5000 ot./min s odstředivou silou 4800 g.

Z takto připravených roztoků byl vždy odebrán 1 ml, který byl ve zkumavce naředěn na 10 ml. Tento konečný roztok byl celkově 100x zředěnější než počáteční.

Měření 1. a 2. série experimentů vzorků ozářených UV probíhala tak, že vzorek byl umístěn do polohy 0 na optické lavici a ozařován. Během ozařování byl vzorek třepán na třepačce IKA MS 3 BASIC. Následně byl vzorek dán do tmy a měření na spektrofotometru proběhlo po ozáření všech vzorků.

V případě 3. série byly všechny vzorky třepány 90 minut na třepačce IKA MS 3 BASIC, v závislosti na čase ozařování probíhala část třepání pod zdrojem UV záření. Například vzorek, který byl ozařován 60 minut, byl předtím 30 minut třepán na třepačce a poté byl ozařován. Vzorek byl vždy po ozáření rovnou změřena na spektrofotometru.

Ozařování vzorků v Gammacellu probíhalo v případě 1: a 3. sérii stejně. Vzorek s nejdelší dobou ozařování byl vložen do gammacellu a postupně k němu byly ostatní vzorky přidány. Než byl vzorek vložen do Gammacellu, byl ve tmě. Po ukončení ozařování byly vzorky proměřeny na spektrofotometru.

Ke 3. sérii experimentů byl přidán 4. vzorek. Ten se skládal z ppIX, EtOH a 0,1 M roztok NaOH. Ze zkumavky, kde byl ppIX v EtOH (před ředěním) byly odebrány 2 ml do 40 ml zkumavky, byl přidán EtOH o objemu 18 ml a 20 ml 0,1 M roztoku NaOH. Takto připravený vzorek byl zařazen do 3. série experimentů, ozařování probíhalo za stejných podmínek, jako pro ppIX v rozpouštědle bez přídavku NaOH.



OBRÁZEK 13 SADA VZORKŮ ZLEVA: PPIX+MEOH, PPIX+ETOH, PPIX+I-PROH, 10X NAŘEDĚNÝ PPIX+MEOH, 10X NAŘEDĚNÝ PPIX+ETOH, 10X NAŘEDĚNÝ PPIX+I-PROH, 100X NAŘEDĚNÝ PPIX+MEOH, 100X NAŘEDĚNÝ PPIX+ETOH, 100X NAŘEDĚNÝ PPIX+I-PROH

3.1.6. Seznam chemikálií

TABULKA 2 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

Název látky	Vzorec	Dodavatel	Čistota [%]	Molekulová hmotnost [g/mol]
Protoporfyrin IX	$C_{34}H_{34}N_4O_4$	Sigma	≥ 95	562,6
Ethanol	C_2H_5OH	Penta	$>99,8$	46,07
Methanol	CH_3OH	Penta	$\geq 99,8$	32,04
Isopropanol	$(CH_3)_2CHOH$	Penta	$\geq 99,8$	60,10
Hydroxid sodný	$NaOH$	Penta	>98	40,00

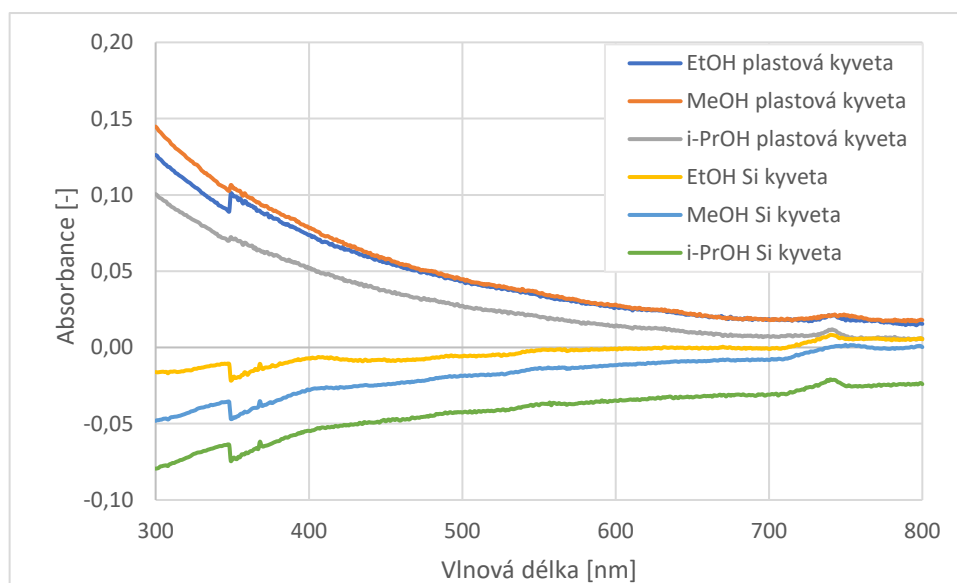
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Výběr vhodného rozpouštědla

Nejprve bylo proměřena samotná rozpouštědla, jestli neabsorbují při vlnových délkách zasahujících do Soretova pásu. V rámci prvních experimentů byly používány plastové kyvety, ukázalo se však, že během měření došlo k jejich prasknutí, viz obrázek (14). Proto byly nahrazeny kyvetami z křemenného skla. V grafu na obrázku (15) jsou naměřená absorpční spektra pro všechny tři použité rozpouštědla jak v plastových kyvetách, tak v křemenných. Z těchto měření vyplynulo, že k dalšímu měření jsou vhodnější křemenné kyvety. Též bylo prokázáno, že žádné z vytipovaných rozpouštědel nemá žádný absorpční pík v Soretově pásu. Skok u vlnové délky 350 nm je dán změnou lamp, přičemž jedna je určená pro měření v UV oblasti a druhá ve viditelné.

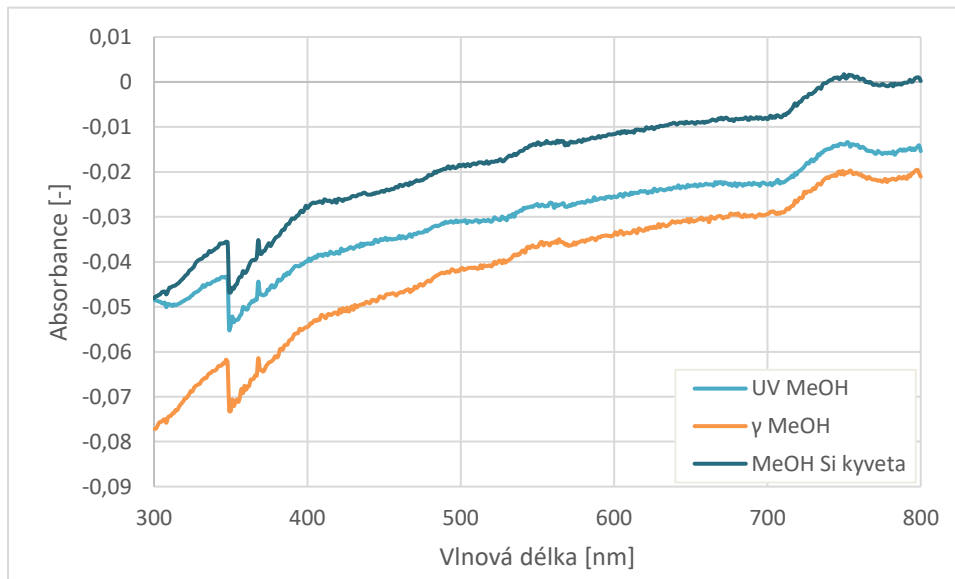


OBRÁZEK 14 PLASTOVÁ KYVETA PRASKLA PO PŘIDÁNÍ PPIX+I-PROH, ČERNÉ TEČKY V KYVETĚ VLEVO JE NEROZPUŠTĚNÝ PPIX



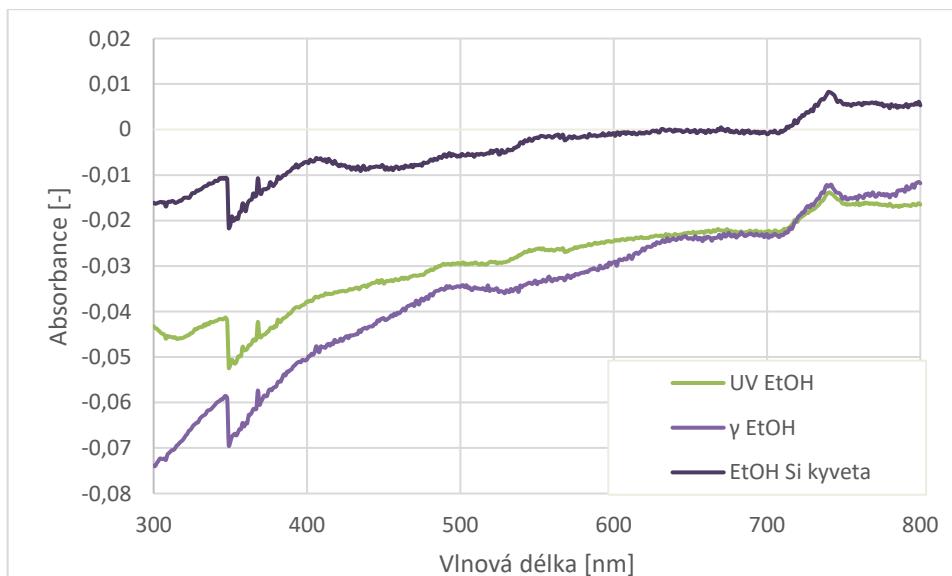
OBRÁZEK 15 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZPOUŠTĚDEL, PŘI MĚŘENÍ BYLY POUŽITY DVA TYPY KYVET: KŘEMENNÉ (SI) A PLASTOVÉ

Dále bylo proměřeno chování jednotlivých rozpouštědel po ozáření ionizujícím a UV zářením. Ozařování probíhalo v UV oblasti po dobu maximálně tří hodin a ozařování

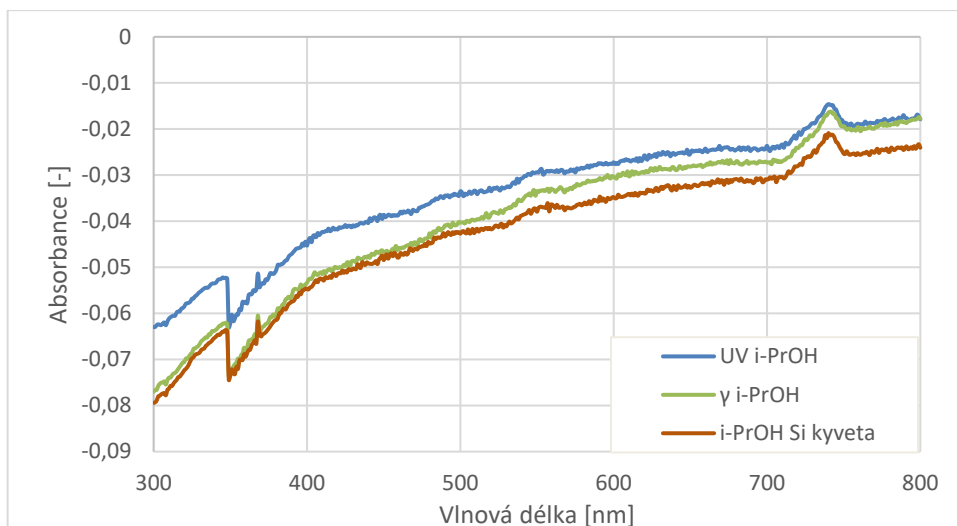


OBRAZEK 16 ABSORPČNÍ SPEKTRA NEOZÁŘENÉHO MeOH A MeOH VYSTAVENÉHO UV A GAMA ZÁŘENÍ

gama zdrojem ^{60}Co byla použita maximální dávka 59,680 Gy. Výsledky experimentu jsou vidět na obrázcích (16) – (18), jednotlivá rozpouštědla i po ozáření mají podobný trend, a tudíž neprobíhá tvorba produktů, které by mohly ovlivnit měření. Posun křivek může být daný změnou pozadí, jelikož všechna měření neprobíhala se stejnými křemennými kyvetami.



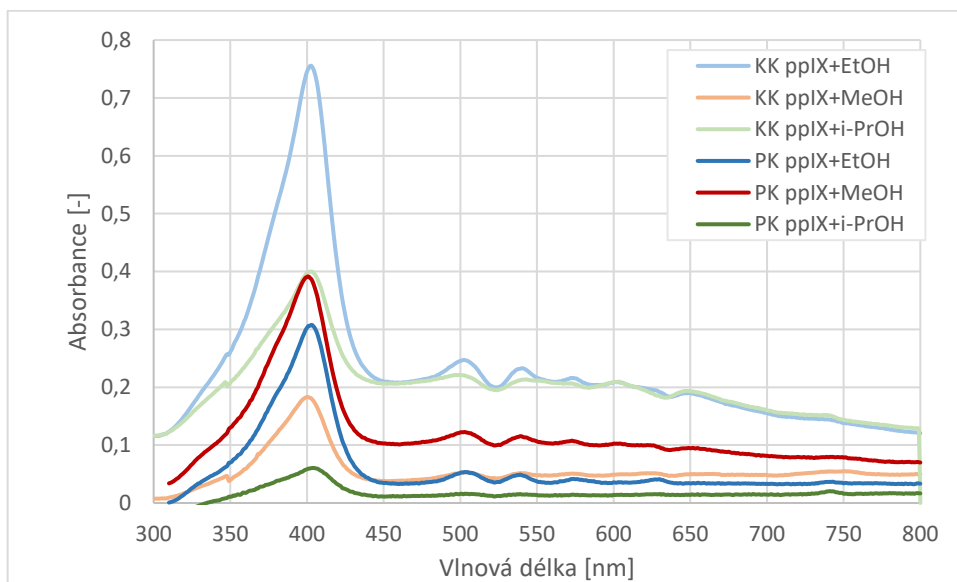
OBRAZEK 17 ABSORPČNÍ SPEKTRA NEOZÁŘENÉHO EtOH, EtOH VYSTAVENÉHO UV A GAMA ZÁŘENÍ



OBRÁZEK 18 ABSORPČNÍ SPEKTRA NEOZÁŘENÉHO *t*-PROH A *i*-PROH VYSTAVENÉHO UV A GAMA ZÁŘENÍ

Pro výběr vhodného rozpouštědla byl realizován poslední experiment, při kterém byla změřená absorpční spektra rozpouštědel s pplx. Po proměření těchto dat, byla zaměřena pozornost na pík okolo 405 nm, na kterém jsou snadno pozorovatelné rozdíly naměřených intenzit pro různé vzorky měření (viz obrázek 19).

Z těchto experimentálních měření vyplynulo, že všechna vytypovaná rozpouštědla můžeme použít, jelikož splňují naše požadavky.



OBRÁZEK 19 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKŮ PPIX V RŮZNÝCH ROZPOUŠTĚDLECH A V RŮZNÝCH TYPECH KYVET (KK-KŘEMENNÉ KYVETY, PK-PLASTOVÉ KYVETY)

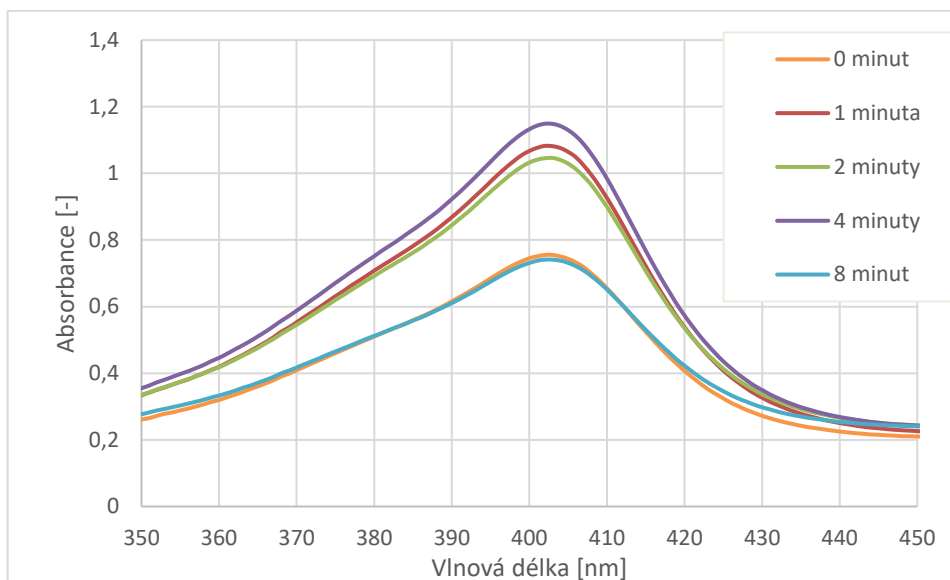
4.2. 1. série experimentů

V této a 2. sérii experimentů byl vzorek „0 minut“ použit z naměřených dat absorpčního spektra, která jsou zpracována v grafu na obrázku (19) (data naměřená pro křemenné

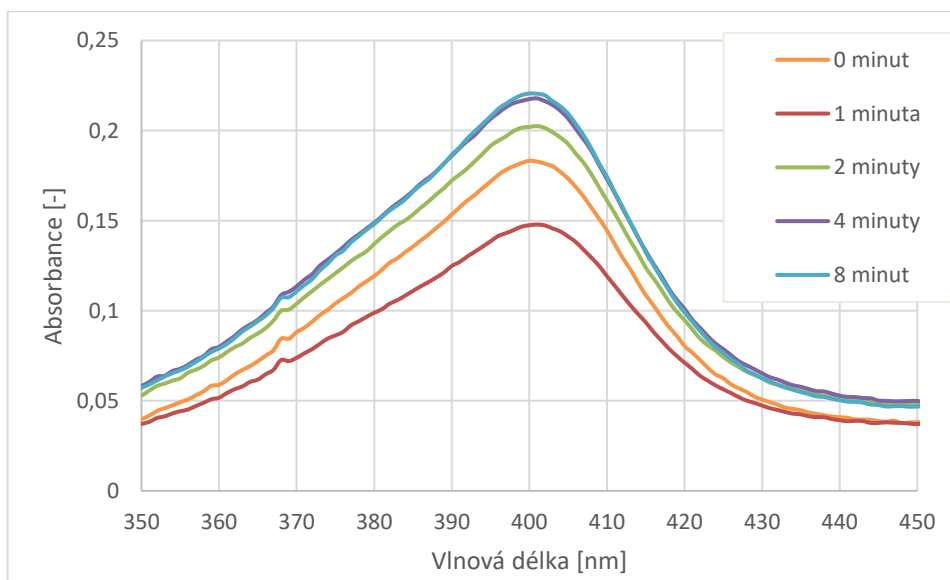
kyvety). Posléze se ukázalo, že není ideální používat neozářený vzorek z jiné série experimentů ke srovnávání s ostatními sériemi, jelikož koncentrace pPIX v rozpouštědle nebyla stejná.

4.2.1. Ozařování zdrojem UV záření

První řada vzorků byla ozařovaná po dobu 1, 2, 4 a 8 minut.



OBRÁZEK 20 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKŮ pPIX v EtOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ VLIVU UV ZÁŘENÍ



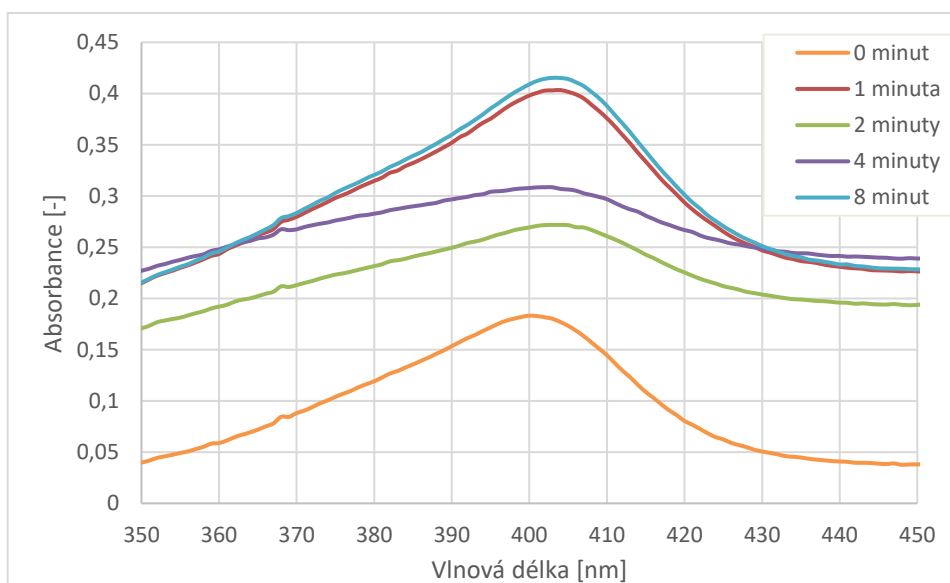
OBRÁZEK 21 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX v MeOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ VLIVU UV ZÁŘENÍ

V grafu na obrázku (20) není z naměřených absorpčních spekter úplně jednoznačné, co se s molekulou pPIX děje. Během ozařování pPIX v EtOH dochází k nárůstu absorbance u vzorků ozářených po dobu 1, 2 a 4 minuty oproti neozářenému vzorku („0 minut“). Nárůst je vždy vyšší s dobou ozáření, ale vzorek, který nebyl ozařován („0 minut“) má podobnou hodnotu maxima stejnou jako vzorek, který byl ozářen po dobu 8 minut.

V absorpčních spektrech v grafu na obrázku (21) je vidět, že s dobou ozařování roste absorbance vzorku. Ačkoliv nárůst absorbance mezi spektry „4 minuty“ a „8 minut“ je malý. Absorpční spektrum naměřené pro vzorek, který byl vystavený UV záření po dobu 1 minuty má nižší absorbanci než neozářený vzorek. To může být způsobený jinou koncentrací neozářeného vzorku pplx v MeOH, než u vzorků, které jsou ozářené.

Absorpční spektra, která jsou zobrazená v grafu na obrázku (22), nemají jednoznačný trend. Jedná se o roztok pplx v i-PrOH. Na základě naměřených absorpčních spekter byly upraveny podmínky měření pro další série. V rámci 2. série měření došlo k prodloužení času ozařování.

Hodnoty Soretova pásu pro naměřená absorpční spektra 1. série vzorků jsou uvedeny v tabulce (3).



OBRÁZEK 22 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V I-PROH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ VLIVU UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 1, 2, 4 A 8 MINUT

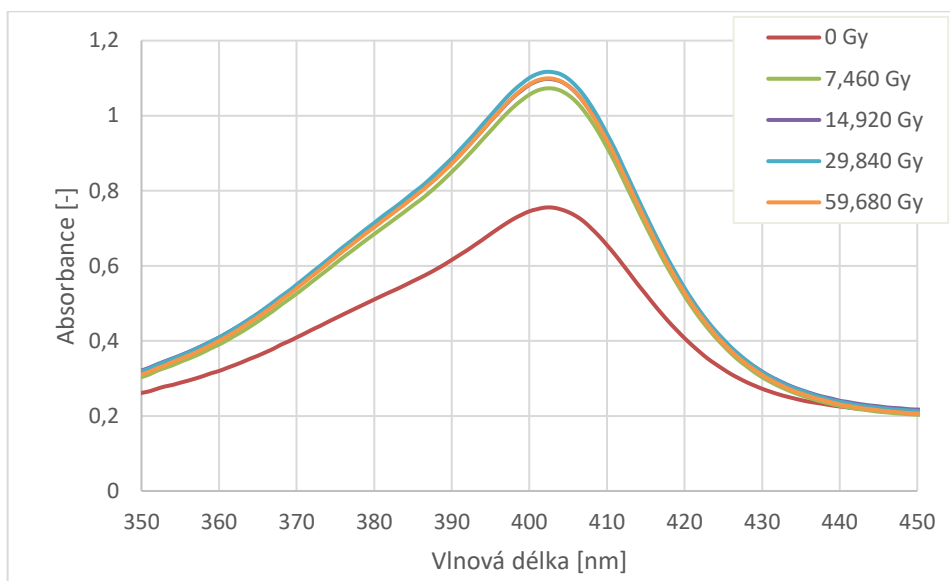
TABULKA 3 HODNOTY MAXIM PRO 1. SÉRII VZORKŮ OZÁŘENÝCH UV ZÁŘENÍM

	0 minut	1 minuta	2 minuty	4 minuty	8 minut
pplx+EtOH	0,755	1,082	1,046	1,149	0,741
pplx+MeOH	0,183	0,148	0,202	0,218	0,220
pplx+i-PrOH	0,400	0,403	0,272	0,308	0,415

4.2.2. Ozařování zdrojem gama záření

Ozařování zdrojem gama probíhalo po dobu 30, 60, 120 a 240 minut. Na obrázku (23) jsou uvedena spektra vzorků, pplx rozpuštěného v EtOH. Je viditelné, že maximální

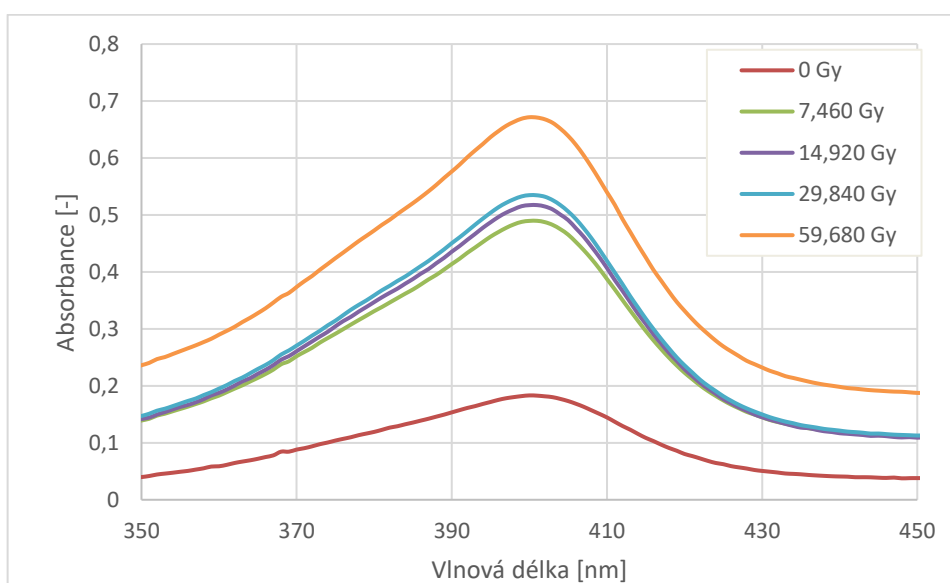
hodnota absorpce u všech ozářených vzorků je podobná. Neozářený vzorek („0 minut) má absorpenci nižší.



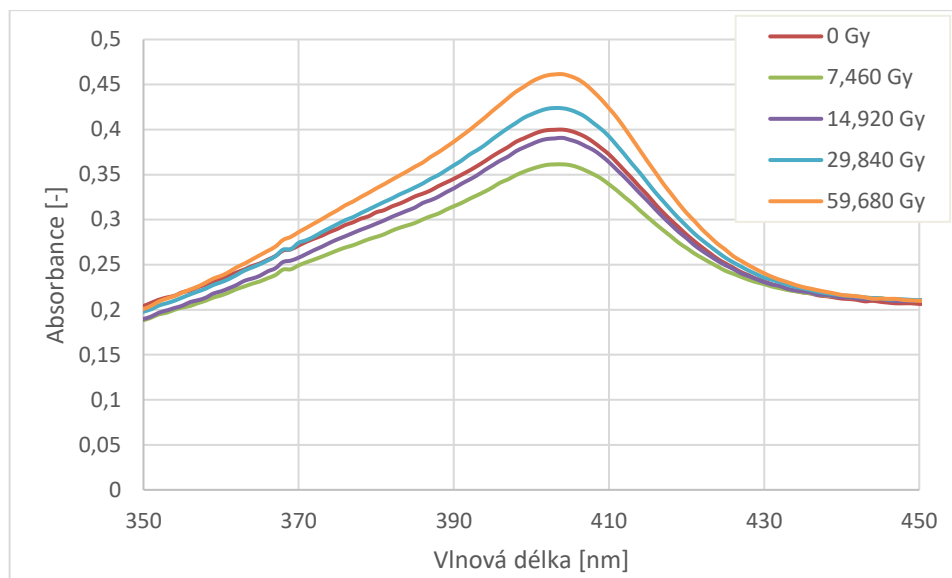
OBRÁZEK 23 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX V EtOH, VYSTAVENÝ VLIVU GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 GY

V grafu na obrázku (24) jsou vidět naměřená absorpční spektra roztoku pPIX v MeOH. Z nich je patrné, že s narůstající dávkou záření, dochází k nárůstům absorpance.

V případě absorpčních spekter pPIX v i-PrOH (viz graf na obrázku (25)) dochází též k nárůstu absorpance s dobou ozařování, až na to, že neozářený vzorek má absorpční maximum mezi vzorky vystavené dávce 14,920 Gy a 29,840 Gy. Což může být způsobeno tím, že stejně jako během ozařování v UV oblasti byl vzorek „0 minut“ použit ze série absorpčních spekter pro graf na obrázku (19) a tudíž složení roztoku se mohlo lišit.



OBRÁZEK 24 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX V MeOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ VLIVU GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 GY



OBRÁZEK 25 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU ppIX V i-PROH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ VLIVU GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 Gy

Hodnoty maxim absorpčních spektrech vzorků ozářených gama zdrojem v 1. sérii experimentů jsou uvedeny v tabulce (4).

TABULKA 4 HODNOTY MAXIM PRO 1. SÉRII VZORKŮ OZÁŘENÝCH GAMA ZÁŘENÍM

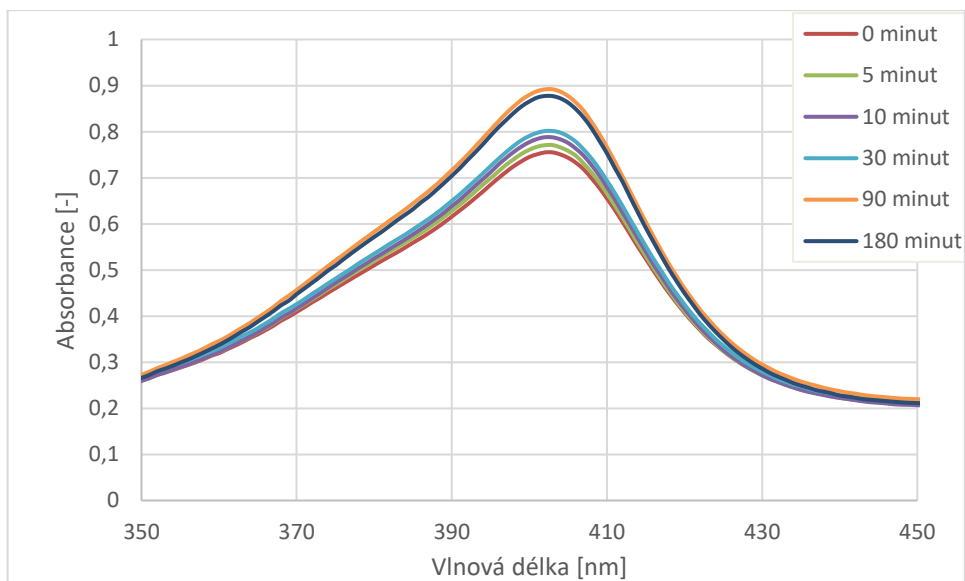
	0 Gy	7,460 Gy	14,920 Gy	29,840 Gy	59,680 Gy
ppIX+EtOH	0,755	1,072	1,097	1,116	1,099
ppIX+MeOH	0,183	0,490	0,517	0,535	0,672
ppIX+i-PrOH	0,400	0,489	0,391	0,424	0,461

4.3. 2. série experimentů

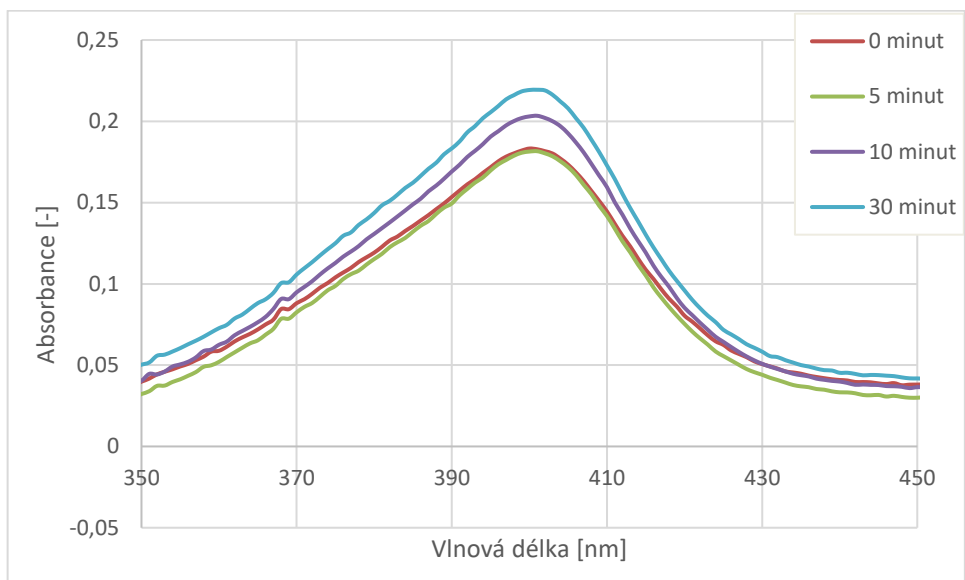
V této sérii byly vzorky vystavené UV záření po dobu 5, 10 a 15 minut. Naměřená spektra byly vynesena do grafů na obrázcích (26)-(28). Graf na obrázku (26) obsahuje o dvě absorpční spektra víc, a to spektra ppIX v EtOH ozařovaný po dobu 90 minut a spektrum ppIX v EtOH ozářených po dobu 180 minut. Navýšení času ozařování bylo zvoleno proto, že s narůstající dobou ozařování se zvyšovala absorbance. Jelikož se potvrdil předpoklad, že absorbance je vyšší s délkou ozařování, byly navýšeny časy měření i ve třetí sérii experimentů.

V případě grafu na obrázku (27), kde jsou uvedena spektra ppIX rozpuštěného v MeOH, dochází ke zvýšení absorpčního maxima až po deseti minutách ozařování a při dalším měření hodnota maxim absorbance roste. V případě naměřených absorpčních spekter ppIX v i-PrOH (viz graf na obrázku (28)) stejně jako u absorpčních spekter v grafu na obrázku (22) jsem nepozorovala jednotné chování.

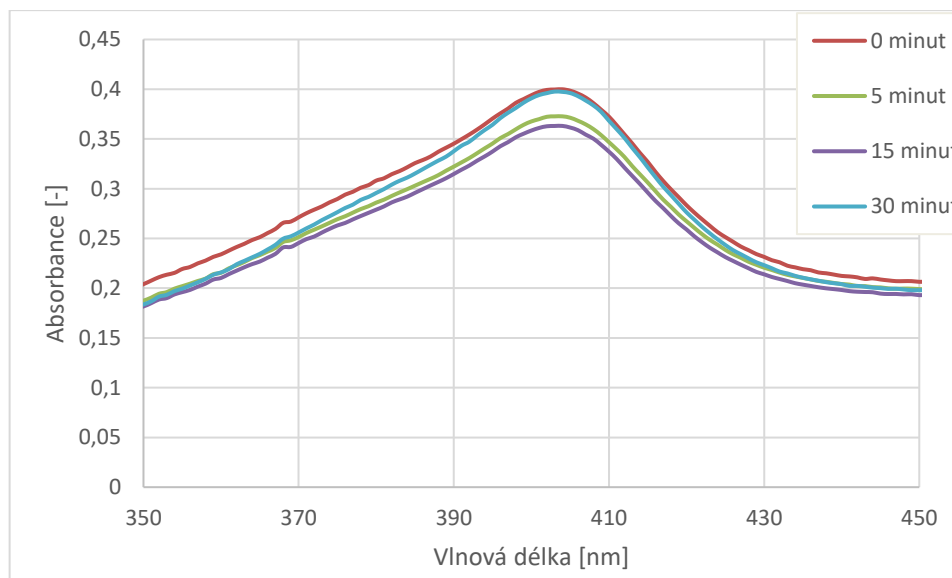
Hodnoty absorpčních maxim spekter této série jsou uvedeny v tabulce (5).



OBRÁZEK 26 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V EtOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ ZDROJ UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 15, 30, 90 A 180 MINUT



OBRÁZEK 27 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V MeOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ ZDROJI UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 15 A 30 MINUT



OBRAZEK 28 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU ppIX V i-PrOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ ZDROJI UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 15 A 30 MINUT

TABULKA 5 HODNOTY MAXIM PRO 2. SÉRII VZORKŮ OZÁŘENÝCH UV ZÁŘENÍM

	0 minut	5 minut	10 minut	30 minut	90 minut	180 minut
ppIX+EtOH	0,755	0,771	0,788	0,801	0,892	0,880
ppIX+MeOH	0,183	0,182	0,203	0,219	-	-
ppIX+i-PrOH	0,400	0,373	0,363	0,398	-	-

4.4. 3. série experimentů

V této sérii byla provedena změna v přípravě vzorku: došlo k zařazení kroku s centrifugou pro odstranění nerozpuštěných pevných částic ppIX. Kromě měření ppIX v daném rozpouštědle, přibyl ještě 4. vzorek, který se skládal z ppIX rozpuštěným v EtOH a roztokem 0,1M NaOH v poměru 1:1.

4.4.1. Ozařování zdrojem UV záření

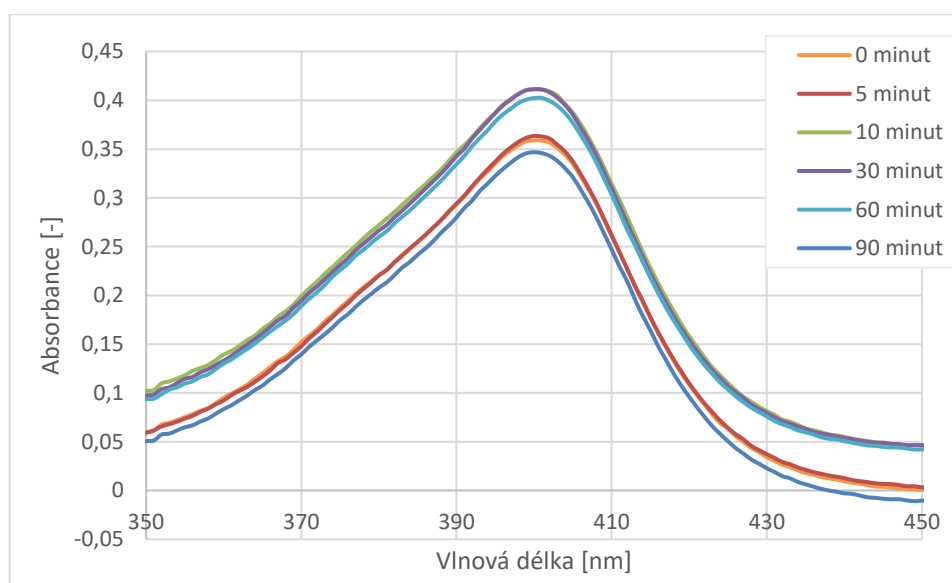
V grafu na obrázku (29) jsou změřená absorpční spektra ppIX v EtOH. Naměřená data absorpčních spekter pro 0, 5 a 90 minut mají nižší hodnotu pozadí než naměřená absorpční spektra 30 a 60 minut. To může být způsobeno chybou při manipulaci s kvyetami, kdy mohla být kvjeta před vložením o 90° pootočena (ve vertikální ose). Z naměřených dat plyne, že působení UV záření pravděpodobně nemá vliv na změnu absorbance ppIX rozpuštěného v EtOH.

Absorpční spektra roztoku ppIX v EtOH s 0,1 M NaOH, která jsou vidět v grafu na obrázku (30), mají vyšší hodnotu maxim absorbancí než ppIX v EtOH bez přidavku roztoku NaOH. To je způsobeno změnou pH, která způsobila větší rozpustnost ppIX

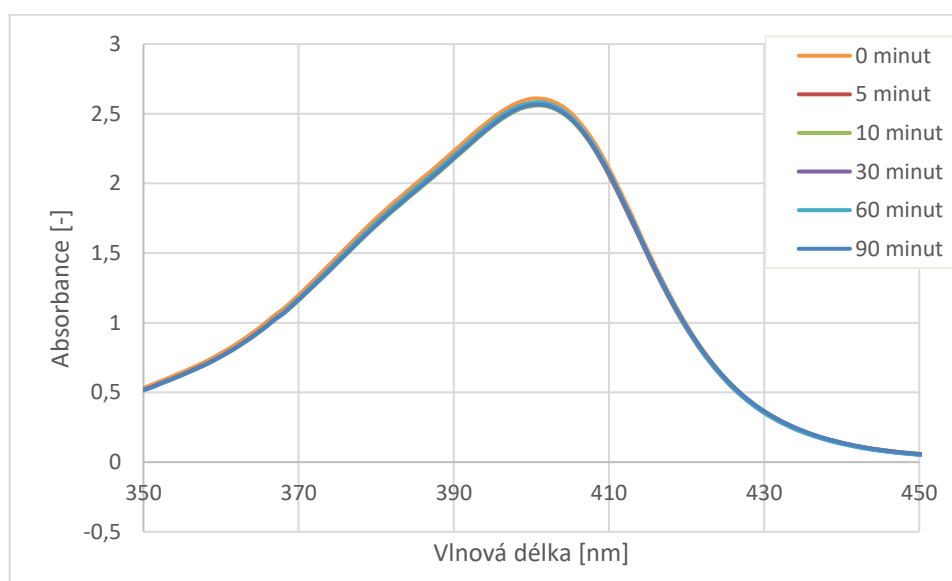
v EtOH a tím zvýšení jeho koncentraci v roztoku. Ani v tomto případě se nepodařilo prokázat vliv UV záření na změnu absorpce pIX.

V grafu na obrázku (31) je naměřené spektrum, které je zatížené hrubou chybou. Je nepravděpodobné, aby došlo po ozáření UV zdrojem po dobu 10 minut k takovému nárůstu absorpce. Tato chyba může být způsobena záměnou vzorků. Po vyloučení spektra vzorku, které bylo vystaveno záření po dobu 10 minut vplynulo z naměřených spekter, že absorpce pIX v MeOH se nemění.

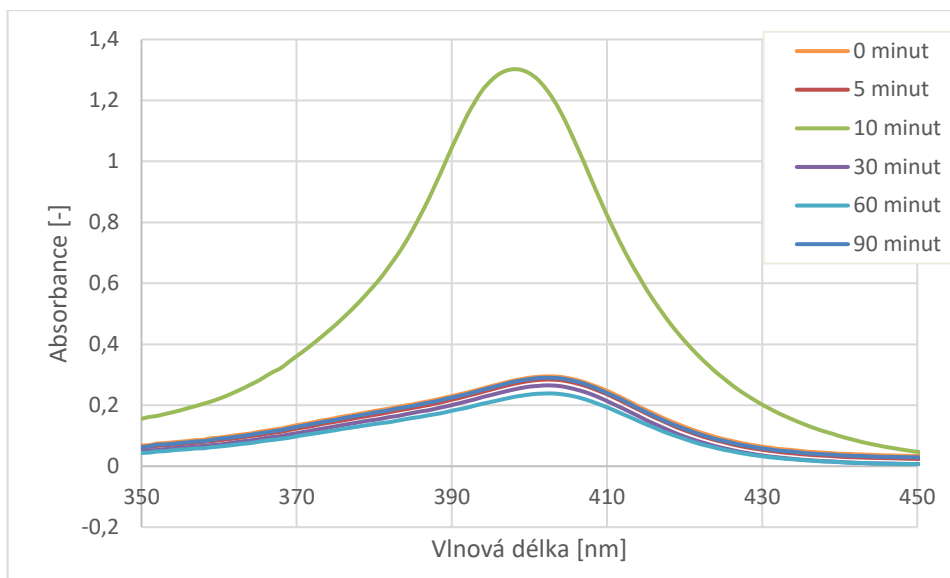
Po analýze naměřených spekter posledního vzorku pIX v i-PrOH (viz graf na obrázku (32)) docházím k závěru, že pIX je velice špatně rozpustný v i-PrOH.



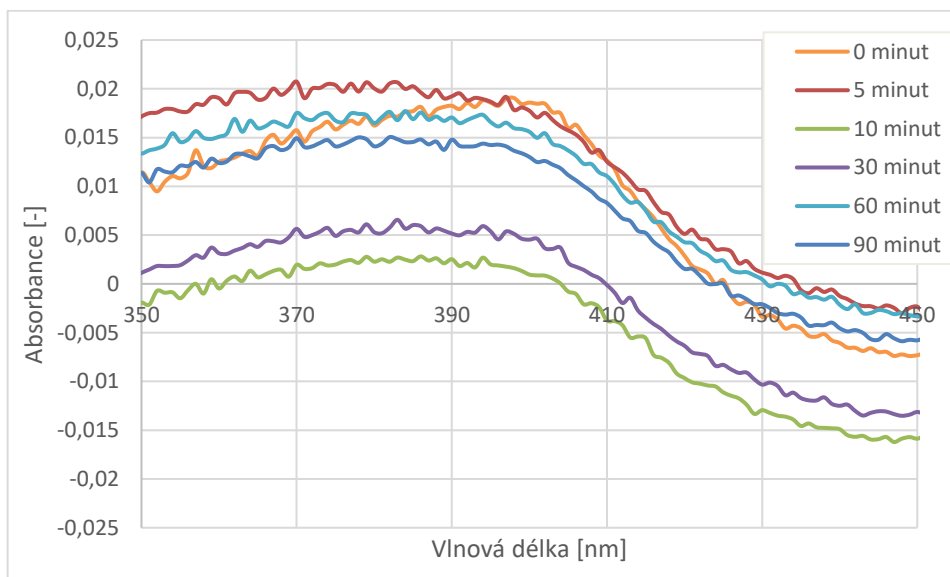
OBRÁZEK 29 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pIX V ETHANOLU, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 10, 30, 60 A 90 MINUT



OBRÁZEK 30 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pIX V EtOH A 0,1 M ROZTOKU NaOH, KTERÝ BYL UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 10, 30, 60 A 90 MINUT



OBRÁZEK 31 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX V MeOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 10, 30, 60 A 90 MINUT



OBRÁZEK 32 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX V i-PROH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ UV ZÁŘENÍ PO DOBU 0, 5, 10, 30, 60 A 90 MINUT

V tabulce (7) jsou uvedené hodnoty naměřených maxim v absorpčních spektrech vzorků 3. série vystavených paprskům UV záření.

TABULKA 6 HODNOTY MAXIM PRO 3. SÉRII VZORKŮ OZÁŘENÝCH UV ZÁŘENÍM (ČERVENÁ HODNOTA JE CHYBNÉ MĚŘENÍ, KTERÉ BYLO VYLOUČENÉ Z ANALÝZY)

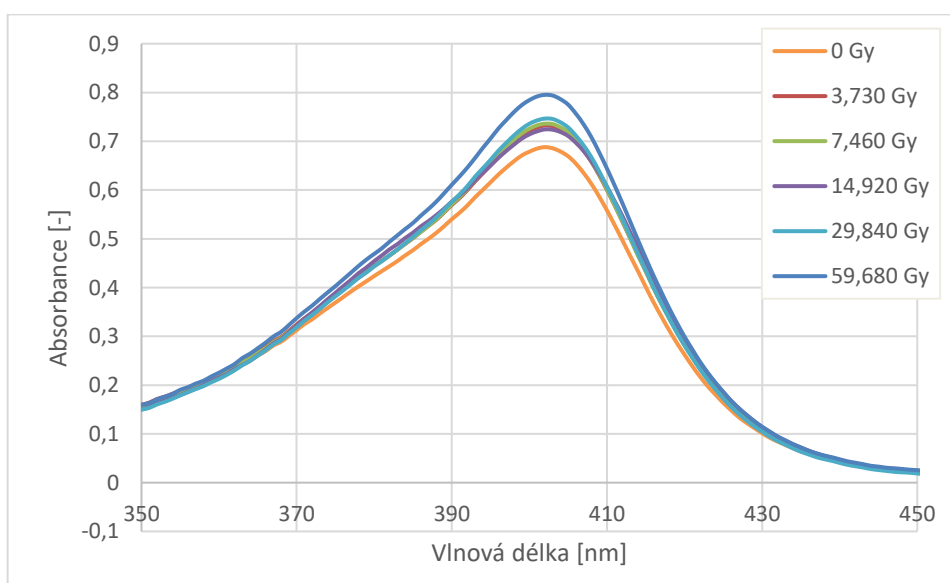
	0 minut	5 minut	10 minut	30 minut	60 minut	90 minut
pPIX+EtOH	0,359	0,364	0,411	0,411	0,402	0,347
pPIX+MeOH	0,294	0,284	1,303	0,265	0,239	0,290
pPIX+i-PrOH	0,019	0,021	0,003	0,007	0,018	0,015
pPIX+EtOH+NaOH	2,609	2,569	2,560	2,573	2,583	2,565

4.4.2. Ozařování zdrojem gama záření

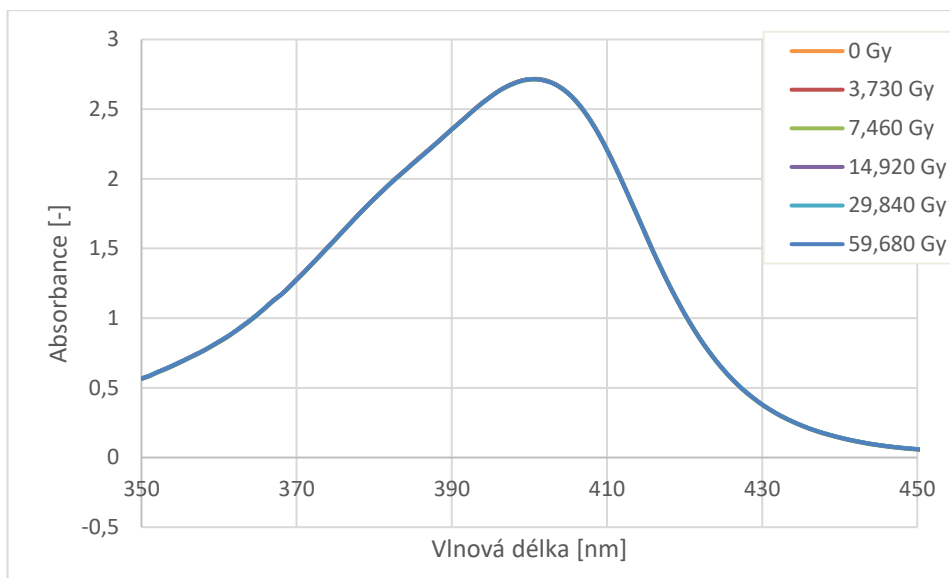
Během ozařování gama zdrojem došlo k navýšení absorbance prokazatelně jen u vzorku ppIX v EtOH (viz graf na obrázku (33)). Roztok ppIX rozpuštěný v EtOH s 0,1 M NaOH má hodnotu absorpčního maxima kolem 2,8. Zásadité prostředí má vliv na rozpustnost ppIX, což souhlasí s poznatkami z článků (Kubát et al., 2003; Myrzakhmetov et al., 2021). Zvýšení maxima absorbance bylo zaznamenáno i u vzorku ppIX v EtOH s 0,1 M NaOH, který byl měřený ve 3. sérii vzorků vystavený vlivu UV záření.

PpIX v MeOH má o trochu nižší absorbanci po ozáření než před ním, nicméně je to odchylka v rámci chyby měření.

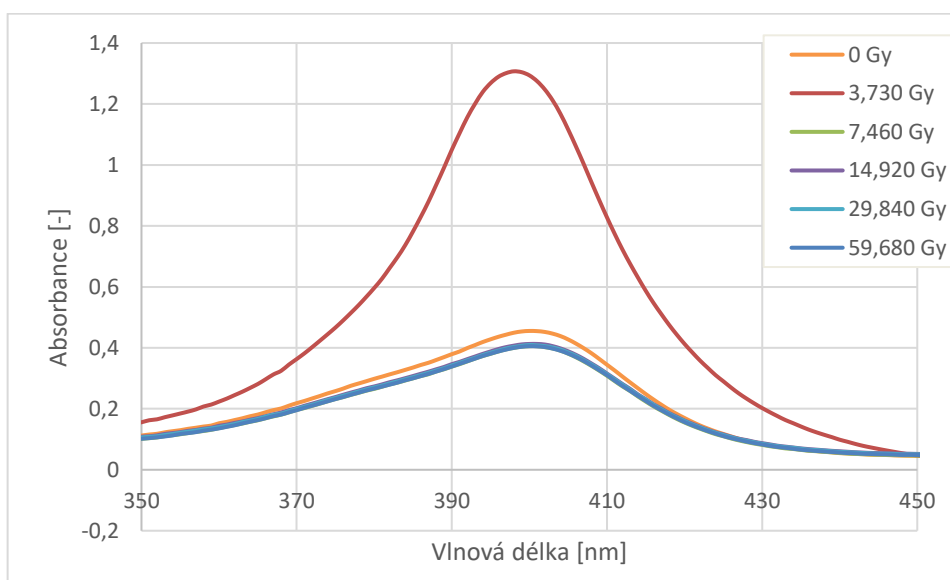
PpIX v i-PrOH je velmi špatně rozpustný, jelikož absorpční maximum se pohybuje kolem 0,01, což může být způsobeno částicemi ppIX ve vznosu, které se nepovedlo odstranit na centrifuze.



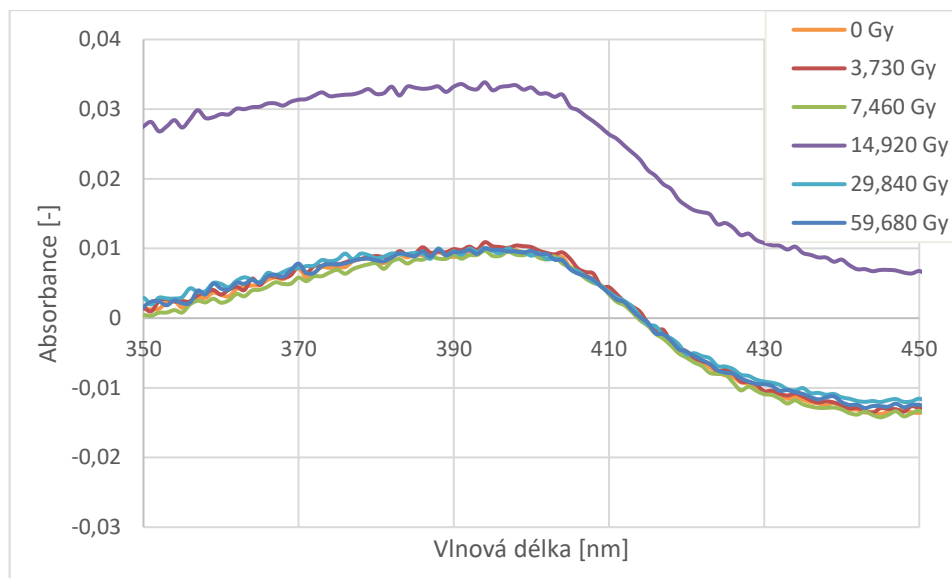
OBRAZEK 33 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V EtOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 3,730, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 GY



OBRÁZEK 34 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V ETOH A 0,1 M ROZTOK NaOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 3,730, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 Gy



OBRÁZEK 35 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU PPIX V MeOH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 3,730, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 Gy



OBRÁZEK 36 ABSORPČNÍ SPEKTRA ROZTOKU pPIX V I-PROH, KTERÝ BYL VYSTAVENÝ GAMA ZÁŘENÍ O DÁVKÁCH 0, 3,730, 7,460, 14,920, 29,840 A 59,680 Gy

TABULKA 7 HODNOTY MAXIM PRO 3. SÉRII VZORKŮ OZÁŘENÝCH GAMA ZÁŘENÍM (ČERVENÁ HODNOTA JE CHYBNÉ MĚŘENÍ, KTERÉ BYLO VYŘAZENÉ Z ANALÝZY)

	0 Gy	3,730 Gy	7,460 Gy	14,920 Gy	29,840 Gy	59,680 Gy
ppIX+EtOH	0,688	0,732	0,736	0,724	0,746	0,795
ppIX+MeOH	0,455	1,307	0,406	0,413	0,409	0,406
ppIX+i-PrOH	0,010	0,011	0,010	0,034	0,010	0,010
ppIX+EtOH+NaOH	2,718	2,716	2,711	2,716	2,716	2,714

4.5. Shrnutí výsledků

Během měření byl ppIX v roztoku, bylo vizuálně potvrzeno, že v roztoku nebyly sraženiny ani žádné další nečistoty. Avšak po delší době stání roztoku ve tmě (v rámci jednotkách týdnů) došlo k vzniku sraženiny na dně. Toto byla zjištěno až po změření prvních dvou sérii experimentů. Proto byla u třetí série sraženina odstraněna odstředěním na centrifuze.

Z naměřených spekter vyplynulo, že isopropanol nebyl vhodně vybraným rozpouštědlem a ačkoli je v některých vlastnostech podobný EtOH a MeOH, tak ppIX téměř nerozpouští. To bylo potvrzeno ve 3. sérii experimentu, kdy po centrifugování došlo k usazení ppIX na dně zkumavky a v naměřených absorpčních spektrech se hodnota maxima pohybovala okolo 0,01.

Série experimentů ukázala, že UV záření pravděpodobně nemá vliv na molekulu ppIX.

Během ozařování gama zářením roztoku ppIX došlo k nárůstu hodnoty absorpčního maxima. Hodnota maxima se zvyšovala s narůstající dávkou gama záření.

5. ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše, ve které byly popsány vlastnosti fosfolipidů, proteinů a DNA. Dále byla popsána radiolýza jednotlivých biomolekul.

V rámci teoretické části byla věnována pozornost ozařování jednotlivých biomolekul a porovnávání účinků záření s různými parametry.

V experimentální části byly navrženy a realizovány experimenty s radiací a fotocitlivostí molekuly protoporphyrinu. Než byly realizovány experimenty s ozařováním, byla zjištěna rozpustnost protoporphyrinu v různých rozpouštědlech. Během těchto experimentů se zjistilo, že protoporphyrin je velice špatně rozpustný v isopropanolu.

Tato molekula byla vystavena paprskům UV a gama záření. Následně byla měřena absorpční spektra jednotlivých ozářených vzorků. Analýzou naměřených dat plyne, že v případě použití UV zdroje k ozařování molekuly protoporphyrin nedochází k nárůstu absorbance, a tudíž lze předpokládat, že UV záření významně neovlivňuje vlastnosti protoporphyrinu. Naopak v případě ozařování roztoku protoporphyrin v EtOH gama zdrojem bylo pozorováno, že se zvyšující se dávkou absorbovaného záření dochází k nárůstu intenzity Soretova pásu. U roztoku protoporphyrinu v methanolu pro oba zdroje záření se nepodařilo prokázat vliv záření na změnu absorbance.

6. POUŽITÁ LITERATURA

Accelerators | CERN. Home | CERN [online]. Copyright © [cit. 23.12.2021]. Dostupné z: <https://home.cern/science/accelerators>

Alberts, B. 1998. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*, Espero, Ústí nad Labem.

Asaithamby, A., & Chen, D. J. (2009). Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose γ -irradiation. *Nucleic Acids Research*, 37(12), 3912–3923. doi:10.1093/nar/gkp237

Aurengo, André, Dietrich Averbeck, A Bonnin, Bernard Le Guen, Roland Mase, Roger Monier, Maurice Tubiana, Alain-Jacques Valleron and Florent de Vathaire. (2005). Dose-effect relationships and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation. Executive Summary. French Academy of Sciences, French National Academy of Medicine, 1e59.

Azzam I. E., Raaphorst G.P., Mitchel R.E., (1994) Radiation-induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10 T1/2 mouse embryo cells *Radiation Research*, 138, pp. S28-S31

Brunclík, Robert. 2014. *Historický vývoj rentgenových přístrojů pro skiografii*. Bakalářská práce. Brno. Masarykova univerzita. Lékařská fakulta.

Campbell NA, Reece JB. 2007. *Biology: International Edition*, 8th edition. Pearson

Cieśla, K., Roos, Y., Głuszewski, W. (2000). Denaturation processes in gamma irradiated proteins studied by differential scanning calorimetry. *Radiation Physics and Chemistry*, 58(3), 233–243. doi:10.1016/s0969-806x(99)00380

Claus, H. (2021). Ozone Generation by Ultraviolet Lamps †. *Photochemistry and Photobiology*, 97(3), 471–476. doi:10.1111/php.13391

Conte, L.L., Ailey, B., Hubbard, T.J.P., Brenner, S.E., Murzin, A.G., Chothia, C., 2000. SCOP: a Structural Classification of Proteins database. *Nucl. Acids Res.* 28, 257259.

Cooper, G. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd ed.). Sinauer Associates Inc.

Crichton Robert R., (2012) Chapter 2 - Basic Coordination Chemistry for Biologists, Editor(s): Robert R. Crichton, *Biological Inorganic Chemistry* (Second Edition), Elsevier, Pages 21-34, ISBN 9780444537829, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53782-9.00002-4>.

ČSN IEC 50(845):1987 *Mezinárodní elektrotechnický slovník*. Kapitola 845: Osvětlení, Praha, 1995

Da Silva, Rafaela Rogiski, Bruna Carla AGUSTINI, André Luís Lopes DA SILVA a Henrique Ravanhol FRIGERI. Luminol in the forensic science. *Journal of Biotechnology and Biodiversity* [online]. 2012, 3(4), 172-177 [cit. 2021-11-16]. ISSN 2179-4804. doi:10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.rogiskisilva

Desouky, O., Ding, N., & Zhou, G. (2015). Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(2), 247–254. doi:10.1016/j.jrras.2015.03.00

- Diffey, Brian L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* [online]. 2002, 28(1), 4-13 [cit. 2021-6-13]. ISSN 10462023. doi:10.1016/S1046-2023(02)00204-9
- Ding, H., Sumer, B. D., Gao, J. (2011). CLINICAL APPLICATIONS OF HEME BIOSYNTHETIC PATHWAY: Photodynamic Therapy with Protoporphyrin IX. *Heme Biology*, 197–209. doi:10.1142/9789814287937_0009
- Donnelly, E. H., Nemhauser, J. B., Smith, J. M., Kazzi, Z. N., Farfán, E. B., Chang, A. S., & Naeem, S. F. (2010). Acute Radiation Syndrome: Assessment and Management. *Southern Medical Journal*, 103(6), 541–546. doi:10.1097/smj.0b013e3181ddd571
- Duarte, F. J. *Tunable lasers handbook*. San Diego: Academic Press, c1995. ISBN 978-0-12-222695-3.
- Elder, G.H. 1994. *Scientific Foundations of biochemistry in clinical practice*, Haem Synthesis and the porphyrias, 409-419
- Elliott, David J. *Ultraviolet Light. Ultraviolet Laser Technology and Applications* [online]. Elsevier, 1995, 1995, s. 1-32 [cit. 2021-6-13]. ISBN 9780122370700. doi:10.1016/B978-0-12-237070-0.50005-4
- Favaudon, V., Tourbez, H., Houee-Levin, C., & Lhoste, J. M. (1990). Carboxyl radical induced cleavage of disulfide bonds in proteins. A γ -ray and pulse radiolysis mechanistic investigation. *Biochemistry*, 29(49), 10978–10989. doi:10.1021/bi00501a016
- Garrison, W. M., Jayko, M. E., & Bennett, W. (1962). Radiation-Induced Oxidation of Protein in Aqueous Solution. *Radiation Research*, 16(4), 483. doi:10.2307/3571084
- Garrison, W. M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, 87(2), 381–398. doi:10.1021/cr00078a006
- Gray, L. H. (1952). *Actions of Radiations on Living Cells, 1946 and After The Second Douglas Lea Memorial Lecture. The British Journal of Radiology*, 25(293), 235–244. doi:10.1259/0007-1285-25-293-235
- Hasegawa, T., Takahashi, J., Nagasawa, S., Doi, M., Moriyama, A., & Iwahashi, H. (2020). DNA Strand Break Properties of Protoporphyrin IX by X-ray Irradiation against Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2302. doi:10.3390/ijms21072302
- Harekrishna Roy, Satyabrata Bhanja, Uttam Prasad Panigrahy, Vinay Kumar Theendra, Chapter 4 - Graphene-Based Nanovehicles for Drug Delivery,
- Hornby, A. S., Ashby, M., & Wehmeier, S. (2000). *Oxford advanced learner's dictionary of current English*. Oxford, Oxford University Press.
- Hoseini, M., Sazgarnia, A., & Sharifi, S. (2019). Effect of Environment on Protoporphyrin IX: Absorbance, Fluorescence and Nonlinear Optical Properties. *Journal of Fluorescence*. doi:10.1007/s10895-019-02366-4
- Iyer R., Lehnert B.E.. (2002) Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells *Mutation Research*, 503, pp. 1-9
- Kennedy, J. C., & Pottier, R. H. (1992). New trends in photobiology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 14(4), 275–292. doi:10.1016/1011-1344(92)85108-7

- Kramar, U. (2017). X-Ray Fluorescence Spectrometers ☆. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 695–706.
- Kubát, P., Lang, K., Procházková, K., & Anzenbacher, P. (2003). Self-Aggregates of Cationicmeso-Tetratolylporphyrins in Aqueous Solutions. *Langmuir*, 19(2), 422–428. doi:10.1021/la026183f
- Kumta, U. S., & Tappel, A. L. (1961). Radiation Damage to Proteins. *Nature*, 191(4795), 1304–1305. doi:10.1038/1911304a0
- Lee, S. J., Park, K., Oh, Y.-K., Kwon, S.-H., Her, S., Kim, I.-S., ... Lee, S. G. (2009). *Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice*. *Biomaterials*, 30(15), 2929–2939. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.
- Luby-Phelps, Katherine. *Cytoarchitecture and Physical Properties of Cytoplasm: Volume, Viscosity, Diffusion, Intracellular Surface Area. Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 189-221 [cit. 2020-04-16]. *International Review of Cytology*. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)60527-6. ISBN 9780123645968.
- Maisonneuve, E., Ducret, A., Khoueir, P., Lignon, S., Longhi, S., Talla, E., & Dukan, S. (2009). Rules Governing Selective Protein Carbonylation. *PLoS ONE*, 4(10), e7269. doi:10.1371/journal.pone.0007269
- Manivasagam, Geetha, Aakash Reddy, Dwaipayan SEN, Sunita Nayak, Mathew T. Mathew a Asokami Rajamanikam. *Dentistry: Restorative and Regenerative Approaches*. *Encyclopedia of Biomedical Engineering* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 332-347 [cit. 2021-6-15]. ISBN 9780128051443. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11017-7
- Marathe, D., & Mishra, K. P. (2002). Radiation-Induced Changes in Permeability in Unilamellar Phospholipid Liposomes. *Radiation Research*, 157(6), 685–692. doi:10.1667/0033-7587(2002)157
- Mark, F., Becker, U., Herak, J. N., & Schulte-Frohlinde, D. (1989). Radiolysis of DNA in aqueous solution in the presence of a scavenger: A kinetic model based on a nonhomogeneous reaction of OH radicals with DNA molecules of spherical or cylindrical shape. *Radiation and Environmental Biophysics*, 28(2), 81–99. doi:10.1007/bf01210293
- Myrzakhmetov, B., Arnoux, P., Mordon, S., Acherar, S., Tsoy, I., & Frochot, C. (2021). Photophysical Properties of Protoporphyrin IX, Pyropheophorbide-a, and Photofrin® in Different Conditions. *Pharmaceuticals*, 14(2), 138. doi:10.3390/ph14020138
- Nagasawa, Hatsumi and John B. Little. "Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles." *Cancer research* 52 22 (1992): 6394-6 .
- Nave C. R., Cobalt 60 [online]. ©C.R. Nave, HyperPhysics [2022-1-1] Dostupné z: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Nuclear/betaex.html>
- O'Neill, P. (2001). Radiation-induced damage in DNA. *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, 585–622. doi:10.1016/s0167-6881(01)8002
- OUELLETTE, Robert J. a J. David RAWN. *Amino Acids, Peptides, and Proteins*. *Organic Chemistry* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 929-971 [cit. 2021-6-11]. ISBN 9780128128381. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812838-1.50029-3

SHARON, Nathan a Halina LIS. Microbial lectins and their glycoprotein receptors. *Glycoproteins II* [online]. Elsevier, 1997, 1997, s. 475-506 [cit. 2021-6-10]. *New Comprehensive Biochemistry*. ISBN 9780444823939. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-

7306(08)60626-2

Pierre Pelcé,1 - Constituents, Editor(s): Pierre Pelcé, A Physicochemical Theory of Tip Growth, Elsevier, 2019, Pages 1-24, ISBN 9781785483165, [https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-316-5.50001-](https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-316-5.50001-4)

4. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781785483165500014>)

Popovich, Kseniya. *Biofunctionalization of Luminescent Nanocomposites*. Praha, 2020. Disertační práce. ČVUT. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská. Vedoucí práce doc. Ing. Václav Čuba, Ph. D.

POTTIER, R. H., & RUSSELL, D. A. (1991). PHOTOCHEMISTRY. *Photobiological Techniques*, 216, 45.

Reichl Jaroslav, Všetečka Martin (2010), ©Encyklopedie Fyziky, Lineární urychlovače, Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com>

Rogers, Kara. "Biomolecule". *Encyclopedia Britannica*, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/biomolecule>. Accessed 26 May 2021.

Sachar, M., Anderson, K. E., & Ma, X. (2015). Protoporphyrin IX: the Good, the Bad, and the Ugly. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 356(2), 267–275. doi:10.1124/jpet.115.228130

SCHNAAR, Ronald L. Glycolipid-mediated cell–cell recognition in inflammation and nerve regeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2004, 426(2), 163-172 [cit. 2021-6-11]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2004.02.019

Spotheim-Maurizot, M., Savoye, C., Sabattier, R., & Charlier, M. (1996). Comparative study of DNA radiolysis by fast neutrons and γ -rays. *Bulletin Du Cancer/Radiothérapie*, 83, 27s–31s. doi:10.1016/0924-4212(96)84880-8

Stadtman, E. R. (1993). Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins by Radiolysis and by Metal-Catalyzed Reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), 797–821. doi:10.1146/annurev.bi.62.070193

Suresh R., M. Pandiaraj, M. Sankaralingam, K. Giribabu, Chapter 6 - Graphene–Metal Chalcogenide Modified Electrochemical Sensors, Editor(s): Alagarsamy Pandikumar, Perumal Rameshkumar, In *Micro and Nano Technologies, Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*, Elsevier, 2019, Pages 139-153, ISBN 9780128153949, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815394-9.00006-6>.

Takahashi, J., & Misawa, M. (2009). Characterization of reactive oxygen species generated by protoporphyrin IX under X-ray irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(11), 889–898. doi:10.1016/j.radphyschem.2009.06.

Thomas, G., & Isaacs, R. (2011). Basic principles of lasers. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 12(12), 574–577. doi:10.1016/j.mpaic.2011.09.013

Tobiska, W.K., Nusinov, A.A.(2007) Status of ISO draft international standard for determining solar irradiances (DIS 21348). J. Adv. Space Research

Thompson, Thomas E.. "Lipid". Encyclopedia Britannica, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/lipid>. Accessed 29 May 2021.

Tomanová, K., Precek, M., Múčka, V., Vyšín, L., Juha, L., & Čuba, V. (2017). At the crossroad of photochemistry and radiation chemistry: formation of hydroxyl radicals in diluted aqueous solutions exposed to ultraviolet radiation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(43), 29402–29408. doi:10.1039/c7cp05125e

Valenta Martin: Predikce proteinových domén, diplomová práce, Brno, FIT VUT v Brně, 2013

Vyšín L, Tomanová K, Pavelková T, Wagner R, Davidková M, Múčka V, Čuba V, Juha L. Degradation of phospholipids under different types of irradiation and varying oxygen saturation. *Radiat Environ Biophys*. 2017 Aug;56(3):241-247. doi: 10.1007/s00411-017-0693-6. Epub 2017 May 12. PMID: 28500389.

Zephyris, Wheeler R., hemoglobin, 2007 <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>