



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**OPTICKÁ MIKROMANIPULACE A RAMANOVA
SPEKTROSKOPIE BUNĚK V MIKROFLUIDNÍCH
SYSTÉMECH**

OPTICAL MICROMANIPULATION AND RAMAN SPECTROSCOPY OF CELLS IN MICROFLUIDIC SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Klementová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1365/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Tereza Klementová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Optická mikromanipulace a Ramanova spektroskopie buněk v mikrofluidních systémech

Zadání diplomové práce:

- 1) Provést literární rešerši na využití Ramanovy spektroskopie a optické mikromanipulace v mikrofluidních systémech ve výzkumu odezvy *Escherichia coli* na vybraná antibiotika.
- 2) Navrhnout soubor experimentů k optimalizaci mikromanipulace, pozorování a měření Ramanových spekter modelového mikroorganismu v mikrofluidním systému.
- 3) Optimalizovat mikromanipulaci, kultivaci a pozorování *E. coli* v mikrofluidním systému a hodnotit vliv zvolených antibiotik z mikroskopických a spektroskopických měření.
- 4) Na základě rešerše a získaných dat diskutovat optimální nastavení celého optofluidního systému a pozorované vlastnosti buněk zkoumaného mikroorganismu v závislosti na přítomnosti antibiotika.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Tereza Klementová
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá optimalizací procesu měření a analýzou změn indukovaných antibiotiky v buňkách bakterií *E.coli* prostřednictvím Ramanovy mikrospektroskopie kombinované s optickou mikromanipulací (tzv. Ramanova pinzeta) v mikrofluidních systémech. Ramanova spektroskopie umožňuje nedestruktivní a rychlou analýzu chemických vazeb ve vzorku laserovým svazkem. Optická mikromanipulace dovoluje pomocí zaostřeného laserového paprsku bezkontaktně a neinvazivně manipulovat objekty o rozměrech řádově 10^{-5} – 10^{-8} m, například bakteriemi. Mikrofluidní systém složený z kanálek a komůrek v průhledném polymeru slouží k izolaci, pozorování a kultivaci bakterií v definovaném prostředí. Kombinace těchto metod poskytuje efektivní nástroj k pozorování, manipulaci a analýze mikroorganismů. Bakterie *E. coli* je mikroorganismus příležitostně patogenní pro člověka a rychlejší detekce její odezvy na antibiotika by usnadnila včasnou léčbu vhodnými přípravky. V popsáných experimentech byla měřena spektra čistých bakteriálních kultur a buněk ovlivněných antibiotiky s použitím optické pinzety i konvenční Ramanovou spektroskopií. Získaná spektra a jejich charakteristické znaky byla porovnána s literaturou a bylo ověřeno, jak široce lze tuto metodu aplikovat a zda je měření spolehlivé a opakovatelné.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with optimization of analysis process and measuring antibiotics induced changes in *E. coli* cells via Raman spectroscopy, LTRS and microfluidic systems. Optical micromanipulation by a laser beam allows noncontact and noninvasive manipulation of objects on scale 10^{-5} – 10^{-8} m, for example bacterial cells. Microfluidic device consists of microchannels and microchambers in transparent polymer and it is used for isolation, observation and cultivation of bacterial cells. Combination of these methods gives an effective tool for observation, manipulation and analysis of microorganisms. *E. coli* is a microorganism potentially pathogenic for humans and faster detection of its sensitivity to antibiotic treatment would make the whole process of diagnostics and treatment easier. We performed laser tweezer-Raman spectroscopy and conventional Raman spectroscopy of bacterial cells and cells under antibiotic stress and collected Raman spectra and characteristic areas were compared with literature to establish the reliability and usefulness of this method.

KLÍČOVÁ SLOVA

mikrofluidika, Ramanova spektroskopie, optická mikromanipulace, antibiotika, *E. coli*

KEY WORDS

microfluidics, Raman spectroscopy, optical micromanipulation, antibiotics, microorganisms

KLEMENTOVÁ, Tereza. Optická mikromanipulace a Ramanova spektroskopie buňek v mikrofluidních systémech. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113580>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

Poděkování

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za vstřícnost a čas, který mi věnoval. Velké poděkování patří Mgr. Zdeňkovi Pilátovi, Ph.D. za sdílení zkušeností, jeho čas, ochotu a rady, které mi byly k dispozici v průběhu zpracovávání této práce. Také děkuji mé rodině a přátelům, kteří mne při studiu významně podporovali.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Ramanova spektroskopie	8
2.1.1	Polarizovatelnost a dipól moment	8
2.1.2	Rozptyl záření při interakci s molekulou.....	9
2.2	Optická mikromanipulace	11
2.2.1	Počátky experimentů s optickou pastí	11
2.2.2	Optická pinzeta	12
2.2.3	Fyzikální základy optického chytání	13
2.3	LTRS	15
2.4	Mikrofluidika	16
2.4.1	Fotolitografie	16
2.4.2	Příprava křemíkového waferu se vzorem mikrofluidních kanálků	16
2.4.3	Měkká litografie PDMS	17
2.5	Bakterie <i>Escherichia coli</i>	21
2.5.1	Sepse a průběh diagnostiky	21
2.6	Kultivace buněk <i>in vitro</i>	21
2.7	Antibiotika.....	22
2.7.1	Cefotaxim	23
2.7.2	Ciprofloxacín	23
2.7.3	Tetracyklin.....	24
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	25
4	Experimentální část.....	27
4.1	Použitý materiál a přístroje	27
4.2	Příprava buněk	28
4.2.1	Příprava kapalného média CASO Broth.....	28
4.2.2	Příprava média CASO s přídavkem agaru.....	28
4.2.3	Kultivace buněk.....	28
4.2.4	Příprava inokula.....	28
4.3	Mikrofluidní čipy	28
4.4	Povrchová úprava skleněného povrchu kanálku v čipu	30
4.4.1	Leptání povrchu.....	30
4.5	Měřicí sestava.....	30

4.6	Dávkování buněk do mikrofluidního čipu a zapojení do měřicí aparatury.....	31
4.6.1	Rychlost difuze v mikrofluidním čipu.....	32
4.6.2	Měření skrz PDMS vrstvu a závislost signálu na hloubce zaostření laseru	32
4.6.3	Měření spekter z jednotlivých buněk <i>E. coli</i> a buněk po přidavku antibiotik	33
5	Výsledky a diskuze	34
5.1	Efektivita povrchové úpravy skla	34
5.2	Růstová fáze buněk <i>E. coli</i> 785 použitých k měření.....	35
5.3	Závislost intenzity signálu na hloubce zaostření laserového svazku	36
5.4	Vyhodnocení Ramanovských spekter	38
5.4.1	Ramanova spektra buněk <i>E. coli</i> 785 v přítomnosti ciprofloxacinu	39
5.4.2	Ramanova spektra buněk <i>E. coli</i> 785 v přítomnosti cefotaximu.....	40
5.4.3	Ramanova spektra buněk <i>E. coli</i> 785 v přítomnosti tetracyklinu.....	41
5.4.4	Porovnání poměru intenzit na vlnočtech 1 458 cm ⁻¹ a 1 485 cm ⁻¹	43
5.4.5	Poměry intenzit píků charakteristických pro působení jednotlivých antibiotik	45
6	Závěr	49
7	Seznam použitých zdrojů	51
8	Seznam zkratk a symbolů.....	54

1 ÚVOD

Současné testování citlivosti patogenů na antibiotika a diagnostika při podezření na bakteriální infekci jsou poměrně zdoluhavé procesy a v mezičase, než jsou dostupné přesné výsledky, je nutné podávat pacientům širokospektrá antibiotika. Pokročilejší metody, jako je například analýza založená na polymerázové řetězové reakci (PCR), jsou sice rychlejším způsobem získání dat o citlivosti patogenu, avšak také finančně mnohem náročnější. Zde přichází s výhodou Ramanova spektroskopie či metoda LTRS, které nabízí bezkontaktní, neinvazivní, časově a na přípravu vzorků nenáročné měření. Tyto parametry naznačují, že by mohlo do budoucna jít o alternativní možnost diagnostiky a stanovení citlivosti na léčiva pro klinickou praxi.

Ramanova spektroskopie kombinovaná s laserovou optickou pinzetou (Laser trapping Raman spectroscopy, LTRS) a mikrofluidními zařízeními (tzv. laboratořemi na čipu) je poměrně nová experimentální metoda, kterou lze bezkontaktní manipulaci, analýzu i třídění buněk mikroorganismů provádět. Jedná se o technologii, založenou na principu sledování změn vibrací molekulových vazeb. Na základě získaného Ramanova spektra lze sledovanou buňku pomocí laserové optické pinzety přesunout na určené místo a provádět tak okamžité třídění buněk podle výsledků měření. Pokud je zvoleno optimální nastavení laserového zdroje, tak je optická mikromanipulace zcela neinvazivní proces a jelikož nedochází k poškození analyzovaného vzorku, je možné buňky dále opakovaně kultivovat a zkoumat. Použití mikrofluidních zařízení zase přináší tomuto systému výhodu sledovat interakce buněk a jejich reakce na konkrétní podněty ve velmi krátkém čase. Navíc lze velice precizně a definovaně určovat veškeré podmínky experimentu (koncentrace, teplota, počet buněk atd.).

Popsaný komplexní analytický systém lze využít právě k testování citlivosti patogenních bakteriálních buněk na antibiotickou terapii. Ze vzorků krve či moči je možné snadno separovat jednotlivé buňky, které jsou předmětem analýzy. Vzhledem k rostoucí antibiotické rezistenci různých patogenních kmenů je žádoucí vývoj metody rychlé identifikace a detekce citlivosti na konkrétní antibiotika. Taková analýza v důsledku umožní podání správné terapie pacientovi v co nejkratším čase.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda fungující na principu analýzy vzorkem rozptýleného záření. Umožňuje nedestruktivní kvantitativní a zároveň kvalitativní analýzu, přináší informace o struktuře látek. Využívá laserového zdroje ke generování charakteristického rozptýleného záření, které je zaznamenáno jako Ramanovo spektrum^{1, 2}. Specifita získaných spekter pro konkrétní látky umožňuje přesnou identifikaci analyzovaných molekul².

Mezi výhody metody patří bezkontaktní nedestruktivní analýza vzorků, možnost hloubkové analýzy transparentních materiálů³, či měření organických i anorganických vzorků v různých skupenstvích⁴. Zároveň není potřebná speciální úprava vzorků před analýzou a získání základního spektra není příliš časově náročné².

Ačkoli Nobelova cena byla za objev této metody udělena v roce 1930, rozšíření Ramanovy spektroskopie však nastalo až ve druhé polovině dvacátého století, kdy byl vynalezen laser. Do té doby bylo poměrně problematické získat nezbytné budící monochromatické záření – využívalo se různých filtrů a složitých optických soustav, což ve výsledku vedlo k nežádoucímu oslabení původního záření, a tedy značně limitovalo tuto metodu. V současné době se jako zdroje monochromatického záření využívá různých druhů laserů, zejména pak pevnolátkový Nd:YAG laser⁵ (krystal Yttrium Aluminium granátu dopovaný ionty neodymu) a plynový He:Ne laser⁶ (helium – neonový). Lasery s kratší vlnovou délkou (např. argonový nebo kryptonový) nejsou ideální, jelikož indukují ve vzorku silnou fluorescenci a způsobují fotochemickou degradaci vzorku. Nyní nachází Ramanova spektroskopie uplatnění v široké škále oborů – v materiálovém inženýrství a nanotechnologiích, farmakologii⁷ a dalších chemických oborech a technologie je dále zdokonalována například lokálním zesilováním dopadajícího záření (tzv. metoda SERS – Surface enhanced Raman spectroscopy)⁸.

Výstupem měření je Ramanovo spektrum, standardně vyjádřeno jako intenzita rozptýleného záření v závislosti na vlnočtu (reciproká hodnota vlnové délky, nazývaná jako Ramanův posun). Vlnočtet se používá, protože je lineárně vztažen k energii a tvoří tak spektrum nezávislé na excitační vlnové délce. V Ramanově spektru jsou aktivní pouze takové vibrace, které vedou ke změně polarizovatelnosti molekuly (pokud dochází ke změně rozložení náboje v molekule)⁹. Jedná se o metodu komplementární k infračervené spektroskopii, kde podmínkou absorpce IČ záření je **nenulová změna dipól momentu** při přechodu do vyššího vibračního stavu¹⁰.

2.1.1 Polarizovatelnost a dipól moment

Na nabitě částice silově působí elektrické pole – pokud uvažíme neutrální molekulu, ve které je určitým způsobem rozložen náboj, toto rozložení náboje v prostoru je dáno elektronovou hustotou $\rho(\vec{r})$ a náboji jednotlivých jader $q_i = Z_i e$. Pokud sečteme celkovou hustotu náboje přes celý prostor, dostaneme pro neutrální molekulu nulovou hodnotu. Na neutrální molekulu však vnější elektrické pole působí, jelikož náboj není rozložen rovnoměrně^{2, 10}. Například v molekule HBr je vyšší elektronová hustota okolo atomu bromu než kolem atomu vodíku. Na molekulu bromovodíku můžeme pohlížet jako na soustavu parciálního kladného

a parciálního záporného náboje ve vzdálenosti r . Molekula HBr má tedy **nenulový dipólový moment**, daný vztahem¹⁰,

$$\vec{\mu} = q \cdot r \quad (1)$$

kde q je náboj a r je vzdálenost mezi náboji. Související veličina – polarizovatelnost α udává, jak je molekula citlivá na vnější elektrické pole. Molekula v elektrickém poli o intenzitě \vec{E} indukuje dipólový moment,

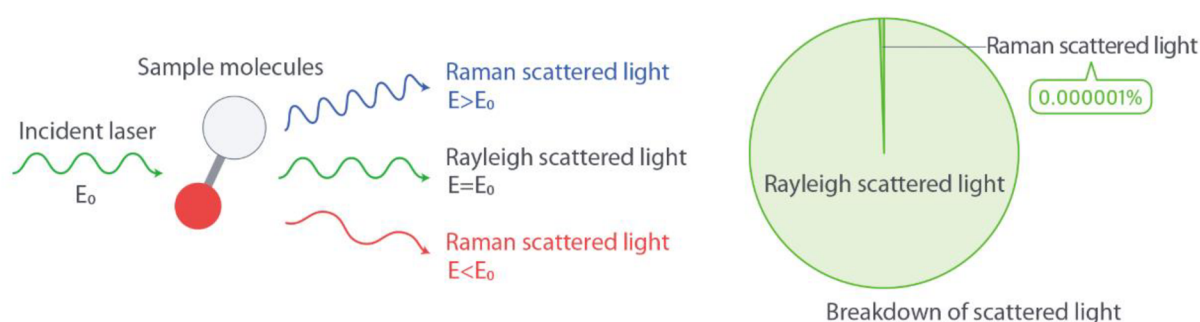
$$\vec{u}_i = \alpha \cdot \vec{E} \quad (2)$$

přičemž konstantou úměrnosti je zde polarizovatelnost α . Hodnotu polarizovatelnosti lze stanovit výpočtem dipólového momentu molekuly v elektrickém poli a molekuly mimo elektrické pole. Rozdíl dipólových momentů po vydělení intenzitou elektrického pole poskytne hodnotu polarizovatelnosti^{2, 10}.

2.1.2 Rozptyl záření při interakci s molekulou

Pokud je vzorek vystaven záření, fotony částečně vzorkem prochází, některé jsou absorbovány a část je rozptýlena. Právě rozptýlené fotony jsou klíčové pro Ramanovu spektroskopii. Rozptyl záření nastává dvojího typu: Rayleighův (elastický) a Ramanův (neelastický)².

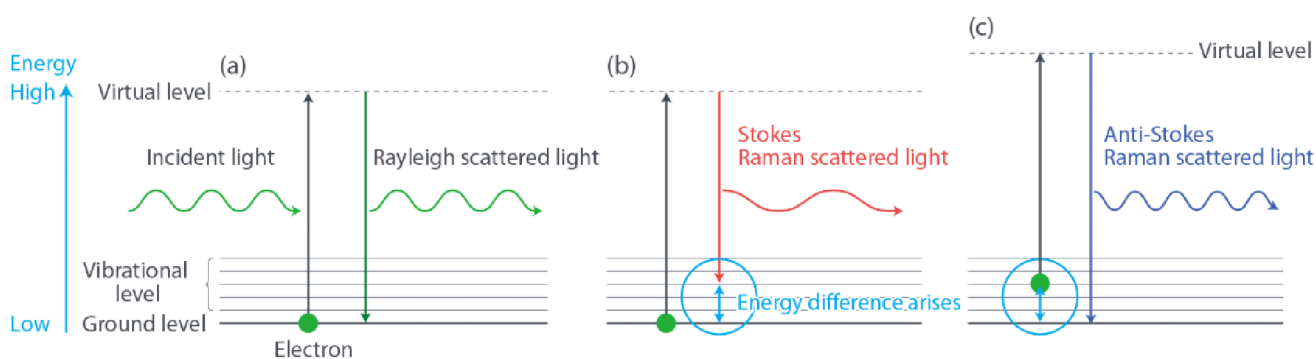
Pokud je světlo po dopadu na částici rozptylováno, téměř veškerý rozptyl je elastický (Rayleighův), při kterém nedochází ke změnám energie. Pouze malé procento záření je rozptýleno neelasticky a dochází tak ke změně energie oproti zdrojovému záření (poměr Rayleighova a Ramanova rozptylu je znázorněn na Obr. 1 Obr. 1)^{2, 11, 12}.



Obr. 1: Rozptyl záření po kontaktu s hmotou a znázornění poměru elastického a neelastického rozptylu záření¹¹.

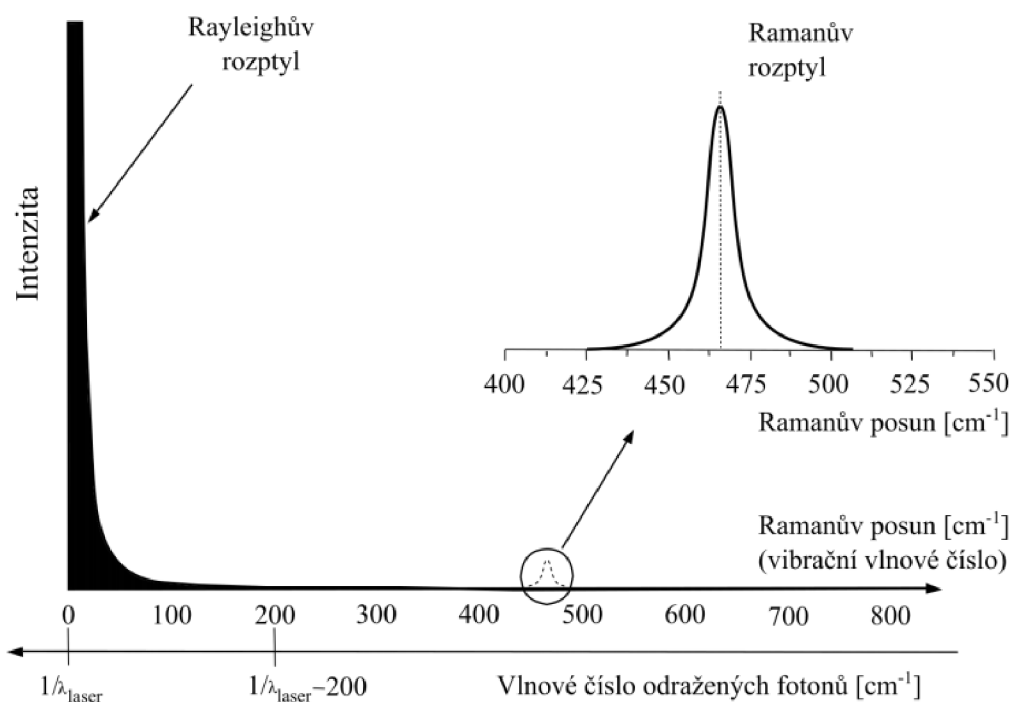
Zdrojové záření ve všech zmíněných případech interaguje s molekulou vzorku a elektrony se dostávají do virtuálního energetického stavu, který není stabilní a bezprostředně dochází k vyzáření získané energie v podobě rozptýleného záření (viz Obr. 2). Rayleighův (elastický) rozptyl (Obr. 2a) nezahrnuje energetickou změnu a takto rozptýlené záření má stejnou energii (stejnou vlnovou délku) jako záření zdrojové. Excitovaný elektron dopadá zpět na základní hladinu².

Pro Ramanovu spektroskopii klíčový Ramanův rozptyl rozlišujeme na dva mechanismy a sice Stokesův a anti-Stokesův mechanismus. V procesu Stokesova rozptylu (Obr. 2b) je elektron excitován ze základního stavu a vrací se zpět do některého ze stavů vibračních. Toto zahrnuje absorpci energie molekulou a rozptýlené záření má proto menší energii (delší vlnovou délku), než excitační záření. Naproti tomu anti-Stokesův mechanismus (Obr. 2c) zahrnuje excitaci elektronu z některé vibrační hladiny a jeho návrat do hladiny základní a dochází zde taktéž ke změně energie, ale takto rozptýlené záření má naopak vyšší energii (kratší vlnovou délku)^{2, 9, 12}.



Obr. 2: (a) Rayleighův, (b) Stokesův a (c) anti-Stokesův mechanismus rozptylu záření⁹

Převažujícím jevem je vždy, pro Ramanovu spektroskopii bezvýznamný, Rayleighův rozptyl. Ramanův rozptyl je velice slabý, řádově pouze jeden z 10^7 fotonů je rozptýlen Ramanovsky. Poměr fotonů rozptýlených Stokesovým a anti-Stokesovým mechanismem je závislý na populaci daných stavů v molekule. Obecně je při laboratorní teplotě intenzita Stokesova mechanismu rozptylu vyšší, protože více molekul je přirozeně v základním stavu a dochází u nich k tomuto mechanismu rozptylu záření. Při standardním měření je Rayleighův rozptyl eliminován filtrem a z praktických důvodů je zaznamenáván pouze Stokesův rozptyl. Spektrum zobrazující oba mechanismy rozptylu záření je uvedeno na Obr. 3.



Obr. 3: Srovnání intenzity elasticky a neelasticky rozptýlených fotonů¹²

2.2 Optická mikromanipulace

K manipulaci s objekty o rozměrech v řádu nanometrů až desítek mikrometrů lze využít mechanické vlastnosti světla. Na mechanické účinky světla poukázal už Johannes Kepler a J. Maxwell o mnoho desetiletí později odvodil, že světlo může vyvolat radiační tlak. Experimenty dokazující toto tvrzení následně provedli na začátku 20. století Lebedev a spol.¹³. Skrytý potenciál mechanických účinků záření se ovšem ukázal až ve druhé polovině dvacátého století, po objevení laseru. Průkopníkem v oboru se stal Artur Ashkin – zjistil, že optickou silou lze hýbat částicemi s mikrometrovými rozměry a přišel s myšlenkou optické pasti vytvořené fokusovaným laserovým svazkem, nakonec publikovanou v roce 1978. V roce 2018 obdržel za tento průlomový objev Nobelovu cenu za fyziku^{14, 15}.

V dnešní době je využití optické pasti poměrně běžnou záležitostí v různých oblastech výzkumu, využívá se například v biologii a medicíně k manipulaci s buňkami¹⁶, či jednotlivými organelami uvnitř buněk. Používá se samostatně, ale často také v kombinaci s mikroskopií^{14, 16, 17}.

2.2.1 Počátky experimentů s optickou pastí

Arthur Ashkin začal své experimenty s optickou mikromanipulací v 70. letech v Bellových laboratořích. První pokusy probíhaly s manipulací opticky zachytávaných dielektrických částic suspendovaných ve vodě¹⁸. Ashkin použil vodní suspenzi latexových kuliček o průměru několika mikrometrů a vystavil je kontinuálnímu laserovému záření fokusovanému do bodu o průměru 12 μm . Následně pozoroval pohyb kuliček ve směru šíření paprsku, ale také přitahování kuliček do maxima intenzity paprsku tzv. gradientní silou. Tato síla působí vždy,

pokud je rozdílný index lomu částice a okolního média. V principu je částice s indexem lomu větším, než je index lomu prostředí, přitahována směrem ke středu paprsku. Je to důsledek gradientu intenzity, který existuje mezi hranou a středem paprsku. Objev gradientní síly byl inspirací ke zkonstruování první 3D optické pasti pomocí dvou paprsků, které se šíří proti sobě¹⁹. Ashkin také realizoval optické pasti ve vzduchu a vakuu s jedním vertikálním paprskem kompenzujícím gravitaci rozptylovou silou (tzv. optická levitace)²⁰.

2.2.2 Optická pinzeta

Až o 16 let později bylo zjištěno, že částici je možné zachytit pouze jedním laserovým paprskem a byla zkonstruována tzv. optická pinzeta. Jedná se o zařízení, které využívá mechanického účinku fokusovaného laserového záření k prostorovému zachycování a přemísťování částic o velikosti v intervalu desítek nanometrů až mikrometrů^{14, 19}.

Základní princip optické pinzety spočívá v hybnosti fotonů, která se může při kontaktu s částicí měnit. Změna hybnosti je podle Newtonových zákonů spojena se silovými účinky a tyto se projeví pohybem částice. Paprsek musí být přiveden do extrémně ostrého ohniska, vytvářející složku síly působící proti rozptylu. Pro dosažení co největšího gradientu intenzity se používají imerzní objektivy s numerickou aperturou větší než 1²¹.

U laserové pinzety s přímou fokusací světla je optická past vytvořená pomocí laserového svazku s gaussovským profilem intenzity, který je kolimován a následně fokusován objektivem mikroskopu. Jedná se o statickou past a přemístění zachyceného objektu probíhá posuvem stolku, na kterém je preparát umístěn²¹. Přístroj založený na tomto principu se v současné době široce využívá pro optické zachycení a manipulace mikroobjektů, přestože původně byl určen pro zachycení atomů²².

Ashkin poprvé využil optickou pinzetu k zachycování a manipulaci s mikroorganismy v roce 1987. Aby nedocházelo k poškození zkoumaných organismů, bylo při této aplikaci nutné použít záření o vlnové délce v infračervené oblasti¹⁴. Výzkumníci nejprve demonstrovali schopnost tohoto systému zachytit mikroskopické objekty na submikronových koloidních částicích oxidu křemičitého²³. Později bylo dosaženo úspěšného zachycení částic o rozměrech přesahujících vlnovou délku světla. S použitím argonového laseru ($\lambda = 514 \text{ nm}$) Ashkinův tým úspěšně manipuloval s virem tabákové mozaiky a také s bakteriemi²⁴. Tyto počáteční pokusy o optickou mikromanipulaci byly však pro zachycované živé buňky stále fatální. Síla záření v řádu desítek mW způsobovala jejich smrt. Použití infračerveného laseru Nd:YAG ($\lambda = 1064 \text{ nm}$), jehož světlo téměř není živými organismy absorbováno, umožnilo zachytit bakteriální buňky *Escherichia coli* paprskem silným 50 mW po dobu mnoha minut bez omezení jejich mobility a sledovat jejich dělení. Několik následných experimentů pak prokázalo nebývalé možnosti této metody – měření přímo v živých buňkách či manipulaci subcelulárními strukturami²⁵.

Pokročilost různých biologických experimentů klade stále větší požadavky na parametry optických pinzet. Například je pro pokročilé experimenty požadována schopnost vícenásobného zachycení s vysokou přesností. Generování násobných optických pastí může být realizováno rozdělením laserového paprsku děličem paprsků nebo optickou mřížkou. V současné době jsou používanější technologií pro generování více paprsků modulátory prostorového světla (SLM). Jedná se o amplitudovou či fázovou holografickou masku s maticí

pixelů individuálně adresovanou počítačem. Současný výzkum optického chytání je také často úzce spojen s využitím mikrofluidních zařízení²⁶, tzv. systémů „laboratoře na čipu“, které jsou dále diskutovány v kapitole 2.4.

2.2.3 Fyzikální základy optického chytání

Základem kvantitativního popisu optických sil účastnících se na chytání objektu do optické pasti je teorie elektromagnetického pole, založená na Maxwellových rovnicích. V závislosti na poměru vlnové délky záření a poloměru objektu se využívají různé přístupy k výpočtu těchto sil²⁷.

Pro velmi malé (Rayleigh) částice, o poloměru $r \leq \lambda/20$, je možné považovat částice za indukované bodové dipóly^{28, 29}. Síly působící na tyto částice je možné jednoznačně rozlišit na rozptylové a gradientní. Rozptylové síly působí ve směru vyvolávacího záření a jsou úměrné jeho intenzitě. Gradientní síly jsou úměrné gradientu optické intenzity a působí ve směru tohoto gradientu nebo proti němu. Intenzita a směr výsledné síly může být stanovena součtem gradientních a rozptylových sil. Částice je zachycena v rovnováze – v optické pasti, která je definována nulovou silou a záporným sklonem závislosti síly na poloze objektu. Chytání v 3D prostoru je tedy umožněno přítomností gradientní síly. Rovnice pro výpočet těchto sil mohou být odvozeny analyticky z rovnic pro gradientní sílu²³,

$$\vec{F}_{\text{grad}} = \frac{\alpha}{2} \cdot \nabla \langle |\vec{E}|^2 \rangle \quad (3)$$

kde $\langle |\vec{E}|^2 \rangle$ je časově průměrovaná hodnota druhé mocniny amplitudy elektrického pole a α je polarizovatelnost částice, určená rovnicí,

$$\alpha = 4 \cdot \pi \cdot \varepsilon \cdot r^3 \cdot \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right) \quad (4)$$

kde r je poloměr částice, ε je permitivita prostředí a m je poměr indexu lomu částice n_{int} a indexu lomu prostředí n_{ext} ; $m = n_{\text{int}}/n_{\text{ext}}$. Rozptylová síla je dána rovnicí²⁹,

$$\vec{F}_{\text{scatt}} = n_{\text{ext}} \cdot \frac{\langle \vec{S} \rangle \cdot \sigma}{c} \quad (5)$$

kde c je rychlost světla, $\langle \vec{S} \rangle$ je časově průměrovaný Poyntingův vektor a σ je účinný průřez, popsany rovnicí,

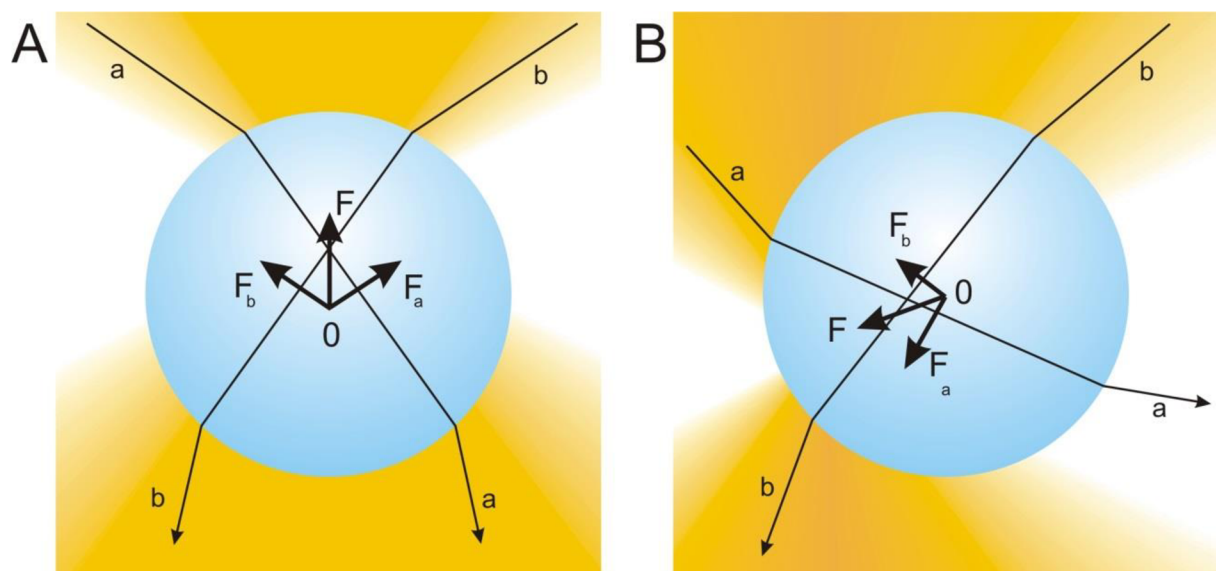
$$\sigma = \frac{8}{3} \cdot \pi \cdot (k \cdot r)^4 \cdot r^2 \cdot \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \quad (6)$$

kde $k = \frac{2 \cdot \pi \cdot n_m}{\lambda}$ je vlnčet světla v prostředí, λ je vlnová délka světla ve vakuu a r je poloměr Rayleighovy částice³⁰.

K popisu síly fokusovaného gaussovského svazku na sférické a elipsoidní částice větší než $\lambda/20$ je používána zobecněná Lorenz–Mieho teorie²⁷. Tato teorie je založená na Mieho teorii popisující rozptyl rovinné vlny na sférické částici. Pro jednodušší popis interakce záření s dielektrickým objektem o velikosti násobně převyšující vlnovou délku chytacího svazku ($r \gg 5\lambda$), je možné použít model paprskové optiky²⁷. Paprsky, dopadající na optické rozhraní, zde na povrch kulové dielektrické částice, se na daném rozhraní odrážejí anebo procházejí. Úhly, které tyto paprsky svírají vzhledem k rovině kolmé na zdroj záření, jsou dány Snellovým zákonem. Poměr intenzity odraženého a prošlého záření je dán Fresnelovými koeficienty. Jak Snellův zákon, tak Fresnelovy koeficienty závisí na úhlu dopadu paprsku a na poměru indexů lomu mezi okolním prostředím.

Pokud zanedbáme vliv odraženého záření, můžeme demonstrovat síly působící na kouli ve fokusovaném gaussovském paprsku pomocí jednoduchého modelu. Paprsky o stejné intenzitě osvětlují povrch koule s indexem lomu vyšším, než je prostředí. Paprsky se při vstupu lámou ke kolmici, při výstupu od kolmice. Fotony dopadajícího záření následují směr paprsků a mění vektory hybnosti. Částice působí na foton silou \vec{F} podle druhého Newtonova zákona. Podle třetího Newtonova zákona dále platí, že fotony vyvíjejí sílu stejné intenzity a opačného směru na danou částici.

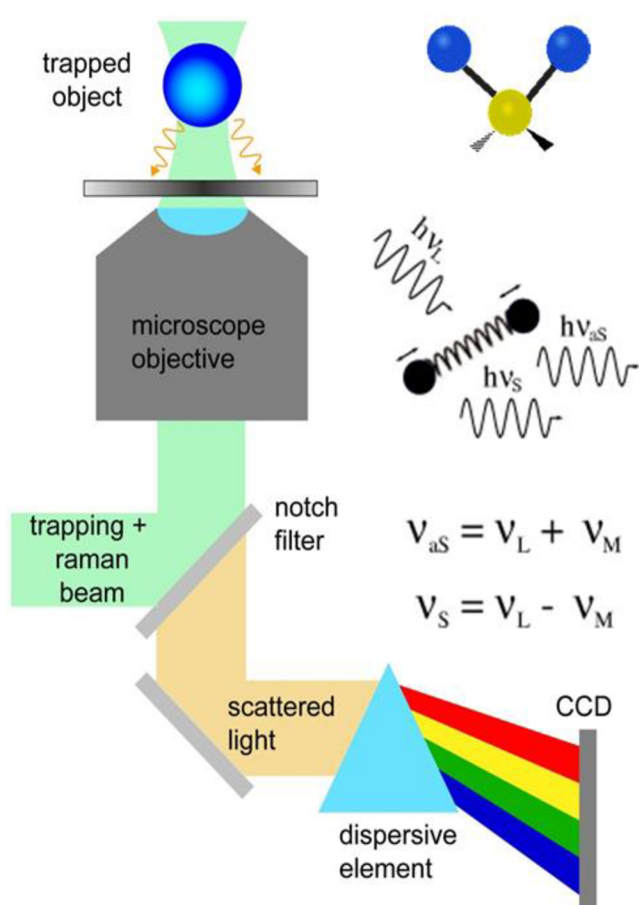
Na Obr. 4 jsou znázorněny síly působící na kulovou částici v optické pasti. Fotony následující trajektorii a působí na objekt silou \vec{F}_a a fotony následující trajektorii b působí na objekt silou \vec{F}_b . Výslednicí součtu vektorů sil \vec{F}_a a \vec{F}_b je síla \vec{F} , působící proti směru šíření fotonů. Koule je přitahována k ohnisku a amplituda výsledné síly je součtem příspěvků síly všech jednotlivých paprsků^{21, 27, 30}.



Obr. 4: Schématické znázornění optických sil působících na částici v optické pasti²¹. A) Koule posunutá ve směru osy paprsku. B) koule posunutá kolmo k ose paprsku. Šipky a, b znázorňují dráhu paprsků stejné intenzity. Optické síly jsou značeny jako \vec{F}_a a \vec{F}_b . Výsledná síla \vec{F} působí na střed koule O. Koule je přitahována směrem k ohnisku paprsku. V obou případech součet silových příspěvků všech paprsků představuje celkovou sílu působící na částici.

2.3 LTRS

Princip metody LTRS (Laser Tweezer Raman Spectroscopy) spočívá v současném zapojení optické pinzety a Ramanova mikrospektrometru. Schéma je zachyceno na Obr. 5. Na vzorek dopadají dva laserové svazky, jeden zajišťující pinzetu a druhý jako budící zdroj pro spektroskopii, a odrážejí se od úzkopásmového (notch) filtru do objektivu mikroskopu. Paprsky souběžně zajistí zachycení měřeného objektu a excitaci potřebnou ke změření Ramanova spektra. Ramanovsky rozptýlené záření je po průchodu objektivem odděleno filtrem, separováno dle vlnové délky na disperzním prvku a detekováno CCD kamerou^{12, 17, 19}. Ramanovo spektrum, blíže popsáno v kapitole 2.1., je získáno z analýzy vibrací vazeb v molekulách vzorku².



Obr. 5: Schéma LTRS sestavy¹⁷. Na vzorek dopadají dva laserové svazky, jeden zajišťující chytání a druhý jako budící zdroj pro spektroskopii. Odrážejí se od úzkopásmového filtru do objektivu mikroskopu. Ramanovsky rozptýlené záření je po průchodu objektivem odděleno filtrem, separováno dle vlnové délky na disperzním prvku a detekováno CCD kamerou.

2.4 Mikrofluidika

Mikrofluidní zařízení jsou v současné době důležitou součástí výzkumu v různých oborech, jelikož je trendem miniaturizace a automatizace, což mikrofluidika nabízí.

Tyto miniaturizované systémy umožňují manipulaci velmi malých objemů roztoků (v řádu 10^{-9} – 10^{-12} litrů) v prostředí kanálků o rozměrech jednotek či desítek mikrometrů, v závislosti na konkrétní aplikaci. Jedná se o malé zařízení o celkových rozměrech maximálně několik centimetrů čtverečních, vyrobené ze skla, polymerů, křemíku apod. Volba konkrétního materiálu závisí na požadovaných vlastnostech, technologii výroby a samozřejmě i na ceně³¹.

Kvůli častému využití mikrofluidních zařízení v kombinaci s optickou detekcí jsou důležité i optické vlastnosti použitých materiálů. Tyto miniaturizované laboratorní systémy (tzv. laboratoře na čipu) přináší výhodu poměrně rychlé analýzy s velice malou spotřebou vzorků a činidel a s okamžitou možností detekce. Navíc je možné provádět velké množství paralelních experimentů^{17, 31}.

Mikrofluidika nachází využití v mnoha oborech, včetně analytické chemie³², produkce energie³³, separace buněk či molekulární biologie^{34, 35}. S pokroky ve využití této technologie pokročily i metody, jakými lze kanálky s požadovanými rozměry vyrábět³¹ – využívají se metody měkké litografie, 3D tisk, tepelné vtisknutí (hot embossing) či lisování za horka.

Výroba mikrofluidního zařízení probíhá v několika krocích: nejprve je na křemíkový wafer metodou fotolitografie přenesen vzor, který odpovídá požadované struktuře kanálků. Dále je připravena směs polymeru a tvrdidla, která je odplyněna a nanесena na wafer v požadované tloušťce. Vrstva polymeru je poté vytvrzena teplem a oddělena od waferu. V závislosti na dalším použití může být takto připravený čip například spojen s podložním sklem, aby došlo k uzavření komůrek. Další metody výroby jsou podrobněji popsány v kapitole 2.4.3.

2.4.1 Fotolitografie

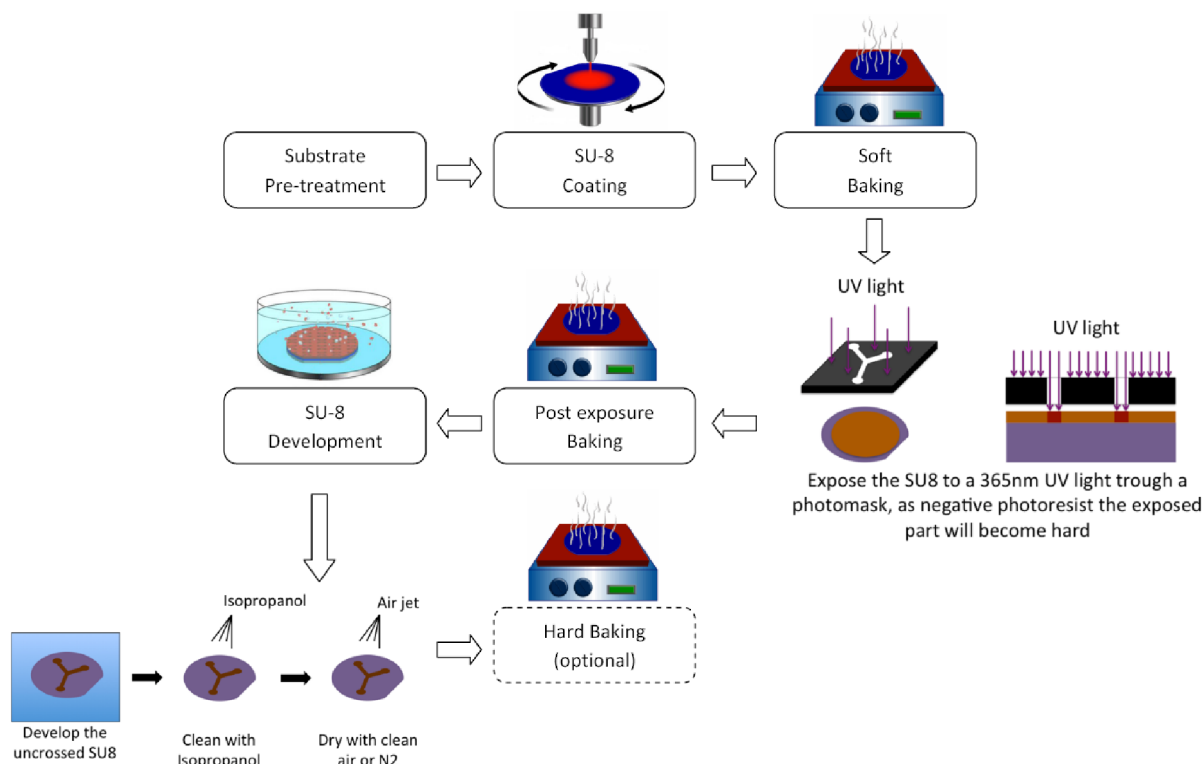
Nezbytnou technologií v procesu výroby mikrofluidních zařízení je fotolitografie. Jedná se o postup používaný při výrobě mikrostruktur pro selektivní opracování částí tenkých vrstev nebo materiálu substrátu. Pro přenos geometrických vzorů z fotomasky do chemického fotorezistu nanесeného na podložce se používá světlo (fotografický proces) a různé chemické postupy pak umožní opracovat vrstvu materiálu pod rezistem. Je možné tvořit velice malé stuktury přesně definovaných tvarů a rozměrů. Nevýhodou technologie může být nutnost práce v mimořádně čistých prostorech. Fotolitografie zahrnuje několik specifických technologií, jako nanolitografie, litografie optickým svazkem, či skenovací nanolitografie³⁶.

Obecně lze popsat proces fotolitografie v několika krocích: nejprve je nutné provést nanесení vrstvy fotorezistu na pevný substrát, poté následuje vytvrzení, dále se na fotorezist vybranou technologií vytvoří požadovaný vzor, a nakonec dojde k vyvolání obrazu. Podrobný popis výroby je popsán v kapitole 2.4.2.

2.4.2 Příprava křemíkového waferu se vzorem mikrofluidních kanálků

Křemíkový substrát je nejprve vyčištěn acetonem a vysušen při 120 °C, aby byla zajištěna dobrá přilnavost fotorezistu k povrchu. Jako fotorezist se často používá například epoxidová pryskyřice SU-8. Druhým krokem je nanесení vrstvy fotorezistu SU-8 metodou spin coating.

Křemíkový wafer se umístí na rotační podstavec, nanese se potřebné množství fotorezistu a vhodnou volbou rychlosti otáčení, zrychlení a viskozity fotorezistu se dosáhne požadované tloušťky vrstvy. Následuje odpaření rozpouštědla z naneseného SU-8 a vytvrzení vrstvy ultrafialovým zářením (jelikož je SU-8 negativní fotorezist, část vystavená UV záření je vytvrzena a neozářená část se rozpustí ve vyvíjecí lázni). Wafer se vypéká při zvýšené teplotě, aby došlo k dokonalému vytvrzení ozářeného fotorezistu a poté následuje samotný vývoj rezistu v rozpouštědle, kdy se nesíťovaný fotorezist SU-8 odstraní. V tomto kroku vzniká na substrátu požadovaný vzor. Epoxidová pryskyřice SU-8 může být vyvíjena činidlem PGMEA (propylenglykolmonomethylether acetát), pomocí ethyllaktátu nebo DAA (diacetonalkoholu). Jako poslední krok může být případně provedeno poslední zapékání při vysoké teplotě, kterým se minimalizuje možnost tvorby prasklin a povrch výrobku se celkově vytvrdí³⁷. Proces a jednotlivé kroky jsou popsány na Obr. 6.



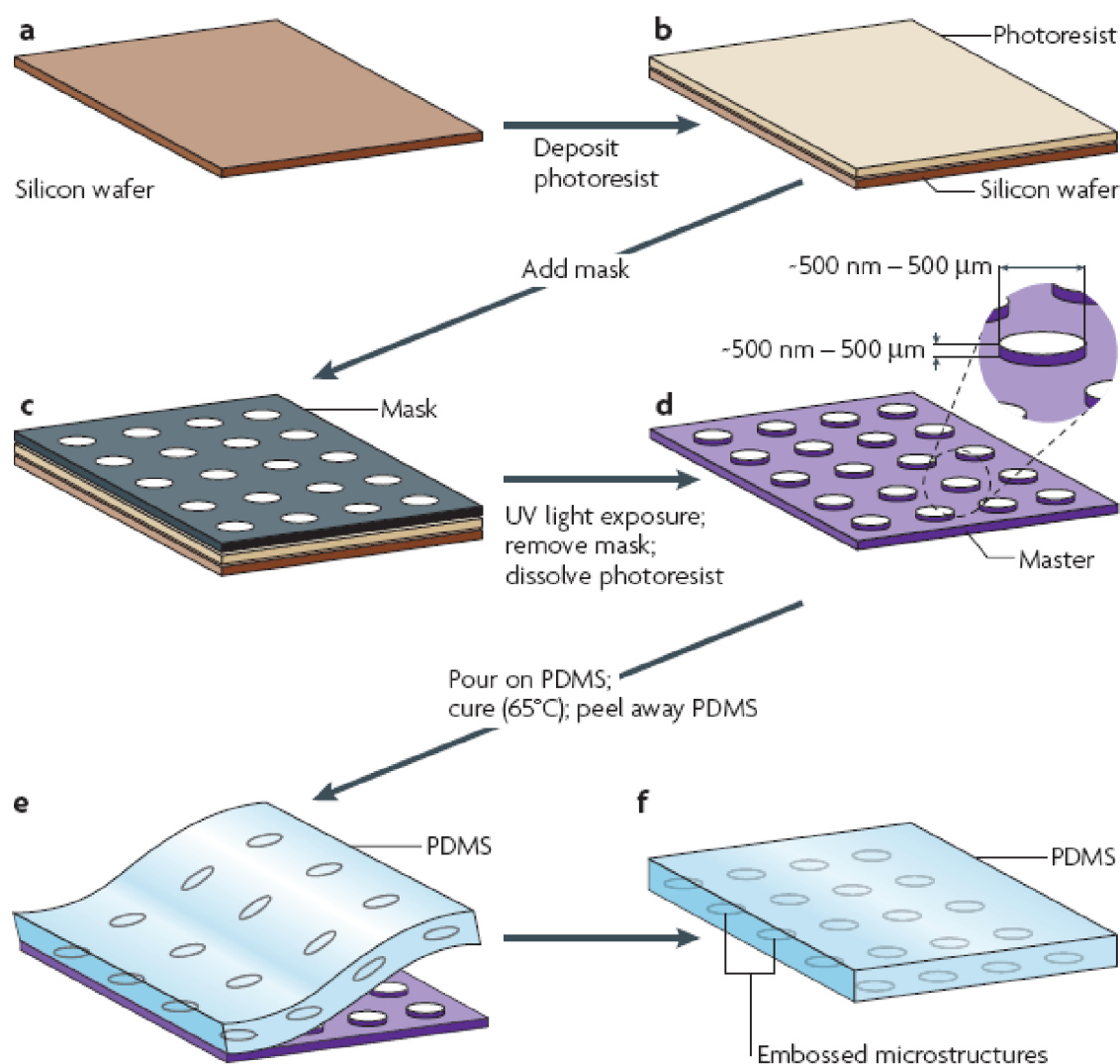
Obr. 6: Proces přípravy křemíkového waferu se vzorem³⁷

2.4.3 Měkká litografie PDMS

Další metodou, která je klíčová pro přípravu mikrofluidních čipů, je měkká litografie. Tato technologie umožňuje práci se širokým spektrem elastomerů (tedy *měkkých* materiálů). Nejčastěji se však pro účely „laboratoře na čipu“ používá polydimethylsiloxan (PDMS), který se odlévá na křemíkové substráty. Silikonový elastomer PDMS má hned několik vhodných vlastností, jako je například nízká cena, biokompatibilita či snadná manipulace³¹. Výroba probíhá tak, že se PDMS odlije na připravený substrát se vzorem z fotorezistu, nechá se vytvrdit a po odloučení od substrátu se odlitky překryjí například krycím sklem, nebo další

vrstvou PDMS. Vrstvy musí vykazovat silnou permanentní vazbu, které je většinou dosaženo opracováním styčných ploch kyslíkovým plazmovým výbojem. Pokud je sloučení vrstev provedeno správně, je možné pracovat v komůrkách s kapalinami pod tlakem až 350 kPa³⁸. Postup měkké litografie je blíže uveden v kapitole 4.3.

Existuje také několik dalších technik výroby mikrokanálkových struktur. Reliéf lze vytvořit pomocí odlévání replik, odlévání v kapilárách, mikrokontaktního tisku a mikrotransportního odlévání³¹.



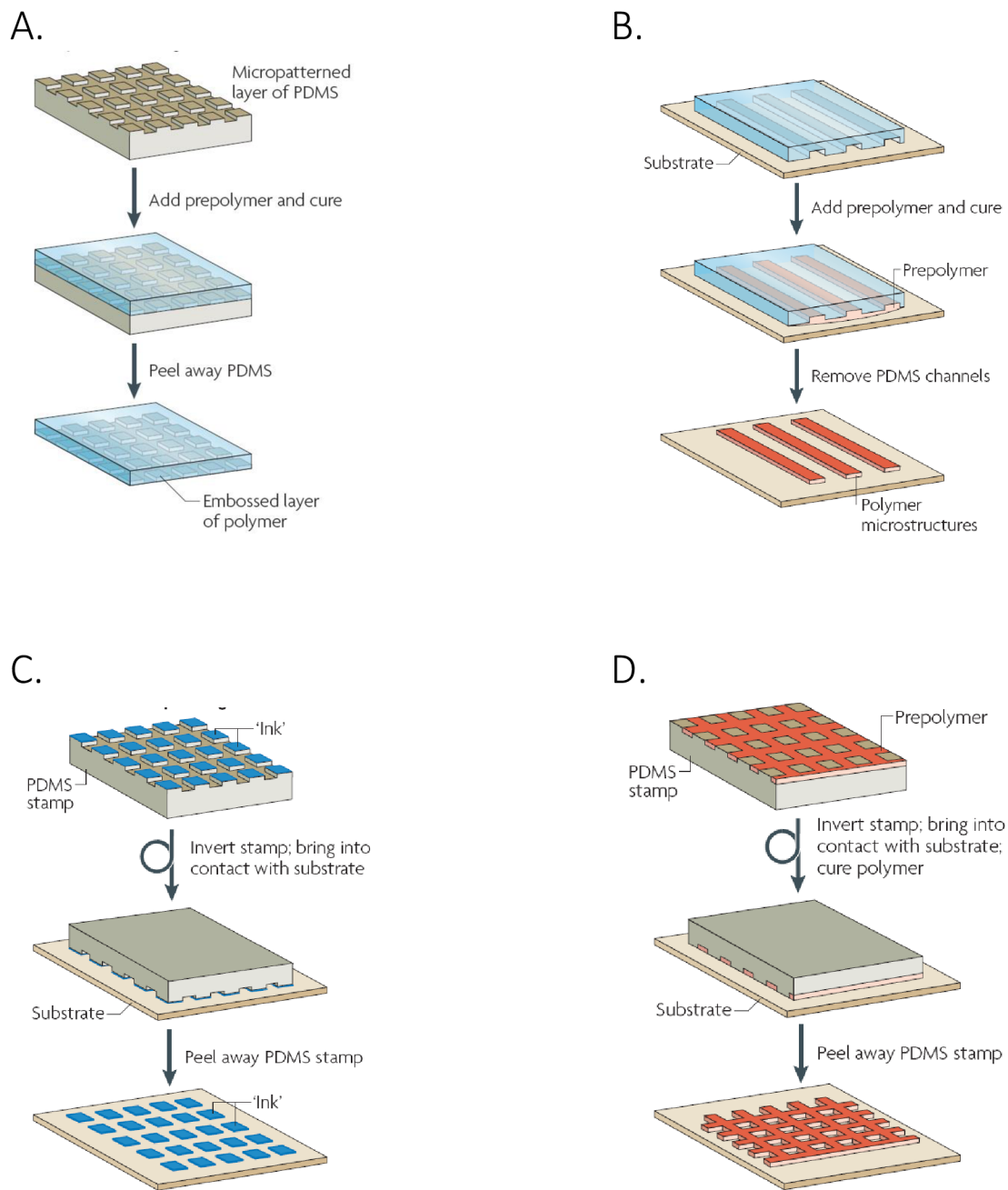
Obr. 7: Výroba PDMS vrstev s mikrostrukturami. (a) – (d) se vztahuje k výrobě pevné vzorovací formy pomocí fotolitografie. (e) a (f) ukazuje proces měkké litografie a vznik konečné vrstvy s mikrostrukturou³⁸

Při *odlévání replik* je PDMS vrstva se vzorem použita jako forma, do které je odlit vybraný polymer. Po vytvrzení je polymer od formy oddělen a vzory z vrstvy PDMS jsou, podobně jako při využití fotolitograficky vytvořené předlohy, obtištěny na povrchu polymeru. Odlévání replik umožňuje oproti fotolitografii použití širší škály materiálů (lze například odlévat z biokompatibilních materiálů, jako je agar nebo agaróza), výhodou je, že dochází k replikaci 3D struktur v jednom kroku a stejná forma je opakovaně použitelná³⁹.

Při *kapilárním odlévání* je stejně jako u *odlévání replik* PDMS vrstva se vzorem použita jako forma. Vzory na PDMS vrstvě však musí nejprve přijít do kontaktu se substrátem (například krycím sklem). Následně jsou vzniklé dutiny vyplněny kapalným polymerem. Po vytvrzení je PDMS odstraněn a na povrchu substrátu zůstávají hotové mikrostruktury³⁹.

Mikrokontaktní tisk pracuje s PDMS vrstvou jako s razítkem. Vzorovaná vrstva PDMS je smočena v tzv. molekulárním inkoustu a po kontaktu se substrátem je inkoust z vyvýšených ploch vzoru přenesen na povrch daného substrátu. Používají se různé inkousty obsahující malé biomolekuly, proteiny nebo suspenze buněk³¹.

V *mikrotransportním odlévání* je vzorovaný povrch PDMS vyplněn kapalným polymerem. Po odstranění přebytku polymeru je PDMS vrstva je převrácena a uvedena do kontaktu se substrátem. Po vytvrzení se vzniklé vrstvy oddělí a na povrchu substrátu zůstává vzniklá mikrostruktura. Podobně jako u odlévání replik může být stejná vzorovaná vrstva PDMS opakovaně používána³⁹.



Obr. 8: (a) odlévání replik (b) kapilární odlévání (c) mikrokontaktní tisk (d) mikrotransportní odlévání³⁷

2.5 Bakterie *Escherichia coli*

Escherichia coli je tyčinkovitá, gramnegativní, fakultativně anaerobní, spory netvořící bakterie, objevená bakteriologem Theodorem Escherichem v roce 1885. *E. coli* se přirozeně vyskytuje ve střevní mikrofloře teplokrevných živočichů⁴⁰.

Jakožto častý modelový organismus pro genetické a klinické studie patří *E. coli* k nejlépe prostudovaným mikroorganismům. Například Joshua Lederberg jako první r. 1947 pozoroval a popsal na bakterii *E. coli* výměnu genetického materiálu tzv. konjugaci. Je také nejčastější bakterií vyskytující se v klinických vzorcích. Její přítomnost je fyziologická pouze ve střevech, kde je prospěšná produkcí látek bránících rozšíření patogenních bakterií a podílí se také na tvorbě některých vitamínů (např. vitamínu K). Pokud se nachází i v krvi, může být původcem bakteriémie – způsobit sepsi^{40, 41}.

2.5.1 Sepse a průběh diagnostiky

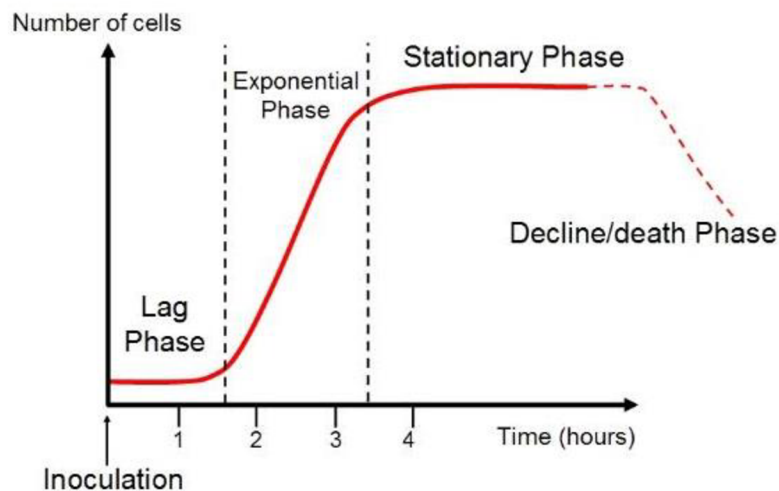
Obecně lze tyto infekce léčit podáním antibiotik, je však stále častější, že kmeny patogenů jsou vůči podanému antibiotiku rezistentní. Sepse je světově nejčastější příčinou smrti v nemocnicích na jednotkách intenzivní péče, mortalita dosahuje až 36 %⁴².

Při podezření na sepsi jsou pacientovi odebrány hemokultury a tyto vzorky se odesílají ke kultivaci. Průměrně sedmáct hodin⁴³ trvá určení přítomnosti bakterií, jejich druhu a citlivosti na antibiotika kultivační analýzou.

Léčbu je však nutné zahájit ihned při podezření na sepsi, a proto jsou jako první nitrožilně podávána širokospektrá antibiotika. Po přesném stanovení přítomných patogenů následuje cílená antibiotická terapie. Tento proces je poměrně zdlouhavý a pokud je krevní vzorek odebrán až po podání antibiotik, je citlivost značně omezená. Právě k těmto tradičním metodám diagnostiky by mohly být alternativou mikrofluidní systémy s optickou detekcí.

2.6 Kultivace buněk *in vitro*

Při kultivaci v laboratorních podmínkách zaznamenáváme u buněk několik fází vývoje, které jsou graficky znázorněny jako růstová křivka. Růst populace bakterií je způsoben mnohočetným binárním dělením, které se opakuje. Rozmnožování podléhá jistým vlivům prostředí a jeho průběh je možné graficky demonstrovat na růstové křivce (Obr. 9).



Obr. 9: Růstová křivka bakteriálních buněk⁴¹

Rozlišitelné jsou čtyři růstové fáze. Nejprve je rychlost růstu nulová, bakterie se v kultuře nemnoží, adaptují se na nové prostředí, zvětšuje se objem a hmotnost buňky, roste citlivost vůči vnějším vlivům, prodlužují se a syntetizují makromolekuly – tzv. *Lag fáze*. Po čase dojde k dělení buněk a rychlost růstu se zvýší až dosáhne exponenciálního přírůstku, tato fáze je nejdůležitější, bakterie se intenzivně množí, rychlost růstu je největší a generační doba nejkratší. Populace exponenciálně roste, fáze trvá do vyčerpání živin – exponenciální fáze (*log fáze*). Následuje doba zpomalování rychlosti růstu, až do stavu, kdy je počet buněk konstantní, růstová rychlost je nulová – *stacionární fáze* (bakterie se množí a zároveň odumírají, vyčerpávají se živiny, akumulují se sekundární metabolity). Po čase rychlost odumírání převáží a dochází k poklesu počtu živých buněk a *fázi odumírání*, může docházet ke tvorbě klidových stádií⁴¹.

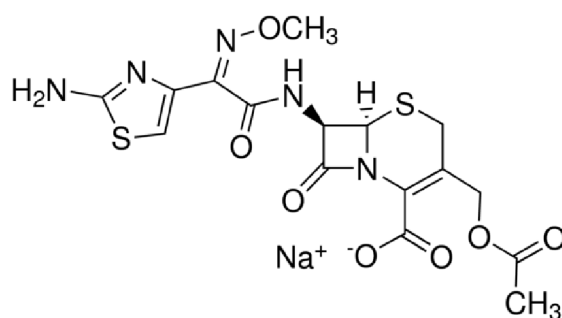
2.7 Antibiotika

Antibiotika jsou léčivé látky, působící na mikroorganismy – bakterie, některé parazity a houby. Jsou produkovány jinými houbami a bakteriemi, ale nyní se nejčastěji využívají jejich (polo)syntetické deriváty. Jejich účinek je bakteriostatický (zastavuje množení cílového mikroorganismu) či baktericidní (mikroorganismy usmrcuje). Toto dělení však není zcela určující, neboť mnoho bakteriostatických látek v závislosti na koncentraci působí také baktericidně. Mezi antibiotika se řadí i některá chemoterapeutika^{41, 44}. Éra antibiotik byla zahájena v roce 1929 objevem penicilinu, a přestože počet dosud izolovaných a charakterizovaných antibiotik se pohybuje v řádu stovek, v medicíně je využita velice malá část těchto látek, jelikož většina je vysoce toxická. Hlavní indikací jsou onemocnění bakteriálního a fungálního původu, na začátku jejich používání byla však považována za téměř zázračné a všemocné léky. Při stanovení dávkování je nutné zjistit minimální inhibiční koncentraci antibiotika. Jedná se o nejnižší koncentraci, která potlačí bakteriální růst a je to důležitý parametr určovaný při rutinním mikrobiologickém testování pro stanovení správného léčiva pacientovi.

2.7.1 Cefotaxim

Cefotaxim patří mezi cefalosporiny 3. generace. Cefalosporiny jsou skupinou betalaktamových antibiotik (základem struktury je β -laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem). Účinek betalaktamových antibiotik je baktericidní a mechanismem jejich účinku je inhibice syntézy buněčné stěny. Cefalosporiny přesněji brání vytvoření trojrozměrné struktury buněčné stěny, která je tvořena peptidoglykanovými vlákny spojenými působením enzymů transpeptidázy, transglykosidázy a karboxypeptidázy. Nosiči těchto enzymů jsou PBP (penicilin binding protein). Cefalosporiny se ireverzibilně naváží na PBP a znemožní tvorbu potřebných enzymů. Buňky působením cefalosporinů lyzují^{41, 44}.

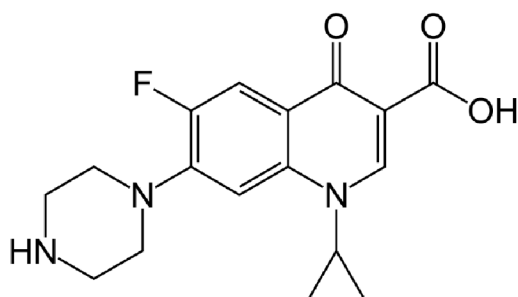
Tato skupina antibiotik má poměrně široké spektrum účinku, používají se často při akutních infekcích, kdy není možné čekat na výsledky kultivace. Skupina zahrnuje pět generací léčivých látek, rozlišených dle spektra působení, schopnosti průniku buněčnou stěnou či farmakokinetických vlastností⁴⁴.



Obr. 10: Struktura Cefotaximu

2.7.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin patří mezi antibiotika skupiny chinolonů 2. generace (fluorované chinolony). Účinek chinolonů je baktericidní, dochází k ovlivnění DNA bakteriálních buněk. Princip účinku spočívá ve vazbě na komplex DNA a DNA gyrázy (enzymu zodpovědného za správné splétání a rozplétání řetězců bakteriální nukleové kyseliny v průběhu G fáze buněčného cyklu). Proces tedy vede k zábraně replikace bakteriálního chromozomu tím, že narušuje prostorovou strukturalizaci DNA. Ciprofloxacin se využívá při léčbě infekcí trávicího traktu a močových cest.

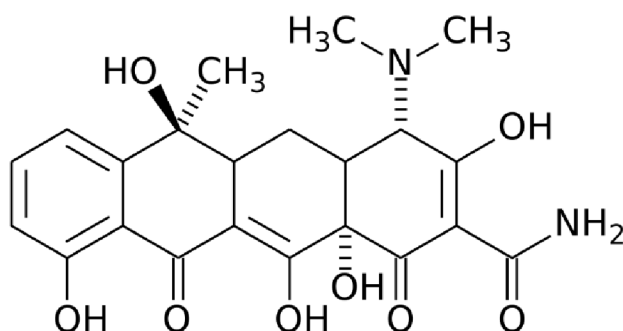


Obr. 11: Struktura Ciprofloxacinu

2.7.3 Tetracyklin

Tetracyklin je antibiotikum 1. generace, ze skupiny tetracyklinů. Jedná se o širokospektrá antibiotika, jejichž účinek je bakteriostatický. Mechanismus účinku je inhibice proteosyntézy. Uvnitř buňky se reverzibilně váže na receptor 30S podjednotky ribozomů. Zde zabrání vazbě aminoacyl-tRNA a mRNA a nemůže proto dojít k přidávání aminokyselin na prodlužující se peptidový řetězec. Dochází k inhibici proteosyntézy a zástavě růstu bakterie.

Tato antibiotika byla v minulosti často využívána v pediatrii, později se však ukázalo, že poškozují zubní sklovinu a růstové chrupavky a jsou pro děti zcela nevhodná.



Obr. 12: Struktura tetracyklinu

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době je diagnostika bakteriálních infekcí prováděna pomocí kultivační analýzy a uplatnění nachází také metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), která je založena na vyhledávání známých genů rezistence. Je snaha tyto časově či finančně náročné metody diagnostiky postupně nahradit anebo přinést k nim novou jednodušší alternativu. Metoda založená na PCR navíc neumožňuje stanovit minimální inhibiční koncentraci (MIC) účinné látky a je možné ji využít pouze na známé genové sekvence. Autoři **B. Suberviola a spol.** v článku *Microbiological Diagnosis of Sepsis: Polymerase Chain Reaction System Versus Blood Cultures*⁴³ srovnávají zmíněné metody z časového hlediska. Autoři uvádějí, že časová náročnost metody kultivace krevních vzorků je průměrně 17 hodin (tj. nejkratší doba k získání prvních výsledků) a metoda PCR poskytne výsledky průměrně po šesti hodinách od počátku testování. Bylo zároveň zjištěno, že PCR analýza může odhalit mikroorganismy i ve vzorku, který při tradiční kultivaci pozitivní na mikroorganismy není. Inovativní způsoby stanovování citlivosti patogenů vůči antibiotikům a stanovení MIC zahrnují vývoj metod jako jsou například MALDI–TOF MS, fluorescencí aktivované třídění buněk (FACS) či techniky založené na Ramanově spektroskopii. Mnohé nové techniky však stále vyžadují jisté přípravy vzorků před měřením a v tomto ohledu je velice výhodná právě Ramanova spektroskopie v kombinaci s mikrofluidikou, kde je možné provádět analýzy v podstatě přímo ze vzorku tělních tekutin. Nyní je standardní metodou stanovení MIC test na bázi mikrodiluční bujonové metody (BMD), kdy je definované množství bakteriální kultury inkubováno s odpovídajícím množstvím antibiotik po dobu 16 až 20 hodin⁴⁵.

Diplomová práce navazuje na práci **Z. Piláta a spol.**, kteří se problematice mikroorganismů a jejich stanovení pomocí Ramanovy mikrospektroskopie věnovali ve svých předchozích pracích *Effects of Infrared Optical Trapping on Saccharomyces cerevisiae in a Microfluidic System*¹⁶ a *Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman Spectroscopy of E-coli under Antibiotic Stress*^{16, 17}. Autoři provedli pilotní měření odezvy buněk na přítomnost antibiotik pomocí systému Ramanovy mikrospektroskopie kombinované s optickou pinzetou a tato práce si klade za cíl optimalizovat metodu měření a rozšířit poznatky původních autorů.

V práci bylo využito také poznatků **J. Kirchhoff a spol.**, kteří v práci *Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within two hours using Raman spectroscopy*⁴⁶ prováděli srovnání Ramanových spekter buněk *E. coli* v prostředí antibiotik a v čistém médiu, ovšem bez použití optické pinzety. Stanovovali citlivost buněk na ciprofloxacin (AST) a jeho MIC. Časová náročnost této metody byla stanovena celkově na dvě hodiny od počátku stanovení k výsledku analýzy. Jedná se o markantní rozdíl v porovnání s časovými údaji u zavedených metod⁴³ (kultivace sedmáct hodin, PCR šest hodin). Autoři Kirchhoff a spol. popisují na určitých vlnočtech Ramanova spektra buněk za přítomnosti antibiotika ciprofloxacinu signifikantní změny, které jsou dle jejich závěrů významné a rozhodující při vyhodnocení inhibice růstu patogenu a stanovení MIC léčiva. Klíčové pásy Ramanova spektra buněk, které autoři zmiňují, budou blíže diskutovány v rámci výsledků v kapitole 5.

V rámci diplomové práce je cílem získat Ramanova spektra buněk ovlivněných různým typem antibiotik, nalézt a porovnat s literaturou konkrétní charakteristické pásy ve spektru, a ověřit, zda jsou Ramanova spektra buněk opakovatelná, univerzální a spolehlivá natolik, že lze na jejich základě usuzovat na citlivost patogenu k antibiotiku. Zároveň je cílem porovnat, zda je spektrum získané pomocí měření systémem s optickou pinzetou vhodnější (poskytuje kvalitnější spektra) a případně optimalizovat nastavení tohoto systému tak, aby bylo možné data spolehlivě získávat.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitý materiál a přístroje

Kultivace buněk:	Caso Broth Agar	Sigma – Aldrich Carl Roth
Buňky:	<i>E. coli</i> 785	Pathogen Biobank, Fridrich Schiller University of Jena
Derivatizace povrchů skla:	PDMS trichloroktadecylsilan methylalkohol ethanol absolutní diethylether	Sylgard 184, Dow Corning Sigma – Aldrich 112-04-9 Penta 67-56-1 Penta 64-17-5 Penta 60-29-7
Antibiotika:	cefotaxim sodná sůl tetracyklin ciprofloxacin	Sigma – Aldrich 64485-93-4 Sigma – Aldrich 60-54-8 Sigma – Aldrich 85721-33-1
Přístroje:	Optický mikroskop Ramanův mikrospektrometr Optická pinzeta Ozonizátor Bioreaktor Centrifuga Stříkačkové pumpy NE1001 Autokláv Flowbox	Olympus IX70 Renishaw In Via Raman Ústav přístrojové techniky AV ČR Certizon BioSan Eppendorf New Era Pump Systems, Inc. Tuttnauer 1730 MK ThermoFisher Scientific
Další materiál:	zkumavky centrifugační, typ Falcon, s membránovým filtrem TubeSpin® injekční stříkačky 1ml luer-lock konektory mikrofluidní hadičky	BioSan Terumo IDEX Health & Science LLC IDEX Health & Science LLC

4.2 Příprava buněk

4.2.1 Příprava kapalného média CASO Broth

Médium bylo připraveno rozpuštěním příslušného množství práškového CASO Broth (použitá komerční směs obsahuje agar a kaseinový pepton o koncentraci 15 g dm^{-3} a sójový pepton a chlorid sodný o koncentraci 5 g dm^{-3}). Tato směs byla rozpuštěna v deionizované vodě vždy tak, aby byla dosažena koncentrace 3 % hm. Následně byla provedena sterilizace připraveného média v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 min.

4.2.2 Příprava média CASO s přídavkem agaru

Živná půda na přípravu kultivačních misek byla připravena rozpuštěním příslušného množství CASO Broth a agaru v deionizované vodě vždy tak, aby byla dosažena koncentrace 3 % hm. CASO a 2 % hm. agaru. Následně byla provedena sterilizace připraveného roztoku v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 min. Po vychladnutí byl připravený roztok rozdělen na sterilní Petriho misky.

4.2.3 Kultivace buněk

Veškeré manipulace byly provedeny za sterilních podmínek v laminárním boxu. Buňky, získané od partnerského pracoviště (Biobanka patogenů, Fakultní nemocnice Jena, Německo) z krevních vzorků pacientů se sepsí, zakonzervované zamražením, byly kultivovány na Petriho miskách s připravenou agarovou živnou půdou. Po nanesení příslušných buněk křížovým roztěrem na živnou půdu pokračovala kultivace v termostatu (inkubátoru) po dobu 24 hodin při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Misky byly dále uchovávány při teplotě $4 \text{ }^\circ\text{C}$ nejdéle 20 dnů, poté byly buňky sterilně vždy stejným způsobem přeočkovány na novou půdu.

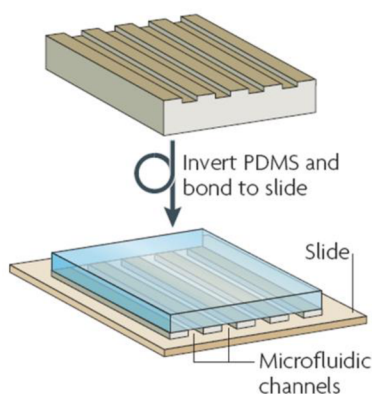
4.2.4 Příprava inokula

Příprava suspenze buněk v tekutém médiu CASO Broth byla prováděna v centrifugační zkumavce typu Falcon 50 ml s kónickým dnem, ve které objem použitého sterilizovaného média činil 15 ml. Do média byly zaočkovány z vybrané agarové plotny buňky a suspenze byla dále kultivována v automatické bioreaktoru při $37 \text{ }^\circ\text{C}$, po dobu potřebnou k dosažení optimální hodnoty optické hustoty, která se lišila v závislosti na konkrétním experimentu. Nakonec byl odebrán 1 ml kultury, která byla odstředěna, promyta 1 ml PBS a znovu odstředěna, aby se zamezilo interakci pozadí z média ve spektrech.

4.3 Mikrofluidní čipy

Na realizaci experimentů byla využita mikrofluidní zařízení vyrobená na Ústavu přístrojové techniky AV ČR. Design kanálků byl zvolen na základě předchozích zkušeností s použitím v obdobných experimentech¹⁷.

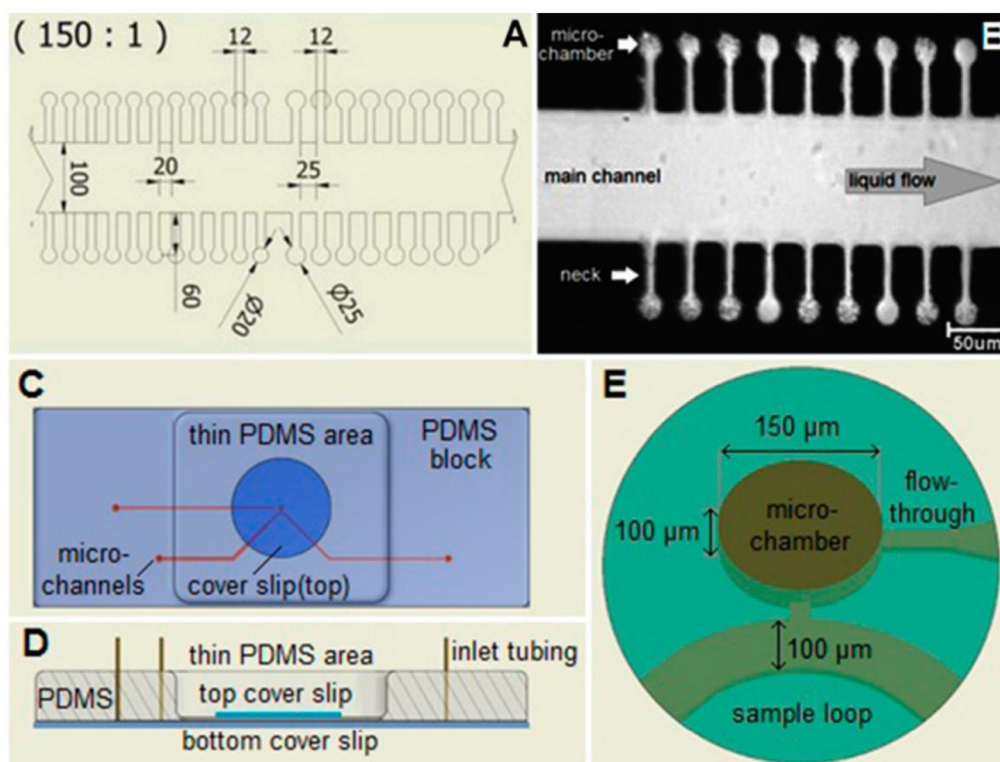
Čipy byly vyrobeny z polydimethylsiloxanu (PDMS) měkkou litografií. Směs monomerů a tvrdidla v poměru 10:1 byla promíchána, odplyněna za sníženého tlaku a nanášena do polykarbonátového rámečku na křemíkový wafer s příslušným vzorem. Po vytvrzení bylo zbytkové PDMS odstraněno, čip byl odebrán z waferu a kanálky byly uzavřeny nalepením PDMS vrstvy na podložní sklo (viz Obr. 13), pomocí aktivace povrchů PDMS a skla kyslíkovou plazmou. Proces výroby je detailněji uveden v kapitole 2.4.



Obr. 13: Sloučení PDMS a skleněné vrstvy mikrofluidního čipu³⁸

Konkrétní uspořádání komůrek v použitých čípech je uvedeno na

Obr. 14. Na experimenty, při kterých byla pořizována Ramanova spektra, byly použity čipy s průtočnou komorou (Obr. 14 C–E), které jsou z vrchu kryté křemenným sklem. Díky tomu je možné pořizovat spektra bez interference signálu PDMS, zároveň je větší prostor pro manipulaci s objektivem a menší pozadí ze skla.



Obr. 14: Mikrofluidní čipy použité k experimentům. Rozměry jsou uvedeny v μm : (A) Hlavní kanálek čipu, použitého na experimenty s optickou mikromanipulací a kultivační experimenty. (B) Detail komůrek v čipu. (C) Jednokomorový čip použitý na LTRS experimenty. (D) Pohled na řez čipem. (E) Detail hlavní části čipu s komorou.

4.4 Povrchová úprava skleněného povrchu kanálku v čipu

Byla provedena povrchová úprava skla, aby bylo ověřeno, zda takovou úpravou lze dosáhnout lepší míry adheze buněk v mikrofluidním kanálku, jako popisují autoři Ong a spol.⁴⁷.

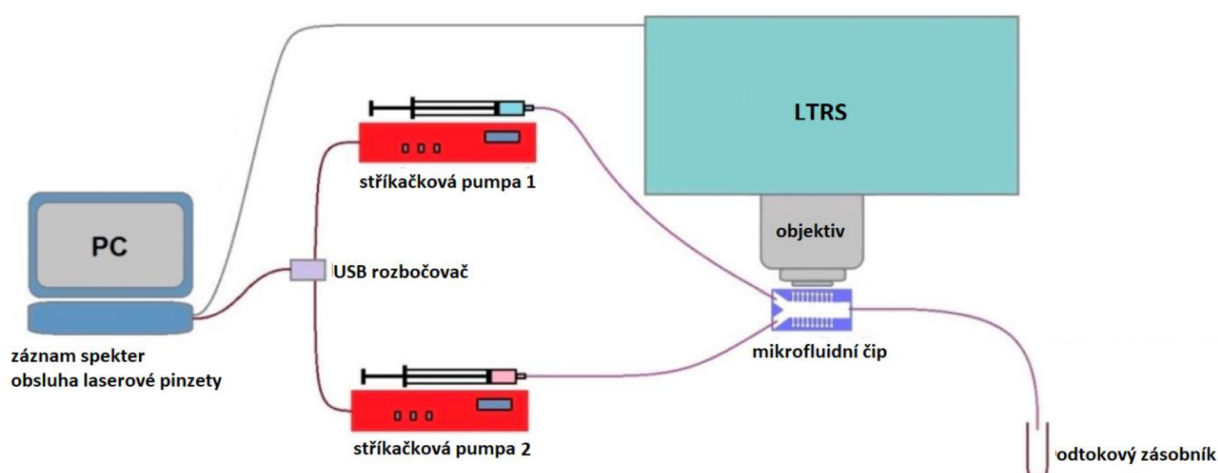
Roztok pro derivatizaci povrchů kanálků byl připraven nadávkováním příslušného množství methanolu, do kterého byl rozpuštěn trichloroktadecylsilan tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 0 %; 0,1 % a 0,5 %. Roztok byl vzhledem k nestálosti připravován bezprostředně před použitím a uchováván pouze po dobu nutnou k manipulaci.

4.4.1 Leptání povrchu

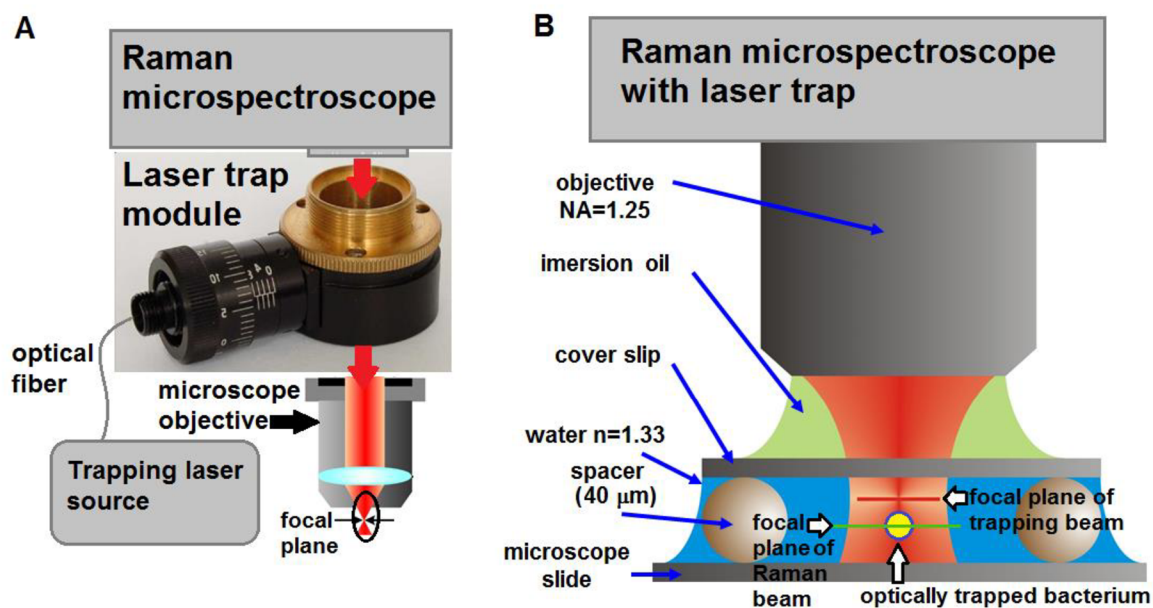
Pro účely porovnání byly povrchově upravovány podložní skla pro mikroskopii. Sklo bylo nejdříve vyčištěno směsí ethanolu a diethyletheru v poměru 1:1 a následně bylo ozonizováno v uzavřené komoře s přívodem ozonu po dobu 30 minut. Na ozonizovaný povrch byl nanesen roztok trichloroktadecylsilanu, vždy byly připraveny 3 vzorky skla na každou koncentraci trichloroktadecylsilanu. Roztok na sklo působil po dobu 15 minut. Zbytek činidla byl odsán, sklo bylo opláchnuto čistou vodou a vysušeno. Na sklo bylo dále nanášeno 0,5 ml buněčné suspenze a buňky byly ponechány k usazení 60 min. Poté bylo sklo propláchnuto 3x opakovaným ponořením do vodní lázně a na mikroskopu byly pořízeny snímky zachycených buněk. Pomocí softwaru ImageJ byl nakonec porovnán počet přichycených buněk v závislosti na stupni úpravy skla.

4.5 Měřicí sestava

Měření probíhalo pomocí sestavy kombinující mikrofluidiku, Ramanovu mikrospektroskopii a optickou mikromanipulaci (LTRS). Systém je popsán v kapitole 2.3 a byl použit na základě zkušeností autorů Pilát a spol.¹⁷. Mikrofluidní část byla složena z pístových pump, v počtu závislém na konkrétním experimentu, 1 ml injekční stříkačky, konektorů luer-lock, a kapilár (vnitřní průměr 360 μ M). Na jednom konci byl čip dále připojen k mikrofluidní pumpě. Zapojení je znázorněno na Obr. 15. Průtok kapalin v experimentech byl vždy volen 100 μ l/h. Schéma viz Obr. 15 a Obr. 16.



Obr. 15: Schématické znázornění LTRS sestavy.

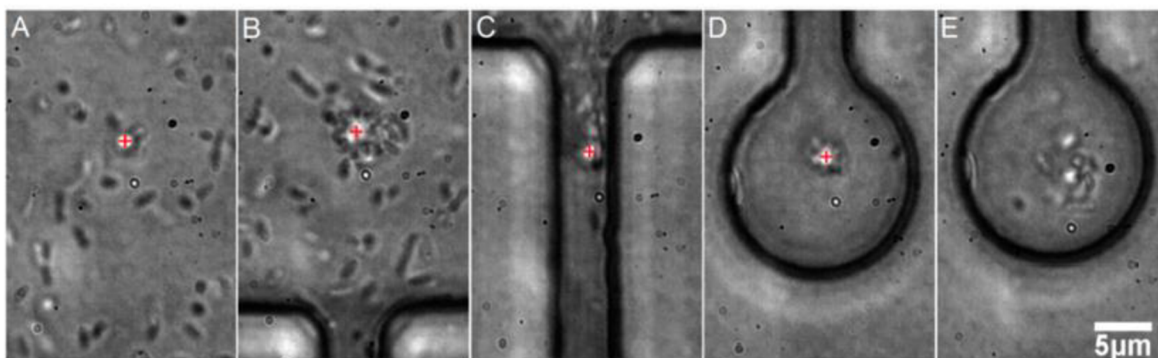


Obr. 16: Schéma Ramanova mikrospektroskopu a Ramanova mikrospektroskopu s optickou pastí¹⁷.

4.6 Dávkování buněk do mikrofluidního čipu a zapojení do měřicí aparatury

Hotový mikrofluidní čip byl pomocí kapiláry připojen ke stříkačce naplněné nejprve čistým CASO médiem, kterým byly kanálky propláchnuty. Poté byla stříkačka v pumpě vyměněna za médium s buňkami o příslušné optické hustotě a buňky byly umístěny optickou pinzetou do pozic v komůrkách (Obr. 17). Na snímku 9A byla spuštěna optická past a bezprostředně došlo k zachycení několika buněk. B stolcem s preparátem je pohybováno tak, aby se zachycené buňky dostaly krčkem do příslušné komůrky. C při manipulaci dochází ke ztrátě několika zachycených buněk. D optická past se nachází v cílové komůrce a stále je zachyceno několik buněk. E past je vypnuta a zachycené buňky jsou uvolněny do prostoru. Aby bylo vyloučeno poškození buněk při manipulaci laserem, jeho síla byla nastavena na minimální efektivní hodnotu pro chytání a čas manipulace byl omezen na co nejkratší dobu, řádově jednotky sekund.

Nakonec byla buněčná suspenze v pumpě vyměněna za médium s příslušným antibiotikem, a za několik sekund (viz kapitola 4.6.1) difuzí došlo ve všech komůrkách k vyrovnání koncentrace antibiotika.



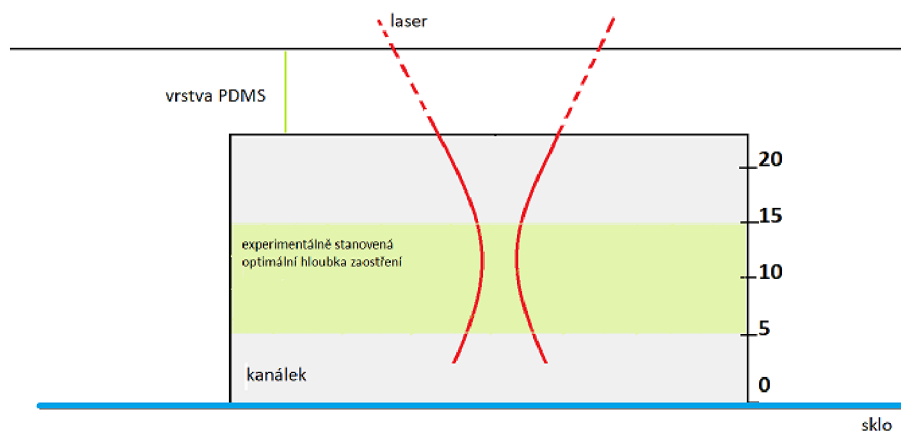
Obr. 17: Manipulace buněk pomocí optické pinzety. Pozice chytacího svazku je zvýrazněna červeným bodem. (A) byla spuštěna optická past a bezprostředně došlo k zachycení několika buněk. (B) stolkem s preparátem je pohybováno tak, aby se zachycené buňky dostaly krčkem do příslušné komůrky. (C) při manipulaci dochází ke ztrátě několika zachycených buněk. (D) optická past se nachází v cílové komůrce a stále je zachyceno několik buněk. (E) past je vypnuta a zachycené buňky jsou uvolněny do prostoru. Regulaci optické hustoty použité buněčné kultury lze rovněž dosáhnout vhodné koncentrace buněk, kdy je možné pohodlně chytat pouze jednotlivé bakterie, pokud je to potřebné.

4.6.1 Rychlost difuze v mikrofluidním čipu

Pro ověření rychlosti difuze kapalin v mikrofluidním čipu byl proveden experiment s obarveným CASO médiem. Na optický mikroskop byl vložen čip, který byl stříkačkou naplněn nejprve čistým médiem a poté bylo pomocí pumpy s nastaveným průtokem $100\mu\text{l}/\text{min}$ pumpováno médium obarvené. Rychlost difuze od začátku pumpování do zaplnění všech kanálků (délky $300\mu\text{m}$) obarveným médiem byla naměřena 78 s.

4.6.2 Měření skrz PDMS vrstvu a závislost signálu na hloubce zaostření laseru

Aby bylo zjištěno, zda lze měřit Ramanova spektra v mikrofluidním kanálku skrz vnější vrstvu PDMS, byl proveden sběr spekter ze suspenze buněk *E. coli* 785 v CASO médiu v různých hloubkách zaostření laserového svazku v kanálku (viz Obr.18) a tato spektra byla následně porovnána.



Obr.18: Měření spekter v různé hloubce zaostření (boční pohled na řez čipem)

4.6.3 Měření spekter z jednotlivých buněk *E. coli* a buněk po přidavku antibiotik

Klasickou Ramanovou mikrospektroskopií a Ramanovou mikrospektroskopií ve spojení s optickou pinzetou (viz kap. 4.5) byla naměřena spektra čisté kultury buněk *E. coli* 785 a buněk ovlivněných přítomností různých druhů antibiotik (cefotaximu, ciprofloxacinu a tetracyklinu). Nastavení přístroje je uvedeno v Tab. 2. Všechna dále uvedená spektra jsou průměrem dvaceti jednotlivých pořízených spekter.

Výsledná spektra byla zpracována softwarem ProcessRaman, vyvinutým Mgr. Martinem Šilerem, PhD. na ÚPT AV ČR. Odstranění nežádoucího záření pozadí a fluorescence bylo provedeno použitím RCF⁴⁸ (Rolling Circle Filter). Vhodným nastavením tohoto filtru je možné efektivně odstranit záření pozadí bez významného zkreslení sledovaných hodnot. Spektra byla normalizována na $1\ 001\text{ cm}^{-1}$. Dále byl vybrán rozsah sledovaného vlnočtu (700 cm^{-1} – $1\ 700\text{ cm}^{-1}$). V následujícím textu budou dále značeny poměry Ramanovských intenzit na definovaných vlnočtech jako $I_{x/y}$, kde indexy x a y označují příslušný vlnočet.

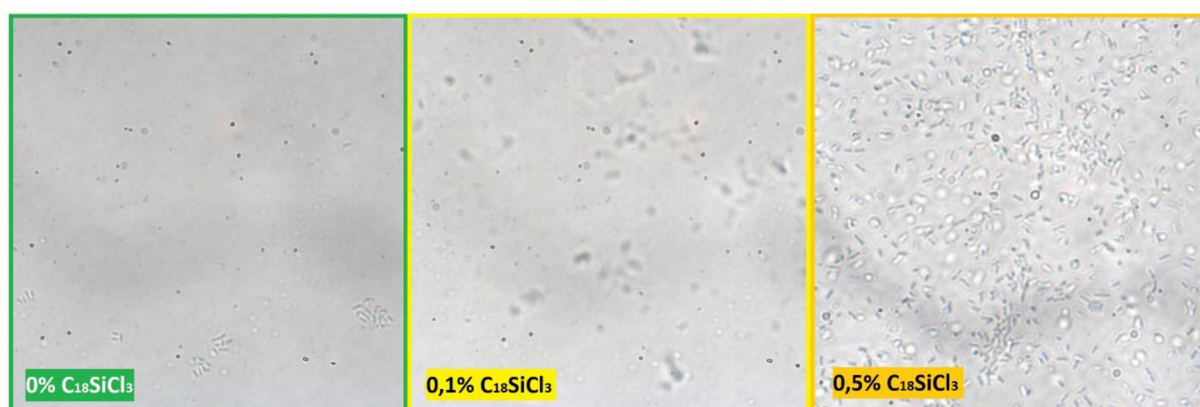
Stanovení poměru intenzit charakteristických pásů ve spektru bylo provedeno výběrem maximální hodnoty intenzity v oblasti $1\ 456$ – $1\ 464\text{ cm}^{-1}$ a v oblasti $1\ 481$ – $1\ 489\text{ cm}^{-1}$. Všechny grafy byly dále zpracovány programem Microsoft Excel.

Byly stanoveny také poměry intenzit píků charakteristických pro oblast působení jednotlivých antibiotik. Pro ciprofloxacin $I_{1001/1099}$, pro cefotaxim $I_{1001/1061}$ a pro tetracyklin $I_{1001/1061}$.

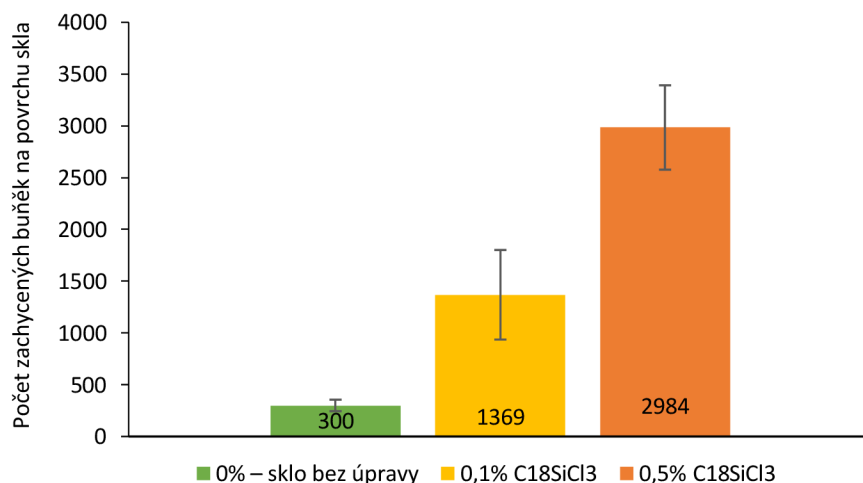
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Efektivita povrchové úpravy skla

V experimentech s chemickou úpravou (derivatizací) vnitřních povrchů mikrofluidních čipů bylo cílem zlepšit adhezi bakteriálních buněk, pro účely pozorování tvorby biofilmu. Už vizuálním zhodnocením (viz. Obr. 19) je patrné, že derivatizace výrazně přispěla ke zvýšení adheze buněk na sklo. Toto pozorování dokládá Obr. 20, na kterém je znázorněn počet zachycených buněk v závislosti na provedené úpravě skla. Provedeným experimentem bylo ověřeno, že uvedeným způsobem úpravy skla lze dosáhnout požadovaného efektu, a tedy byla tato metoda dále využívána k přípravě mikrofluidních čipů jak na mikroskopické pozorování, tak pro měření Ramanových spekter.



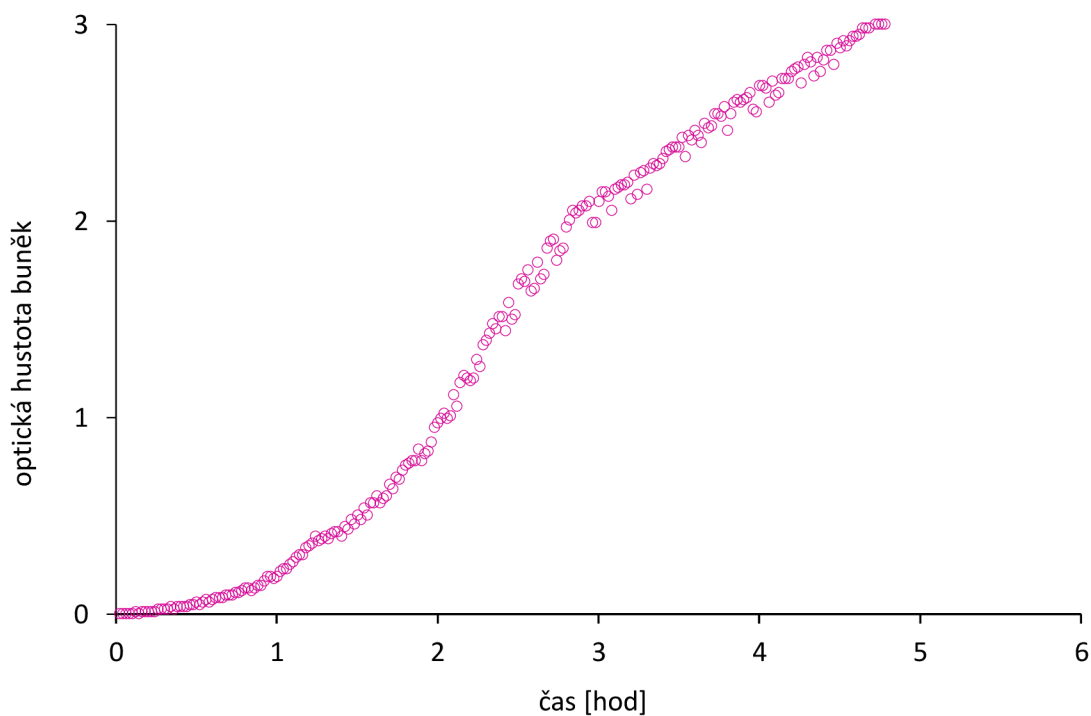
Obr. 19: Snímky povrchově upravených skel se zachycenými buňkami



Obr. 20: Porovnání počtu zachycených buněk v závislosti na povrchové úpravě skla

5.2 Růstová fáze buněk *E. coli* 785 použitých k měření

Na experimenty byly použity buněčné kultury kultivované po dobu nezbytnou k dosažení exponenciální fáze, vždy nejméně 90 minut. Byly monitorovány růstové křivky a kultura byla odebrána v okamžiku dosažení potřebné hodnoty optické hustoty a optimální růstové fáze. Ilustrační typická růstová křivka buněk *E. coli* 785 je uvedena na Obr. 21.



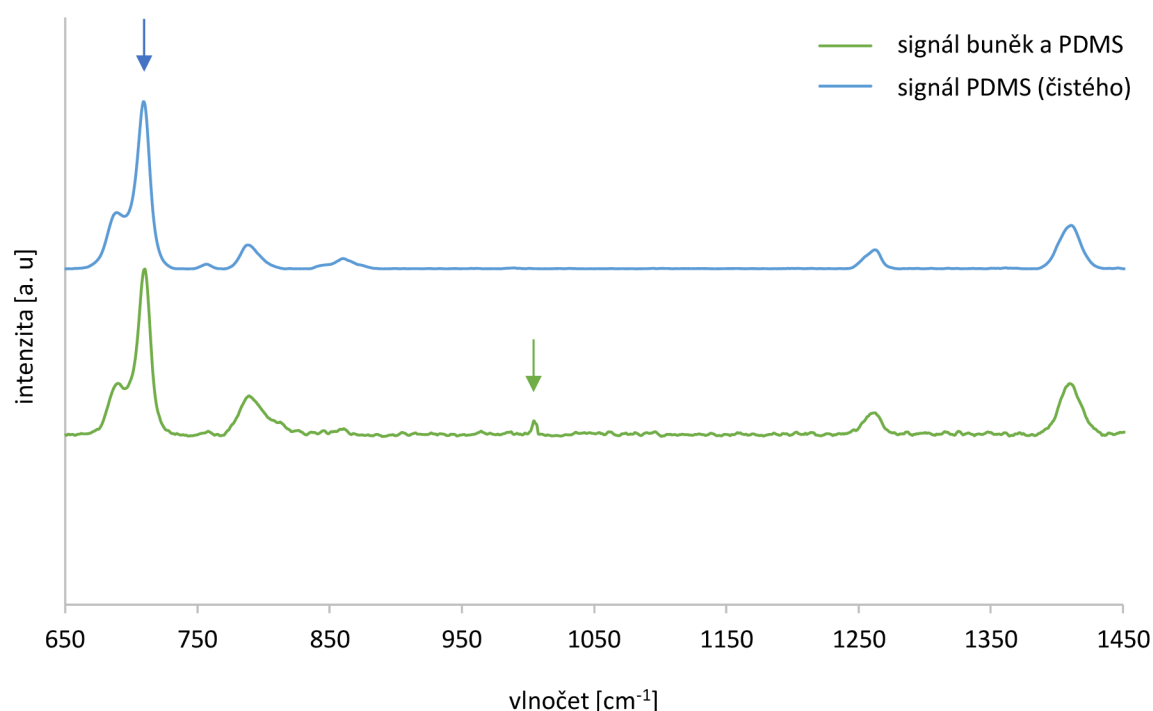
Obr. 21: Růstová křivka buněk *E. coli* 785.

5.3 Závislost intenzity signálu na hloubce zaostření laserového svazku

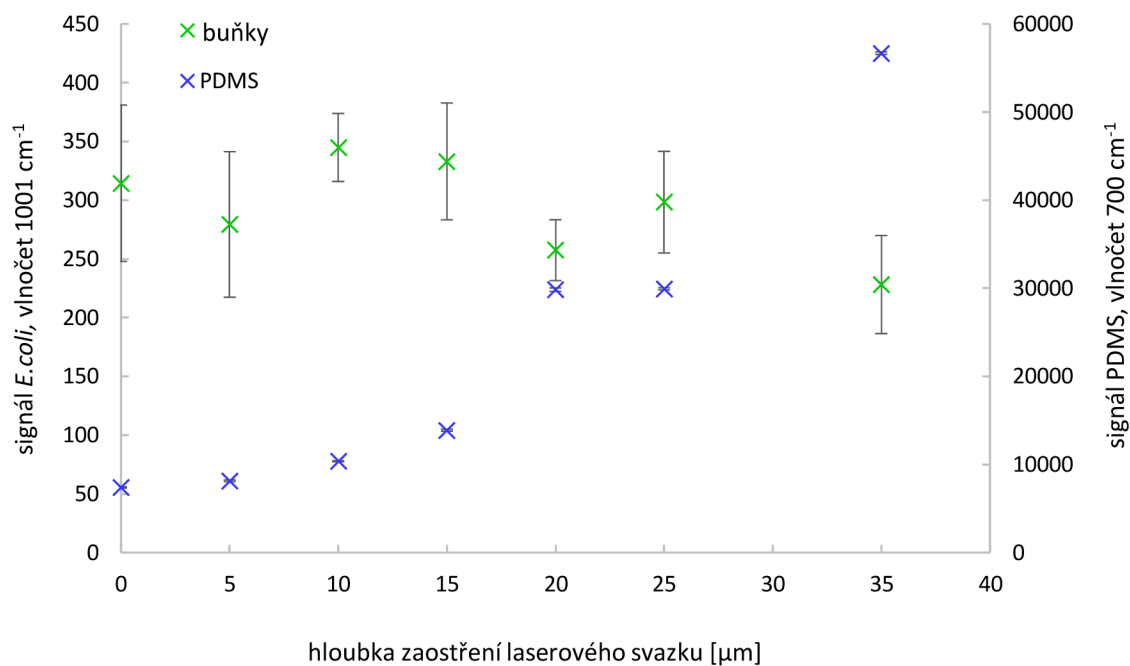
Spektra, na jejichž základě byl zvolen vlnočet pro následné porovnání intenzit signálu buněk a PDMS v závislosti na hloubce zaostření reprezentuje Obr. 22. Ramanova spektra, získaná v různé hloubce komůrky ukazují, že optimální hloubka zaostření laserového svazku je mezi 5–15 μm výšky kanálku (viz Obr. 23), ve které byl pozorován dostatečně intenzivní signál buněk a zároveň menší vliv signálu ze samotného PDMS. Nastavení přístroje je uvedeno v Tab. 1.

Tab. 1: Nastavení Ramanova mikrospektrometru

střed spektra	1 200 cm^{-1}
vlnová délka excitačního záření	532 nm
počet akumulací	30
čas integrace	1 s
opakování na variantu	9



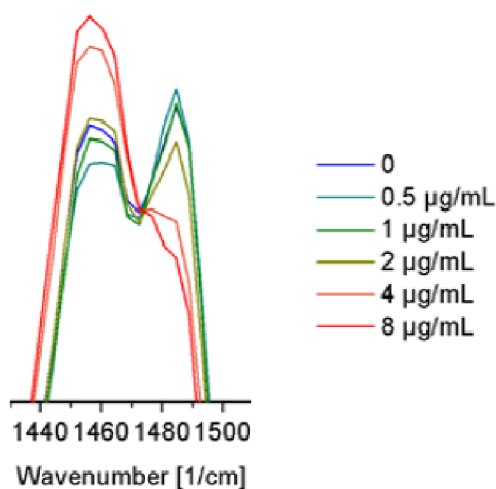
Obr. 22: Spektra, dle kterých byl určen vlnočet pro následné porovnání. Vybraný vlnočet je označen šipkou – pro buňky fenylalanin ($1\ 001\ \text{cm}^{-1}$, zaostřeno v 10 μm hloubky kanálku) a pro PDMS Si–C₆H₅ ($700\ \text{cm}^{-1}$, zaostřeno několik μm pod dnem kanálku)



Obr. 23: Závislost měřeného Ramanova signálu PDMS na vlnočtu 700 cm^{-1} ($\text{Si-C}_6\text{H}_5$) a bakterie *E. coli* 785 na vlnočtu 1 001 cm^{-1} (fenylalanin) na hloubce zaostření v mikrokanálku z PDMS a skla (dno kanálku). Vyznačené chybové úsečky reprezentují 2SD.

5.4 Vyhodnocení Ramanovských spekter

V následující kapitole je uvedeno porovnání získaných spekter pomocí Ramanovy mikrospektroskopie a LTRS pro jednotlivá antibiotika. Autoři článku *Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration (MIC) within two hours using Raman spectroscopy*⁴⁶ uvádějí, že výpočet poměru intenzit pásů na vlnočtech okolo $1\,458\text{ cm}^{-1}$ a $1\,485\text{ cm}^{-1}$ udává míru růstu či inhibice růstu buněk antibiotikem a ukazují, že je zde koncentračně závislý průběh. Na základě intenzit těchto pásů pak přímo stanovují MIC ciprofloxacinu. Obecně je intenzita na vlnočtu $1\,458\text{ cm}^{-1}$ považována za rostoucí s rostoucí koncentrací ciprofloxacinu a na $1\,485\text{ cm}^{-1}$ klesající, viz obrázek Obr. 24.



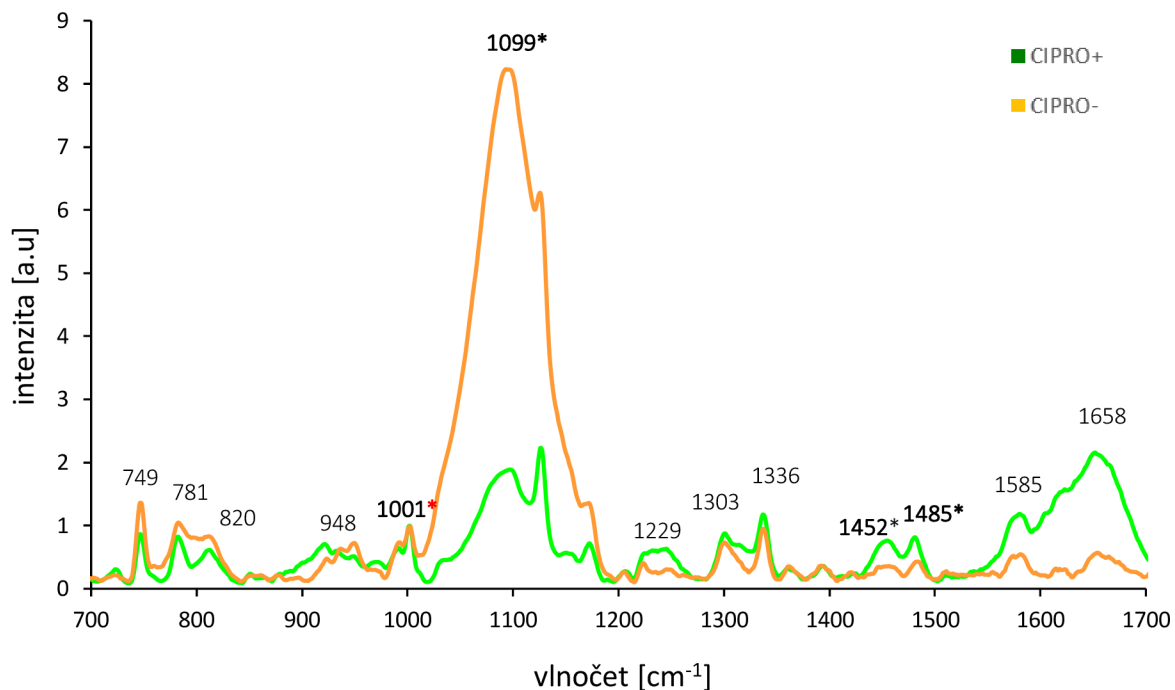
Obr. 24: Trend rostoucí intenzity signálu na $1\,458\text{ cm}^{-1}$ a klesající intenzity na $1\,485\text{ cm}^{-1}$ s rostoucí koncentrací ciprofloxacinu dle Kirchhoff a spol.⁴⁶

Následující výsledky, uvedené v kapitole 5.4.1 až 5.4.4 ukazují závislosti a poměry klíčových pásů spektra pro jednotlivá antibiotika. Všechna uvedená spektra jsou průměrem dvaceti jednotlivých spekter. Nastavení mikrospektrometru je uvedeno v Tab. 2. Všechny označené píky byly identifikovány a jejich přehled je uveden v Tab. 3. Pík označený červenou hvězdičkou je pík normalizace. Píky označené černou hvězdičkou jsou použity pro další analýzu.

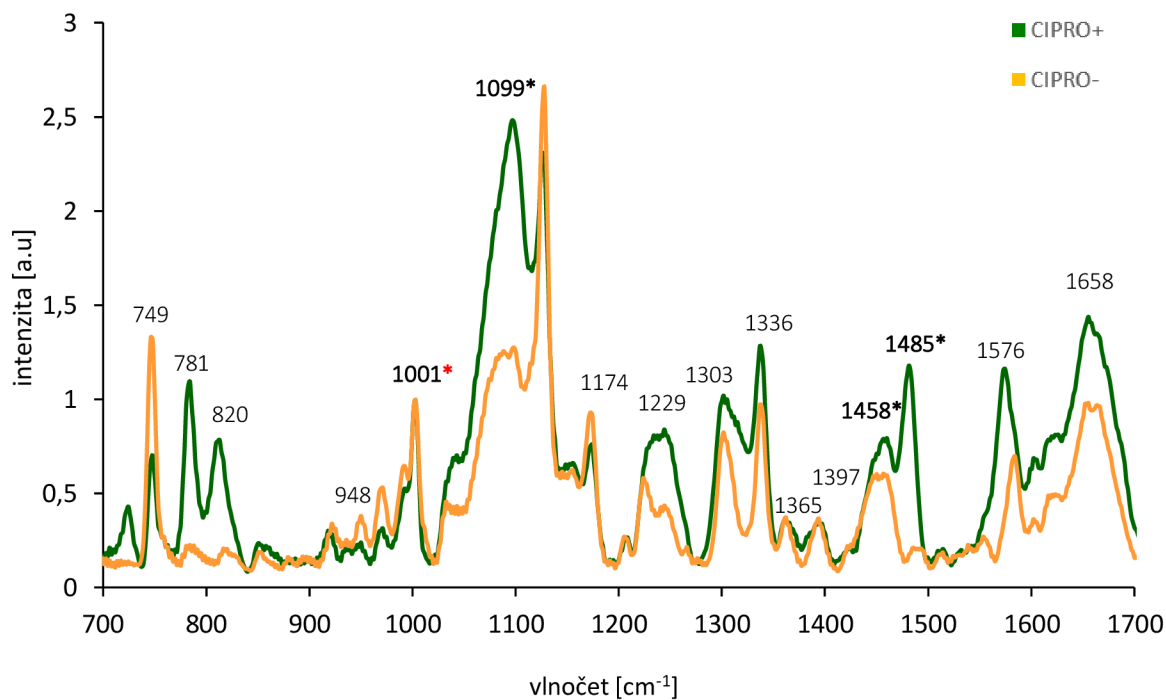
Tab. 2: Nastavení mikrospektrometru

střed spektra	$1\,200\text{ cm}^{-1}$
vlnová délka excitačního záření	532 nm
počet akumulací	30
Čas integrace	1 s

5.4.1 Ramanova spektra buněk *E. coli* 785 v přítomnosti ciprofloxacinu

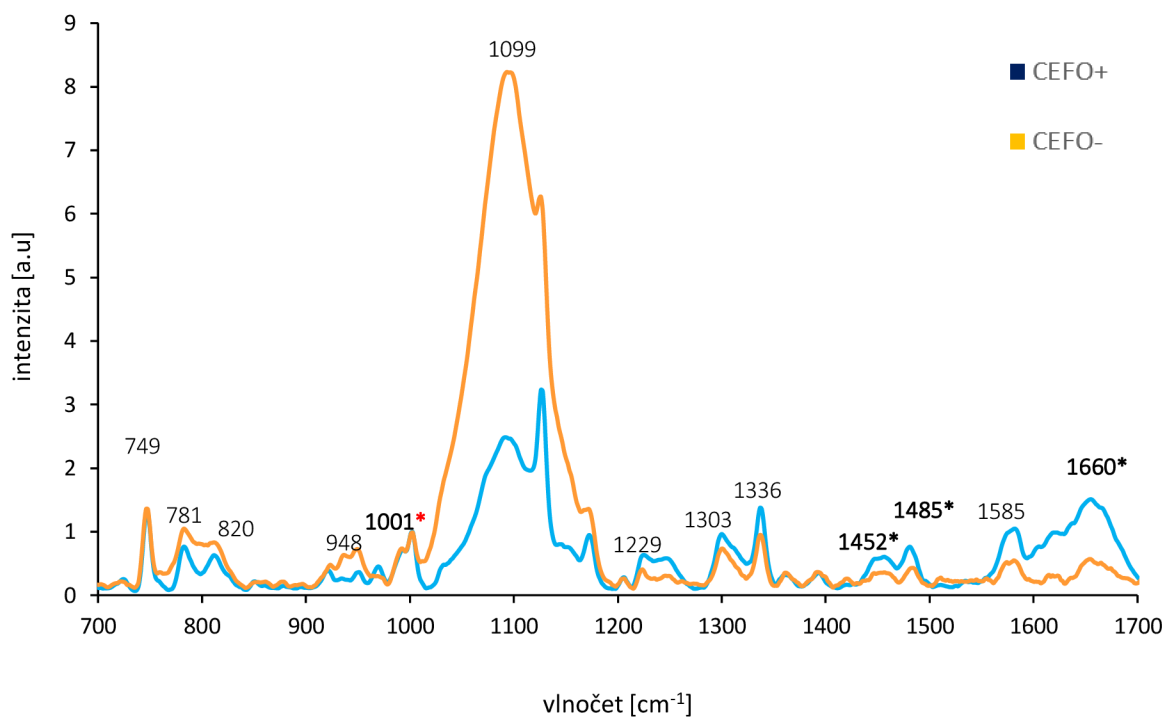


Obr. 25: Průměrné Ramanovo spektrum opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) ciprofloxacinu (n=20).

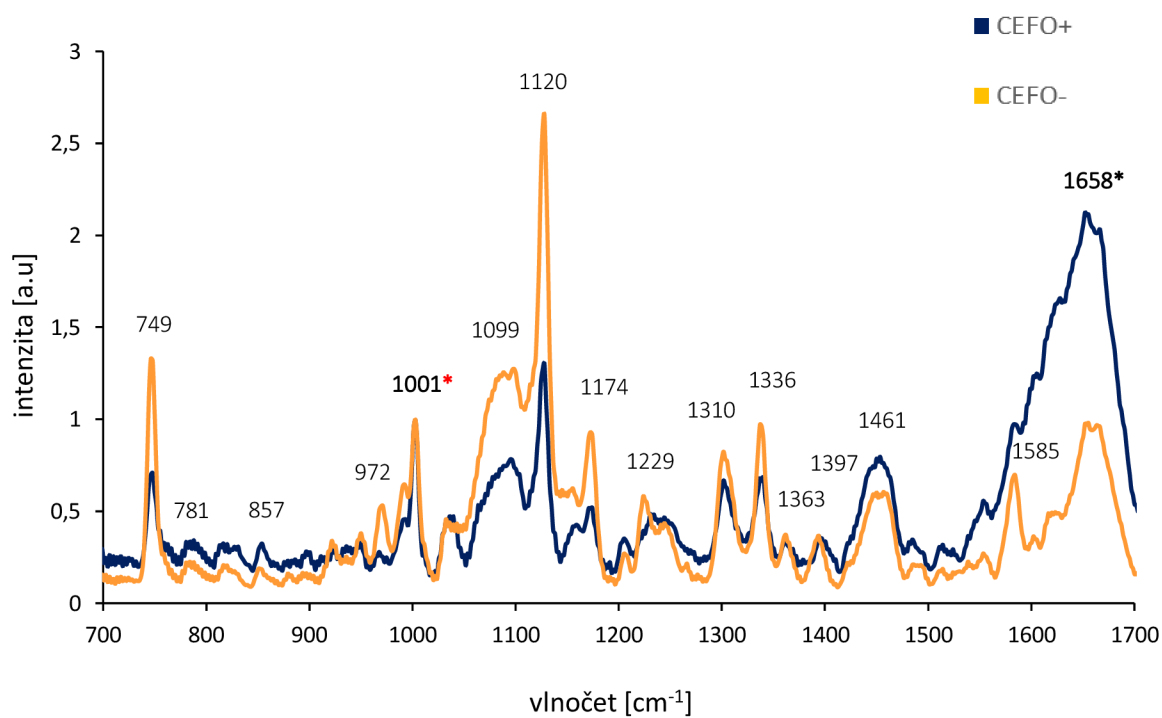


Obr.26: Průměrné Ramanovo spektrum opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) ciprofloxacinu (n=20)

5.4.2 Ramanova spektra buněk *E. coli* 785 v přítomnosti cefotaximu

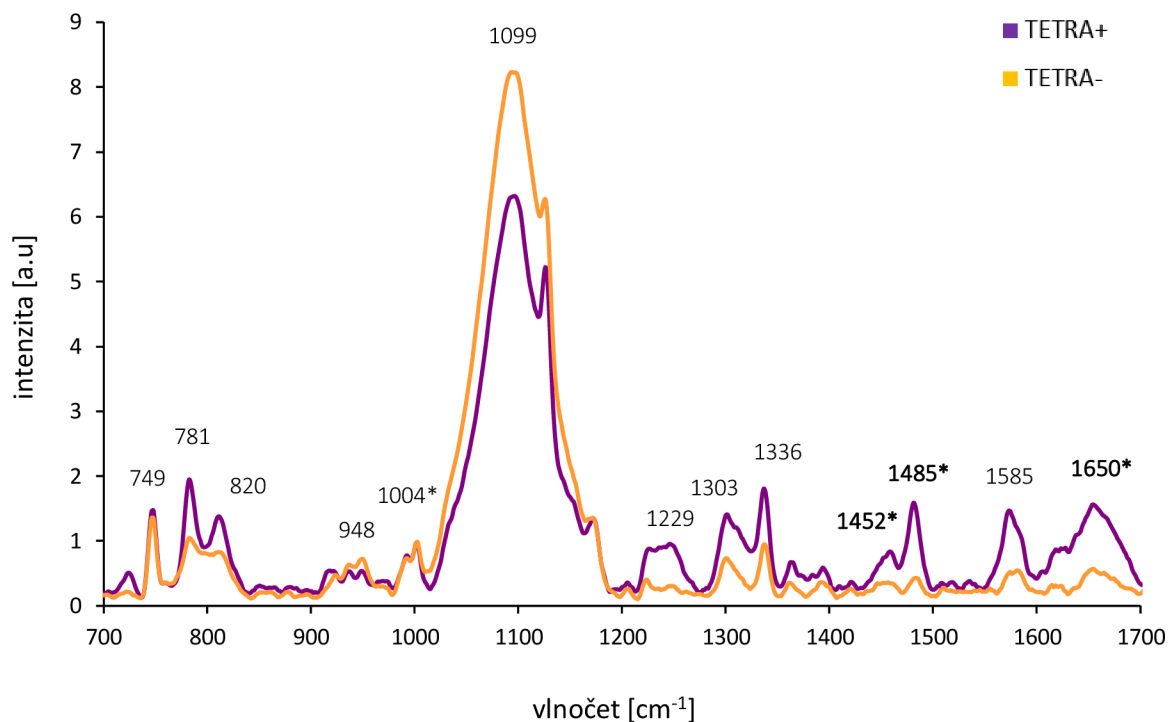


Obr. 27: Průměrné Ramanovo spektrum opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) cefotaximu (n=20)

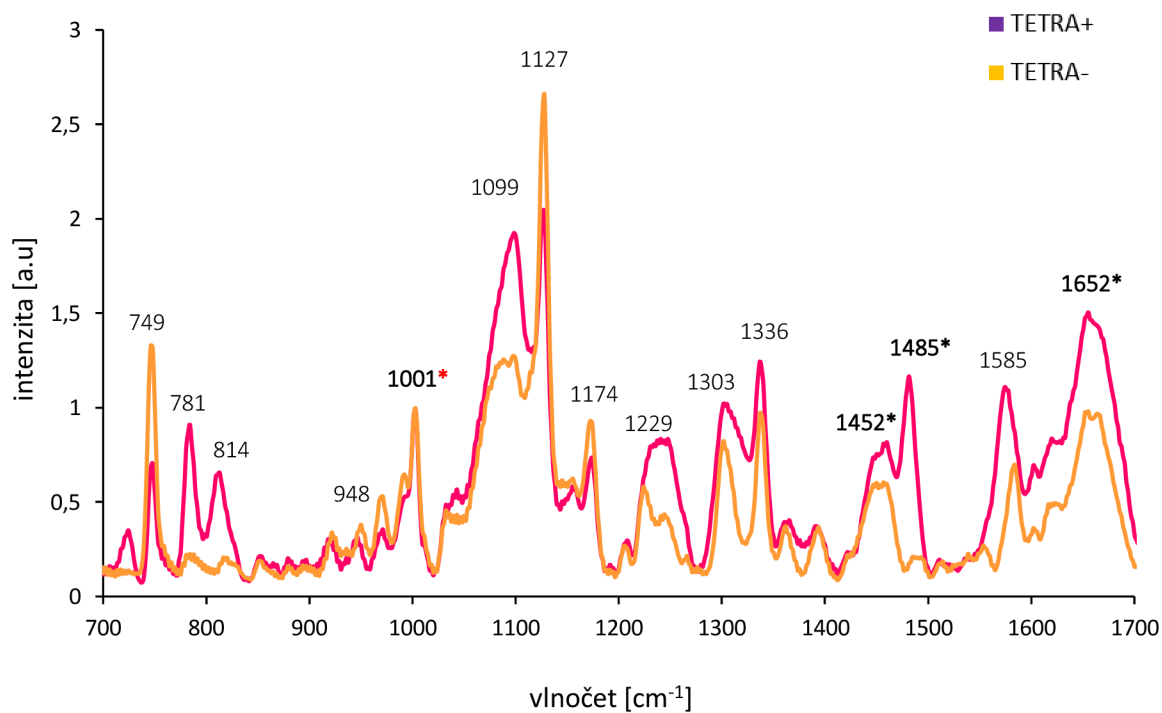


Obr. 28: Průměrné Ramanovo spektrum opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) cefotaximu (n=20)

5.4.3 Ramanova spektra buněk *E. coli* 785 v přítomnosti tetracyklinu



Obr. 29: Průměrné Ramanovo spektrum opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) tetracyklinu (n=20)

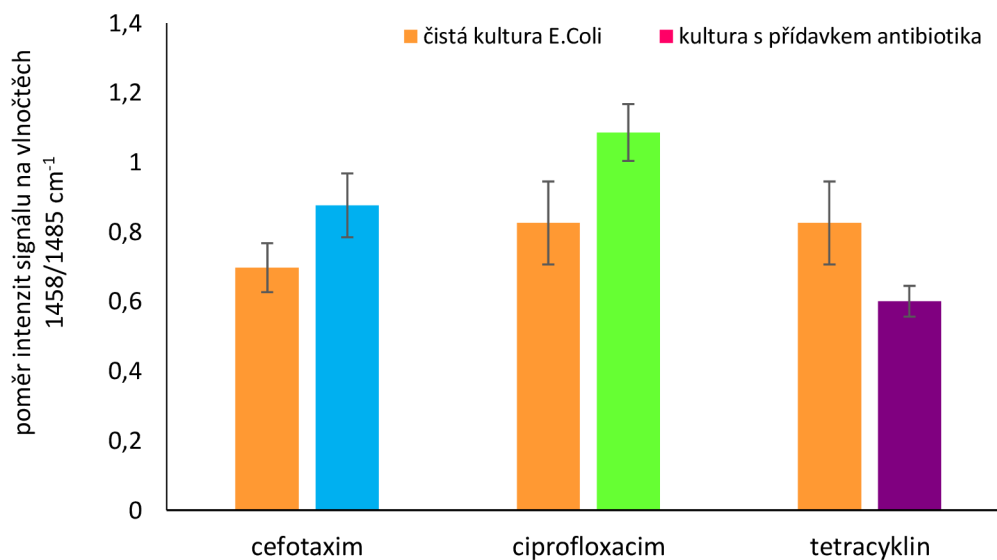


Obr. 30: Průměrné Ramanovo spektrum opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) tetracyklinu (n=20)

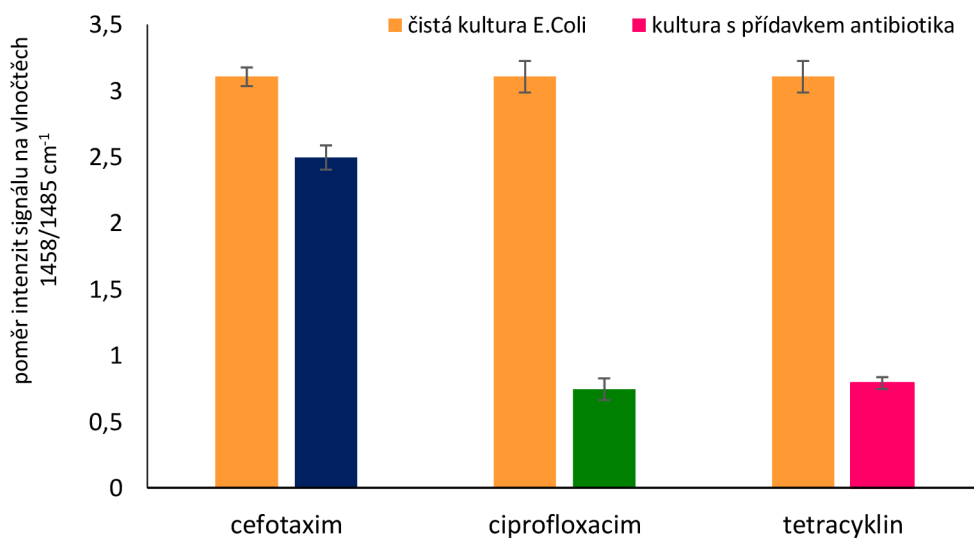
Tab. 3: Píky v Ramanově spektru *E. coli* a jejich identifikace^{17, 49, 50}

Vlnočet dle literatury [cm⁻¹]	Naměřený vlnočet [cm⁻¹]	Charakteristická vibrace
728	749	tryptofan
783	781	nukleové kyseliny (C, T)
857	857	tyrosin
961	972	C–C, C–N–N
1 001	1 001	fenylalanin
1 095	1 099	DNA:OPO ⁻
1 126	1 120	C–N
1170	1 174	C–H ₂ , lipidy
1 257	1 229	Amid III
1 340	1 336	nukleové kyseliny
1 360	1 363	tryptofan
1 453	1 461	C–H ₂ , lipidy
1 582	1 585	nukleové kyseliny
1 660	1 658	Amid I

5.4.4 Porovnání poměru intenzit na vlnočtech 1 458 cm⁻¹ a 1 485 cm⁻¹



Obr. 31: Poměry Ramanových píků opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez přítomnosti antibiotika. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.



Obr. 32: Poměry Ramanových píků opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez přítomnosti antibiotika. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

Z porovnání poměrů intenzit $I_{1458/1485}$ na obrázku Obr. 31 a Obr. 32 je patrné, že všechna antibiotika nevykazují stejný trend, jako uvádějí pro opticky nezachycené vzorky buněk ovlivněné ciprofloxacinem Kirchhoff a spol.⁴⁶ a cefotaximem Pilát a spol.¹⁷. Podařilo se ověřit výsledky původních autorů, kdy u vzorků s přidaným ciprofloxacinem i cefotaximem byl pozorován shodně rostoucí trend v poměru intenzit $I_{1458/1485}$, což odpovídá výsledkům původních autorů. U tetracyklinu byl navzdory očekávání pozorován trend opačný.

Nabízí se zde několik vysvětlení – použitá kultura kmene *E. coli* 785 mohla být již na začátku experimentu vůči tetracyklinovým antibiotikům rezistentní a tento fakt by významně přispěl k ovlivnění výsledného spektra. Změna ve spektrální odezvě bakteriálního vzorku může být způsobena také použitým mírně odlišného typu buněk, než který použili autoři původní studie a tyto buňky mohou reagovat na antibiotický stres jiným způsobem, což v závěru svého pozorování připouští i Kirchhoff a spol.⁴⁶. Navíc lze předpokládat, že změna spektrální odezvy je částečně způsobena také odlišným mechanismem účinku tetracyklinových antibiotik, jak je popsáno v kapitole 2.7.3. Dalším možným vysvětlením změn ve spektrech je, že antibiotikum samotné, navázané v buňkách bakterií má intenzivní ramanovskou odezvu a z tohoto důvodu se signály ve spektru překrývají právě v oblasti, která je předmětem analýzy.

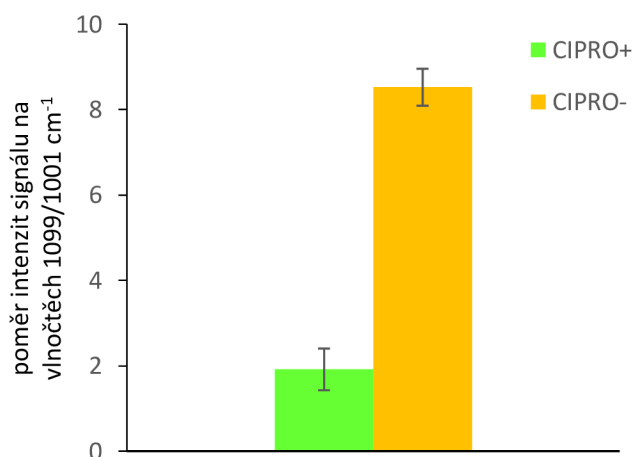
Spektra a výsledky získané měřením pomocí systému LTRS jsou pravděpodobně ovlivněna přímo optickou mikromanipulací – buďto tepelným efektem nebo fotochemicky. Tetracyklin při měření LTRS jako jediný vykazuje stejný trend, tak jako při měření bez pinzety, což může souviset s jeho chemickou strukturou či módem účinku.

Poměr ramanovských intenzit $I_{1458/1485}$ pro kultury bez antibiotika byl v rámci experimentálních setů vyrovnaný, ovšem v setu zachycených buněk se pohyboval kolem 3 a u nezachycených buněk byl asi 0,8. V následujících experimentech by bylo vhodné zahrnout nezachycené kontroly do měření zachycených buněk, aby bylo možné odlišit, zda má samotné optické zachycení vliv na poměr $I_{1458/1485}$, nebo zda šlo o variaci ve vlastnostech vstupního vzorku *E. coli*. Výsledky měření vykazují statisticky významné rozdíly, které mají poměrně vysokou spolehlivost okolo 2σ . V podmínkách podobných uspořádání použitému v Kirchhoff a spol. (bez optické pinzety) se podařilo potvrdit výsledky uvedené v tomto článku a ověřit jejich platnost pro druhé antibiotikum (Cefotaxim), což bylo poprvé zmíněno v článku Pilát a spol. 2018. V ostatních experimentálních podmínkách se však výsledné poměry $I_{1458/1485}$ významně lišily.

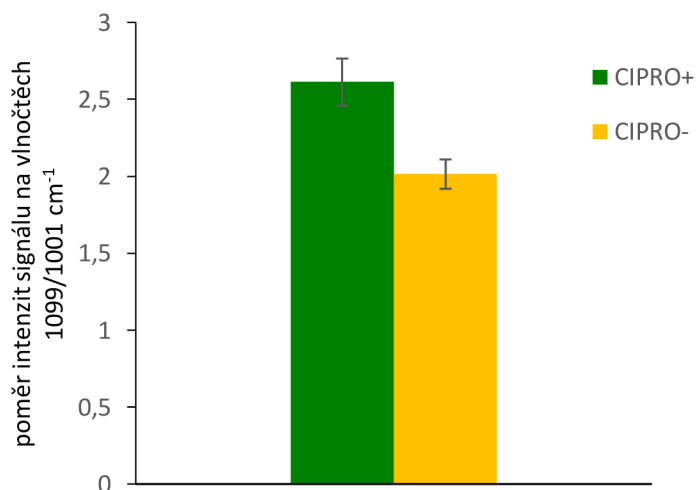
5.4.5 Poměry intenzit píků charakteristických pro působení jednotlivých antibiotik

Byly stanoveny také poměry intenzit píků charakteristických pro oblast působení jednotlivých antibiotik. Pro ciprofloxacin se jedná o poměr intenzit $I_{1001/1099}$, jelikož jde o antibiotikum, které svým mechanismem působení vede k zábraně replikace bakteriálního chromozomu tím, že narušuje prostorovou strukturalizaci DNA.

Výsledky měření v opticky nezachycených buňkách potvrzují tento mechanismus (viz Obr. 33, kdy u buněk s přidavkem antibiotika dochází ke značnému poklesu intenzity na vlnočtu 1099 cm^{-1} , což je vlnočet spojovaný s fosfodiesterovou vazbou DNA. Opticky zachycený vzorek však vykazuje opačnou tendenci.

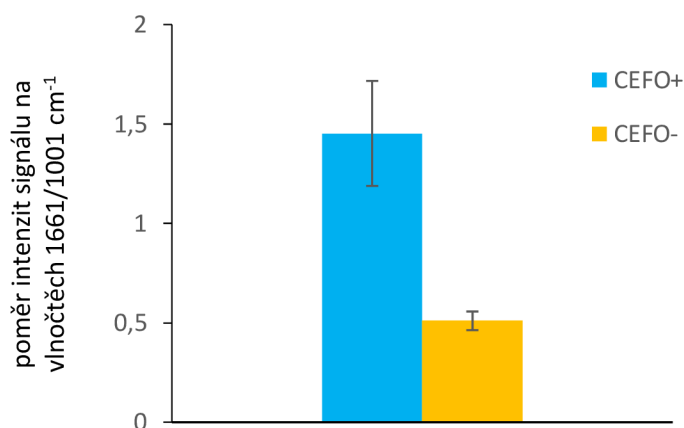


Obr. 33: Poměr Ramanových píků opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) ciprofloxacinu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

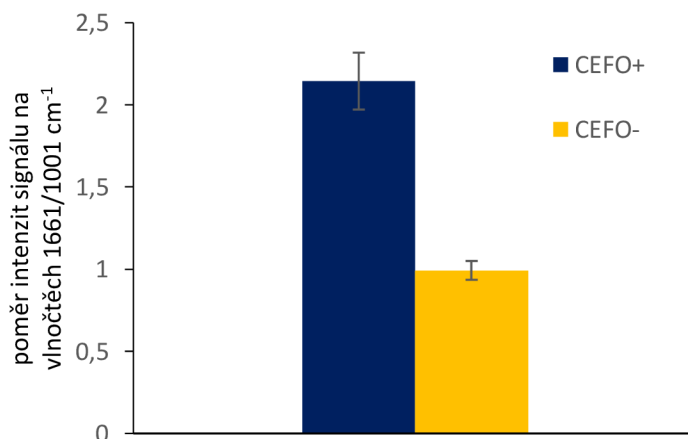


Obr. 34: Poměr Ramanových píků opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) ciprofloxacinu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

Pro cefotaxim byl zvolen poměr intenzit $I_{1001/1661}$, jelikož jde o antibiotikum, které svým mechanismem působení brání vytvoření trojrozměrné struktury buněčné stěny. Po přidání antibiotik by proto mělo dojít ke snížení intenzity na vlnočet 1661 cm^{-1} , který odpovídá amidu I. Tento předpoklad se však nepotvrzuje ve vzorku opticky nezachyceném ani opticky zachyceném (viz Obr. 35 a Obr. 36). Je pravděpodobné, že vlnočet 1661 cm^{-1} zahrnuje i signál dalších proteinů mimo buněčnou stěnu a jelikož působení antibiotika neovlivňuje proteosyntézu jako celek, výsledný poměr zvolených píků změnám způsobeným antibiotikem neodpovídá. Původně bylo na základě literatury⁴⁹ předpokládáno, že signál neporušené buněčné stěny vs. narušené struktury bude odlišný, toto se však experimentálně nepotvrdilo.

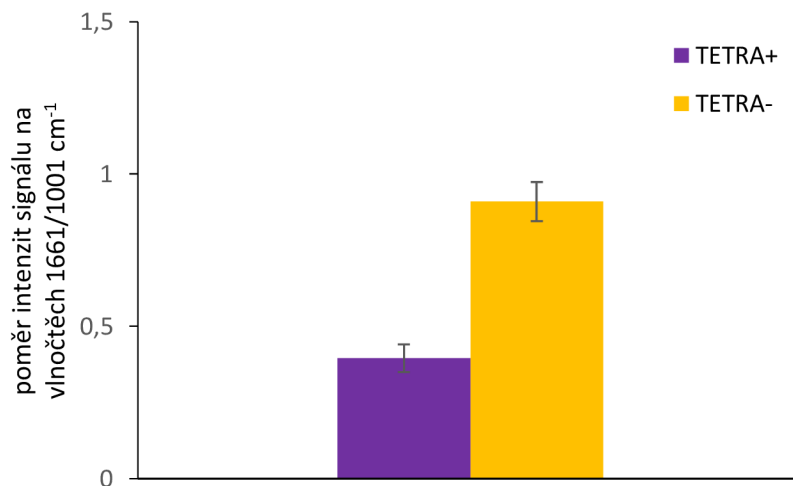


Obr. 35: Poměr Ramanových píků opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) přítomnosti cefotaximu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

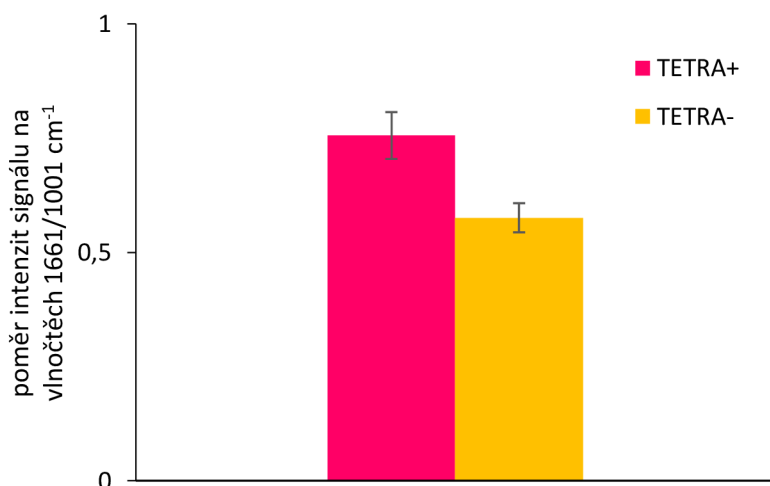


Obr. 36: Poměr Ramanových píků opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) cefotaximu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

Pro tetracyklin byl zvolen poměr intenzit $I_{1001/1225}$, protože mechanismem působení je inhibice proteosyntézy. Po přidání antibiotik by proto mělo dojít ke snížení intenzity na vlnočtu 1225 cm^{-1} , který odpovídá vibraci amidické vazby (amidu III), ve srovnání s vlnočtem 1001 cm^{-1} , odpovídající vibraci benzenového jádra v aminokyselině fenylalaninu. Výsledky měření v opticky nezachycených buňkách potvrzují tento předpoklad (viz. Obr.37), kdy u buněk s přidavkem antibiotika dochází ke značnému poklesu intenzity. Opticky zachycené buňky spolehlivě vykazují opačný trend.



Obr. 37: Poměr Ramanových píků opticky nezachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) tetracyklinu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.



Obr. 38: Poměr Ramanových píků opticky zachycených buněk *E. coli* 785 v přítomnosti a bez (+/-) tetracyklinu. Chybová úsečka reprezentuje 2SD.

Výsledky stanovení poměru intenzit píků charakteristických pro působení jednotlivých antibiotik byly porovnány také s článkem *Evaluation of Escherichia coli Cell Response to Antibiotic Treatment by Use of Raman Spectroscopy with Laser Tweezers*⁵¹. Autoři zde při detekci reakce buněk *E. coli* na penicilin G–streptomycin a cefazolin odhalili časově a koncentračně závislé změny intenzit ramanovských píků na vlnočtech 729, 1 245 a 1 660 cm^{-1} . Při detekci reakce buněk na cefazolin se tyto změny projevíly pouze na vlnočtech 729 a 1 245 cm^{-1} . Pro měření spekter byl použit laser o vlnové délce $\lambda = 785 \text{ nm}$ a výkon laseru optické pasti byl nastaven na 28 mW.

Při porovnání s výsledky získanými v této diplomové práci lze konstatovat, že ve shodě s autory byl nalezen stejný trend v oblasti působení tetracyklinu (1 225 cm^{-1}), kde ve vzorku s přidaným antibiotikem také došlo k poklesu intenzity (autoři použili penicilin G–streptomycin a cefazolin a pozorovali pokles intenzity oproti vzorku bez antibiotika). Trend zde byl ovšem nalezen shodně pouze u vzorku opticky nezachycených buněk, kdežto autoři prováděli pouze experimenty s optickou pinzetou.

V oblasti působení cefotaximu (1 660 cm^{-1}) byl také nalezen shodný trend, po přidání antibiotik došlo k nárůstu intenzity ve sledované oblasti (autoři tento trend pozorovali pro penicilin G–streptomycin, u cefazolinu jej nenalezli). V této práci byl popsán trend u vzorků s cefotaximem nalezen shodně jak u vzorku opticky nezachycených buněk, tak u vzorku buněk zachycených. Je namístě podotknout, že cefotaxim, stejně jako penicilin G a cefazolin patří do skupiny betalaktamových antibiotik, což naznačuje, že by tato oblast mohla být signifikantní pro detekci účinnosti právě této skupiny antibiotik.

6 ZÁVĚR

Byla vyrobena mikrofluidní zařízení navržená a vhodná speciálně pro kultivaci, pozorování a mikromanipulaci a analýzu buněk. Ještě před samotným použitím byl skleněný povrch kanálků v hotových mikrofluidních čípech opracován pomocí trichloroktadecylsilanu, aby bylo dosaženo vyšší míry přilnavosti buněk k povrchu skla. Tato metoda úpravy povrchu byla vyhodnocena jako vhodná k dalšímu použití, zvláště pro pozorování tvorby bakteriálního biofilmu. Vyhodnocení experimentu ukázalo, že dochází k násobně vyšší přilnavosti buněk než při použití čipů s neopracovaným povrchem.

Byla ověřena funkčnost manipulace buněk pomocí optické pinzety a stanovena optimální optická hustota použité buněčné kultury. Pro ověření rychlosti difuze kapalin v mikrofluidním čipu byl proveden experiment s obarveným CASO médiem. Rychlost difuze byla naměřena 78 s.

Dále bylo provedeno stanovení optimální hloubky zaostření laserového svazku pro měření Ramanovy spektroskopie buněk v mikrofluidních systémech ze skla a PDMS. Bylo zjištěno, že optimální hloubka zaostření se pohybuje mezi 5–15 μm výšky kanálku, kde byl pozorován dostatečně intenzivní signál buněk a zároveň menší vliv signálu ze samotného PDMS.

Připravené vzorky buněk *E. coli* 785 byly kultivovány se třemi vybranými druhy antibiotik (ciprofloxacin, cefotaxim, tetracyklin) a následně byla provedena spektrální analýza za použití Ramanova mikrospektrometru a LTRS. Na základě literární rešerše byl proveden soubor experimentů k optimalizaci mikromanipulace, pozorování a měření Ramanových spekter modelového mikroorganismu a dále byl zhodnocen vliv zvolených antibiotik dle mikrospektroskopických měření.

Podařilo se potvrdit dříve publikované výsledky autorů Kirchoff a spol⁴⁶., kde byly shodně s původními autory pozorovány signifikantní rozdíly v poměrech intenzit píků $I_{1458/1485}$ při Ramanově spektroskopii buněk ovlivněných ciprofloxacinem a cefotaximem. U tetracyklinu se tento trend nepotvrdil, a naopak byl stanoven obrácený poměr intenzit na zmíněných vlnótech.

Při porovnání další části výsledků s autory⁵¹, kteří stanovovali podobné ukazatele u antibiotik penicilin G–streptomycin a cefazolinu, byla nalezena částečná shoda v trendech u cefotaximu a tetracyklinu.

Při měření LTRS došlo k neočekávanému jevu, kdy byl opačný poměr intenzit píků $I_{1458/1485}$ nalezen u všech provedených měření. Vzhledem k extrémnímu posunu poměrů $I_{1458/1485}$ mezi variantami s optickým chytáním a bez chytání (bez ohledu na přítomnost antibiotika) je představitelné, že bude mít použitý výkon v optické pasti tak zásadní vliv na výsledný poměr $I_{1458/1485}$, že použití optické pinzety pro tato měření nebude možné. Jasně tím však v takovém případě identifikujeme spektrální charakteristiku, která se během optického zachytávání výrazně mění. V takovém případě bude zásadní dalšími experimenty

zjistit, zda nedochází k poškození buněk, jaký chemický proces spektrální změně odpovídá a jestli existuje možnost buňky zachytit pod limitem poškození.

K objasnění konkrétních souvislostí mezi změnami v poměru $I_{1458/1485}$, druhem antibiotika a použitím optické pasti by bylo v rámci dalšího zkoumání žádoucí provést měření Ramanových spekter s různými koncentracemi antibiotika (i bez antibiotika) a s různými intenzitami optické pasti. Tyto experimenty mohou rozlišit, jak ovlivní poměry ramanovského signálu optické zachytávání, a za jakých podmínek lze tento vliv efektivně potlačit a dále využívat výhod měření v optické pasti. Dalším krokem bude také zjistit, jak konkrétně se fyzikální a molekulární mechanismy na změnách ve spektru podílejí.

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny: podařilo se realizovat užitečné povrchové úpravy mikrofluidních čipů, v mikrofluidních systémech se zdařila měření difuze, optická mikromanipulace buněk a měření Ramanových spekter bakterií. Taktéž se povedlo nezávisle potvrdit výsledky měření Ramanovy spektroskopie bakterií ovlivněných antibiotiky z několika zdrojů a doplnit tato měření o další překvapivé závěry, které mohou výrazně ovlivnit náhled na použití LTRS v analýze interakce bakterie – antibiotikum. Výsledky obsažené v této práci budou dále rozvíjeny a budou stát v základech dalšího výzkumu Ramanovy spektroskopie, mikrofluidních technologií a dalších optofluidních technik s uplatněním v analýze jednotlivých buněk, ve farmakologii a v medicíně.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Raman, C. V., A new radiation. *Indian Journal of physics* **1928**, 2, 387-398.
2. Dent, G.; Smith, G., *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Wiley: 2005.
3. Kobayashi-Kirschvink, K. J.; Nakaoka, H.; Kamen, K. F.; Oda, A.; Noshio, K.; Fukushima, H.; Kanasaki, Y.; Yajima, S.; Masaki, H.; Ohta, K.; Wakamoto, Y., Non-Destructive Prediction of Transcriptomes from Single-Cell Raman Microscopy. *Biophysical Journal* **2018**, 114 (3), 390A-390A.
4. Weber, A., *Raman spectroscopy of gases and liquids*. Springer Science & Business Media: 2012; Vol. 11.
5. Korepanov, V.; Yu, C. C.; Hamaguchi, H. O., Hyper-Raman investigation of intermolecular vibrations of water and ice. *Journal of Raman Spectroscopy* **2018**, 49 (11), 1742-1746.
6. Pappu, R.; Prakasarao, A.; Dornadula, K.; Singaravelu, G. In *Raman spectroscopic characterization of urine of normal and cervical cancer subjects*, Conference on Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic and Surgical Guidance Systems XV, San Francisco, CA, Jan 29-31; Spie-Int Soc Optical Engineering: San Francisco, CA, 2017.
7. Eberhardt, K.; Stiebing, C.; Matthaus, C.; Schmitt, M.; Popp, J., Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2015**, 15 (6), 773-787.
8. Pilat, Z.; Kizovsky, M.; Jezek, J.; Kratky, S.; Sobota, J.; Siler, M.; Samek, O.; Buryska, T.; Vanacek, P.; Damborsky, J.; Prokop, Z.; Zemanek, P., Detection of Chloroalkanes by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Microfluidic Chips. *Sensors* **2018**, 18 (10), 18.
9. HORIBA Raman academy. <http://www.horiba.com/fr/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-tutorial/the-theory-of-raman-spectroscopy/> (accessed 01.12).
10. Polák, R.; Zahradník, R., *Kvantová chemie*. STNL: Praha, 1988.
11. Nanophoton What is Raman spectroscopy? . <https://www.nanophoton.net/raman/raman-spectroscopy.html> (accessed 30.11.2018).
12. Amer, M., *Raman spectroscopy for soft matter applications*. John Wiley & Sons: 2009.
13. Lebedev, P., Experimental examination of light pressure. *Nuovo Cimento* **1883**, 15 (195), 195.
14. Won, R.; Ashkin, A., How it all began. *Nature Photonics* **2011**, 5 (6), 316-317.
15. Ashkin, A., A personal perspective by Arthur Ashkin. *Laser & Photonics Reviews* **2011**, 5 (1), A7-A8.
16. Pilat, Z.; Jonas, A.; Jezek, J.; Zemanek, P., Effects of Infrared Optical Trapping on *Saccharomyces cerevisiae* in a Microfluidic System. *Sensors* **2017**, 17 (11), 12.
17. Pilat, Z.; Bernatova, S.; Jezek, J.; Kirchhoff, J.; Tannert, A.; Neugebauer, U.; Samek, O.; Zemanek, P., Microfluidic Cultivation and Laser Tweezers Raman Spectroscopy of E-coli under Antibiotic Stress. *Sensors* **2018**, 18 (5), 14.
18. Ashkin, A., Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Methods in Cell Biology*, Vol 55 **1998**, 55, 1-27.
19. Ashkin, A., History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *Ieee Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **2000**, 6 (6), 841-856.
20. Ashkin, A.; Dziedzic, J. M., OPTICAL LEVITATION IN HIGH-VACUUM. *Applied Physics Letters* **1976**, 28 (6), 333-335.
21. JEŽEK, J. Vícenásobná optická

pinzeta a optický skalpel. VUT, Brno, 2004.

22. Ashkin, A., TRAPPING OF ATOMS BY RESONANCE RADIATION PRESSURE. *Physical Review Letters* **1978**, *40* (12), 729-732.
23. Ashkin, A.; Dziedzic, J. M.; Bjorkholm, J. E.; Chu, S., OBSERVATION OF A SINGLE-BEAM GRADIENT FORCE OPTICAL TRAP FOR DIELECTRIC PARTICLES. *Optics Letters* **1986**, *11* (5), 288-290.
24. Ashkin, A.; Dziedzic, J. M., OPTICAL TRAPPING AND MANIPULATION OF VIRUSES AND BACTERIA. *Science* **1987**, *235* (4795), 1517-1520.
25. Ashkin, A.; Dziedzic, J. M.; Yamane, T., OPTICAL TRAPPING AND MANIPULATION OF SINGLE CELLS USING INFRARED-LASER BEAMS. *Nature* **1987**, *330* (6150), 769-771.
26. Psaltis, D.; Quake, S. R.; Yang, C. H., Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 381-386.
27. Pilat, Z. Optické mikromanipulační techniky kombinované s mikrospektroskopickými metodami. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Brno, 2014.
28. Chaumet, P. C.; Nieto-Vesperinas, M., Time-averaged total force on a dipolar sphere in an electromagnetic field. *Optics Letters* **2000**, *25* (15), 1065-1067.
29. Harada, Y.; Asakura, T., Radiation forces on a dielectric sphere in the Rayleigh scattering regime. *Optics Communications* **1996**, *124* (5-6), 529-541.
30. Svoboda, K.; Block, S. M., BIOLOGICAL APPLICATIONS OF OPTICAL FORCES. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **1994**, *23*, 247-285.
31. Faustino, V.; Catarino, S. O.; Lima, R.; Minas, G., Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. *Journal of Biomechanics* **2016**, *49* (11), 2280-2292.
32. Jafek, A. R.; Harbertson, S.; Brady, H.; Samuel, R.; Gale, B. K., Instrumentation for xPCR Incorporating qPCR and HRMA. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (12), 7190-7196.
33. Safdar, M.; Janis, J.; Sanchez, S., Microfluidic fuel cells for energy generation. *Lab on a Chip* **2016**, *16* (15), 2754-2758.
34. Son, J.; Samuel, R.; Gale, B. K.; Carrell, D. T.; Hotaling, J. M., Separation of sperm cells from samples containing high concentrations of white blood cells using a spiral channel. *Biomicrofluidics* **2017**, *11* (5).
35. Guo, M. T.; Rotem, A.; Heyman, J. A.; Weitz, D. A., Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a Chip* **2012**, *12* (12), 2146-2155.
36. DeFranco, J. A.; Schmidt, B. S.; Lipson, M.; Malliaras, G. G., Photolithographic patterning of organic electronic materials. *Organic Electronics* **2006**, *7* (1), 22-28.
37. Team, E. HOW TO DO AN EPOXY SU-8 MOLD?
<https://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/soft-lithography-reviews-and-tutorials/introduction-in-soft-lithography/su-8-mold-lithography/> (accessed 20.02.).
38. Weibel, D. B.; DiLuzio, W. R.; Whitesides, G. M., Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology* **2007**, *5* (3), 209-218.
39. Weerakoon-Ratnayake, K. M.; O'Neil, C. E.; Uba, F. I.; Soper, S. A., Thermoplastic nanofluidic devices for biomedical applications. *Lab on a Chip* **2017**, *17* (3), 362-381.
40. Rosypal, S., *Nový přehled biologie*. Scientia: 2003.
41. Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A., *Medical microbiology*. Elsevier Health Sciences: 2015.
42. Vincent, J. L.; Mongkolpun, W., Non-antibiotic therapies for sepsis: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2019**.
43. Suberviola, B.; Marquez-Lopez, A.; Castellanos-Ortega, A.; Fernandez-Mazarrasa, C.; Santibanez, M.; Martinez, L. M., MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF SEPSIS:

POLYMERASE CHAIN REACTION SYSTEM VERSUS BLOOD CULTURES. *American Journal of Critical Care* **2016**, 25 (1), 68-75.

44. Lincová, D.; Farghali, H., ZÁKLADNÍ A APLIKOVANÁ FARMAKOLOGIE Druhé, doplněné a přepracované vydání.

45. van Belkum, A.; Dunne, W. M., Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology* **2013**, 51 (7), 2018-2024.

46. Kirchhoff, J.; Glaser, U.; Bohnert, J. r. A.; Pletz, M. W.; Popp, J. r.; Neugebauer, U., Simple ciprofloxacin resistance test and determination of minimal inhibitory concentration within 2 h using Raman spectroscopy. *Analytical chemistry* **2018**, 90 (3), 1811-1818.

47. Ong, Y. L.; Razatos, A.; Georgiou, G.; Sharma, M. M., Adhesion forces between E-coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* **1999**, 15 (8), 2719-2725.

48. Brandt, N. N.; Brovko, O. O.; Chikishev, A. Y.; Paraschuk, O. D., Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Subtraction. *Applied Spectroscopy* **2006**, 60 (3), 288-293.

49. Cai, D. K.; Neyer, A.; Kuckuk, R.; Heise, H. M., Raman, mid-infrared, near-infrared and ultraviolet-visible spectroscopy of PDMS silicone rubber for characterization of polymer optical waveguide materials. *Journal of Molecular Structure* **2010**, 976 (1-3), 274-281.

50. Chan, J. W.; Winhold, H.; Corzett, M. H.; Ulloa, J. M.; Cosman, M.; Balhorn, R.; Huser, T., Monitoring dynamic protein expression in living E-coli. Bacterial Cells by laser tweezers raman spectroscopy. *Cytometry Part A* **2007**, 71A (7), 468-474.

51. Moritz, T. J.; Polage, C. R.; Taylor, D. S.; Krol, D. M.; Lane, S. M.; Chan, J. W., Evaluation of Escherichia coli Cell Response to Antibiotic Treatment by Use of Raman Spectroscopy with Laser Tweezers. *Journal of Clinical Microbiology* **2010**, 48 (11), 4287-4290.

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

AST	antibiotic sensitivity testing (testování citlivosti na antibiotika)
BMD	mikrodiluční bujonová metoda
CASO	casein soya broth
CCD	charged couple device
DAA	diacetone alcohol
FACS	fluorescence activated cell sorting
He:Ne	helium neonový laser
LTRS	laser trapping Raman spectroscopy
MALDI–TOF	matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectroscopy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
Nd:Yag	laser s yttrium aluminium granátem dopovaným ionty neodymu
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDMS	polydimethylsiloxan
PGMEA	propylene glycol methyl ether acetate
RCF	rolling circle filter
SERS	surface enhanced Raman spectroscopy
SLM	spatial light modulator (modulátory prostorového světla)
SU–8	negativní fotorezist
pík	vrchol na křivce zaznamenávající určitý trend, někdy také spektrální pás apod.