

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta jaderná a fyzikální inženýrská

Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv parametrů prostředí na poškození plasmidu
DNA ionizujícím zářením

Autor: Bc. Klára Stefanová
Vedoucí: Ing. Václav Štěpán, Ph.D.
Akademický rok: 2020/2021



Katedra: KDAIZ

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: Bc. Klára Stefanová

Studijní program: Radiologická fyzika

Název práce: Vliv parametrů prostředí na poškození plasmidu DNA ionizujícím
(česky) zářením

Název práce: Impact of environment parameters on the plasmid DNA damage
(anglicky) induced by ionizing radiation

Pokyny pro vypracování:

1. Popište možnosti použití a principy Monte Carlo track structure kódů pro studium radiačního poškození DNA plasmidu ve vodném roztoku.
2. Vygenerujte knihovnu prostorových konfigurací DNA plasmidů pBR322 a pUC19 v čase pro vybrané kombinace teploty a koncentrace sodných iontů ve vodném roztoku pomocí worm-like chain modelu.
3. S využitím nástrojů vytvořených v rámci bakalářské práce vytvořte popisy konfigurací plasmidů na atomární úrovni, v PDB formátu.
4. Použijte Geant4-DNA pro predikci radiačního poškození plasmidů DNA protony a gamma zářením.
5. Výsledky simulací diskutujte.

Doporučená literatura:

- [1] KARAMITROS, M., S. LUAN, M.A. BERNAL, et al. Diffusion-controlled reactions modeling in Geant4-DNA. *Journal of Computational Physics*. 2014, **274**, 841-882. ISSN 00219991. DOI:10.1016/j.jcp.2014.06.011.
- [2] SCHUEMANN, J., A. L. MCNAMARA, J. RAMOS-MÉNDEZ, J. PERL, K. D. HELD, H. PAGANETTI, S. INCERTI a B. FADDEGON. TOPAS-nBio: An Extension to the TOPAS Simulation Toolkit for Cellular and Sub-cellular Radiobiology. *Radiation Research*. 2019, **191**(2). ISSN 0033-7587. DOI:10.1667/RR15226.1.
- [3] RAMOS-MÉNDEZ, José, Wook-Geun SHIN, Mathieu KARAMITROS, et al. Independent reaction times method in Geant4-DNA: Implementation and performance. *Medical Physics*. 2020, **47**(11), 5919-593. ISSN 0094-2405.

Jméno a pracoviště vedoucího diplomové práce:

Ing. Václav Štěpán, Ph.D.
Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.
Oddělení dozimetrie záření
Na Truhlářce 39/64
180 00 Praha 8

Jméno a pracoviště konzultanta diplomové práce:


Ing. Kateřina Pachnerová Brabcová, Ph.D.
Ústav jaderné fyziky AV ČR, v.v.i.
Oddělení dozimetrie záření
Na Truhlářce 39/64
180 00 Praha 8

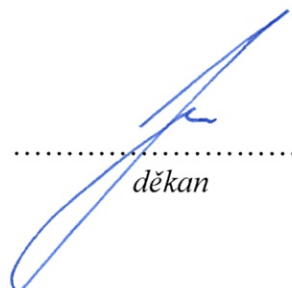
Datum zadání diplomové práce: 14. 10. 2020

Termín odevzdání diplomové práce: 3. 5. 2021

Doba platnosti zadání je dva roky od data zadání.


.....
garant programu


.....
vedoucí katedry


.....
děkan

V Praze dne 14.10.2020



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

V Praze 2. 8. 2021

.....
Bc. Klára Stefanová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu Ing. Václavu Štěpánovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla své konzultantce Ing. Kateřině Pachnerové Brabcové, Ph.D. a vedoucí našeho oddělení Ing. Marii Davidkové, CSc. za odbornou pomoc při vypracování práce. Jako poslední bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během studia.

Tento výzkum byl podpořen GAČR v rámci projektu č. 1703403Y. Také by nevznikl bez výsledků projektu ESA BIORAD (ESA AO 7146).

Tato práce vznikla za podpory projektů CERIT Scientific Cloud (LM2015085) a CESNET (LM2015042) financovaných z programu MŠMT Projekty velkých infrastruktur pro VaVaI.

Bc. Klára Stefanová

Název práce: Vliv parametrů prostředí na poškození plasmidu DNA ionizujícím zářením

Autor: Bc. Klára Stefanová

Obor: Radiologická fyzika

Druh práce: Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Václav Štěpán, Ph.D., ODZ ÚJF AV ČR, v. v. i., Na Truhlářce 39/64, 180 00 Praha 8

Konzultant: Ing. Kateřina Pachnerová–Brabcová, Ph.D., ODZ ÚJF AV ČR, v. v. i., Na Truhlářce 39/64, 180 00 Praha 8

Abstrakt: Plasmidy jsou v radiobiologii využívány mimo jiné i jako přiblížení pro DNA v jádře buňky. Přitom jsou ale běžně uchovávány a ozařovány v podmínkách, které se od těch v buňce značně liší. Pokud by to mělo vliv i na výtěžky poškození DNA plasmidu ionizujícím zářením, znevěhodňovalo by to přenositelnost závěrů experimentů z plasmidů na buňky.

Cílem práce je zkoumat vliv okolního prostředí, konkrétně teploty prostředí a koncentrace sodných iontů, na radiační výtěžky poškození plasmidu.

Teoretická část se zabývá možnostmi a principy použití Monte Carlo track structure kódů v modelování fyzikální, fyzikálně–chemické a chemické fáze účinku ionizujícího záření.

Metody a softwarové nástroje vyvinuté nebo uzpůsobené pro vyřešení zadání popisuje část Materiály a metody. Pro zkoumání vlivu okolního prostředí na radiační výtěžky byla vytvořena aplikace využívající Geant4–DNA knihovny a procesy, které umožňují simulovat chemickou fázi účinků ionizujícího záření a zároveň pracovat s atomární strukturou plasmidu.

Pomocí softwarových nástrojů pro tvorbu worm-like chain modelu byla vytvořena knihovna hrubých struktur plasmidů pBR322 a pUC19. Její analýzou bylo zjištěno, že teplota prostředí nemá na vlastnosti konfigurace významný vliv, oproti tomu koncentrace sodných iontů ano. Ze struktur byly následně vygenerovány modely na atomární úrovni a ty byly použity pro modelování výtěžků poškození plasmidu DNA protony o energiích 50 keV až 10 MeV a 1,25 MeV fotony. Vliv teploty a koncentrace sodných iontů byl hodnocen prostřednictvím separační vzdálenosti pro dvojný zlom.

U protonů do 1 MeV ze simulací vychází, že na plasmidech v roztoku s vyšší koncentrací sodných iontů vzniká přibližně o třetinu poškození více a vliv parametrů prostředí na přenositelnost výsledků do buněčného prostředí nelze zanedbat. Pro fotony nebylo možné závislost kvůli nedostatečné statistice výsledků posoudit.

Klíčová slova: DNA, plasmid, strukturní model, ionizující záření, Geant4–DNA

***Title:* Impact of environment parameters on the plasmid DNA damage induced by ionizing radiation**

Author: Bc. Klára Stefanová

Abstract: Plasmids are used in radiobiology, among other things, as an approximation of nuclear DNA. Meanwhile, they are stored and irradiated in environmental conditions which are considerably different from those in cells. Should this difference affect yields of plasmid DNA damage by ionizing radiation, it would discredit the portability of results of experiments from plasmids to cells.

This work aims to study the influence of the environment, namely the temperature of the environment and concentration of sodium ions in solution, on yields of radiation damage of plasmid. The theoretical part explains the possibilities and principles of Monte Carlo track structure codes in modelling physical, physico-chemical, and chemical phases of the effect of ionizing radiation.

Newly developed and adapted methods and software tools for solving the assignment are described in Materials and methods. To examine the effect of the environmental conditions on yields of plasmid damage by ionizing radiation, an application was developed using Geant4–DNA libraries and processes. Simulation of physical, physico-chemical, and chemical phases of the effect of ionizing radiation can be run with this application using the atomic structure of plasmid.

Library of the worm-like chain models of plasmids pUC19 and pBR322 was generated with software tools. No big influence of the temperature on the characteristic of the configuration of plasmid was found by analysis of the library. Compared to that, the concentration of sodium ions affects the characteristic. The atomic models of plasmids were generated from these structures. They were used in the simulation of yields of radiation damage of plasmid by protons with energies between 50 keV and 10 MeV and 1,25 MeV photons. The influence of the temperature of the environment and concentrations of sodium ions was evaluated by changing of separation distance for the double-strand break.

A one-third increase in the yield of radiation damage was found at plasmids with higher concentrations of sodium ions for protons with energy under 1 MeV. So, the influence of environmental parameters on the portability of results to cells cannot be neglected. There was no dependence on photon yields because of insufficient statistics of hits.

Key words: DNA, plasmid, structural model, ionizing radiation, Geant4–DNA

Obsah

Úvod	10
1 Teorie	11
1.1 Monte Carlo track structure kódy	11
1.1.1 Modelování fyzikální fáze účinku ionizujícího záření	11
1.1.2 Modelování chemické fáze účinku ionizujícího záření	12
1.2 Používané Monte Carlo track structure kódy	15
1.2.1 Geant4–DNA	15
1.2.2 TOPAS–nBio	16
1.2.3 RADAMOL	16
1.2.4 PARTRAC	16
2 Materiály a metody	18
2.1 Vygenerování hrubé struktury plasmidu	18
2.1.1 Volba parametrů okolního prostředí	18
2.1.2 Použitý worm-like chain model	19
2.1.3 Realizace simulace	21
2.1.4 Vyhodnocení vlastností vygenerovaných struktur	22
2.2 Automatizace zjemňování hrubé struktury	23
2.3 Aplikace pro simulaci radiačního poškození	26
2.3.1 Načtení modelu plasmidu	27
2.3.2 Zdroj primárních částic	27
2.3.3 Fyzikální fáze	28
2.3.4 Chemická fáze	28
2.3.5 Skórování poškození plasmidu	28
2.4 Volba parametrů simulace radiačního poškození	30
2.4.1 Druh a struktura plasmidu	30
2.4.2 Zdroj ionizujícího záření	30
2.5 Vliv parametrů okolního prostředí na radiační poškození	32

2.5.1	Teplota okolního prostředí	33
2.5.2	Iontová síla roztoku	33
2.5.3	Zohlednění okolního prostředí v simulaci	33
2.6	Výstupy simulace	33
2.6.1	Sledovaná poškození	34
2.6.2	Výtěžky radiačního poškození plasmidu	35
2.6.3	Formát SDD (Standard DNA Damage) výstupního souboru	36
3	Výsledky	39
3.1	Chování molekuly s měnicími se podmínkami prostředí	39
3.2	Knihovna atomární struktury	45
3.3	Aplikace pro simulaci účinku ionizujícího záření	46
3.4	Simulace radiačního poškození plasmidu	46
3.4.1	Výtěžky radiačního poškození u plasmidů pUC19 a pBR322	49
3.5	Vyvinuté kódy a skripty	52
4	Diskuze	53
4.1	Chování molekuly s měnicími se podmínkami prostředí	53
4.1.1	Teplota prostředí	53
4.1.2	Koncentrace sodných iontů	54
4.2	Zjemnění hrubé struktury na atomární úroveň	56
4.3	Aplikace pro simulaci poškození plasmidu ionizujícím zářením	56
4.4	Vliv okolního prostředí na výtěžky poškození plasmidu ionizujícím zářením	58
4.4.1	Protony	58
4.4.2	Fotonové záření	60
5	Závěr	62
	Literatura	64

Úvod

Monte Carlo track structure kódy se staly neodmyslitelnou součástí studia poškození DNA ionizujícím zářením. Oproti experimentům umožňují blíže zkoumat jednotlivá vzniklá poškození na molekule. Aby bylo možné porovnat závěry experimentů se závěry simulací, je nutné vědět jak prostředí, do kterého je během experimentu umístěna DNA, může ovlivnit její chování a výtěžky vzniklých poškození. Cílem této práce je zkoumat vliv okolního prostředí na konfiguraci molekuly a radiační výtěžky u plasmidů.

Plasmidy jsou molekuly DNA, které je možné nalézt v cytoplasmě některých bakterií. V radiobiologii se používají mimo jiné i jako zjednodušený model jaderné DNA. A to jak při experimentech, tak při simulaci účinků ionizujícího záření na tuto molekulu.

V této práci je využit atomární model plasmidu, který zachycuje vývoj jeho konformace v čase. Tento model je založen na worm-like chain modelu plasmidu [1] zjmeněném pomocí algoritmu z mé bakalářské práce [2] inspirovaném popisem v [3]. Konkrétně jsou v této práci použity plasmidy pUC19 a pBR322, které mají délku 2686 a 4361 bazických párů [4].

Pro zohlednění vlivu okolního prostředí na konformaci plasmidu je simulován její časový vývoj při různých teplotách a koncentracích sodných iontů. Pro porovnání vlivu jednotlivých parametrů prostředí jsou využity konformace plasmidu v nadšroubovicové formě.

Pro hodnocení vlivu okolního prostředí na výtěžky ionizujícího záření je v rámci této práce vyvinuta aplikace v C++ pod GNU/Linux, která využívá Geant4–DNA knihovny a procesy v rámci simulačního nástroje Geant4 [5], [6]. Pomocí aplikace byla simulována fyzikální, fyzikálně–chemickou a chemickou fázi až do času 100 ns. Pro hodnocení vlivu okolního prostředí je využito vlivu měnící se teploty a koncentrace sodných iontů na separační vzdálenost [7]. Jako primární částice jsou použity protony o různých energiích a fotonové záření. Tyto primární částice jsou často používány při radioterapii, proto je nutné zkoumat jejich účinek na jadernou DNA, popřípadě její modely.

Kapitola 1

Teorie

1.1 Monte Carlo track structure kódy

Monte Carlo track structure kódy umožňují získat časo–prostorovou distribuci fyzikálních interakcí a chemických reakcí, které probíhají při průchodu ionizujícího záření prostředím. Díky tomuto přístupu kódy umožňují získat stopu částice a produktů jejich interakcí.

Tento přístup umožňuje získat přesnější výsledky oproti jiným metodám, příkladem metodě kondenzovaných historií, avšak za cenu vyššího výpočetního času. Přesnost výsledků se výrazně projevuje především u nižších energií simulovaných částic (do 100 eV) a menších rozměrů simulovaných objemů (do μm). V těchto hodnotách se pohybujeme i pokud studujeme radiační poškození molekuly DNA, tudíž je tento přístup vhodný i pro simulace v oblasti radiobiologie [8], [9].

Účinek ionizujícího záření na molekulu DNA není okamžitý, ale má několik fází: fyzikální, fyzikálně-chemickou, chemickou a biologickou. Jelikož během těchto fází probíhají odlišné děje, je nutné přistupovat odlišně i k jejich simulaci. V kapitole 1.1.1 je popsán princip simulace fyzikální fáze, kdy dochází k transportu částic ionizujícího záření a jejich interakci s prostředím. Kapitola 1.1.2 je zaměřena na simulaci fyzikálně-chemické a chemické fáze, kdy dochází k pohybu produktů radiolýzy a jejich reakcím mezi sebou nebo s ostatními molekulami [10].

1.1.1 Modelování fyzikální fáze účinku ionizujícího záření

Při fyzikální fázi dochází k interakci částic ionizujícího záření s molekulami prostředí, kterým prochází. Track structure kódy umožňují simulovat každou interakci, která nastane, dokud energie částice neklesne pod určitý práh, a pomocí nich sledovat dráhu primárních i sekundárních částic [8].

Interakce ionizujícího záření jsou modelovány pomocí pravděpodobnostních rozdělení na základě účinných průřezů jednotlivých interakcí. Účinné průřezy jsou buď dopočítávány pro danou situaci z analytických modelů nebo získány z uložených tabelovaných hodnot. Tyto modely transportu částic ionizujícího záření prostředím bývají omezené co se týče druhu simulovaných částic a jejich možné energie.

Simulace dráhy částice, primární nebo sekundární, je ukončena ve chvíli, kdy energie částice klesne pod hraniční hodnotu, tzv. cut-off. Zbytková energie je poté deponována lokálně. Další možností, kdy se ukončí simulace dráhy částice, je její interakce nebo chvíle, kdy opustí zájmový objemu [11].

Na konci fyzikální fáze uživatel získá prostorové rozložení ionizovaných a excitovaných molekul prostředí, které je vstupní informací pro modelování chemické fáze účinku ionizujícího záření, v radiobiologických simulacích se jedná o molekuly vody [12].

Při simulaci fyzikální fáze účinků ionizujícího je možné simulovat přímé poškození molekuly DNA. A to v případě, že součástí simulačního kódu je implementace geometrie molekuly a také metoda skórování přímého poškození. Konkrétní řešení tohoto problému je popsáno např. v [13].

1.1.2 Modelování chemické fáze účinku ionizujícího záření

Vlivem interakcí ionizujícího záření dochází k excitaci a ionizaci molekul vody, které se poté rozpadají nebo disociují na jiné molekuly a radikály (př. e_{aq}^- , H_2 nebo $\text{OH}\cdot$). Takto vzniklé molekuly a radikály difundují prostředím mohou reagovat mezi sebou za vzniku dalších reaktivních produktů (H_2O_2 nebo OH^-). Některé molekuly a radikály, např. e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$ a H_2O_2 , mohou způsobit nepřímé poškození molekuly DNA [14].

Produkty radiolýzy se během chemické fáze pohybují difúzí. Ta je pro jednotlivé molekuly a radikálů charakterizována pomocí difúzního koeficientu D . V Tab. 1.1 jsou uvedeny difúzní koeficienty některých molekul, iontů a radikálů ve vodě používané v simulačních nástrojích PARTRAC a Geant4–DNA [14].

Tab. 1.1: Hodnoty difúzních koeficientů D některých molekul, iontů a radikálů ve vodě používané v simulačních nástrojích PARTRAC a Geant4–DNA [14].

molekula, ion, radikál	D [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$]
e_{aq}^-	4,9
$\text{OH}\cdot$	2,8
$\text{H}\cdot$	7,0
H_3O^+	9,0
H_2	4,8
OH^-	5,0
H_2O_2	2,3

Reakce produktů radiolýzy mezi sebou nebo s molekulou DNA jsou charakterizovány pomocí reakčních rychlostí k . V Tab. 1.2 jsou uvedeny příklady reakčních rychlostí pro vybrané reakce.

Z hodnot difúzních koeficientů jednotlivých reaktantů D_A a D_B a reakční konstanta reakce k lze spočítat reakční poloměr $r_{A,B}$ reakce chemických produktů A a B a to pomocí vzorce

$$r_{A,B} = \frac{k}{4\pi N_A (D_A + D_B)}, \quad (1.1)$$

Tab. 1.2: Hodnoty reakčních konstant pro vybrané reakce. Hodnoty pro reakce produktů radiolýzy mezi sebou převzaty z [15] a pro reakce radikálu $\text{OH}\cdot$ s částmi molekuly DNA z [16].

reakce	k [$10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	reakce	k [$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
$\text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^- \longrightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	14,00	$\text{OH}\cdot + 2\text{-deoxyribóza}$	2,50
$\text{OH}\cdot + \text{OH}\cdot \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0,55	$\text{OH}\cdot + \text{adenin}$	6,10
$\text{H}\cdot + \text{H}\cdot \longrightarrow \text{H}_2$	0,78	$\text{OH}\cdot + \text{thymin}$	6,40
$\text{H}_3\text{O} + \text{O}_2^- \longrightarrow \text{HO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	5,00	$\text{OH}\cdot + \text{cytosin}$	6,10
$\text{e}_{\text{aq}}^- + \text{OH}\cdot \longrightarrow \text{OH}^-$	3,00	$\text{OH}\cdot + \text{guanin}$	9,20

kde N_A je Avogadrova konstanta. Pokud se reaktanty A a B přiblíží na vzdálenost menší než $r_{A,B}$, uvažuje se, že k reakci došlo.

Následující kapitoly popisují dva přístupy k modelování difúzního pohybu a reakcí chemických produktů radiolýzy: simulace step-by-step a metoda nezávislých reakčních časů.

Step-by-step simulace

Při step-by-step simulaci se molekuly pohybují prostorem pomocí série časo-prostorových kroků, které simulují průběh difúze. Délka prostorového kroku je ovlivněna difúzním koeficientem D daného produktu a délkou časového kroku Δt , který má prostorový krok reprezentovat.

Střední délka prostorového kroku je přímo úměrná druhé odmocnině z difúzního koeficientu [14], [17].

Časový krok, který ovlivňuje délku prostorového kroku, je možné zvolit konstantní nebo měnící se [18].

Použití konstantního časového kroku může vést ke dvěma nevýhodným situacím. Pokud je zvolený časový krok příliš krátký, dojde k výraznému zvýšení výpočetní náročnosti simulace, což vede ke dlouhé době výpočtu. Naopak příliš dlouhý časový krok může být zdrojem nepřesností. Z těchto důvodů není vhodné tento přístup používat.

Cílem změny délky časového kroku je minimalizovat počet kroků, na jejichž konci s určitou pravděpodobností nedojde k reakci. Tato pravděpodobnost je popsána pomocí Smoluchowského rovnice, viz [8]. Na následujícím řádku je uveden její nejjednodušší tvar, který je platný pro dva neutrální reaktanty:

$$p(t|r_0) = \frac{r_{A,B}}{r_0} \text{erfc} \left[\frac{r_0 - r_{A,B}}{\sqrt{4(D_A + D_B)t}} \right], \quad (1.2)$$

kde $p(t|r_0)$ je pravděpodobnost, že v čase t dojde k reakci dvou chemických produktů A a B s počáteční vzdáleností r_0 . $r_{A,B}$ je jejich již dříve popsany reakční poloměr a D_A a D_B difúzní koeficienty. Na počátku chemické fáze, kdy jsou chemické produkty blízko sebe, je jsou voleny časové kroky krátké, aby nedocházelo k vynechání některých reakcí. Naopak na konci chemické fáze je možné krok prodloužit. Simu-

lační nástroje PARTRAC a Geant4–DNA proto velikost časového kroku škálují podle doby uplynulé od prvotní fyzikální interakce, viz Tab. 1.3.

Tab. 1.3: Délka časového kroku Δs v závislosti na době od prvotní fyzikální interakce (časový interval) používaná v simulačních nástrojích PARTRAC [12] a Geant4–DNA [14].

časový interval [s]	délka časového kroku Δt [ps]
$\leq 10^{-11}$	0,1
$10^{-11} - 10^{-10}$	1
$10^{-10} - 10^{-9}$	3
$10^{-9} - 10^{-8}$	10
$\geq 10^{-8}$	100

Na konci každého časo–prostorového kroku dojde ke kontrole vzdálenosti mezi jednotlivými chemickými produkty. Pokud je vzdálenost reaktantů menší než je reakční poloměr pro reakci mezi nimi, proběhne reakce a jsou nahrazeny jejími produkty. Naopak pokud je vzdálenost větší než reakční poloměr, produkty beze změny pokračují do dalšího časo–prostorového kroku.

Metoda nezávislých reakčních časů (IRT)

Druhou možností, jak simulovat pohyb chemických produktů a reakcí mezi nimi, je metoda nezávislých reakčních časů. Její hlavní výhodou oproti step-by-step simulaci je menší výpočetní náročnost. Ta je však vykoupena méně podrobnou časo–prostorovou informací o pohybu chemického produktu získáme [8], [19].

V rámci tohoto odstavce bude popsán tzv. poziční přístup. Druhým možností použití metody nezávislých reakčních času je tzv. časově–difúzní přístup. Jeho popis je uveden v [20]. V této práci se mu však věnovat nebudu, jelikož neumožňuje získat informaci o časo–prostorovém vývoji pohybu chemického produktu.

V porovnání s metodou step-by-step, kdy uživatel předem zná délku časového kroku a může ji ovlivnit, u IRT je délka časového kroku určena na základě proustorového rozložení jednotlivých chemických radikálů.

V daném časovém okamžiku a proustorovém rozdělení chemických produktů jsou vypočteny časy, které jsou potřebné k tomu, aby se dva z nich pomocí difúze přiblížili na vzdálenost menší než je reakční poměr jejich reakce. Ze všech možných realizovatelných reakcí se poté vybere ta, pro jejíž realizaci je potřeba nejkratší čas. Tato reakce je provedena a ostatní produkty v časo–proustoru difundují do své nové pozice s časovým krokem rovným době potřebné pro realizaci zvolené reakce. Poté se tento proces opakuje znovu [8], [19].

Pokud se nějaké dva produkty, kterých se netýkala původní reakce, nachází po difúzi k sobě blíže je reakční poloměr jejich reakce, může s určitou pravděpodobností nastat i jejich reakce, blíže je tato problematika popsána v [20].

1.2 Používané Monte Carlo track structure kódy

V následujících odstavcích jsou uvedeny příklady simulačních nástrojů, které se používají v radiobiologii. Zmíněné simulační nástroje umožňují simulovat kromě popisu dráhy částice i chemickou fázi. Výjimkou je simulační nástroj RADAMOL využívající pro popis fyzikální fáze kódy externí nástroje.

V textu je kladen důraz na popis simulačního projektu Geant4–DNA vyvíjený v rámci simulačního nástroje Geant 4, jelikož bude použit v této práci.

1.2.1 Geant4–DNA

Geant4–DNA je projektem simulačního nástroje Geant4. Geant4–DNA. Jeho cílem je provádět track structure simulace transportu ionizujícího záření, včetně simulace chemické fáze účinků ionizujícího záření, zejména v tekuté vodě. To umožňuje simulovat biologické účinky ionizujícího záření. K simulaci transportu a interakcí částic ionizujícího záření Geant4–DNA využívá modely vyvinuté pro Geant4 [11], [21].

V rámci Geant4 jsou vytvořeny knihovny pro projekt Geant4–DNA, díky kterým je možné simulovat účinky širokého spektra primárních částic: fotonů, elektronů, protonů, vodíkových atomů, alfa částic (${}^4\text{He}^0$, ${}^4\text{He}^+$, ${}^4\text{He}^{2+}$) a těžší iontů, jejichž seznam je uveden v [8].

Modelování fyzikálních interakcí, které nastávají ve fyzikální fázi, se v tomto simulačním nástroji provádí pomocí tříd procesů a modelů. Třída procesů popisuje konkrétní fyzikální interakci, třída modelů poté definuje konkrétní způsob, jakým je interakce simulována [22]. Pomocí nichž je poté definována třída *PhysicsList*, která popisuje všechny simulované fyzikální procesy. Pro Geant4–DNA jsou doporučeny tři možnosti kombinací tříd procesů a modelů, které jsou podrobněji popsány v [21].

Vznik chemických radikálů a chemické reakce lze v rámci Geant4–DNA simulovat pomocí procesů spojených s radiolýzou vody. Modely a procesy použité v simulování chemických procesů lze stejně jako fyzikálních interakcí definovat v *PhysicsList* [23]. Základní možností je simulace metodou step-by-step. Podrobný popis implementace této metody je uveden v [18]. V aktuální verzi nástroje Geant4 (verze 10.07) byla zveřejněna i implementace metody nezávislých reakčních časů [8]. Aplikace, které modelují kromě fyzikálních i chemické procesy lze v instalační složce Geant4 nalézt nalézt na adrese `examples/extended/medical/dna` jako `chem1` až `chem6` [24].

V simulačním nástroji Geant4 je možné vytvářet modely biologických terčů nebo je do aplikací importovat. Příkladem vytvořeného modelu je voxelový model buňky, který je možné nalézt v příkladu `microbeam` [25]. Import biologických terčů ze souborů byl implementován také např. v příkladu `DICOM` [26].

V případě subbuněčných biologických terčů byly v rámci projektu Geant4–DNA vytvořeno několik modelů jaderné nebo bakteriální DNA, např. [16], [27], [28]. Do aplikací možné též importovat biologické terče, jejichž struktura je popsána pomocí souboru ve formátu PDB [29]. Aplikace, která představuje implementaci importu atomární struktury ze souboru ve formátu PDB do simulace, se nazývá `pdb4dna`. Je možné jí nalézt na stejné adrese jako ilustrační aplikace pro chemické procesy pod

jménem `pdb4dna,examples/extended/medical/dna`. Podrobněji je aplikace představena v článku [13].

1.2.2 TOPAS–nBio

TOPAS–nBio vznikl jako rozšíření simulačního nástroje TOPAS. TOPAS byl vyvinut jako uživatelsky přívětivější rozšíření simulačního nástroje Geant4 se zaměřením na Monte Carlo simulace v oblasti protonové terapie [30]. Cílem TOPAS–nBio je zkoumat efekty ionizujícího záření na buněčné a nižší úrovni. Výsledky simulací v TOPAS–nBio by měly být dále použity při modelování makroskopických účinků ionizujícího záření pomocí nástroje TOPAS [19].

V rámci simulačního nástroje TOPAS–nBio je možné simulovat dráhu částice ionizujícího záření a produkty jejích interakcí. Fyzikální procesy jsou převzaty z Geant4–DNA knihoven a procesů. Jedná se o interakce částic ionizujícího záření s vodou a molekulou DNA. Chemickou fází umožňuje TOPAS–nBio modelovat jak step-by-step simulací, tak i pomocí metody nezávislých reakčních časů. Možnost simulace chemické fáze step-by-step byla prezentována v [31]. Implementace metody nezávislých reakčních časů byla představena v článku [19]. V něm bylo také představeno srovnání výtěžků chemických produktů získaných metodou step-by-step a IRT s experimentálními výsledky. Výsledky simulací byly srovnatelné s experimentálními daty pro obě metody simulace.

Nástroj TOPAS–nBio umožňuje využívat nebo vytvářet různé modely biologických terčů [19]. Možnosti tvorby modelů biologických terčů jsou popsány v dokumentaci [32].

1.2.3 RADAMOL

RADAMOL je simulační nástroj, který vznikl za účelem studia radiačního poškození biomolekul na úrovni nižší než je jaderná DNA. Na rozdíl od dříve zmíněných simulačních nástrojů neumožňuje RADAMOL modelovat fyzikální fázi.

Jako vstupní informace pro simulaci je potřeba znát event-by-event popis fyzikální fáze ozáření a atomární model biologického terče. Fyzikální fázi je možné modelovat pomocí simulačního nástroje TRIOL nebo Geant4–DNA. Atomární model biologického terče je nutné do simulace načíst ve formátu PDB [33].

V rámci simulace se poté modeluje fyzikálně-chemická a chemická fáze. Simulace probíhá step-by-step metodou. Simulace umožňuje modelovat i poškození DNA způsobené migrací náboje [15]. Dále lze modelovat poškození komplexu DNA–protein nebo vliv kyslíkového efektu na poškození biomolekuly [33].

1.2.4 PARTRAC

Simulační nástroj PARTRAC byl vyvinut za účelem simulace fyzikální, chemických a biologických dějů na úrovni nanometrů a mikrometrů. Je ho však možné s uspokojivými výsledky použít i pro simulaci větších objemů [34].

PARTRAC umožňuje vytvářet modely DNA na různé úrovni organizace na atomární úrovni. Nejvyšším stupněm organizace, který je možné modelovat, je jaderná DNA. Ta je modelována pomocí chromozomových domén. Jednotlivé domény jsou složeny ze čtverců, které jsou tvořeny hustě smotaným chromatinovým vláknem. Podrobněji je tento model popsán v [35].

Fyzikální fázi tento simulační nástroj modeluje event-by-event metodou. Modelování fyzikálně-chemické a chemické fáze je založené na step-by-step metodě. Dále se autoři tohoto nástroje zabývali implementací biologické fáze radiačního poškození molekuly DNA. V rámci nástroje je vytvořen stochastický model, který umožňuje simulovat reparaci dvojných zlomů pomocí NHEJ (non-homologous end joining) [35]. Jako důsledek reparací dvojných zlomů mohou vzniknout chromozomové aberace. I jejich vznik je možné pomocí PARTRACu sledovat [36].

Kapitola 2

Materiály a metody

Cílem této práce je zhodnotit vliv okolního prostředí na radiační výtěžky poškození plasmidu. V rámci této kapitoly bude představen worm-like chain model plasmidu, který bude použit k vygenerování konfigurací při různých koncentracích sodných iontů a teplotě prostředí. Dále je v této kapitole popsán způsob hodnocení vlivu těchto dvou parametrů na konfiguraci plasmidu. Následujícím krokem procesu je zjemnění hrubé struktury plasmidu vygenerované pomocí worm-like chain modelu, na atomární úroveň. V této kapitole bude popsán algoritmus, který bude k tomuto účelu použit.

Dále bude v této kapitole popsán vývoj aplikace v C++ pod GNU/Linux s Geant4-DNA knihovnamí a procesy v rámci Geant4, jejíž účelem je simulace radiačního poškození plasmidu. Z dat získaných pomocí této aplikace budou určeny výtěžky jednotlivých druhů radiačního poškození. Způsob jejich určení bude též popsán v této kapitole.

2.1 Vygenerování hrubé struktury plasmidu

V rámci své diplomové práce jsem jako jeden z cílů stanovila vytvořit knihovnu časových vývoje prostorové konfigurace plasmidu pomocí worm-like chain modelu. Simulace časových vývoje budou probíhat s různými podmínkami okolního prostředí, tudíž bude možné posoudit jejich vliv na chování plasmidu.

V rámci této kapitoly se zaměřím na volbu podmínek okolního prostředí použitých pro simulaci konformace plasmidu a popis vstupů a výstupu simulace.

2.1.1 Volba parametrů okolního prostředí

Konfigurace plasmidové molekuly je ovlivněna zejména dvěma parametry prostředí: teplotou roztoku, ve kterém se molekula nachází, a jeho iontovou silou [37, s. 45–48]. Vzhledem k možnostem volby parametrů u použitého worm-like chain modelu nebude dále uvažován obecně vliv iontové síly roztoku, ale vliv koncentrace sodných iontů.

Teplota prostředí

Rostoucí teplota okolního prostředí způsobí zvýšený termální pohyb atomů, který způsobí rozplétání dvoušroubovice DNA [37, s. 45–48].

V rámci své diplomové práce chci získat výsledky simulace poškození plasmidu ionizujícím zářením, které bude možné porovnat jak s poškozením kultivovaných buněčných nebo tkáňových kultur, tak i s výsledky získanými ozařováním subbuněčných modelů, jako je plasmid. Za standardní teplotu pro kultivace buněčných a tkáňových kultur se považuje teplota 37 °C [37, s. 32]. Pro druhou situaci, například plasmid, je typická teplota okolního prostředí 20 °C.

Na základě těchto skutečností byly simulace prováděny při obou výše zmíněných teplotách, tedy 20 a 37 °C.

Koncentrace sodných iontů

Zvyšující se koncentrace sodných kationtů snižuje vliv záporně nabitě fosfátové kostry na tvar dvoušroubovice. Důsledkem tohoto jevu je její sbalení [37, s. 45–48].

Za standardní okolní podmínky pro B–DNA je považována koncentrace sodných iontů 0,2 M [37, s. 32]. Autoři zabývající se simulacemi konformací plasmidu pracují i s nižšími koncentracemi sodných iontů, např. [1], [38]. Nejnižší uvažovanou koncentrací bývá 0,01 M. V savčích buňkách dosahuje koncentrace sodných iontů 10 mM a v krevní plasmě se pohybuje mezi 100 mM a 200 mM [39, s. 127–130].

Aby byly výsledky diplomové práce porovnatelné jak s experimenty a simulacemi probíhajícími při standardní koncentraci sodných iontů, tak při ostatních nestandardních koncentracích, probíhaly simulace při koncentracích Na^+ v rozmezí 0,01 M a 0,2 M s krokem 0,01 M.

2.1.2 Použitý worm-like chain model

Worm-like chain model zjednodušuje molekulu na soustavu elasticky propojených segmentů. Elastické spojení segmentů umožňuje jejich pohyb. Během pohybu mají určité části struktury tendenci zachovávat si svou orientaci. Délka úseku, na kterém se tak děje se nazývá *persistence length*. Jeho hodnota se volí 50 nm, což je hodnota typická pro B–DNA [40].

Pro vygenerování knihovny časových vývoje budu používat worm-like chain model, který byl představen pracovní skupinou prof. Vologodského v článku [1]. Na ODZ ÚJF AV ČR je kód se souhlasem prof. Vologodského používán. S jeho výstupy pracuje již má bakalářská práce [2], ve které byl vyvinut nástroj, který umožňuje vygenerovanou strukturu zjemnit a vytvořit atomární model plasmidu.

Charakterizace simulovaného plasmidu, tj. jeho délka a dělení na segmenty, a prostředí, ve kterém se má plasmid v průběhu simulace nacházet, je popsána vstupním souborem `Input_data`. Výstupy simulace jsou zapisovány do souborů s předponou `fort`, různé výstupní proudy jsou identifikovány číslem.

Vstupní soubor modelu

Vstupní soubor je určen k charakterizaci plasmidu a prostředí, ve kterém má být simulace prováděna. Prostředí charakterizujeme pomocí jeho teploty a koncentrace sodných kationtů.

Ve Výpisu 2.1 je uveden příklad vstupního souboru použitého v této práci. Na následujících řádcích budou popsány parametry podstatné pro účely této práce. Ostatní jsou blíže popsány v rozšířené verzi vstupního souboru, který je možné případným zájemcům poskytnout.

Výpis 2.1: Ukázka vstupního souboru. Textová část pojmenovává jednotlivé parametry.

```
143 5
1 0 1000000 500.0
1 1 0 1
1 2 10

2091982691 902166748
293.0 80.0 1.0 10 100.0 3.0 10.5
10 4.806 0.224 0.09 56.6 -0.06
2 0.20 0.05

1 10 1 1000 1 100 -3 1 0

1. SIZE: n nc
2. TRAJECTORY: initial nbegin nfinal dtime
3. SHAPE: icircular iclose iknot iele
4. ALGORITHM: ihydro ibd nupdate

5. RANDOM SEEDS: rand1 rand2
6. CONSTANT: temp d visco statbl ss1 cg phi0
7. PARAMETERS: subseg bendc beadr concen charge superdensity
8. EXCLUDED VOLUME: interval ddna drmin

9. OUTPUT: np108 , n108 , np129 , n129 , npbranch , nbranch , np600 , neuler , njuxta
```

Prvním významným parametrem je parametr n uvedený na prvním řádku. Tento parametr udává počet bodů, které popisují plasmid. V této ukázce se jedná o plasmid pBR322. V Tab. 2.1 je uveden počet bazických párů použitých plasmidů a počet bodů, které jej charakterizují. Oba použité plasmidy jsou v radiobiologických experimentech hojně používané modely jaderné DNA. Počet bodů, který použitý k charakterizaci struktury, je vypočten jako poměr délky plasmidu a požadované vzdálenosti mezi dvěma sousedními doby. Tato vzdálenost je určena jako násobek dvojnásobku *persistence length*, Kuhnovy statistické jednotky [41]. Délka Kuhnovy statistické jednotky je ve vstupním souboru zapsána na šestém řádku jako parametr `statbl`, počet segmentů, které dohromady složí úsečku o délce jedné Kuhnovy jednotky, je zadán na sedmém řádku jako parametr `subseg`.

Tab. 2.1: Počet bazických párů plasmidu a počet bodů charakterizující plasmid během simulace.

	pUC19	pBR322
počet bazických párů	2686	4361
počet bodů simulované struktury	91	143

Parametry `nfinal` a `dtime` uvedené na druhém řádku jsou použity k definici počtu kroků simulace a časového kroku mezi kroky simulace udaného v ps. V tomto případě a i v ostatních simulacích provedených v rámci této práce je zvoleno 10^6 kroků s časovým rozestupem 500 ps.

Parametry sloužící k charakterizaci okolního prostředí jsou teplota a koncentrace sodných iontů. Ty jsou do simulace zadávány jako parametry `temp` na šestém řádku a `concen` na řádku sedmém. Teplota je uvedena v K a koncentrace sodných kationtů v M. V této ukázce je teplota 293 K a koncentrace sodných iontů 0,09 M.

V posledním řádku jsou uvedeny pokyny pro zápis do jednotlivých výstupních souborů a frekvence tohoto zápisu. Klíčové výstupní proudy jsou blíže popsány v následující kapitole.

Výstupy simulace

Pro další práci s vygenerovanými hrubými strukturami, hodnocení jejich chování v závislosti na měnících se parametrech a jejich zjemňování, jsou podstatné následující výstupy simulace.

- `fort.108` – v tomto výstupu jsou zaznamenány hodnoty velikostí topologických veličin writhe a twist, které budou použity pro hodnocení chování struktury pod vlivem měnících se parametrů prostředí. Jejich význam je popsán v kapitole 2.1.4.
- `fort.129` – z tohoto výstupu je možné získat souřadnice všech bodů jednotlivých konfigurací. Ty jsou poté použity jak k hodnocení chování struktury, tak samozřejmě ke zjemňování struktury.
- `fort.139` – tento výstup obsahuje polohy bodů v poslední konfiguraci. Je dále použit k hodnocení unikátnosti časového vývoje hrubé struktury.
- `fort.787` – do toho výstupu se zapisují hodnoty energie ohybu struktury a její torzní energie. Jejich význam je popsán v kapitole 2.1.4. Hodnoty energií jsou poté použity k hodnocení chování struktury při měnících se parametrech prostředí.

V rámci vstupního souboru je možné měnit frekvence zápisu do jednotlivých výstupních souborů, viz předchozí kapitola.

2.1.3 Realizace simulace

Záměrem práce bylo vytvořit knihovnu časových průběhů pro dva plasmidy a kombinace teploty prostředí a koncentrace sodných iontů popsaných v kapitole 2.1.1. Pro tvorbu knihovny bylo provedeno sto výpočtů pro každý plasmid a kombinaci teploty prostředí a koncentrace sodných kationtů.

Aby prováděné výpočty byly nezávislé, je nutné každé z úloh přiřadit unikátní seed, v tomto případě dvojici náhodných čísel. Toho bylo docíleno tak, že byl pomocí generátoru náhodných čísel `/dev/random`, který je považován za opravdu náhodný

generátor a pro generování čísel využívá termálního šumu procesu, vygenerován soubor obsahující náhodná čísla pro více úloh, v našem případě pro úlohy pro jeden plasmid se stejnou teplotou a koncentrací sodných iontů. V tomto souboru byla provedena i kontrola unikátnosti vygenerovaných seedů. Z něj byla náhodná čísla poté přepsána do vstupního souboru. A byla provedena simulace časových vývoje konformace plasmidu.

Po provedení všech výpočtů byla provedena kontrola unikátnosti vygenerovaných průběhů. Jako unikátní byl hodnocen takový časový průběh, jehož poslední konfigurace nebyla shodná s žádnou z ostatních, které byly vygenerovány při stejných podmínkách prostředí. Pro porovnání konformací byl pro každou z nich vygenerován pomocí funkce `hash` řetězec znaků, tzv. otisk. Otisky dvou rozdílných souborů mohou být shodné, ale pravděpodobnost toho, že se tak snad je zanedbatelná. Z tohoto důvodu se výstup funkce `hash` hodí k porovnání shody nebo neshody dvou souborů [42]. Pokud budou mít soubory obsahující poslední konformaci stejný otisk, bude pro další postup použit pouze jeden ze simulovaných časových průběhů.

2.1.4 Vyhodnocení vlastností vygenerovaných struktur

Při volbě veličin, které budou použity na vyhodnocení vlivu teploty a koncentrace sodných iontů jsem zohledňovala, jestli byla veličina již někdy pro tyto účely použita a zda je možné získat její hodnotu z výstupů simulace. Na základě rešerše a studia výstupů simulace bylo rozhodnuto, že pro hodnocení chování molekuly budou použity čtyři níže popsané veličiny.

Pro srovnání chování plasmidů při různých teplotách a koncentracích sodných iontů v roztoku nebudu používat průběh veličiny v závislosti na čase simulace, ale její průměrnou hodnotu po smotání struktury do nadšroubovicové konformace (dále „po smotání“).

Poloměr koule opsané

Poloměr koule opsané mnohoúhelníku, který reprezentuje plasmid, je veličina, která umožňuje hodnotit, jaký vliv mají podmínky prostředí na smotávání dvoušroubovice DNA.

Vstupní data pro určení této veličiny byla získána z výstupu `fort.129`. Tento výstup byl pomocí skriptu Ing. Václava Štěpána, Ph.D. upraven tak, aby souřadnice bodů mnohoúhelníku pro každou zaznamenanou konfiguraci byly zapsány v samostatném souboru. Poloměr koule opsané danému mnohoúhelníku byl poté určen pomocí Welzlova algoritmu [43]. K získání výsledků byla použita volně dostupná implementace tohoto algoritmu od Antona Semechka [44].

Elastická energie

Elastická energie mnohoúhelníku reprezentující konfiguraci plasmidu charakterizuje míru ohýbání struktury a její torzní tuhost. Tato veličina byla použita k hodnocení chování struktury v [3] a [45].

Tuto veličinu, často označovanou jako E_e , lze spočítat součet energie ohybu, E_b , a torzní energie, E_t . Energie pohybu je určena pomocí vzorce

$$E_b = \frac{g}{2} \sum_{i=1}^N \theta_i, \quad (2.1)$$

kde g je ohybová konstanta, N počet stran mnohoúhelníku a θ_i je úhel mezi sousedními stranami mnohoúhelníku. Druhou z energií, torzní, definuje vzorec

$$E_t = \frac{C}{2l_0} \sum_{i=1}^N (\alpha_{i,i+1} + \gamma_{i,i+1} - \phi_0)^2, \quad (2.2)$$

kde C je konstanta torzní tuhosti, l_0 počáteční vzdálenost dvou sousedních bodů mnohoúhelníku. Součet $\alpha_{i,i+1} + \gamma_{i,i+1}$ definuje tzv. torzní úhel mezi dvěma sousedními body a ϕ_0 je rovnovážné zakroucené strany i , definované body i a $i + 1$. Tyto pojmy jsou podrobněji vysvětleny v [1].

Writhe a twist

Writhe a twist jsou veličiny, které se používají k charakterizaci chování struktury z pohledu topologie, například v [45].

První zmíněná veličina, writhe, slouží ke kvantifikaci počtu a orientace křížení dvoušroubovice DNA v prostoru. Pomocí veličiny twist lze určit kolikrát a jakým směrem, po nebo proti směru hodinových ručiček, se dvoušroubovice otočí kolem své centrální osy. Podrobněji jsou tyto veličiny popsány v [46, s. 49–54].

2.2 Automatizace zjemňování hrubé struktury

Vygenerovaná hrubá struktura byla zjemňována pomocí zjemňovacích skriptů, který byl vyvinut v rámci bakalářské práce [2]. Vyvinuté skripty byly založeny na popisu zjemňovacího procesu v [3].

Vstupními daty pro zjemňovací proces jsou:

- hrubá struktura konfigurace
- sekvence bazických párů plasmidu
- PDB soubory bazických párů
- počet iterací zjemňujícího procesu
- hodnoty kontrolních parametrů

Samotný proces zjemňování začíná iterativními zjemňování celé struktury s předem zadaným počtem iterací. Její průběh je podrobně popsán v [2] a v rámci procesu je realizována skriptem `puleni_py.m`. Po zjemnění je délka struktury upravena tak, aby její délka byla rovna $3,4 \cdot N$, kde N je počet bazických párů plasmidu,

kteřý struktura reprezentuje a 3,4 je vzdálenost dvou bazických párů v Å. Škálování délky struktury je realizováno skriptem `skalovani.m` Poté jsou na zjemněné a naškálované struktře určeny polohy bodů, které reprezentují polohy jednotlivých bazických párů. K tomuto účelu slouží skript `ekvidistant.m` Následně jsou zkontrolovány hodnoty kontrolních parametrů. Jejich hraniční hodnoty jsou uvedeny v Tab. 2.2. Pokud jsou hodnoty kontrolních parametrů vyhovující, je spuštěn skript `tr.m`, který je určen k vypočtení poloh všech atomů tvořící plasmidovou molekulu a jejich zápis do PDB souboru.

Tab. 2.2: Kontrolní parametry použité k hodnocení správnosti procesu zjemňování a jejich hraniční hodnoty.

kontrolní parametr	podmínka
vzdálenost mezi dvěma sousedními body reprezentující bazické páry	mezi 3,2 Å a 3,4 Å
velikost cosinu při vrcholu v bodě reprezentující bazický pár	alespoň 0,95
vzdálenost dvou nesousedních bodů reprezentujících bazický pár	větší než 20 Å, s výjimkou 6 nejbližších

Procesem zjemňování procházely oba dva druhy plasmidů. V Tab. 2.3 jsou uvedeny jejich charakteristiky a počet iterací, které struktura během zjemňování podstoupila.

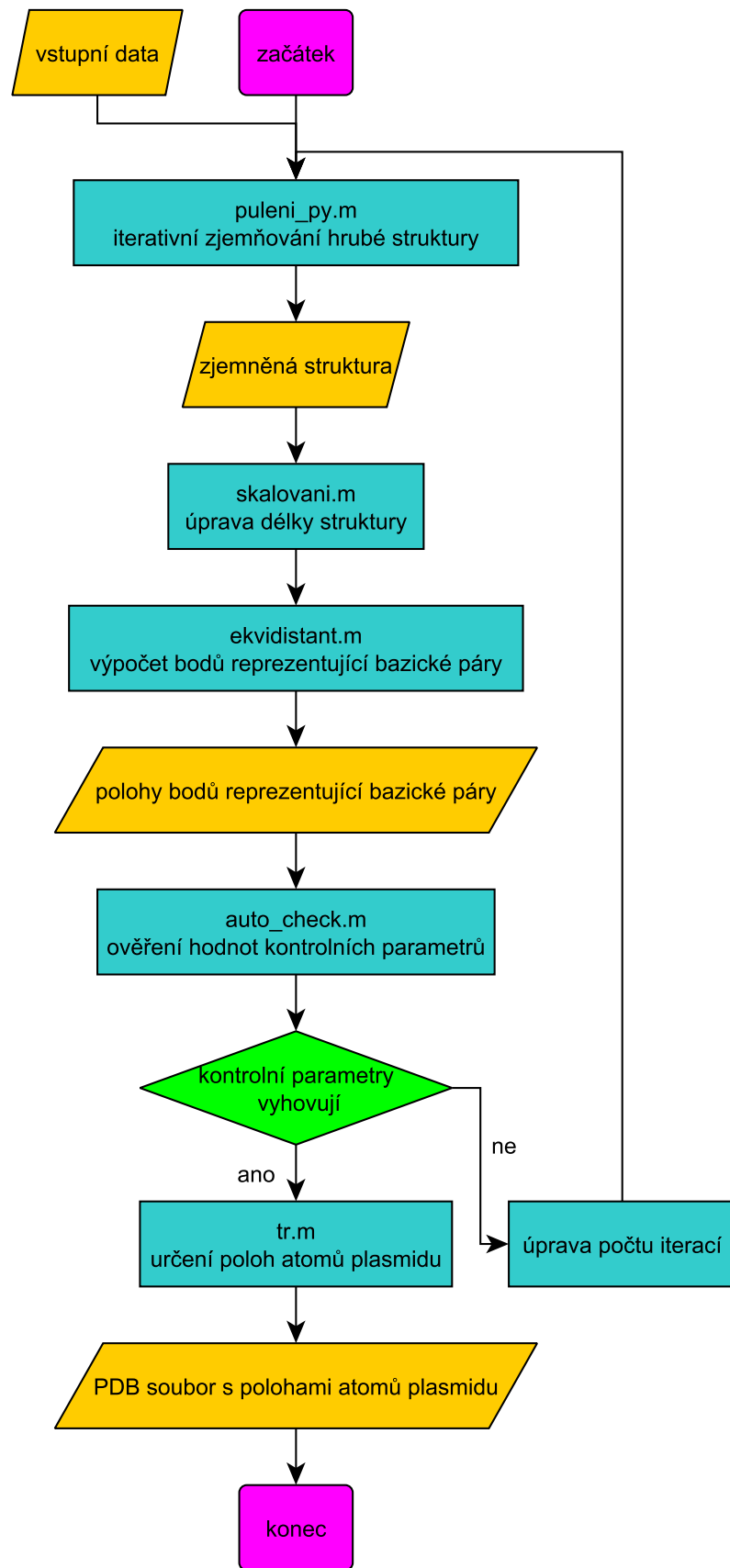
Tab. 2.3: Počet bazických párů tvořící zkoumané plasmidy [4], počet bodů hrubé struktury, která plasmid modeluje, a počet iterací zjemňujícího procesu.

	pUC19	pBR322
počet bazických párů	2686	4361
počet bodů hrubé struktury	91	143
počet iterací	7	8

V původní verzi algoritmů bylo v případě, že hodnoty kontrolních parametrů struktury nebyly vyhovující, nutné, aby uživatel změnil počet zvolených iterací a nechal celý proces proběhnout znovu. Tento přístup není vhodný ve chvíli, kdy je nutné vzhledem k množství zpracovávaných dat provádět zjemňování na gridech. Z tohoto důvodu muselo dojít k mírnému upravení celého procesu.

Pro účely automatického vyhodnocení hodnot kontrolních parametrů byl připraven skript `auto_check.m`. V případě nevyhovujících hodnot kontrolních parametrů je změněn počet iterací zjemňovacího procesu tak, že je počet iterací zjemňujícího procesu snížěn o jednu nebo dvě. Pokud ani tento postup nezajistí, že struktura vyhoví požadavkům na kontrolní hodnoty, je z procesu vyřazena. Až poté co, struktura splní požadované podmínky, je možné přejít k výpočtu poloh atomů a následnému zápisu do souboru.

Celý automatizovaný proces řídí funkce `auto_skript_pdb.m`, vstupními daty pro tuto funkci je počet iterací zjemňování a sekvence bazických párů zjemňovaného plasmidu. Vývojový diagram řídící funkce je na Obr. 2.1.



Obr. 2.1: Vývojový diagram řídicí funkce `auto_skript_pdb.m`, který řídí automatizovaný proces zjemňování [2, upraveno].

2.3 Aplikace pro simulaci radiačního poškození

Simulace radiačního poškození plasmidu bude prováděna pomocí Geant4–DNA knihoven a procesů. Pro realizaci simulace je nutné vytvořit v C++ aplikaci, která simulaci řídí. Tuto aplikaci si uživatel může celou vybudovat sám, nebo ji lze sestavit pomocí tříd popisující jednotlivé děje, které byly zveřejněny v rámci aplikací řešících ukázkové úlohy, které lze v instalační složce nalézt ve složce `examples`, která je součástí instalačního balíčku.

Pro sestavení simulace byly využity třídy z aplikací `pdb4dna`, `chem6` a `chem3`, které lze nalézt na adrese `examples/extended/medical/dna` v instalačním balíčku Geant4.

Načtení modelu plasmidu je popsáno ve třídě *DetectorConstruction* a bude popsáno v kapitole 2.3.1. Fyzikální a chemické procesy, které mají být simulovány, jsou definovány ve třídě *PhysicsList*. Zdroj primárních částic popisuje třída *PrimaryGeneratorAction*, podrobněji rozebrána v kapitole 2.3.2.

Průběh simulace je řízen pomocí třídy *RunAction*. Za sledování dráhy primární částice a všech fyzikálních interakcí a chemických reakcí, které částice přímo či nepřímo způsobí, je zodpovědná třída *EventAction*.

Třídy související se simulací fyzikální fáze účinků ionizujícího záření budou popsány v kapitole 2.3.3 a ty související s fází chemickou jsou v kapitole 2.3.4. Skórování poškození v těchto fázích bude popsáno v kapitole 2.3.2.

Změny v jednotlivých třídách je možné provádět dvěma způsoby. První z nich jsou změny v souborech, které slouží k realizaci aplikace. To však vyžaduje opětovnou kompilaci aplikace. Druhým je tvorba makra, které umožňuje provést změny určitých parametrů. pro přenos informací z makra do aplikace je nutné mít v rámci aplikace definovány třídy tzv. messengerů. V prezentované aplikaci jsou použity messengery *DetectorMessenger* a *EventActionMessenger*. Ukázka makra je uvedena ve Výpisu 2.2.

Výpis 2.2: Ukázka makra sloužícího pro zadání parametrů simulace

```
/tracking/verbose 0
/PDB4DNA/det/loadPDB pdb_500.pdb
/run/initialize
/PDB4DNA/det/setBoundingRadius 300 nm
/PDB4DNA/det/buildBoundingV
/random/setSeeds 2791 422
/gun/particle proton
/gun/energy 500 keV
/scheduler/endTime 100 ns
/run/beamOn 1000
```

2.3.1 Načtení modelu plasmidu

Za načtení geometrie simulace je zodpovědná třída *DetectorConstruction*. V ní vytvořen tzv. svět, ve kterém se veškeré simulované děje odehrávají. V této práci je to krychle s velikostí hrany 1 cm vyplněná vodou, jejichž střed je umístěn do střed souřadné soustavy.

Po definici světa je do v této třídě načtena struktura plasmidu z PDB souboru. Kromě třídy *DetectorConstruction* jsou k definici plasmidu použity třídy *PDBlib*, *PDBAtom*, *PDBResidue* a *PDBmolecule*.

Molekula plasmidu je z PDB souboru načtena nejprve po atomech. Každý z atomů je modelován jako koule, jejíž poloměr je roven van der Waalově poloměru. Z poloh atomů jsou vypočteny středy koulí, které modelují nukleotidy a tzv. residua. Jako residuum se v této aplikaci označuje báze, cukr a fosfátový zbytek. Tyto koule jsou konstruovány jako koule opsané modelům atomů, které jednotlivé organizační skupiny tvoří [13], [47].

V makru je možné nastavit, jaký soubor PDB bude do simulace načten a to pomocí příkazu `/PDB4DNA/det/loadPDB`.

2.3.2 Zdroj primárních částic

Ve třídě *PrimaryGeneratorAction* je definován zdroj primárních částic. Volba druhu a energie částic byla popsána v kapitole 2.4.2. Geometrie zdroje byla následující.

Okolo středu souřadné soustavy byla vytvořena kulová plocha. Objem uvnitř této plochy je v kódu nazýván *Bounding Volume*. Poloměr kulové plochy lze určit v této třídě nebo je možné jej zadat pomocí makra a to příkazem `/PDB4DNA/det/setBoundingRadius`. Na kulové ploše byl náhodně zvolen bod $(x_1 \ y_1 \ z_1)$, ze kterého částice vylétala. Poté byl v této kouli zvolen další bod $(x_2 \ y_2 \ z_2)$, do kterého by měla primární částice mířit. Body $(x_1 \ y_1 \ z_1)$ a $(x_2 \ y_2 \ z_2)$ jsou určeny následujícími algoritmy:

$$\begin{aligned}x_1 &= x_0 + R \sin \theta \cos \varphi \\y_1 &= y_0 + R \sin \theta \sin \varphi \\z_1 &= y_0 + R \cos \varphi, \\x_2 &= x_0 + R \cdot rand \\y_2 &= y_0 + R \cdot rand \\z_2 &= z_0 + R \cdot rand,\end{aligned}$$

kde bod $(x_0 \ y_0 \ z_0)$ je střed *BoundingVolume* a R jeho poloměr, *rand* je náhodné číslo mezi 0 a 1 určené pomocí generátoru náhodných čísel `G4UniformRand()`. Náhodnost volby prvního bodu je dána volbou úhlů θ a φ a to následujícím způsobem:

$$\begin{aligned}\cos \theta &= 2 * rand - 1 \\ \sin \theta &= \sqrt{1 - \cos^2 \theta} \\ \varphi &= 2\pi \cdot rand\end{aligned}$$

Vektor definovaný body $(x_1 \ y_1 \ z_1)$ a $(x_2 \ y_2 \ z_2)$ určuje směr částice z výchozího bodu. Po získání těchto informací je primární částice „vystřelena“.

Energii, druh a počet simulovaných primárních částic lze nastavit v této třídě také, pohodlnější je však zadání těchto příkazů skrz makro. Druh částice se zadává po příkazu `/gun/particle` a její energie `/gun/energy`. Pro zadání počtu částic je potřeba použít příkaz `/run/beamOn`.

2.3.3 Fyzikální fáze

Fyzikální interakce, které částice ionizujícího záření během fyzikální fáze, jsou definovány ve třídě *PhysicsList*. V této práci byl použit konstruktor `G4EmDNAPhysics_option2`, blíže popsáný v [21].

Jednotlivé kroky částice ovládá třída *SteppingAction*. V ní je také definován první krok skórování přímého poškození molekuly, které je popsáno v 2.3.5. Ke sledování dráhy primární částice a depozice její energie je určena třída *TrackingAction*.

Pokud se částice vzdálí od středu o určitou vzdálenost, je její simulace ukončena. Tato vzdálenost je zvolena 500 nm. Pokud je však poloměr kulové plochy pro „výstřel“ částice větší, je tato vzdálenost zvětšena na vzdálenost o 1 nm než poloměr kulové plochy. Tento postup byl zvolen kvůli zvýšení efektivity výpočtu. Toto rozhodování probíhalo ve třídě *SteppingAction*.

2.3.4 Chemická fáze

Po dokončení simulace dráhy primárních částic a jí produkovaných sekundárních částic je inicializována simulace fáze chemické. Za inicializaci je zodpovědná třída *StackingAction*, jež získává informace o dráze částic ze třídy *TrackingAction*.

Chemické reakce, které během simulace probíhají, a způsob simulace pohybu chemických produktů je definován ve třídě *PhysicsList* pomocí konstruktoru `G4EmDNAChemistry_option1`. Simulované chemické produkty a reakce je možné nalézt v git repozitáři konstruktoru [48]. Tento konstruktor modeluje pohyb chemických produktů metodou `step-by-step`, popsáné v kapitole 1.1.2.

Kroky chemického produktu jsou sledovány třídou *ITSteppingAction*. Délka časového kroku produktu je určována pomocí podmínek uvedených ve třídě *TimeStepAction*. S prodlužující se dobou od vzniku produktu se časový krok prodlužuje. Dráha chemického produktu je sledována pomocí třídy *ITTrackingAction* [49].

Pomocí třídy *G4Scheduler* uživatel aplikace definuje dobu od fyzikální interakce, po kterou jsou chemické produkty sledovány. Tu lze nastavit buď v aplikaci nebo v makru příkazem `/scheduler/endTime`.

Ve třídě *ITTrackingInteractivity* je definován první krok nepřímého poškození molekuly plasmidu. Tento proces je popsán v kapitole 2.3.5.

2.3.5 Skórování poškození plasmidu

V aplikaci byla zaznamenána přímá i nepřímá poškození plasmidu, která vedla ke vzniku zlomu vlákna. Princip vzniku těchto poškození je rozdílný a byl popsán

v bakalářské práci [2]. Z tohoto důvodu musí být odlišná i implementace skórování těchto poškození.

Přímé poškození vlákna

Pro skórování tohoto poškození bylo využito již existující řešení z aplikace `pdb4dna`. Rozhodnutí o tom, zda došlo k poškození probíhat, se odehrává na více úrovních.

Jako první se při každém kroku částice ve třídě `SteppingAction` rozhoduje, jestli se na jeho konci částice nachází v tzv. `Bounding Volume`. `Bounding Volume` může být nejmenší koule, do kterého je možné umístit plasmid. Jeho rozměry jsou spočteny ve třídě `PrimaryGeneratorAction`, nebo je jeho velikost zadána v makru pomocí příkazu `/PDB4DNA/det/setBoundingRadius`. Pokud se částice v tomto objemu nachází, je ve třídě `PDBlib` spuštěn algoritmus, který má za úkol nalézt atom, který je částici nejbližší a zároveň je jí zasažen. Zasažení je v tomto algoritmu definované tak, že je částice ke středu atomu blíže než je jeho van der Waalsův poloměr.

Prvním krokem algoritmu je vyhodnocení polohy částice vůči nukleotidu. Pokud se částice nachází v objemu definující nukleotid, algoritmus pokračuje v hledání atomu, který je částici zasažen a zároveň je jí nejbližší. Kvůli překryvům koulí s van der Waalsovými poloměry jednotlivých atomu kontroluje algoritmus kromě atomů v daném nukleotidu i atomu v nukleotidu sousedním. Pokud je nalezen zasažený atom z cukr-fosfátové kostry a zároveň je depozice energie u tohoto atomu větší než 8,22 eV, je tato událost zaznamenána jako zlom vlákna u daného nukleotidu [13]. Tuto energii je možné modifikovat pomocí makra a to příkazem `/PDB4DNA/event/setEnergyThres`.

Schéma vyhodnocení a jeho podrobnější popis je možné nalézt v [13].

Nepřímé poškození vlákna

Nepřímé poškození vlákna molekuly DNA vzniká při reakci $\text{OH}\cdot$ radikálu s cukrem (2-deoxyribózou). Tato reakce může nastat pouze ve chvíli, kdy se $\text{OH}\cdot$ dostane do reakčního radiu pro reakci $\text{OH}\cdot$ s 2-deoxyribózou a pouze ve 40% případech vede ke vzniku zlomu. Kromě reakce $\text{OH}\cdot$ s cukrem je nutné v skórování definovat i reakce s bázemi [16], [27].

Samotný proces skórování začíná ve třídě `ITTrackingInteractivity`, se podobně jako při skórování nepřímého poškození sleduje, zda se $\text{OH}\cdot$ radikál nachází v `Bounding Volume`. Pokud ano, spouští se algoritmus ve třídě `PDBlib`, který má za úkol provést samotnou reakci.

Reakce $\text{OH}\cdot$ s jednotlivými částmi molekuly byla simulována ve chvíli, kdy se radikál přiblížil do vzdálenosti menší než je reakční poloměr pro danou vzdálenost. Ta byla spočtena pomocí vzorce

$$r_{\text{OH}\cdot, \text{DNA}} = \frac{k}{4\pi N_A D_{\text{OH}\cdot}}, \quad (2.3)$$

kde N_A je Avogadrova konstanta. Hodnota difúzního koeficientu pro $\text{OH}\cdot$ $D_{\text{OH}\cdot}$ byla převzata z Tab. 1.1 a jednotlivé části DNA byly považovány za nehybné, tudíž

byl jejich difúzní koeficient D_{DNA} položen 0. Hodnoty reakčních rychlostí k byly převzaty z Tab. 1.2. Hodnoty reakčních rychlostí pro jednotlivé báze jsou odlišné, pro účely této práce byla jako jednotná hodnota reakční reakce pro reakci báze s $\text{OH}\cdot$ brána jako průměr těchto hodnot. Použité hodnoty reakčních rychlostí a vypočtená velikost reakčního poloměru je uvedena v Tab. 2.4.

Tab. 2.4: Hodnoty reakčních rychlostí z [16] a z vypočtené velikosti reakčních poloměrů.

reakce $\text{OH}\cdot$ s	k [$10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	$r_{\text{OH}\cdot, DNA}$ [\AA]
2-deoxyribóza	2,5	1,2
báze	6,95	3,3

Za zasaženou strukturu je považována ta, jejíž střed je blíže středu $\text{OH}\cdot$. V případě, že vzdálenosti existují dvě struktury se stejnou vzdáleností od středu $\text{OH}\cdot$, je uvažována 50% pravděpodobnost zasažení jedné za struktur. Rozhodnutí je učiněno za pomoci generátoru náhodných čísel `G4UniformRand()`. Pokud dojde k reakci s cukrem nebo bází, dochází k zániku radikálu. V případě, že reakce probíhá na cukru, je za pomoci generátoru náhodných čísel `G4UniformRand()` určeno, zda tato reakce vedla ke vzniku zlomu, či nikoliv.

2.4 Volba parametrů simulace radiačního poškození

Před provedením simulace bylo nutné zvolit množství vygenerovaných atomárních struktur plasmidů, které bude během simulací ozařováno, jelikož nebylo možné vzhledem k velkému objemu dat nebylo možné simulovat ozáření všech. Dále bylo nutné zvolit typ a energii primárních částic a další uzpůsobení některých parametrů aplikace pro Geant4–DNA těmto charakteristikám.

2.4.1 Druh a struktura plasmidu

Pro účely simulace bude použit model atomární model plasmidů pUC19 a pBR322. Při simulaci radiačního poškození plasmidu fotonovým zářením bylo použito 70 konformací každého z plasmidů v nadšroubovicové formě simulované při teplotě 20°C a koncentraci sodných iontů 10 mM. Pro simulaci radiačního poškození způsobeného protony bylo použito po 10 konformacích plasmidu v nadšroubovicové formě a to vygenerovaných při teplotě 20°C a koncentraci sodných iontů 10 mM nebo 200 mM.

2.4.2 Zdroj ionizujícího záření

V rámci této práce bylo simulováno radiační poškození způsobené dvěma druhy částic: fotony a protony.

Prvním parametrem, který bude zvolen na základě druhu primární částice je poloměr `Bounding Volume`, blíže popsán v kapitole 2.3.2. Jeho poloměr bude způsoben hustotě stopy částice. Pro hustě ionizující proton byl tento poloměr zvolen

tak, aby byl co nejlíže plasmidu. Zároveň byla zvolena velikost poloměru tak, aby nebylo nutné poloměr měnit při použití jiné konformace plasmidu. Konkrétně byl zvolen poloměr 300 nm. V případě fotonů, jejichž hustota ionizace je nižší v porovnání s protony, byl poloměr zvolen větší. Konkrétně byl zvolen poloměr 500 nm.

Druh a energie primárních částic

Pro simulaci radiačního poškození od protonového záření bylo použito širší spektrum energií tak, aby byla pokryta oblast Braggova píku a oblast za ním. Do oblasti rozšířeného Braggova píku, která vzniká složením několika Braggových píků od protonů různých energií, se v protonové terapii umísťuje PTV, jelikož lze protony deponují většinu své energie [50]. Použité energie a jejich hodnoty LET jsou uvedeny v Tab. 2.5.

Tab. 2.5: Energie a LET ve vodě simulovaných primárních protonů [51].

energie [keV]	50	100	250	500	1000	5000	10000
LET [keV/ μm]	77,68	81,61	60,06	41,32	26,08	7,91	4,56

Energie fotonového záření byla zvolena 1,25 MeV. Jedná se o střední energii fotonů emitovaných izotopem ^{60}Co . Tento izotop je používán jako zdroj externího ozáření v radioterapii, dnes především u Leksellova gama nože [52], [53]. V radiobiologii je toto záření používáno jako referenční při určování hodnoty RBE (relativní biologická účinnost) [54, s. 14].

Počet simulovaných primárních částic

Při volbě počtu protonů bylo prvním cílem nalézt prvním počet částic, který by v **Bounding Volume** deponoval tolik energie, aby měrná energie odpovídala 2 Gy. V makroskopickém měřítku odpovídají 2 Gy dávce, kterou při normofrakcionaci obdrží PTV v průběhu jedné frakce. Pro odhad tohoto počtu primárních protonů byl použit vzorec pro výpočet absorbované dávky

$$D = \Phi S_m, \quad (2.4)$$

kde S_m je měrná brzdná schopnost protonu určená z [51] a Φ je fluence primárních částic. Odhadnuté počty primárních částic jsou uvedeny v Tab. 2.6. Z té je zřejmé, že k depozici požadované energie není nutné použít více než jednu částici. V práci bylo tím pádem hodnoceno poškození způsobené jedním protonem. Pro každou z konfigurací bylo simulováno 2000 historií primární částice.

Tab. 2.6: Energie primárních protonů, odhadnutý počet protonů, který deponuje měřenou energii 2 Gy v závislosti na energii protonu. Výpočty byly provedeny pomocí vzorce (2.4).

energie [keV]	50	100	250	500	1000	5000	10000
počet částic na $z = 2\text{ Gy}$	0,045	0,043	0,058	0,085	0,135	0,445	0,771

Pro fotony byl k odhadu dávky použit vzorec

$$D = \Phi E \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right), \quad (2.5)$$

kde Φ je již zmiňovaná fluence částic, E je energie primární částic a $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)$ je hmotnostní součinitel absorpce energie, jeho hodnota byla získána v [55]. Pomocí toho vzorce bylo odhadnuto, že k depozici požadované dávky je zapotřebí simulovat $2,65 \cdot 10^3$ částic. U tohoto výsledku je nutné zohlednit fakt, že výše popsany vzorec platí při nastolení elektronové rovnováhy, ta však na tomto objemu nenastává a deponovaná energie bude při tomto počtu částic menší. Dále bylo při rozhodování o počtu primárních částic nutné zohlednit i zeslabení proudu fotonů ve sledovaném objemu, které je popsáno pomocí lineárního součinitele zeslabení. Při jeho zohlednění v kombinaci s velikostí objemu bylo rozhodnuto, že bude simulováno 10^9 částic. Celkově bylo provedeno 140 běhů simulace pro každý plasmid, dva pro každou konfiguraci.

Zvolené parametry simulací jsou shrnuty v Tab 2.7.

Tab. 2.7: Energie, poloměr **Bounding Volume**, počet simulovaných primárních částic v jednom běhu a počet simulovaných běhů použitých pro výpočet výtěžků.

primární částice	proton	foton
energie	viz Tab. 2.5	1,25 MeV
poloměr Bounding Volume [nm]	300	500
počet částic v běhu	1	10^9
počet běhů	20000	140

2.5 Vliv parametrů okolního prostředí na radiační poškození

Vliv parametrů okolního prostředí na prostorovou konfiguraci plasmidu byl zohledněn ve volbě prostorové konfigurace, jejíž ozáření bude simulováno. Proto nebude v této kapitole diskutován.

K simulacím radiačního poškození byly použity Geant4–DNA knihovny a procesy. Ty umožňují provádět simulace fyzikální fáze radiačního poškození pouze v čisté vodě [21]. Při simulaci fáze fyzikálně-chemické a chemické je možné definovat reakce sodných iontů s produkty radiolýzy vody a DNA [56]. Tento přístup nebyl v této práci použit.

Kromě prostorového uspořádání plasmidu ale mohou okolní podmínky prostředí ovlivnit délku separační vzdálenosti, která určuje, zda se dva protilehlé jednoduché dvojně zlomy budou chovat separátně nebo dojde ke vzniku dvojněho zlomu [2]. Právě měnící se separační vzdálenost bude pro hodnocení vlivu okolního prostředí na radiační poškození plasmidu použita.

2.5.1 Teplota okolního prostředí

S rostoucí teplotou prostředí byl pozorován vzrůst vzdálenosti dvou jednoduchých zlomů tvořících zlom dvojný až k 102 ± 13 . Těchto hodnot však bylo dosaženo při teplotě 55°C . Naopak při teplotách nízkých (4°C) byla nutná vzdálenost pouze šest bazických párů. Při teplotě 25°C byla vzdálenost nejbližše běžně uvažovaným deseti bazickým párům, a to konkrétně bazických párů devět [7].

Podstatně větší vliv teploty na radiační poškození lze pozorovat u rychlosti reparace vzniklých poškození. S vyšší teplotou dochází ke zpomalení rychlosti reparace poškození, čehož v některých případech využívá v radioterapii [57], [58]. Tento faktor však v této práci nelze uvažovat.

2.5.2 Iontová síla roztoku

Klesající iontová síla roztoku způsobí zvětšení separační vzdálenosti. Při poklesu koncentrace k $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ vzroste separační vzdálenost na 34 bazických párů. Při vysokých iontových silách roztoku ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) naopak separační vzdálenost klesá ke třem bazickým párům [7].

2.5.3 Zohlednění okolního prostředí v simulaci

V této práci bude vliv iontové síly roztoku na radiační poškození zohledněn právě pomocí změny separační vzdálenosti. Vliv teploty prostředí bude pro tuto chvíli zanedbán, jelikož pozorované rozdíly při uvažovaných teplotách nejsou velké, a její vliv se projevuje spíše při rychlosti reparace.

V simulacích radiačního se běžně uvažuje separační vzdálenost deseti bazických párů [13]. Pro nižší hodnoty koncentrace iontů však může být relevantní i hodnota pěti bazických párů. Při vyšší iontových silách roztoku, které panují například v lidském těle, naopak velikost separační vzdálenosti roste až ke třiceti bazickým párům, které jsou považovány za horní hranici uvažovaných velikostí separační vzdálenosti [15].

Pro pokrytí celého spektra těchto situací budou v této práci uvažovány separační vzdálenosti mezi pěti a třiceti bazickými páry a to vždy s krokem pěti bazických párů.

2.6 Výstupy simulace

Pro vyhodnocení simulace byly v aplikaci implementovány procesy, které umožňují zapsat určité informace do výstupních souborů. Jejich význam je shrnut na následujících řádcích.

- `pos.txt` – tento výstup zaznamenává pozice a druh poškození jednotlivých nukleotidů. Jeho formát byl inspirován formátem navrženým Ing. Martinem Šeflem, Ph.D..

Ukázka části výstupního souboru je ve Výpisu 2.3. Každý z řádků je uvozen **S1:** nebo **S2:**, zda se jedná o zásah zaznamenaný na vláknu plasmidu 1 nebo 2. Další z čísel, na prvním řádku je jedná o **68**, je pořadové číslo nukleotidu, který byl poškozen. Druhé z čísel, v příkladu **0**, označuje, zda se jedná o přímé (**0**) nebo nepřímé (**1**) poškození. Každá z primárních částic generuje ve výstupním souboru dva řádky pro dvě vlákna plasmidu.

Výpis 2.3: Ukázka části výstupního souboru

```
S1: 1513 0
S2: 889 1
```

- **edep.txt** – do tohoto výstupního souboru se uvádí deponovaná energie v **Bounding Volume** v eV. Energie je zaznamenána pro každou z primárních částic zvlášť a dále bude použita pro výpočet dávky.
- **volume.txt** – v tomto výstupním souboru jsou uvedeny informace o pozici a velikosti **Bounding Volume**, které budou dále použity k tvorbě finálního výstupního souboru.

Z výstupních souborů jsou data zpracována tak, aby byly určeny výtěžky jednotlivých poškození a bylo možné vytvořit finální výstupní soubor ve formátu SDD (Standard DNA Damage). Celý proces je popsán v následujících kapitolách.

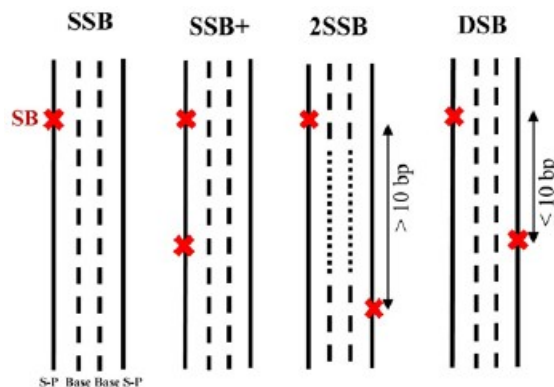
2.6.1 Sledovaná poškození

Po simulaci radiačního poškození byly sledovány následující poškození:

- jednoduchý zlom (SSB) – vzniká přerušением vazby na cukr–fosfátové kostře jednoho z vláken.
- násobný jednoduchý zlom (SSB+) – o tomto poškození mluvíme ve chvíli, kdy na jednom z vláken vzniknou dva jednoduché zlomy ve vzdálenosti menší než je separační vzdálenost.
- dvojný zlom (DSB) – pokud je na každém z obou vláken jednoduchý zlom a zároveň jsou tyto zlomy od sebe ne dále než je separační vzdálenost, mluvíme o dvojném zlomu.
- komplexní poškození – ve chvíli, kdy se na separační vzdálenosti objevují tři a více jednoduché zlomy, označujeme toto poškození za komplexní.

Jak se velikost separační vzdálenosti mění v závislosti na okolních podmínkách, bylo popsáno v kapitole 2.5 [59, s. 121–139], [60]. Na Obr. 2.2 jsou vyobrazena SSB, SSB+ a DSB. V rámci mé diplomové práce nebyla studována poškození bází.

Reakce buněk na tato poškození byla popsána v mé bakalářské práci [2]. Reakce plasmidu na tato poškození budou popsána v následující kapitole.



Obr. 2.2: Jednoduchý zlom, násobný jednoduchý zlom, dva jednoduché zlomy a dvojný zlom s uvážením separační vzdálenosti deset bazických párů [61, upraveno].

2.6.2 Výtěžky radiačního poškození plasmidu

Tato veličina popisuje počet poškození, které vzniknout, normované na měrnou energii a počet bazických párů studované molekuly DNA, běžně uváděné v jednotce Mbp (milion bazických párů).

Měrná energie je určena jako podíl absorbované energie v `Bounding Volume` a jeho hmotnosti. Absorbovaná energie byla získána z výstupního souboru `edep.txt`. Hmotnost `Bounding Volume` byla vypočtena z jeho rozměrů, uvedeny jsou v Tab. 2.7. Hmotnost plasmidu samotného byla při výpočtu zanedbána z důvodu velmi malé hmotnosti v porovnání s `Bounding Volume`.

Hodnoty výtěžků budou uváděné jako průměry ze všech běhů. Výběrová střední chyba průměru s_x bude určena pomocí vzorce

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}, \quad (2.6)$$

Výše definované výtěžky radiačního poškození jsou běžně používanou veličinou pro prezentování výsledků simulací radiačního poškození, ukázky je možné nalézt v [16] a [13]. Výsledky z experimentálních měření lze také zpracovat tak, abychom hodnoty této veličiny získali, viz [62].

Pro porovnání dat získaných v rámci této práce budou použita data z experimentálního ozařování plasmidů protony nebo fotony. Budou uvažovány i experimenty, jejichž autoři používali i různé vychytávače $\text{OH}\cdot$ radikálů. Obecně je účinnost vychytávačů popsána pomocí veličiny scavenging capacity, v tomto textu se bude vztahovat pouze k vychytávačům $\text{OH}\cdot$. Výtěžky jednoduchých zlomů uvažovaných experimentů jsou uvedeny spolu se svými charakteristikami v Tab. 2.8.

Aby bylo možné výsledky porovnat s výsledky simulací je nutné výsledky z experimentů upravit výtěžky tak, aby odpovídaly koncentraci plasmidů v simulaci. Tyto koncentrace jsou uvedeny v Tab. 2.9. Pro přepočítání na tyto koncentrace bude využito toho, že výtěžky radiačního poškození jsou přímo úměrné koncentraci plasmidů. Přepočtené hodnoty jsou uvedeny spolu s původními v Tab. 2.8.

Tab. 2.8: Přehled výtěžků jednoduchých zlomů získaných při experimentech s plasmidy při ozáření vzorků protony nebo fotony. Výtěžky jsou uváděny v jednotce [1/Gy/Mbp], jednotka není z důvodu velikosti tabulky uvedena přímo v ní, pokud je obsah tabulky proškrtnut (-) není daná informace v článku uvedena. Přepočtené výtěžky jsou původní výsledky převedeny na koncentraci plasmidů používanou během simulací, viz Tab. 2.9, pomocí metody popsané v textu.

autor	plasmid	scavenging capacity [s ⁻¹]	částice	energie [MeV]	koncentrace plasmidu [ng/μl]	výtěžek původní	výtěžek přepočtený
[63]	pUC19	2,1·10 ⁵	proton	30	10	17,90	45,88
		10 ⁷				3,29	8,43
		10 ⁸				0,59	1,51
	pBR322	2,1·10 ⁵				13,90	57,84
		10 ⁷				3,70	15,40
		10 ⁸				0,50	2,08
[64]	pBR322	1,5·10 ³	proton	30	10	113,76	473,36
		1,36·10 ⁷				24,79	103,15
		1,36·10 ⁸				9,17	38,16
		1,36·10 ⁹				1,22	5,08
[65]	pBR322	2,1·10 ²	proton	30	15	39,40	109,30
				20		56,10	155,62
[66]	pUC19	-	proton	15	100	9,95	2,55
			foton	1,25		0,51	0,03

Tab. 2.9: Koncentrace plasmidů pUC19 a pBR322 v simulacích jejich ozáření protony nebo fotony.

koncentrace plasmidu [ng/μl]	pUC19		pBR322	
	protony	fotony	protony	fotony
	25,6	5,5	41,6	9,0

2.6.3 Formát SDD (Standard DNA Damage) výstupního souboru

Formát SDD byl představen poprvé představen v [67]. Umožňuje svému uživateli uchovat informace o poškození molekuly DNA v jednotném formátu, který bude snadno analyzovatelný i pro ostatní zájemce.

Soubor je možné rozdělit na dvě části. První se nazývá **Header section** a obsahuje základní informace o provedeném ozařování a shrnuje jeho výsledky. Druhá část, **Data section**, obsahuje samotné informace o druhu a lokalizaci jednotlivých poškození.

Ve výpisu 2.4 je ukázka vygenerovaného výstupního souboru. Jeho jednotlivé řádky budou popsány níže. Podrobnější popis je možné dohledat v [67] nebo na stránkách [68].

Výpis 2.4: Ukázka části výstupního souboru ve formátu SDD

```
SDD, version, SDDv1.0;
Software, Geant4 v10.7;
Author, Klara Stefanova, stefakla@fffi.cvut.cz, August 2021, master thesis Impact
of environment parameters on the plasmid DNA damage induced by ionizing radiation,
FNSPE, CTU;
Simulation details, Simulation of DNA damage of the plasmid, using pdb4dna and chem3
and chem6 example, used plasmid: pUC19;
Source, Monoenergetic proton randomly generated on the surface on the sphere
with radius 300 nm exposing plasmid inside the sphere. Energy: 0.1 MeV;
Source type, 1;
Incident particles, 2212;
Mean particle energy, 0.1;
Energy distribution, M,0;
Particle fraction, 1.0;
Dose or fluence, 0;
Dose rate, 0;
Irradiation target, plasmid pUC19, supercoiled form;
Volumes, 0,10000,10000,10000,0,0,0, 1,0.3,0.3,0.3,0,0,0;
Chromosome sizes, 1, 0.002686;
DNA Density, 0.023749;
Cell Cycle Phase, 0;
DNA Structure, 6, 1;
In vitro / in vivo, 0;
Proliferation status, 0, plasmid is static;
Microenvironment, 20, 0;
Damage definition, 1, 0, 10, -1, 8.22;
Time, 100;
Damage and primary count, 1312271.283, 1;
Data entries, 0, 1, 0, 0, 0, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0;
Additional information, Damage position is scored as a center of damaged base pair;
***EndOfHeader***

652.06, 942.2, -801.11, 653.65, 939.76, -802.87, 652.06, 942.2, -801.11; 1;
-39.996, 665.54, -497.02, -39.996, 665.54, -497.02, -39.996, 665.54, -497.02; 1;
```

Řádky uvozené slovy `SDD version` a `Software` slouží k popisu verze SDD formátu, která je pro zápis použita a verze a druhu softwaru, který byl pro simulaci použit.

V řádcích uvozených `Author`, `Simulation details` a `Source` autor stručně charakterizuje práci, v rámci které tato data vznikla, a podmínky simulace a použitý zdroj ionizujícího záření.

Řádky uvozené `Source type` až `Dose rate` slouží k bližší charakterizaci zdroje. Konkrétně zde je uvedeno spektrum energie a druh použitých primárních částic. Druh primární částic je označen číselně podle seznamu částic Particle Data Group (PDG), viz [69]. Dále je zde charakterizována dávka nebo fluence simulovaného pole a dávkový příkon zdroje.

Informace o biologickém terči, v našem případě plasmidu, jsou uvedeny na řádcích `Irradiation target` až `Proliferation status`. Cílem těchto řádků je předat informace o druhu a velikosti používaného biologického terče, objemu, ve kterém simulace probíhá a ve kterém se biologický terč nachází. Je možné charakterizovat, zda je biologický terč zkoumán in vivo nebo in vitro. Pokud uživatel pracuje s jadernou DNA nebo s buňkou je možné charakterizovat i fázi buněčného cyklu a zda je v souboru buněk přítomná i proliferace.

Řádek `Microenvironment` popisuje teplotu prostředí a koncentraci kyslíku v něm. Další řádek `Damage definition` slouží k popisu skórovaných poškození. Zda dojde k zaznamenání přímých nebo i nepřímých poškození a poškození bází, jaká vzdá-

lenost bude použita pro tvorbu bazických párů a deponovaná energie potřebná ke vzniku zlomu vlákna. Na dalším řádku je uvedena doba, po kterou bude primární částice simulována v ns. Řádek **Damage and primary count** uvádí počet identifikovaných poškození a primárních částic. Předposlední řádek výpisu obsahuje informaci o tom, jaká data budou uvedena v **Data section**. V našem případě se jedná o polohu středu a okrajů poškození a způsob jeho vzniku, tedy jestli se jedná o přímé (0), nepřímé (1) nebo kombinované (2) poškození. V posledním řádku má uživatel možnost uvést poznámky k datům uvedeným v **Data section**.

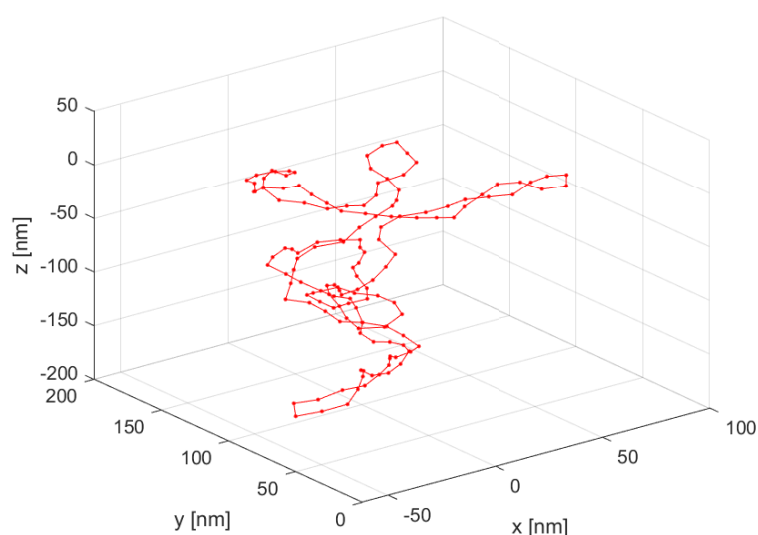
V rámci **Data section** je každé z poškození uváděno na jednom řádku. Jednotlivé sekce informací jsou od sebe odděleny středníky a pokud jsou uváděny souřadnice bazických párů charakterizující poškození, jsou uvedeny v nm.

Kapitola 3

Výsledky

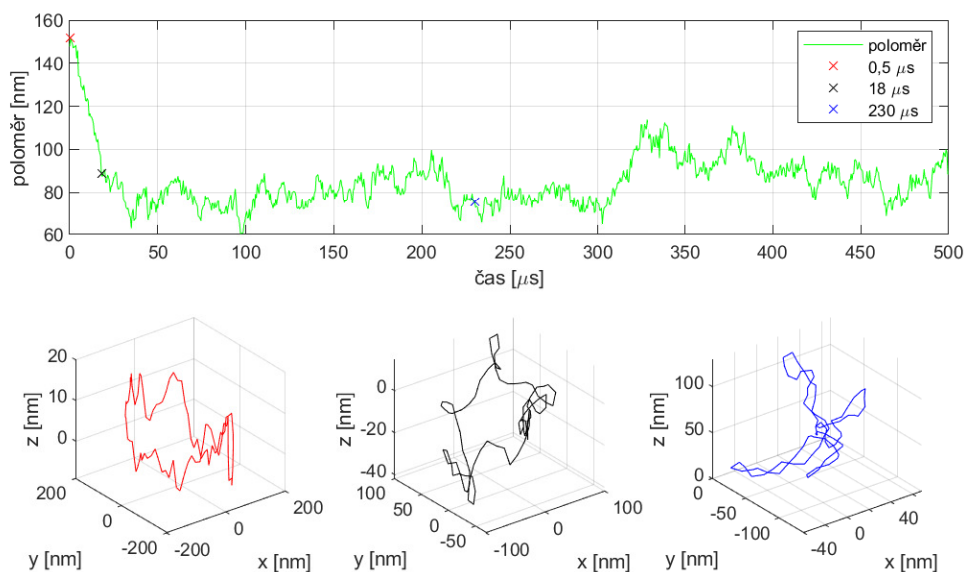
3.1 Chování molekuly s měnícími se podmínkami prostředí

V rámci simulace časových průběhů byly spočteny vývoje konformací pro plasmidy pUC19 a pBR322. Pro simulaci byly zvoleny teploty 20 °C a 37 °C a koncentrace sodných iontů 10 až 200 mM s krokem 10 mM. Pro každou kombinaci teploty a koncentrace sodných iontů bylo nasimulováno sto časových průběhů konformací, vždy s unikátním seedem. Pro každou ze simulací bylo provedeno 10^6 časových kroků s délkou 500 ps a zaznamenány byly údaje o každém tisícím. Ukázka vypočtené konformace mnohoúhelníkové struktury je na Obr. 3.1. Všechny vygenerované časové vývoje prostorové konformace plasmidu jsou uloženy na diskových polích organizace MetaCentrum VO. Případným zájemcům může být poskytnuta k využití.



Obr. 3.1: Nasimulovaná prostorová konformace plasmidu pBR322 při teplotě 37 °C a koncentraci sodných iontů 40 mM v čase 335 μ s od začátku simulace.

Po skončení simulací jsem na základě časových průběhů hodnotících veličin odhadla dobu simulace, která byla potřeba, aby se struktury smotaly do nadšroubovicové formy. Tento odhad byl učiněn na základě časových průběhů hodnotících veličin tak, že po smotání do nadšroubovicové formy se hodnoty veličin začaly pohybovat kolem průměrných hodnot. Tento jev byl již dříve popsán v [45]. Ukázka časového průběhu poloměru koule struktury opsané pro jeden z běhů simulace spolu s ukázkami konformací struktury ve vybraných časových bodech je na Obr. 3.2. Na základě těchto pozorování jsem určila čas potřebný ke smotání do nadšroubovicové formy na 150 μs .

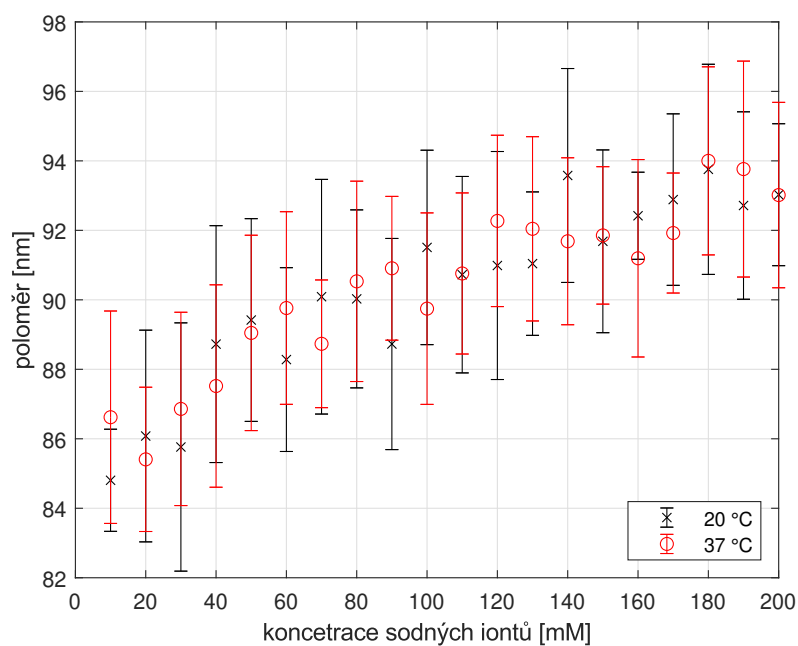


Obr. 3.2: Časový průběh poloměru koule opsané struktury pro plasmid pUC19 simulovaný při teplotě 20 °C a koncentraci sodných iontů 130 mM spolu s vyznačenými konformacemi v časech 0,5, 18 a 230 μs po začátku simulace.

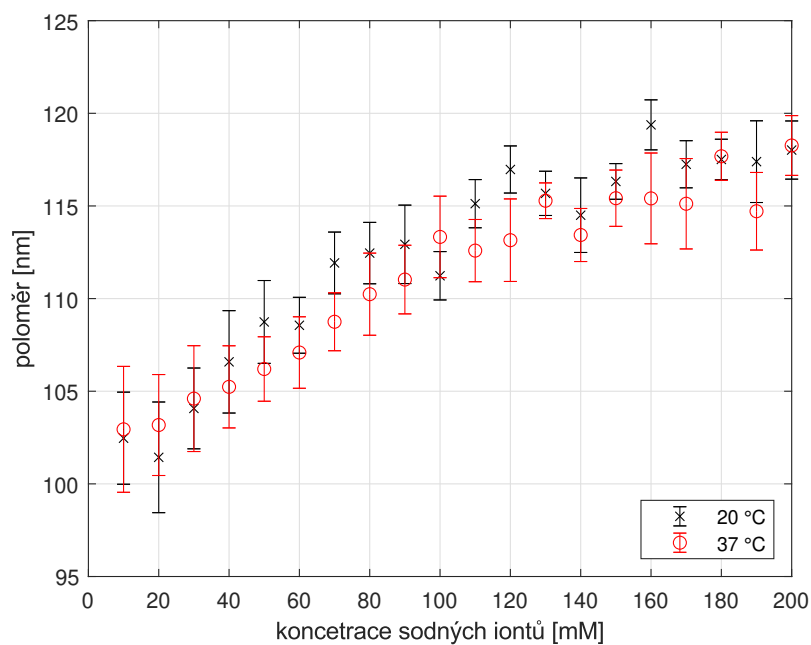
Pro další zpracování byly použity pouze ty časové vývoje konformací, které byly označeny za unikátní. Kvůli tomu bylo vyřazeno nula až osm simulací časových průběhů konformace z jejich sady pro určitou kombinaci teploty a koncentrace sodných iontů.

Po vyřazení neunikátních časových průběhů a určení času potřebného k dosažení nadšroubovicové formy jsem určila hodnoty veličin poloměr koule opsané, elastická energie, writhe a twist po smotání. Veličiny jsou popsány v kapitole 2.1.4. Při tomto zpracování byly vyhodnoceny zvláště sady nasimulovaných časových průběhů pro jednotlivé teploty a koncentrace sodných iontů. Nejprve byla určena průměrná hodnota veličiny v daném časovém okamžiku ze všech neunikátních průběhů v rámci sady průběhů. Jako hodnotu veličiny po smotání byl brán průměr průměrných hodnot v časových okamžicích od času 150 μs . Chyba určení této hodnoty byla určena v programu Matlab pomocí funkce `std` [70].

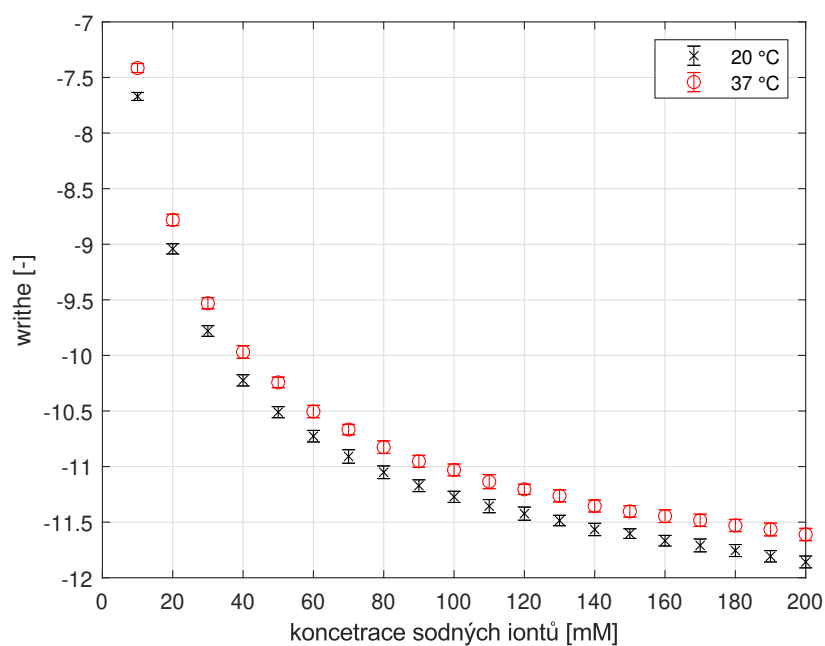
Na Obr. 3.3 až 3.10 jsou vyobrazeny závislosti velikosti hodnotících veličin po smotání na teplotě a koncentraci sodných iontů pro plasmidy pUC19 a pBR322.



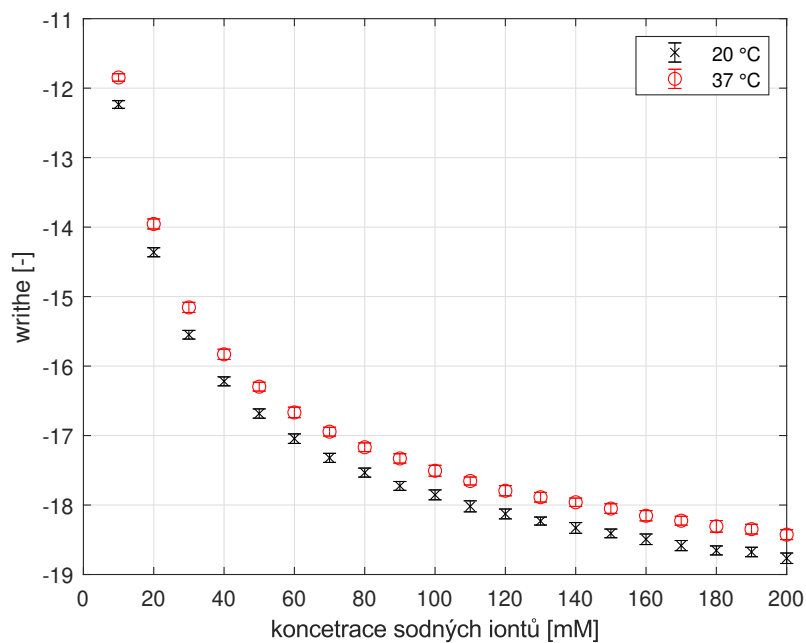
Obr. 3.3: Závislost průměrného poloměru koule opsané strukturu reprezentující plasmid pUC19 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



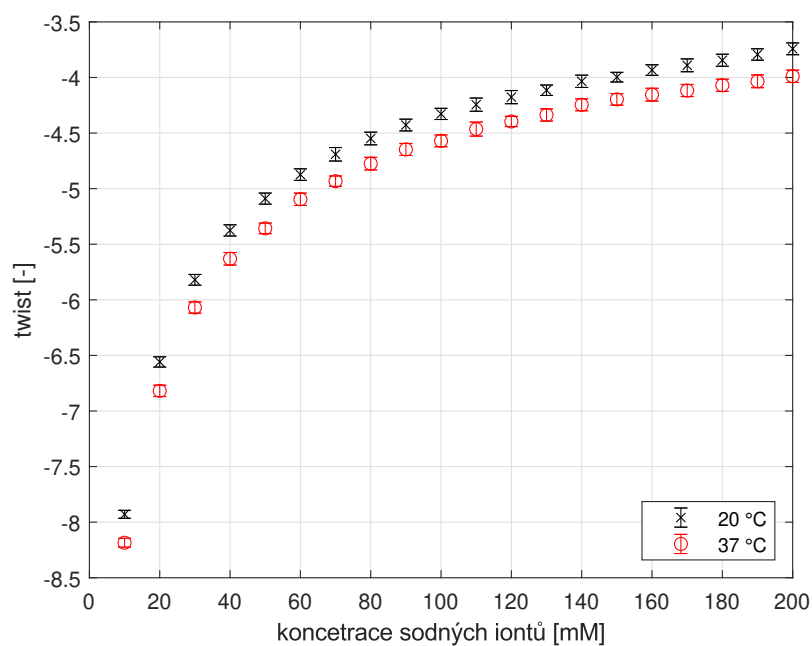
Obr. 3.4: Závislost průměrného poloměru koule opsané strukturu reprezentující plasmid pBR322 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



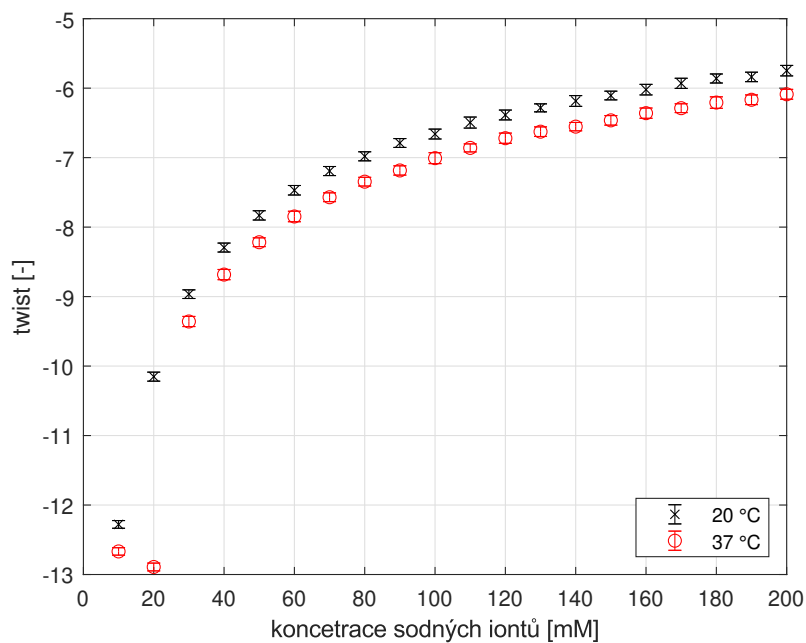
Obr. 3.5: Závislost průměrné hodnoty veličiny writhe struktury reprezentující plasmid pUC19 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



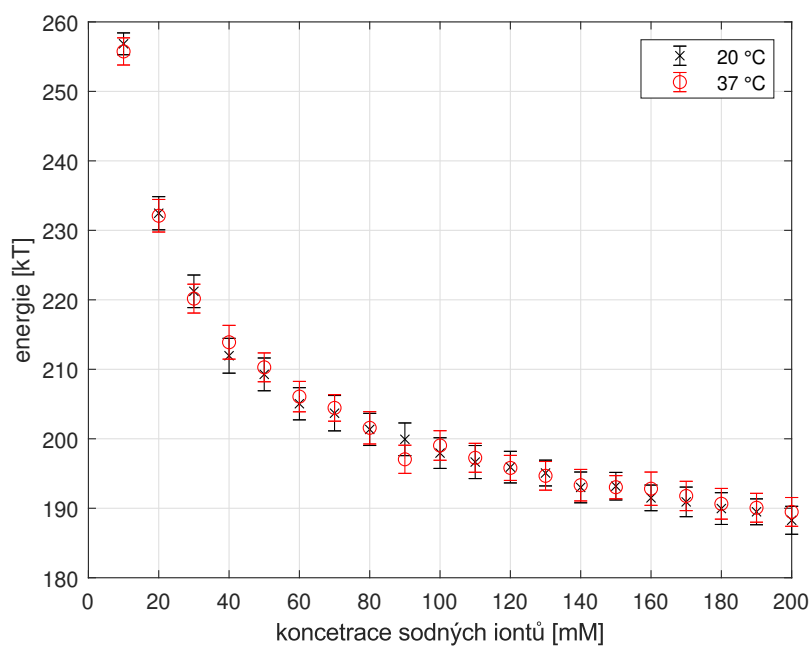
Obr. 3.6: Závislost průměrné hodnoty veličiny writhe struktury reprezentující plasmid pBR322 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



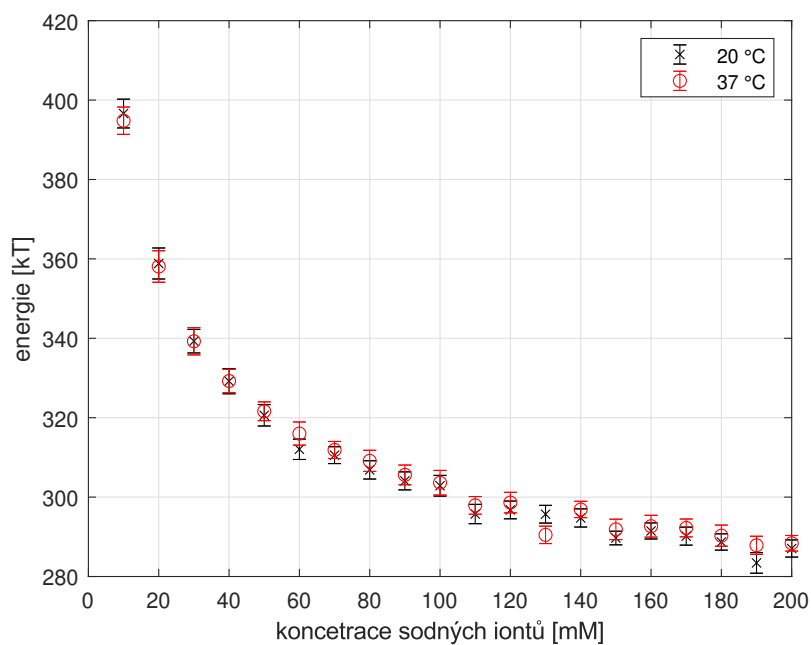
Obr. 3.7: Závislost průměrné hodnoty veličiny twist struktury reprezentující plasmid pUC19 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



Obr. 3.8: Závislost průměrné hodnoty veličiny twist struktury reprezentující plasmid pBR322 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.



Obr. 3.9: Závislost průměrné hodnoty elastické energie struktury reprezentující plasmid pUC19 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.

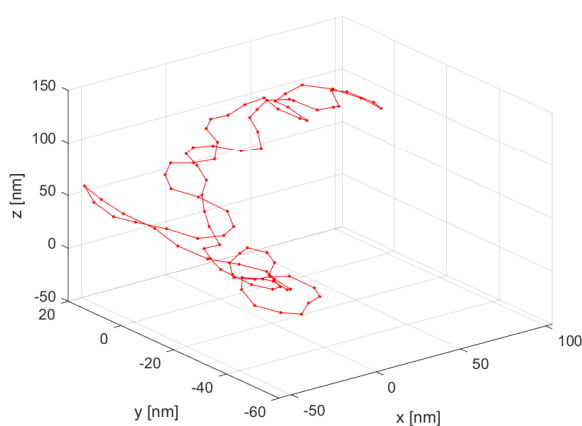


Obr. 3.10: Závislost průměrné hodnoty elastické energie struktury reprezentující plasmid pBR322 po smotání pro uvažované teploty (20 °C a 37 °C) pro různé koncentrace sodných iontů.

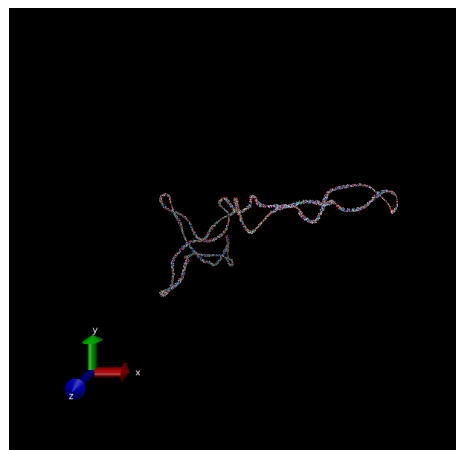
3.2 Knihovna atomární struktury

Po vygenerování hrubých struktur následovalo jejich zjemnění pomocí skriptů popsaných v kapitole 2.2. Vzhledem k počtu prováděných výpočtů, bylo veškeré zjemňování prováděno na výpočetních uzlech MetaCentra. Pro zkrácení doby výpočtu pro každý z časových běhů, bylo provedeno zjemňování jednotlivých hrubých struktur prováděno paralelně.

Všechny použité skripty ke zjemňování spolu s ukázkami použitých dávkových úloh jsou uloženy v git repozitáři [71]. Ukázka hrubé struktury a zjemněné atomární struktury, která byla z hrubé struktury získána, je na Obr. 3.11.



(a) Hrubá struktura



(b) Atomární struktura

Obr. 3.11: Mnohoúhelníková struktura reprezentující plasmid před zjemněním—hrubá struktura, a atomární struktura, která vznikla zjemněním struktury hrubé.

Navržený korekční mechanismus neproběhl u všech struktur úspěšně, tedy některé ze struktur úspěšně nesplnily podmínky uvedené v Tab. 2.2. V rámci jednoho časového vývoje nastal k tomuto došlo až u osmi konfigurací.

Zde prezentovaný zjemňující algoritmus ve své automatizované podobě byl použit také pro vygenerování dat, využitých pro validaci simulace radiolýzy vody v TOPAS-nBio: *TOPAS-nBio validation for simulating water radiolysis and DNA damage under Low-LET irradiation*, připraveném kolektivem autorů pod vedením José Ramos-Mendézem z UCLA. Článek byl 1. června 2021 odeslán na posouzení do časopisu *Physics in Medicine and Biology*. Hlavička článku je na Obr. 3.12. Článek se také věnuje radiačnímu poškození plasmidu ve fyzikální a chemické fázi, avšak pracuje pouze s modelem plasmidu na úrovni poloh bazických párů a s odlišným simulačním kódem.

TOPAS-nBio validation for simulating water radiolysis and DNA damage under Low-LET irradiation.

Ramos-Méndez J^{1*}, LaVerne JA², Domínguez-Kondo N³, Milligan J⁴, Štěpán V⁵, Stefanová K⁵, Perrot Y⁶, Villagrasa C⁶, Shin W-G⁷, Incerti S⁸, McNamara A⁹, Paganetti H⁹, Perl J¹⁰, Schuemann J⁹, and Faddegon B¹.

¹ Department of Radiation Oncology, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94115, USA.

² Radiation Laboratory and Department of Physics, University of Notre Dame, Notre Dame, IN 46556, USA.

³ Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72000, MEX.

⁴ Department of Basic Sciences, School of Medicine, Loma Linda University, Loma Linda, CA, 92350, USA.

⁵ Department of Radiation Dosimetry, Nuclear Physics Institute of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic.

⁶ Laboratoire de Dosimétrie des Rayonnements Ionisants, Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire, Fontenay aux Roses, BP. 17, 92262, France

⁷ Department of Radiation Oncology, Seoul National University Hospital, Seoul 03080, Republic of Korea.

⁸ Univ. Bordeaux, CNRS, CENBG, UMR 5797, F-33170 Gradignan, France

⁹ Department of Radiation Oncology, Physics Division, Massachusetts General Hospital & Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

¹⁰ SLAC National Accelerator Laboratory, Menlo Park, CA, USA.

*Corresponding author. Jose.RamosMendez@ucsf.edu

Obr. 3.12: Hlavička podaného článku k validaci simulací v TOPAS-nBio.

3.3 Aplikace pro simulaci účinku ionizujícího záření

Jako další krok práce byla vyvinuta aplikace, která umožnila simulovat radiační poškození plasmidu na atomární úrovni. Pro vývoj aplikace byly použity Geant4–DNA knihovny a procesy v rámci simulačního nástroje Geant4, konkrétně verze 10.07. Podrobný popis fungování aplikace je uveden v kapitole 2.3.

Vyvinutá aplikace byla použita pro simulaci radiační poškození plasmidu, které vzniklo do času 100 ns od interakce částice. Model plasmidu je do aplikace načten z PDB souboru, který jej popisuje na atomární úrovni. Hlavními výstupy aplikace jsou dva výstupní soubory. Jeden z nich obsahuje informace o poloze a původu poškození nukleotidů, druhý zaznamenává deponovanou energii ve vytyčeném *Bounding Volume*.

Finální verze aplikace je zveřejněna v git repozitáři, který naleznete na [72]. Kromě aplikace jsou v repozitáři na ukázkou umístěny i vstupní a výstupní soubory jedné ze simulací. Samozřejmostí je i soubor `README.md`, který slouží jako návod pro úspěšné spuštění aplikace.

3.4 Simulace radiačního poškození plasmidu

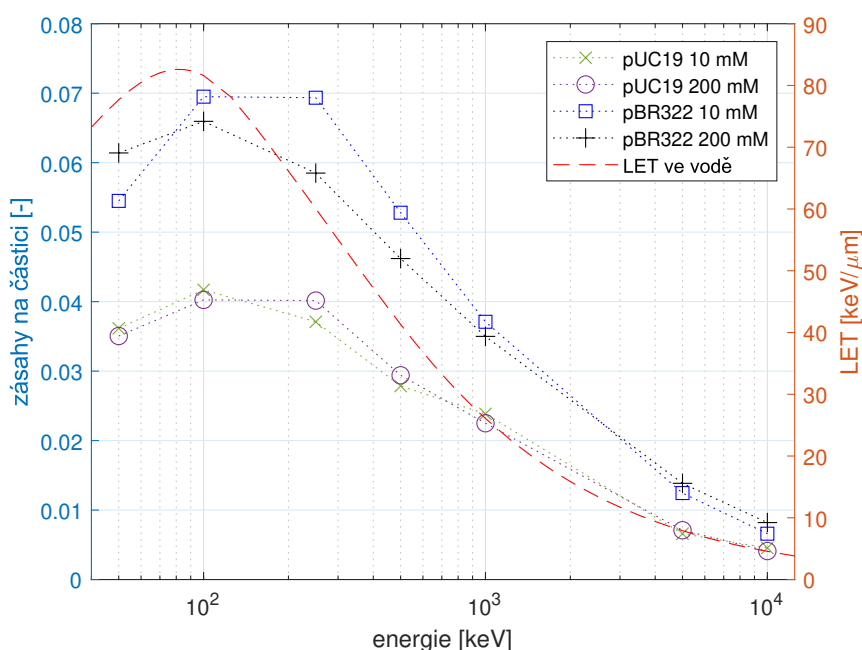
Pro simulaci radiačního poškození plasmidu byla použita aplikace představená v předchozí kapitole. Pro simulace byly použity atomární modely plasmidů pUC19 a pBR322, jejichž tvorba byla popsána v kapitolách 3.1 a 3.2. Tyto struktury byly ozařovány protony o různých energiích nebo fotony.

Výstupní soubory simulace obsahující informace o zásahu struktury plasmidu a deponovanou energii v *Bounding Volume* byly zpracovány pomocí skriptů v [73]. Nejprve byly určeny počty a lokalizace zásahů pro každý z běhů, který byl hodnocen.

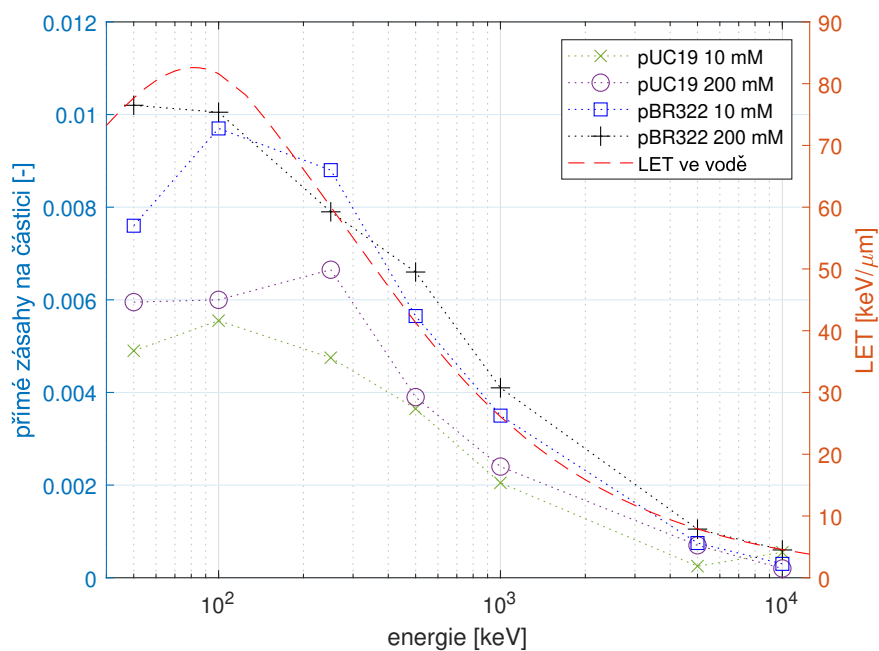
V případě protonů se jednalo o simulaci jedné primární částice, fotony jako celá simulace najednou.

Na Obr. 3.13 a 3.14 je vyobrazena závislost průměrného počtu všech zásahů plasmidu nebo přímých zásahů plasmidu na jeden primární proton v závislosti na jeho energii a druhu ozařovaného plasmidu. V grafu na Obr. 3.15 je vyobrazena závislost podílu přímých zásahů na celkovém počtu v závislosti na primární energii protonů a ozařovaného plasmidu. Pro doplnění je na grafech vždy vyobrazena i závislost LET protonu na jeho energii.

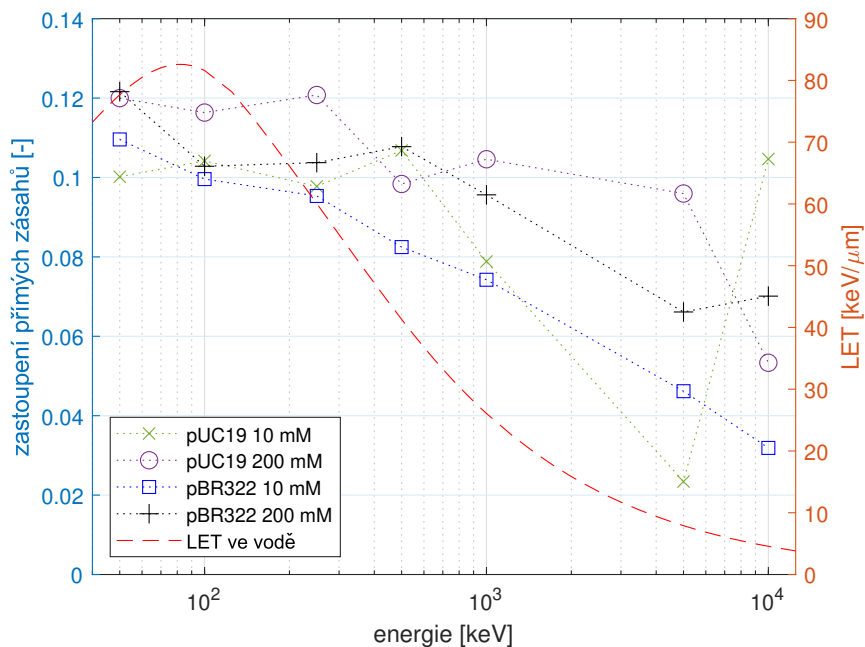
Podobně jako pro protonové záření byly studovány i počty zásahů u fotonového záření. Při každém z běhů, tedy simulaci dráhy 10^9 primárních fotonů, došlo pouze k jednotkovému počtu zásahů, maximálně tři. Ze zaznamenaných zásahů nebyl ani jeden z nich přímý.



Obr. 3.13: Závislost průměrného počtu zásahů plasmidu během jednoho běhu primárního protonu v závislosti na jeho počáteční energii a použitém plasmidu a závislost LET protonu ve vodě na jeho energii [51].



Obr. 3.14: Závislost průměrného počtu přímých zásahů plasmidu během jednoho běhu primárního protonu v závislosti na jeho počáteční energii a použitém plasmidu a závislost LET protonu ve vodě na jeho energii [51].

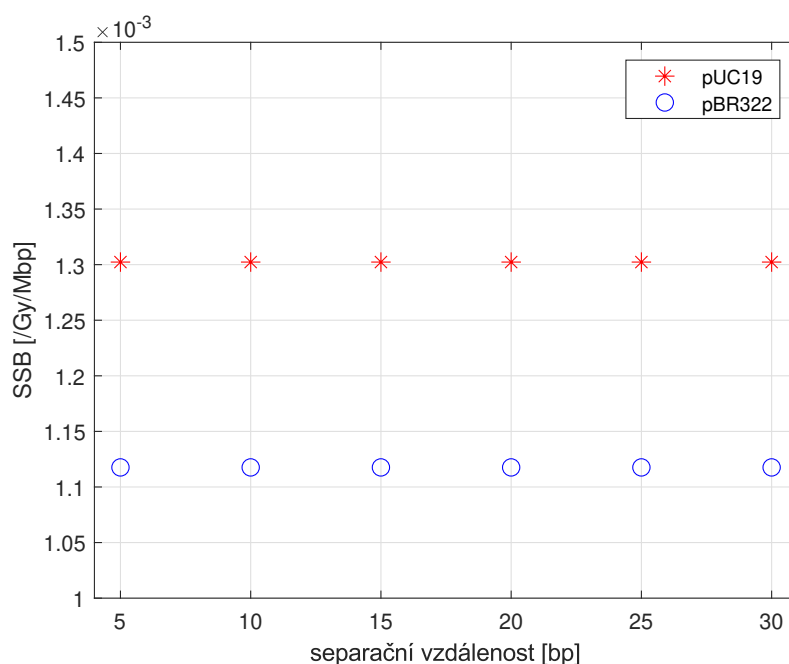


Obr. 3.15: Závislost průměrného poměru přímých zásahů plasmidu z celkového počtu během jednoho běhu primárního protonu v závislosti na jeho počáteční energii a použitém plasmidu a závislost LET protonu ve vodě na jeho energii [51].

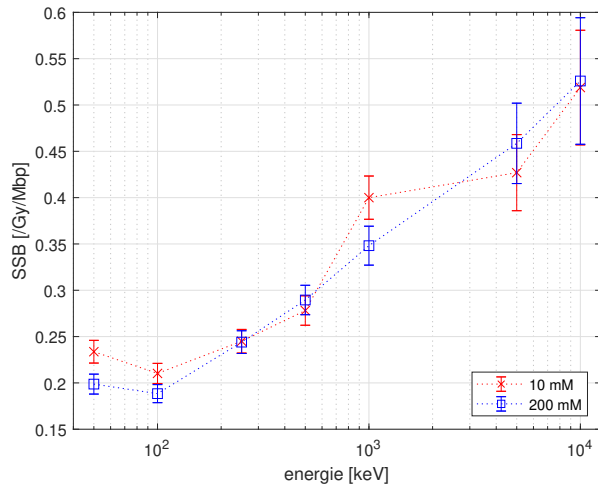
3.4.1 Výtežky radiačního poškození u plasmidů pUC19 a pBR322

Na Obr. 3.17 jsou vyobrazeny výtěžky jednoduchých zlomů a násobných poškození plasmidů pUC19 a pBR322 po ozáření protony. Jako násobná poškození se rozumí SSB+, DSB a komplexní poškození dohromady. Pro konfigurace simulované při koncentraci sodných iontů 10 mM byla na základě rešerše zvolena odpovídající separační vzdálenost 10 bp, pro simulaci odpovídající koncentraci sodných iontů 200 mM byla použita separační vzdálenost 30 bp. Obr. 3.18 ilustruje jak se mění výtěžky násobného jednoduchého zlomu plasmidu s měnící se separační vzdáleností.

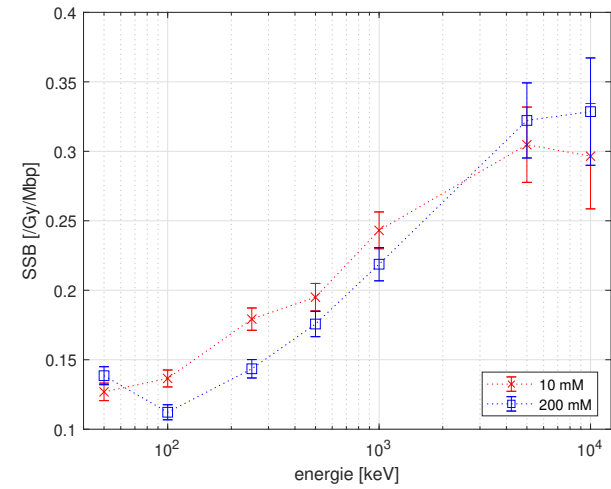
Na Obr. 3.16 jsou vyobrazeny výtěžky jednoduchých zlomů plasmidů pUC19 a pBR322 po ozáření fotony o energii 1,25 MeV. Ostatní druhy poškození nebylo možné v datech vysledovat kvůli malému počtu běhů. Z tohoto důvodu nejsou grafy jejich závislostí na separační vzdálenosti v práci prezentovány.



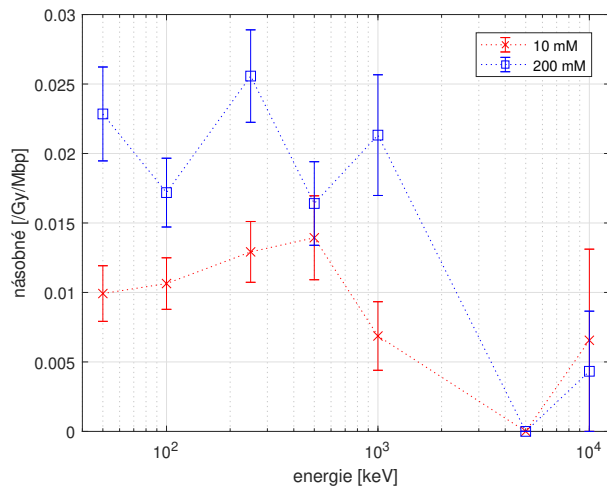
Obr. 3.16: Závislost výtěžků jednoduché zlomu na separační vzdálenosti pro vznik dvojného zlomu při simulaci ozáření plasmidů pUC19 a pBR322 s konfigurací odpovídající koncentraci sodných iontů 10 mM fotony o energii 1,25 MeV.



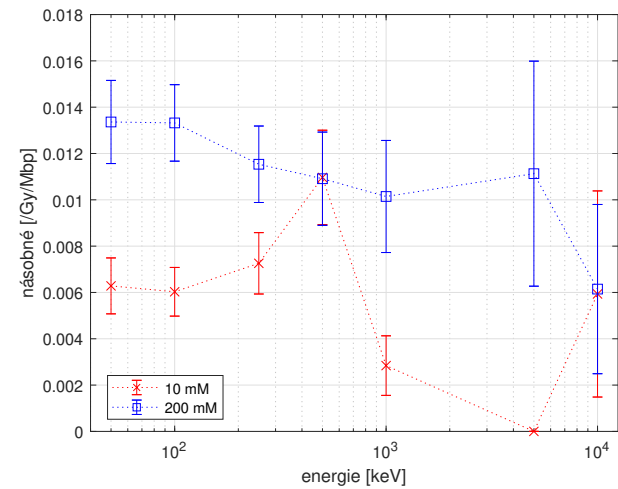
(a) jednoduché zlomy, pUC19



(b) jednoduché zlomy, pBR322

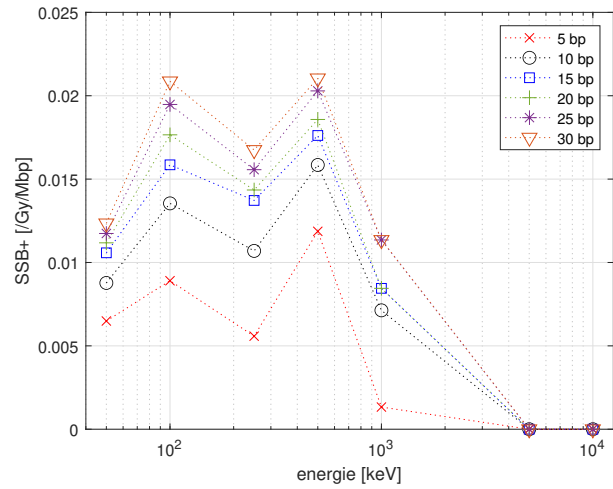
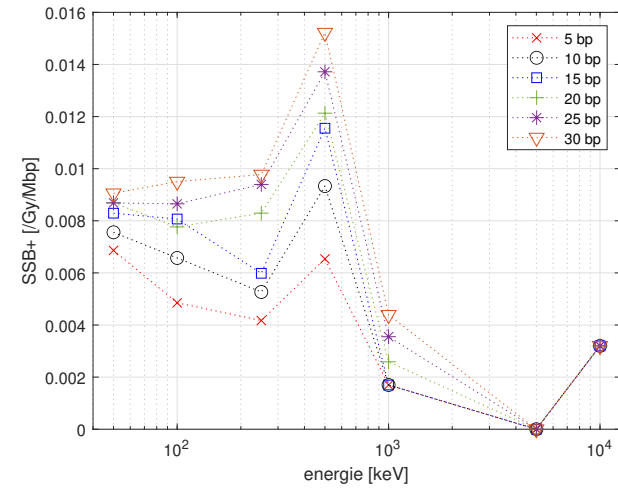
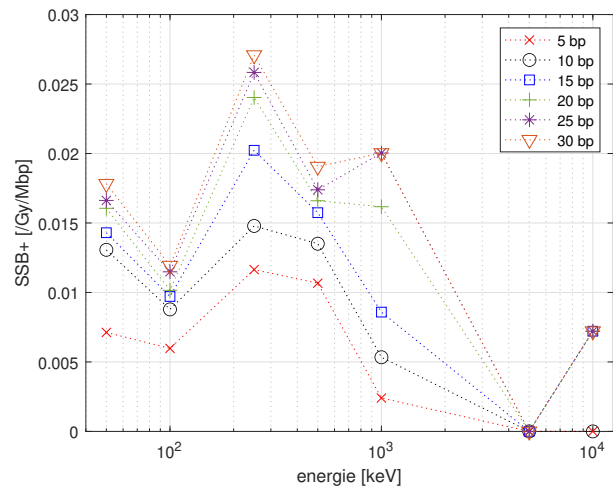
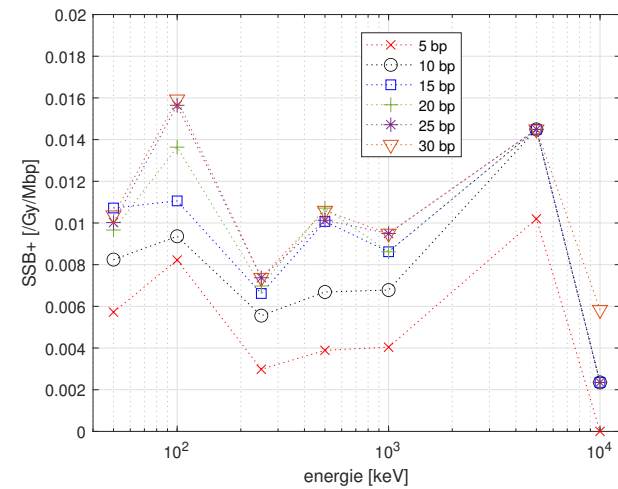


(c) násobná poškození, pUC19



(d) násobná poškození, pBR322

Obr. 3.17: Výtěžky jednoduchých zlomů a násobných poškození při simulaci ozáření plasmidů pUC19 a pBR322 s konfiguracemi odpovídající koncentraci sodných iontů 10 mM a 200 mM protony v závislosti na jejich primární energii.

(a) pUC19, koncentrace Na^+ 10 mM(b) pBR322, koncentrace Na^+ 10 mM(c) pUC19, koncentrace Na^+ 200 mM(d) pBR322, koncentrace Na^+ 200 mM

Obr. 3.18: Výtěžky násobného jednoduchého zlomu při simulaci ozáření plasmidů pUC19 a pBR322 s konfiguracemi odpovídající koncentraci sodných iontů 10 mM a 200 mM protony v závislosti na jejich primární energii.

3.5 Vyvinuté kódy a skripty

V rámci této práce byly vytvořeny kódy a skripty, které byly uloženy do veřejných git repozitářů tak, aby každý případný zájemce do nich mohl nahlédnout. Jsou to následující repozitáře:

- **Stefanova_vliv** [74] – tento repozitář obsahuje skripty vytvořené v programu Matlab, které byly použity k analýze výstupních proudů `fort.*` simulace časových vývoji prostorových konformací a zaznamenaných konformací. Výstupem analýzy jsou veličiny použité k hodnocení vlivu okolního prostředí na konformaci plasmidu, viz kapitola 2.1.4.
- **Stefanova_smoothing** [71] – v tomto repozitáři je nachází skripty vyvinuté v programu Matlab určené ke zjemnění hrubých struktur na atomární strukturu, celý proces je blíže popsán v kapitole 2.2.
- **Stefanova_pdb4dna_chem** [72] – repozitář obsahuje kódy v jazyce C++, které používají Geant4–DNA knihovny a procesy, a implementují aplikaci použitou k simulaci radiačního poškození plasmidu, viz kapitola 2.3.
- **Stefanova_sdd_format** [73] – tento repozitář obsahuje skripty vyvinuté v programu Matlab, které slouží k vygenerování výstupního souboru simulace radiačního poškození plasmidu ve formátu SDD, viz kapitola 2.6.3. Součástí repozitáře jsou i skripty, které z výstupních souborů simulace určují výtěžky jednotlivých radiačních poškození, viz kapitola 2.6.2.

Kapitola 4

Diskuze

4.1 Chování molekuly s měnícími se podmínkami prostředí

Pomocí worm-like chain modelu byly vygenerovány sady časových průběhů konformací dvou druhů plasmidové molekuly, pUC19 a pBR322. Simulace probíhaly při dvou různých teplotách (20 a 37 °C) a dvaceti různých koncentracích sodných iontů, v rozmezí od 10 mM do 200 mM s krokem 10 mM. Pro vygenerování byl použit simulační kód popsáný v [1].

Aby nebylo nutné porovnávat chování struktur pomocí každého kroku v rámci časových průběhů hodnotících veličin, bylo využito toho, že struktura se po určité době smotá do nadšroubovicového stavu. To se na časovém průběhu hodnotící veličiny projeví tak, že hodnoty veličiny se budou pohybovat kolem průměrné hodnoty [45]. Doba, kterou se této situace dosáhne byla odhadnuta na 150 μ s. Pokud by bylo analyzováno pouze chování plasmidu pUC19, byl by tento odhad doby velmi konzervativní a bylo by vhodné dobu zkrátit. Druhý ze studovaných plasmidů, pBR322, je delší a tudíž mu dosažení nadšroubovicové formy trvá delší dobu a odhad potřebné doby 150 μ s je pro něj vhodný. Aby byly výsledky snáze porovnatelné i mezi sebou, rozhodla jsem se pro oba plasmidy použít stejný odhad.

4.1.1 Teplota prostředí

Prvním parametrem, který může ovlivnit chování molekuly je teplota okolního prostředí. Rostoucí teplota prostředí způsobí, že má struktura vyšší termální energii, a tím pádem větší tendence se pohybovat. Tento pohyb se projeví tak, že se celá struktura rozbálí, což způsobí vzrůst poloměru koule struktury opsané [37, s. 45–48]. Vizuálně není možné tento trend z Obr. 3.3 a 3.4 potvrdit ani vyvrátit, proto byl pro zhodnocení použit znaménkový test, konkrétně byla použita funkce `signrank` v programu Matlab [75]. Nulová hypotéza byla, že se od sebe průměrné poloměry při teplotách 20 °C a 37 °C se liší. Z testu vyplynulo, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ v případě plasmidu pUC19 byla tato hypotéza zamítnuta, naopak u plasmidu pBR322 zamítnuta na této hladině významnosti nebyla.

Z Obr. 3.5 a 3.6 je patrné, že s rostoucí teplotou nepatrně vzrůstá hodnota veličiny writhe, tedy struktura má větší tendenci se křížit. Naopak hodnota veličiny twist, která popisuje počet obtáčení kolem centrální osy, s rostoucí teplotou klesá, viz Obr. 3.7 a 3.8. Rozdíly mezi získanými hodnotami jsou malé, pravděpodobně opět z důvodu malého rozdílu teplot. Jediný výkyv velikost rozdílu hodnot mezi jednotlivými teplotami na Obr. 3.8 u koncentrace Na^+ 20 mM. Důvod vzniku této odchylky bude předmětem dalšího zkoumání.

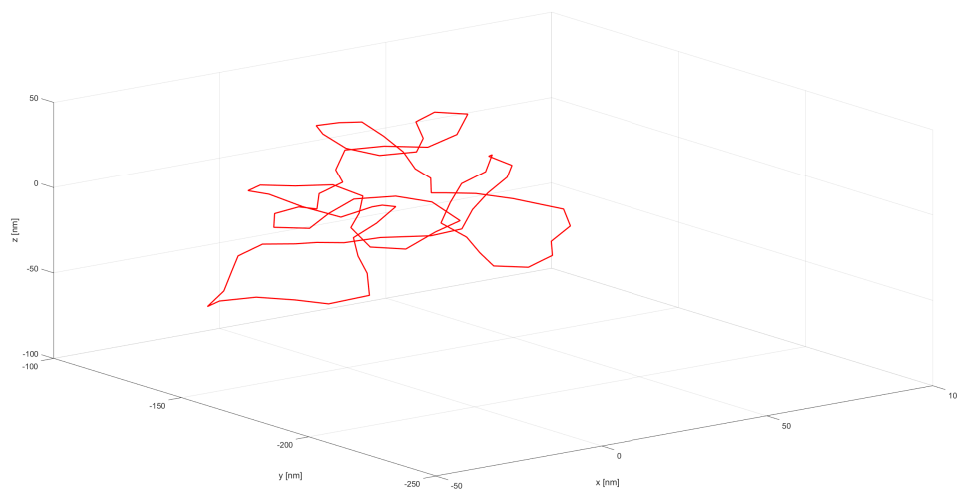
Velikost elastické energie není příliš ovlivněna teplotou okolního prostředí, viz Obr. 3.9 a 3.10. Hodnoty pro obě teploty se překrývají nebo se od sebe liší pouze o svou směrodatnou odchylku. Rozdíl mezi hodnotami by mohl být větší pokud by se uvažila teplotní závislost některých konstant, konkrétně ohybová konstanta a konstanta torzní tuhosti.

4.1.2 Koncentrace sodných iontů

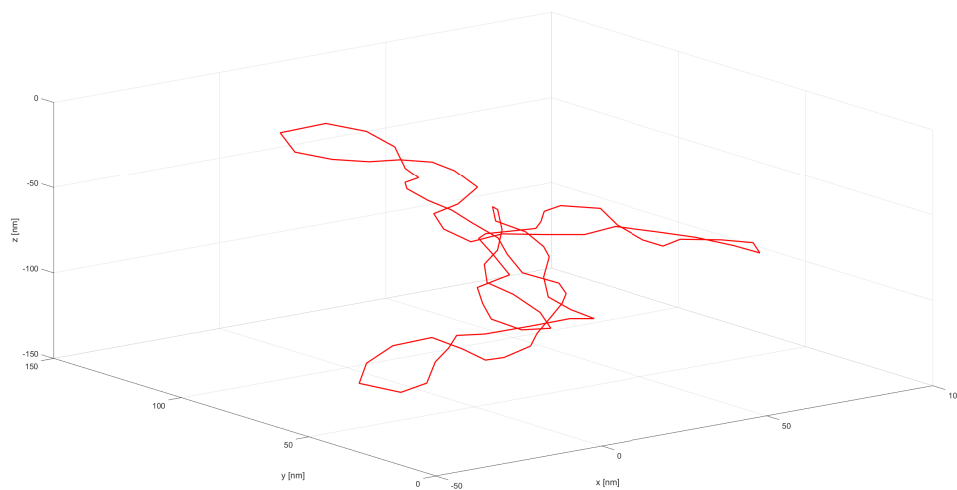
Dalším z parametrů, který ovlivňuje konformaci struktury, je iontová síla roztoku, v této simulaci reprezentována pomocí koncentrace sodných iontů. S rostoucí koncentrací kladných iontů klesá vliv záporně nabitě fosfátové kostry, který se projeví tak, že molekula se více smotává. Více smotaná struktura bude mít sklon se více mezi sebou křížit, což se projeví rostoucí absolutní hodnoty veličiny writhe, viz Obr. 3.5 a 3.6. Je možné ji také pozorovat při porovnání prostorových konformací plasmidu, kdy plasmid simulovaný při vyšších koncentracích sodných iontů vytváří v nadšroubovicové formě více ramen a více se rozprostírá do prostoru v porovnání s plasmidem simulovaným v nižší koncentraci. Příklad takového srovnání je na Obr. 4.1 a 4.2, plasmidy jsou vyobrazeny ve stejném měřítku. Tento jev se projeví i tak, že plasmidy v roztocích s vyšší koncentrací sodných iontů mají větší mobilitu v elektrickém poli, což je možné pozorovat při elektroforéze, viz [37, s. 45–48].

Se vzrůstajícím zamotáním struktury se pojí i to, že poloměr koule struktury opsané se bude s rostoucí koncentrací zvětšovat, viz Obr. 3.3 a 3.4. Malé změny velikosti poloměru a velká směrodatná odchylka získaných hodnot, hlavně u plasmidu pUC19, neumožňuje tento růst blíže popsat.

Změna míry smotávání se odráží i ve změně velikosti elastické energie. S rostoucí koncentrací její hodnota klesá, viz Obr. 3.9 a 3.10. S poklesem elastické energie souvisí i pokles míry obtáčení kolem centrální osy, charakterizovaný veličinou twist, vyobrazeno na Obr. 3.7 a 3.8.



Obr. 4.1: Prostorová konformace plasmidu pUC19 v nadšroubovicové formě simulovaná při teplotě 20 °C a koncentraci Na⁺ 10 mM.



Obr. 4.2: Prostorová konformace plasmidu pUC19 v nadšroubovicové formě simulovaná při teplotě 20 °C a koncentraci Na⁺ 200 mM.

4.2 Zjemnění hrubé struktury na atomární úroveň

Úspěšně byly upraveny skripty prezentované v bakalářské práci [2] tak, aby bylo možné je použít pro výpočty na gridech. Do skriptů byl zaveden automatický korekční mechanismus, aby nebylo nutné zjemňovací skript ručně korigovat na případné vzniklé chyby.

Korekční mechanismus, který byl uplatněn v případě, že kontrolní parametry struktury nevyhovovaly požadavkům uvedeným v Tab. 2.2, nebyl dokonalý. Chyby, které se v průběhu zjemňování vyskytly nebyly během procesu identifikovány. Cílem dalšího výzkumu bude tyto chyby identifikovat a popsat a následně navrhnout korekční mechanismus pro jejich opravu, který by bylo možné aplikovat i při automatickém průběhu zjemňování.

Při zjemňování tak velkého množství dat, které bylo prováděno v této práci, se mohou vyskytnout další problémy, které u menších objemů dat nenastávají. MetaCentrum, na kterém výpočty probíhaly, sice disponuje 450 licencemi k programu Matlab, ale z důvodu urychlení výpočtů byly použity paralelní výpočty. K jejich využití v rámci programu Matlab je potřeba balíček `Distrib_Computing_Toolbox`. MetaCentrum však disponuje pouze 53 licencemi k tomuto balíčku [76]. Údaje o počtu licencí byly zjišťovány 3. března 2021.

Dalším aspektem, který zkomplikoval výpočty, byla velikost a množství vygenerovaných PDB souborů. Každý z PDB souborů ukládající atomární strukturu jedné konformace plasmidu pUC19 měl velikost 13,5 MB a pBR322 22 MB. Vzhledem k počtu vygenerovaných konformací hrubých struktur dosahuje velikost adresáře obsahující všechny PDB soubory desítek TB. Skladování takto velkého množství dat na diskových polích MetaCentra je problematické. Z tohoto důvodu byly smazány sady PDB souborů těch časových průběhů, u nichž se vyskytla alespoň jedna problematická hrubá struktura, kterou se nepovedlo zjemnit, a také ty, které byly shledány shodnými metodou, která byla popsána v Kapitole 2.1.3. Množství zjemněných časových průběhů pro každý z plasmidů pro každou kombinaci teploty a koncentrace sodných iontů se z původních 100 snížilo průměrně na 35.

4.3 Aplikace pro simulaci poškození plasmidu ionizujícím zářením

Pro simulaci radiačního poškození plasmidu byla vyvinuta aplikace v Geant4–DNA. Aplikace byla vyvíjena na podkladu aplikace `pdb4dna`, do které byla připojena simulace fyzikálně-chemické a chemické fáze převzatá z aplikací `chem3` a `chem6` spolu se skórováním poškození. Simulace fyzikální fáze a skórování přímých poškození bylo převzato z aplikace `pdb4dna` [13]. Fyzikálně-chemická a chemická fáze byla simulována pomocí metody `step-by-step`, viz kapitola 1.1.2. Metoda skórování poškození od chemických produktů byla implementací metody reakčních poloměrů popsané v kapitole 1.1.2. Tato metoda skórování je používána i v jiných pracích, např. v [16].

Součástí aplikace není implementace skórování poškození bází, jak těch vzniklých fyzikální interakcí, tak těch, které jsou výsledkem chemických reakcí. V případě fyzi-

kálních interakcí je implementace shodná s tou, která byla popsána v kapitole 2.3.3. Jediným rozdílem by byl ten, že by se skórovala depozice energie, která by byla nejbližší dané bázi. Chemické reakce produktů fyzikálně-chemické a chemické fáze s jednotlivými báze byly již v minulosti v Geant4–DNA implementovány, viz [16]. Tato implementace je však spojena i s modelem DNA prezentovaným ve zmíněném článku a bylo by nutné ji upravit tak, aby byla kompatibilní s námi používaným modelem plasmidu. Data získaná pomocí takto upravené aplikace by bylo samozřejmě možné srovnat i s daty experimentálními [77], [78].

Spolu se skórováním přímého poškození, byl z aplikace `pdb4dna` převzat i způsob, kterým se určuje směr primární částice. Tato metoda byla blíže analyzována a bylo zjištěno, že zvolený způsob určování bodů $(x_1 \ y_1 \ z_1)$ a $(x_2 \ y_2 \ z_2)$, viz kapitola 2.3.2, negeneruje rovnoměrné rozložení směřování primárních částic. Během volby směru primární částice je v ose z preferován směr do středu. V rovině, kterou lze popsat rovnicí $z = 0$ je pozorovatelná velmi mírná preference ve směru os x a y . Tato preference se v zastoupení těchto směrů projevuje pouze v jednotkách %. Tento přístup není vhodný pro plasmidy, které nejsou centrovány. Plasmidy použité v této práci vycentrované nebyly a jejich posunutému středu nebyla přizpůsobena ani pozice `Bounding Volume`. To pravděpodobně vedlo k tomu, že plasmidy obdržely méně zásahů než pokud by centrovány byly. Dalším problémem v popsaném generování částic bylo, že popsaným algoritmem může vzniknout směr pro částici, který míří ven z koule. Pravděpodobnost, že tento jev nastane je však nižší než 0,2%.

Z důvodu snížení časové náročnosti výpočtu byly chemické produkty a reakce sledovány pouze do času 100 ns po fyzikální interakci i přes to, že se nejedná o konec chemické fáze. Implementace chemických reakcí a pohybu chemických produktů do doby konce chemické fáze, čas 1 μ s [79, s. 156–160], již v Geant4–DNA implementováno bylo a je používáno při simulacích výtěžků chemických produktů [8]. Avšak simulace, které zahrnují skórování nepřímého poškození DNA, se běžně ukončují v čase 10 ns po fyzikální interakci [16].

Zkrácená doba simulace chemické fáze, v této práci 100 ns od fyzikální interakce, lze srovnat s experimentální situací, kdy je do roztoku s plasmidy přidán vychytávač $\text{OH} \cdot$. Efektivita vychytávače je popsána pomocí veličiny `scavenging capacity`. Výsledky získané v této práci budou porovnány s výsledky získanými s vysokými koncentracemi vychytávačů a tedy i vysokými hodnotami `scavenging capacity`.

Další možností jak aplikaci posunout dále by byla implementace chemických reakcí sodných iontů s produkty radiolýzy vody, případně implementace reakcí jiných iontů nebo sloučenin. Tím by bylo docíleno větší podobnosti prostředí simulace s prostředím, ve kterém se plasmidy nachází během experimentálního ozařování. Příklad složení roztoku, ve kterém se plasmidu během ozařování nachází je možné nalézt v [62]. Dále by bylo možné do simulace přidávat i různé `scavengery`, které mohou ovlivnit výtěžky radiačního poškození, obdobně jako se přidávají k plasmidům během experimentů [80], [81].

K dalšímu vylepšení simulace fyzikálně-chemické a chemické fáze by bylo vhodné implementovat také přesun náboje mezi částmi plasmidu obdobně jako bylo provedeno u nástroje RADAMOL [15].

Představená aplikace je výpočetně náročná. Ke snížení náročnosti by mohlo dojít,

pokud by pohyb a reakce chemických produktů byla simulována nikoliv metodou step-by-step, ale metodou nezávislých reakčních časů. Tato metoda byla popsána v kapitole 1.1.2. Tato metoda již byla v Geant4–DNA implementována a je možné ji spustit v aplikaci chem6, která je jako příklad součástí instalační složky [24].

Na základě popisu formátu výstupního souboru ve formátu SDD [67] byl sestaven skript v jazyce Matlab, který je schopen z výstupních souborů vygenerovat soubor v tomto formátu. Vytvořené řešení je možné si stáhnout z git repozitáře [73]. Formát souboru je určen především pro zápis poškození jaderné DNA, tudíž mnohé z vyplňovaných informací nemají pro plasmid smysl, typickým příkladem je *Cell Cycle Phase*. Do informací o poškození jsou uváděny pouze strohé informace o prostorové lokalizaci poškození a jeho původu, tedy jestli bylo přímé, přímé nebo se na jeho vzniku podíleli oba procesy. Vložení dalších informací, které formát nabízí, např. doba, kdy k poškození došlo, nebo jaká částice nebo chemický produkt jej způsobili, je teoreticky možné, podstatně by to však zvýšilo především požadavky na kapacitu úložiště, ve kterém by data byla uchovávána.

4.4 Vliv okolního prostředí na výtěžky poškození plasmidu ionizujícím zářením

Pro zkoumání vlivu okolního prostředí na výtěžky poškození byly použity oba plasmidy pUC19 a pBR322. Pro simulaci byly použity konfigurace simulované při teplotě 20 °C, v případě protonového záření byly použity konfigurace simulované při dvou koncentracích sodných iontů, 10 a 200 mM, oproti tomu u fotonového záření byly použity pouze konfigurace simulované při koncentraci 10 mM.

K realizaci simulací byly použity výpočetní kapacity organizace MetaCentrum VO [82]. Pro urychlení výpočtů bylo využito toho, že je možné aplikaci spouštět na více procesorech.

Prezentované výsledky jsou zatíženy velkou chybou určení, jelikož bylo vygenerováno malé množství běhů. Malé množství běhů je způsobeno tím, že aplikace byla v průběhu vypracování práce laděna a bylo neustále nutné generovat nová data.

Pro hodnocení vlivu prostředí na výtěžky ionizujícího záření bylo využito toho, že okolní podmínky prostředí mohou ovlivnit separační vzdálenost pro dvojný zlom. Standardní používaná hodnota je deset bazických párů, studováno bylo rozpětí pěti až třiceti bazických párů. S větší hodnotou separační vzdálenosti jsou spojovány nižší hodnoty koncentrace sodných iontů, obecněji i nižší iontové síly roztoku, a vyšší teploty. Vliv změny teploty byl při posuzování získaných výsledků zanedbán, jelikož rozdíl způsobené změnou teploty z referenční pro živé organismy na laboratorní nebyl příliš velký, viz kapitola 2.5.

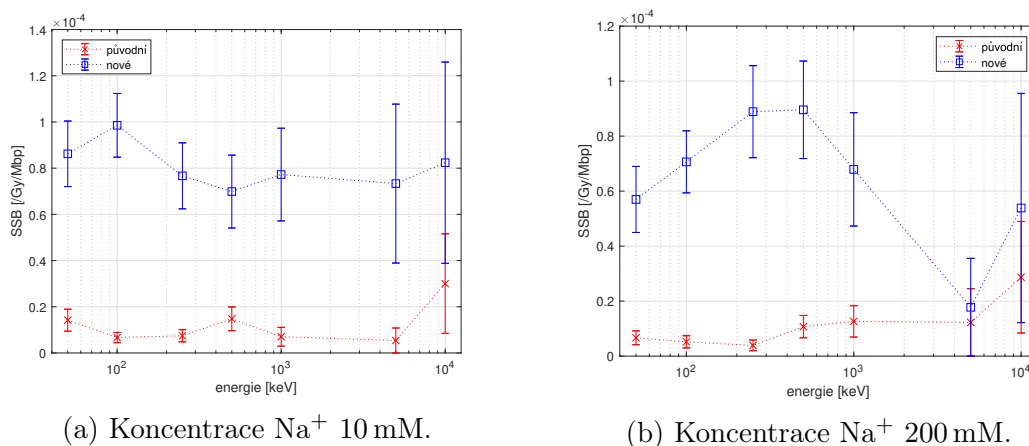
4.4.1 Protony

Při simulaci protonového záření byly použity energie protonů v rozsahu 50 keV až 10 MeV. Pro získání jednotlivých výtěžků radiačních poškození byly použity výsledky z celkem 20000 běhů.

Na Obr. 3.13 a 3.14 jsou vyobrazeny grafy závislosti průměrného počtu zásahů, všech nebo pouze přímých, na primární energii protonu. Průběh těchto závislostí se podobá průběhu závislosti LET na energii, které je také na grafech vyobrazena. Tento jev souvisí s dávkou deponovanou v uvažovaném objemu, jelikož částice s větším LET a tím pádem i větší brzdou schopností deponuje více energie na jednotku dráhy. Z grafů lze také vyčíst, že delší plasmid, pBR322, při stejných podmínkách obdržel více zásahů. Tento jev byl popsán také v [63].

Podíl přímých zásahů plasmidů ke všem zásahům v závislosti na energii protonu je na Obr. 3.15. Z grafu je jasné, že převažují nepřímé zásahy plasmidu, což odpovídá předpokladům. Dále je zde patrné, že se snižujícím se LET zastoupení přímých zásahů klesá. Tento jev byl také očekávaný [9]. Odklon hodnoty u plasmidu pUC19 se strukturou simulovanou při koncentraci sodných iontů 10 mM a energii 10 MeV je způsoben malou statistikou zásahů.

Pro simulaci byly zvoleny čtyři datové sady deseti po sobě jdoucích konfigurací plasmidu. Nebylo však jasné, zda tato sada relevantně popisuje daný plasmid s danou koncentrací sodných iontů, tj. jestli při volbě jiné sady dat nedojde k radikální změně výsledků. Z tohoto důvodu byly pro plasmid pUC19 provedeny simulace přímých účinků pro dvacet dalších konfigurací plasmidu, deset pro konfiguraci odpovídající koncentraci sodných iontů 10 mM a deset pro 200 mM. Tyto konfigurace byly brány z různých běhů. Určené výtěžky přímého jednoduchého zlomu plasmidu pUC19 jsou na Obr. 4.3. Jako původní jsou zde označeny sady dat, které jsou zpracovány v kapitole 3. Z výsledků je patrné, že volba sady dat v rámci daných podmínek okolního prostředí nezpůsobí příliš velkou chybu ve vypočtených výtěžcích. Velká odchylka dat od sebe na Obr. 4.3b u energie 5 MeV je pravděpodobně dána malou statistikou dat.



Obr. 4.3: Porovnání výtěžků jednoduchého zlomu plasmidu pUC19 včetně chyby průměru pro separační vzdálenost 10 bp pro konformace odpovídající různě zvoleným koncentracím sodných iontů pro původně zvolený set konfigurací a nově zvolený.

Na Obr. 3.17 jsou vyobrazeny výtěžky poškození plasmidů v závislosti na jejich energii s příslušnými separačními vzdálenostmi. Vzhledem k malé statistice násobných poškození a to především v oblasti vyšších energií, nad 5 MeV byla ná-

sledující poškození vyhodnocována dohromady: násobný jednoduchý zlom, dvojný zlom a komplexní poškození.

U závislosti výtěžků jednoduchého zlomu plasmidu na primární energii protonu, viz Obr. 3.17a a Obr. 3.17b, lze pozorovat závislost na LET, viz Tab. 2.6. A to z důvodu, že jsou vyhodnocovány výsledky po jedné částici, jejíž deponovaná energie v objemu je závislá na jejím LET. A to tak, že čím větší LET, tím větší depozice energie. A větší depozice energie je spojena s větší měrnou energií, kterou je absolutní počet poškození dělen. Konkrétní popis závislosti výtěžků SSB na energii nebo LET není možné blíže popsat jelikož jsou mezi jednotlivými průběhy rozdíly, viz Obr. 3.17a. Tyto odchylky mohou být způsobeny samotným nastavením simulace. Nastavení simulace by bylo možné vylepšit minimálně úpravou zdroje primárních částic tak, aby bylo jejich směřování rovnoměrné.

Při porovnání velikosti výtěžků SSB u plasmidu pBR332 a pUC19 je patrné, že výtěžky SSB plasmidu pBR322 jsou menší. To souvisí s normováním hodnoty na délku plasmidu, protože pBR322 je složen z 4361 bazických párů, oproti tomu pUC19 ze 2686.

U násobných poškození pozorujeme, že rostoucí separační vzdálenost, která je spojena s vyšší koncentrací sodných iontů způsobí nárůst výtěžků těchto poškození. Tento jev je výrazný u energií protonů do 1 MeV. Výtěžky získané při koncentraci sodných iontů 200 mM do energie protonu 1 MeV jsou asi o třetinu větší než ty získané při koncentraci 10 mM. U vyšších energií už je malá statistika těchto poškození a hodnoty tím pádem fluktuují.

Při porovnání získaných výsledků s experimentálními je nutné brát v potaz, že experimenty pracují především s takovými primárními energiemi protonů, které zaručují, že během průchodu protonů zkumavkou s plasmidy nedošlo k dosažení Braggova píku. V něm dochází k výrazným změnám energií protonu a plasmidy by v různých částech roztoku byly ozářeny nerovnoměrně. Porovnání průběhu LET pro 10, 20 a 30 MeV protony ve zkumavce je možné dohledat v [65].

Dalším aspektem, který potřeba při porovnání s experimenty zohlednit je kratší doba simulace chemické fáze, důsledkem, které je to, že je nutné porovnávat výsledky simulací s výsledky experimentů s vysokou scavenging capacity. Z výsledků uvedených v Tab. 2.8 proto není možné uvažovat výsledky získané v [65].

Při porovnání výsledků experimentů, které bylo možné použít, bylo zjištěno, že simulací stanovené výsledky jsou třikrát až desetkrát nižší. Toto zjištění podrobíme dalšímu zkoumání.

4.4.2 Fotonové záření

V případě simulace ozáření plasmidu fotonovým zářením byla použita energie, která odpovídá střední energii emitovaných fotonů radionuklidem ^{60}Co , tedy 1,25 MeV. Pro každý z plasmidů bylo analyzováno 140 běhů.

Na Obr. 3.16 je vyobrazena závislost výtěžků jednoduchého zlomu plasmidu na zvolené separační vzdálenosti pro oba plasmidy. Výtěžky ostatních zlomů nebylo možné analyzovat, jelikož plasmidy během běhu obdržely pouze malé množství

izolovaných zásahů. Toto je také důvod, proč nejsou výtěžky ovlivněny měnící se separační vzdáleností.

Chyba určení výtěžků SSB pro plasmid pUC19 je rovna 17,5 %, pro plasmid pBR322 16,7 %. V její velikosti se též odráží malá statistika zásahů.

Při porovnání získaných výsledků s výsledky experimentu, viz Tab. 2.8, je zřejmé, že výsledky experimentů jsou přibližně desetkrát větší než získaná data. U výsledků [66] neznáme přesnou scavenging capacity pro vychytávače $\text{OH}\cdot$, ale z výsledků pro protonové záření lze odhadovat, že byla poměrně vysoká a lze ji použít jako srovnání pro prezentované výsledky. Nižší výsledky lze přisuzovat nejistotě ve stanovení scavenging capacity u experimentu a také nastavením simulace.

Jedním z aspektů, který mohl způsobit výtěžky získané pomocí simulace, bylo to, že v objemu vytyčeném pro simulaci účinků ionizujícího záření nedošlo k dosažení maxima procentuální dávkové hloubkové křivky, pro ^{60}Co se jedná o hloubku 5 mm. Pro její dosažení by bylo nutné zvětšit simulovaný objem, což by vedlo ke zvýšení výpočetní náročnosti simulace. Tento přístup byl zvolen jako první možnost při simulaci výtěžků, narazili jsme však na hranice použitelnosti Geant4–DNA. Pokud došlo k interakci nebo reakci příliš daleko od středu simulovaného objemu, simulace selhávala. Jako hraniční se ukázala vzdálenost 500 nm, která byla následně zvolena jako poloměr `BoundingVolume`.

Další možností jak získat výsledky, které odpovídají situace dosažení elektronové rovnováhy, by bylo nejprve nasimulovat spektrum sekundárních elektronů a k simulaci použít pouze ty, jako tomu bylo v článku, jehož hlavička je na Obr. 3.12. V tomto případě by bylo vhodné použít místo step-by-step simulace chemické fáze metodu nezávislých reakčních časů (IRT).

Kapitola 5

Závěr

Tato práce se zabývala studiem vlivu okolních podmínek na radiační poškození plasmidu. Tento výzkum je důležitý z toho důvodu, že v buňkách panují jiné podmínky než ty, které jsou v okolí plasmidu během radiobiologických experimentů. Tyto odlišnosti však mohou způsobit rozdílné výsledky v získaných výtěžcích radiačního poškození.

Ke studiu vlivu okolního prostředí na radiační poškození plasmidu byly v této práci použity simulace v Geant4–DNA, který je jedním z významných projektů, které se věnují Monte Carlo track structure kódům v radiobiologii. Měnící se podmínky okolního prostředí byly modelovány pomocí měnící se teploty a koncentrace sodných iontů v roztoku s plasmidy.

V prvním kapitole jsou představeny principy simulace fyzikální, fyzikálně–chemické a chemické fáze účinků ionizujícího záření pomocí Monte Carlo track structure kódů. Dále jsou v této kapitole představeny čtyři simulační nástroje pracující na principu Monte Carlo track structure kódů, které se v radiobiologii k těmto účelům používají.

Kapitola 2 shrnuje teoretické poznatky o vlivu teploty a koncentraci sodných iontů na konfiguraci plasmidu a radiační výtěžky plasmidu. Dále jsou zde stanoveny rozsahy měnících se podmínek prostředí, které byly zkoumány v rámci této práce. Dalším bodem této kapitoly je představení kód prezentovaného v článku [1], který byl použit k vygenerování hrubé struktury plasmidu. Pro získání atomární struktury konfigurace plasmidu zapsané do souboru ve formátu PDB [29] byly použity upravené zjemňující skripty z [2]. Podstatou úpravy skriptů bylo jejich přizpůsobení pro použití pro výpočty na gridech. V poslední části práce byla představena aplikace v Geant4–DNA, která byla vyvinuta v rámci této práce. Aplikace umožňuje provádět simulace prvních třech fází účinků ionizujícího záření a zároveň pracuje s atomárním modelem konfigurace plasmidu, který je zapsán ve formátu PDB.

V kapitole Výsledky je představena závislost chování konfigurace plasmidů pUC19 a pBR322 na teplotě a koncentraci sodných iontů. Z výsledků je patrné, že mezi konfiguracemi vygenerovanými při laboratorní teplotě a teplotě typické pro živý organismus, 20 °C a 37 °C, není velký rozdíl. Oproti tomu měnící se koncentrace sodných iontů, škála od 10 mM do 200 mM, způsobí v konfiguracích plasmidu v nadšroubovicovém vinutí velké rozdíly, především zvětšení poloměru koule opsané struktury a větší míru smotávání a tvorby ramen s rostoucí koncentrací Na^+ . Dále byly v kapi-

tole představeny výsledky simulace ozáření obou plasmidů pomocí vyvinuté aplikace v Geant4–DNA. K posouzení vlivu okolního prostředí bylo využito toho, že s klesající koncentrací sodných iontů nebo rostoucí teplotou okolního prostředí roste separační vzdálenost pro dva protilehlé jednoduché zlomy na vytvoření zlomu dvojného. Vzhledem k malým rozdílům v separační vzdálenosti na uvažovaném intervalu teplot, byl tento aspekt zanedbán. U protonů byl do energií 1 MeV pozorován přibližně třetinový nárůst výtěžků násobných poškození při koncentraci sodných iontů 200 mM oproti koncentraci sodných iontů 10 mM

U fotonů, jejichž radiační účinek na plasmid byl v této práci simulován, tento jev nebylo možné z důvodu malé statistiky zásahů pozorovat.

Cílem budoucího výzkumu je použít vyvinutou aplikaci na širší spektrum typů a energií částic a podrobněji zkoumat vliv okolního prostředí na radiační výtěžky plasmidů. Vytvořené nástroje by mohly být dobrým základem pro řešení tohoto problému pomocí použití metody nezávislých reakčních časů.

Bibliografie

1. HUANG, J.; SCHLICK, T.; VOLOGODSKII, A. Dynamics of site juxtaposition in supercoiled DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. Dostupné z DOI: 10.1073/pnas.98.3.968 (cit. na s. 10, 19, 23, 53, 62).
2. STEFANOVÁ, K. *Tvorba podrobných dynamických modelů struktur molekuly DNA plasmidu*. 2019. Bakalářská práce. Katedra dozimetrie a aplikace ionizujícího záření, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, České vysoké učení technické v Praze (cit. na s. 10, 19, 23, 25, 29, 32, 34, 56, 62).
3. KÜMMERLE, E A; POMPLUN, E. A computer-generated supercoiled model of the pUC19 plasmid. *European Biophysics Journal*. 2005, **34**(1), 13–18. ISSN 0175-7571. Dostupné z DOI: 10.1007/s00249-004-0431-2 (cit. na s. 10, 22, 23).
4. BIOLABS, New England. *NEB Tools: DNA Sequences and Maps Tool* [online] [cit. 2019-06-13]. Dostupné z: <https://international.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool> (cit. na s. 10, 24).
5. THE GEANT4-DNA COLLABORATION. *Geant4-DNA:Extending The Geant4 Monte Carlo Simulation Toolkit For Radiobiology* [online] [cit. 2019-04-24]. Dostupné z: <http://geant4-dna.org/> (cit. na s. 10).
6. *Geant4 A Simulation Toolkit* [online] [cit. 2019-04-22]. Dostupné z: <https://geant4.web.cern.ch/> (cit. na s. 10).
7. FULFORD, J. *Quantification of complex DNA damage by ionising radiation: An experimental and theoretical approach*. 2000. Dostupné také z: <http://bura.brunel.ac.uk/handle/2438/5782>. Disertační práce. Department of Biological Sciences, Brunel University (cit. na s. 10, 33).
8. RAMOS-MÉNDEZ, J. et al. Independent reaction times method in Geant4-DNA: Implementation and performance. *Medical Physics*. 2020, **47**(11), 5919–5930. Dostupné z DOI: 10.1002/mp.14490 (cit. na s. 11, 13–15, 57).
9. SHIN, W. G. et al. Evaluation of the influence of physical and chemical parameters on water radiolysis simulations under MeV electron irradiation using Geant4-DNA. *Journal of Applied Physics*. 2019, **126**, 114301. Dostupné z DOI: 10.1063/1.5107511 (cit. na s. 11, 59).
10. NIKJOO, H. Radiation track and DNA damage. *Iran. Journal of Radiation Research*. 2003, **1**(1), 3–16 (cit. na s. 11).

11. INCERTI, S. et al. The Geant4-DNA project. *International Journal of Modeling, Simulation and Scientific Computing*. 2010, **1**(2), 157–178. Dostupné z DOI: 10.1142/S1793962310000122 (cit. na s. 12, 15).
12. KREIPL, M. S.; FRIEDLAND, W.; PARETZKE, H. G. Time- and space-resolved Monte Carlo study of water radiolysis for photon, electron and ion irradiation. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2009, **48**(1), 11–20. Dostupné z DOI: 10.1007/s00411-008-0194-8 (cit. na s. 12, 14).
13. DELAGE, E; PHAM, Q T; KARAMITROS, M et al. PDB4DNA: Implementation of DNA geometry from the Protein Data Bank (PDB) description for Geant4-DNA Monte-Carlo simulations. *Computer Physics Communications*. 2015, **192**, 282–288. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cpc.2015.02.026 (cit. na s. 12, 16, 27, 29, 33, 35, 56).
14. KARAMITROS, M.; INCERTI, S.; MANTERO, A. Modeling radiation chemistry in the Geant4 toolkit. *Progress in Nuclear Science and Technology*. 2011, **2**, 503–508. Dostupné z DOI: 10.15669/pnst.2.503 (cit. na s. 12–14).
15. ŠTĚPÁN, V.; DAVÍDKOVÁ, M. RADAMOL tool: Role of radiation quality and charge transfer in damage distribution along DNA oligomer. *The European Physical Journal D*. 2014, **68**(8), 240. Dostupné z DOI: 10.1140/epjd/e2014-50068-8 (cit. na s. 13, 16, 33, 57).
16. MEYLAN, S.; INCERTI, S.; KARAMITROS, M. et al. Simulation of early DNA damage after the irradiation of a fibroblast cell nucleus using Geant4-DNA. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 11923. Dostupné z DOI: 10.1038/s41598-017-11851-4 (cit. na s. 13, 15, 29, 30, 35, 56, 57).
17. TURNER, J.E.; HAMM, R.N.; WRIGHT, H.A. et al. Studies to link the basic radiation physics and chemistry of liquid water. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part C. Radiation Physics and Chemistry*. 1988, **32**(3), 503–510. Dostupné z DOI: 10.1016/1359-0197(88)90056-2 (cit. na s. 13).
18. KARAMITROS, M. et al. Diffusion-controlled reactions modeling in Geant4-DNA. *Journal of Computational Physics*. 2014, **274**, 841–882. Dostupné z DOI: 10.1016/j.jcp.2014.06.011 (cit. na s. 13, 15).
19. SCHUEMANN, J.; MCNAMARA, A. L.; RAMOS-MÉNDEZ, J. et al. TOPAS-nBio: An Extension to the TOPAS Simulation Toolkit for Cellular and Sub-cellular Radiobiology. *Radiation Research*. 2019, **191**(2), 125–138. Dostupné z DOI: 10.1667/RR15226.1 (cit. na s. 14, 16).
20. TRAN, H. N. et al. Assessment of DNA damage with an adapted independent reaction time approach implemented in Geant4-DNA for the simulation of diffusion-controlled reactions between radio-induced reactive species and a chromatin fiber. *Medical Physics*. 2021, **48**(2), 890–901. Dostupné z DOI: 10.1002/mp.14612 (cit. na s. 14).
21. INCERTI, S. et al. Geant4-DNA example applications for track structure simulations in liquid water: A report from the Geant4-DNA Project. *Medical Physics*. 2018, **45**(8), 722–739. Dostupné z DOI: 10.1002/mp.13048 (cit. na s. 15, 28, 32).

22. THE GEANT4-DNA COLLABORATION. *Geant4-DNA: Physics processes & models* [online] [cit. 2021-03-20] (cit. na s. 15).
23. BERNAL, M.A. et al. Track structure modeling in liquid water: A review of the Geant4-DNA very low energy extension of the Geant4 Monte Carlo simulation toolkit. *Physica Medica*. 2015, **31**(8), 861–874. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ejmp.2015.10.087 (cit. na s. 15).
24. COLLABORATION, THE GEANT4. *Geant4: Geant4 10.07 download* [online] [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: <https://geant4.web.cern.ch/support/download> (cit. na s. 15, 58).
25. INCERTI, S.; SEZNEC, H.; SIMON, M. et al. Monte Carlo dosimetry for targeted irradiation of individual cells using a microbeam facility. *Radiation Protection Dosimetry*. 2009, **133**(1), 2–11. ISSN 0144-8420. Dostupné z DOI: 10.1093/rpd/ncp003 (cit. na s. 15).
26. COLLABORATION, THE GEANT4. *DICOM example* [online] [cit. 2021-07-31]. Dostupné z: <https://gitlab.cern.ch/geant4/geant4/-/tree/master/examples/extended/medical/DICOM> (cit. na s. 15).
27. SAKATA, D. et al. Evaluation of early radiation DNA damage in a fractal cell nucleus model using Geant4-DNA. *Physica Medica*. 2019, **62**, 152–157. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ejmp.2019.04.010 (cit. na s. 15, 29).
28. LAMPE, N.; KARAMITROS, M; BRETON, V. et al. Mechanistic DNA damage simulations in Geant4-DNA Part 2: Electron and proton damage in a bacterial cell. *Phys Med*. 2018, **48**, 148–155. Dostupné z DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2017.12.008> (cit. na s. 15).
29. *RCSB Protein Data Bank* [online] [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/> (cit. na s. 15, 62).
30. PERL, J.; SHIN, J.; SCHÜMANN, J. et al. TOPAS: An innovative proton Monte Carlo platform for research and clinical applications. *Medical Physics*. 2012, **39**(11), 6818–6837. Dostupné z DOI: 10.1118/1.4758060 (cit. na s. 16).
31. RAMOS-MÉNDEZ, J.; PERL, J.; SCHUEMANN, J. et al. Monte Carlo simulation of chemistry following radiolysis with TOPAS-nBio. *Physics in Medicine & Biology*. 2018, **63**(10), 105014. Dostupné z DOI: 10.1088/1361-6560/aac04c (cit. na s. 16).
32. SCHUEMANN, J.; MCNAMARA, A L; RAMOS-MÉNDEZ, J. et al. *TOPAS-nBio: Geometries, Intro* [online] [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://topas-nbio.readthedocs.io/en/latest/Geometries/Intro.html> (cit. na s. 16).
33. ŠTĚPÁN, V.; DAVIDKOVÁ, M. Understanding radiation damage on sub-cellular scale using RADAMOL simulation tool. *Radiation Physics and Chemistry*. 2016, **128**, 11–17. Dostupné z DOI: 10.1016/j.radphyschem.2016.06.031 (cit. na s. 16).
34. FRIEDLAND, W.; KUNDRÁT, P.; BECKER, J.; EIDEMÜLLER, M. Biophysical simulation tool PARTRAC: Modelling proton beams at therapy-relevant energies. *Radiation Protection Dosimetry*. 2019, **186**(2–3), 172–175. Dostupné z DOI: 10.1093/rpd/ncz197 (cit. na s. 16).

35. FRIEDLAND, W.; DINGFELDER, M.; KUNDRÁT, P.; JACOB, P. Track structures, DNA targets and radiation effects in the biophysical Monte Carlo simulation code PARTRAC. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011, **711**(1-2), 28–40. Dostupné z DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.01.003 (cit. na s. 17).
36. FRIEDLAND, W.; KUNDRÁT, P. *Comprehensive Biomedical Physics*. 2014. ISBN 9780444536334 (cit. na s. 17).
37. BATES, A. D.; MAXWELL, A. *DNA Topology*. Oxford University Press, New York, 2005. ISBN 0 19 850655 4 (cit. na s. 18, 19, 53, 54).
38. TOMITA, H.; KAI, M.; KUSAMA, T.; ITO, A. Monte Carlo simulation of DNA strand-break induction in supercoiled plasmid pBR322 DNA from indirect effects. *Radiation and Environmental Biophysics*. 1998, **36**(4), 235–41. Dostupné z DOI: 10.1007/s004110050077 (cit. na s. 19).
39. PHILLIPS, R.; MILO, R. *Cell biology by the numbers*. Garland Sc. New York: Taylor & Francis, 2016. ISBN 0815345372 (cit. na s. 19).
40. LEPAGE, T.; JUNIER, I. Modeling bacterial DNA: Simulation of self-avoiding supercoiled worm-like chains including structural transitions of the helix. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017. Dostupné z DOI: 10.1007/978-1-4939-7098-8_23 (cit. na s. 19).
41. GEGGIER, S.; KOTLYAR, A.; VOLOGODSKII, A. Temperature dependence of DNA persistence length. *Nucleic Acids Research*. 2011, **39**(4), 1419–1426. Dostupné z DOI: 10.1093/nar/gkq932 (cit. na s. 20).
42. *AbcLinuxu: hash* [online]. AbcLinuxu [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://www.abclinuxu.cz/slovník/hash> (cit. na s. 22).
43. WELZL, E. Smallest enclosing disks (balls and ellipsoids). In: *New Results and New Trends in Computer Science*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1991, sv. 555, s. 359–370. Dostupné z DOI: 10.1007/BFb0038202 (cit. na s. 22).
44. SEMECHKO, A. *Bounding Spheres and Circles* [online]. 2019 [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://github.com/AntonSemechko/Bounding-Spheres-And-Circles> (cit. na s. 22).
45. VOLOGODSKII, A. V.; LEVENE, S. D.; KLENIN, K. V. et al. Conformational and Thermodynamical Properties of Supercoiled DNA. *Journal of molecular biology*. 1992, **227**, 1224–1243. Dostupné z DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.003141 (cit. na s. 22, 23, 40, 53).
46. VOLOGODSKII, Alexander V. *Topology and Physics of Circular DNA*. Boca Raton: CRC Press, 1992. ISBN 0849342287 (cit. na s. 23).
47. DELAGE, E.; PERROT, Y.; INCERTI, S. Hands-On on geometries: pdb4dna. In: *Geant4-DNA Tutorial*, Hiroshima, Japan, 2015. Dostupné také z: <https://indico.esa.int/event/82/contributions/3243/attachments/2616/3038/HandsOn-pdb4dna.pdf> (cit. na s. 27).

48. THE GEANT4-DNA COLLABORATION. *G4EmDNAChemistry_option1.cc* [online] [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: https://github.com/Geant4/geant4/blob/master/source/physics_lists/constructors/electromagnetic/src/G4EmDNAChemistry_option1.cc (cit. na s. 28).
49. TRAN, H.; MEYLAN, S.; STEPAN, V. et al. Hands-On: Chemistry examples. In: *Geant4-DNA Tutorial*. Hiroshima, Japan, 2015. Dostupné také z: <https://indico.esa.int/event/82/contributions/3256/attachments/2617/3039/HandsOn-chemistry.pdf> (cit. na s. 28).
50. KANEMOTO, A. et al. RBE and OER within the spread-out Bragg peak for proton beam therapy: in vitro study at the Proton Medical Research Center at the University of Tsukuba. *Journal of Radiation Research*. 2014, **55**(5), 1028–1032. Dostupné z DOI: 10.1093/jrr/rru043 (cit. na s. 31).
51. *PSTAR: Stopping Power and Range Tables for Protons: Water, Liquid* [online]. NIST [cit. 2021-06-17]. Dostupné z: https://physics.nist.gov/cgi-bin/Star/ap_table.pl (cit. na s. 31, 47, 48).
52. *Electa: Leksell Gamma Knife Icon* [online]. Electa [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.elekta.com/radiosurgery/leksell-gamma-knife-icon> (cit. na s. 31).
53. *CDC: Radioisotope Brief: 60-Co* [online]. Centers for Disease Control a Prevention [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/emergencies/isotopes/cobalt.htm> (cit. na s. 31).
54. ANDO, K. et al. *TRS No. 461 Relative Biological Effectiveness in Ion Beam Therapy*. Vídeň: International Atomic Energy Agency, 2008. ISBN 978-92-0107807-0 (cit. na s. 31).
55. *X-Ray Mass Attenuation Coefficients: Water, Liquid* [online]. NIST [cit. 2021-07-01]. Dostupné z: <https://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/ComTab/water.html> (cit. na s. 32).
56. PEUKERT, D.; INCERTI, S.; KEMPSON, I. et al. Validation and investigation of reactive species yields of Geant4-DNA chemistry models. *Medical Physics*. 2019, **46**(2), 983–998. Dostupné z DOI: 10.1002/mp.13332 (cit. na s. 32).
57. LISOWSKA, H.; CHENG, L.; SOLLAZZO, A. et al. Hypothermia modulates the DNA damage response to ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes. *International Journal of Radiation Biology*. 2018, **94**(6), 551–557. Dostupné z DOI: 10.1080/09553002.2018.1466206 (cit. na s. 33).
58. SINGH, V.; JOHANSSON, P.; TORCHINSKY, D. et al. Quantifying DNA damage induced by ionizing radiation and hyperthermia using single DNA molecule imaging. *Translational Oncology*. 2020, **13**(10), 100822. Dostupné z DOI: 10.1016/j.tranon.2020.100822 (cit. na s. 33).
59. LEHNERT, S. *Biomolecular Action of Ionizing Radiation*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2008. ISBN 978-0-7503-0824-3 (cit. na s. 34).

60. DE LA FUENTE ROSALES, L.; INCERTI, S.; FRANCIS, Z.; BERNAL, M. A. Accounting for radiation-induced indirect damage on DNA with the Geant 4-DNA code. *Physica Medica*. 2018, **51**, 108–116. Dostupné z DOI: 10.1016/j.ejmp.2018.06.006 (cit. na s. 34).
61. MOKARI, M.; ALAMATSAZ, M. H.; MOEINI, H.; TALEEI, R. A simulation approach for determining the spectrum of DNA damage induced by protons. *Physics in Medicine & Biology*. 2018, **63**(17), 175003. Dostupné z DOI: 10.1088/1361-6560/aad7ee (cit. na s. 35).
62. PACHNEROVÁ BRABCOVÁ, K.; SIHVER, L.; UKRAINTSEV, E. et al. How detection of plasmid DNA fragmentation affects radiation strand break yields. *Radiation Protection Dosimetry*. 2019, **183**(1–2), 89–92. Dostupné z DOI: 10.1093/rpd/ncy222 (cit. na s. 35, 57).
63. PACHNEROVÁ BRABCOVÁ, K.; JAMBOROVÁ, Z.; MICHAELIDESOVÁ, A. et al. Radiation-induced plasmid DNA damage: effect of concentration and length. *Radiation Protection Dosimetry*. 2019, **186**(2–3), 168–171. Dostupné z DOI: 10.1093/rpd/ncz196 (cit. na s. 36, 59).
64. PACHNEROVÁ BRABCOVÁ, K.; ŠTĚPÁN, V.; KARAMITROS, M. et al. Contribution of indirect effects to clustered damage in DNA irradiated with protons. *Radiation Protection Dosimetry*. 2015, **166**(1–4), 44–48. Dostupné z DOI: 10.1093/rpd/ncv159 (cit. na s. 36).
65. VYŠÍN, L. et al. Proton-induced direct and indirect damage of plasmid DNA. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2015, **54**(3), 343–352. Dostupné z DOI: 10.1007/s00411-015-0605-6 (cit. na s. 36, 60).
66. SUI, L.; WANG, Y.; WANG, X. et al. Clustered DNA damage induced by protons radiation in plasmid DNA. *Chinese Science Bulletin*. 2013, **58**(26), 3217–3223. Dostupné z DOI: 10.1007/s11434-013-5940-x (cit. na s. 36, 61).
67. SCHUEMANN, J. et al. A New Standard DNA Damage (SDD) Data Format. *Radiation Research*. 2018, **191**(1), 76. Dostupné z DOI: 10.1667/RR15209.1 (cit. na s. 36, 58).
68. SCHUEMANN, J.; MCNAMARA, A. L.; WARMENHOVEN, J. W. et al. *Welcome to the documentation of the Standard for DNA Damage (SDD) data format!* [online] [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://standard-for-dna-damage.readthedocs.io/en/latest/index.html> (cit. na s. 36).
69. KRAUSS, F.; NAVAS, S.; RICHARDSON, P.; SJÖSTRAND, T. *53. Monte Carlo Particle Numbering Scheme* [online]. 2019 [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://pdg.lbl.gov/2019/reviews/rpp2018-rev-monte-carlo-numbering.pdf> (cit. na s. 37).
70. *Matlab Documentation: std* [online]. MathWorks [cit. 2021-01-27]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/matlab/ref/std.html> (cit. na s. 40).
71. STEFANOVÁ, K. *GitHub repozitář: Stefanova_smoothing* [online] [cit. 2021-07-14]. Dostupné z: https://github.com/stefakla/Stefanova_smoothing.git (cit. na s. 45, 52).

72. STEFANOVÁ, K. *GitHub repozitář: Stefanova_pdb4dna_chem* [online] [cit. 2021-07-14]. Dostupné z: https://github.com/stefakla/Stefanova_pdb4dna_chem.git (cit. na s. 46, 52).
73. STEFANOVÁ, K. *GitHub repozitář: Stefanova_sdd_format* [online] [cit. 2021-07-15]. Dostupné z: https://github.com/stefakla/Stefanova_sdd_format.git (cit. na s. 46, 52, 58).
74. STEFANOVÁ, K. *Bitbucket repozitář: Stefanova_vliv* [online] [cit. 2021-08-01]. Dostupné z: https://bitbucket.org/stefakla/stefanova_vliv (cit. na s. 52).
75. *Matlab Documentation: signrank* [online]. MathWorks [cit. 2021-07-30]. Dostupné z: <https://www.mathworks.com/help/stats/signrank.html> (cit. na s. 53).
76. *MetaCentrum wiki: Matlab* [online]. CESNET MetaCentrum [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://wiki.metacentrum.cz/wiki/Matlab> (cit. na s. 56).
77. PACHNEROVÁ BRABCOVÁ, K.; SIHVER, L.; YASUDA, N. et al. Clustered DNA damage on subcellular level: effect of scavengers. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2014, **53**(4), 705–712. Dostupné z DOI: 10.1007/s00411-014-0557-2 (cit. na s. 57).
78. XU, X.; NAKANO, T.; TSUDA, M. et al. Direct observation of damage clustering in irradiated DNA with atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*. 2020, **48**(3), e18. ISSN 0305-1048. Dostupné z DOI: 10.1093/nar/gkz1159 (cit. na s. 57).
79. SEDLÁK, A. *Mikrodozimetrie a její aplikace*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0100 (cit. na s. 57).
80. MILLIGAN, J. R.; AGUILERA, J. A.; WARD, J. F. Variation of Single-Strand Break Yield with Scavenger Concentration for Plasmid DNA Irradiated in Aqueous Solution. *Radiation Research*. 1993, **133**(2), 151–157. Dostupné z DOI: 10.2307/3578350 (cit. na s. 57).
81. DO, T. T.; TANG, V. J.; KONIGSFELD, K. et al. Damage clusters after gamma irradiation of a nanoparticulate plasmid DNA peptide condensate. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2012, **51**, 43–52. Dostupné z DOI: 10.1007/s00411-011-0388-3 (cit. na s. 57).
82. *MetaCentrum VO* [online]. CESNET MetaCentrum [cit. 2020-06-30]. Dostupné z: <https://metavo.metacentrum.cz/cs/> (cit. na s. 58).