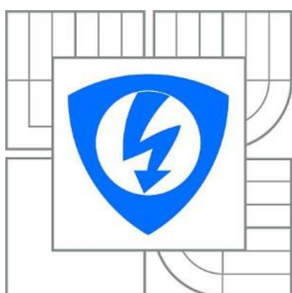




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

STUDIUM DOBY ŽIVOTA A SPEKTRÁLNÍCH ZMĚN FLUORESCENCE NANOČÁSTIC V BUNĚČNÉ BIOLOGII

STUDY OF FLUORESCENCE LIFETIME AND SPECTRAL CHANGES OF NANOPARTICLES IN
CELL BIOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

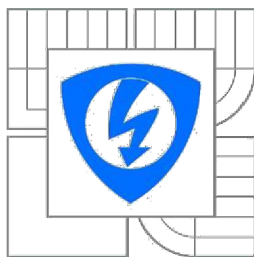
Bc. PAVEL PELC

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Pavel Pelc

ID: 137241

Ročník: 2

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Studium doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Provedte literární rešerši v oblasti konfokální mikroskopie a využití měření doby života fluorescence v buněčné biologii. 2) Seznamte se s možností využití laditelného laseru (WLL) a funkce řízení doby otevření detektoru (TimeGate). Seznamte se s technikou spektrálního skenu využívající WLL. 3) S aplikací WLL, funkce TimeGate a detekce hybridními detektory pořídte sadu fluorescenčních intenzitních snímků a současně spektrálních snímků organického barviva u živočišné buňky. 4) Navrhněte schéma algoritmu pro znázornění spektrální změny současně se změnami v době života fluorescence. 5) Realizujte navržený algoritmus včetně vytvoření grafické reprezentace a 3D rekonstrukce posunutých spektrálních dat. Ve výsledku získáte snímky v různých spektrálních oblastech, na nichž bude v pseudobarvách vyobrazena doba života fluorescence sledovaných nanočástic. 6) Provedte diskusi nad chováním nanočástic v konkrétní aplikaci.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. Principles in Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York: Plenum Press, 1993. ISBN-13: 978-0387312781
[2] GOLDMAN, Robert D., SPECTOR, David L. Live Cell Imaging: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. ISBN-13: 978-0879698935

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 22.5.2015

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor diplomové práce nesmí při vytváření diplomové práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii. Popisuje princip fluorescence, fluorescenční mikroskopii a laserový konfokální mikroskop Leica TCS SP8. Je zde přiblížena klasická metoda FLIM, mapování Lambda Square a rozdělení nanočástic. V praktické části je popsán realizovaný program pro hodnocení doby života fluorescence a spektrálních změn. Program umožňuje zobrazovat excitačně-emisní lambda mapy, dobu života fluorescence a spektrální posun v prostorové oblasti. V závěru práce je proveden experiment s rhodaminovými nanočásticemi, který je pomocí realizovaného programu vyhodnocen a diskutován.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, fluorescenční mikroskopie, bílý pulzní laser, spektrum, buňka, FLIM

ABSTRACT

This work deals with the study of fluorescence lifetime and spectral changes of nanoparticles in cell biology. It describes the principle of fluorescence, fluorescence microscopy and laser confocal microscope Leica TCS SP8. The classic FLIM method, the Lambda Square mapping and the division of nanoparticles are introduced there. In the practical part, the created program for the evaluation of fluorescence lifetime and spectral changes is described. The program can show two-dimensional lambda maps, the fluorescence lifetime and spectral shift in the space area. In the final part of the thesis, an experiment with rhodamine nanoparticles is carried out and it is evaluated using the created program and then discussed.

KEYWORDS

Fluorescence, fluorescence microscopy, white light laser, spectrum, cell, FLIM

Bibliografická citace:

PELC, P. *Studium doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 72 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Studium doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009Sb.

V Brně dne

podpis autora

Poděkování

Děkuji panu Ing. Vratislavu Čmielovi za odborné vedení, cenné rady a doporučení při tvorbě této diplomové práce. Zároveň děkuji panu Mgr. Josefu Skopalíkovi za poskytnutí buněk k měření a cenné rady při jejich vyhodnocování.

V Brně dne

.....
podpis autora (autorky)

Obsah

1	Úvod	8
2	Fluorescence	10
2.1	Princip fluorescence (Jablonského diagram)	10
2.2	Základní pravidla a charakteristiky fluorescence	12
2.2.1	Charakteristiky fluorescence	12
2.2.2	Pravidla fluorescence	12
2.3	Fluorofory	13
2.3.1	Fluorescenční značky	14
2.3.2	Fluorescenční sondy	14
2.3.3	Fluorescenční indikátory	14
2.4	Doba života fluorescence	15
2.4.1	Autofluorescence a doba života	17
3	Fluorescenční mikroskopie	18
3.1	Konfokální mikroskopie	19
3.1.1	Laserový rastrovací konfokální mikroskop	20
3.1.2	Mikroskop s rotujícím diskem	21
3.2	Srovnání klasické fluorescenční a fluorescenční konfokální mikroskopie	21
4	Laserový konfokální mikroskop LEICA TCS SP8	22
4.1	Bílý pulzní laser (WLL)	22
4.1.1	Akusticko-optický laditelný filtr (AOTF)	23
4.2	Akusticko-optický rozdělovač paprsků (AOBS)	24
4.3	Hybridní detektory (HyDs) a porovnání s klasickým PMT	26
4.3.1	Funkce TimeGate (LightGate)	27
4.4	Spektrální detektory (SP)	27
4.4.1	Funkce Lambda sken	28
5	Analýza buněk fluorescenčním mikroskopem	29
5.1	Klasická Metoda FLIM a její aplikace	29
5.1.1	Snímání místního prostředí	30
5.1.2	Detekce molekulárních interakcí pomocí FLIM-FRET	30
5.1.3	Rozlišování fluorescence a fluorescenčních značek	30
5.1.4	Autofluorescence a rozlišování tkání	30
5.1.5	FLIM a materiály	30
5.2	Mapování Lambda Square (λ^2)	31
5.2.1	Využití Lambda Square	32

5.3	Nanotechnologie a nanočástice	33
5.3.1	Zlaté nanočástice.....	34
5.3.2	Stříbrné nanočástice	34
5.3.3	Nanočástice tvořené oxidy železa	34
5.3.4	Kvantové tečky	35
5.4	Živočišná buňka a její stavba	36
5.4.1	Plazmatická membrána	36
5.4.2	Cytoplazma	36
5.4.3	Buněčné jádro	36
5.4.4	Golgiho komplex	37
5.4.5	Endoplazmatické retikulum	37
5.4.6	Mitochondrie.....	37
5.4.7	Lyzozomy	37
5.4.8	Cytoskelet	38
6	Praktická část.....	39
6.1	Použité buňky	39
6.1.1	Mezenchymální buňky	39
6.1.2	Kardiomyocyty	40
6.1.3	Získané fluorescenční snímky	42
6.1.4	Získané spektrální snímky	43
6.2	Metoda zobrazení doby života fluorescence	44
6.3	Metoda zobrazení 2D lambda skenu	45
6.4	Metoda zobrazení 2D spektrálního posunu	50
6.5	Uživatelské prostředí (GUI)	54
7	Vyhodnocení výsledků	56
7.1	Hodnocení spektrálních změn u buněk kardiomyocytů	56
7.2	Hodnocení chování rhodaminových nanočástic v konkrétním experimentu.....	59
8	Závěr.....	63
	Seznam použité literatury	64
	Seznam obrázků	68
	Seznam tabulek.....	69
	Seznam pojmů	69
	Seznam tlačítek a prvků programu	70

1 Úvod

Velké množství současných znalostí, jež vedly k pochopení mnoha biologických procesů, vychází z možnosti přímé vizualizace. Ze široké škály různých zobrazovacích technik se v biologických vědách často preferuje fluorescenční mikroskopie, a to zejména díky možnosti specifického značení sledovaných molekul a možnosti jejího využití na živých buňkách. Fluorescenční mikroskopie jako první umožnila vizualizovat struktury cytoskeletu eukaryontních buněk. V buněčné biologii je hojně využívána k identifikaci buněčných organel, složek cytoskeletu nebo ke sledování biochemických dějů. Rozvoj širokého množství pokročilých fluorescenčních technik přispěl k tomu, že se fluorescenční mikroskopie stala významnou součástí výzkumných procesů v biologii a biomedicině.

Tato diplomová práce se zabývá studiem doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii. Práce obsahuje teoretickou a praktickou část, jež jsou pro snadnější orientaci v textu členěny do dílčích podkapitol. Text je vhodně doplněn názornými ukázkami v podobě schématických obrázků a získaných snímků.

V teoretické části se práce snaží přiblížit a popsat základní principy a charakteristiky fluorescence a fluorescenční mikroskopie, věnuje se také základnímu rozdělení fluoroforů, nanočásticím a stavbě živočišné buňky. Hlavní důraz je kladen na popis laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8. Je zde popsán princip bílého pulzního laseru (WLL), akusticko-optických laditelných filtrů (AOTF) a rozdělovače paprsků (AOBF). Dále jsou přiblíženy přednosti hybridních detektorů a jejich porovnání s klasickými PMT detektory. Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 umožňuje použití mnoha pokročilých funkcí a technik, ze kterých je zde zmíněna funkce excitačně-emisního 2D lambda skenu (slouží k vykreslení charakteristiky intenzity fluorescence pro zvolenou oblast excitace a emise, v literatuře někdy označovaný jako fluorescenční spektrogram) a funkce TimeGate. Protože se práce zaměřuje na studium doby života a spektrálních změn fluorescence, je zde nastíněna klasická metoda FLIM společně s excitačně-emisním mapováním Lambda square a jejich využitím.

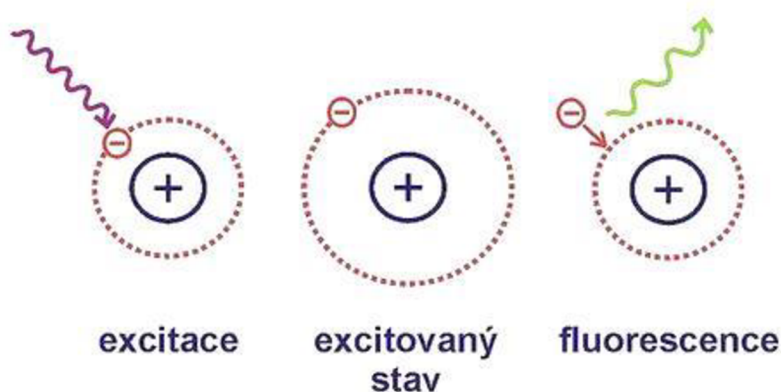
V praktické části jsou nejprve krátce popsány druhy použitých buněk a jejich fluorescenční barviva. Dále je uveden stručný popis nastavení, při kterém byly fluorescenční a spektrální snímky daných buněk získány. Po dohodě s vedoucím práce je praktická část zaměřena na zobrazení a hodnocení 2D excitačně-emisních map (2D fluorescenčních spektrogramů) ze snímků, které mikroskop získává pomocí funkce 2D lambda skenu. Na základě navržené metody je v prostředí Matlab realizován program s uživatelským prostředím. Prostředí umožňuje uživateli přehledně zobrazovat dobu života fluorescence a hodnotit spektrální změny fluorochromů v různých místech vzorku a za různých fyzikálně-chemických podmínek.

V práci jsou popsány a vysvětleny jednotlivé části programu a metody jejich realizace včetně blokových schémat. Program umožňuje ze sady fluorescenčních snímků zobrazit dobu života fluorescence v prostorové oblasti vzorku, která je pak vykreslena v pseudobarvách. Pro hodnocení spektrálních změn byl navržen a realizován algoritmus, jenž umožňuje mapování Lambda square stejně jako software mikroskopu. Výhodou je možnost zpracování naměřených dat v offline režimu mimo softwarové prostředí mikroskopu a vzájemné porovnávání dvou různých oblastí zájmu ve vzorku. Hodnocení spektrálních změn bylo navíc doplněno o zobrazení posunu maxima excitace a emise a o zobrazení Stokesova posunu v prostorové oblasti celého snímku.

V závěru práce je popsán experiment rhodaminových nanočástic na mezenchymálních buňkách, jež byly vystaveny fixačním činidlům – paraformaldehydu a etanolu. Pomocí realizovaného programu je zobrazeno, popsáno a zhodnoceno chování rhodaminových nanočástic i spektrálních změn u buněk kardiomyocytů.

2 Fluorescence

Atomy se nachází buď v základním energetickém stavu s minimální hodnotou energie elektronů, nebo ve stavech excitovaných (Obr. 1). K excitaci (vybuzení) dochází, jestliže atomům dodáme energii a elektrony začnou obsazovat vyšší energetické hladiny. Tento excitovaný stav ale není stabilní, vzápětí dochází k přeskoku elektronů zpět na původní energetickou hladinu a tím dochází k deexcitaci. Atom při tomto procesu vyzáří kvantum elektromagnetického záření rovné rozdílu energie elektronových hladin. Takto vzniklé elektromagnetické záření je označováno jako luminiscence. Podle délky trvání dělíme luminiscenci na fluorescenci a fosforescenci. Fluorescenci je možné pozorovat během buzení a po jeho vypnutí ihned vymizí, doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s. Fosforescence se liší tím, že má delší dobu dohasínání než fluorescence (obvykle milisekundy až sekundy), a proto i po odstranění buzení přetrvává. [14], [19], [41]

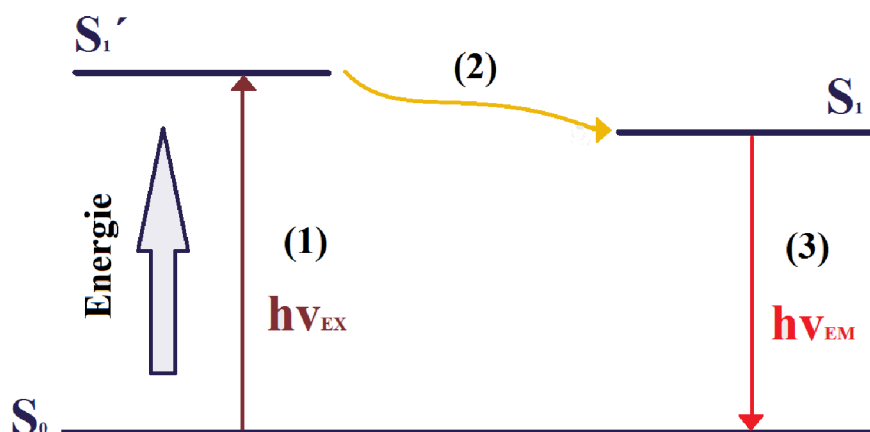


Obr. 1: Excitace a fluorescence [36]

2.1 Princip fluorescence (Jablonského diagram)

Fluorescence je charakteristická pro fluorescenční barviva a fluorofory, což jsou molekuly obsahující aromatické uhlovodíky nebo heterocykly. Příkladem může být fluorescein nebo rhodamin B. Princip fluorescence nejlépe ilustruje Jablonského diagram (Obr. 2), který fluorescenci popisuje jako třístupňový proces složený z buzení, excitovaného stavu a emise.

První stupeň je excitace neboli buzení a začíná nejprve ozářením fluoroforu elektromagnetickým zářením o určité vlnové délce z externího zdroje, kterým je nejčastěji žárovka nebo laser. Emitovaný foton s energií $h\nu_{\text{EX}}$ je fluoroforem vstřebán a dochází k excitaci. K té dochází přechodem elektronů ze základní hladiny S_0 do vyšší energetické hladiny S_1' .



Obr. 2: Princip fluorescence

Druhým stupněm je excitovaný stav, který ale trvá velmi krátce, obvykle 1 až 10 nanosekund. Během této doby fluorofor prochází mnoha konformačními změnami, a také interaguje vzájemně s molekulovým prostředím. Část energie S_1' je předána ve formě tepelné energie do okolí, čím se dosáhne relaxovaného excitačního stavu S_1 .

Třetím stupněm je emise, kdy je zbývající energie $h\nu_{EM}$ vyzářena ve formě fluorescenčního fotonu, což způsobí návrat fluoroforu do svého základního stavu S_0 . Vyzářená energie $h\nu_{EM}$ je menší ale s delší vlnovou délkou než energie $h\nu_{EX}$ emitovaného fotonu. Rozdíl energií ($h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$) nebo také vlnových délek se nazývá Stokesův posun, který má zásadní význam pro citlivost fluorescenčních technik.

Pomocí fluorescence se ale nedostanou do základního stavu S_0 všechny původně excitované molekuly. Během celého procesu dochází k dalším nezářivým dějům, jako je například vnitřní konverze, fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET) a mezi systémové křížení. Proto je vhodné jako měřítko relativního rozsahu zmínit kvantový výtěžek fluorescence Φ (1). Ten je dán poměrem počtu fluorescenčních fotonů emitovaných, k počtu fotonů absorbovaných. Kvantové výtěžky fluorescence jsou výrazně nižší než 1. Největší kvantové výtěžky mají rhodaminové fluorofory a fluorescein. [13], [25], [29]

$$(1) \text{ Kvantový výtěžek } \Phi \quad \Phi = \frac{N_{emit}}{N_{absorb}}$$

- N_{emit} je počet fotonů vyzářených látkou ve formě fluorescence
- N_{absorb} je počet fotonů látkou absorbovaných

2.2 Základní pravidla a charakteristiky fluorescence

Pro proces fluorescence jsou typické určité znaky a pravidla, kterými se řídí. Níže jsou přiblíženy některé z nich.

2.2.1 Charakteristiky fluorescence

Zářivý tok Φ : Představuje energii procházející v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času. Jednotkou zářivého toku je watt (W). [17]

Intenzita záření (Plošná hustota zářivého toku): Je definovaná jako měrná veličina zářivého toku na jednotku plochy. Jednotkou je watt na metr čtvereční (W/m^2). [17]

Polarizace: Je směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny. Nastává, pokud je roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením a molekuly mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace. Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti.

Doba života fluorescence: Představuje průměrnou dobu, kterou fluorofor stráví v excitovaném stavu vzhledem k rychlosti jeho přechodu do základního stavu. Obecně je doba života fluorescence kolem 10^{-9} s.

Koherenční vlastnosti: Jsou vztahy mezi fázemi světelných vln.

Spektrální charakteristika fluoroforu: Rozlišujeme emisní a excitační spektrum pro daný fluorofor. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence (W/m^2) na vlnové délce při zvolené konstantní vlnové délce budícího záření. Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření. Pro každé fluorescenční barvivo je charakteristické určité excitační a emisní spektrum. Detailní charakteristikou fluoroforu je pak konstrukce excitačně-emisního spektrogramu, který se zobrazuje nejčastěji jako prostorový nebo 2D vrstevnicový graf zobrazující intenzity fluorescence jako funkci dvou proměnných. [8], [14]

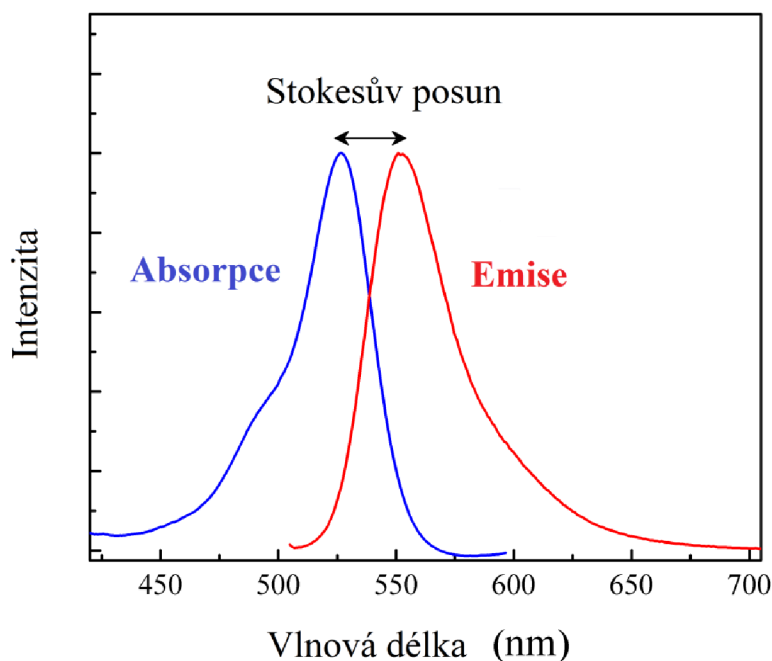
2.2.2 Pravidla fluorescence

Stokesův posun: Je definován jako rozdíl maxim excitačního a emisního fluorescenčního spektra (viz Obr. 3). Energie vyzářená při emisi je menší (ale s delší vlnovou délkou) než energie pohlcená při absorpci. Tento rozdíl energií je způsoben energetickými ztrátami, ke kterým dochází u většiny fluorescenčních molekul. Stokesův posun tedy popisuje snížení energie emitovaného záření a zvětšení jeho vlnové délky. [14], [25]

Kashovo pravidlo: Toto pravidlo říká, že tvar emisního spektra fluorescence je vždy stejný, bez ohledu na velikosti vlnové délky excitačního (budícího) záření. Při excitaci na vyšší vibrační hladiny se přebytečná energie rychle rozptýlí a fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S1. [14], [25]

Vavilův zákon: Je důsledkem Kashova pravidla a říká, že kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul nezávisí na vlnové délce excitačního záření. [14], [25]

Zrcadlové pravidlo: Toto pravidlo platí pro velké množství organických molekul a říká, že emisní spektrum je zrcadlovým obrazem excitačního spektra. Je to z toho důvodu, že vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Výjimku tohoto pravidla tvoří molekuly, které mají rozdílné geometrické uspořádání atomových jader v excitovaném a základním stavu. [14], [25]



Obr. 3: Stokesův posun [36]

2.3 Fluorofory

Fluorofory jsou molekuly, jež mají schopnost fluorescence. Základním předpokladem fluoroforů je schopnost absorpce světla určité vlnové délky a následná schopnost emise světla s delší vlnovou délkou. Mezi fluorofory názvoslovně řadíme i tzv. fluorochromy, ty mají stejné fyzikální vlastnosti, avšak jsou to látky, které se přirozeně nevyskytují ve zkoumaném vzorku, ale uměle je navazujeme na určitou strukturu jako značku. Jejich využití je hlavně ve značení biologických vzorků. Fluorofory někdy dělíme do dvou základních skupin, na fluorofory vnitřní a fluorofory vnější. Vnitřní fluorofory se vyskytují v přírodě samostatně a

jsou schopné vlastní fluorescence. Vnější fluorofory jsou přidávány ke vzorkům, které vlastní fluorescenční schopnosti nemají. [14]

Zásadní podíl na vlastní fluorescenci některých buněk mají hlavně proteiny, enzymové kofaktory, cytochromy, myoglobin, vitamíny a mnohé další molekuly, které jsou v daných buňkách přirozeně obsaženy. Hlavními fluorofory v proteinech jsou aromatické aminokyseliny jako tryptofan (Try), tyrozin (Tyr) a fenylalanin (Phe), jejichž absorpční pás leží mezi 240 a 300 nm. Existuje i několik tříd proteinů, které mají vlastní fluorescenci při delších vlnových délkách, příkladem mohou být fykobiliproteiny, které absorbují od 470 do 650 nm. Jejich výhodou je intenzivní dlouhověnná excitace a emise, velký Stokesův posun a vysoký kvantový výtěžek emise. Vlastní fluorescence jsou dále schopné již zmíněné enzymové kofaktory, hlavně NADH (Nikotinamidadenindinukleotid), FAD (Flavinadenindinukleotid) a pyridoxal fosfát. [14]

Vnější fluorofory mají mnohem širší a častější použití v moderní biologii a biofyzice než vnitřní fluorofory. Přidáváme je ke studovaným vzorkům a podle způsobu, jakým se na něj vážou, je dělíme na fluorescenční značky, fluorescenční sondy a fluorescenční indikátory.

2.3.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se nejčastěji používají ke značení proteinů. Vážou se kovalentní vazbou na jejich thiolové skupiny nebo na aminové, sulfhydrylové a histidinové boční řetězce. Používají se v mnoha aplikacích v imunologii, histochemii, afinitní chromatografii, atd. Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou FITC (fluoresceinizothiokynát) a TRITC (tetrametylrhodaminizothiokyanát), které se používají v imunofluorescenčních metodách. [14]

2.3.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy se ke sledované struktuře vážou nekovalentní vazbou a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Existují tisíce sond, jejichž správný výběr je klíčový pro experimenty ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě vlastnosti fluorescenčních sond umožňují získat potřebné informace. Z mnoha typů sond je vhodné zmínit například sondy citlivé na polaritu prostředí (ANS, TNS), DNA sondy (DAPI, TOTO, ethidium bromid) a proteinové sondy (SYPRO). [14]

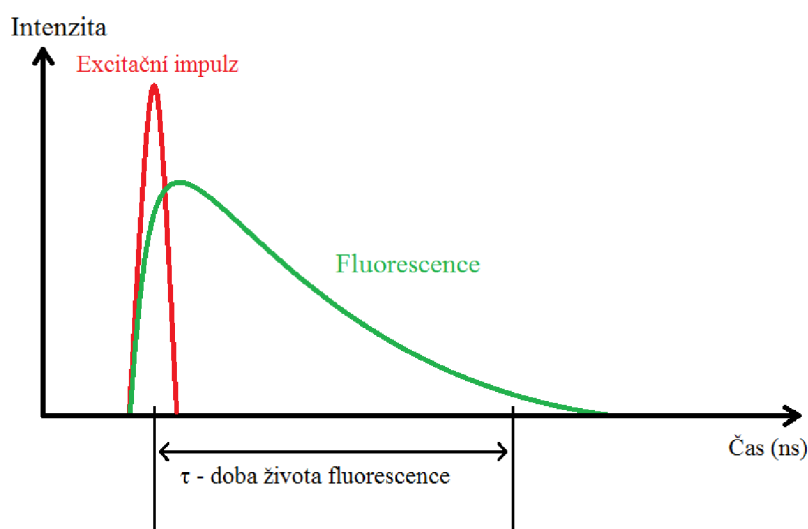
2.3.3 Fluorescenční indikátory

Mezi fluorescenční indikátory řadíme takové fluorofory, které vykazují spektrální citlivost na určité látky. U těchto fluoroforů dochází ke spektrálnímu posunu v závislosti na přítomnosti určité látky nebo vykazují zvýšení intenzity fluorescence bez spektrálního posunu v přítomnosti dané látky. Příkladem může být PBFI, což je fluorescenční indikátor citlivý na draslík, nebo indikátor SNARF-5F citlivý na pH. Dalšími jsou indikátory Fura-2 vykazující

spektrální posun v přítomnosti Ca^{2+} a indikátor Calcium green, který vykazuje zvýšenou intenzitu fluorescence bez spektrálního posunu v přítomnosti Ca^{2+} .

2.4 Doba života fluorescence

Doba života fluorescence je definována jako průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do základního stavu. Při návratu do základního stavu dochází k vyzáření fluorescenčního fotonu. Obecně se doba života fluorescence pohybuje kolem 10^{-9} s (Obr. 4). Doba života fluorescence nezávisí na koncentraci fluoroforu, absorpci, tloušťce vzorku nebo intenzitě excitace, ale spíše na biologických vlastnostech, jako je pH, teplota, struktura fluoroforu, koncentrace kyslíku, změna prostředí, nebo vazba s různými molekulami. [16], [40]



Obr. 4: Doba života fluorescence

Pro měření doby života fluorescence je důležité objasnit si její parametr τ . Předpokládejme, že vzorek obsahující fluorofory je excitován nekonečně ostrým světelným impulzem, který způsobí v počáteční populaci fluoroforů (n_0) excitovaný stav. Excitovaný stav populace fluoroforů se rozkládá s mírou $\Gamma + K_{nr}$ podle:

$$(2) \quad \frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + K_{nr})n(t)$$

Kde $n(t)$ je počet excitovaných molekul v čase t po excitaci, Γ je míra emise a K_{nr} je míra nezářivého útlumu. Emise je náhodný jev, a proto má každý excitovaný fluorofor stejnou pravděpodobnost v daném čase emitovat foton, což má za následek exponenciální pokles excitovaného stavu populace:

$$(3) \quad n(t) = n_0 e^{-t/\tau}$$

Ve fluorescenčních experimentech nepozorujeme počet excitovaných molekul, ale intenzitu fluorescence, která je úměrná $n(t)$, a proto můžeme rovnici (3) zapsat jako závislost intenzity fluorescence na čase $I(t)$:

$$(4) \quad I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Kde I_0 je počáteční fluorescence v čase 0, τ je doba života fluorescence a t je čas. Doba života fluorescence je tedy průměrný čas, který fluorofor stráví v excitovaném stavu. Pokles průměrné doby, kdy fluorofor zůstává v excitovaném stavu, je roven době života fluorescence. [7]

Měření doby života fluorescence zahrnuje nesmírně velké pole vědy. Od poloviny 19. století rozvoj fluorescenčních technik přispěl k velkým objevům v oblasti chemie a fyziky. V posledních dvou dekadách vývoj techniky měření doby života fluorescence přispěl k řadě objevů v biologii a medicíně. Prvotní výzkumná činnost doby života fluorescence se zaměřovala pouze na chemické a biologické analyty, v dnešní době tato technika nachází svou cestu v rychle se rozvíjející oblasti molekulárního zobrazování. [3]

Zobrazování doby života fluorescence může být prováděno buď přímo pomocí měření doby života fluorescence pro každý pixel a generování mapy doby života fluorescence měřeného objektu, nebo pomocí časově řízených experimentů (TimeGate), kde intenzita fluorescence pro každý pixel je určena po krátkém časovém intervalu a následně je vytvořena mapa intenzity fluorescence. Zatímco první metoda se obecně používá pro monitorování funkčních změn v důsledku faktorů životního prostředí, druhá metoda (TimeGate) nabízí velký potenciál k odstranění nežádoucího pozadí fluorescence a zvýšení kontrastu zobrazování. [3]

Zobrazování doby života fluorescence je velmi užitečná fluorescenční metoda, neboť umožňuje provádět měření v mnoha fázích, jako jsou: plyny, kapaliny, pevné látky, nebo jejich libovolná kombinace. Přínosem je i možnost aplikace této metody v širokém prostorovém měřítku od jednotlivých molekul přes buňky až po části lidského těla. Všestrannost zobrazování doby života fluorescence umožňuje její použití v různých studijních oblastech, jako jsou materiálové vědy, umění, letectví, zemědělství, biologie a medicína. Nedávné pokroky v laserové technice, výpočetním výkonu a zobrazovacích algoritmech rozšířily možnost uplatňovat metody doby života fluorescence v lékařském zobrazování. Díky své schopnosti poskytovat jedinečné a doplňující diagnostické informace se předpokládá bezproblémová integrace této metody také do rodiny molekulárních zobrazovacích nástrojů. [3]

2.4.1 Autofluorescence a doba života

Před stovkami let bylo zjištěno, že některé biologické látky mají schopnost vnitřní fluorescence dnes známou jako autofluorescence. Nejstarší zpráva o autofluorescenci byla zveřejněna v 16. století, kdy byla poprvé pozorována modrá záře extraktu z mexického dřeva, v Evropě známého jako *Lignum nephriticum*. S vynálezem fluorescenčního mikroskopu v roce 1908, bylo možné se začít zabývat studiem autofluorescence. Od této doby bylo nalezeno, izolováno a syntetizováno velké množství fluorescenčních materiálů, které emitují v rozsahu od 250 do 800 nm. [3]

Význam autofluorescence pro studium buněk a tkání spočívá především v jejím potenciálu pro diagnostické aplikace, a také jako výzkumný nástroj pro pochopení základních mechanismů molekulárních interakcí a signalizačních procesů v rámci svých přirozených podmínek. Nejdůležitějšími autofluorofory v buňkách a tkáních jsou aminokyseliny, základní stavební kameny bílkovin a enzymů, dále NADH a FAD, které regulují buněčný metabolismus. Dalšími autofluorofory jsou porfyriny, které vznikají jako vedlejší produkty u savců a tvoří zásadní prvek absorbující světlo u rostlin. Dále jsou to strukturní proteiny odpovědné za tuhost a pružnost tkání a orgánů, a také fluorescenční pigmenty, jež jsou markery mnoha patologických stavů souvisejících s věkem. [3]

Zobrazování autofluorescence je atraktivní metoda, protože nevyžaduje složité postupy barvení in vitro, nebo podávání exogenních molekulárních činidel in vivo. Nicméně s komplexní povahou autofluorescence je spojena řada problémů včetně obtížné interpretace obrazů doby života fluorescence, což omezuje její široké aplikace. Problémem je přítomnost řady fluoroforů s odlišnými dobami života fluorescence. Například doba života fluorescence tryptofanu v bílkovinách se liší v závislosti na prostředí a pozici ve vztahu k ostatním fluoroforům. Pro zjednodušení zobrazování je nutný pečlivý výběr excitačních a emisních podmínek, které potlačují nežádoucí fluorescenci z jiných autofluorescenčních struktur. [3]

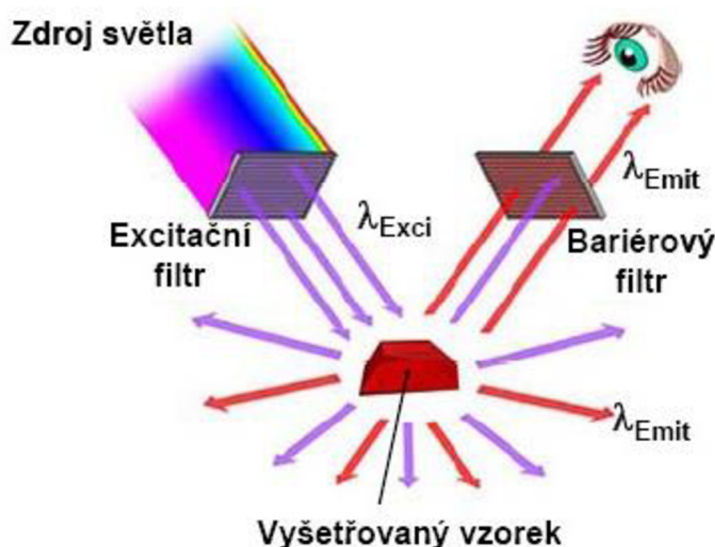
Tabulka 1: Příklad některých fluoroforů odpovědných za autofluorescenci [3]

Fluorofor	Excitace (nm)	Emise (nm)	Doba života fluorescence (ns)
fenylalanin	258 (max) 240-270	280 (max)	7,5
tyrosin	275 (max) 250-290	300 (max)	2,5
tryptofan	280 (max) 250-310	350 (max)	3,03
NAD(P)H volný	300-380	450-500	0,3
NAD(P)H protein	300-380	450-500	2.0-2.3
FAD	420-500	520-570	2,91
melanin	300-800	440,520, 575	0.1/1.9/8
kolagen	280-350	370-440	≤ 5.3
elastin	300-370	420-460	≤ 2.3

3 Fluorescenční mikroskopie

Historie prvního fluorescenčního mikroskopu, který vycházel z konstrukce mikroskopu pro UV záření, sahá až na počátek 20. století. Přínos této techniky nebyl doceněn několik desetiletí. V dnešní době fluorescenční mikroskopie patří mezi nejcennější nástroje pro studium buněk a buněčných částí mikroorganismů. Fluorescenční mikroskopy využívají schopnost některých látek (fluoroforů) absorbovat světlo určité vlnové délky a toto světlo následně emitovat jako viditelné světlo o delší vlnové délce. Použitím vhodných fluoroforů je možné rozlišit jednotlivé buněčné prvky, jako jsou - buněčná jádra, chromozomy, jadérka, cytoskelet, proteiny, lipidy, polysacharidy a další buněčné struktury. Konstrukce klasického fluorescenčního mikroskopu je velice podobná běžnému světelnému mikroskopu, odlišností je doplnění o velice silný zdroj světla a dva typy filtrů. První filtr (excitační) se nachází mezi zdrojem světla a vzorkem a umožňuje excitovat fluorofory světlem o potřebné vlnové délce, druhý filtr (bariérový) propouští pouze emisní část spektra a je umístěn mezi vzorkem a okulárem (Obr. 5).

Jednou z hlavních komplikací fluorescenční mikroskopie je fotobleaching (vysvěcování, fotovybělování). Ten způsobuje, že fluorofory jsou intenzivním zářením postupně rozkládány a ztrácejí tak schopnost absorpce a emise. Při absorpcích a následných emisích navíc dochází k uvolňování volných radikálů, které mohou poškozovat fluorofory, a také narušovat životaschopnost buněk. Při práci se živými buňkami je proto zásadní omezit jejich expozici světelným zářením z vysokoenergetických zdrojů. Toho je možné dosáhnout s využitím clon, jež vpouštějí excitační světlo do vzorku pouze při expozici, a také použitím velmi citlivých kamer nebo fotonásobičů. [9], [33], [36], [42]

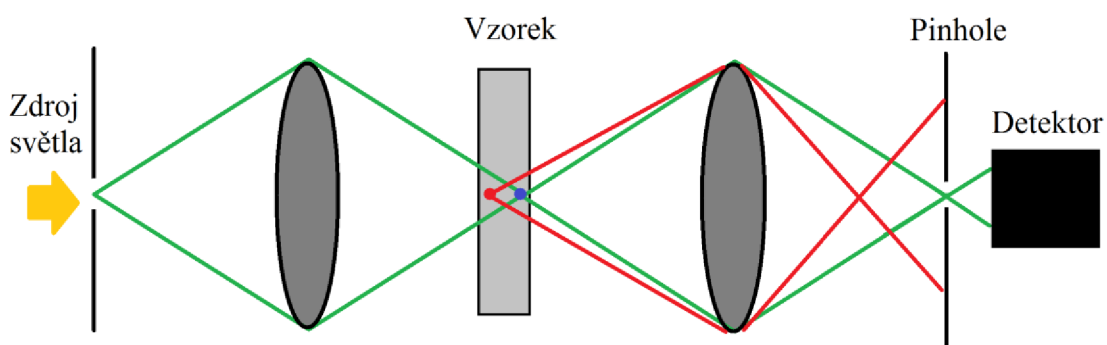


Obr. 5: Princip fluorescenční mikroskopie [36]

3.1 Konfokální mikroskopie

Dnes jsou kladeny stále větší nároky pro zobrazování velmi jemných struktur buněk, různých součástek a materiálů se snahou o co nejpřesnější měření. K těmto účelům slouží konfokální mikroskop, jehož hlavní předností je vysoká rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Samostatný princip konfokálního mikroskopu byl patentován již v roce 1957. Velkou výhodou konfokální mikroskopie je především potlačení signálu nad a pod rovinou zaostření a možnost snímání sérií optických řezů, jejichž skládáním můžeme rekonstruovat pozorovaný objekt. Oproti klasickému fluorescenčnímu mikroskopu je u této metody potřeba silného zdroje světla typu laser, speciální technologie pro detekci fotonů z roviny ostrosti a výkonný PC. Všechny tyto nároky se negativně odrážejí na ceně přístroje, který je pak několikanásobně dražší. [36], [35], [22], [31]

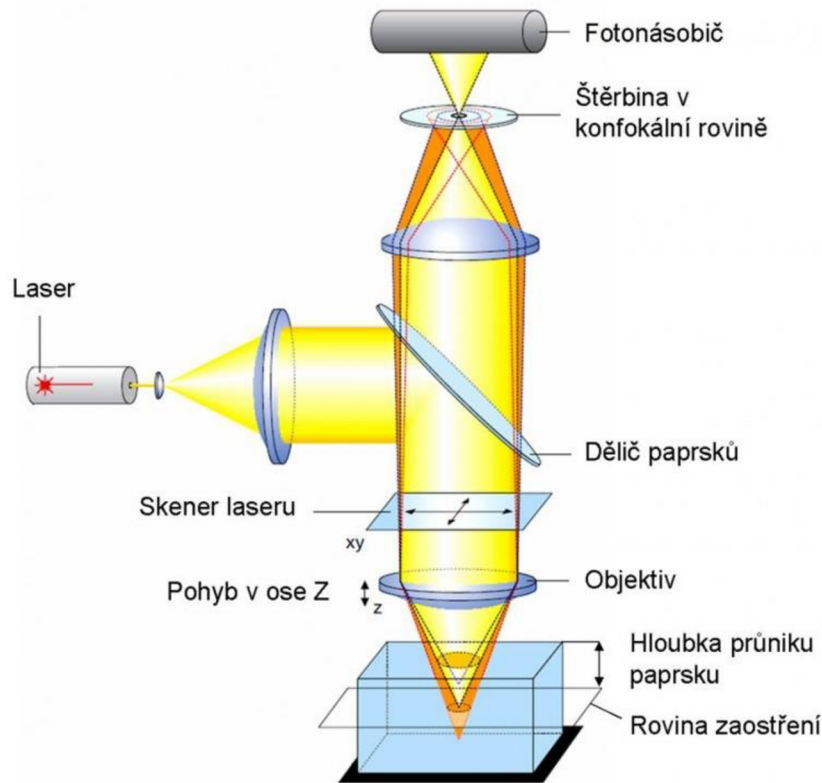
Základní princip je založený na tom, že světlo přicházející z fokálního bodu čočky objektivu dává ostrý obraz. Světlo z jiného bodu než fokálního je také zobrazeno čočkami mikroskopu, ale jeho obraz není ostrý. U konfokálního mikroskopu je použita bodová clonka (pinhole), která odfiltruje neostrý obraz (Obr. 6). Pinhole musí být konjugována s fokálním bodem čočky, čím získáme konfokální pinhole. Pokud by byla pinhole menší, ztratili bychom užitečné světlo, pokud by byla pinhole větší, pronikalo by více světla mimo ohnisko. Z uspořádání konfokálního mikroskopu vyplývá, že v jednom kroku získáme informaci pouze o jednom bodě, a proto pro získání celého obrazu je nutné řádkování bod po bodu. Podle mechanismu rastrování rozlišujeme základní dvě konstrukce - rastrující konfokální mikroskop a konfokální mikroskop s rotujícím diskem. [22], [36]



Obr. 6: Bodové ohnisko konfokálního mikroskopu [36]

3.1.1 Laserový rastrovací konfokální mikroskop

LSCM (Laser Scanning Confocal Microscope) = Laserový rastrovací konfokální mikroskop (Obr. 7). Tento typ mikroskopu obsahuje skenující zařízení, které posouvá ohnisko excitujícího laserového paprsku. Obraz zaostřené roviny se pak získává rastrováním (řádkováním) bod po bodu. Pomocí řádkování jsou tedy snímány optické body v rovině XY a díky přesně definovanému posuvu objektivu v ose Z i jednotlivé optické řezy. Pomocí počítače je pak možno sestavit i velmi čistý 3D obraz. [35], [36]



Obr. 7: Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu [2]

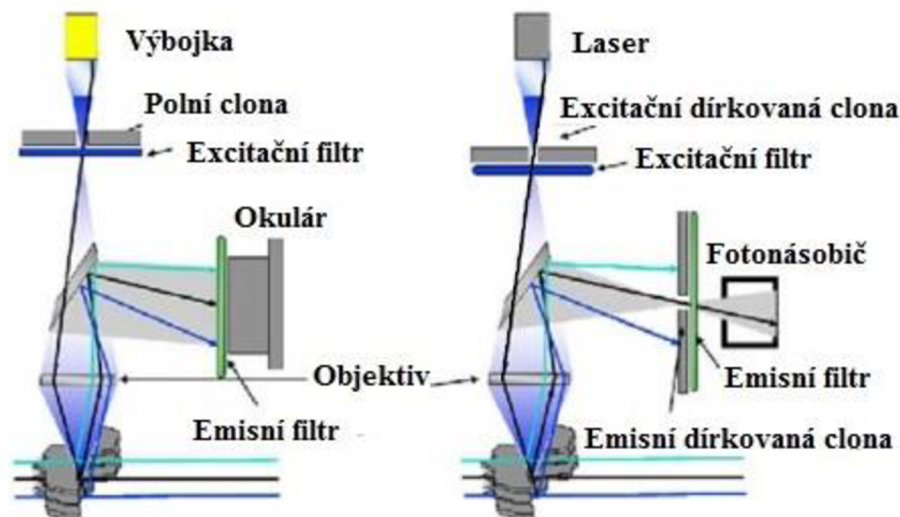
Úzký svazek paprsku z laseru směřuje skrz excitační filtr a první konfokální clonu na dichroické zrcátko, které jej skrz objektiv zaměří na určitý bod preparátu. Preparát musí být umístěn v ohniskové rovině, která je určena skenujícím zařízením. Odražené (= emitované) světlo prochází zpět objektivem, dichroickým zrcátkem přes bariérový filtr na druhou konfokální clonu (pinhole), která odfiltruje až 95% emitovaného světla. Světlo nesoucí potřebnou informaci z ohniskové roviny dopadá na detektor, kterým je obvykle fotonásobič. Výsledkem jsou souřadnice X a Y daného bodu. Rastrováním bod po bodu počítač sestaví obraz celého preparátu v zaostřené rovině XY. Laserový rastrovací konfokální mikroskop je v současné době nejpoužívanějším typem pro biomedicínské výzkumné aplikace. [35], [36]

3.1.2 Mikroskop s rotujícím diskem

TSCM (Tandem Scanning Confocal Microscope) = mikroskop s rotujícím diskem. Tento druhý typ mikroskopu obsahuje Nipkowův kotouč, což je rychle rotující perforovaná destička tvořená navzájem oddělenými clonkami. Přes tuto destičku se světlo zaměří na zkoumaný objekt a umožní tak zobrazit několik bodů preparátu najednou. Snímání touto technikou je rychlé, díky čemuž na pozorovaný objekt působí světlo s nižší intenzitou. Tato metoda je tedy vhodná pro pozorování rychlých dějů, které jsou přítomny v živých buňkách. Nipkowův kotouč rotuje rychlostí v desítkách Hz a může obsahovat až stovky tisíc otvorů uspořádaných v Archimedových spirálách. Vzorek je obvykle pozorován okulárem v reálném čase nebo pomocí chlazené CCD kamery. [35], [36]

3.2 Srovnání klasické fluorescenční a fluorescenční konfokální mikroskopie

Klasická fluorescenční mikroskopie předpokládá nekonečně malou tloušťku vzorku. Pokud bychom zkoumali silnější vzorky, docházelo by k překrývání zaostřené obrazové roviny neostrými obrazy rovin ležícími pod a nad ní, proto lze zkoumat jen vzorky o menší tloušťce, než je hloubka ostroty objektivu. Nespornou výhodou konfokálního fluorescenčního mikroskopu je vyšší rozlišovací schopnost, která je dána detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu, kdy pinhole eliminuje neostrý signál. Výhodou je i možnost optické tomografické 3D rekonstrukce, která není limitována Rayleighovým kritériem. Nevýhodou konfokálního mikroskopu je několikanásobně vyšší cena, potřeba silného zdroje světla jako jsou lasery a speciální technologie detekce fotonů (Obr. 8). [36]



Obr. 8: Fluorescenční a konfokální mikroskopie [36]

4 Laserový konfokální mikroskop LEICA TCS SP8

Mikroskop Leica TCS SP8 patří mezi nejmodernější konfokální mikroskopy. Vyznačuje se vysokou rychlostí, optimální účinností, vysokým kontrastem získaného obrazu a zachováním vysoké životaschopnosti zkoumaných buněk. K detekci slouží velmi citlivý vysokorychlostní snímací systém, který je schopen získat až 428 snímků za sekundu, a také velké zorné pole umožňující zkoumat i nejnáročnější vzorky.

Zdrojem světla je bílý pulsní laser (WLL), který umožňuje nastavit až 200 různých vlnových délek pro širokou škálu fluorescenčního barvení. Výhodou je možnost nastavit až 8 vlnových délek současně. Kombinací excitace pomocí bílého laseru a detekce pomocí hybridních detektorů (HyD) je možné nakombinovat přibližně 200 milionů kombinací excitace a emise. Díky této možnosti libovolného nastavení je možné snížit fototoxicitu na minimální úroveň. Leica TCS SP8 je dále vybavena AOBS (akusticko-optický rozdělovač paprsků), který je schopen rychle přepínat a ladit jednotlivé vlnové délky a zároveň neovlivňovat emisi pro důležitý signál.

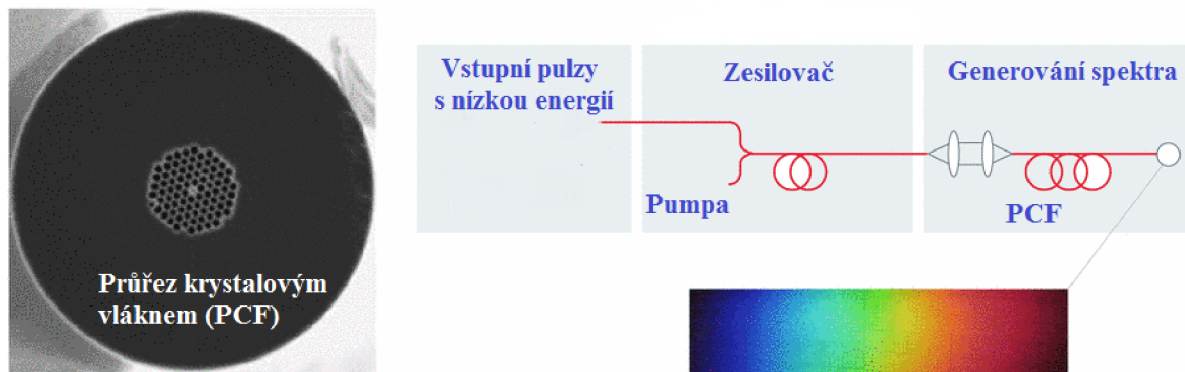
Velkou výhodou je pulsní režim WLL laseru, jehož taktovací frekvence se přesně hodí ke studiu doby života fluorescence, která je obvykle od 0,5 až do 5 ns. Intervaly mezi jednotlivými pulsy je možné měnit, díky čemuž je Leica TCS SP 8 vhodný nástroj pro měření doby života fluorescence. [23], [26]

4.1 Bílý pulzní laser (WLL)

Klasické lasery obvykle vyzařují světlo v úzkém paprsku, který je monochromatický – jednobarevný. Některé plynové lasery mohou vyzařovat současně několik barevných kanálů. Příkladem je plynový argonový laser, jenž vydává modrozelené světlo. Dalšími typy jsou barevné lasery, které sice jsou laditelné, ale vyzařují v čase pouze jednu konkrétní barvu. Kromě toho je tento typ barevných laserů nestabilní a vyžaduje složitější nastavení. Dále existují laditelné pevné lasery, ty je však možné ladit pouze v infračervené oblasti. Mimo jejich vysokou složitost a náročnost i ony mohou emitovat pouze jednu vlnovou délku v čase a proces jejich ladění je velmi pomalý. Situace se změnila s vynálezem světelných zdrojů, které emitují světlo v širokém rozsahu vlnových délek současně a mají schopnost jej zaostřit stejně jako klasický laser. [23]

Mezi takovéto zdroje patří bílý pulzní laser (WLL), který se skládá z pulzního IR vláknového laseru, jež emituje pulzy s frekvencí kolem 80 MHz. Tyto pulzy jsou následně na diodově-pumpovém laserovém zesilovači zesíleny. Takto vzniklé vysokoenergetické pulzy jsou zaměřeny na vstupní povrch fotonického krystalového vlákna (PCF), v jehož středu jsou duté trubičky (viz Obr. 9). Silně nelineární procesy na povrchu trubičkovité struktury způsobí, že monochromatické světlo se rozšíří do širokého spojitého spektra. [23]

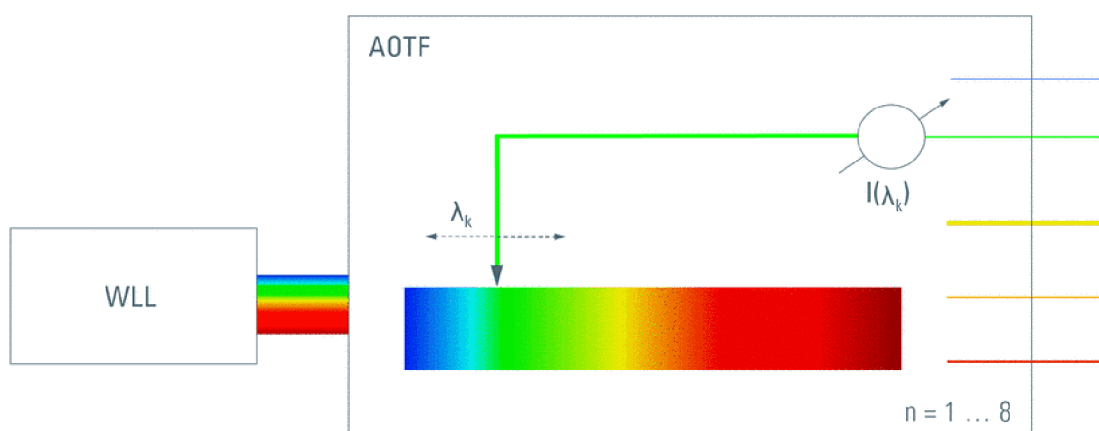
Z takto vzniklého spektra jsou dále pomocí akusticko-optických laditelných filtrů vybrány potřebné laserové excitační barevné proužky – jednotlivé vlnové délky. WLL tak umožňuje plynulé nastavení barvy v oblasti celého spektra od modré až po červenou (470 až 670 nm). [23]



Obr. 9: Vlevo je zobrazen průřez fotonického krystalového vlákna (PCF). Vpravo je schéma WLL. [23]

4.1.1 Akusticko-optický laditelný filtr (AOTF)

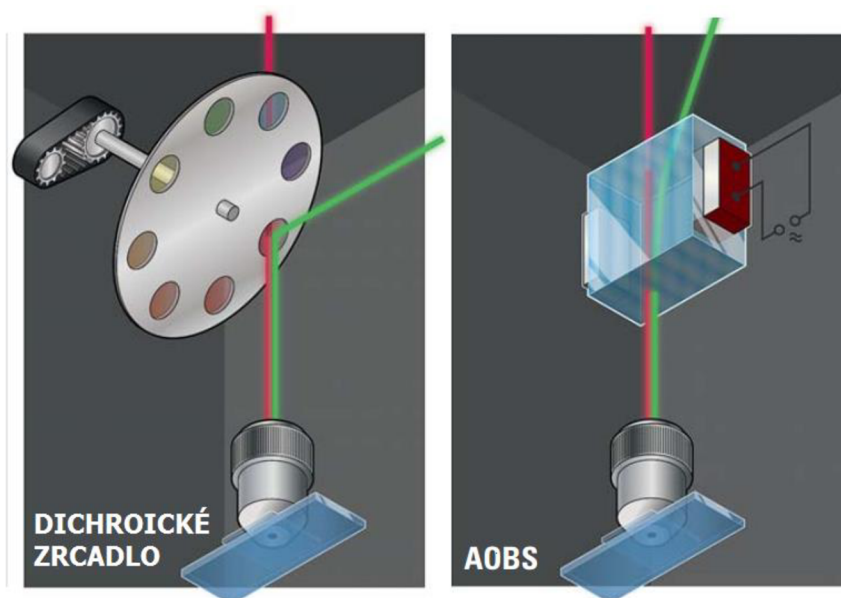
Akusticko-optický laditelný filtr umožňuje vybrat pouze jeden barevný proužek ze spojitého spektra WLL paprsku a odvézt jej do jiného směru, zbytek spektra projde rovně přes krystal (Obr. 10). Pomocí změny frekvence budících mechanických vln jsme schopni nastavit výchylku směru, a tím vybrat potřebný barevný proužek (vlnovou délku). Šířka tohoto proužku je obvykle 1 až 3 nm v závislosti na vlnové délce. Tímto způsobem je možné ze vstupního spektra vybrat jakoukoliv barvu. Přidání dalších elektronických zařízení pro generování mechanických vln v krystalu umožňuje vybrat více barev najednou. Leica TCS SP 8 umožňuje nastavit až osm barev s různou vlnovou délkou současně, což přináší možnost excitovat více různých fluorescenčních barviv v jednom vzorku. [23]



Obr. 10: Ukázka výběru jednotlivých barevných proužků z celého spektra pomocí AOTF. [23]

4.2 Akusticko-optický rozdělovač paprsků (AOBS)

Fluorescenční zobrazování mikroskopu je uspořádáno tak, že excitační světlo vstupuje do vzorku na stejné straně, kde se snímá i emise. Takové uspořádání vyžaduje zařízení, které umožňuje oddělit excitaci od emise. Klasické dichroické zrcadlo propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. V běžné fluorescenční mikroskopii je proto nutné mít pro různé druhy fluoroforů různé kombinace dichroických zrcadel, excitačních a emisních filtrů a ty dle potřeby měnit (Obr. 11). Běžné dichroické zrcadlo by tedy nebylo schopné využít veškeré přednosti laditelného světelného zdroje, jakým je bílý pulzní laser (WLL), a proto společnost Leica vyvinula AOBS. Akusticko-optický rozdělovač paprsků také odděluje excitaci a emise světla, ale ve srovnání s dichroickým zrcadlem pracuje úplně jiným způsobem. Je to aktivní programovatelné zařízení, které je velmi rychlé, flexibilní a efektivní.



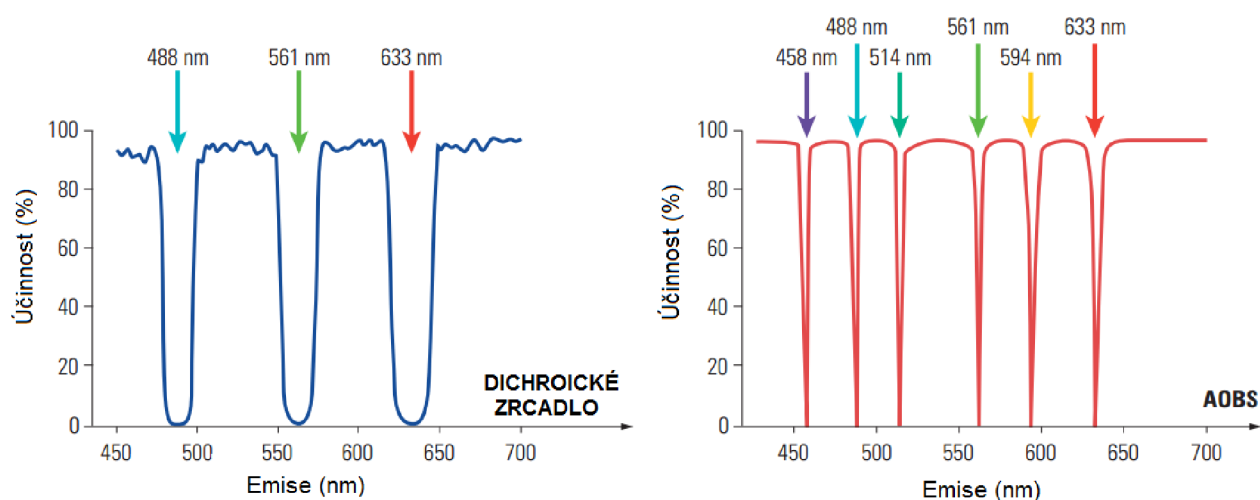
Obr. 11: Porovnání dichroického zrcadla a AOBS. [1]

Akusticko-optický rozdělovač paprsků (AOBS) je zařízení, které přivádí vybrané excitační barevné proužky do optické dráhy mikroskopu a zbytek spektra odvádí do jiného směru. Velkou výhodou je jeho 95% účinnost a možnost přenést až osm vybraných vlnových délek (barevných proužků). AOBS umožňuje, že zvolené excitační barvy projdou na zkoumaný vzorek v podobě excitačního paprsku a kompletní emisní spektrum je pak účinně přeneseno k detekci. Štěrbiny v přenosovém spektru potřebné pro přenesení excitačních proužků na vzorek jsou stejně velké jako samotné excitační proužky (to je umožněno díky použití stejné akusticko-optické technologie). Celý proces je řízen paralelně, jakmile je nastavována určitá excitační barva, elektronika současně ladí odpovídající meziprostor. Ze strany obsluhy není tedy potřeba žádný zásah, vše probíhá plně automaticky. Akusticko-optický rozdělovač paprsků je posledním spojovacím zařízením, díky němuž je možné provádět vícebarevné excitace. [1], [20]

Dělení paprsku pomocí AOBS je založeno na akusticko-optické difrakci (ohyb světla) v krystalu TeO_2 . Pro tento krystal platí velký útlum světla od 400 nm po více než 4 μm . Aplikování radiofrekvenční mechanické vlny vede k periodickým změnám hustoty uvnitř krystalu (zředování a zhušťování). Index lomu krystalu je dán jeho hustotou, a proto ve výsledku je možné akustickými vlnami vytvořit určitý index lomu krystalové mřížky. Mřížková konstanta je variabilní a závisí na frekvenci a amplitudě použité vlny, což umožňuje snadné ladění. Pokud excitační světlo požadované barvy vstupuje do krystalu ve vhodném úhlu, je akusticko-opticky zlomeno a spojeno s hlavním paprskem, který je shodný s optickou osou mikroskopu.

Vzhledem k tomu, že je mřížková konstanta měnitelná, můžeme s optickou osou sloučit jakoukoli barvu. Kromě toho index lomu mřížky AOBS může uložit několik vlnových délek současně, což přináší možnost vícebarevné excitace. Emitované světlo je posunuto o Stokesuv posun, a proto dochází k emisi na jiných vlnových délkách. Tyto emitované vlnové délky prochází krystalem bez ovlivnění indexu lomu jeho mřížky. Výsledná emise je nakonec přivedena do vícekanálového spektrálního detektoru TCS SP8.

Pokud porovnáme přenosové křivky typického trojitého dichroického zrcadla a akusticko-optického rozdělovače paprsků (AOBS) při excitaci na 488, 561 a 633 nm (viz Obr. 12), vyplývají dvě hlavní výhody AOBS. Přenosové křivky AOBS mají strmé hrany a úzká pásma, což umožňuje lepší sběr emisního světla. Druhou výhodou je flexibilita AOBS, která může přenést až osm barevných proužků, čehož se uplatňuje při souběžném zobrazování více fluoroforů. [1]



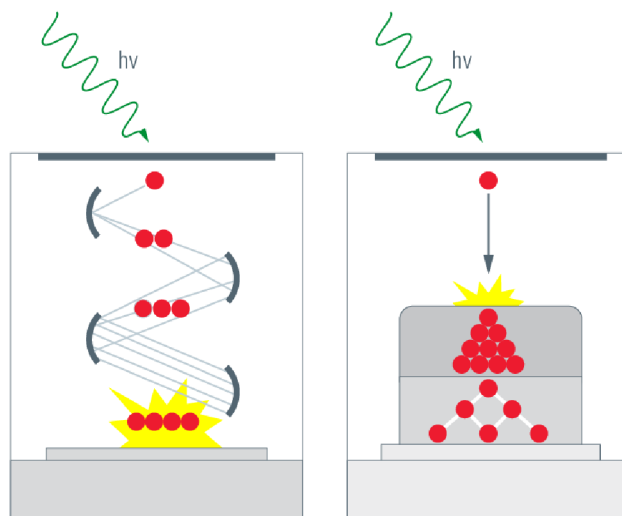
Obr. 12: Porovnání dichroického zrcadla (vlevo) a AOBS, jehož vlnové délky jsou plynule nastavitelné (vpravo) [1]

4.3 Hybridní detektory (HyDs) a porovnání s klasickým PMT

Nejpoužívanější detektory optických signálů jsou fotonásobiče PMT (photomultiplier tube), které se skládají z fotokatody, vstupní elektronové optiky, systému dynod a anody (Obr. 13). Foton dopadne na fotokatodu, na které vyvolá emisi elektronů v důsledku fotoelektrického jevu. Elektrony z fotokatody jsou urychleny k první dynodě, kde každý elektron způsobí emisi několika dalších elektronů. Ty jsou postupně urychlovány k dalším dynodám a celý proces se opakuje. Po sérii zesílení se elektrický signál detekuje na anodě. Fotonásobič může takto detekovat i jednotlivé fotony. Hlavní nevýhodou PMT je jejich nízká kvantová účinnost (poměr mezi dopadajícími fotony a vygenerovaným el. nábojem). [21],[22]

Hybridní detektory (HyDs) společnosti Leica spojují vakuovou technologii (klasický PMT) dohromady s polovodičovou lavinovou technologií (lavinová fotodioda). HyD detektor je vybaven vrstvenou GaAsP fotokatodou, ale na rozdíl od souboru dynod využívá jen jeden krok urychlení. Elektrony z fotokatody jsou urychleny ve vakuu pomocí vysokého napětí, které dosahuje až 8000V. Vysoká kinetická energie urychlených elektronů je následně rozptýlena na křemíkovou vrstvu, kde dochází k lavinovému efektu a k okamžitému až 1500 násobnému zesílení. Konečný signál je pak získán na anodě. Tato konstrukce snižuje náchylnost a riziko poškození detektoru o několik řádů, přičemž kvantová účinnost dosahuje až 45%. Ve srovnání s klasickým fotonásobičem je kvantová účinnost při 500 nm dvojnásobná. [22]

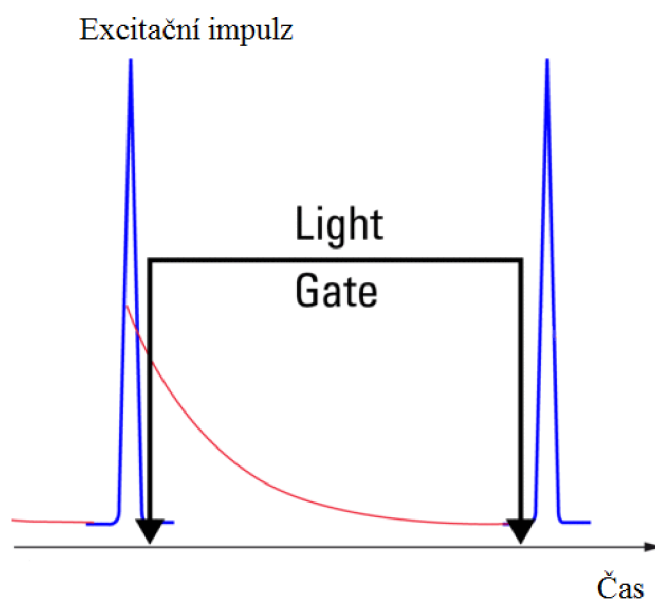
Hybridní detektory (HyDs) dnes patří mezi nejmodernější technologie. Vyznačují se vysokou citlivostí, rychlostí a pokrytím velkého dynamického rozsahu. Výhodou těchto moderních detektorů je, že v kombinaci s pulsním laserem (WLL) umožňují detekovat emisi fluorescence pouze v době mezi světelnými pulsy. Detekovaný signál je pak čistá emise fluorescence, která neobsahuje žádné odražené světlo. [22]



Obr. 13: Vlevo je schéma PMT, vpravo je schéma HyD. [4]

4.3.1 Funkce TimeGate (LightGate)

Tato funkce umožňuje nastavit hybridní detektory tak, že jsou po dobu světelného impulsu vypnuté a nedetekují žádný signál. Tím se umožní detekovat fluorescenční emisi pouze v čase mezi pulzy (Obr. 14). Nastavením určitého časového okna, kdy je detektor otevřen (TimeGate), je možné odstranit nežádoucí fluorescenční signál z obrazových dat. Výsledný obraz potom neobsahuje žádné excitační světlo, má lepší kontrast a poměr signál-šum. Časové okno je možné nastavit na minimální hodnotu 3,5 ns, kdy je detektor otevřen. Posouváním tohoto časového okna je možné získat sadu snímků, které demonstrují postupný pokles fluorescence. [4], [22]



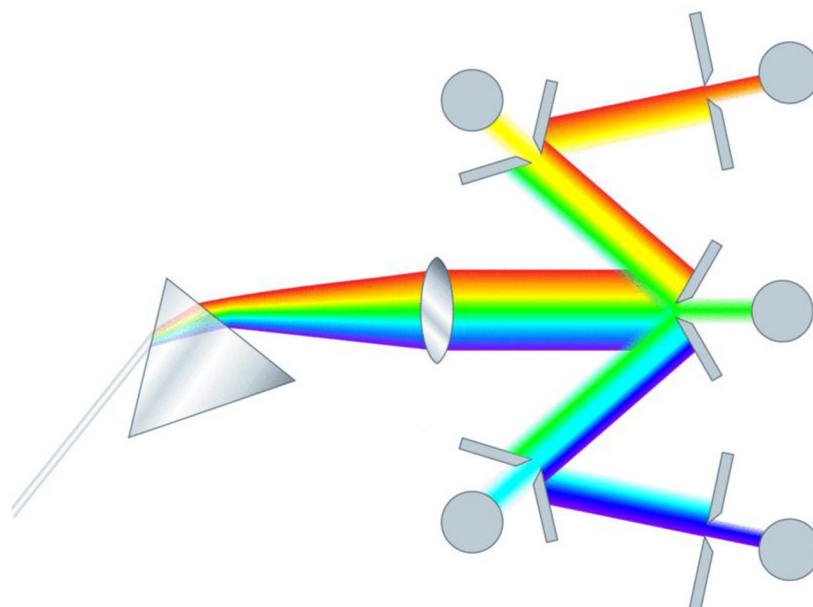
Obr. 14: Funkce LightGate. [4]

4.4 Spektrální detektory (SP)

V minulosti bývaly fluorescenční mikroskopy vybaveny sadou skleněných filtrů. Pokud jsme chtěli použít různé fluorescenční barviva, museli jsme dle potřeby ručně nebo motoricky vybírat mezi příslušnými skleněnými filtry, a tím měnit detekční pásmo.

Zcela jiný přístup pro výběr požadovaného pásma z celého spektra přineslo použití mechanických zařízení. Pokud světlo prochází disperzním prvkem, jakým je hranol nebo mřížka, jsou jeho složky v závislosti na energii prostorově rozptýleny. Moderní fluorescenční metody v biomedicíně vyžadují, aby bylo možné snímat záznam z několika kanálů současně. Proto bylo vyvinuto kaskádové mechanické dělicí zařízení – vícepásmový detekční systém SP (Obr. 15). Tento systém obsahuje vysoce odrazivá posuvná zrcadla, která umožňují rozdělení spektra do dílčích pásů. Štěrbina uvnitř zrcadla přenesou požadované

vlnové pásmo do prvního kanálu a zbytek spektra směřuje prakticky beze ztrát na následující detektory obsahující posuvná zrcadla pro výběr dalšího pásma. Teoreticky je možné mít nekonečný počet takovýchto kaskádových pásmových detektorů. Z praktických důvodů Leica používá 5 takovýchto senzorů. Předností tohoto konceptu je jeho vysoká účinnost a možnost nezávislého nastavení jednotlivých spektrálních pásem. Štěrbiny umožňují přenést 100% požadovaného pásma a zrcadla odrážejí 99 % spektra. [5], [37]



Obr. 15: Detektor SP využívající posuvná zrcadla pro rozdělení spektra do požadovaných pásem. [5]

4.4.1 Funkce Lambda sken

Mikroskop Leica TCS SP 8 je vybaven funkcí 1D lambda skenu, která umožňuje skenovat fluorescenci vzorku napříč zvoleným rozsahem vlnových délek. Tato funkce je velmi užitečná, pokud potřebujeme stanovit fluorescenční vlastnosti neznámého barviva (fluorochromu), nebo vymezit vlastnosti auto-fluorescence samostatného vzorku. V nastavení funkce lambda skenu si uživatel může nastavit rozsah spektra od počáteční po konečnou vlnovou délku, v závislosti na zvolené excitační vlnové délce laseru. Dále je možno nastavit šířku detekovaného pásma s minimální hodnotou 5 nm (minimální hodnota pro detektor) a krok, se kterým bude lambda sken skenovat. Výsledkem bude emisní spektrum fluorescenčního vzorku, pro zadanou excitační vlnovou délku. Podle získaného spektra je možné určit, jaká vlnová délka bude ideální pro excitaci neznámého barviva, aby nedocházelo ke spektrálnímu překrytí. [27]

Mikroskop je dále vybaven funkcí excitačně-emisního 2D lambda skenu (viz kap. 5.2), která umožňuje proměřit fluorescenci vzorku a vykreslit charakteristiky intenzity fluorescence pro zvolenou kombinaci intervalů vlnových délek excitace a emise. Výsledkem je 2D fluorescenční spektrogram (lambda mapa), kde intenzita fluorescence je zobrazena jako funkce dvou proměnných, tj. excitační a emisní vlnové délky (viz Obr. 17).

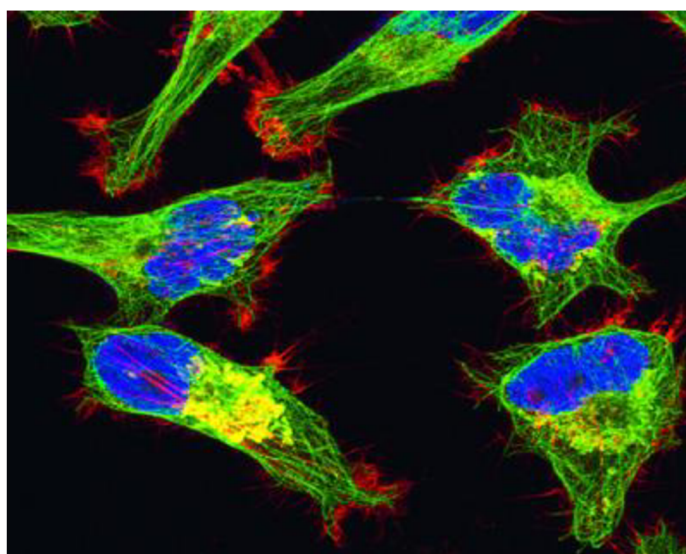
5 Analýza buněk fluorescenčním mikroskopem

5.1 Klasická Metoda FLIM a její aplikace

FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) je fluorescenční zobrazovací technika sloužící k zobrazování životnosti fluorescence jednotlivých fluoroforů ve zkoumaném vzorku. Při návratu excitované molekuly do základního stavu dochází k vyzáření fluorescenčního fotonu. Pomocí detekčního systému se sleduje postupná emise těchto fotonů, která má vždy exponenciální pokles v čase. FLIM zobrazuje různé časové úseky poklesu doby života fluorescence na úrovni pixelů. Výsledkem této metody je obraz zkoumaného vzorku, který nese informace o prostorovém rozložení doby života fluorescence a zároveň informace o jeho struktuře.

K přesnému určení doby života fluorescence se využívá jednotka TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting), která měří čas mezi buzením pulzním laserem a dopadem fotonu na detektor. Tato technika potřebuje ke správnému měření přesně definovaný začátek signálu v podobě laserového impulzu a přesné ukončení pomocí citlivého jedno-fotonového detektoru. Měření této časové prodlevy se mnohokrát opakuje a výsledná naměřená zpoždění jsou seřazena v histogramu, který znázorňuje emisi v čase po počátečním impulzu. Výsledný obraz (Obr. 16) je vytvořen tak, že jednotlivým pixelům jsou přiřazeny fotony v závislosti na čase mezi vybuzením a příchodem na detektor. Abychom získali přesný snímek pomocí metody FLIM, je nutné mít pulsní laserový zdroj světla, citlivý jedno-fotonový detektor a TCSPC jednotku pro měření doby mezi excitací a emisí fluorescence.

Vzhledem k tomu, že doba života fluorescence je závislá na změnách prostředí a biologických vlastnostech vzorku, je metoda FLIM velmi vhodným nástrojem pro funkční zobrazování. [16], [26]



Obr. 16: Snímek získaný klasickou metodou FLIM [15]

5.1.1 Snímání místního prostředí

Doba života fluorescence daného fluoroforu se může různě měnit v závislosti na okolním prostředí, jakým je teplota, pH, polarita, nebo koncentrace iontů. Tlumení excitovaného stavu vnějšími faktory výrazně snižuje dobu života fluorescence. Výsledná zkrácená doba života fluorescence tak poskytuje přesné informace o molekulárním prostředí a dokonce umožňuje kvantitativně znázornit rozdíly mezi tlumenými a netlumenými oblastmi fluoroforu. [16], [40]

5.1.2 Detekce molekulárních interakcí pomocí FLIM-FRET

Zvláštní vliv na dobu života fluorescence má fluorescenční přenos rezonanční energie (FRET). Přenos energie může nastat pouze tehdy, pokud se překrývají donorové emisní a akceptorové excitační spektra a pokud jsou donor a akceptor fluoroforu v těsné blízkosti (obvykle menší než 10 nm). Tento přenos rezonanční energie způsobí pokles emise donoru a nárůst emise akceptoru. Díky tomu FRET společně s poklesem doby života fluorescence slouží jako nástroj k posuzování molekulárních interakcí. [16], [40]

5.1.3 Rozlišování fluorescence a fluorescenčních značek

S rozvojem fluorescenční mikroskopie a stálým vývojem nových fluoroforů je dnes možné rozlišit souběžně probíhající procesy v buňkách za použití více fluorescenčních značek najednou. K této aplikaci je nutné mít fluorofory, které jsou snadno rozlišitelné, ale mají běžně používané spektrální charakteristiky. Počet takových fluoroforů je omezený, a proto se nabízí použití dalšího parametru, jakým je doba života fluorescence. Metoda FLIM dále umožňuje rozlišit fluorescenci od fluorescenčního pozadí vzorku, čím se výrazně zvýší účinnost detekce a zpřesní lokalizaci dané fluorescenční značky. [16], [40]

5.1.4 Autofluorescence a rozlišování tkání

V lékařsky orientovaných aplikacích se často používá autofluorescence, která přináší důležité informace o některých tkáních. Často se pro zobrazení vzorků silnějších tkání používá dvou-fotonová excitace (TPE). První prozkoumanou autofluorescenční sloučeninou, která vykazuje zřetelné rozdíly v době života fluorescence, byl NADH. Autofluorescence je velmi složitý proces, a proto se její výzkum omezuje hlavně na zjišťování specifických rozdílů mezi tkáněmi. Jedná se například o rozlišení nezdravé zubní tkáně, zjištění aterosklerózy, nebo určení malých struktur na sítnici. [16], [40]

5.1.5 FLIM a materiály

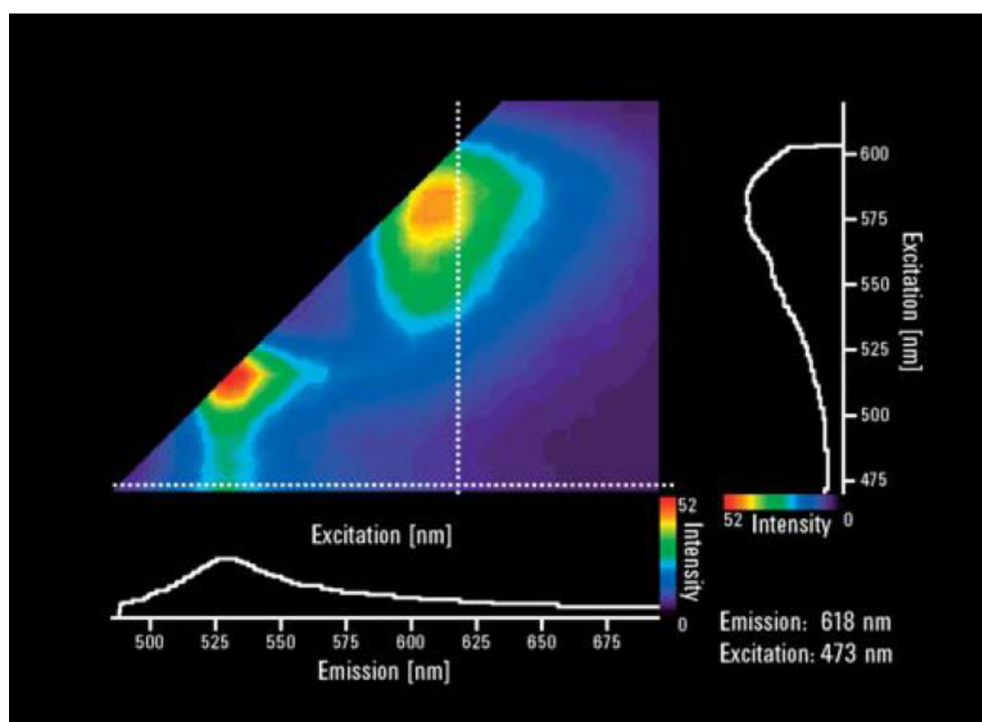
Odvětví materiálových věd se zaměřuje především na výzkum nových typů materiálů používaných v mnoha odvětvích. Častým předmětem výzkumu jsou anorganické materiály užívané pro časově rozlišitelnou fotoluminiscenci (TRPL). Důležitým materiálem v této oblasti výzkumu jsou kvantové tečky, které se používají v široké škále různých aplikací.

Uplatnění nacházejí jako barviva, citlivé solární články, nebo značky v biologických vědách. [16], [40]

5.2 Mapování Lambda Square (λ^2)

Fluorescenční mikroskop Leica je vybaven funkcí excitačně-emisního 2D lambda skenu (výrobce někdy označuje jako Lambda Square), která umožňuje rekonstruovat dvourozměrné spektrum ze série excitačních spekter. Tato excitační spektra jsou získána pro přesně definovaná emisní pásma Leica SP detektoru. Výsledek Lambda Square umožňuje rozlišovat fluorofory, které mají identické nebo velmi podobné excitace a emise.

Mapování Lambda Square (Obr. 17) vztahuje intenzitu fluorescence k excitační a emisní vlnové délce. Pro každou pozici jednoho rozměru λ se získá emisní vlnová délka (λ), pro další rozměr λ se získá excitační vlnová délka (Λ). V podstatě lze říci, že excitační spektrum se zaznamenává pro všechny emisní vlnové délky. Naměřená data pro každou dvojici emise a excitace jsou uložena jako úplné fluorescenční snímky. Software, kterým je mikroskop Leica vybaven, umožní z těchto naměřených dat zobrazit dvojrozměrnou mapu, která vyobrazuje intenzitu fluorescence vzorku jako funkci excitace a emise. Pro každý zaznamenaný pixel platí, že obsahuje všechny fotony dané oblasti. Pro zvýšení poměru signálu k šumu je proto vhodné zvolit určitou oblast zájmu. Mapa Lambda Square sčítá všechny hodnoty v těchto vybraných oblastech a zobrazuje rozložení fluorescence v závislosti na excitační a emisní vlnové délce. [28]

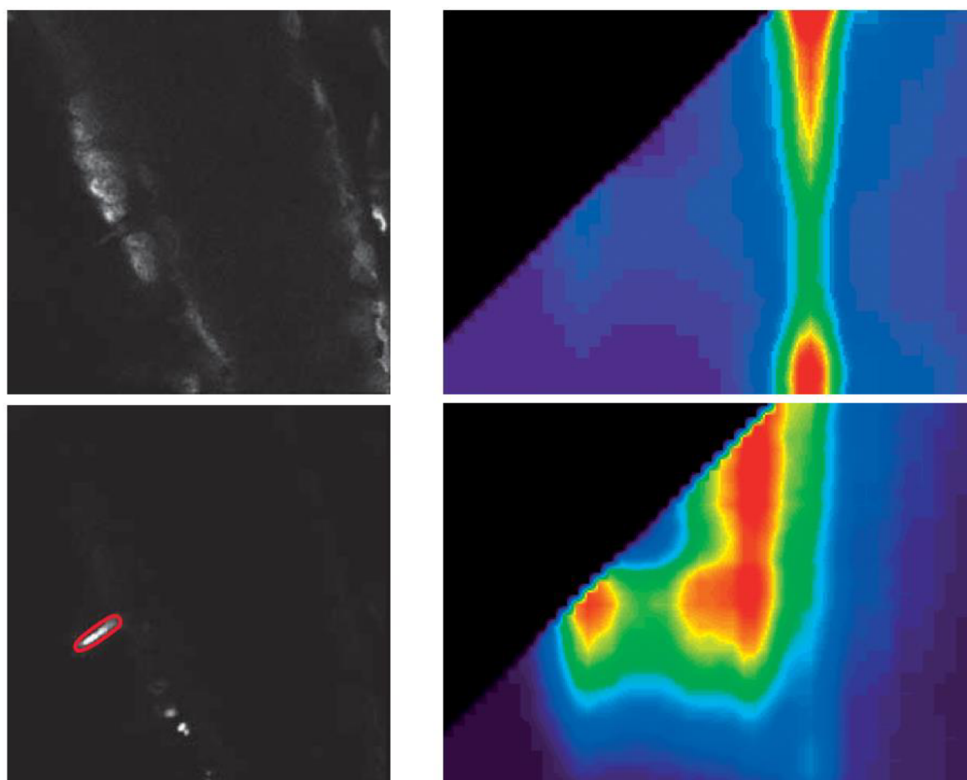


Obr. 17: Výsledná λ^2 mapa mikroskopu Leica. [28]

5.2.1 Využití Lambda Square

Moderní výzkumy v biologii se dnes obvykle zaměřují na vzorky s více fluorofory. Rozlišování těchto fluoroforů pomocí jednoduchého emisního spektra je nedostatečné, protože vrchol spektra se v mnoha případech skládá z více různých příspěvků. Právě tyto příspěvky mohou být nyní odděleny pomocí λ^2 mapy. Díky tomuto mapování můžeme například zobrazit dva vrcholy, které mají podobné emise, ale různé budící (excitační) vlastnosti. Lambda Square mapování je velmi vhodný nástroj pro charakterizaci fluorescence jakéhokoli vzorku. Velmi důležité využití najde i pro známé fluorofory, protože jejich spektrální vlastnosti mohou významně záviset na podmínkách prostředí daných molekul.

Mnoho biologických struktur obsahuje fluorescenční komponenty, které mohou být použity pro zobrazování bez nutnosti externího barvení. Autofluorescence může poskytnout cenné informace o složení funkčních molekulárních komplexů nebo látek, které charakterizují metabolický stav buněk a tkání. Funkce Lambda Square a jeho analytické nástroje umožňují extrahovat a vizualizovat tyto informace jednoduchým způsobem. λ^2 mapování vybraných oblastí zájmů umožňuje zobrazení fluorescenčních příspěvků menších populací a struktur, které nebyly předtím viditelné. Na obrázku níže (Obr. 18) je zobrazena fluorescence celého snímku chlorofylu a vybrané oblasti zájmu. Oblasti celého snímku dominuje dvojitý excitační vrchol. Tento dominantní vrchol překryje téměř všechny detaily z jiných fluoroforů. Výběrem různých oblastí zájmu je možné odhalit více různých fluorescenčních složek. [31]



Obr. 18: λ^2 mapa chlorofylu celého snímku a vybrané oblasti [28]

5.3 Nanotechnologie a nanočástice

S pojmem nanotechnologie se setkáváme až od roku 1974, kdy tímto termínem japonský fyzik N. Taniguchi označil novou metodu výroby součástek s přesností na nanometry. K dalšímu rozvoji tohoto nového interdisciplinárního oboru přispěl objev skenovacího tunelovacího mikroskopu (STM – Scanning Tunneling Microscope) a mikroskopu atomárních sil (AFM – Atomic Force Microscope) v 80. letech. Dnes se tento obor dynamicky rozvíjí a zasahuje do velkého množství odvětví, jako jsou elektronika, biotechnologie, medicína, chemie, fyzika, stavebnictví a mnoho dalších.

Jako nanočástice se obvykle označují částice a struktury molekul a atomů s rozměry od cca 10 nm až do cca 200 nm. Můžeme mezi ně teoreticky zařadit velké množství biologických entit, jako jsou liposomy, organické makromolekuly, viry (10–200 nm) nebo bílkoviny (5–50 nm), ty se však většinou pod pojem nanočástice v odborných textech nezahrnují. V medicíně se nanočástice často uplatňují pro cílenou dopravu léčiv na konkrétní místo, jako kontrastní látky, pro cílenou likvidaci tumorů, nebo jako speciální roztoky a gely. [21], [24]

Nanočástice mohou být tvořeny jedním typem atomu nebo molekuly nebo několika typy molekul. Nanočástice tvořená několika typy molekul může mít například jádro tvořené kovem a obal tvořený škrobem nebo albuminem. Většinou se nanočástice klasifikují podle použitého materiálu: nanočástice zlaté, stříbrné, železité, uhlíkové, zinkové a nanočástice na bázi dalších kovů. Za nejstarší typ nanočástic se dají považovat zlaté nanočástice, které se již několik desítek let používají jako nosiče DNA fragmentů při transfekčních metodách. Nevýhodou je jejich akumulace v organismu. Stříbrné nanočástice se pro svůj účinek začínají využívat jako antibakteriální přípravek. Potenciál mají také v možném navázání na viry HIV vedoucí ke snížení jejich infekčního potenciálu. Nanočástice tvořené oxidy železa se dnes připravují nejčastěji precipitací železnatých a železitých solí, elektrochemickou syntézou, nebo mikro-emulsní technikou. V této práci se pracuje s železitými nanočásticemi, které jsou obalené rhodaminem, což je fluorescenční chemikálie. Hlavním plánovaným účelem těchto rhodaminových nanočástic v budoucnu je označení transplantované buňky (např. v srdci, mozku, v chrupavce, atd.), která pak v dané tkáni svítí pod fluorescenčním mikroskopem. [38]

Některé nanočástice nepronikají do buněk, ale pouze vyplní určitý orgán nebo tělní dutinu a tato oblast je pak kontrastní na MRI. Dále existují nanočástice, které mají takovou povrchovou úpravu, aby se nenavazovaly a nepronikaly do zdravých buněk. Jejich předností je možnost selektivního zachycení až na buňky, které mají specifické markery (například nádorové buňky). Pro biologické experimenty jsou nejdůležitější nanočástice, které vnikají do buňky. Mají takovou povrchovou úpravu, aby selektivně pronikaly do určitých typů buněk, tyto buňky jsou pak v těle kontrastní a lze mapovat jejich lokalizaci. Tyto intracelulární značky jsou použity i v této práci. [38]

5.3.1 Zlaté nanočástice

Tento typ nanočástic patří historicky k nejstarším nanočásticím, které člověk vyrobil. První typ těchto 70 nanometrových nanočástic byl nalezen ve skleněné vrstvě antických pohárů ze 4. století našeho letopočtu a vznikl pravděpodobně náhodně pomocí atypické krystalizace roztoku ve sklářské dílně. Dnešní zlaté nanočástice jsou syntetizovány pomocí řízené redukce solí v roztoku. Nastavením vnějších podmínek jako je pH roztoku, teplota a reakční čas, je možné dobře regulovat velikost a tvar vzniklých nanočástic.

Zlaté nanočástice jsou využívány jako nosiče DNA fragmentů při transfekčních metodách, jako nosiče při transferu biologicky aktivních a farmakologických látek dovnitř buňky, a také jako značka svázaná s protilátkou pro histologické analýzy nebo RTG snímkování. Velkou výhodou zlatých nanočástic je jejich inertnost, a proto nejsou toxické ani při přímém kontaktu s buňkou nebo s vnitřními strukturami. Problémem zlatých nanočástic je jejich akumulace v organismu. Z tohoto důvodu je určena hraniční velikost 5,5 nm pro bezpečnou eliminaci z těla prostřednictvím ledvin. [38]

5.3.2 Stříbrné nanočástice

Stříbro v iontové formě je toxické pro vyšší i nižší organismy. Jeho toxicita klesá s rostoucí složitostí organismu. Z tohoto důvodu nejsou stříbrné nanočástice na rozdíl od zlatých nebo železitých využívány jako transportní systém léčiv, ani jako značky pro zobrazovací techniky in vivo. Jejich hlavní přínos je možnost využívat je jako antibakteriální přípravek nebo jako komponenty ve vodivostních biosenzorech. Stříbrné nanočástice jsou vyráběny nejčastěji redukcí nitrátu stříbra. [38]

5.3.3 Nanočástice tvořené oxidy železa

Železité nanočástice vznikají přírodním procesem při sopečné činnosti. Jejich laboratorní výroba se datuje od poloviny 20. století. Komerční nanočástice na bázi oxidů železa (Fe-NP) se dnes připravují nejčastěji precipitací železnatých a železitých solí, teplotní dekompozicí železo obsahujícího prekurzoru, elektrochemickou syntézou, sol-gel metodami nebo mikro-emulsní technikou.

Železité nanočástice mají časté využití jako nosiče enzymů. Hlavní výhodou je, že po skončení požadované reakce lze enzymy z reakčního prostředí odstranit působením vhodného magnetického separátoru. Dalším využitím Fe-NP jsou magnetické separace. Jedná se o proces, při kterém se nejprve označí požadovaných biologických struktury nebo buňky magnetickými částicemi, a poté dojde k separaci magnetickým polem pomocí magnetického separačního zařízení. Železité nanočástice je možné využívat také jako kontrastní látky zvýrazňující biologické struktury v histologických řezech. Tyto struktury jsou následně po obarvení barvivem zvýrazňující přítomnost železa zobrazovány světelným nebo elektronovým

mikroskopem. Pro zobrazení výskytu kovových nanočástic v biologických strukturách bez nutnosti jakéhokoli dodatečného barvení, je možné k těmto nanočásticím připojit organický fluorochrom (například rhodamin). [38]

5.3.4 Kvantové tečky

Kvantové tečky (QD, „quantum dots“) jsou anorganické polovodičové nanočástice, které nacházejí v biologii podobné uplatnění jako dlouho známé organické fluorofory. V poslední době kvantové tečky pomalu, ale jistě začínají klasické fluorofory v některých aplikacích vytlačovat. Výhodou kvantových teček je vyšší svítivost, menší photobleaching, časová stabilita a také menší spektrální překryvy jednotlivých kvantových teček. Široké uplatnění získávají ve fluorescenční mikroskopii při zobrazování specificky zvýrazněných biologických objektů a struktur. Kvantové tečky jsou polovodičové nanokrystaly o velikosti několika nanometrů (1-20 nm), existují buď samostatně, nebo jsou uspořádány do klastrů. Nejběžnější je uspořádání označující se jako „core/shell“. Jeden typ polovodiče vytváří jádro kvantové tečky (core, např. CdSe) a několik vrstev atomů druhého typu polovodiče vytváří obal kolem tohoto jádra (shell, např. ZnS).

Nejkvalitnější kvantové tečky jsou připravovány v nevodných rozpouštědlech. Tento typ syntézy je však poměrně náročný, vyžaduje práci při vysokých teplotách, a proto se z těchto důvodů více prosazuje příprava kvantových teček ve vodném prostředí. Oba přístupy jsou založeny na vytvoření nanokrystalů v přítomnosti stabilizujících ligandů, které zajistí jejich solvataci (obalení částic rozpuštěné látky molekulami rozpouštědla) v reakčním prostředí. Pro biologické aplikace jsou nejznámější nanokrystaly CdSe a CdSe/ZnS nebo CdTe a CdTe/CdS. Dále jsou také vyvíjeny kvantové tečky tvořené méně toxickými materiály, jako jsou InP nebo ZnS.

Elektrony QD excitované elektromagnetickým zářením přejdou na energeticky vyšší hladinu. Po určité době může dojít k uvolnění této energie a emisi elektromagnetického záření o delší vlnové délce než při excitaci. Na rozdíl od klasických organických fluoroforů není podoba excitačních a emisních spekter dána jen chemickým složením kvantových teček, ale také jejich rozměry. Předností kvantových teček je výborná fotostabilita, která je předurčuje k využití ve fluorescenční mikroskopii. Fluorescenčním značením mikroskopických preparátů pomocí QD, které emitují při různých vlnových délkách, lze barevně odlišit různé buněčné struktury. Nevýhodou QD je jejich chemická stabilita, obsah toxických prvků (nejčastěji Cd, Pb, Hg a Te) a také jejich velikost, která dosahuje jednotek až desítek nm, což může být pro určité aplikace rušivé. Studium kvantových teček a jejich specifických vlastností dnes patří mezi nejvíce se rozvíjející oblasti nanotechnologií. [18], [38]

5.4 Živočišná buňka a její stavba

Buňka je základní stavební jednotkou všech živých organismů a zároveň nejmenším systémem, který je sám o sobě schopen života a rozmnožování (Obr. 19). Během života organismu dochází k neustálé výměně látek uvnitř buňky, mezi jednotlivými buňkami a mezi buňkami a okolním prostředím. Existují jednobuněčné organismy (např. bakterie), kde buňka představuje celý organismus. Mnohobuněčné organismy jsou složeny z velkého počtu buněk, které jsou integrované tak, aby jednotlivé části těla vykazovaly jednotné chování. Mnohobuněčné organismy se vyvíjí z jediné buňky, která se postupně dělí, až dojde k vytvoření celého dospělého jedince. [6], [20]

5.4.1 Plazmatická membrána

Živočišná buňka je ohraničena plazmatickou membránou (buněčná membrána, plazmalema), která se skládá z proteinů a lipidů. Základ tvoří lipidová dvojvrstva obklopená vnitřními a vnějšími membránovými bílkoviny, které jsou zcela nebo částečně do lipidové dvojvrstvy zanořeny. Plazmatická membrána je semipermeabilní (polopropustná), a proto kontroluje a řídí pohyb různých látek a sloučenin do buňky a ven. Podílí se na mnoha buněčných procesech jako adheze, difuze, výměna iontů nebo buněčná signalizace. [6], [20]

5.4.2 Cytoplazma

Cytoplazma je průhledná viskózní látka, která vyplňuje vnitřní prostor buňky a obsahuje jemné struktury a buněčné organely. Z velké části je tvořena vodou, ve které jsou rozpuštěny různé anorganické látky a enzymy. Cytoplazma dále tvoří prostředí pro chemické reakce (např. glykolýza). [6], [20]

5.4.3 Buněčné jádro

Buněčné jádro (nukleus) je nejnápadnější organela celé buňky obvykle kulovitěho tvaru. Jeho velikost se pohybuje od 5 do 10 μm . Tenká blanka obalující jádro se nazývá jaderný obal a je tvořeno dvěma paralelními membránami. Obě membrány spolu splývají a vytvářejí jaderné póry, které umožňují výměnu látek s okolní cytoplazmou. Uvnitř jádra je chromatin, který je tvořen stočenými vlákny DNA a proteiny. Základní strukturální jednotkou chromatinu je nukleosom, který se skládá z centra tvořeného čtyřmi páry histonů, okolo kterého je navinuta dvoušroubovice DNA. Chromatinová DNA představuje hlavní formu DNA v buňce a je nositelem většiny genetických informací. Během buněčného dělení dochází k agregaci chromatinových vláken do viditelných tyčovitých struktur, chromozómů. Jádro dále obsahuje kulovitý útvar – jadérko (nucleolus), které je tvořeno RNA a proteiny a může dosahovat velikosti až 1 μm . Jadérek může být i větší počet a jsou místem syntézy prekurzorů rRNA. [6], [20]

5.4.4 Golgiho komplex

Golgiho komplex patří mezi nejstarší pozorované organely. Je složen z plochých váčků, cisteren a kanálů obalených membránami, které jsou kontinuální s cytoplazmatickou membránou. V Golgiho komplexu dochází k úpravě bílkovin syntetizovaných v endoplazmatickém retikulu a ke vzniku glykoproteinů. Produktem Golgiho komplexu jsou též primární lyzozomy. [6], [20]

5.4.5 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum je soustava vzájemně propojených váčků a cisteren, které jsou obaleny membránami. V buňkách se vyskytují dva typy: endoplazmatické retikulum drsné (granulární) a hladké (agranulární). Množství endoplazmatického retikula v buňkách značně kolísá v závislosti na stupni diferenciaci buňky, jejím typu a na jejím funkčním stavu. Drsné endoplazmatické retikulum obsahuje na vnitřní straně velký počet ribozomů, které jsou místem proteosyntézy. U hladkého endoplazmatického retikula ribozomy chybí a je místem metabolismu některých tukových látek. Hladká ER převažují v buňkách tvořících steroidní hormony, nebo v jaterních buňkách, kde se podílejí na řadě detoxikačních procesů. Drsná ER se bohatě vyskytují v nejrůznějších typech buněk tvořících sekreční proteiny (žlázo- v é buňky exokrinní, endokrinní). [6], [20]

5.4.6 Mitochondrie

Mitochondrie jsou organely válcovitého tvaru, které obsahují vlastní mitochondriální DNA. Jsou tvořeny zevní a vnitřní mitochondriální membránou. Zevní membrána je hladká, vnitřní membrána je tvořena četnými záhyby - mitochondriální kristy. Tyto kristy zvětšují vnitřní povrch mitochondrií a jsou místem aerobního metabolismu buňky, zejména enzymatické oxidace a tvorby ATP. Mitochondriální matrix vyplňuje vnitřní prostor mezi kristami a je v něm obsažena mitochondriální DNA, všechny tři typy RNA a ribozomy. Vzhledem k tomu, že mitochondriální DNA je tvořena kruhovou molekulou DNA podobně jako u prokaryot, a také ribozomy jsou prokaryotického typu, je podporována hypotéza symbiotického vzniku mitochondrií (teorie endosymbiózy). Množství mitochondrií a jejich krist je úměrné metabolické aktivitě buňky. Vysoce aktivní buňky obsahují četné mitochondrie s výraznými kristami. Jsou to například buňky srdečního svalu nebo buňky ledvinných kanálků. Hlavní úloha mitochondrií je tedy tvorba ATP, což je látka schopná uvolnit velké množství energie. ATP je z nitra mitochondrie transportována a dále zužitkovávána v cytoplazmě, kde poskytuje energii pro: mechanickou práci svalů, osmotickou práci ledvinových tubulů, vznik akčních potenciálů a řadě dalších. [6], [20]

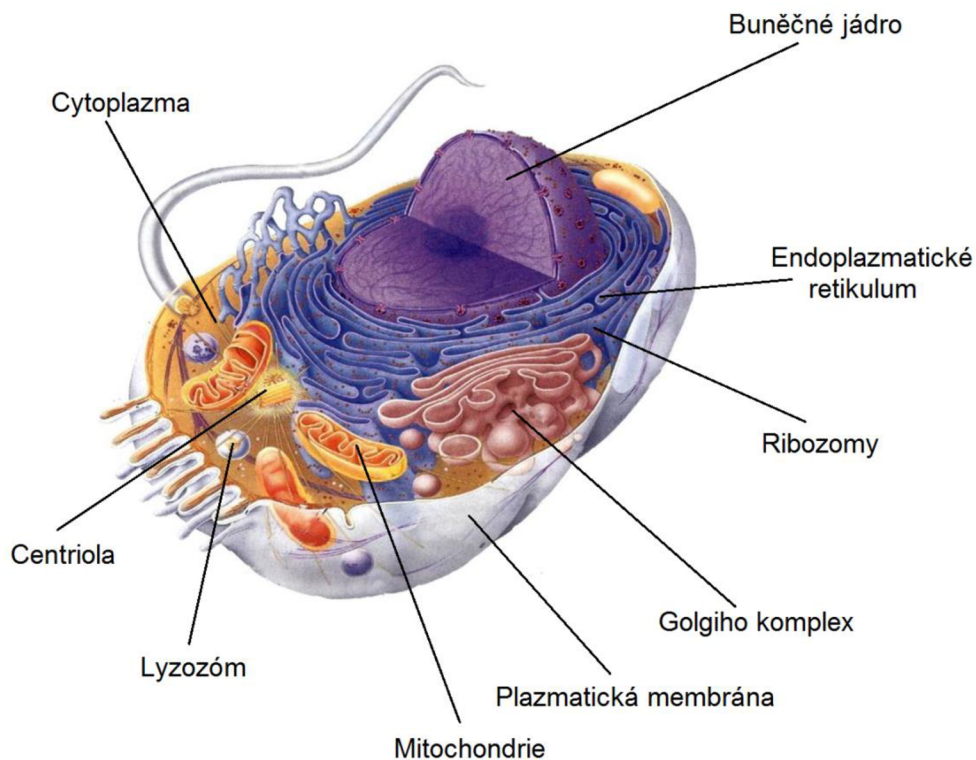
5.4.7 Lyzozomy

Lyzozomy jsou zpravidla drobné kulovité útvary, velké 0,05 - 0,5 μm . Obsahují hydrolytické enzymy, díky čemuž jsou místem rozkladu látek. Lyzozomy jsou přítomné v

každé buňce, ale zvláště velké množství jich obsahují buňky vyznačující se fagocytózou. Do enzymatické výbavy lyzozomů patří asi 40 enzymů, které jsou syntetizovány v drsném ER, dále transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou dále modifikovány a posléze opouštějí Golgiho aparát jako membránou obalené kulovité útvary - primární lyzozomy. [6], [20]

5.4.8 Cytoskelet

Cytoskelet je charakteristickým rysem eukaryotických buněk, jeho hlavní funkcí je opora buňky, účast na jejím dělení a transport látek. Za součásti tvořící cytoskelet jsou považovány mikrotubuly, mikrofilamenty, vlákna přechodná a také centrioly. Mikrofilamenta jsou vláknité útvary tvořené dvěma proteiny: Aktinem (vlákna průměrně 6 nm silná) a Myosinem (vlákna průměrně 12 nm silná). Mikrotubuly jsou tvořeny molekulami α - a β -tubulinu, mají zevní průměr cca 24 nm a stěnu silnou cca 5 nm. Jejich délka je značně variabilní, někdy dosahuje až několika μm . Podílejí se na udržování tvaru buňky, zvláště na jejím asymetrickém uspořádání, dále na transportu, nebo na pohybu chromosomů po dělicím vřeténku. Centrioly jsou tvořeny typicky uspořádanými tubuly, kdy je devět paralelně orientovaných tubulových tripletů uspořádáno do kruhu. Uspořádání tubulů v tripletu je tak těsné, že stěny sousedních tubulů vzájemně splývají. V buňce bývají zpravidla 2 centrioly, které na sebe stojí kolmo svými dlouhými osami. Centrioly se účastní procesu dělení buňky. [6], [20]



Obr. 19: Stavba živočišné buňky [7]

6 Praktická část

Cílem praktické části je určit, zda dochází ke změnám v posunu emisního spektra v různých oblastech buňky vlivem okolního prostředí, či různým vlivem vnitrobuněčných interakcí spolu se změnami v době života fluorescence. Hlavním účelem je zjistit, zda použité nanočástice na bázi rhodaminu jsou v buňce bezpečně lokalizovatelné, jak se mění doba života fluorescence, jak rhodamin degraduje a jak se mění jeho spektrum.

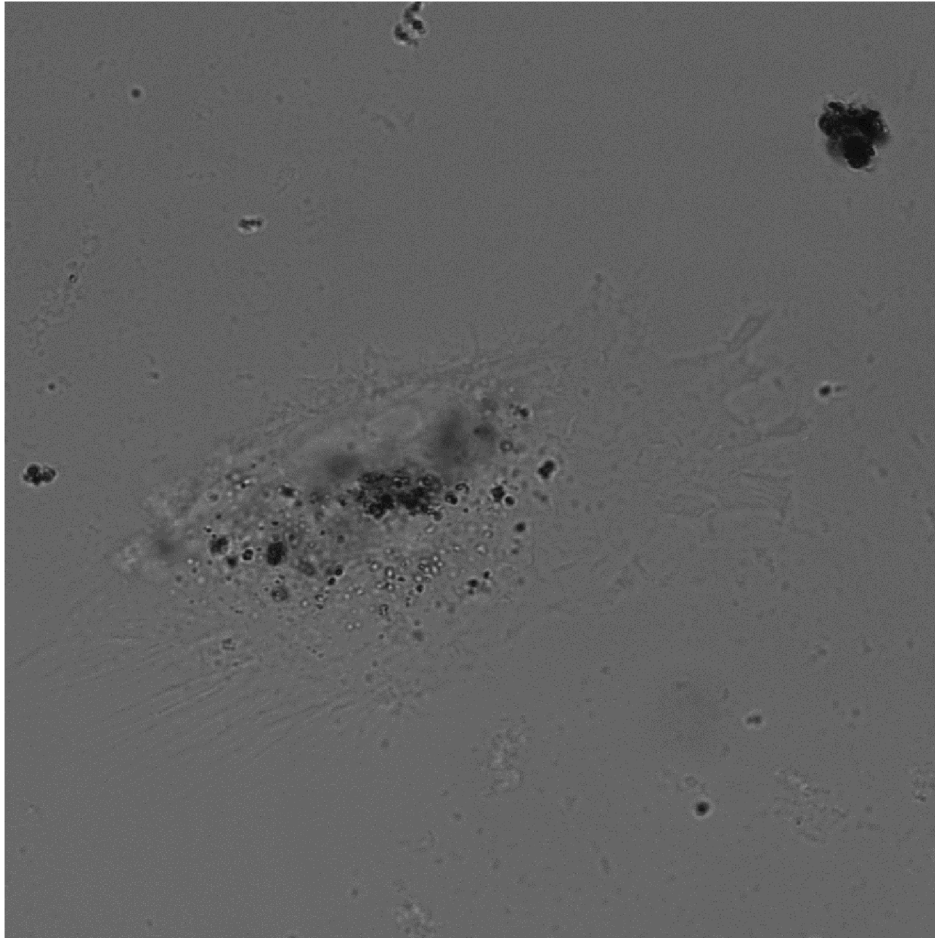
6.1 Použité buňky

V této práci se pracovalo celkem se dvěma typy buněk. Hlavním typem buněk byly mezenchymální buňky (izolovány na spolupracující Lékařské fakultě Masarykovy univerzity z aspirátu kostní dřeně zdravých dárců), jež byly označeny (intracelulárně) nanočásticemi potaženými rhodaminem. Jako druhý typ buněk byly zvoleny kardiomyocyty (izolovány na spolupracující Lékařské fakultě Masarykovy univerzity z laboratorního potkana) obarvené napětově citlivým barvivem Di-4-ANEPPS. Kardiomyocyty byly vybrány z toho důvodu, že společně s napětově citlivým barvivem vykazují silné spektrální změny jak uvnitř buněk, tak vzhledem k prostředí, v němž se nachází. Tato vlastnost je vhodná pro následné zobrazení a hodnocení spektrálního posunu.

6.1.1 Mezenchymální buňky

Pro měření na fluorescenčním mikroskopu byly použity mezenchymální buňky (dle současného názvosloví nazývané mesenchymální stromální buňky), které se získávají z kostní dřeně. Počet mezenchymálních buněk v kostní dřeni je zhruba desetkrát menší než krevtvořných krevních buněk. Pro odběr krve z kostní dřeně se většinou používají invazivní zákroky. Nejčastěji se jedná o punkci kostní dřeně z lopatky nebo kyčelní kosti. Mezenchymální buňky jsou charakteristické tím, že se aktivně dělí a diferencují do různých typů jiných buněk. [12]

Na použité mezenchymální buňky (Obr. 20) dodané z Masarykovy Univerzity byly před měřením navázány nanočástice označované jako FeNV-R. Jedná se o dosud nekomerční, rhodaminem potažené nanočástice z kovu. Samostatná příprava buněk před měřením se skládá z několika částí. Jeden den před měřením jsou mezenchymální buňky nasazeny v hustotě 5000 buněk na cm^3 . Nanočástice FeNV-R, které mají hustotu 1000 μg na cm^3 , jsou zředěny médiem DMEM na výslednou hodnotu 50 μg na cm^3 . DMEM je standardní buněčné kultivační médium doplněné buněčnými živinami v podobě 5% fetálního bovinního séra (FBS). Následně jsou takto připravené rhodaminové nanočástice přidány k mezenchymálním buňkám. Po nějaké době se nanočástice dostávají do buněk a jsou připraveny k měření. Na obrázku níže (Obr. 20) je zobrazen snímek mezenchymální buňka spolu s průchozím světlem. Snímek byl získán za použití olejového objektivu HC PL APO CS2 63x/1.40.



Obr. 20: Snímek mezenchymálních buněk pořízený fluorescenčním mikroskopem LEICA TCS SP 8 (zobrazení s průchozím světlem)

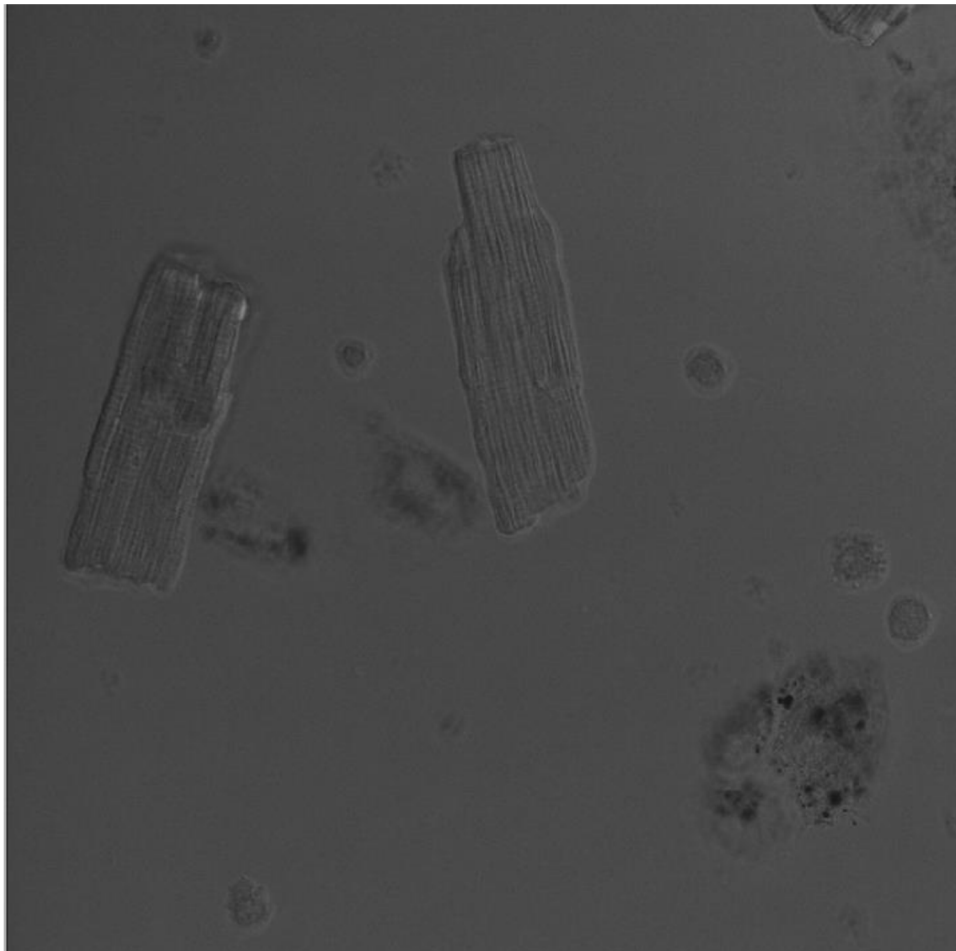
6.1.2 Kardiomyocyty

Dalším typem buněk, jež byly použity k měření na mikroskopu, byly kardiomyocyty. Jak samotný název napovídá, jedná se o buňky tvořící srdeční sval, které jsou stejně jako buňky kosterních svalů příčně pruhované, avšak jejich jádra jsou jako u hladkého svalu uložena centrálně. Kardiomyocyty jsou asi 15 μm široké a 85 až 100 μm dlouhé a obsahují jedno až dvě jádra. Celou cytoplazmu těchto buněk difúzně vyplňují myofilameta. Buňky srdečního svalu obsahují velmi hojně také mitochondrie, které mohou tvořit až 40% cytoplazmatického objemu. [20]

Použité kardiomyocyty (Obr. 21) byly získány z pravé srdeční komory. Před samostatným měřením byly nejprve obarveny napěťově citlivým membránovým barvivem Di-4-ANEPPS. Barvení probíhalo tak, že k 1,5 μl roztoku obsahující buňky byly přidány 3 μl tohoto barviva. Před samostatným měřením je nutné nechat barvivo navázat na buňky zhruba 20 minut.

Barviva skupiny ANEP obsahují molekuly, které fluoreskují v závislosti na změnách elektrického potenciálu prostředí, v němž se nachází. Jsou to fluorescenční sondy s rychlou odezvou, které pracují na principu změny jejich elektronové struktury a následné změně fluorescenčních vlastností, v závislosti na změnách v okolním elektrickém poli. Jejich optická odezva je dostatečně rychlá pro detekci přechodných potencionálních změn (v milisekundách) u dráždivých buněk včetně jednotlivých neuronů srdečních buněk. Tyto sondy obvykle vykazují 2-10 % změnu fluorescence na 100 mV. Kromě výše zmíněných vlastností jsou tato barviva schopná zobrazit závislost potenciálu na posunu excitačních spekter, což umožňuje kvantifikaci membránových potenciálů. [11]

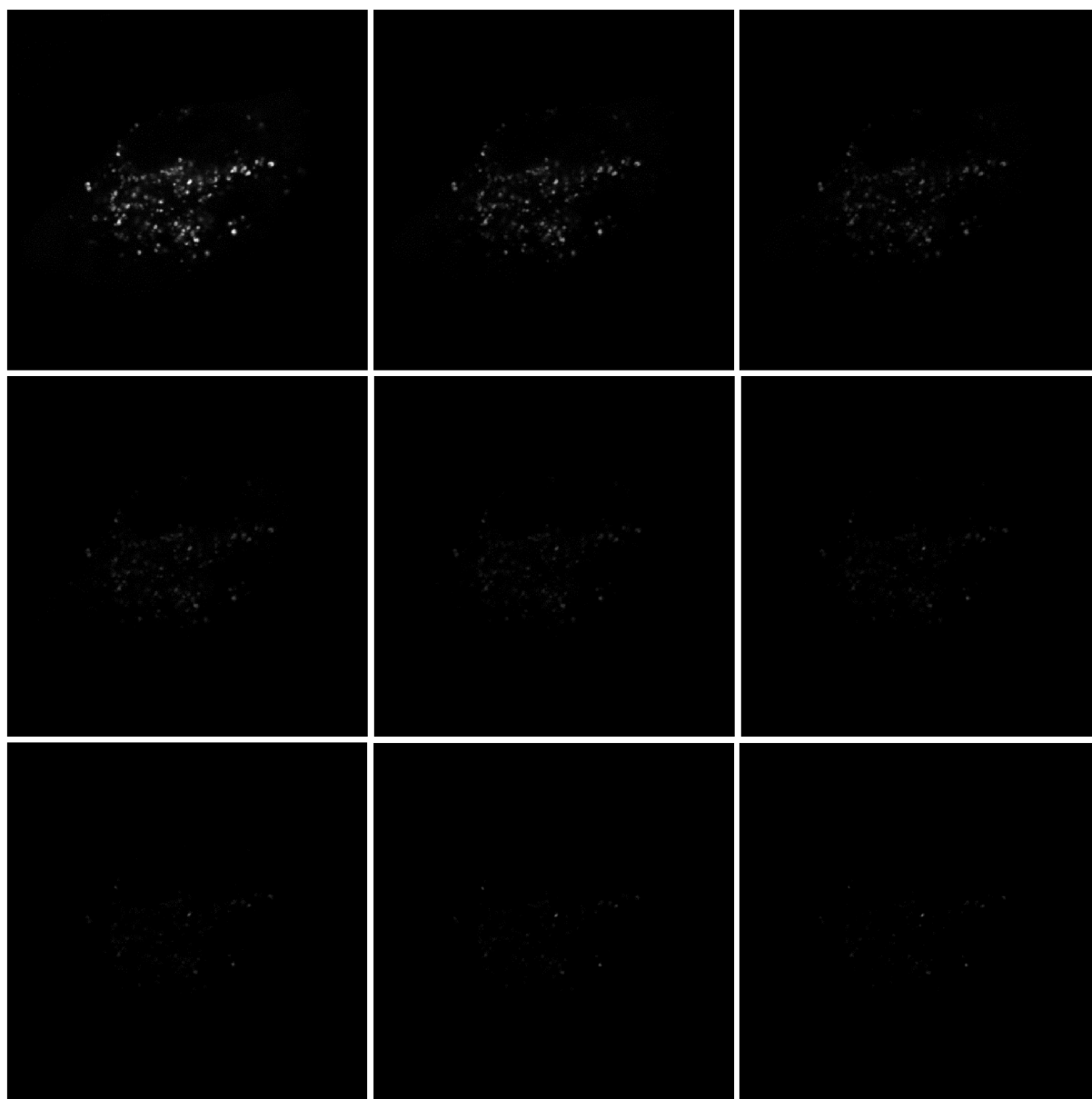
Na obrázku níže (Obr. 21) je zobrazen snímek použitých buněk kardiomyocytů spolu s průchozím světlem. K měření byl použit také olejový objektiv HC PL APO CS2 63x/1.40.



Obr. 21: Snímek buněk kardiomyocytů pořízený fluorescenčním mikroskopem LEICA TCS SP 8 (zobrazení s průchozím světlem)

6.1.3 Získané fluorescenční snímky

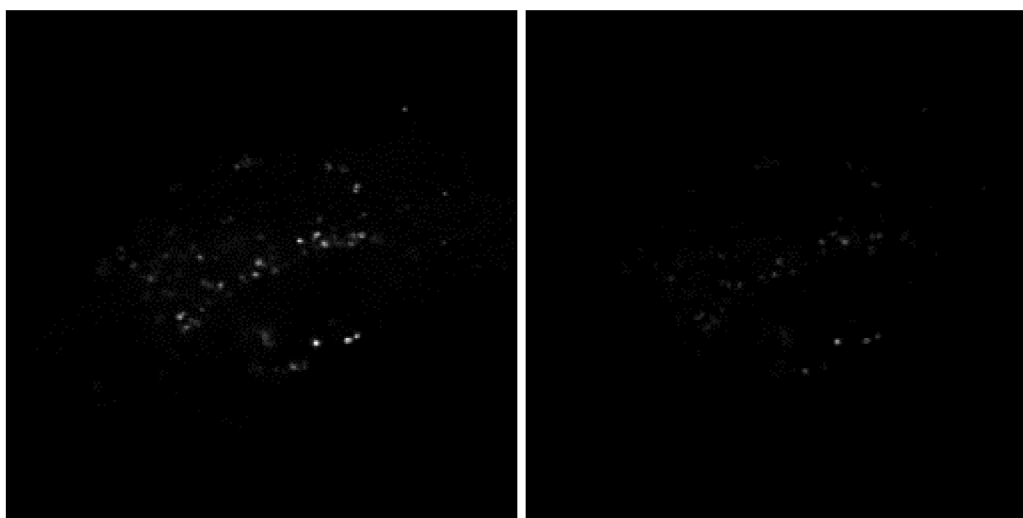
Při měření byly získány fluorescenční snímky za pomoci WLL laseru a funkce TimeGate, která umožňuje detekovat fluorescenční emisi pouze v čase mezi pulzy laseru, a také posouvat časové okno. Protože použité nanočástice byly obarveny rhodaminem, byl excitační paprsek nastaven na 540 nm. Velikost časového okna byla nastavena na hodnotu 3,5 ns. Toto okno bylo v každém kroku posunuto o 1 ns. První snímek zobrazuje fluorescenci v době od 0 do 3,5 ns, druhý od 1 do 4,5 ns atd. Celkem tak bylo získáno devět fluorescenčních intenzitních snímků mezenchymálních buněk, které zachycují pokles fluorescence v čase od 0 do 11,5 ns. (Obr. 22).



Obr. 22: Sada získaných fluorescenčních snímků mezenchymálních buněk (0 až 11.5 ns).

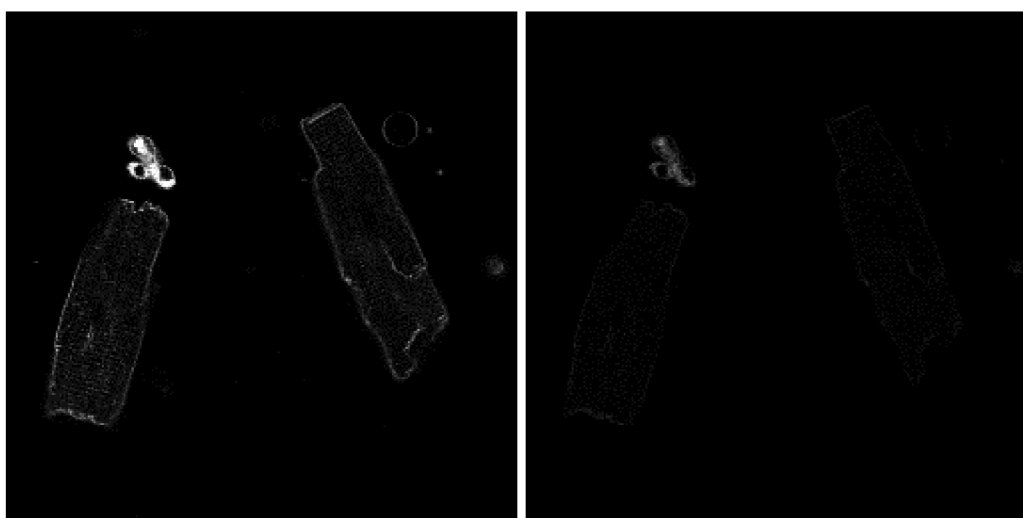
6.1.4 Získané spektrální snímky

Fluorescenční mikroskop Leica je vybaven funkcemi lambda a 2D lambda skenu, které umožňují skenovat fluorescenci vzorku napříč zvoleným rozsahem vlnových délek. K získání sady spektrálních snímků mezenchymálních buněk byla zvolena funkce 2D lambda skenu, kde byl nastaven rozsah excitace v rozmezí 490 – 560 nm a rozsah detekce v rozmezí 500 – 700 nm. Aby byly výsledné snímky pořízeny v odpovídajícím čase (jednotky minut), byla nastavena velikost spektrálních snímků 256x256. Po provedení exportu získáme sadu snímků v bezztrátovém souboru TIF rozdělených do 15 složek v rozsahu zvolené detekce s krokem 13 nm. Celkem tak v těchto složkách bylo získáno 100 spektrálních snímků (Obr. 23).



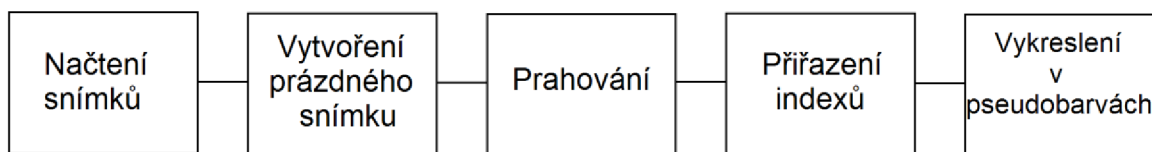
Obr. 23: Spektrální snímek mezenchymální buňky detekovaný na 586 nm (vlevo) a 626 nm (vpravo)

Za použití 2D lambda skenu byla dále získána sada spektrálních snímků kardiomyocytů (Obr. 24). Pro tento typ buněk, jež byly obarveny napěťově citlivým membránovým barvivem Di-4-ANEPPS, byl nastaven rozsah excitace v rozmezí 470 – 550 nm a rozsah detekce v rozmezí 480 – 650 nm.



Obr 24: Spektrální snímek kardiomyocytů detekovaný na 565 nm (vlevo) a na 531 nm (vpravo)

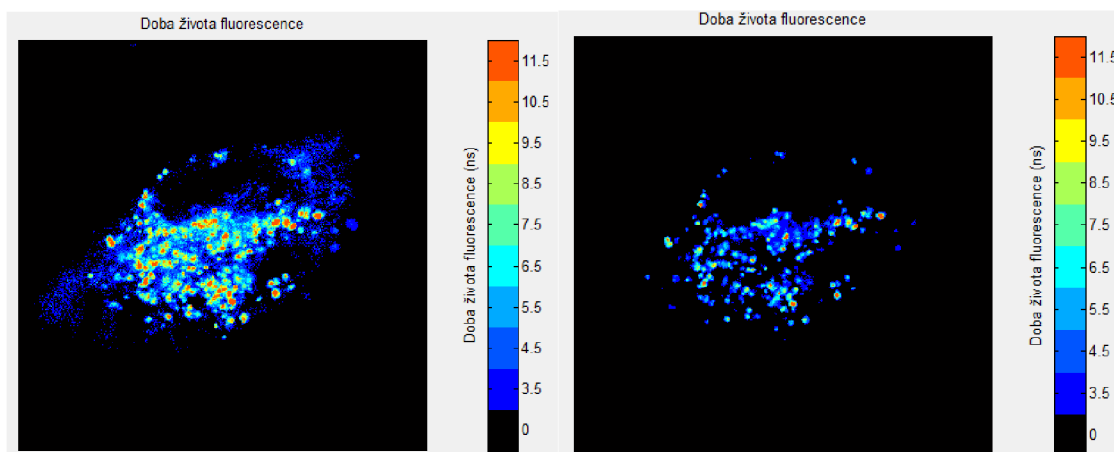
6.2 Metoda zobrazení doby života fluorescence



Obr. 25: Blokové schéma zobrazení doby života fluorescence

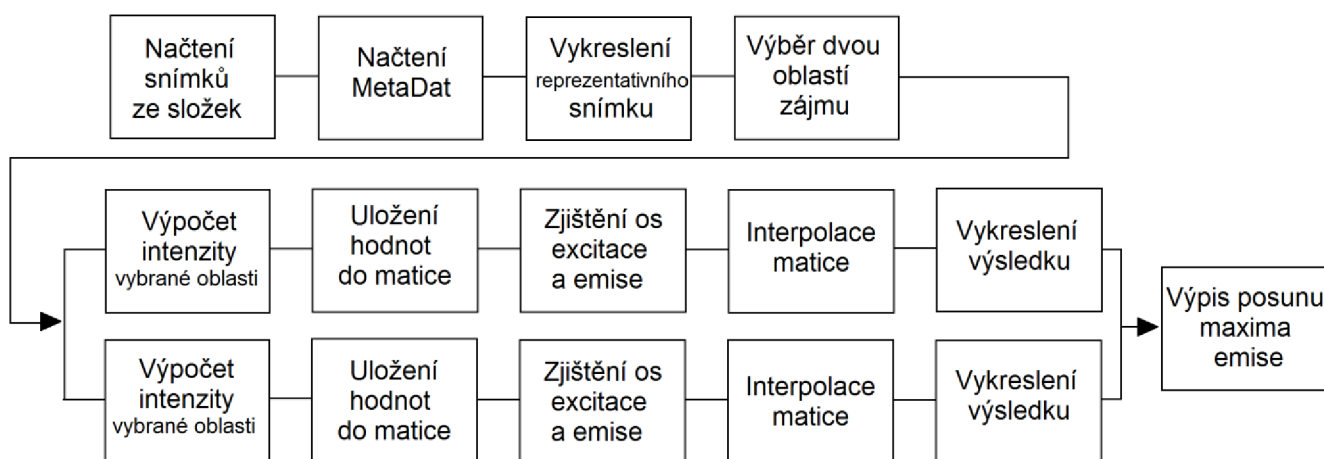
Hlavním cílem při zpracování získané sady fluorescenčních snímků bylo vytvořit barevný snímek jako alternativní metodu ke klasické metodě FLIM popsanou výše v teorii. Ve výsledku by tedy měl být vyobrazený snímek v pseudobarvách, kde jednotlivé barvy demonstrují pokles doby života fluorescence v prostorové oblasti celého snímku.

Všechny snímky pořízené konfokálním fluorescenčním mikroskopem jsou exportované ve flexibilním adaptabilním formátu TIF. Prvním krokem algoritmu, který vychází z blokového schéma (Obr. 25), je načtení všech těchto snímků ze sady a jejich uložení do proměnné, kde jsou seřazeny tak, jak byly mikroskopem snímány v jednotlivých časových úsecích. Snímek s nejvyšší intenzitou je uložen jako první a snímek s nejnižší intenzitou, kde byla doba života fluorescence nejvyšší, je uložen jako poslední. Pokud by se exportované snímky nacházely ve formátu RGB, jsou před uložením převedeny na šedotónové obrazy. Všechny snímky jsou matlabem uloženy jako datový typ uint8 a nabývají hodnot 0 – 255. Dále je vytvořen prázdný snímek nulových hodnot se stejnou velikostí jako získané snímky. Algoritmus dále v cyklu prochází všechny snímky a podle zvolené prahové hodnoty jim přiřadí index. Všem hodnotám, které jsou větší než předem zvolený práh, se tedy přiřadí určitý index alias barva. Nejprve je uložena první barva (index) nadprahovým hodnotám prvního snímku, dále algoritmus uloží další barvu nadprahovým hodnotám druhého snímku, a tak dále až po poslední snímek. Pokud se daná nadprahová hodnota předešlého snímku nachází na stejné pozici jako v následujícím snímku, je přepsána indexem z novějšího snímku. Tím se docílí toho, že na dané pozici bude viditelný index (barva) posledního snímku, který nese informaci o nejdéle přetrvávající fluorescenci. Zvolení vhodného prahu je základem pro vykreslení správného výsledku. Ve výsledku pak každá barva představuje jeden časový úsek a tím udává informaci, jak dlouho v dané prostorové oblasti přetrvávala fluorescence. Na závěr je k zobrazenému výsledku doplněna barevná škála JET, která nese stejný počet barev jako je načtených snímků a navíc je doplněna o černou barvu, která reprezentuje pozadí. U vynesných barev jsou doplněny i orientační časové úseky v nanosekundách odpovídající době trvání fluorescence v místě konkrétní barvy. Algoritmus funguje pro libovolný počet snímků zobrazujících pokles fluorescence, větší sada těchto snímků pak přinese podrobnější výsledek demonstrující pokles doby života fluorescence ve více pseudobarvách (Obr. 26).



Obr. 26: Zobrazení doby života fluorescence mezenchymálních buněk a vliv různého nastavení prahu na výsledek

6.3 Metoda zobrazení 2D lambda skenu



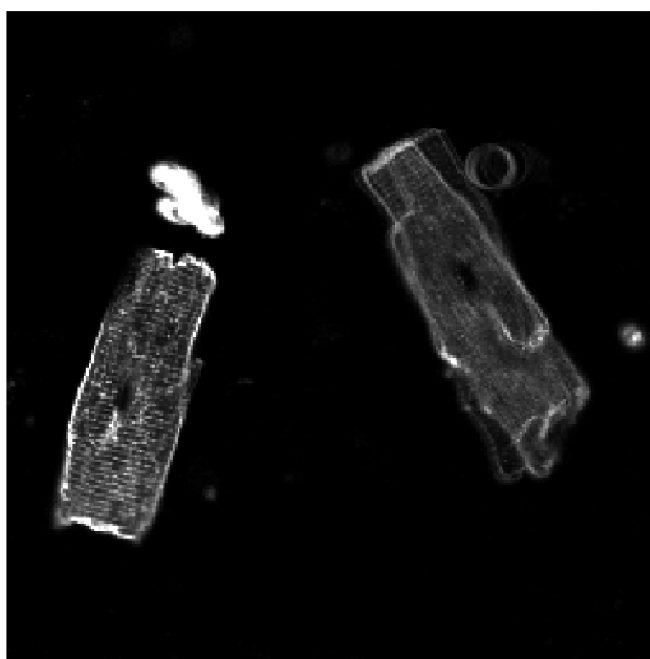
Obr. 27: Blokové schéma zobrazení 2D lambda skenu

Fluorescenční mikroskop Leica je vybaven funkcí 2D lambda skenu, která skenuje vzorek napříč zvoleným rozsahem vlnových délek a umožňuje rekonstruovat dvourozměrné fluorescenční spektrum. Naměřená data pro každou dvojici excitace a emise jsou uložena jako úplné fluorescenční snímky, ze kterých software mikroskopu dvourozměrné spektrum rekonstruuje. Hlavním cílem bylo v prostředí Matlab vytvořit algoritmus, který umožní zpracovávat a hodnotit spektrální snímky pořízené 2D lambda skenem v offline režimu mimo software mikroskopu.

Mikroskop veškeré snímky pořízené 2D lambda skenem exportuje ve formátu TIF a ukládá je do složky označené LambdaLambda. V této složce se nachází další složky označené vlnovou délkou, na které docházelo k detekci. Počet těchto složek odpovídá rozsahu a kroku detekce nastaveného skenování. V těchto složkách jsou uloženy samostatné snímky, jejichž

počet odpovídá nastavenému rozsahu a kroku excitace, a také složka s metadaty. V metadatech jsou uloženy informace o nastavení mikroskopu a podmínkách snímání ve formátu XML.

Algoritmus nejprve ve dvou cyklech načítá uložené snímky. První cyklus prochází hlavní složku, druhý cyklus prochází jednotlivé podsložky s pořízenými snímky. Z těchto načtených spektrálních snímků je vytvořen jeden reprezentativní snímek (Obr. 28), který dále slouží pro správnou orientaci a výběr potřebné oblasti zájmu. Reprezentativní snímek je vytvořen sečtením všech spektrálních snímků, které jsou před přičtením poděleny. Takto vytvořený snímek má pouze informativní charakter pro možnost výběru potřebné oblasti zájmu.



Obr. 28: Ukázka reprezentativního snímku, který slouží pro výběr oblasti zájmu

Dále algoritmus prochází opět ve dvou cyklech hlavní složku a její podsložky, které jsou označeny podle detekovaných vlnových délek. Do prázdného vektoru jsou uloženy tyto hodnoty vlnových délek, čímž se získá potřebný rozsah emise sloužící pro správné zobrazení výsledku. Pro získání rozsahu, kdy docházelo k excitaci, je využito načtení metadat ve formátu XML. Po otevření tohoto souboru se veškerý jeho obsah uloží do proměnné Text, ve které se následně vyhledá „LambdaExcitationBegin=“ a „LambdaExcitationEnd=“, čímž se získají pozice začátku a konce excitace. Za pomoci *str2double* se z těchto pozic uloží počáteční a konečná vlnová délka, mezi kterými docházelo k excitaci.

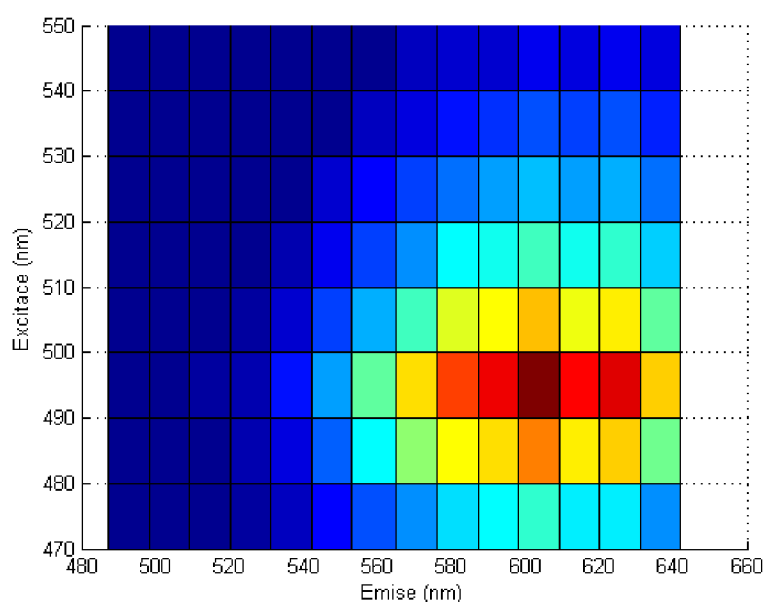
Dalším krokem je vykreslení reprezentativního snímku, ze kterého se pomocí myši a funkce *getrect* vybírají dvě obdélníkové oblasti zájmu. První vybraná oblast je následně ve snímku označena zelenou barvou, druhá oblast červenou. Takto vybrané obdélníky definují

oblasti ve všech uložených spektrálních snímcích. Z každého snímku se získá suma intenzit vybrané oblasti, jejichž hodnota se uloží do matice. Matice se plní postupně, na první pozici prvního sloupce se uloží hodnota intenzity vybrané oblasti prvního snímku z první složky, do druhého sloupce se uloží hodnoty intenzit vybrané oblasti snímků z druhé složky, do třetího sloupce hodnoty intenzit vybrané oblasti snímků ze třetí složky atd. Vzhledem k tomu, že snímky jsou mikroskopem exportovány tak, že v první složce se nachází pouze jeden snímek, ve druhé složce dva snímky, ve třetí složce tři snímky a dále, získáme ve výsledku trojúhelníkovou matici. Protože se vybírají dvě oblasti zájmů, jsou získány dvě takovéto matice.

Tabulka 2: Ukázka plnění matice hodnotami intenzit z jednotlivých snímků

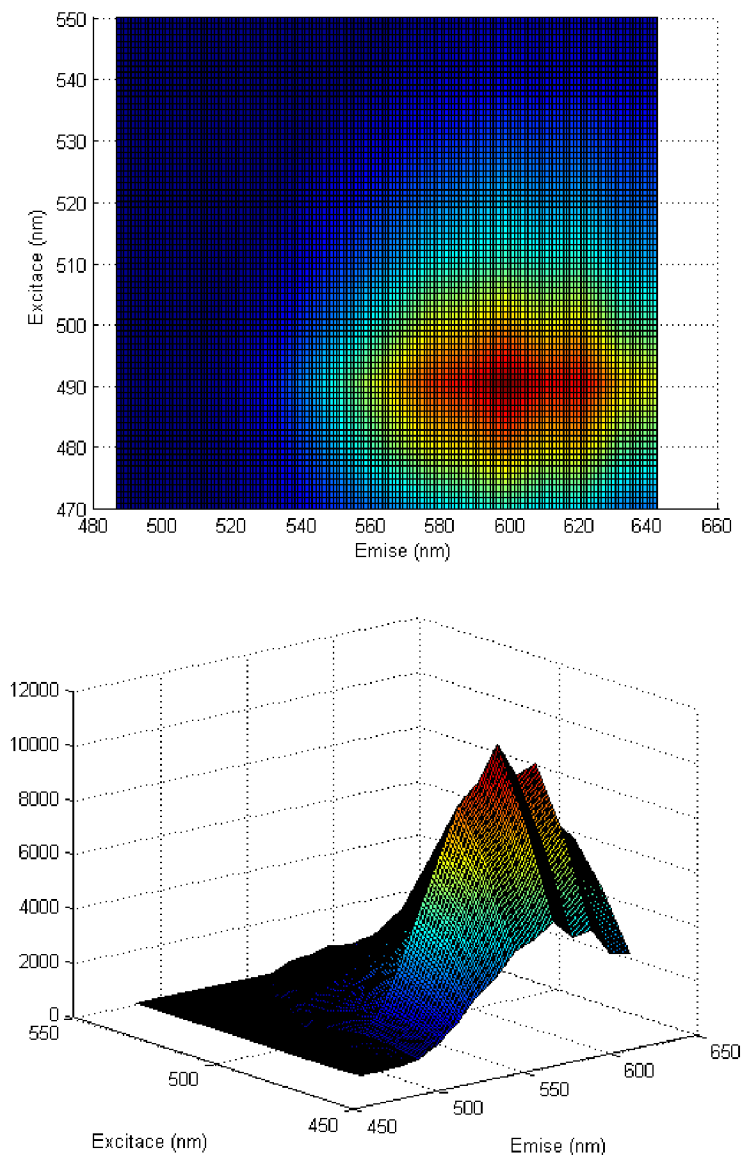
45	69	97	191	522	1153	1900	2575	3312	3544
0	52	139	341	937	2044	3530	4896	6279	6354
0	0	129	477	1205	2723	4513	6430	8423	8591
0	0	0	277	814	1804	2967	4462	5761	5994
0	0	0	0	426	1059	1848	2693	3498	3748
0	0	0	0	0	633	1093	1759	2380	2529
0	0	0	0	0	0	584	912	1401	1422
0	0	0	0	0	0	0	414	684	744
0	0	0	0	0	0	0	0	315	400

Dále se využívá funkce *meshgrid*, která umožňuje vytvořit matice, jejichž prvky obsahují souřadnice bodů v rovině. Pomocí této funkce jsou vytvořeny matice prvků pro rozsah excitace a emise. Pro vykreslení závislosti dvou proměnných je využita funkce *surf*, která vykresluje 3D graf, body spojuje navzájem ve směru obou os a vzniklé plošky vyplní barvou. Touto funkcí jsou vykresleny hodnoty intenzit z jednotlivých snímků (Tab. 2), které představují funkční hodnoty v závislosti na rozsahu excitace a emise (Obr. 29).



Obr. 29: Výsledek funkce *surf* pro hodnoty intenzit pořízených snímků

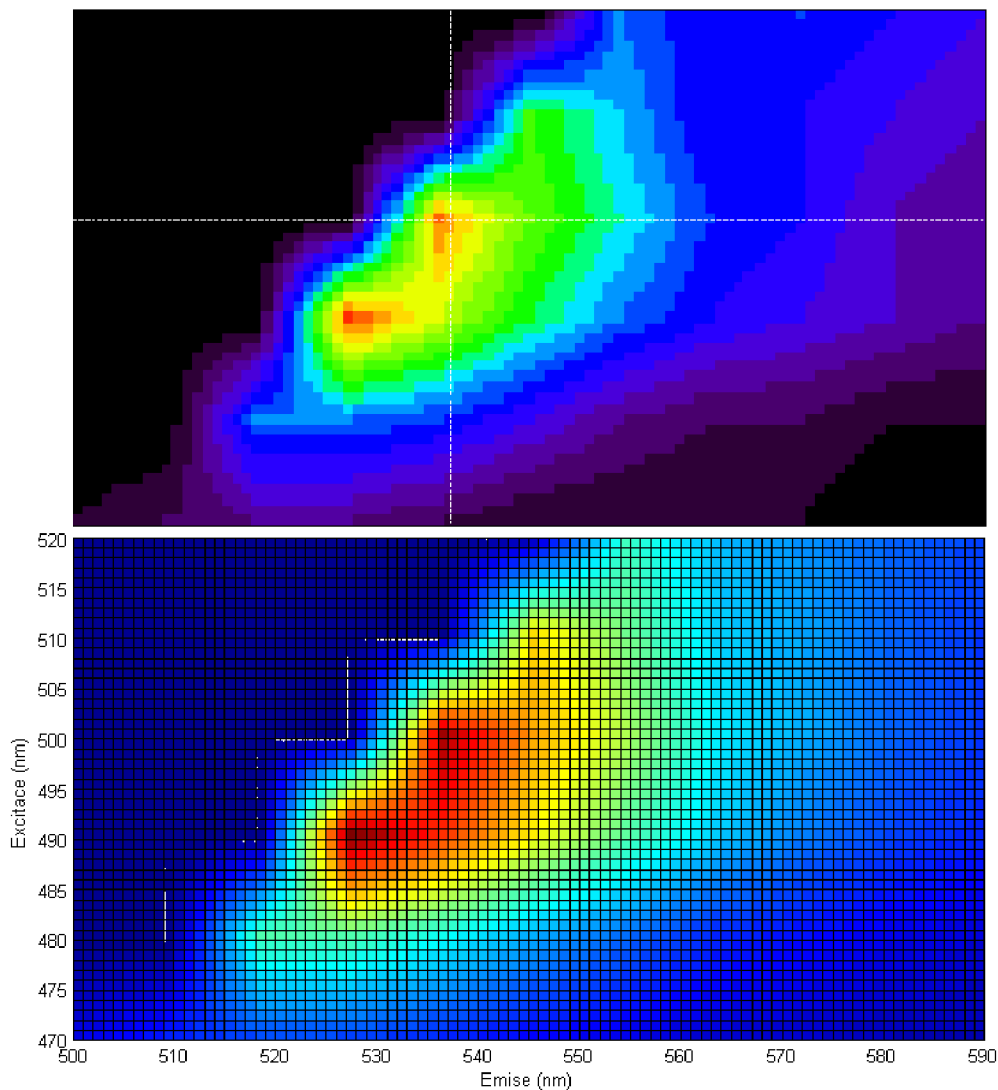
Protože takto získaný výsledek zatím neodpovídá výsledku, který je možné zobrazit na fluorescenčním mikroskopu Leica, je nutné dále provést interpolaci dat. Byla zvolena vícerozměrná interpolace - Bilineární interpolace, což je ve své podstatě rozšířená lineární interpolace. Klasická lineární interpolace je založena na proložení dvou sousedních bodů přímkou. Bilineární interpolace je založena na interpolaci funkce dvou proměnných na pravidelnou prostorovou mřížku. Hlavní myšlenkou je provedení lineární interpolaci nejprve v jednom směru a pak i ve druhém směru. Výsledek bilineární interpolace není závislý na pořadí interpolací. Výsledek aproximace bude stejný, pokud se provede interpolace nejprve na ose x a poté na ose y, nebo nejprve na ose y a poté na ose x. V matlabu tuto vícerozměrnou interpolaci provádí funkce *interp2*. Celkový výsledek je zobrazen pomocí funkce *surf*, která vykresluje ve 3D. Použití této funkce umožňuje výsledkem rotovat, což přináší možnost vizuálního hodnocení závislosti excitace na emisi pořizovaných dat i v prostorové oblasti (Obr. 30).



Obr. 30: Výsledek interpolovaných hodnot snímků (nahore) a 3D pohled na výsledek (dole)

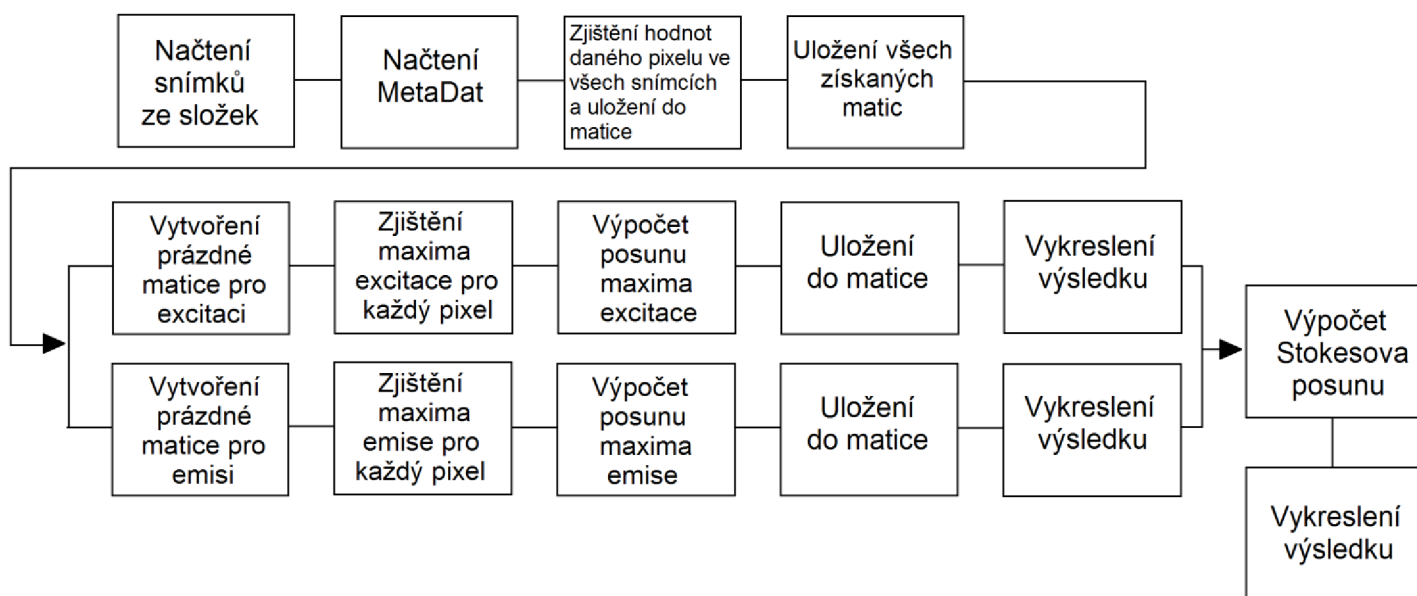
Protože algoritmus umožňuje výběr dvou různých oblastí zájmu v pořízených spektrálních snímcích, jsou ve výsledku získány dvě dvojrozměrné mapy závislosti excitace a emise, které mohou být vzájemně vizuálně hodnoceny. Algoritmus nakonec z obou vykreslených výsledků zjistí maximální emisní vlnovou délku a vypíše hodnotu posunu maxima emisního spektra mezi dvěma vybranými oblastmi.

Na obrázku níže (Obr. 31) jsou zobrazeny výsledky stejných dat, horní obrázek byl získán za použití softwaru Leica, který je součástí mikroskopu, spodní obrázek byl získán výše popsaným algoritmem v prostředí Matlab. Při porovnání vidíme, že obě metody vykreslují stejný vizuální výsledek, a také detekují maxima na stejných pozicích. Ve výsledku metody řešené Matlabem je použito ve vykreslení více barev a navíc je zobrazena prostorová mřížka, která usnadňuje orientaci podle příslušné vlnové délky. Při realizaci algoritmu bylo vyzkoušeno i vykreslení bez mřížky, ale subjektivní dojem byl horší, proto byla mřížka v konečném výsledku ponechána.



Obr. 31: Ukázka porovnání výsledku mikroskopu Leica (nahore) a výsledku s využitím Matlabu (dole)

6.4 Metoda zobrazení 2D spektrálního posunu



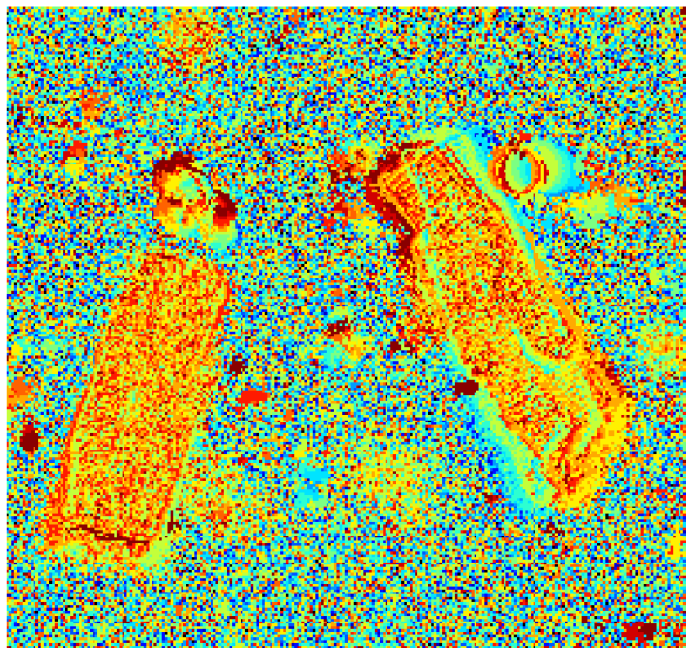
Obr. 32: Blokové schéma metody zobrazení 2D spektrálního posunu

Dalším krokem v hodnocení získaných spektrálních snímků byla snaha zobrazit posun maxima excitace a emise v prostorové oblasti celého snímku. Na rozdíl od předešlého zobrazení 2D lambda mapy se výsledek nepočítá ze dvou oblastí zájmu, ale v každém pixelu. Pro zobrazení této metody byla použita sada stejných, již zmíněných spektrálních snímků, které byly pořízeny mikroskopem pomocí funkce 2D lambda skenu. Mikroskop data exportuje jako úplné fluorescenční snímky pro každou dvojici excitace a emise, a proto je možné zobrazení posunu maxima excitace a emise v prostorové oblasti celého snímku. Blokové schéma výše (Obr. 32) znázorňuje jednotlivé kroky algoritmu.

První částí algoritmu je načtení a uložení všech spektrálních snímků, a také získání potřebných informací z metadat. Všechny snímky jsou uloženy do buňkového pole tak, že každý řádek odpovídá jedné složce se snímky. Postup načítání snímků ze složek a postup, jak získat hodnoty rozsahů excitace a emise z metadat daného měření, je již popsán výše u algoritmu zobrazení 2D lambda skenu.

Hlavní část algoritmu se skládá ze čtyř *for* cyklů. První dva cykly definují řádkové a sloupcové souřadnice konkrétního pixelu, pro který se dále počítá matice hodnot. Další dva *for* cykly procházejí buňkové pole, ve kterém jsou uloženy všechny snímky. Procházením těchto cyklů se na pozici konkrétního pixelu zjistí hodnoty intenzit ze všech snímků a uloží se do matice. V této matici jsou hodnoty uloženy tak, že jednotlivé sloupce odpovídají vlnovým délkám detekce (stejně jako matice v Tab. 2). Počet takto vytvořených trojúhelníkových matic je určen velikostí snímků (Například pro snímky velikosti 256x256 bodů se získá 65536 těchto matic).

Vzhledem k tomu, že algoritmus prochází všechny pixely a sestavuje matice hodnot i na pozicích, kde se buňky nevyskytují, byl by výsledek zatížen šumem z pozadí (viz Obr. 33). Z tohoto důvodu je před získáním každé matice vložena podmínka eliminující rušivé hodnoty pozadí. Hodnoty intenzit nižší než jedna desetina maxima konkrétního snímku se dále nezapočítávají do výsledku a berou se jako pozadí (Pro méně intenzivní snímky lze hodnotu v podmínce upravit posuvníkem).



Obr. 33. Výsledek bez použití podmínky eliminující vliv pozadí

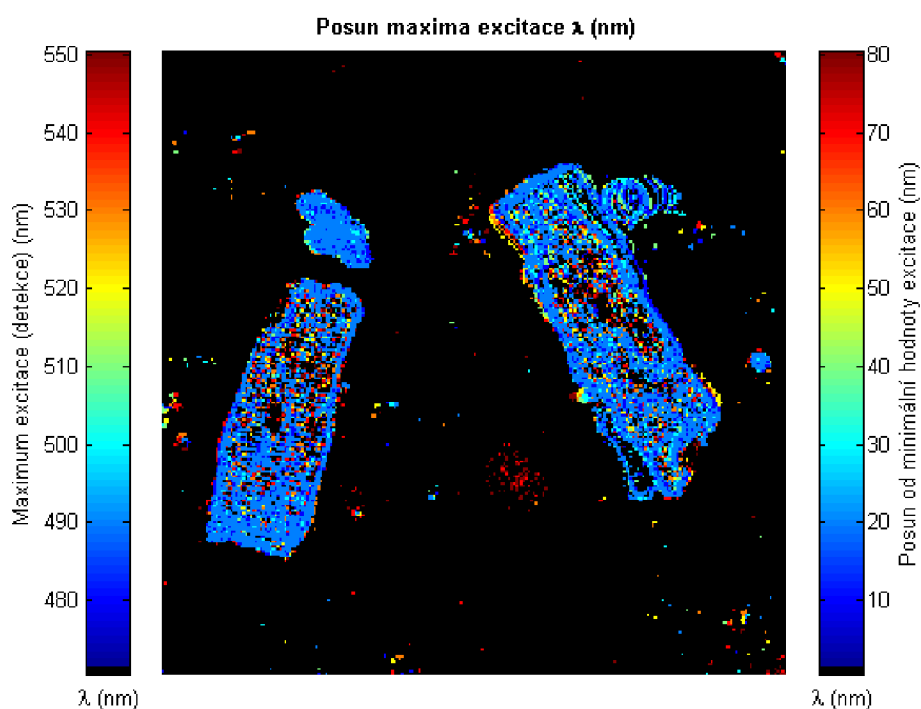
V dalším kroku algoritmus zjistí pozice maxim v jednotlivých maticích. Indexy těchto pozic jsou následně extrahovány pomocí funkce *ind2sub*. Jak již bylo popsáno výše, hodnoty v maticích reprezentují závislost excitace na vlnové délce, a proto je indexům řádků přiřazen rozsah excitace a indexům sloupců rozsah emise. Hodnoty rozsahu vlnových délek excitace jsou získány z metadat a hodnoty vlnových délek detekce (emise) jsou získány z názvů složek (Postup již popsán výše). Následně jsou do dvou předem připravených prázdných matic uloženy vlnové délky maxim excitace a emise na pozicích konkrétních pixelů. Tímto způsobem jsou získány dvě výsledné matice (jedna pro excitaci, druhá pro emisi) stejné velikosti jako původní snímky (Část výsledné matice s maximy excitace je v Tab. 3).

Tabulka 3: Ukázka části výsledné matice s maximálními hodnotami excitace

470	470	470	470	470	470	490	480
470	470	470	470	470	480	480	480
470	470	470	470	470	490	490	490
470	470	470	470	540	490	490	470
470	470	470	470	480	480	490	480
470	470	470	470	480	490	500	480

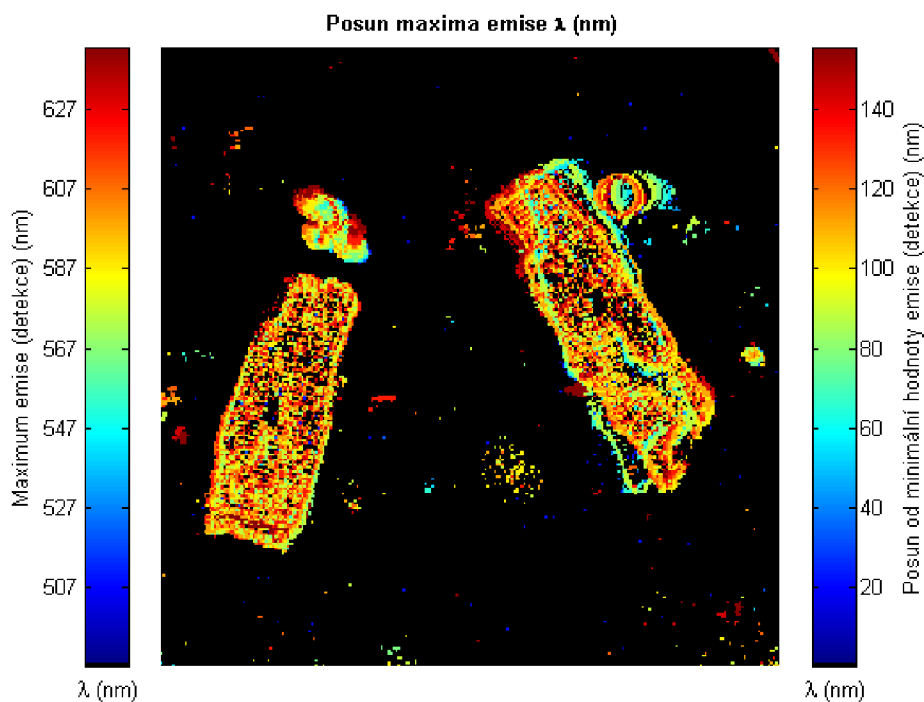
Ve výsledných maticích excitace a emise je všem pozicím, na kterých se vyskytuje pozadí, přiřazen nejnižší index. Celému pozadí je tak přiřazena nejnižší vlnová délka, která se později pro vykreslení správného výsledku musí eliminovat (Ukázka v Tab. 3, kde vlnová délka 470 odpovídá pozadí).

Pro zobrazení posunu maxima excitace se z výsledné matice odečte nejnižší hodnota, tím se získá obraz, kde jednotlivé indexy odpovídají posunu vlnové délky od minimální hodnoty excitace (Př.: Při použití Tab. 3 by se odečetla minimální hodnota 470, od této hodnoty se zobrazuje výsledné posunutí). K takto indexovanému obrazu je přiřazena barevná paleta jet, jejíž počet barev odpovídá maximálnímu posunu. Ve výsledku je zobrazen pseudobarevný obraz (Obr. 34), kde jednotlivé barvy charakterizují posun maxima excitace (v nm). K obrazu jsou také doplněny barevné škály *colorbar*, která usnadňuje orientaci v prostorové oblasti celého snímku.



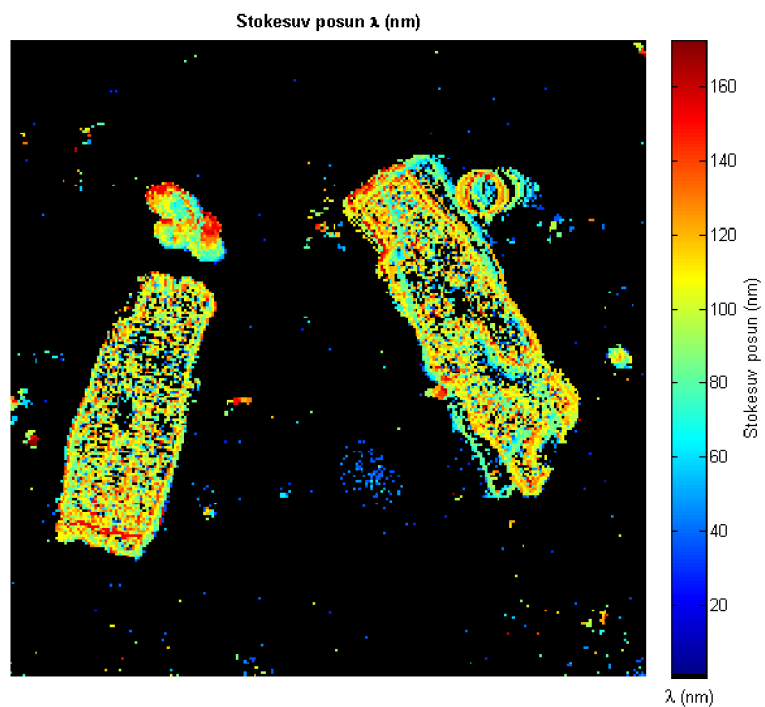
Obr. 34: Výsledek zobrazení posunu maxima excitace (posun od minimální hodnoty excitace)

Při zobrazení posunu maxima emise se postupuje stejně jako v předchozím výsledku, pouze se pracuje s maticí s maximálními hodnotami emise. Z výsledné matice se také odečte nejnižší hodnota, čím se získají hodnoty charakterizující posun maxima emise od minimální hodnoty emise (detekce). K tomuto výsledku je dále přiřazena barevná paleta jet s počtem barev odpovídající maximální hodnotě posunu. Výsledkem je pseudobarevný obraz (Obr. 35) doplněný o barevné škály *colorbar*, které informují o posunu maxima emise v prostorové oblasti celého snímku.



Obr. 35: Výsledek zobrazení posunu maxima emise (posun od minimální hodnoty emise)

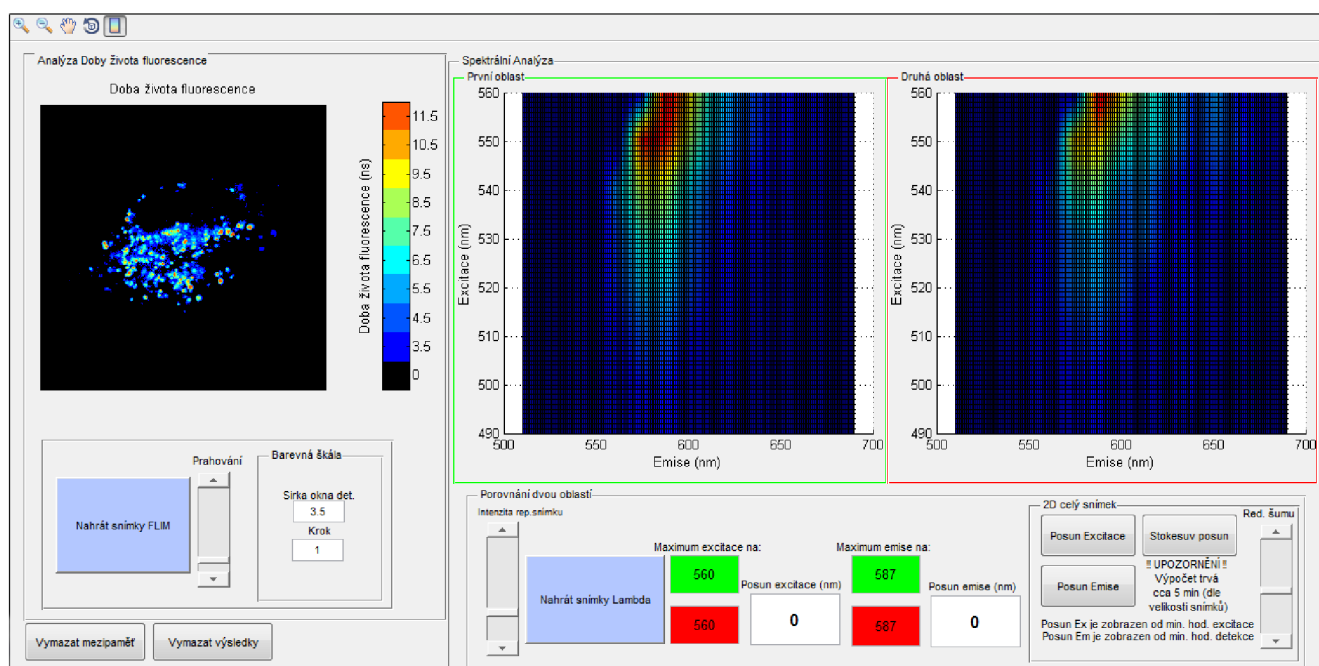
Pro zobrazení Stokesova posunu (Obr. 36) se od matice s maximálními hodnotami emise odečte matice s maximálními hodnotami excitace. Před zobrazením výsledku je vynulována nejnižší hodnota, která reprezentuje pozadí. I v tomto případě je použita barevná paleta jet, díky které jednotlivé barvy ve výsledku vizuálně charakterizují velikost Stokesova posunu v prostorové oblasti celého snímku.



Obr. 36: Výsledek zobrazení Stokesova posunu (v nm)

6.5 Uživatelské prostředí (GUI)

Na obrázku níže je ukázka uživatelského prostředí pro ovládání celého programu, který funguje pro libovolný počet získaných snímků (Obr. 37). Prostedí je rozděleno na dvě části. Levá část slouží pro analýzu doby života fluorescence, pravá část pro spektrální analýzu. Při zobrazování více barevných palet docházelo k vzájemnému přebarvování výsledků. Protože matlab neumožňuje zobrazení více barevných palet najednou, byla použita převzatá externí funkce freezeColors. Jedná se o volně šiřitelnou funkci, která je dostupná na oficiálních stránkách společnosti MathWorks – Matlab Central. Tato funkce umožňuje zobrazit více barevných palet najednou tím, že ukládá aktuální vykreslení. [30]



Obr. 37: Uživatelské prostředí (GUI)

Část pro analýzu doby života fluorescence se skládá z okna pro vykreslení výsledku, tlačítka pro načtení sady snímků, posuvníku a okna pro definování rozsahu barevné škály. Při spuštění programu je nejprve nutné nahrát sadu snímků pomocí tlačítka Nahrát snímky FLIM. Dále je pro vykreslení výsledku potřeba nastavit odpovídající hodnotu prahu, která se určuje posuvníkem. Správná hodnota se volí v závislosti na aktuálním vykreslení dle potřeb uživatele. Protože mikroskop nijak neexportuje informace o šířce detektoru a kroku, s jakou byla sada snímků pořízena, je barevná škála defaultně nastavena pro šířku detektoru 3,5 ns a krok 1. Pokud by bylo potřeba analyzovat sadu snímků, jež byla získána s jiným nastavením šířky detektoru, je možné pro správný popis barevné škály tyto hodnoty upravit. Pro analýzu detailů ve výsledku je možné využít tlačítka v levém horním rohu GUI, která umožňují přibližování, oddalování a posouvání výsledku.

Spektrální analýza slouží pro vykreslení 2D lambda mapy dvou oblastí spektrálních snímků, a také pro zobrazení posunu excitačního a emisního spektra v prostorové oblasti celého snímku. Po spuštění programu je nejprve nutné nahrát snímky, které byly získány mikroskopem pomocí 2D lambda skenu. Poté je do nového okna vykreslen reprezentativní snímek, ze kterého je nutné pomocí myši vybrat dvě obdélníkové oblasti zájmu. Pomocí posuvníku je navíc možné upravit intenzitu reprezentativního snímku. Úpravu intenzity je nutné provést před načtením snímků, neboť reprezentativní snímek se vykresluje hned po načtení příslušných dat. První vybraná oblast je v reprezentativním snímku označena zeleně, druhá oblast je označena červeně. Poté, co jsou vybrány tyto dvě libovolné oblasti, dojde k vykreslení závislosti excitace na emisi (2D lambda mapy) obou oblastí. Mapa zeleně označené oblasti je vykreslena v levém zeleně orámovaném okně. Mapa červeně označené oblasti je vykreslena v pravém červeně orámovaném okně. Pomocí tlačítek v levém horním rohu GUI je možné příslušnou lambda mapu přibližovat, vzdalovat, posouvat, případně zobrazit 3D povrch a rotovat. Pod těmito výsledky jsou vypsány maximální hodnoty excitace a emise obou oblastí a vzájemný posun mezi těmito oblastmi. Na zeleném pozadí je vypsána maximální hodnota excitace a emise levé (zelené) mapy, na červeném pozadí pak maximální hodnota excitace a emise pravé (červené) mapy.

Dále je možné pomocí tlačítek v pravém dolním rohu vykreslit posun excitace, posun emise a Stokesův posun v prostorové oblasti celého snímku. Celý výpočet je uložen pod tlačítkem Posun Excitace. Z tohoto důvodu je nutné vždy nejprve stisknout tlačítko zobrazení posunu excitace. Tlačítka Posun Emise a Stokesův posun slouží pouze pro vykreslení daného výsledku, a proto musí být stisknuta až po vykreslení posunu emise. Výpočet pro zobrazení trvá několik minut, protože algoritmus prochází každý pixel každého snímku v celé sadě. Pro snímky velikosti 256x256 výpočet trvá cca 5-8 minut, pro snímky 512x512 cca 40 minut. Zobrazení příslušného posunu je vykresleno vždy v novém okně. Pokud by výsledné zobrazení bylo zatíženo šumem z pozadí, je možné šum eliminovat pomocí posuvníku Red. šumu. Podle zobrazeného posunu v prostorové oblasti celého snímku je možné vybírat ty oblasti zájmů, kde jsou viditelné změny a hodnotit pak jejich 2D lambda mapy.

Celý algoritmus s uživatelským prostředím je koncipován tak, aby sloužil k analýze a hodnocení získaných snímků doby života fluorescence a spektrálních lambda snímků v offline režimu mimo software mikroskopu. Na snímcích konkrétních buněk je tak možné hodnotit, v kterých částech se mění doba života fluorescence, a také kde dochází ke spektrálním změnám. Při analýze spektrálních vlastností je možné hodnotit jak chování emise, tak i chování excitace použitého fluorescenčního barviva. Zobrazení doby života fluorescence a spektrálních změn jsou na sobě zcela nezávislé, a proto je možné hodnotit pouze jedno z nich.

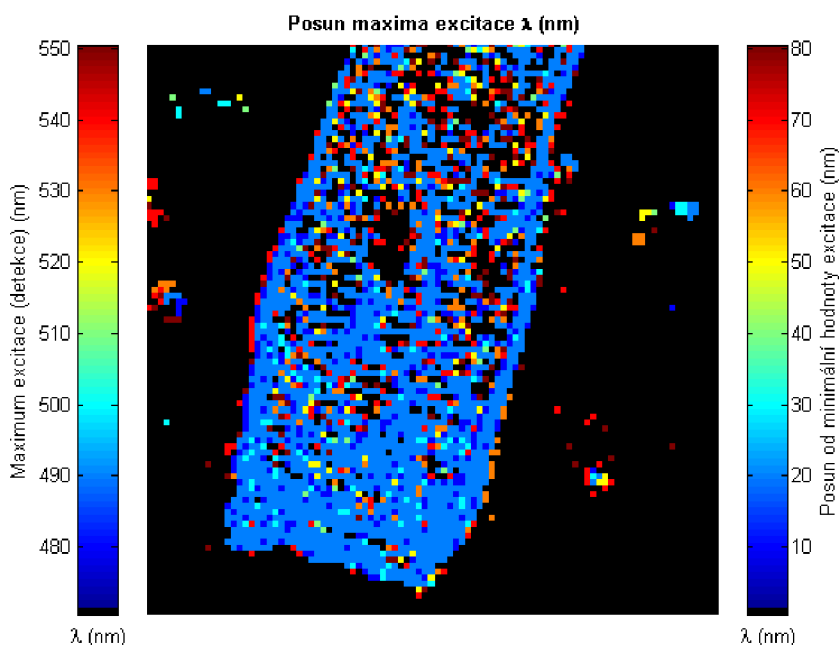
7 Vyhodnocení výsledků

V této části práce je popsán experiment s rhodaminovými nanočásticemi, a také je zde uvedeno vyhodnocení spektrálních změn kardiomyocytů, které spolu s barvivem Di-4-ANEPPS vykazují silné spektrální změny. Cílem experimentu je zjistit, zda na snímcích testovaných buněk dochází ke spektrálním změnám, a také ke změnám v době života fluorescence vlivem okolního prostředí, či různým vlivem vnitrobuněčných interakcí.

7.1 Hodnocení spektrálních změn u buněk kardiomyocytů

Použité buňky kardiomyocytů byly obarveny napěťově citlivým membránovým barvivem Di-4-ANEPPS. Toto barvivo se váže především na buněčné membrány a posouvá fluorescenční spektrum v závislosti na elektrickém potenciálu prostředí. Na pořizovaných spektrálních snímcích (Obr. 24) je jasně patrné, že k fluorescenci dochází převážně v oblasti membrán.

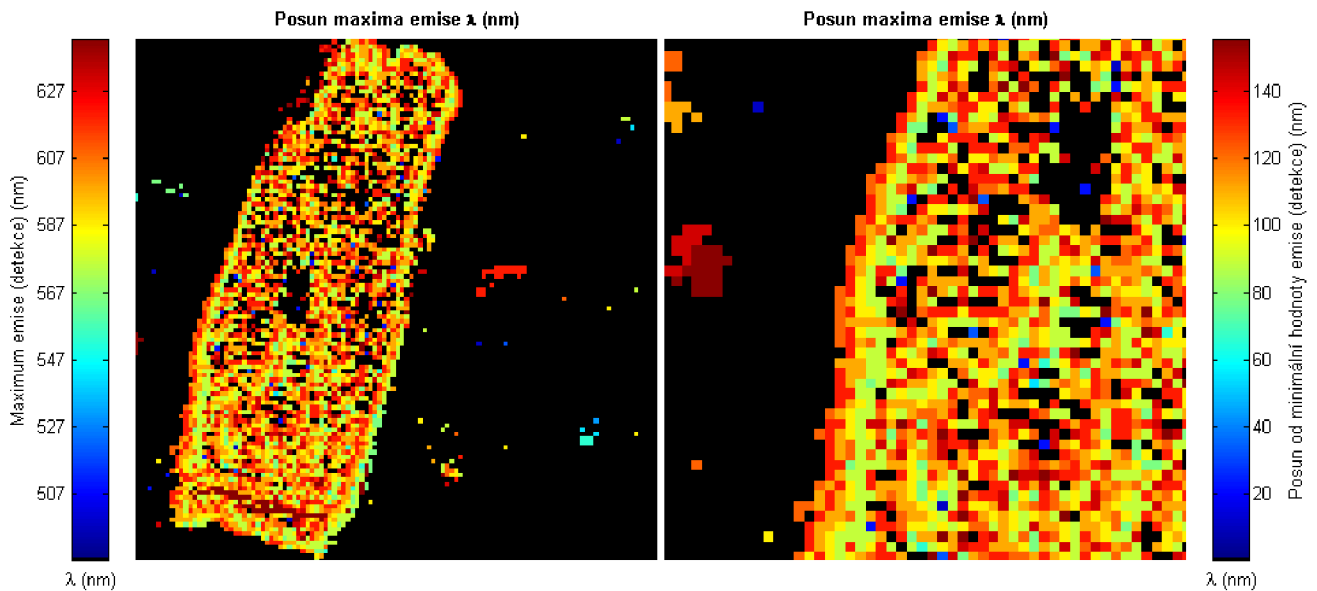
Při vykreslení posunu maxima excitace v prostorové oblasti buňky (Obr. 38) pomocí realizovaného programu je vidět, že maximum excitace bylo většinou na 490 nm, místy na 480 nm. Posun od minimální hodnoty excitace, jež byla 470 nm, byl tedy 10 a 20 nm. Hodnoty vyššího posunu jsou lokalizovány spíše uvnitř buňky v podobě jednotlivých impulzů. Z celkového výsledku lze usoudit, že k excitaci barviva Di-4-ANEPPS v prostorové oblasti testované buňky kardiomyocytu dochází téměř rovnoměrně.



Obr. 38: Výsledek posunu maxima excitace u buňky kardiomyocytu

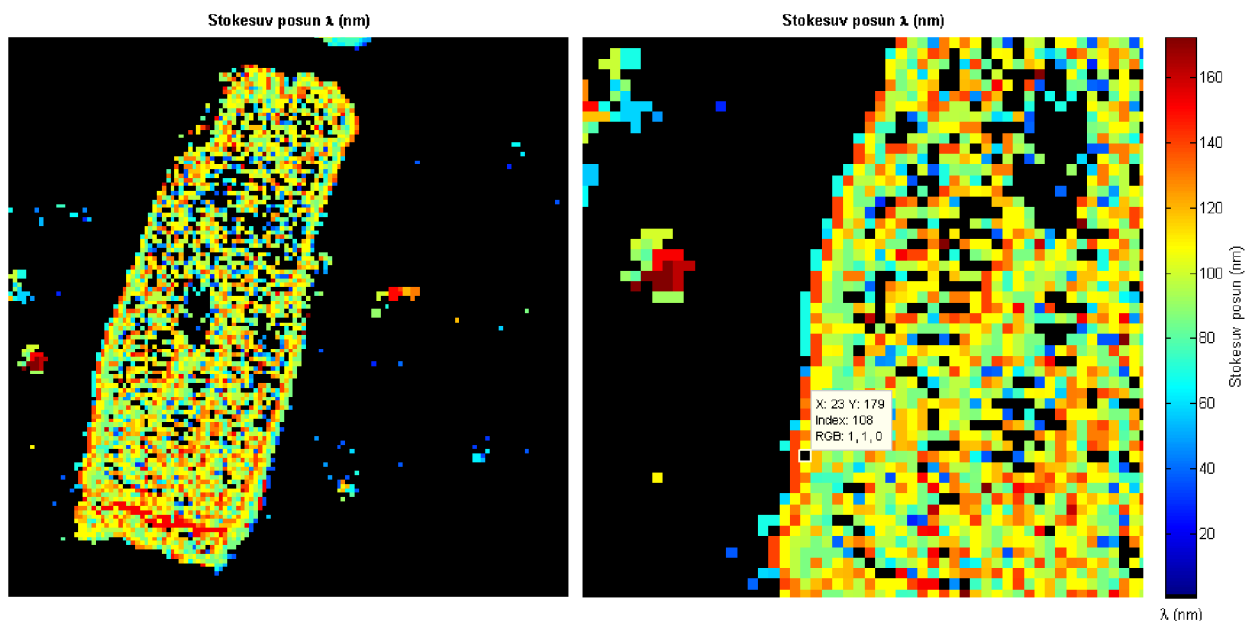
Při vykreslení posunu maxima emise v prostorové oblasti buňky (Obr. 39) jsou již patrně viditelné změny na membránách. Minimální hodnota detekce byla nastavena na

vlnovou délkou 487 nm. Na vnějším okraji plazmatické membrány byl zaznamenán posun od minimální hodnoty o 133 nm a 122 nm (emise na 620 a 609 nm). Na vnitřní straně membrány docházelo k emisi na 576 nm, tedy posun o 89 nm od minimální hodnoty detekce. Na výsledných snímcích je dále vidět, že v cytosolu uvnitř buňky dochází k rovnoměrnému rozložení posunu maxima emise a nejsou zde viditelné žádné specifické struktury.



Obr. 39: Posunu maxima emise kardiomyocytu celé buňky (vlevo) a detail membrány (vpravo)

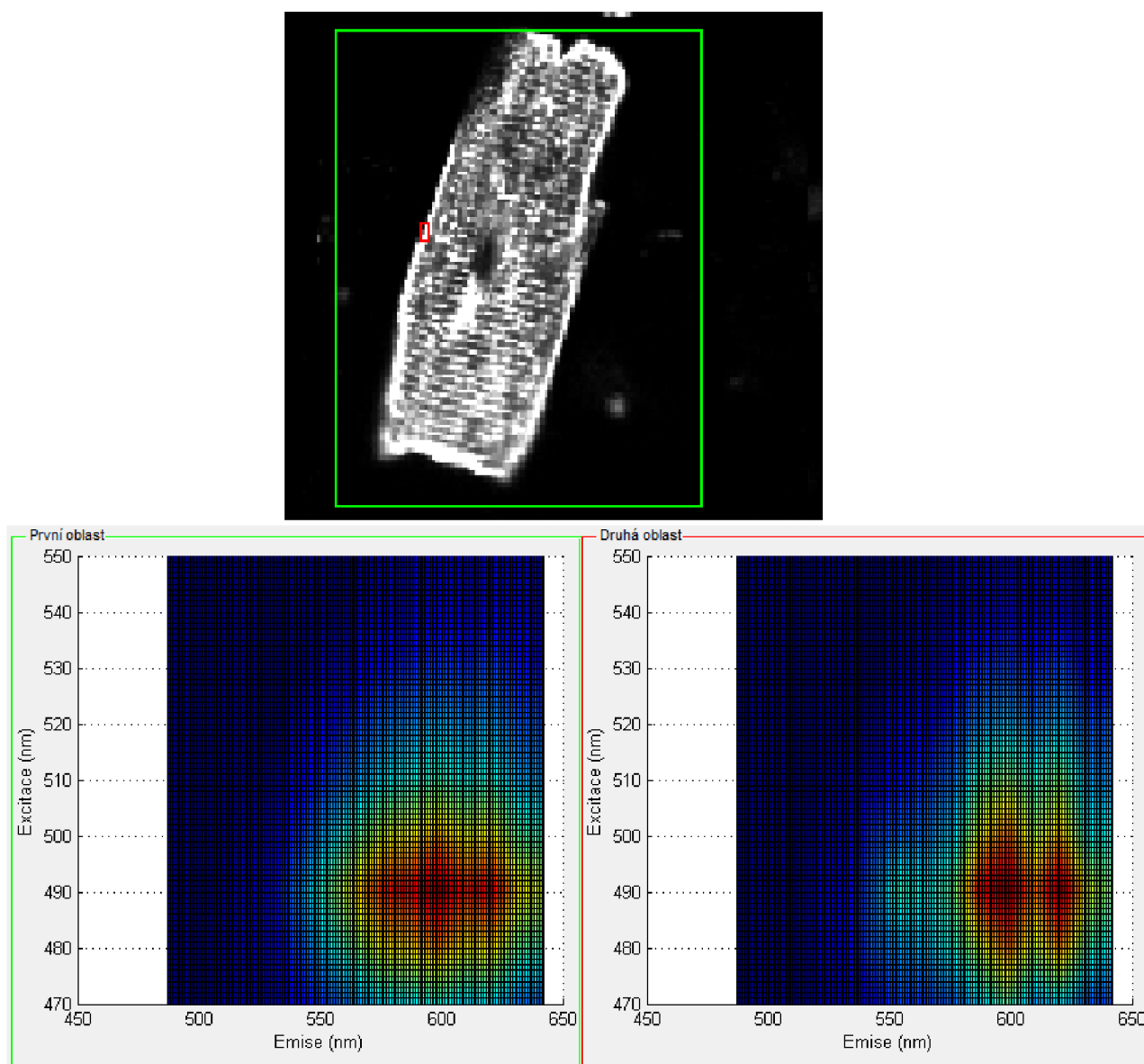
Při zobrazení Stokesova posunu v prostorové oblasti buňky kardiomyocytu jsou také viditelné změny na membráně. Při detailnějším pohledu na plazmatickou membránu (Obr. 40) je vidět, že na vnější straně dochází k posunu 69 nm, ve středu membrány je Stokesuv posun 140 nm a na vnitřní straně membrány dochází k poklesu na hodnoty 108 a 97 nm.



Obr. 40: Výsledek Stokesova posunu na buňce kardiomyocytu (vlevo) a detail mambrány (vpravo)

Plazmatická membrána je složená z lipidové dvojvrstvy, jež se skládá z hydrofilních hlaviček, které jsou orientované intra a extracelulárně. Mezi těmito hlavičkami se nachází hydrofobní ocásky. Z výsledku by se dalo usoudit, že na hydrofobní části plazmatické membrány dochází k vyšším hodnotám Stokesova posunu použitého fluorescenčního barviva. V cytoplasmě buňky byl zaznamenán rovnoměrně rozložený Stokesův posun bez viditelných struktur.

Při porovnání excitačně-emisních map (Obr. 41) celé buňky kardiomyocytu (levá mapa) a části plazmatické membrány (pravá mapa) je patrné, že k maximální excitaci docházelo v obou oblastech na 490 nm. Levá mapa se skládá z příspěvků celé buňky, pravá mapa pouze z malé oblasti části membrány. Z levé mapy je patrné, že pro oblast celé buňky docházelo k maximální emisi na 598 nm. Pro vybranou oblast membrány bylo maximum emise také na 598 nm, zároveň jsou však patrné výraznější příspěvky emise kolem 620 nm.



Obr. 41: Lambda mapy vybraných oblastí buňky kardiomyocytu

7.2 Hodnocení chování rhodaminových nanočástic v konkrétním experimentu

V dnešní praxi je velmi důležité dobře charakterizovat změny v excitačním a emisním spektru fluorescenčních značek při fixaci buněk. Ne všechny fluorofory si zachovají fluorescenční vlastnosti při fixaci. [10], [32]

Tento experiment měl za úkol podrobně zmapovat změny excitačně-emisních spekter právě při vystavení buněk fixačním činidlům - paraformaldehydu a etanolu. Na konfokálním mikroskopu Leica bylo provedeno celkem 6 spektrálních snímání pomocí funkce 2D lambda, kdy před každým snímáním byly buňky vystaveny fixačním činidlům. Nastavení parametrů mikroskopu pro měření bylo vždy stejné a je již uvedeno výše v textu (viz kapitola 6.1.4). Nejprve byla pořízena sada spektrálních snímků samostatných mezenchymálních buněk spolu s nanočásticemi a kultivačním médiem. Pro druhé snímání byl k těmto buňkám přidán paraformaldehyd tak, aby koncentrace paraformaldehydu a kultivačního média byla 1:1. Paraformaldehyd je histologické fixační činidlo, které slouží k fixaci všech membrán v buňce. Pro třetí snímání byl vytvořen nový vzorek, ve kterém bylo kultivační médium odsáto a buňky zality roztokem paraformaldehydu. Před čtvrtým snímáním byl k tomuto roztoku paraformaldehydu přidán etanol tak, aby koncentrace paraformaldehydu a etanolu byla 10:1. Pro páté snímání byl přidán znova etanol, aby se koncentrace ve vzorku zvýšila na poměr 1:1. Pro poslední šesté snímání byl vytvořen nový vzorek, který obsahoval mezenchymální buňky s nanočásticemi kde médium bylo nahrazeno čistým etanolem. Etanol má na fluorescenci některých fluoroforů degradující účinky a proto byl v experimentu použit. [10], [32]

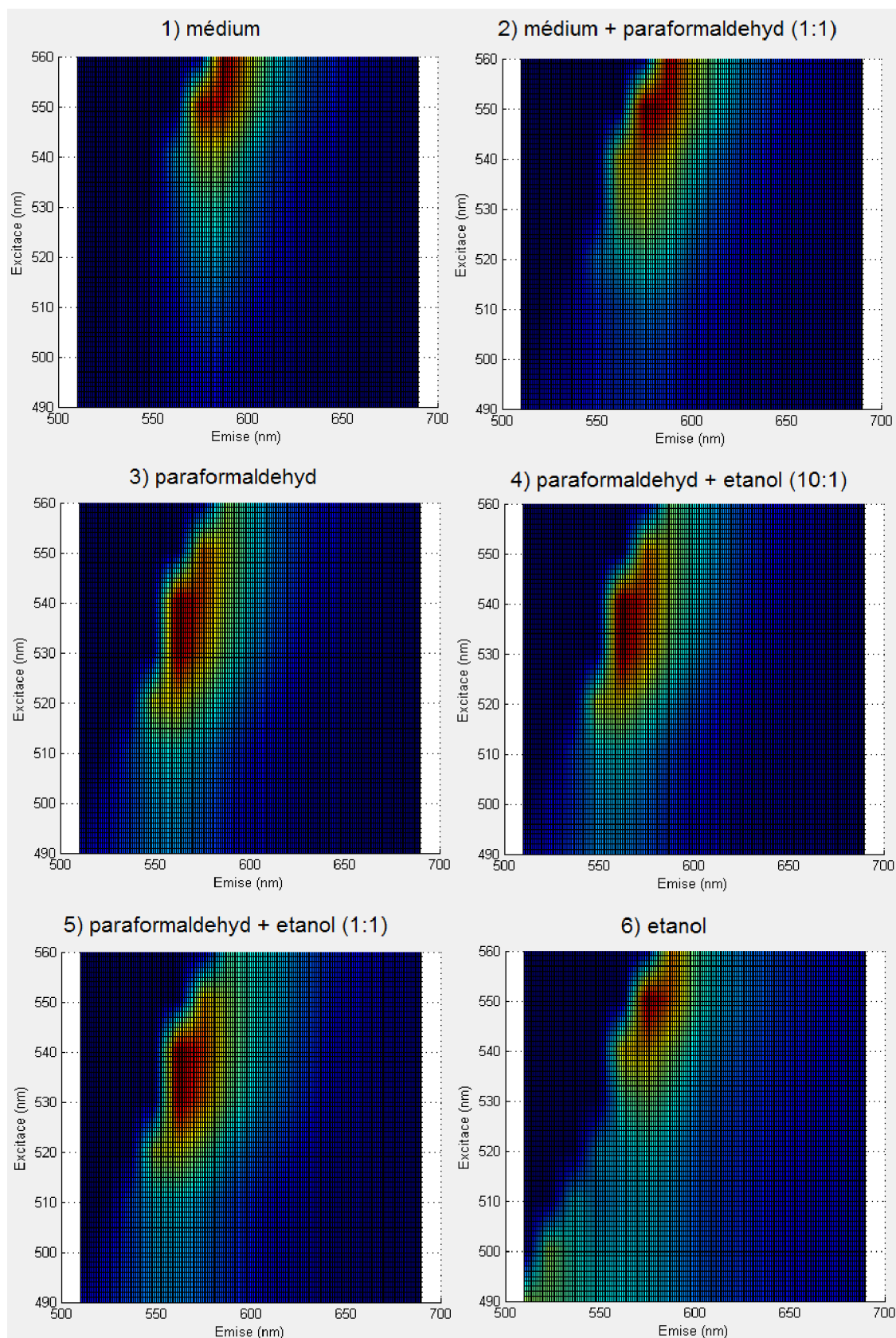
Celkem tak bylo naměřeno šest sad spektrálních snímků pro rozdílné vnější podmínky. Pomocí realizovaného programu byly vykresleny excitačně-emisní mapy vždy pro oblast celé buňky (Obr. 42). Z každé této mapy byly zjištěny hodnoty maxim excitace a emise. V tabulce níže (Tab. 4) jsou uvedeny složky přidané k nanočásticím v konkrétním měření a hodnoty zjištěných maxim.

Tabulka 4: Jednotlivé složky přidané k nanočásticím a detekované hodnoty maxim (oblast celé buňky)

Měření	Přidaná složka	Max EX (nm)	Max EM (nm)
1.	médium	560	587
2.	médium + paraformaldehyd (1:1)	550	574
3.	paraformaldehyd	530	561
4.	paraformaldehyd + etanol (10:1)	540	561
5.	paraformaldehyd + etanol (1:1)	540	561
6.	pouze etanol	550	574

Ze zjištěných výsledků je patrné, že přidání jakékoli použité složky vede ke snížení maxima excitace i emise. Nejvyšší pokles maxima excitace byl zaznamenán pro vzorek

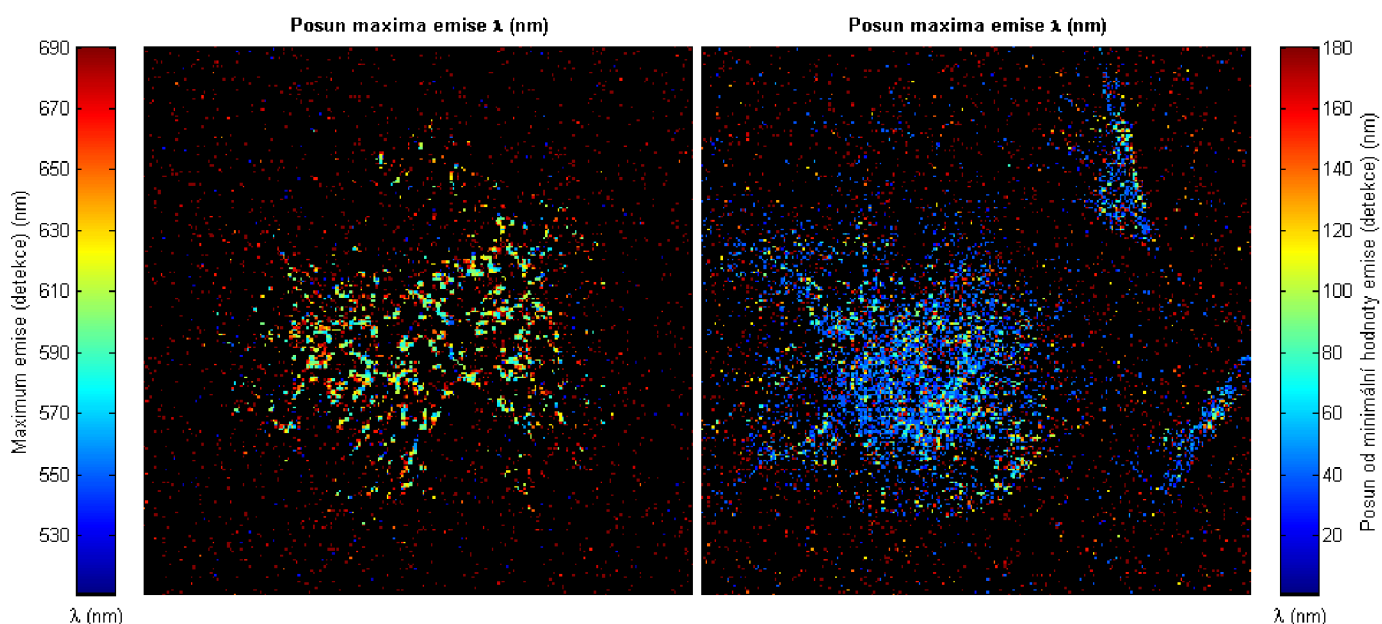
nanočástic v paraformaldehydu. Nejvyšší pokles maxima emise byl zaznamenán pro 3. až 5. měření, kde byla naměřena stejná hodnota 561 nm.



Obr. 42: Lambda mapy v různých podmínkách pro oblast celé buňky

Pokud porovnáme výše zobrazené lambda mapy (Obr. 42), jež byly získány vždy pro oblast celé buňky v různých podmínkách, jsou jasně patrné mírné změny. První mapa zobrazuje nanočástice v kultivačním médiu, po přidání paraformaldehydu je patrné zvětšení celé mapy převážně ve směru excitace k nižším vlnovým délkám. Pokud se studované nanočástice nacházely pouze ve fixačním činidlu (paraformaldehydu), vidíme jasný posun dominantního píku k nižším hodnotám jak excitace, tak i emise. Pokud se ke vzorku nanočástic s formaldehydem přidal etanol, nebyla patrná žádná větší změna. Ke změně lambda mapy nepřispělo ani zvýšení koncentrace etanolu k fixačnímu činidlu. Nanočástice, které byly pouze v etanolu (jež může být agresivnější pro některé fluorofory a degraduje fluorescenci), vykazují zúžení celé excitačně-emisní mapy směrem k vrcholu na 550 nm excitace a na 574 nm emise.

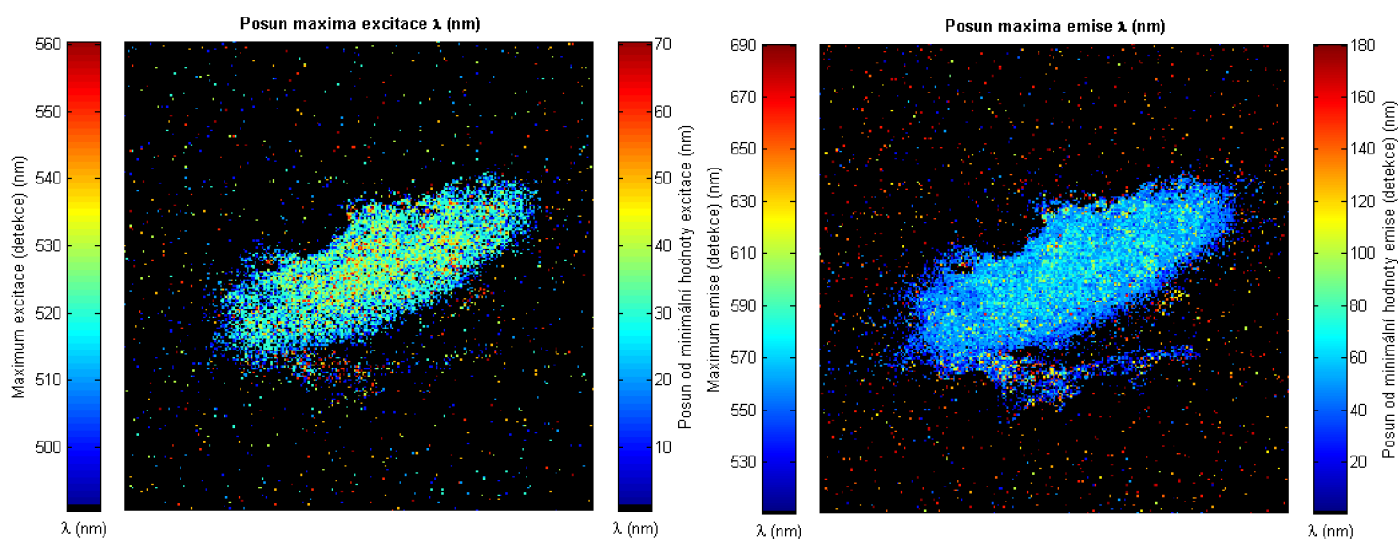
Zobrazení posunu maxima excitace a maxima emise v prostorové oblasti celého snímku vykazuje u nanočástic v kultivačním médiu bez přidávání dalších činidel rovnoměrné zastoupení všech hodnot v celém rozsahu excitace i emise a nejsou zde viditelné žádné specifické struktury. Po přidání fixačního činidla se hodnoty excitace ustálí na hodnotách 500 až 510 nm a hodnoty emise v rozsahu 530 až 570 nm v oblasti celé buňky. Na obrázku níže (Obr. 43) je znázorněn posun maxima emise bez fixačního činidla (vlevo) a s fixačním činidlem (vpravo). Z ukázky je patrné, že po přidání fixačního činidla jsou hodnoty rovnoměrně ustáleny na hodnotách maximální emise kolem 530 až 570 nm v celé oblasti buňky.



Obr. 43: Posun maxima emise bez fixačního činidla (vlevo), s fixačním činidlem (vpravo)

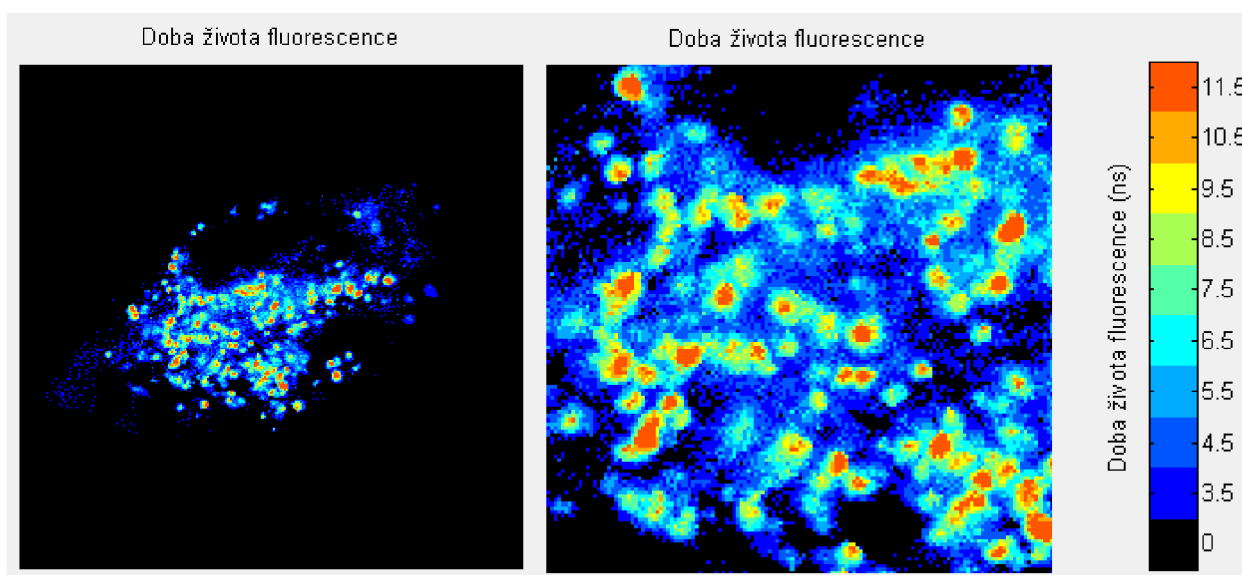
Pro vzorky pouze s fixačním činidlem a vzorky s etanolem bylo dosaženo obdobných hodnot maxim excitace a emise. Na některých snímcích je možné pozorovat vyšší posun excitace a emise nanočástic lokalizovaných v centru buněk a menší posun nanočástic

lokalizovaných u okrajů, což mohlo být způsobeno rychlejší difuzí a vyšší koncentrací fixačního činidla u okrajů buněk. Na obrázku níže (Obr. 44) je zobrazen vzorek pouze v paraformaldehydu bez kultivačního činidla. Jsou zde patrné vyšší hodnoty ve středu buňky.



Obr. 44: Posun maxima excitace a emise pro nanočástice v paraformaldehydu (bez média)

Na obrázku níže (Obr. 45) je zobrazena doba života fluorescence rhodaminových nanočástic v prostorové oblasti pomocí realizovaného programu. Jedná se o nanočástice v kultivačním médiu bez přidávání jakýchkoli dalších činidel. V levé části je zobrazena celá mezenchymální buňka a v pravé části detail na intracelulární vāčky. Ze zobrazeného výsledku je patrné, že nejdelší doba fluorescence přetrvávala v intracelulárních vāčkách, jež jsou pravděpodobně tvořeny hlavně lysozomy, endozomy a místy také mitochondriemi. V oblastech mimo tyto vāčky se fluorescence udržela zhruba do 5,5 ns. Z toho můžeme usoudit, že většina rhodaminových nanočástic se dostala dovnitř těchto vāček, kde byla bezpečně lokalizovaná.



Obr. 45: Zobrazení doby života fluorescence nanočástic na mezenchymálních buňkách

8 Závěr

Tématem této diplomové práce bylo studium doby života a spektrálních změn fluorescence nanočástic v buněčné biologii. Úkolem bylo nejprve se teoreticky seznámit s fluorescenční konfokální mikroskopií a jejím využití při měření doby života fluorescence. Dále bylo nutné prostudovat možnosti využití laditelného laseru, funkci řízení doby otevření detektoru a techniku spektrálního skenu. Na základě získaných znalostí mělo být realizováno měření, navrhuta metoda pro vyhodnocení a diskuze získaných výsledků.

Nejprve jsem se snažil popsat základní principy fluorescence, její hlavní charakteristiky, dobu života fluorescence a rozdělení fluoroforů. Poté jsem se pokusil přiblížit fluorescenční konfokální mikroskopii s důrazem převážně na přednosti mikroskopu Leica TCS SP8. Popsal jsem princip laditelného laseru WLL, hybridních detektorů, funkci TimeGate a lambda skenu. Dále jsem se teoreticky zaměřil na vybrané fluorescenční techniky, jež se využívají při zkoumání buněk. Přiblížil jsem klasickou metodu FLIM, mapování Lambda Square a charakteristiku nanočástic.

Na základě konzultací s vedoucím práce byla praktická část více zaměřena na zobrazení excitačně-emisních lambda map a hodnocení spektrálního posunu. S využitím teoretických poznatků jsem provedl několik měření, během nichž jsem pomocí funkce TimeGate a 2D lambda skenu získal sadu fluorescenčních snímků a sadu spektrálních snímků rhodaminových nanočástic mezenchymálních buněk. Pro předpokládané spektrální změny barviva byla pořízena i sada spektrálních snímků kardiomyocytů, jež byly obarveny napětěově citlivým barvivem Di-4-ANEPPS. V práci jsem krátce popsal charakteristiku použitých buněk, kroky jejich přípravy a barvení. Podle předem navrženého schématu jsem v prostředí MatLab realizoval program, který zahrnuje uživatelské prostředí pro hodnocení pořízených snímků. Vytvořený program umožňuje ze sady fluorescenčních snímků zobrazit dobu života fluorescence v prostorové oblasti. Aby bylo možné hodnotit spektrální změny pořízených snímků, umožňuje program zobrazovat excitačně-emisní lambda mapy ze snímků podobně jako software mikroskopu. Výhodou je možnost hodnocení naměřených dat v offline režimu mimo softwarové prostředí mikroskopu Leica a vzájemné porovnání dvou oblastí zájmu. Hodnocení spektrálních změn je rozšířeno o zobrazení posunu maxima emise a excitace a o zobrazení Stokesova posunu v prostorové oblasti celého snímku.

V závěrečné části práce jsem popsal a zhodnotil spektrální změny u kardiomyocytů. S testovanými rhodaminovými nanočásticemi byl realizován experiment, při němž se vždy před každým snímáním změnily vnější podmínky. Hodnocením snímků jsem došel k závěru, že změnou vnějších podmínek u nanočástic dochází ke změnám v jejich spektru.

Seznam použité literatury

- [1] AOBS® – The Most Versatile Beam Splitter: Acousto-Optical Beam Splitter for the TCS SP8 Confocal. Leica Microsystems [online]. 2014 [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: http://www.leicamicrosystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8%20X/Brochures/Leica%20AOBS-Brochure_EN.pdf
- [2] BÁLKOVÁ, Radka. Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM). *Chempoint* [online]. 2011 [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>
- [3] BEREZIN, Mikhail Y. a Samuel ACHILEFU. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews*. 2010-05-12, vol. 110, issue 5, s. 2641-2684. DOI: 10.1021/cr900343z. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2924670/>
- [4] BERLINGHAUS, Rolf T. Gates Open for Improved Confocal Fluorescence and Super-Resolution STED. *Leica Microsystems* [online]. 2013 [cit. 2014-11-03]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/gates-open-for-improved-confocal-fluorescence-and-super-resolution-sted/>
- [5] BERLINGHAUS, Rolf T. Spectral Detection – How to Define the Spectral Bands that Collect Probe-specific Emission. *Leica Microsystems* [online]. 2013 [cit. 2014-11-03]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/spectral-detection-how-to-define-the-spectral-bands-that-collect-probe-specific-emission/>
- [6] BOCÁKOVÁ, Milada. Obecná Zoologie: Živočišná buňka. *Univerzita Palackého, Pedagogická fakulta Olomouc* [online]. 2004 [cit. 2014-11-19]. Dostupné z: http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/PdF-katedry/KPR/bocakova/Bunka/bunka.html
- [7] Buňka: Interaktivní výuková aplikace. In: *SZŠ Karviná* [online]. [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://sszdra-karvina.cz/bunka/>
- [8] CENKLOVÁ, Věra. Mikroskopie a obrazová analýza pro biochemiky: Fluorescenční mikroskopie a její využití v biologii. *FytoChem* [online]. [cit. 2014-10-15]. Dostupné z: www.fytochem.cz/Services/Downloader.ashx?id=100
- [9] ČERNÝ, Jan. *Fluorescenční mikroskopie*. Oddělení vývojové biologie, Katedra fyziologie živočichů. Přírodovědecká fakulta UK v Praze [online]. Dostupné z: <http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf>
- [10] DEL CASTILLO, P., LLORENTE, A. R., & STOCKERT, J. C. (1988). Influence of fixation, exciting light and section thickness on the primary fluorescence of samples for microfluorometric analysis. *Basic and applied histochemistry*, 33(3), 251-257.

- [11] Di-4-ANEPPS. *Life Technologies* [online]. 2015 [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/D1199>
- [12] DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH, F.C MARINI, D.S. KRAUSE, R.J. DEANS, A. KEATING, D.J. PROCKOP, et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**(4): 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905. ISSN 14653249. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
- [13] FÄHNRIČH, Jan. Fluorimetrie. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>
- [14] FIŠAR, Zdeněk. FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH: Principy fluorescenční spektroskopie. [online]. [cit. 2014-10-10]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>. ISSN 1803-6619
- [15] FLIM a další fluorescenční metody. *Lao* [online]. 2014 [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: <http://www.lao.cz/aplikace-79/zobrazovaci-metody-145/flim-a-dalsi-fluorescencni-techniky-147>
- [16] Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM): Imaging technique based on differences in the excited state decay rate. *PicoQuant* [online]. [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-lifetime-imaging-flim>
- [17] FYZIKÁLNÍ ÚSTAV UK, ODDĚLENÍ FYZIKY BIOMOLEKUL. Charakteristiky optického záření. *Fyzika III: Optika* [online]. [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: http://fu.mff.cuni.cz/biomolecules/media/files/courses/Real_opt_zar_UFY102.pdf
- [18] HLAVÁČEK, Antonín a Petr SKLÁDAL. Kvantové tečky: Příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita*,. 2010. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_611-615.pdf
- [19] HRAZDÍRA Ivo, MORNSTEIN Vojtěch. Lékařská biofyzika a přístrojová technika. Neptun ©2006. ISBN 80-902896-1-4
- [20] JELÍNEK, R., M. DOSTÁL, Z LIKOVSKÝ, M HALAŠKOVÁ, E. MAŇÁKOVÁ, M. PETERKA, R. PETERKOVÁ, M. TITLBACH, J. VELICKÝ a Z. ZEMANOVÁ. *Histologie embryologie* [online]. Centrum biomedicínských oborů 3. LF UK, s. 15-30 [cit. 2014-11-19]. Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

- [21] KUBÍNEK, Roman. Vzdělávání v nanotechnologiích. In: [online]. 2011 [cit. 2014-10-03]. Dostupné z:
<http://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/granty/VzdelavaniNano.pdf>
- [22] KUSÁK, Ivo. Konfokální mikroskop. *Ústav fyziky FAST VUT* [online]. [cit. 2014-10-20]. Dostupné z: http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/konfokalni_mikroskopie.pdf
- [23] KUSCHEL, Lioba a Rolf T. BORLINGHAUS. White Light Laser: The Ultimate Source for Confocal Microscopy. *Leica Microsystems* [online]. 2012 [cit. 2014-10-29]. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/white-light-laser/>
- [24] KRAJSKÁ HYGIENICKÁ STANICE MORAVSKOSLEZSKÉHO KRAJE. *Nanotechnologie a nanomateriály* [online]. 2009 [cit. 2014-10-03]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/01_aktuality/nanotechnologie.php?datum=2009-03-18
- [25] LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third. Singapore: Springer, 2006. ISBN 0-387-31278-1. Dostupné z:
<http://www.lcg.unam.mx/~rgalindo/bioquimica/BQPosgrado2011/V%20PurificacionEspectroscopia/PrinciplesofFluorescenceSpectroscopy3rd.pdf>
- [26] LEICA TCS SP8 X. *MIKRO spol. s r.o.* [online]. 2014 [cit. 2014-10-22]. Dostupné z: <http://www.mikro.cz/konfokalni-multifotonova-a-tirf-mikroskopie/leica-tcs-sp8-x/>
- [27] Leica Lambda Scans. *University of Houston: Biology & Biochemistry Imaging Core (BBIC)* [online]. 2014 [cit. 2014-11-04]. Dostupné z: <http://bbic.nsm.uh.edu/protocols/leica-lambda-scans>
- [28] LEICA MICROSYSTEMS. *Lambda Square Mapping and FLIM: Explore Photonic Landscapes with the Leica TCS SP5 X*. 2011. Dostupné z: http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP5%20X/Brochures/Leica%20Lambda%20Square%20Mapping%20and%20FLIM-Brochure_EN.pdf
- [29] Life Technologies [online]. Fluorescence Fundamentals. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html>
- [30] MathWorks: MATLAB CENTRAL. IVERSEN, John. *FreezeColors / unfreezeColors* [online]. 28.06.2005, 14.10.2010 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/7943-freezecolors---unfreezecolors>
- [31] PADDOCK, Stephen W., Thomas J. FELLERS a Michael W. DAVIDSON. Confocal Microscopy. Nikon MicroscopyU [online]. [cit. 2014-10-22]. Dostupné z: <http://microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>

- [32] PENZKOFER, A., & LU, Y. (1986). Fluorescence quenching of rhodamine 6G in methanol at high concentration. *Chemical physics*, 103(2), 399-405.
- [33] PLACHÝ, Radek. *Metody mikroskopie: Fluorescenční mikroskopie. Ústav lékařské biologie Lékařská fakulta University Palackého*. 2004. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/mikroskopie/fluorescencni%20mikroskopie.htm>
- [34] REICHL, Jaroslav. *Encyklopedie fyziky: Fotonásobič* [online]. 2014 [cit. 2014-11-01]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/747-fotonasobic>
- [35] SEDLÁŘOVÁ, Michaela. *Konfokální mikroskopie: Principy konfokální mikroskopie. Katedra botaniky PřF UP v Olomouci* [online]. 2010 [cit. 2014-10-17]. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlasy/confmicro/principles.php>
- [36] SEHADOVÁ, Hana. *Fluorescenční a konfokální mikroskopie. Biologické centrum AVČR, České Budějovice* [online]. 2011 [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>
- [37] *Setting up your detection windows in the SP8 software. University of Houston: Biology & Biochemistry Imaging Core (BBIC)* [online]. 2014 [cit. 2014-11-04]. Dostupné z: <http://bbic.nsm.uh.edu/protocols/setting-the-detectors-in-the-leica-sp8>
- [38] SKOPALÍK, J., M. HAVRDOVÁ, V. ČMIEL, K. POLÁKOVÁ a D. HRUŠKOVÁ. 2013. Nanočástice v současné biologii a medicíně. *Zpravodaj Československé biologické společnosti*. 23(2). ISSN 1805-9619. Dostupné také z: <http://www.icsbs.cz/images/zpravodaj/ZpravodajCSBC201302.pdf>
- [39] Stokes shift. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift#/media/File:Stokes_shift-_Rh6G.png
- [40] TRAUTMANN, S., V. BUSCHMANN, S. ORTHAUS, F. KOBERLING, U. ORTMANN, a R. ERDMANN. *Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview. PicoQuant* [online]. [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: http://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7350/appnote_flim_overview.pdf
- [41] ULLMANN, Vojtěch. *Jaderná a radiační fyzika: Ionizující záření*. [online]. [cit. 2014-10-05]. Dostupné z: <http://astronuklfyzika.cz/JadRadFyzika6.htm#InterakceAlfaBeta>
- [42] VESELÁ, Mária. *Fluorescenční mikroskopie. Chempoint*. 2011. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie>

Seznam obrázků

Obr. 1: Excitace a fluorescence [36]	10
Obr. 2: Princip fluorescence	11
Obr. 3: Stokesův posun [36].....	13
Obr. 4: Doba života fluorescence	15
Obr. 5: Princip fluorescenční mikroskopie [36].....	18
Obr. 6: Bodové ohnisko konfokálního mikroskopu [36]	19
Obr. 7: Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu [2].....	20
Obr. 8: Fluorescenční a konfokální mikroskopie [36]	21
Obr. 9: Vlevo je zobrazen průřez fotonického krystalového vlákna (PCF). Vpravo je schéma WLL. [23].....	23
Obr. 10: Ukázka výběru jednotlivých barevných proužků z celého spektra pomocí AOTF. [23]	23
Obr. 11: Porovnání dichroického zrcadla a AOBS. [1].....	24
Obr. 12: Porovnání dichroického zrcadla (vlevo) a AOBS, jehož vlnové délky jsou plynule nastavitelné (vpravo) [1]	25
Obr. 13: Vlevo je schéma PMT, vpravo je schéma HyD. [4]	26
Obr. 14: Funkce LightGate. [4].....	27
Obr. 15: Detektor SP využívající posuvná zrcadla pro rozdělení spektra do požadovaných pásem. [5].....	28
Obr. 16: Snímek získaný klasickou metodou FLIM [15].....	29
Obr. 17: Výsledná λ^2 mapa mikroskopu Leica. [28].....	31
Obr. 18: λ^2 mapa chlorofylu celého snímku a vybrané oblasti [28].....	32
Obr. 19: Stavba živočišné buňky [7]	38
Obr. 20: Snímek mezenchymálních buněk pořízený fluorescenčním mikroskopem LEICA TCS SP 8 (zobrazení s průchozím světlem).....	40
Obr. 21: Snímek buněk kardiomyocytů pořízený fluorescenčním mikroskopem LEICA TCS SP 8 (zobrazení s průchozím světlem)	41
Obr. 22: Sada získaných fluorescenčních snímků mezenchymálních buněk (0 až 11.5 ns). ...	42
Obr. 23: Spektrální snímek mezenchymální buňky detekovaný na 586 nm a 626 nm	43
Obr. 24: Spektrální snímek kardiomyocytů detekovaný na 565 nm a na 531 nm	43
Obr. 25: Blokové schéma zobrazení doby života fluorescence.....	44
Obr. 26: Zobrazení doby života fluorescence mezenchymálních buněk a vliv různého nastavení prahu na výsledek.....	45
Obr. 27: Blokové schéma zobrazení 2D lambda skenu.....	45
Obr. 28: Ukázka reprezentativního snímku, který slouží pro výběr oblasti zájmu	46
Obr. 29: Výsledek funkce surf pro hodnoty intenzit pořízených snímků	47
Obr. 30: Výsledek interpolovaných hodnot snímků (nahore) a 3D pohled na výsledek (dole)48	

Obr. 31: Ukázka porovnání výsledku mikroskopu Leica a výsledku s využitím Matlabu	49
Obr. 32: Blokové schéma metody zobrazení 2D spektrálního posunu	50
Obr. 33: Výsledek bez použití podmínky eliminující vliv pozadí.....	51
Obr. 34: Výsledek zobrazení posunu maxima excitace (posun od minimální hodnoty ex.)....	52
Obr. 35: Výsledek zobrazení posunu maxima emise (posun od minimální hodnoty emise)...	53
Obr. 36: Výsledek zobrazení Stokesova posunu (v nm)	53
Obr. 37: Uživatelské prostředí (GUI).....	54
Obr. 38: Výsledek posunu maxima excitace u buňky kardiomyocytu.....	56
Obr. 39: Posunu maxima emise kardiomyocytu celé buňky a detail membrány	57
Obr. 40: Výsledek Stokesova posunu na buňce kardiomyocytu a detail membrány	57
Obr. 41: Lambda mapy vybraných oblastí buňky kardiomyocytu	58
Obr. 42: Lambda mapy v různých podmínkách pro oblast celé buňky.....	60
Obr. 43: Posun maxima emise bez fixačního činidla (vlevo), s fixačním činidlem (vpravo)..	61
Obr. 44: Posun maxima excitace a emise pro nanočástice v paraformaldehydu (bez média) .	62
Obr. 45: Zobrazení doby života fluorescence nanočástic na mezenchymálních buňkách	62

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příklad některých fluoroforů odpovědných za autofluorescenci [3].....	17
Tabulka 2: Ukázka plnění matice hodnotami intenzit z jednotlivých snímků	47
Tabulka 3: Ukázka části výsledné matice s maximálními hodnotami excitace	51
Tabulka 4: Jednotlivé složky přidané k nanočásticím a detekované hodnoty maxim)	59

Seznam pojmů

NADH – nikotinamidadenindinukleotid

FAD – flavinadenindinukleotid

LSCM – laserový rastrovací konfokální mikroskop

TSCM – mikroskop s rotujícím diskem

Pinhole – bodová clonka

WLL – bílý pulsní laser

HyD – hybridní detektory

AOBS – akusticko-optický rozdělovač paprsků

AOTF – akusticko-optický laditelný filtr

PCF – fotonické krystalové vlákno

PMT – fotonásobič

FLIM – zobrazování životnosti fluorescence

FRET – přenos rezonanční energie

QD - kvantové tečky

ER – endoplazmatické retikulum

Seznam tlačítek a prvků programu

Nahrát snímky FLIM - tlačítko pro výběr složky se snímky

Sírka okna det. - hodnota šířky okna otevření detektoru funkce TimeGate

Krok - hodnota udávající s jakým krokem byly snímky pořízeny

Prahování - hodnota zvolené prahu určující výsledek

Vymazat mezipaměť - tlačítko pro odstranění uložených hodnot v mezipaměti

Vymazat výsledky - tlačítko pro odstranění vykreslených výsledků

Nahrát snímky Lambda - tlačítko pro výběr složky se spektrálními snímky

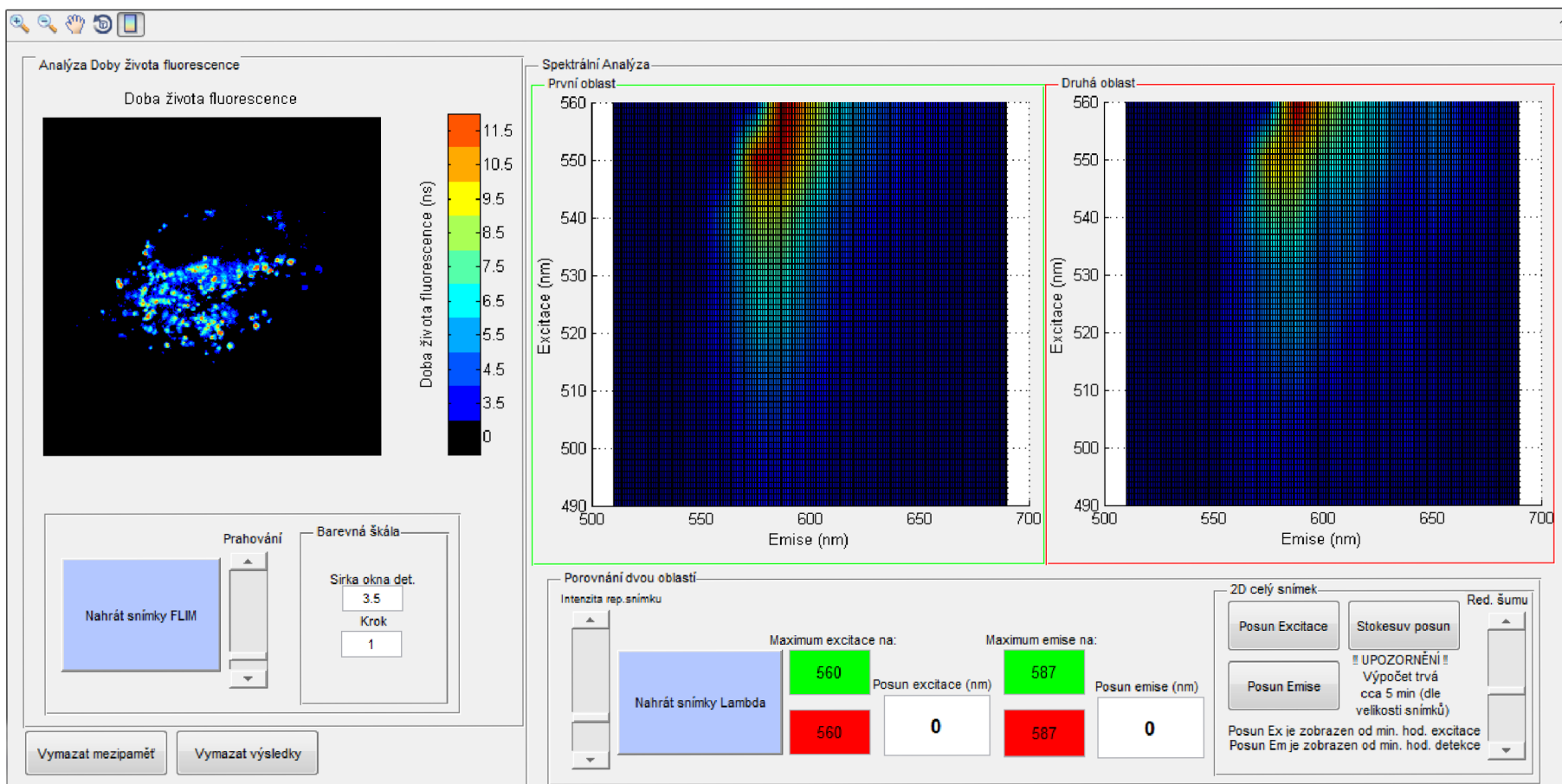
Intenzita rep. snímku - hodnota upravuje intenzitu reprezentativního snímku

Posun Excitace - tlačítko pro zobrazení posunu maxima excitace v prostorové oblasti

Posun Emise - tlačítko pro zobrazení posunu maxima emise v prostorové oblasti

Stokesuv Posun - tlačítko pro zobrazení Stokesova posunu v prostorové oblasti

Red. šumu - hodnota podmínky pro eliminaci šumu z pozadí



Příloha 2. Návod pro práci s programem

Po spuštění programu má uživatel na výběr, zda bude nejprve provádět analýzu doby života fluorescence (A) nebo spektrální analýzu (B).

A. Analýza doby života fluorescence

- 1) Pro analýzu doby života fluorescence je nejprve nutné načíst sadu fluorescenčních snímků. Kliknutím na tlačítko **Nahrát snímky FLIM** se otevře adresář, kde vybereme složku se snímky.
- 2) Po načtení snímků je nutné nastavit hodnotu prahu pomocí posuvníku **Prahování**. Tímto dojde k zobrazení výsledku, který je dle potřeby možné posuvníkem doladit.
- 3) Dále je možné upravit **Šířku okna detektoru** a **krok**, čímž dojde k upravení popisků barevné škály.

B. Spektrální analýza

- 1) Nejprve je nutné načíst sadu spektrálních snímků. Kliknutím na tlačítko **Nahrát snímky Lambda** se otevře adresář, kde vybereme složku se spektrálními snímky.
- 2) Poté se v novém okně otevře reprezentativní snímek, ze kterého je nutné pomocí myši vybrat dvě oblasti zájmu. (Pokud je reprezentativní snímek příliš nebo naopak málo jasný, upravíme jeho intenzitu pomocí posuvníku **Intenzita rep. snímku** a zopakujeme bod 1)
- 3) Dále dojde k vykreslení závislosti excitace na emisi obou oblastí – 2D lambda mapa v oknech **První oblast** a **Druhá oblast**. (Pomocí ovladačů v levém horním rohu je možné oba výsledky přibližovat, vzdalovat nebo jimi rotovat ve 3D.)
- 4) Současně s bodem 3 dojde k výpisu maximálních hodnot excitace a emise v obou oblastech, a také vypsání hodnoty posunu mezi oběma oblastmi.
- 5) Pro zobrazení spektrálního posunu v prostorové oblasti celého snímku je nutné stisknout tlačítko **Posun Excitace**. Po delším výpočtu dojde k zobrazení posunu maxima excitace v prostorové oblasti celého snímku v novém okně.
- 6) Pro zobrazení posunu maxima emise slouží tlačítko **Posun Emise**. Pro zobrazení Stokesova posunu v prostorové oblasti je nutné stisknout tlačítko **Stokesuv Posun** (Obě tato tlačítka musí být stisknuta až po tlačítku **Posun Excitace**). Posuvník **Red. šumu** slouží pro eliminaci šumu z pozadí.