

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Konfokální Ramanova mikroskopie buněk**

Diplomová práce

Autor: **Bc. Monika Harvanová**  
Studijní program: N1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: květen 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 24.4.2013

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu Mgr. Vlastimilovi Maškovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za cenné praktické rady, důvěru a vedení k samostatné práci. Poděkování také patří paní Janě Holinkové a paní Mgr. Janě Steigerové, Ph.D. z Ústavu molekulární patologie LF UPOL a paní Mgr. Soně Purové z Laboratoře experimentální medicíny za pomoc při kultivaci buněčných linií. Děkuji také panu RNDr. Bohumírovi Grúnerovi, CSc. z Ústavu anorganické chemie AV ČR za poskytnutí testovaných metalokarboranů. Ráda bych poděkovala i pracovníkům Ústavu farmakologie LF UPOL za všestrannou pomoc, kterou mi během řešení mé diplomové práce poskytovali. V neposlední řadě děkuji rodičům za podporu během celého mého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Monika Harvanová
Název práce	Konfokální Ramanova mikroskopie buněk
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav farmakologie lékařské fakulty Univerzity Palackého a Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Práce představuje metodu konfokální Ramanovy mikroskopie a možnost jejího využití pro zobrazení fixovaných buněk a vnitrobuněčného prostředí. Metoda je založená na identifikaci vlastních biochemických znaků biomolekul projevujících se v Ramanově spektru buňky, obchází tak nutnost jejich specifického značení. Práce zároveň představuje možnost aplikace metody pro zobrazení distribuce léčiva v buňce bez použití externího značení. Pro Ramanovo zobrazení buněk a některých buněčných kompartment byly experimenty provedeny na fixovaných buňkách buněčné linie MCF-7. Ramanovo zobrazení umožnilo identifikaci jádra a oblastí membránových organel v cytoplasmě. Zároveň jsou popsány některé specifické znaky těchto buněčných kompartment v Ramanově spektru buňky. Pro Ramanovo zobrazení distribuce léčiva v buňce byly buňky U2OS v růstovém médiu 1 h inkubovány s 300 <math>\mu</math>M roztoky jednotlivých potenciálních léčiv ze skupiny metalokarboranů a poté fixovány. Výsledky jsou zobrazením distribuce tří vybraných metalokarboranů ve vnitrobuněčném prostředí bez použití externího značení.</p>
Klíčová slova	konfokální Ramanova mikroskopie, Ramanovo zobrazení, distribuce léčiva
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Monika Harvanová
Title	Confocal Raman microscopy of cells
Type of thesis	Diplom
Department	Department of pharmacology, Faculty of medicine, Palacky University and Institute of molecular and translational medicine
Supervisor	Mgr.Vlastmil Mašek, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The aim of this study is to introduce confocal Raman microscopy as a potential method for imaging of fixed cells and intracellular environment. The method is based on the identification of specific biochemical features of biomolecules which are reflected in the Raman spectrum of the cell. In connection with this, Raman microscopy doesn't require any external labels. The work also introduces this method as a potential tool for studying of drug distribution in cell without using external labels. For Raman imaging of cells and some cellular compartments, fixed MCF-7 cells were used. Raman imaging allowed to visualize nuclei and membrane organelles regions in the cytoplasm. Some of the spectral features of these compartments in Raman spectrum is shown. For Raman imaging of drug distribution, U2OS cells were exposed to 300 <math>\mu</math>M solutions of selected metalocarboranes in growth medium for 1 h and then fixed. The results show distribution of three metalocarboranes in cell environment without using external label.</p>
Keywords	confocal Raman microscopy, Raman imaging, drug distribution
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

Cíle práce .....	- 8 -
Úvod.....	- 9 -
<i>Teoretická část</i> .....	- 10 -
1. Úvod do Ramanovy spektroskopie .....	- 10 -
1.1 Úvod.....	- 10 -
1.2 Ramanův rozptyl.....	- 10 -
1.3 Vibrace biomolekul.....	- 12 -
1.4 Ramanovo spektrum biomolekul .....	- 13 -
2. Konfokální Ramanova mikroskopie .....	- 15 -
2.1 Úvod.....	- 15 -
2.2 Princip metody konfokální Ramanovy mikroskopie.....	- 15 -
2.3 Konfokální Ramanův mikroskop .....	- 16 -
2.4 Zdroj excitační energie .....	- 19 -
2.5 Sběr Ramanova rozptylu.....	- 20 -
2.6 CCD detektor .....	- 21 -
3. Zpracování hyperspektrálních datových souborů .....	- 22 -
3.1 Tvorba obrazu .....	- 22 -
3.2 Univariační tvorba obrazu.....	- 23 -
3.3 Multivariační tvorba obrazu.....	- 25 -
3.3.1 Analýza hlavních komponent.....	- 25 -
3.3.2 Klastrová analýza.....	- 26 -
3.3.2.1 Hierarchická klastrová analýza .....	- 27 -
3.3.2.2 „ <i>k</i> -mean“ klastrová analýza .....	- 28 -
3.3.3 Další multivariační metody zobrazení .....	- 29 -
4. Aplikace metody Ramanovy mikroskopie v biologii a medicíně .....	- 31 -
4.1 Úvod.....	- 31 -
4.2 Biomedicínské aplikace metody Ramanovy mikroskopie .....	- 31 -
4.3 Výhody a možné komplikace metody Ramanovy mikroskopie .....	- 32 -

Seznam použité literatury .....	- 35 -
Seznam použitých zkratek .....	- 43 -

## Cíle práce

- Zpracovat literární rešerši na téma konfokální Ramanova mikroskopie, metody zpracování hyperspektrálních datových souborů a využití Ramanovy mikroskopie v biologii a medicíně
- Zavést metodiku měření Ramanových spekter fixovaných buněk na nově instalovaném konfokálním Ramanově mikroskopu CRM WiTec Alpha300 R+ a softwarového zpracování naměřených hyperspektrálních dat
- Optimalizovat podmínky pro zobrazení fixovaných buněk. Využít metodu konfokální Ramanovy mikroskopie k zobrazení fixované buňky a k vizualizaci některých buněčných kompartment
- Metodu konfokální Ramanovy mikroskopie využít k vizualizaci distribuce vybraného léčiva ve fixované buňce a představit tak možnost využití metody jako potenciálního nástroje studia distribuce exogenních látek v buňkách bez využití externího značení



## Úvod

Pro studium buněk a procesů na buněčné úrovni byly v několika posledních dekáдах využívány zejména techniky optické mikroskopie. Jejich rozvoj umožnilo především využití barviv a fluorescenčně nebo jinak značených protilátek k vizualizaci specifických buněčných organel. Tyto exogenní látky umožňují studium vnitrobuněčné struktury a biochemických změn na úrovni buněk, nicméně, mají omezenou životnost a jejich detekce ve studovaných buňkách je limitována.

Ramanova mikroskopie představuje perspektivní metodu pro sledování vnitrobuněčného prostředí živých nebo fixovaných buněk. Jednotlivé biochemické komponenty jsou charakterizovány přímo svými vibračními spektry, Ramanova mikroskopie tedy nevyžaduje jejich exogenní značení. Tímto způsobem mohou být studovány i různé buněčné procesy spojené s reorganizací vnitrobuněčné struktury, jako je např. buněčné dělení, apoptóza, transport léčiva a biochemické změny vyvolané jeho působením.

Cílem této diplomové práce je v teoretické části představit metodu konfokální Ramanovy mikroskopie a metody zpracování výsledků naměřených hyperspektrálních dat pro zobrazení buňky. Experimentální část představuje využití metody pro zobrazení fixovaných buněk a některých buněčných kompartment. Zároveň práce představuje možnost aplikace konfokální Ramanovy mikroskopie pro vizualizaci distribuce léčiva v buňce bez využití externího značení.

## *Teoretická část*

# 1. Úvod do Ramanovy spektroskopie

## 1.1 Úvod

Spektroskopické metody jsou založeny na studiu interakce elektromagnetického záření s molekulou. Pokud je energie záření rovna energetickému rozdílu mezi základním a excitovaným stavem molekuly, je foton elektromagnetického záření absorbován a molekula přechází do excitovaného stavu. Detekována je změna intenzity excitačního záření po jeho interakci s molekulou. Tímto jevem se zabývá metoda absorpční spektroskopie. Pokud ale energie excitačního záření není rovna rozdílu mezi základním a excitovaným stavem molekuly (např. pokud je vlnová délka záření ve viditelné oblasti), dochází více než k absorpci záření, k jeho rozptylu. Na tomto jevu je založena Ramanova spektroskopie (Smith & Dent, 2005).

Jev Ramanova rozptylu dopadajícího paprsku byl předpovězen v roce 1923 rakouským vědcem *Adolfem Smekalem*. Mezi léty 1925 až 1927 byl předmětem zájmu několika významných vědců, mezi jinými i *Heisenberga* či *Schrödingera*. Teprve v roce 1928 byl tento jev experimentálně prokázán indickým vědcem, sirem *Chandrasekhara Venkata Ramanem*, který spolu s *K.S. Krishnanem* poprvé pozorovali změny ve vlnové délce světla rozptýleného kapalinou (Raman & Krishnan, 1928). V roce 1930 byla siru Ramanovi za tento objev udělena Nobelova cena.

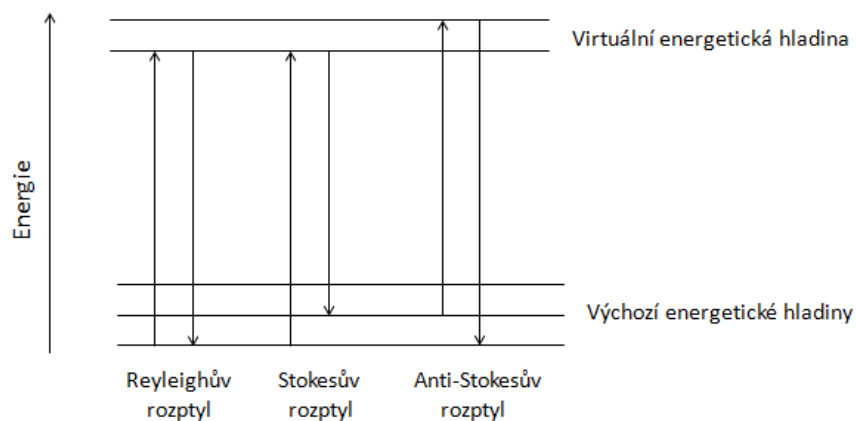
## 1.2 Ramanův rozptyl

Ramanův rozptyl je výsledkem neelastické srážky elektromagnetického záření s molekulou. Popis jevu Ramanova rozptylu je založen na indukci dipólového momentu v molekule působením oscilujícího elektrického pole excitačního záření. Indukovaný dipól je následně zdrojem rozptýleného záření. Indukovaný dipólový moment  $\mu_i$  je přímo úměrný intenzitě elektromagnetického pole  $E$ , a to podle vztahu

$$\mu_i = \alpha \cdot E,$$

kde koeficient  $\alpha$  je elektrická polarizovatelnost. Polarizovatelnost je fyzikálně spjata s mírou schopnosti elektrického pole změnit v molekule rozložení nábojů a vypovídá tedy o schopnosti elektrického pole indukovat v dané molekule dipólový moment (Dietzek et al., 2010).

Literatura často uvádí kvantově-mechanický popis Ramanova rozptylu, který zohledňuje vlnově-částicovou povahu fotonů elektromagnetického záření. Podle této teorie dochází při interakci fotonu s molekulou na extrémně krátký čas k excitaci molekuly do virtuálního energetického stavu, který je energeticky nižší než plně excitovaný stav molekuly. Tento stav odpovídá jiné *vibrační energetické hladině* molekuly. Poté se molekula vrací do základního elektronového stavu. Pokud je výchozí a koncová energetická hladina molekuly stejná, hovoříme o elastickém *Rayleighově rozptylu*. Je-li koncová energetická vibrační hladina molekuly jiná než výchozí hladina, vyzářený foton má jinou vlnovou délku jako excitační záření. V Ramanově spektru jsou rozlišovány *Stokesovy linie* odpovídající fotonům s nižší energií (větší vlnovou délkou) než excitační záření a *anti-Stokesovy linie*, odpovídající fotonům s vyšší energií (kratší vlnovou délkou) než excitační záření (obr. 1). Intenzita anti-Stokesových linií ve srovnání se Stokesovými je mnohem nižší. Pro vznik těchto linií je nutné, aby se molekula již na začátku děje nacházela ve vyšším vibračním energetickém stavu. Praxe se proto zabývá zejména studiem Stokesových linií (Smith & Dent, 2005).



**Obr.1** Schematické znázornění energie rozptýlených fotonů.

### 1.3 Vibrace biomolekul

Hovoříme-li o vibraci, jedná se o vibraci jader kolem rovnovážné polohy. *Valenčními vibracemi* (obr 2.) se nazývají změny mezijaderných vzdáleností a mohou být symetrické či antisymetrické. *Deformačními vibracemi* (obr. 3) se rozumí změny valenčních úhlů. Počet vibrací dané nelineární molekuly lze vypočítat podle vztahu

$$x = 3n - 6,$$

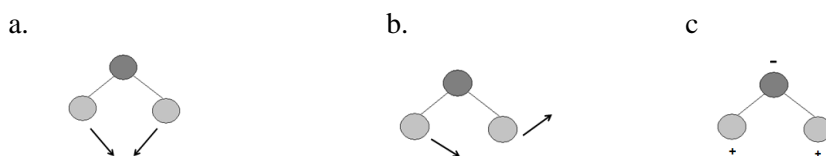
kde  $n$  je počet atomů molekuly. Pokud je molekula lineární, je počet vibrací řešen druhým vztahem

$$x = 3n - 5$$

Předmětem zájmu při studiu buněk jsou biomolekuly – lipidy, proteiny, nukleové kyseliny a sacharidy, které jsou komplexními molekulárními systémy složenými z mnoha atomů. Většina vibračních pásů v takovémto komplexu je úzce lokalizována a odpovídá vibraci relativně malé skupiny atomů, která je od ostatních částí daného komplexu izolována. Taková vibrace je označována jako *skupinová vibrace* a je charakterizována specifickým skupinovým vlnočtem. Každé skupině atomů jednoho typu, která se v rámci makromolekuly (např. nukleové kyseliny nebo proteinu) nachází v podobném prostředí, odpovídá skupinová vibrace s podobným vlnočtem. Odpovídající pásy v Ramanově spektru vznikají překrytím příspěvků všech těchto skupin s ekvivalentní strukturou prostředím (Smith & Dent, 2005).



**Obr. 2** Znárodnění valenčních vibrací molekul: a. symetrická, b. antisymetrická vibrace



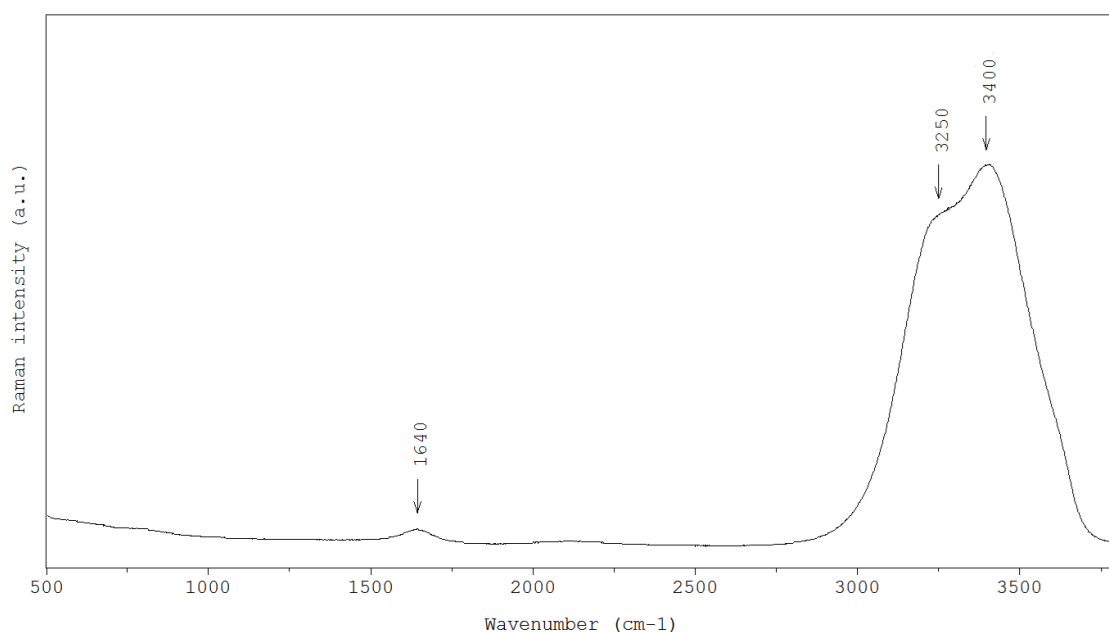
**Obr. 3** Znárodnění deformačních vibrací: a. nůžková, b. kývavá, c. vějířová deformace

## 1.4 Ramanovo spektrum biomolekul

Ramanovo spektrum je vibračním spektrem molekuly. Je vyjádřením intenzity rozptýlených fotonů na vlnové délce. Na obr. 4 je uveden příklad Ramanova spektra jednoduché molekuly, vody. V Ramanově spektru této tříatomové symetrické molekuly jsou viditelné tři vibrační pásy. Pás při  $1640\text{ cm}^{-1}$  odpovídá deformační vibraci, pásy při  $3250\text{ cm}^{-1}$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$  souvisí se symetrickými a antisymetrickými valenčními vibracemi molekuly.

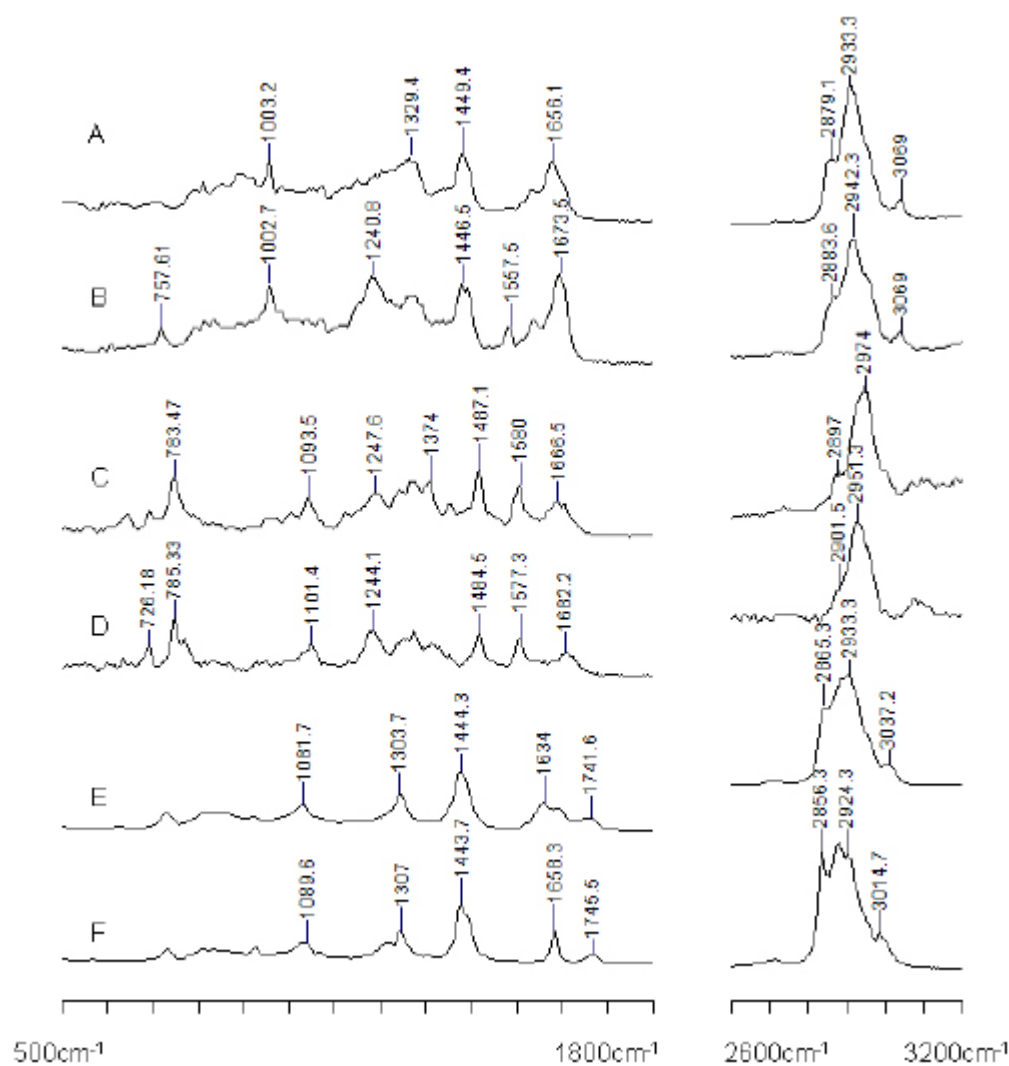
Ramanovo spektrum biomakromolekul je mnohem komplexnější. Jak již bylo uvedeno, spektrum biomakromolekuly je složeno z příspěvků všech skupinových vibrací ve složitém komplexu. Např. i pro molekulu DNA existuje  $3n-6$  normálních vibrací, ale ve skutečném Ramanově spektru DNA lze v intervalu  $\sim 600-1800\text{ cm}^{-1}$  rozeznat asi 30 skupinových vibrací, které souvisejí s vibracemi aromatických bází, cukerných zbytků a fosfátových skupin.

Na obr. 5 jsou znázorněna Ramanova spektra důležitých biomakromolekul podílejících se na stavbě buňky, a to proteinů, DNA, resp. RNA, fosfolipidu a vybraného lipidu.



**Obr. 4** Ramanovo spektrum vody. Pás při  $1640\text{ cm}^{-1}$  odpovídá deformační vibraci, pásy při  $3250\text{ cm}^{-1}$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$  souvisí se symetrickými a antisymetrickými valenčními vibracemi molekul vody.

Ramanovo spektrum buňky charakterizují stejné znaky jako Ramanovo spektrum biomolekul. Vibrační spektrum buňky je rovněž spektrem obsahujícím skupinové vibrace odpovídající vibračním vazeb v lipidech, fosfolipidech, nukleových kyselinách a proteinech podílejících se na kompozici buňky. Důležitá oblast Ramanova spektra buňky leží v rozmezí  $\sim 600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ . Tato oblast poskytuje nejkompexnější informaci o jejím molekulárním složení (Matthäus et al., 2008). Detailněji o Ramanově spektru buňky pojednává experimentální část této práce.



**Obr. 5** Ramanova spektra důležitých bunčných komponent: a. albuminu, typického proteinu v  $\alpha$ -konformaci, b.  $\gamma$ -globulinu, typického proteinu v  $\beta$ -konformaci, c. DNA, d. RNA, e. fosfatidyletanolaminu, f. lipidu (1,2-dioleoyl – 3 – trimethylamoniumpropanu).

Převzato z: Diem et al., 2008

## **2. Konfokální Ramanova mikroskopie**

### **2.1 Úvod**

Jedním z hlavních cílů každé analytické techniky je dosažení co nejvyšší citlivosti. Pokud hovoříme o mikroskopické analytické technice, diskutujeme o schopnosti co nejpřesněji pozorovat detaily vzorku a studovat jejich vlastnosti s co nejvyšším rozlišením. Optické mikroskopické techniky jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s preparátem. Tyto interakce zahrnují absorpci, refrakci, odraz nebo rozptyl záření. Existuje řada technik pro zobrazení buněk a tkání založená na těchto principech. Kromě základního optického mikroskopu, který však neumožňuje detailní studium biochemických změn na buněčné úrovni, je většina těchto technik závislá na využití barviv, a to zejména fluorescenčních, k vizualizaci buněčných organel. I navzdory širokému využití fluorescenční mikroskopie v biologii je metoda spojena s několika komplikacemi. Limitovaná životnost barviva, slabý kontrast, autofluorescence – to vše omezuje využití techniky fluorescenční mikroskopie pro studium biologických vzorků. Navíc, externí značení může ovlivňovat biochemické vlastnosti studovaných biomolekul (Matthäus et al., 2008). Konvenční optické mikroskopické techniky neumožňují studovat změny na buněčné úrovni bez použití externího značení. To vytváří místo pro jiné zobrazovací techniky, jako je Ramanova mikroskopie.

### **2.2 Princip metody konfokální Ramanovy mikroskopie**

Konfokální Ramanova mikroskopie je spojením vibrační spektroskopické techniky- Ramanovy spektroskopie se zobrazovací technikou – konfokální mikroskopií. Systém zahrnující spojení těchto technik nabízí výše zmiňované cíle – dosažení vysokého rozlišení mikroskopické a citlivosti spektroskopické metody. Jednotlivé biochemické komponenty jsou charakterizovány přímo svými vibračními spektry. Vibrační spektroskopie umožňuje zobrazení založené na vlastních biochemických znacích biomolekul a obchází tak nutnost jejich značení (Matthäus et al., 2010).

Technika je založená na identifikaci skupinových molekulárních vibrací charakteristických pro určité funkční skupiny v molekulách. Pro buňky a tkáně je příznačná identifikace funkčních skupin v proteinech, nukleových kyselinách, lipidech, fosfolipidech a

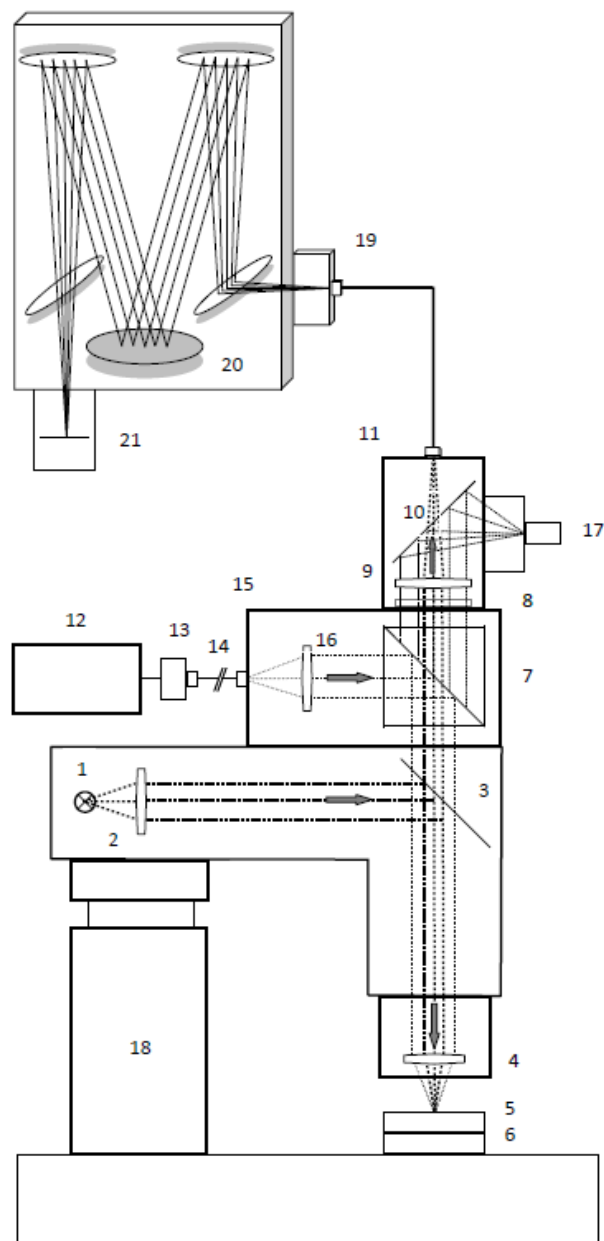
v sacharidech, tedy v základních stavebních složkách buňky. Toto mapování umožňuje získání informace odrážející chemickou kompozici vzorku. Technika umožňuje postupný sběr Ramanova rozptýleného záření souvisejícího s chemickým složením buňky v každém pixelu zobrazované oblasti.

### **2.3 Konfokální Ramanův mikroskop**

Počátky metody Ramanovy mikroskopie jsou datovány do 90. let 20. století, kdy byl poprvé zkonstruován Ramanův spektrometr kombinovaný s konfokálním optickým mikroskopem. Mikroskop byl využíván k fokusaci excitačního záření na určitou oblast vzorku o průměru několika mikrometrů, s cílem získat Ramanova spektra z fokusované oblasti. Další vývoj přinesl krokový motor, umožňující postupné skenování zvolené oblasti pohybem vzorku. To umožnilo sběr Ramanova spekter z různých pozic na vzorku a tvorbu 1D, 2D nebo 3D zobrazení. Rychlý technický pokrok vedl k postupnému vývoji citlivých a přesných mikroskopických systémů (Delhaye et al., 1996).

Na obr. 7 je schematicky znázorněna základní konstrukce konfokálního Ramanova mikroskopu. Konfokalita je důležitým prvkem Ramanovy mikroskopie. Vzorek je ozařován bodovým zdrojem – laserovým paprskem. Rozptýlené světlo z oblastí vzorku mimo oblast fokusace laserového paprsku, je silně tlumeno filtrací, kterou zajišťují konfokální apertury tvořené optickými vlákny. Tato schopnost nepochybně představuje nejdůležitější výhody konfokálního uspořádání, jehož výsledkem je významné zvýšení kontrastu (Delhaye et al., 1996).



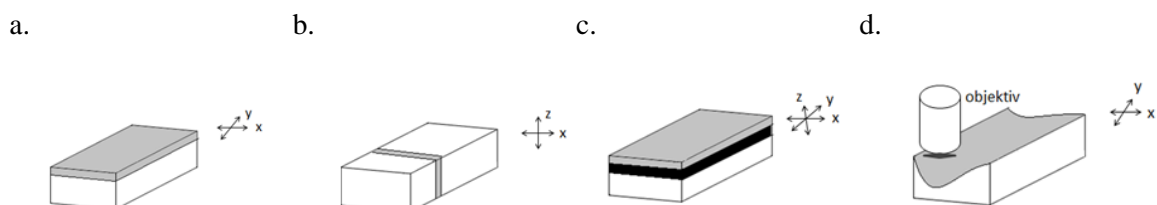


**Obr.7** Schematické znázornění konfokálního Ramanova mikroskopu.

1 – osvětlení mikroskopu, 2 – systém čoček, 3 – dělič paprsků (50:50), 4 – objektiv, 5 – vzorek, 6 – piezoeletricky řízený stolek mikroskopu, 7 – pásmový holografický filtr, 8 – přechodový holografický filtr, 9 – čočka, 10 – dělič paprsků (100:0), 11 – vícevidové optické vlákno propojující mikroskop se spektrometrem, 12 – excitační laser, 13 – výstup jednovidového optického vlákna, 14, 15 – propojení a vstup laserového paprsku, 16 – systém čoček, 17 – videokamera, 18 – zaostřovací systém, 19 – výstupní optické vlákno propojující mikroskop se spektrometrem, 20 – Ramanův spektrometr, 21 – CCD detektor

*Upraveno podle:* Koenen et al. (1998)

Další výhodou, kterou konfokální uspořádání nabízí, je tvorba zobrazení v různých rovinách jednoho vzorku (obr.8). V průmyslových aplikacích tyto techniky umožňují studium vnitřní struktury a integrity materiálů nebo topografické studie. Technika využívaná pro zobrazení buněk je zejména kombinací povrchového skenování a hloubkového profilování. Tyto metody umožňují studium trojrozměrné struktury vnitrobuněčného prostředí.



**Obr. 8** Možné techniky skenování vzorku s využitím konfokálního mikroskopu: a. povrchové skenování ve směru os x-y, b. hloubkové profilování, c. x-y-z skenování, d. profilování povrchu

Konfokalita také značně omezuje negativní vliv fluorescence na detekci Ramanova rozptylu (Hollricher, 2010). Fluorescence je významnou komplikací Ramanovy spektroskopie. Při interakci záření s molekulou se vyskytuje s větší pravděpodobností než Ramanův rozptyl. Intenzita fluorescence může být až o 6 řádů vyšší než intenzita Ramanova rozptylu. Proto je extrémně důležité co nejvíce tento vliv redukovat. Konfokální uspořádání přispívá k redukci vlivu fluorescence z oblastí vzorku mimo oblast fokusace laserového paprsku.

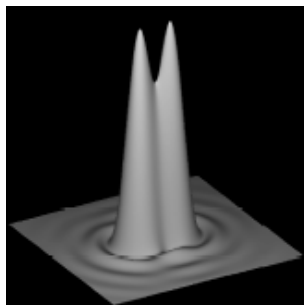
Vzhledem k velmi slabé intenzitě Ramanova rozptylu je důležitá optimalizace každé části systému tak, aby byla zaručena co nejvyšší transmise záření. Nesprávný výběr komponent a nastavení může velice snadno snížit citlivost systému až o několik řádů. Důležitým prvkem ovlivňujícím měření je volba vlnové délky excitačního záření, nastavení objektivu, vedení záření optickými částmi mikroskopu a také optické propojení mezi mikroskopem a spektrometrem (Hollricher, 2010).

## 2.4 Zdroj excitační energie

Zdrojem excitační energie je laserový paprsek. Intenzita Ramanova rozptylu je úměrná  $\nu^4$ , kde  $\nu$  je frekvence excitačního záření. Excitace při vlnové délce v modré až zelené části spektra (430-565 nm) tak vede k mnohem vyššímu Ramanovu signálu než excitace ve žluté až červené části spektra (565-740 nm). Kratší vlnová délka excitačního záření je spojena s vyšším laterálním rozlišením podle *Reyleighova kriteria*

$$D_{xy} = 0,61 \cdot \lambda / NA_{obj},$$

kde  $\lambda$  je vlnová délka, NA numerická apertura použitého objektivu a  $D_{xy}$  laterální rozlišení pro specifickou hodnotu  $\lambda$ . Hodnota uvádí vzdálenost mezi dvěma rozlišitelnými body (obr. 9).



**Obr. 9** Rayleighovo pravidlo pro dva rozlišitelné body.

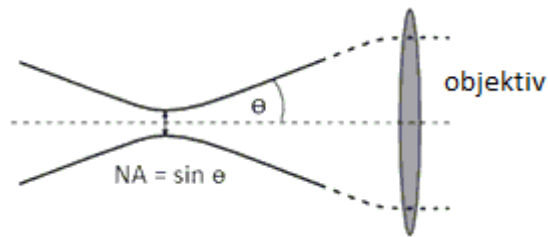
*Upraveno podle:* Koenen et al., 1998

Rayleighovo kritérium poukazuje i na důležitost numerické apertury. NA vyjadřuje v mikroskopii účinnou světelnost objektivu. Je to bezrozměrné číslo, které lze vyjádřit vztahem

$$NA = n \cdot \sin \theta$$

kde  $n$  je index lomu prostředí před objektivem a  $\theta$  je polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu (obr. 10).

Z uvedeného vyplývá, že použití excitační vlnové délky v zelené nebo modré části spektra a objektivu s hodnotou NA rovné 0.8 - 1.0 umožňuje sběr Ramanových spekter přibližně s 300-400 nm rozlišením. To dovoluje sběr Ramanova rozptylu nejen na úrovni buňky, ale také na úrovni její organel.



**Obr. 10** Znárodnění paprsků vstupujících do objektivu s vyjádřením vztahu pro NA objektivu.

## 2.5 Sběr Ramanova rozptylu

Excitační záření je vstupním optickým vláknem vedeno do mikroskopu, kde je dále zacíleno na holografický filtr (*angl.* band – pass filter – filtr propouštějící záření v určitém rozmezí frekvence a silně tlumící záření o frekvenci mimo tento rozsah). Tento filtr zajišťuje redukci Ramanova rozptylu vlákna. Poté je mikroskopickým objektivem fokusováno na vzorek. Rozptýlené Ramanovo záření je sbíráno stejným mikroskopickým objektivem a vedeno na jiný holografický filtr (*angl.* edge filter – filtr propouštějící záření za určitou hodnotou frekvence). Tento filtr blokuje Rayleighův rozptyl a paprsky odraženého laserového záření. Rozptýlené záření je výstupním optickým vláknem vedeno na detektor Ramanova spektrometru (Koenen et al., 1998). Vstupní a výstupní optické vlákno vytvářejí v tomto uspořádání konfokální optické apertury (obr.7).

Volba objektivu pro dosažení co nejefektivnějšího sběru Ramanova rozptylu je závislá zejména na hodnotě jeho NA. Pro zvolené podmínky měření je výběr zaměřen na co nejvyšší možnou hodnotu NA, která, jak již bylo zmíněno, má podle Rayleighova kriteria přímý vliv na hodnotu rozlišení. Zřejmě nejefektivnějším způsobem, jak zvýšení rozlišení dosáhnout, je využití imerzního objektivu (Delhaye et al., 1996). Bylo prokázáno, že tento postup zvyšuje efektivitu měření (Everal, 2000) a pro dosažení co nejvyššího rozlišení je, zejména pro studium živých buněk, používán vodní imerzní objektiv (Adar et al., 2004). Navíc, vodní prostředí přispívá k ochraně buňky před tepelnou degradací a umožňuje studium živých buněk v prostředí blízkém jejich přirozenému prostředí (Matthäus et al., 2008).

## 2.6 CCD detektor

Detektor je jednou z klíčových komponent Ramanova mikroskopu a jeho správný výběr silně ovlivňuje účinnost zařízení. CCD (z *angl.* charged couple devices neboli zařízení s vázanými náboji) je elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace. CCD využívá fyzikálního jevu známého jako *fotoefekt*. Energie dopadajícího světla je přeměňována na energii elektrického signálu. Základ CCD tvoří fotosenzitivní silikonový čip. Čip je vytvořen jako mřížka, která je poskládána z obrazových prvků neboli pixelů. Obvyklý rozměr mřížky v Ramanově spektroskopii je 1024 x 127 pixelů (Hollricher, 2010). Na atomy Si dopadají fotony, které uvolňují záporně nabitě elektrony. Kladně nabitá elektroda, umístěná pod každým pixelem takto uvolněné elektrony zachycuje v tzv. kapacitoru. V dalším kroku je tento obraz čtený pixel po pixelu, a tak vzniká obrazová informace. Čtení signálu probíhá přesouváním kladného náboje v každém sloupci pixelů, přičemž jsou elektrony přemísťovány z jednoho pixelu na druhý. Elektrony jsou tímto způsobem přesouvány až na terminál na konci zařízení. Po přečtení celé řady se celý proces opakuje a postupně je přesouvána další řada elektronů. Tímto způsobem jsou všechny elektrony zachycené na mikroprocesoru přeneseny a odpovědný za tvorbu signálu (Bushberg et al., 2002).

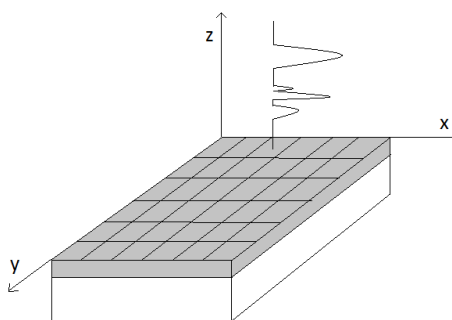
Důležitou vlastností detektoru je jeho kvantová účinnost, která vyjadřuje procento detekovaných fotonů z celkového počtu fotonů, které dopadly na detektor. Kvantová účinnost klasického CCD detektoru s frontálním osvětlením je při vlnové délce 500 nm kolem 45 %. Až dvojnásobně vyšší kvantové účinnosti je dosaženo při bazálním ozařování (Hollricher, 2010).

### 3. Zpracování hyperspektrálních datových souborů

Konfokální Ramanova mikroskopie buněk poskytuje soubor desítek až tisíců spekter, které jsou složitým zdrojem informací o chemickém složení pozorovaného vzorku. Důležitým krokem vlastního zpracování je výběr relevantní informace z naměřených spekter pomocí softwarových algoritmů. Ramanovo spektrum je v konfokálním uspořádání měřeno v každém pixelu oblasti zvolené k zobrazení. Např. v zobrazované oblasti 100 x 100 pixelů je celkově změřeno  $100 \times 100 = 10\,000$  individuálních spekter. Takový soubor dat je často označován jako *hyperspektrální datový soubor*. Získaná informace je posléze vizualizovaná jako obrázek, který může být dále zpracováván nebo slouží pro konečnou prezentaci výsledků experimentu.

#### 3.1 Tvorba obrazu

Hyperspektrální soubory dat získaných konfokální Ramanovou mikroskopií tvoří tzv. *datovou kostku* (z *angl.* data cube) charakterizovanou třemi dimenzemi (obr. 12). Souřadnice  $x$  a  $y$  poskytují prostorovou informaci o chemickém složení vzorku, souřadnice  $z$  poskytuje spektrální informaci o každém pixelu zobrazované oblasti.

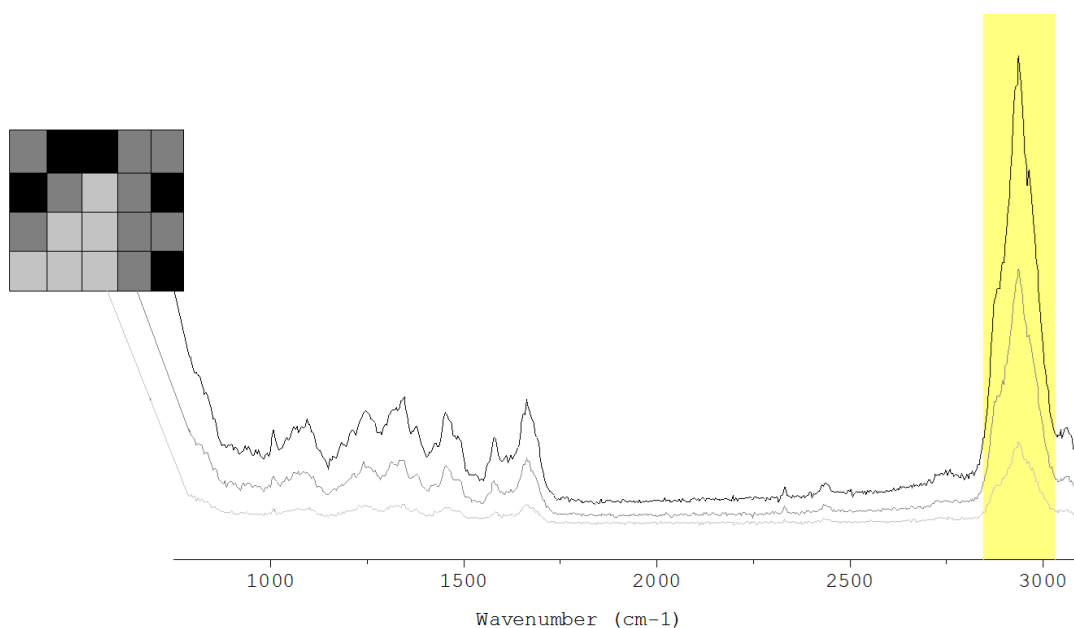


**Obr. 12** Schematické znázornění datové kostky hyperspektrálního datového souboru.

Pro tvorbu obrazu jsou využívány dvě metody: *univariační* (s jednou proměnnou) a *multivariační* (s více proměnnými). Primárním rozdílem je, že univariační metoda zahrnuje změření a zpracování jednoho spektra za jednotku času a tvorbu jednoho pixelu zobrazované oblasti, zatímco multivariační metody využívají informace z celého hyperspektrálního datového souboru.

### 3.2 Univariační tvorba obrazu

Jak již bylo zmíněno, při univariační tvorbě obrazu je samostatně zpracováno každé změřené Ramanovo spektrum. Jednomu Ramanovu spektru odpovídá jeden pixel zobrazované oblasti vzorku. Intenzita zabarvení jednotlivých pixelů se odvíjí od intenzity konkrétního vibračního pásu, resp. intenzity vymezené části Ramanova spektra buňky. Pro zobrazení buňky je nejvhodnější výběr vibračního pásu odpovídajícího valenční vibraci vazby C-H, a to  $2800 - 3030 \text{ cm}^{-1}$  (Scaffi-Haap et al., 2007). Přehled vibračních pásů převládajících v Ramanově spektru buňky je shrnutý v tab. 1. Schematicky je univariační tvorba obrazu znázorněna na obr. 13.



**Obr. 13** Schematické znázornění univariační tvorby obrazu s využitím intenzit vibračního pásu  $2800 - 3030 \text{ cm}^{-1}$ .

Výhoda univariační analýzy spočívá v relativně nízkém zatížení procesoru, a tak může být použita „on-line“ při probíhajícím sběru dat. Univariační analýza však často neposkytuje dostatek informací pro analýzu tak komplexního vzorku jako je buňka. Sofistikovanější způsob výběru dat z naměřeného Ramanova spektra představuje vhodná úprava pomocí matematických aproximací zahrnutých v multivariačních metodách analýzy hyperspektrálních datových souborů.

**Tab. 1** Frekvence vibračních pásů převládajících v Ramanově spektru buňky

*Upraveno podle:* Dieing et al., 2010; Draux et al., 2012; Chan et al., 2008; Matthäus et al. 2008 A; Matthäus et al. 2008 B; Matthäus et al., 2007; Scalfi-Happ et al., 2007

<i>Vibrační mód</i>	<i>Frekvence (cm<sup>-1</sup>)</i>	<i>Popis</i>
C-H symetrická valenční vibrace	~2800-3030 ~3059 ~2975 ~2850-2950 ~2870-2890	(C=C-H) <sub>arom.</sub> CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> a CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>
C=O valenční vibrace	~1730-1760	C=O esterové skupiny lipidů a fosfolipidů
amid I	~1650-1680	C=O valenční vibrace v peptidech
aminokyseliny	~1614 ~1606, ~1002	TYR PHE
DNA/RNA	~1570-1590	C=C valenční vibrace, dýchací vibrace aromatických kruhů purinových bází
deformace CH <sub>2</sub> a CH <sub>3</sub>	~1440-1460	deformace methylových a methylenových skupin postranních řetězců peptidů, lipidů a fosfolipidů
amid III	~1270-1350	deformace C-H, N-H v peptidech
C-N valenční vibrace	~1200-1400 ~ 1250	vibrace amidové vazby proteinů
PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	~1085	symetrická vibrace fosfoesterové vazby v DNA, RNA a fosfolipidech
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	~1095	
DNA/RNA	~852, ~785	dýchací vibrace aromatických kruhů pyrimidinových bází



### 3.3 Multivariační tvorba obrazu

Ramanovo zobrazení pomocí multivariačních metod zpracovává hyperspektrální datový soubor pomocí složitých matematických algoritmů. Tyto mohou být rozděleny do tří kategorií:

- a) *faktorová analýza*, která vybírá konkrétní spektrální informaci
- b) *klastrová analýza*, která rozděluje soubor dat do skupin
- c) *klasifikační analýza*, která modeluje rozdíly mezi skupinami dat (Hadegaard et al., 2011)

Faktorová a klastrová analýza redukuje dimenzionalitu datového souboru, který poté reprezentuje redukovaný počet vektorů nebo klastrů (Krafft et al., 2012).

V zásadě nejvyužívanější multivariační statistické metody pro zpracování hyperspektrálních datových souborů jsou analýza hlavních komponent a klastrová analýza zahrnující hierarchickou a „*k-mean*“ klastrovou analýzu (Dieing & Ibach, 2010).

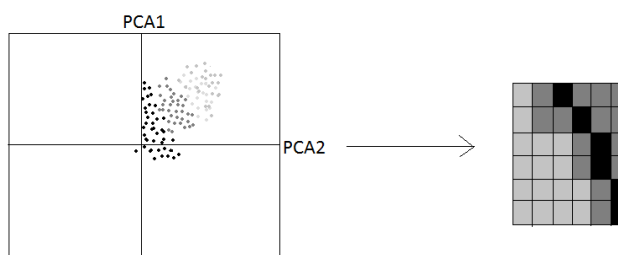
#### 3.3.1 Analýza hlavních komponent

*Analýza hlavních komponent* (PCA, z *angl.* principal component analysis) je často používanou metodou pro spektrální analýzu dat a tvoří základ pro další multivariační metody (Hadegaard et al., 2011). Bývá považována za rozšíření metody faktorové analýzy.

Analýza je založena na transformaci souboru spekter do nového souřadnicového systému. Každé spektrum je zobrazeno jako bod v soustavě souřadnic, které jsou tvořeny hlavními komponentami. Určujícím faktorem pro zobrazení spektra v systému hlavních komponent je jeho vzdálenost od hlavní komponenty. Ta je vyhodnocována prostřednictvím matematické aplikace počítající s tzv. *euklidovskou vzdáleností*. Tato operace je založena na existenci tzv. euklidovského prostoru, v němž je přesně definována vzdálenost bodů. První hlavní komponenta (PC1, z *angl.* principal component 1) udává největší vzdálenost od všech spekter v datovém souboru, druhá a každá následující hlavní komponenta je ortogonální (kolmá na všechny předcházející) a popisuje maximální množství zbývajících variability. Obvyklý počet hlavních komponent je 2-10. Získávají se normalizované hodnoty vzdálenosti bodů, resp. spekter od hlavních komponent, a ty jsou kvantitativně vyjádřeny intenzitou zbarvení. Barevné

intenzity jsou rozmístěny v prostoru jako funkce vzdálenosti individuálních spekter od hlavních komponent (Lasch & Naumann, 1998).

Analýza hlavních komponent může být chápána jako transformace z původního do nového souřadnicového systému, jehož osy jsou tvořeny hlavními komponentami. Takový graf prvních dvou nebo tří hlavních komponent postačuje k rozřídění všech spekter do samostatných oblastí (Downes & Elfick, 2010). Na obr. 14 je schematicky znázorněn příklad vynesení spekter v souřadnicích prvních dvou hlavních komponent PCA transformovaného spektrálního datového souboru. Spektra jsou v grafu reprezentována body.



**Obr. 14** Schematické znázornění vynesení PC1 vs. PC2 hyperspektrálního datového souboru.

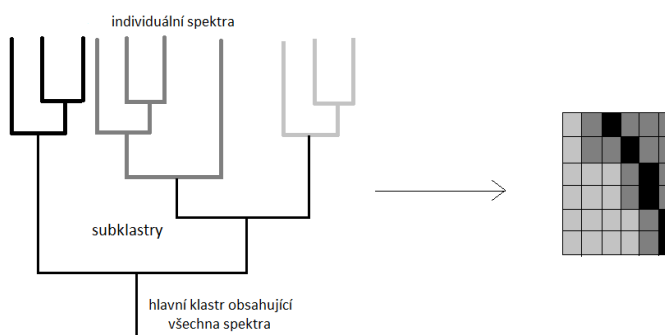
### 3.3.2 Klastrová analýza

*Klastrová analýza* je v podstatě tříděním desítek až tisíců spekter v souboru dat podle jejich podobnosti. Jako výsledek je zobrazována oblast s určitým rozložením klastrů obsahujících soubory podobných spekter. Klastrová analýza je obvykle aplikována na soubor dat zpracovaný analýzou hlavních komponent (Downes & Elfick, 2010).

Výhodou klastrové analýzy je její automatizace a objektivita, nevýhodou představuje výpočetní a časová náročnost. Cílem této metody je vytvářet klastry, tedy skupiny dat s minimálním rozdílem a maximalizovat tak rozdíly mezi jednotlivými klastry (Hadegaard et al., 2011). Je několik způsobů, jak data třídit do klastrů a každý způsob má své výhody i nevýhody.

### 3.3.2.1 Hierarchická klastrová analýza

Jak název této metody napovídá a schematicky znázorňuje obr. 15, *hierarchická klastrová analýza* (HCA, z *angl.* hierarchical cluster analysis) vytváří určitou klastrovou hierarchii, která může být prezentována v podobě stromu. Toto uspořádání se nazývá *dendrogram*. Kmen stromu představuje hlavní klastr obsahující všechna spektra. Následně jsou klastry rozděleny na subklastry různé velikosti (větve), a ty na další menší subklastry (menší větve, větvičky, menší větvičky atd.). Listy jsou poté individuální spektra z datového souboru.



**Obr. 15** Schematické znázornění HCA a pseudo-barevného obrazového výstupu

HCA je velmi často používaným algoritmem, který slouží k vytvoření obrazu z naměřeného hyperspektrálního souboru dat. Tvorba hierarchického uspořádání začíná buď ze základního klastru, který je postupně rozdělován (*tvorba klastrů dělením*), anebo je hierarchické uspořádání vytvořeno postupným shlukováním jednotlivých spekter do klastrů (*tvorba klastrů shlukováním*). Po vytvoření hierarchického uspořádání je možné vybrat ze souboru takto rozdělených dat průměrná spektra jednotlivých klastrů (Dieing & Ibach, 2010).

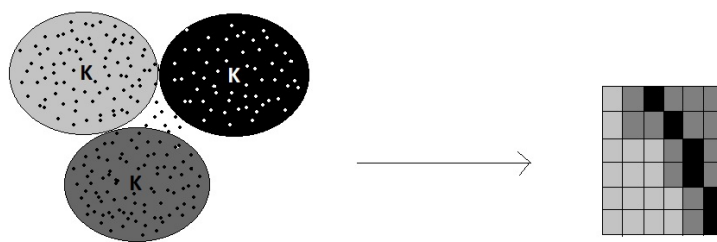
Důležitým ukazatelem pro třídění dat, resp. spekter do klastrů je jejich podobnost, resp. vzájemná vzdálenost. Pro její vyhodnocení využívají softwarové algoritmy vícerozměrné statistické metody. HCA počítá symetrickou vzdálenost dat v souboru o rozměrech  $n \times n$  mezi  $n$  spektry a určuje jejich podobnost. Každé individuální spektrum je porovnáno se všemi spektry v datovém souboru a je určena jejich vzájemná vzdálenost. Algoritmus poté vyhledává spektra s nejmenší vzdáleností a dvě nejpodobnější, resp. nejbližší spektra zařadí do jednoho klastru. Poté spočítá rozdíl mezi spektry zařazenými v klastru a zbývajících spektry v datovém souboru. Tento iterativní proces je opakován  $n-1$  krát a je ukončen po sloučení odpovídajících spekter do finálního klastru (Hadegaard et al., 2011). Každému klastru je ve výsledku zobrazení přiřazeno jiné zbarvení.

Často používanou metodou určení vzdálenosti je metoda *euklidovské vzdálenosti*. Tato matematická operace, jak již bylo zmíněno u PCA, je založena na existenci tzv. euklidovského prostoru, v němž je definována vzdálenost bodů a z ní vyplývající také další ukazatele, např. čtverec euklidovské vzdálenosti. Tento aspekt je důležitý pro vlastní rozdělení dat do klastrů. Pro tento krok využívá algoritmus často *Wardovu metodu*, která vychází z analýzy rozptylu. Vybírá taková data ke sloučení, kde je součet čtverců minimální.

### 3.3.2.2 „*k*-mean“ klastrová analýza

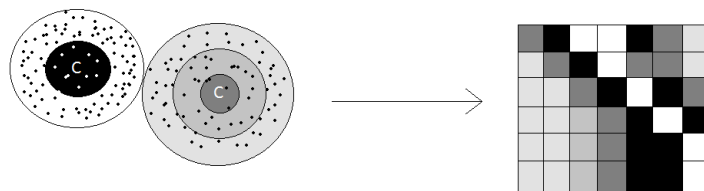
„*k*-mean“ klastrová analýza (KMC, z *angl.* *k*-mean cluster analysis) je metoda vytváření dílčích klastrů. I tato metoda může být využita pro další dělení klastrů na podklastry, čím vzniká pseudo-hierarchické uspořádání podobně jako u HCA (Hadegaard et al., 2011).

„*K*-mean“ klastrová analýza rozděluje spektra do předem určeného počtu klastrů. Na počátku je v PCA grafu zvolen *k* počet bodů, které tvoří centrum skupiny, tzv. centroid. Každému centroidu jsou přidělena nejbližší spektra. Poté, co jsou všechna spektra rozříděna do skupin, jsou definovány nové centroidy, které tvoří průměrné spektrum dané skupiny. Počítána je vzdálenost spekter od jednotlivých centroidů. Každé spektrum je přiděleno do skupiny neboli klastru, jehož centroid je danému spektru nejbližší (Hadegaard et al., 2011). Každému klastru je ve výsledku zobrazení opět přiřazeno jiné zbarvení. Výstup „*k*-mean“ klastrové analýzy je schematicky znázorněn na obr. 16.



**Obr. 16** Schematické znázornění výstupu „*k*-mean“ klastrové analýzy se čtyřmi zvolenými klastry. Spektra jsou prezentována jako body. Písmenko K označuje centroid daného klastru.

KMC rozlišuje, zda spektrum patří nebo nepatří do určitého klastru. To je důvodem toho, proč je obrazový výstup tohoto algoritmu binární. „fuzzy *C*-mean“ klastrová analýza (FCM, z *angl.* fuzzy *C*-mean cluster analysis) je metoda, která rozděluje spektra na základě příslušnosti k určitému stupni klastru. Pokud je spektrum lokalizováno uvnitř klastru, patří k tomuto klastru mnohem více, než spektrum na jeho okraji. Obrazový výstup FCM tyto rozdíly znázorňuje a není binární, nýbrž hodnota každého pixelu má hodnotu mezi 0 a 1 (nebo 100 %). Tato metoda poukazuje na rozložení spekter uvnitř klastrů v závislosti na pravděpodobnosti jejich klastrové příslušnosti. Přitom počítá také s možností příslušnosti spektra do dvou sousedních klastrů. Metoda FCM patří mezi méně používané multivariační metody zobrazení buňky. Výstup FCM je schematicky znázorněn na obr. 17.



**Obr. 17** Schematické znázornění výstupu „fuzzy *c*-mean“ klastrové analýzy. Různá vzdálenost od centroidu *C* je symbolicky vyjádřena intenzitou zbarvení.

### 3.3.3 Další multivariační metody zobrazení

Literatura uvádí i další způsoby analýzy hyperspektrálních datových souborů, a to *vrcholovou analýzu komponent* (VCA, z *angl.* vertex component analysis) a *N-FINDR algoritmus* (Matthäus et al., 2011). Tyto spektrální algoritmy byly zavedeny poměrně nedávno (Miljkovic et al., 2010) a jsou založeny na specifickém principu. Základem metody VCA je předpoklad, že každé spektrum může být považováno za vektor v *n*-dimenzionálním euklidovském prostoru. Vektory spekter v tomto prostoru tvoří geometrický útvar libovolného rozměru, přičemž je dodrženo pravidlo počtu *n*+1 rohů v *n*-dimenzionálním prostoru. Vrcholy tohoto geometrického útvaru odpovídají nejintenzivnějším spektrům datového souboru a jsou označovány jako „konečná spektra“ (z *angl.* endmembers). VCA analyzuje, jak podobné je každé spektrum tomuto „konečnému spektru“ v datovém souboru (Hadegaard et al., 2011).

N-FINDR je podobnou metodou, která byla zavedena při studiu minerálů v geologickém průzkumu (Winter, 1999) a v analýze dat naměřených konfokální Ramanovou mikroskopií představuje zcela nový přístup. N-FINDR i VCA analýza musí počítat se známým počtem koncových členů, který je zadán již na počátku analýzy. Nevýhodou metod je jejich výpočetní náročnost (Wu et al., 2012).

Množství algoritmů využívaných pro úpravu hyperspektrálních datových souborů je rozšířeno i o *metody klasifikační*. Jak již bylo zmíněno, klasifikační metody modelují rozdíly mezi skupinami dat. Do této skupiny patří např. *lineární diskriminantní analýza* (LDA, z *angl.* linear discriminant analysis), která vyhledává signifikantní rozdíl mezi dvěma skupinami dat, *Gaussovské směsné modelování* (GMM, z *angl.* Gaussian mixture modelling) nebo aplikace zvaná „*umělá neuronová síť*“ (ANN, z *angl.* artificial neural network). Zmiňované algoritmy nebyly v práci využity, proto je čtenář odkázán na některé zdroje, které danou problematiku klasifikačních i dalších multivariačních metod, využívaných ke zpracování hyperspektrálních dat, řeší (Bocklitz et al., 2009; Lasch et al., 2006; Wu et al., 2007; Yang, 2002).

## **4. Aplikace metody Ramanovy mikroskopie v biologii a medicíně**

### **4.1 Úvod**

Až do nedávné doby byla Ramanova mikroskopie spojována především s technickými a analytickými aplikacemi. Metoda našla uplatnění v různých odvětvích lidské činnosti. Stala se součástí souboru metod využívaných v geologickém průzkumu a ve vývoji nových materiálů, při kontrole kvality a uplatňuje se také ve forenzní vědě. Teprve nedávno, a to zejména technický vývoj, motivoval mnoho vědeckých skupin a společností vyvinout technologie založené na detekci Ramanova rozptylu pro biologické a klinické aplikace. Během několika posledních let byly publikovány studie, které poukázaly na významné postavení Ramanovy mikroskopie na poli biologie a medicíny.

### **4.2 Biomedicínské aplikace metody Ramanovy mikroskopie**

Jednou ze základních biologických aplikací Ramanovy mikroskopie je zobrazení živých nebo fixovaných buněk a jejich kompartment. Využití systému s vysokým rozlišením umožňuje sběr chemické informace nejen na úrovni buňky, ale také na úrovni její organel. Jak již bylo zmíněno, metoda je založena na detekci vlastních vibračních spektrálních znaků biomolekul podílejících se na kompozici buňky. Vizualizace některých buněčných kompartment, jejichž studium metoda umožňuje, tak obchází nutnost využití specifického externího značení. Metoda Ramanovy mikroskopie umožnila zobrazení různých buněčných kompartment, zejména jádra a chromatinu (Uzunbajakava et al., 2003), mitochondrií (Matthäus et al., 2007), membránových lipidů a proteinů (van Manen et al., 2005 a Kraaft C. et al., 2006).

Ramanova mikroskopie může být využita také ke studiu některých procesů na subbuněčné úrovni, které jsou spojeny s reorganizací vnitrobuněčné struktury. Příkladem je mitóza eukaryotních buněk. Ramanova mikroskopie umožňuje sledovat změny na úrovni DNA, jako je kondenzace chromatinu a distribuce DNA během buněčného dělení (Matthäus et al., 2006).

Metoda je také potenciálním nástrojem studia metabolických dějů. Příkladem je monitorování buněčné nekrózy nebo programované buněčné smrti (Verrier et al., 2004). Studium vnitrobuněčných metabolických procesů je založeno na studiu distribuce a spektrálních změn biomolekul, které souvisejí s morfologickými změnami organel, zejména jádra a mitochondrií.

Ramanova mikroskopie byla úspěšně využita také pro diferenciaci bakteriálních kmenů. Důležitým nástrojem této aplikace jsou multivariační metody, např. PCA, které umožňují detekci minimálních spektrálních změn souvisejících především s odlišným obsahem a zastoupením pigmentů u jednotlivých kmenů bakterií (Scholtes-Timmerman et al., 2009).

Jednou z nejdůležitějších biomedicínských aplikací Ramanovy mikroskopie je identifikace a charakterizace nádorových buněk. Rozlišení nádorových buněk je založeno na studiu rozdílů v naměřených Ramanových spektrech zdravé a maligní tkáně. Studium je založeno na monitorování biochemických změn, které mohou doprovázet nástup tumorigeneze. Této problematice bylo věnováno několik studií (např. Haka et al., 2005; Yu et al., 2006), které prokázaly, že rozdíly mezi zdravou a nádorovou buňkou mohou být kvantifikovány na základě rozdílné celulórní koncentrace DNA a proteinů a jejich konformačních změn projevujících se v Ramanových spektrech buňky. Důležitým nástrojem této aplikace jsou opět multivariační metody jako je PCA nebo HCA, které spektra zdravých a maligních buněk na základě zmíněných spektrálních znaků třídí.

Ramanova mikroskopie má významné postavení mezi metodami studia vnitrobuněčných procesů. Kromě metabolických dějů a dějů spojených se změnami vnitrobuněčné struktury se metoda uplatňuje také při studiu distribuce exogenních látek jako jsou léčiva či nanočástice transportované do buňky během kultivace z živných médií (Chernenko et al., 2009; Matthäus et al., 2008 B; Matthäus et al., 2010).

### **4.3 Výhody a možné komplikace metody Ramanovy mikroskopie**

Hlavní výhodou metody konfokální Ramanovy mikroskopie na rozdíl od jiných technik zobrazení je vysoké dosažitelné rozlišení a vysoká kompoziční citlivost. Metoda Ramanovy mikroskopie si zasloužila pozornost také zejména z pohledu absence externího značení. Jak již bylo několikrát zmíněno, molekuly jsou charakterizovány přímo svými vibračními spektry, a tak metoda založená na jejich detekci obchází nutnost využití specifického značení. Využití těchto exogenních látek je často spojeno s ovlivněním metabolických dějů buňky, případně také aktivity značené molekuly. Metoda nevyžadující externí značení proto proces zobrazení významně zjednodušuje a představuje potenciální alternativní přístup ke studiu buňky. Další výhodou, kterou Ramanova mikroskopie nabízí, je možnost přímého studia živých buněk ve vodním prostředí, bez nutnosti fixace nebo jiné destruktivní procedury, která je pro některé jiné metody umožňující zobrazení jednotlivých buněk nevyhnutelná. Živé buňky tak mohou být pozorovány v prostředí blízkém jejich fyziologickému prostředí.



I navzdory výhodám se metoda Ramanovy mikroskopie potýká s několika komplikacemi. Ty souvisejí především se skutečností, kterou je slabá intenzita Ramanova rozptylu. Typické je, že vznik Ramanovu fotonu dává v průměru i méně než jeden z miliónu excitačních fotonů (Hollricher, 2010). Významnou komplikací Ramanovy spektroskopie je fluorescence. Tento jev se vyskytuje s mnohem vyšší pravděpodobností a jeho intenzita může být až o 6 řádů vyšší než intenzita Ramanova rozptylu. K redukci tohoto jevu významně přispívá konfokální systém umožňující postupný sběr Ramanova rozptylu po jednotlivých bodech, a tak je výrazně redukován možný vliv fluorescence z jiných oblastí vzorku. Se slabou intenzitou Ramanova rozptylu souvisí také potřeba vysokého výkonu excitačního záření dopadajícího na vzorek. Při měření suchým objektivem představuje tato skutečnost možnost tepelné degradace buněk. Řešení této komplikace nabízí využití vodního imerzního objektivu. Ten kromě vyšší hodnoty NA a s ní souvisejícího vyššího rozlišení objektivu představuje výhodu v měření ve vodním prostředí, které přispívá k ochlazení vzorku a ochraně před možnou tepelnou degradací. Intenzita Ramanova rozptylu souvisí i s hodnotou integračního času, t. j. času, po který je Ramanův rozptyl v každém bodě měřen. Vyšší hodnota integračního času souvisí s vyšší intenzitou detekovaného Ramanova signálu, zároveň ale prodlužuje čas měření. Vyšší hodnoty integračního času jsou spojeny zejména s využitím vodního imerzního objektivu. Podle publikovaných zdrojů se hodnota integračního času při měření suchým objektivem pohybuje v řádech desítek ms, zatímco u měření pomocí vodního imerzního objektivu se integrační čas pohybuje v řádech stovek ms. To prodlužuje měření i na několik hodin. Možnou nevýhodou metody Ramanovy mikroskopie je potřeba využití materiálů o vyhovujících spektrálních vlastnostech, které minimalizují negativní vliv na detekci vibrační biomolekul v buňce (viz. kapitola 1.1 *Metody experimentální části*).

Slabá intenzita spontánního Ramanova rozptylu ovlivnila i vývoj dalších technik, které umožnily jeho zesílení. Mezi tyto metody patří zejména metoda založená na tzv. *povrchem zesíleném Ramanově rozptylu* (SERS, z *angl.* surface enhanced Raman scattering). Povrchem zesílený Ramanův rozptyl je důležitým analytickým nástrojem využívaným v Ramanově spektroskopii i mikroskopii. Experimentálně bylo prokázáno, že tato technika umožňuje zesílení Ramanova rozptylu až o 6 řádů (Dietzek et al., 2010). Zesílení Ramanova rozptylu v SERS je ovlivňováno dvěma mechanismy – elektromagnetickým mechanismem pro zesílení intenzity elektrického pole a chemickým mechanismem pro zesílení polarizovatelnosti molekul. Zesílení intenzity elektromagnetického pole je dosaženo s využitím povrchových plazmonů uzavřených v kovových (zlatých nebo stříbrných) nanočásticích o průměru 10-100 nm. Excitace povrchových plasmonů, které, stejně jako molekuly při popisu Ramanova rozptylu, vystupují jako dipóly, vede k výraznému zvýšení intenzity nejen rozptýleného, ale také laserového excitačního záření. Chemický mechanismus zvyšuje polarizovatelnost molekul v důsledku

jejich silné chemisorpce na povrchu kovové nanočástice (Dietzek et al., 2010). Nejen molekuly adsorbované na povrchu nanočástice, ale také ty v blízkém okolí vykazují mnohonásobné zvýšení Ramanova signálu. SERS se uplatňuje také při metodách zobrazení buněk a jejich vnitrobuněčného prostředí. Zjednodušeně popsáno, je metoda založena na inkubaci buněk s nanočásticemi, které jsou během proliferace buněk distribuovány z média do vnitrobuněčného prostředí.

V posledních letech se objevila další metoda, která se vyznačuje efektivním zesílením Ramanova rozptylu, založená na tzv. *koherentním anti-Stokesově Ramanově rozptylu* (CARS, z *angl.* coherent anti-Stokes Raman scattering). Koherentní Ramanův rozptyl vzniká při excitaci molekul třemi laserovými paprsky o určité frekvenci. Společná interakce paprsků s molekulami vzorku je důsledkem koherentního anti-Stokesova rozptýleného záření, které má mnohonásobně vyšší intenzitu než spontánní Ramanův rozptyl (Evans et al., 2005). Pro významné zvýšení intenzity Ramanova rozptylu je pro metodu charakteristické zejména výrazné snížení akvizičního času, potřebného pro zobrazení, na rozmezí několika ms (Volkmer et al., 2002). To umožňuje využití metody zejména pro studium dynamických procesů v buňkách, jako je vezikulární transport nebo difuze (Chan et al., 2008).

SERS reprezentuje několikařádově vyšší intenzita Ramanova rozptylu. Příprava vzorku však vyžaduje inkorporaci nanočástic do buňky. CARS představuje alternativní řešení, a to zejména pro nižší akviziční čas potřebný pro tvorbu obrazu. Nevýhodou však představuje vysoký vliv pozadí během měření (Chan et al., 2008). Ramanova mikroskopie založená na detekci spontánního Ramanova rozptylu je nejpoužívanější „Ramanskou“ metodou pro zobrazení buněk a některých vnitrobuněčných procesů (Downes & Elfick, 2010). Technika nevyžaduje složitější přípravu vzorku a i přes mnohonásobně nižší intenzitu spontánního Ramanova rozptylu, umožňuje studium chemické struktury i některých biochemických změn v buňkách a tkáních.

## Seznam použité literatury

- 1) Adar F., Naudin C. (2004) Use of a microscope objective corrected for a cover glass to improve confocal spatial resolution inside a sample with a finite index of refraction. *Appl. spectrosc.*, 58, 1136-1137
- 2) Baena R. J., Lendl B. (2004) Raman spectroscopy in chemical bioanalysis, *Curr. opin. chem. biol.*, 8, 534-539
- 3) Bakker S. T., Wolthius R., Caspers P. J., Puppels G. J (2002) Real-time tissue characterisation on basis of *in vivo* Raman spectra, *J. Raman spectrosc.*, 33, 580-585
- 4) Bocklitz T., Putsche M., Stuber C., Käs J., Niendorf A., Rosch P., Popp J. (2009) A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis, *J. Raman spectrosc.*, 40, 1759-1765
- 5) Bushberg T. J., Seibert A. J., Leidholdt E. M., Boone J. M. (2002) The Essentials physics of medical imaging, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA
- 6) Delhaye M., Barbillat J., Aubard J., Bridoux M., Da Silva E. (1996) Instrumentation in Raman microscopy: Developments and applications, G. Turrel and J. Corset, eds., Academic Press London
- 7) Dieing T., Ibach W. (2010) Software requirements and data analysis in confocal Raman microscopy *In Confocal Raman microscopy*, pp. 61-89, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 8) Diem M. (1993) Introduction to modern vibrational spectroscopy, New York, Wiley-Interscience
- 9) Diem M., Griffiths P., Chalmers J. (2008) Infrared and Raman spectra of cellular components *In Vibrational spectroscopy for Medical diagnosis*, pp. 325-333, John Wiley and sons Ltd.

- 10) Dietzick B., Cialla D., Schmitt M., Popp J. (2010) Introduction to the fundamentals of Raman spectroscopy *In Confocal Raman microscopy*, pp. 21-27, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 11) Downes A., Elfick A. (2010) Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, *Sensors*, 10, 1871-1889
- 12) Draux F., Gobinet C., Sulé-Suso J., Trussardi A., Manfait M., Jeannesson P., Sockalingum D.G. (2012) Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods, *Anal. bioanal. chem.*, 397, 2727-2737
- 13) Draux F., Jeannesson P., Beljebbar A., Fourre N., Manfait M., Sulé-Suso J., Sockalingum G. D. (2009) Raman spectral imaging of single living cancer cells: a preliminary study, *Analyst*, 3, 542-548
- 14) Draux F., Gobinet C., Sulé-Suso J., Trussardi A., Manfait M., Jeannesson P., Sockalingum D.G. (2010) Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation method, *Anal. bioanal. chem.*, 397, 2727-2737
- 15) Evans C. L., Potma E. O., Puorishaag M., Cote D., Lin C. P., Xie X. S. (2005) Chemical imaging of of tissue *in vivo* with video- rate coherent anti-Stokes Raman microscopy, *PNAS*, 102, 16807-16812
- 16) Everall J. N. (2000) Confocal Raman microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think, *Appl. spectrosc.*, 54, 1515
- 17) Gaulitz G., Tuan V. D. eds. (2003) Handbook of spectroscopy, Wiley-VCh Verlag GmbH & Co., Weinheim
- 18) Hadegaard M., Matthaus C., Hassing S., Krafft C., Diem M., Popp J. (2011) Spectral unmixing and clustering algorithms for assesment of single cells by Raman microscopic imaging, *Theor. chem. acc.*, 130, 1249-1260

- 19) Harada Y, Ota T., Ping D., Yamaoka Y., Hamada K., Fujita K., Takamatsu T. (2008) Imaging of anticancer agent distribution by a slit scanning Raman microscope, *P. soc. photo-opt. ins.*, 6853, 1-5
- 20) Haka A. S., Shafer-Peltier K. E., Fitzmaurice M., Crowe J., Dasari R. R., Feld M. S. (2005) Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy, *PNAS*, 35, 12371-6
- 21) Hartmann K., Becker-Putsche M., Bocklitz T., Pachmann K., Niendorf A., Rosch P., Popp J. (2012) A study of docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy, *Anal. bioanal. chem.*, 403, 745-753
- 22) Hollricher O. (2010) Raman instrumentation for confocal Raman microscopy *In Confocal Raman microscopy*, pp. 43-60, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin
- 23) Hu S., Morris I. K., Singh J. P., Smith K. M., Spiro T. G. (1993) Complete assignment of cytochrom c resonance Raman spectra via enzymatic reconstitution with isotopically labeled hemes, *J. am. chem. soc.*, 115, 12446-12458
- 24) Huang W. E., Griffiths R. I., Thompson I. P., Bailey M. J., Whiteley S. A. (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells, *Anal. chem.*, 76, 4452-4458
- 25) Huang W. E., Karashima T., Yamamoto M., Hamaguchi H. (2005) Molecular-level investigation of the structure, transformation and bioactivity of single living fission yeast cells by time and space-resolved Raman spectroscopy, *Biochem. j.*, 44, 10009-10019
- 26) Chan J. W., Taylor D. S., Zwerdling T., Lane S. M., Ihara K., Huster T. (2006) Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells, *Biophys. j.*, 90(2), 648-656
- 27) Chan J. W., Fore S., Woghiu W. S., Huster T. (2008) Raman spectroscopy and microscopy of individual cells and cellular components, *Laser & photon 2(5)*, 325-349

- 28) Chan J. W., Taylor S. D., Zwerdling T., Lane S. M., Ihara K., Huser T. (2006) Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells, *Biophys. j.*, 90, 648-656
- 29) Chernenko T., Matthäus C., Milane L., Quintero L., Amiji M., Diem M. (2009) Label-free Raman spectral imaging of intracellular delivery and degradation of polymeric nanoparticle system, *J. am. chem. soc.*, 3, 3552-3559
- 30) Jolliffe T. I. (2002) Principal component analysis, Springer series in statistics, Springer-Verlag, New York
- 31) Kneipp J., Kneipp H., McLaughlin M., Brown D., Kneipp K. (2006) In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates, *Nano. lett.*, 6, 2225-2231
- 32) Kneipp K., Kneipp H., Itzkan I., Dassari R. R., Feld M. S. (2002) Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *J. phys-condens. mat.*, 14, 598-624
- 33) Kneipp J., Kneipp H., Rajadurai A., Redmond W. R., Kneipp K. (2009) Optical probing and paging of live cells using SERS labels, *J. Raman spectrosc.*, 40, 1-5
- 34) Kolesov B. A., Volkov O. V., Volkov V. V. (1996) Raman study of the structure of cobalcarborane complexes containing dicarbollide and dicarbacanastide ligands, *J. struct. chem.*, 37, 616-620
- 35) Krafft C., Dietzek B., Schmitt M., Popp J. (2012) Raman and coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy for biomedical applications, *J. biomed. opt.*, 17, 801 – 815
- 36) Krafft C., Knetschke T., Funk RHW, Salzer R. (2005) Identification of organelles and vesicles in single cells by Raman microscopic mapping, *Vib. spectrosc.*, 38, 85-93
- 37) Krafft C., Knetschke T., Funk RHW, Salzer R. (2006) Studie sof stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping, *Anal. chem.*, 78, 4424-4429

- 38) Koenen J., Hollricher O., Weishaupt K. (1998) Confocal Raman microscope *In* Confocal Raman microscope CRM200, Operating manual, pp 9-70, WITec, Wissenschaftliche Instrumente und technologie GmbH, Ulm, Germany
- 39) Lasch P., Diem M., Hänsch W., Naumann D. (2006) Artificial neuronal network as supervised techniques for FT IR microspectroscopic imaging, *J. chemometr.*, 20, 209-220
- 40) Lasch P., Naumann D. (1998) FT-IR microspectroscopic imaging of human carcinoma thin sections based on pattern recognition techniques, *Cell. mol. biol.*, 44, 189-202
- 41) Leites L. A. (1992) Vibrational spectroscopy of carboranes and parent boranes and its capabilities in carborane chemistry, *Chem. rev.*, 92, 279-323
- 42) Ling J., Weitman S. D., Miller M. A., Moore V. R., Bovik A. C. (2002) Direct Raman imaging techniques for study of the subcellular distribution of drug, *Appl. optics*, 41, 28, 6006-6017
- 43) Marković U. S., Stankov J. M., Antunović H. I., Durdević P. (2013) Raman spectroscopy as a new biochemical diagnostic tool, *J. med. biochem.*, 32, 1-4
- 44) Matthäus C., Chernenko T., Newmark J.A., Warner C.M., Diem M. (2007) Label-free detection of mitochondrial distribution in cells by nonresonant Raman microspectroscopy, *Biophys. j.* 93,668-673
- 45) Matthäus C., Bird B., Miljković M., Chernenko T., Romeo M. (2008) Infrared and Raman microscopy in cell biology, *Method cell. biol.*, 89, 275-308 A
- 46) Matthäus C., Chernenko T., Quintero L., Milan L., Kale A., Amij M., Torchilin V., Diem M. (2010) Raman micro-spectral imaging of cells and intracellular drug delivery using nanocarrier systems *In* Confocal Raman microscopy, pp. 137-162, Springer series in optical sciences, Springer, Berlin

- 47) Matthäus C., Chernenko T., Quintero L., Milan L., Kale A., Amij M., Torchilin V., Diem M. (2008) Raman microscopic imaging of cells and applications monitoring the uptake of drug delivery systems, *P. soc. photo-opt. ins.* , 6991, 699106-1-7 B
- 48) Matthäus C., Boydston-White S., Miljkovic M., Romeo M., Diem M. (2006) Raman and infrared microspectral imaging of mitotic cells, *Appl. spectrosc.*, 60,1-8
- 49) McCreery R. L. (2000) Raman spectroscopy for chemical analysis, New York, John Wiley
- 50) Miljkovic M., Chernenko T., Romeo M.J., Bird B., Matthäus C., Diem M. (2010) Label-free imaging of human cells: algorithms for image reconstruction of Raman hyperspectral datasets, *Analyst*, 135, 2001-2013
- 51) Motz J. T., Gandhi S. J., Haka A. S., Kramer J. R., Dasari R. R., Feld M. S. (2005) Real-time Raman system for *in vivo* disease diagnosis, *J. biomed. opt.*, 10
- 52) Naumann D. (2001) FT-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research, *Appl. spectrosc. rev.*, 36, 239-298
- 53) Neil E.J. (2008) Confocal Raman Microscopy : Performance, Pitfalls, and best practice, *Appl. spectrosc.*, 63, 245-262
- 54) Nithipatikom K., McCoy M.J., Hawi S., Nakamoto K., Adar F., Campbell W. (2003) Characterization and applications of Raman labels for confocal microspectroscopic detection of cellular components in single cells, *Anal. biochem.*, 322, 198
- 55) Pappas D., Smith B. W., Winefordner J. W. (2000), Raman spectroscopy in bioanalysis, *Talanta*, 51,131
- 56) Puppels J. G., De Mul M. F. F., Otto C., Greve J., Robert-Nicoud M., Arndt-Jovin D. J., Jovin M. T. (1990) Resonance Raman microspectroscopy in biology, *Nature*, 347, 301
- 57) Raman C.V., Krishnan K. S. (1928) A new type of secondary radiation , *Nature*, 121 (3048), p. 501



- 58) Řezáčová P., Pokorná J., Brynda J., Kožíšek M., Cígler P., Lepšík M., Fanfrlík J., Řezáč J., Šašková G. K., Siegllová I., Plšek J., Šícha V., Grüner B., Oberwinkler B., Sedláček J., Kräusslich J. G., Hobza P., Král V., Konvalika J. (2009) Design of HIV protease inhibitors based on inorganic polyhedral metallocarboranes, *J. med. chem.*, 52, 7132-7141
- 59) Scalfi-Haap C., Jauss A., Ibach W., Hollricher O., Fulda S., Hauser C., Steiner R., Ruck A. (2007) Confocal Raman microscopy as a diagnostic tool for investigation of living neuroblastoma tumour cells, *Med. laser appl.*, 22, 157-164
- 60) Scholtes-Timmerman M., Willemse-Erix D., Schut-Bakker B., van Belkum A., Puppels G., Maquelin K. (2009) A novel approach to correct a-specific variation in Raman spectra due to photo-bleachable cellular components, *Analyst*, 134, 387-393
- 61) Sijtsema N., Tibbe A., Nolten S.I., Verhoeven A., Weening R., Greve J., Otto C. (2000) Intracellular reactions in single human granulocytes upon phorbol myristate acetate activation using confocal Raman microspectroscopy, *Biophys. j.*, 78, 2606
- 62) Smith E., Dent G. (2005) Modern Raman spectroscopy: A practical approach, John Wiley and sons Ltd, Chichester, England
- 63) Tabaksblat R., Meier J. R., Kip J. B. (1992), *Confocal Raman* microspectroscopy: Theory and application to thin polymer samples, *Appl. spectrosc.*, 46, 60
- 64) Uzunbajakava N., Lenferic A., Kraan Y., Willekens B., Vrensen G., Greve J. (2003) Nonresonant Raman imaging of protein distribution in single human cells, *Biopolymers*, 72, 1-9
- 65) Uzunbajakava N., Lenferic A., Kraan Y., Volokhina E., Vrensen G., Greve J. (2003) Nonresonant confocal Raman imaging of DNA and protein distribution in apoptotic cells, *Biophys. j.*, 84, 3968-3981
- 66) Verrier S., Notingher I., Polak J., Hench L.L. (2004) In situ monitoring of cell death using Raman microspectroscopy, *Biopolymers*, 74, 157

- 67) Volkmer A., Book D. L., Xie S. X. (2002) Time-resolved coherent anti-Stokes Raman microscopy: Imaging based on Raman free induction decay, *Appl. phys. lett.*, 80, 1505-1508
- 68) Wachsman-Hogiu S., Weeks T., Huser T. (2009) Chemical analysis *in vivo* and *in vitro* by Raman spectroscopy – from single cells to humans, *Curr. opin. biotech.*, 20, 63-73
- 69) Winter M. E. (1999) N-FINDR: an algorithm for fast autonomous spectral end-member determination in hyperspectral data, *Imaging spectrometry*, 3753, 266-275
- 70) Wood B., Hammer L., Davis L., McNaughton D. (2005) Raman microspectroscopy and imaging provides insights into heme aggregation and denaturation within human erythrocytes, *J. biomed. opt.*, 10,
- 71) Wood B., McNaughton D. (2006) Resonance Raman spectroscopy in malaria research, *Expert rev. proteomic*, 3, 525
- 72) Wu C. C., Chen H. M., Chang C. I. (2012) Real time N-FINDR processing algorithms for hyperspectral imagery, *J. real-time image pr.*, 7, 105-129
- 73) Yang H. (2002) Discriminant analysis by neural network, *Handbook of vibrational spectroscopy*, Jon Wiley & Sons
- 74) Yang W., Xiao X., Tan J., Cai Q. (2009) *In situ* evaluation of breast cancer cell growth with 3D ATR-FTIR spectroscopy, *Vib. spectrosc.*, 49, 64-67
- 75) Yu C., Gestl E., Eckert K., Allara D., Irudayaraj J. (2006) Characterization of human breast epithelial cells by confocal Raman microspectroscopy, *Cancer detect. prev.*, 30, 515-522

## Seznam použitých zkratk

**CARS** – z *angl.* coherent anti-Stokes Raman scattering (koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl)

**CCD** – z *angl.* charged couple devices (zařízení s vázanými náboji)

**D-MEM** – z *angl.* Dulbecco's modified's medium

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina

**HCA** – z *angl.* hierarchical cluster analysis (hierarchická klastrová analýza)

**IC<sub>50</sub>** – z *angl.* half inhibitory concentration (poloviční inhibiční koncentrace)

**KMC** – z *angl.* k-mean cluster analysis (k-mean klastrová analýza)

**MCF-7** – buněčná linie adenokarcinomu prsu (z *angl.* Michigan cancer foundation-7)

**LDA** – z *angl.* linear diskriminant analysis (lineární diskriminantná analýza)

**PBS** – z *angl.* phosphate buffer saline (solný fosfátový pufr)

**PCA** – z *angl.* principal component analysis (analýza hlavních komponent)

**SERS** – z *angl.* surface enhanced Raman scattering (povrchově zesílený Ramanův rozptyl)

**U2OS** – buněčná linie lidského osteosarkomu

**VCA** – z *angl.* vertex component analysis (vrcholová analýza komponent)

**WD** – z *angl.* working distance (pracovní vzdálenost objektivu)