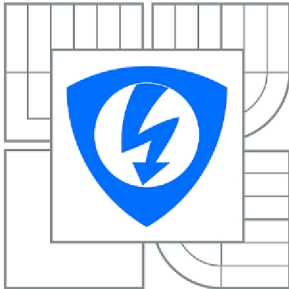




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

LOKALIZACE ŽELEZITÝCH NANOČÁSTIC VE VNITŘNÍCH ORGANELÁCH

FERROUS NANOPARTS LOCALIZATION IN INNER ORGANELLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

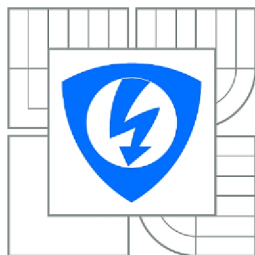
JAN SOLAŘ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor
Biomedicínská technika a bioinformatika

Student: Jan Solař

ID: 147498

Ročník: 3

Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Lokalizace železitých nanočástic ve vnitřních organelách

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

- 1) Prostudujte možnosti vizualizace organel krevní nebo firoblastové buňky pomocí konfokální mikroskopie. Zaměřte se na LysoTracker Green DND-26 a MitoFluo Far Red.
- 2) Prostudujte metody vizualizace mitochondrií ve fluorescenční mikroskopii a sestavte k dané oblasti literární rešerši.
- 3) Navrhněte postup vizualizace vnitřních organel mesenchymální nebo fibroblastové buňky pro studium lokalizace železitých nanočástic ve vnitřních organelách.
- 4) Použijte LysoTracker Green DND-26 a dle doporučeného postupu výrobce optimalizujte metodu značení lysozomů v buňkách tak, aby nebyla narušena jejich viabilita. Optimalizujte postup také pro MitoFluo Far Red, který bude využit pro vizualizaci mitochondrií. K uvedeným fluorescenčním barvám a indikátorům je možné použít i alternativu.
- 5) Inkubujte buňky se železitymi nanočásticemi značenými nanotečkami. S využitím konfokální mikroskopie lokalizujte značené částice a charakterizujte jejich prostorové rozložení v buňce.
- 6) Výsledky zhodnoťte a proveďte diskusi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

- [1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York 1993.
- [2] PAWLEY, J.: Handbook of Biological Confocal Microscopy. 3rd ed. Springer, 2006. ISBN-13: 978-0387259215.

Termín zadání: 10. 2. 2014

Termín odevzdání: 30. 5. 2014

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti bakalářské práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce popisuje chování železitých nanočástic v lidských mezenchymálních kmenových buňkách. V první části se zabývá metodou fluorescenčního značení organel a nanočástic a nastavením konfokálního mikroskopu pro jejich detekci. Dále je zde uveden popis metabolismu nanočástic a jejich akumulace v buňkách. V neposlední řadě se práce zabývá tvorbou softwaru pro lokalizaci a kvantifikační analýzu fluoreskujících organel a nanočástic v buněčných strukturách živých buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

železité nanočástice, konfokální mikroskop, fluorescenční značení, buňka, lysozom, mitochondrie, kolokalizace

ABSTRACT

This bachelor's thesis describes a behavior of iron nanoparticles in human mesenchymal stem cells. First section deals with methods of fluorescent labelling of organelles and nanoparticles and settings of confocal microscope for their detection. Next section describes the iron nanoparticles metabolism and accumulation in cells. Finally, there is a section about the development of the software utility for the localization and for the quantitative analysis of the fluorescence organelles and nanoparticles inside the living cells.

KEYWORDS

Iron nanoparticles, confocal microscopy, fluorescent labelling, cell, lysosome, mitochondria, colocalization

SOLAŘ, J. *Lokalizace železitých nanočástic ve vnitřních organelách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 84 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Lokalizace železitých nanočástic ve vnitřních organelách jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Vratislavovi Čmielovi za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále děkuji panu Mgr. Josefu Skopalíkovi z farmakologického ústavu MU za odborné konzultace a vynaložený čas.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

Seznam obrázků	x
Seznam tabulek	xiv
SEZNAM ZKRATEK	xvi
Úvod	1
1 Železité nanočástice	2
1.1 Charakteristika SPIO nanočástic	3
1.1.1 Magnetické vlastnosti SPIO nanočástic.....	3
1.1.2 Superparamagnetismus	4
1.1.3 Jednodoménovost.....	4
1.2 Struktura SPIO nanočástic	5
1.3 Využití v medicíně.....	6
2 Konfokální mikroskopie	8
2.1 Stavba.....	8
2.1.1 TSM – tandemový skenovací mikroskop	8
2.1.2 Laserový skenovací konfokální mikroskop	9
2.2 Fluorescence	10
2.3 Fluorescenční barviva – fluorofory.....	11
2.4 Rozdíl mezi světelným a fluorescenčním mikroskopem	12
2.4.1 Světelný mikroskop	12
2.4.2 Fluorescenční mikroskop	13
2.5 Rozdíl mezi fluorescenčním a konfokálním mikroskopem	14
2.6 Princip skenování vzorku konfokálním mikroskopem	15
2.7 Použitý konfokální mikroskop.....	16

3	Fluorescenční značení vybraných buněčných organel	17
3.1	Fluorescenční značení lysozomů	17
3.1.1	LysoTracker® Green DND-26	17
3.1.2	Cell Navigator™ Lysosome Staining Kit	18
3.2	Fluorescenční značení mitochondrií	18
3.2.1	Mitochondrie.....	19
3.2.2	Barvení mitochondrií	19
4	Metabolismus nanočástic v buňkách a jejich značení	22
4.1	Fluorescenční značení SPIO nanočástic	22
4.2	Použité buňky	23
4.2.1	Lysozomy.....	23
4.3	Metabolismus SPIO nanočástic v buňkách.....	24
4.3.1	Pronikání do buňky	24
4.3.2	Metabolismus.....	24
4.3.3	Toxicita SPIO	25
5	Testy fluoroforů	26
5.1	Test fluorescence lysozomů.....	26
5.2	Test fluorescence mitochondrií.....	28
5.3	Test fluorescence nanočástic	28
5.3.1	Detekce PEG nanočástic v buňce	30
6	Kolokalizace nanočástic a organel	31
6.1	Kolokalizace QCD a lysozomů.....	31
6.1.1	Další zkrácené statistiky pro QCD a lysozomy	33
6.2	Kolokalizace QCD a mitochondrií	34
6.2.1	Analýza kolokalizace mitochondrií a QCD	36
6.2.2	Analýza kolokalizace QCD a mitochondrií u dalších buněk	38
6.3	Kolokalizace FeNV-R a lysozomů - první metoda (původní spektrum	

barviva lyso RED)	38
6.3.1 Zkrácená statistika pro další buňky značené FeNV-R a zeleným lysozomálním barvivem.....	42
6.4 Kolokalizace FeNV-R a lysozomů – druhá metoda (upravené spektrum barviva lyso GREEN)	42
6.4.1 Zkrácená statistika pro další buňky značené FeNV-R a zeleným lysozomálním barvivem.....	44
6.5 Kolokalizace FeNV-R a mitochondrií	45
6.5.1 Analýza FeNV-R a mitochondrií u dalších buněk.....	47
7 Lokalizační software	48
7.1 Nastavení mikroskopu pro tvorbu vstupních dat	48
7.2 Zpracování a nastavení vstupních parametrů dat.....	48
7.3 Analýza kolokalizace z jedné roviny	51
7.4 Analýza kolokalizace z více rovin (z adresáře)	53
8 Diskuze a zhodnocení výsledků	54
8.1 Statistika společné detekce nanočástic a lysozomů	55
8.2 Statistika společné detekce nanočástic a mitochondrií	55
8.3 Porovnání průměrných obsahů železitých nanočástic v lysozomech a mitochondriích	56
9 Závěr	57
Literatura	59
Přílohy	65

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: snímky železitých nanočástic z elektronového mikroskopu. Jedná se o tři různé velikosti seřazené od leva: 9, 11 a 19 nm. Převzato z [1]	2
Obrázek 2: schéma SPIO nanočástice obalené polymerním obalem (P). Na obale jsou umístěny vazebné místa, pro navázání funkční skupiny. [38]	5
Obrázek 3: multifunkční využití magnetických nanočástic. DDS - drug delivery system - kontrolovaný přenos léčiv. Diagnostický prostředek - MRI kontrastní látka. Terapie - léčení nádoru teplem. Převzato z [39]	7
Obrázek 4: Tandemový konfokální mikroskop. Je vidět dva konjugované Nipkowovy kotouče. Převzato z [13]	9
Obrázek 5: Schéma laserového skenovacího mikroskopu. [12]	10
Obrázek 6: Princip fluorescence, je vidět vstupní excitované a výstupní emitované světlo. Převzato z [40]	11
Obrázek 7: Princip epifluorescenčního mikroskopu. Je zde patrná úloha všech důležitých částí. [18]	14
Obrázek 8: Leica TCS SP8 X. Převzato z [41]	16
Obrázek 9: excitační a emisní spektrum fluoroforu LysoTracker Green DND-26. Excitace je naznačena přerušovaně a emise plně. V obrázku je také naznačen excitační a emisní filtr a započítán rozdíl intenzity kvůli ztrátám laseru. Stokesův posun je cca 7 nm. Vygenerováno přes generátor fluorescenčních spekter [42]	18
Obrázek 10: Schéma technologie BacMan. Do DNA viru se vloží gen na tvorbu fluorescenčního proteinu a jako promotér je speciální ligand pro určitou buněčnou organelu. [43]	20
Obrázek 11: Spektrum fluoroforu MitoTracker Deep Red FM, který by mohl být dobrou variantou pro značení mitochondrií u této práce. Excitace má vrchol v 644 nm a emise v 665 nm. Vygenerováno z [42]	21
Obrázek 12: Syntéza fluorescenčně značených SPIO nanočástic. Základem je vazba fluoroforu Rhodamine nebo fluorescein kovalentně k látce zvané DMSA. 22	
Obrázek 13: excitační a emisní spektra barviva CellNavigator-LysozymeStainingKit	

red. [44].....	26
Obrázek 14: čas pozorování 0, jasně zřetelná fluorescence lysozomů na levé straně, na pravé straně je fluorescence v kombinaci s klasickým opt. mikroskopem ..	27
Obrázek 15: čas pozorování 10 hodin, jasný úbytek fluorescenčního barviva.....	27
Obrázek 16: Mitochondrie značená pomocí <i>cytopainter mitochondrial green</i> . Vidíme ukázkové „řetízky“, které tvoří MSC buňka v cytoplazmě kolem jádra.	28
Obrázek 17: : λ -scan železitých nanoteček. Vodorovná osa značí emisi a svislá excitaci v nm. Největší jas fluorescence ukazuje žluto-zelená barva přibližně uprostřed grafu.....	29
Obrázek 18: Srovnání fluorescence tří typů použitých nanočástic. a-QCD, b-FeNV-R, c-PEG. Rozdíly jasu mohou být způsobené jiným nastavením intenzity excitačních laserů. Vidíme, že tvarem jsou si QCD a FeNV-R podobné. PEG mají v buňce jiné uspořádání.....	30
Obrázek 19: Značení PEG nanočástic (červeně) v buňce. Je vidět slabá fluorescence a hromadění PEG do kulovitých útvarů.....	31
Obrázek 20: a) Spojené tři vstupní kanály (nanočástice červeně, lysozomy zeleně a průchozí světlo) b) Grafická lokalizace překryvu lysozomů a nanočástic. c) bílé jsou zvýrazněné pixely překryvu na obrázku a). Je vidět tendence nanočástic obklopovat zelené lysozomy, překryté pixely tvoří kruhové útvary. Rovina=1.....	32
Obrázek 21: Ukázka zpracování obrázků v Leica softwaru. Jedná se o spojení obrázků tří vstupních kanálů a úprava výstupu pomocí práhování. Je vidět podobný výsledek jako v Matlabu.	33
Obrázek 22: fluorescence mitochondrií před úpravou spekter. Vlevo je zelená fluorescence mitochondrií podle nastavení výrobce. Vpravo je původní spektrum nanočástic, které tam nyní nejsou a svítí stejné mitochondrie jako vlevo. Můžeme tedy vidět parazitní, falešnou fluorescenci, která je způsobena zásahem části jednoho spektra do druhého.	35
Obrázek 23: Samotné FeNV-R v MSC buňkách. Podlouhlé červené "řetízky" jsou mitochondrie, které vyznačil rhodamin. Skutečné FeNV-R jsou malé, kulaté útvary, což jsou shluky FeNV-R v lysozomech.....	36
Obrázek 24: Mitochondrie a QCD pro výše uvedenou statistiku. Zeleně jsou vyznačeny mitochondrie, červeně QCD. Modře jsou vyznačeny pixely překryvu. Je vidět, že i přes velké množství nanočástic je překryv minimální.	37

- Obrázek 25: Společné pozorování před úpravou spekter. Vlevo zelená fluorescence lysozomů, vpravo FeNV-R. Je vidět, až příliš nápadná podobnost, která byla způsobena přesvitěním zelené do červené. 39
- Obrázek 26: Zajímavý snímek dělicí se buňky. Zeleně jsou značeny lysozomy, pár červených pixelů značí samotné nanočástice a modře je vykreslena kolokalizace. Snímek je zachycen před úpravou spekter a je tedy možné, že došlo k určitému překryvu. Dělicí se buňka s relativně velkým obsahem nanočástic je důkazem, že nedošlo k toxikaci buňky. 40
- Obrázek 27: Grafické výsledky pro analýzu v tabulce 7. a) překryté vstupní kanály, b) kolokalizační pixely na průchozím světle, c) kolokalizační pixely překryté přes obrázek a. na obrázku b je krásně vidět, že nanočástice vytvořili v buňce hustou černou síť. Excitační laser nedokáže prosvítit tak hrubou strukturu a proto se z fluorescenčního pohledu zdá, že bylo v buňce nanočástic málo a možná proto, není kolokalizace vyšší než 61 resp. 22 %. 41
- Obrázek 28: Stejná miska jako v obrázku 24, ale nastavení spekter podle tabulky 6. Je vidět, že zelené lysozomy tvoří menší kuličky a nanočástice tvoří prostornější shluky a kuličky s větším jasnem pravděpodobně značí průnik do lysozomu. 42
- Obrázek 29: Pro ilustraci - obrázek stejné pozice jako v přechozím obrázku, ale jedná se transmisní světlo. I v klasickém optickém mikroskopu je jasně vidět, jak vypadá černá železitá nanočástice v buňce. 43
- Obrázek 30: a) Spojené tři vstupní kanály (nanočástice červeně, lysozomy zeleně a průchozí světlo) b) Grafická lokalizace překryvu lysozomů a nanočástic na průchozím světle. c) Modrý překryv na původním obrázku a. Je vidět, že nanočástice obsazují okrajový prostor buňky a nevstupují do jádra. Rovina=4, upravená spektra. 44
- Obrázek 31: Společná detekce FeNV-R (červeně) a mitochondrií (zeleně). Pár modrých pixelů značí pixely překryvu. Na obrázku je snímek 1. roviny buňky, která posloužila pro statistiku v tabulce 10. 46
- Obrázek 32: 3D zobrazení 10 rovin v Leica softwaru. Zeleně jsou značeny mitochondrie a červeně FeNV-R. Zde je kolokalizace značena oranžovou barvou. Je vidět, že nanočástice jsou umístěny zcela mimo mitochondrie a jádro. 46
- Obrázek 33: 3D zobrazení 10 rovin jiné buňky (Leica software). Stejně jako v předchozím obrázku jsou červeně barveny FeNV-R a žluto-zeleně

mitochondrie. Opět vidíme, že se nanočástice do mitochondrií převážně nedostaly. Buněčné jádro je rovněž bez nanočástic.	47
Obrázek 34: Ukázka nastavování detektorů v Leica softwaru. V tomto případě je zapnut fotonásobič 2 (emisní filtr 500-540 nm), hybridní detektor 3 (emisní filtr 580-650 nm) a fotonásobič pro detekci prošlého světla.	49
Obrázek 35: Ukázka výběru prahu v okně GUIDE. Vidíme možnost volby mezi automatickým a manuálním výběrem prahu pro organely i nanočástice.	50
Obrázek 36: Ukázka volby oblasti výpočtu. Je vidět panel pro výběr výběrového nástroje. Zelené dolní tlačítko aktivuje začátek kreslení a při stisku klávesy <i>enter</i> se spustí další výpočty. Nahoře je vidět editovací pole pro vypsání hrany obrázku v reálném rozměru.	51
Obrázek 37: Ukázka výstupní tabulky kolokalizační analýzy z jedné roviny. Vidíme zelené tlačítko pro otevření okna s výběrem výstupních obrázků a žluté tlačítko pro aktualizaci hodnot v tabulce.	52
Obrázek 38: Ukázka rozřídění vstupů na jednotlivé trojice.	53

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Analýza nanočástic a lysozomů pomocí programu v Matlabu. Hodnoty jsou sečteny (zprůměrovány) pro všechny roviny (viz kap. 2.6) a tím vytváří objektivní hodnocení celého objemu buňky – aproximace rovin. Práh zvolen manuálně. 32
Tabulka 2: Čtyři různé buňky ve dvou různých miskách. Jedná se o výběr analýzy QCD a lysozomů v prostředí Matlab. Volba prahu je manuální, podle tvaru struktur. Vybraná byla vždy jedna buňka pomocí nástroje imfreehand a analýza proběhla aproximací všech rovin buňky. 33
Tabulka 3: Nastavení excitačně-emisního spektra pro použité zelené mitochondriální barvivo. Vidíme nutnost posunutí emisních vlnových délek nanočástic na vyšší hodnoty. 34
Tabulka 4: Statistika QCD nanočástic a mitochondrií v oblasti jedné vybrané buňky. . 37
Tabulka 5: Výsledky kolokalizace QCD a mitochondrií pro 4 náhodné buňky. 38
Tabulka 6: Úprava spekter pro společné pozorování zeleného lysozomálního barviva a FeNV-R nanočástic 39
Tabulka 7: Analýza společného značení lysozomů podle výrobcem doporučeného spektra a FeNV-R nanočástic..... 41
Tabulka 8: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green. Analýza proběhla před úpravou spekter a tak mohou být hodnoty znehodnoceny. Je vidět silná saturace nanočástic, přičemž je ještě dost lysozomů volných. Analýza proběhla aproximací všech rovin buňky. 42
Tabulka 9: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green. Nanočástice byly kultivovány 24 hodin, lysozomy byly barvené 40 minut. Je vidět, že 2/3 lysozomů jsou již obsazené nanočásticemi a spousta nanočástic je ještě v cytoplazmě. Tato obrovská saturace byla viditelná i na obrázku 21. Práh byl zvolen manuálně a analýza proběhla aproximací všech rovin buňky.... 43
Tabulka 10: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green. Jedná se o měření s upravenými spektry, bez překryvu. Povedlo se nasnímat jen dvě buňky v 10 rovinách. U buňky 2 došlo zřejmě k chybnému nastavení parametrů. Analýza proběhla aproximací všech rovin buňky..... 44

Tabulka 11: Analýza společné detekce mitochondrií a FeNV-R nanočástic. Výsledky jsou aproximací všech rovin.	45
Tabulka 12: Analýza detekce FeNV-R a mitochondrií současně u čtyř náhodných buněk.....	47
Tabulka 13: Společné vyhodnocení tabulek 1, 2, 7, 8, 9, 10.	55
Tabulka 14: Společné vyhodnocení tabulek 4, 5, 11 a 12	56
Tabulka 15: Společné srovnání tabulky 13 a 14.	56

SEZNAM ZKRATEK A POJMŮ

SPION - Superparamagnetic iron oxide nanoparticles

SPIO - Superparamagnetic iron oxide

NMR, MRI – Nukleární magnetická rezonance

KM - Konfokální mikroskop

TSM - Tandemový skenovací (konfokální) mikroskop

LSKM - Laserový skenovací konfokální mikroskop

SM - světelný mikroskop

FM - Fluorescenční mikroskop

TFM - transmisní fluorescenční mikroskop

EM - epifluorescenční mikroskop

MSC - mezenchymální kmenové buňky

DMSA - dimercaptosuccinic acid

PLL - poly-L-lysine

FeNV – R - SPIO nanočástice s rhodaminem

PEG - uhlíkové kvantové tečky

QD – kvantové tečky

QCD – SPIO nanočástice obalená uhlíkovými kvantovými tečkami

ÚVOD

Cílem této práce je optimalizovat metodu pro detekci železitých nanočástic v buňkách a poté zjistit jaké chování v buňkách vykazují. Moderní věda klade na nanočástice velký důraz a není se čemu divit. Nanočástice mají široké spektrum využití v různých oborech a právě železité nanočástice mají obrovskou perspektivu v medicíně. Jejich využití již nyní vidíme v oblasti nádorové léčby, dále v transportu léčiv na přesně dané místo, regenerativní medicíně, kontrastních látek pro MRI apod. Neprobádanou oblastí stále zůstává přesný osud nanočástic uvnitř buňky, jejich průnik do vnitřních organel a s tím spojená destrukce některých částí (např. nebezpečí rozpadu mitochondrií nebo komplexů DNA v jádře).

Tato práce se zaměřuje na teoretický rozbor a přípravu praktického experimentu pro detekci železitých nanočástic v buňce a vnitřních organelách pomocí konfokálního mikroskopu umístěném na ústavu biomedicínského inženýrství FEKT VUT Brno. Z důvodu složitosti snímání při tvoření obrazu buňky je v této práci teoreticky popsána funkce konfokálního mikroskopu. Pro použití s konfokálním mikroskopem jsou využity speciální, experimentální fluoreskující nanočástice vytvořené na spolupracující UP Olomouc. Tyto nanočástice nejsou komerčně dostupné a proto bylo potřeba zjistit jejich fluorescenční vlastnosti. Zkoumá se zachytávání nanočástic buňkou, procentuální vyjádření lokalizace v jednotlivých organelách a případná toxicita. Pro tyto účely používáme mezenchymální kmenové buňky izolované ve spolupráci s farmakologickým ústavem MU Brno.

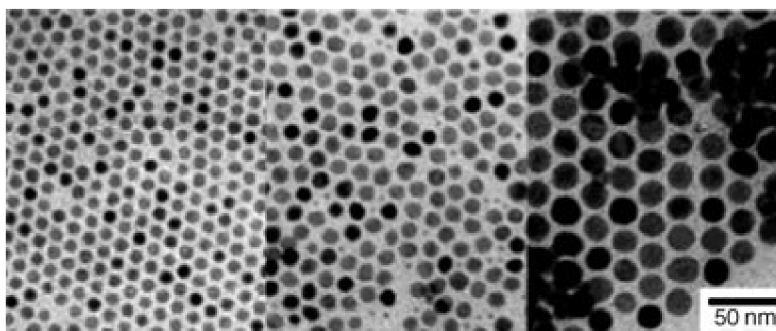
Jako první bylo potřeba provést rozsáhlou literární rešerši a zjistit jakým způsobem se fluorescenčně značí jednotlivé organely a nanočástice a jak nastavit konfokální mikroskop pro jejich detekci. Železitá nanočástice má specifické magnetické vlastnosti, které se využívají např. pro medicínské aplikace a mohou ovlivňovat jejich fluorescenční značení, a proto jsou v této práci teoreticky popsány. Dále bylo potřeba zjistit jak se nanočástice v buňkách chovají a ujasnit si postup pro jejich kolokalizaci s organelami. Pro ujištění, že výsledky mají objektivní hodnotu, provádíme několik pozorování, aby se dalo jednoznačně říct, jak se nanočástice v buňkách chovají.

Zjednodušeně se tedy dá říci, že je sledováno chování nanočástic *in vitro* na pozadí intracelulárních buněčných organel. V praktické části jsou shrnuty výsledky z mikroskopického pozorování vnitřních buněčných struktur a nanočástic do statistiky, je vytvořen program pro automatickou detekci nanočástic v jednotlivých organelách a pro číselné vyhodnocení.

1 ŽELEZITÉ NANOČÁSTICE

Pokud se podíváme blíže na termín nanočástice, zjistíme, že neexistuje jednotná definice tohoto slova. V některých zdrojích narazíme na určení velikosti nanočástice od 1 do 10 nm a v některých narazíme na definici od 1 do 1000 nm. Navíc se často setkáváme s dalším dělením nanočástic a to podle typu, povaze materiálu, možnosti použití apod. Často se taky můžeme setkat s tím, že pokud autor neví, jestli daná částice je vyloženě nanočásticí, tak použije termíny jako je: jemná, resp. ultrajemná částice, koloid, submikrometrová částice apod. Čím menší nanočástice je použita, tím více se projeví unikátní optické, elektrické nebo magnetické vlastnosti. Proto se v praxi používají nanočástice o velikosti 10 – 50 nm, přičemž u nanočástic s rozměry přes 50 nm se hledané unikátní vlastnosti už vytrácí. [1]

Železité nanočástice jsou částice magnetické. V praxi rozeznáváme tři typy nanočástic železa: 1.) VSOP (very small superparamagnetic iron oxide particles) o rozměru < 10 nm, 2.) USPIO (ultrasmall superparamagnetic iron oxide), které mají rozměr kolem 20. nm a 3.) SPIO, resp. SPION - superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Velikost SPIO nanočástic se pohybuje v rozmezí 30-100 nm. Tento třetí typ se v medicínských aplikacích používá nejvíce, zejména kvůli nízké toxicitě, vysoké saturaci a citlivosti magnetizace. [2], [3] Pro účely této práce se dále budou zmiňovat jen SPIO nanočástice.



Obrázek 1: Snímky železitých nanočástic z elektronového mikroskopu. Jedná se o tři různé velikosti seřazené od leva: 9, 11 a 19 nm. Převzato z [1]

1.1 Charakteristika SPIO nanočástic

Přestože známe spoustu oxidů železa a spoustu hydroxidů železa, v praxi využíváme pouze dva typy SPIO nanočástic a to jsou: maghemit - $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ a magnetit Fe_3O_4 . Obě tyto látky mají velice důležité vlastnosti, jedná se o superparamagnetismus a jednodoménovost. [4]

1.1.1 Magnetické vlastnosti SPIO nanočástic

Všechny existující látky vykazují určité magnetické vlastnosti. Rozdělujeme tři hlavní skupiny látek podle magnetických vlastností: diamagnetismus – jedná se o látky se zápornou magnetickou susceptibilitou, paramagnetismus – látky s magnetickou susceptibilitou mezi 0 a 1 a ferromagnetismus, kde mag. susceptibilita je větší než jedna. [5]

Magnetická susceptibilita se dá vyjádřit vztahem (1):

$$\chi_m = \frac{M}{H} \quad (1)$$

Kde M je magnetizace a H je intenzita magnetického pole, (1) se uvádí v jednotkách $\frac{\text{A}}{\text{m}}$. [5]

Mezi látky *diamagnetické* řadíme hlavně nekovy, organické látky nebo např. plazmu. Tyto látky zeslabují vnější magnetické pole, protože díky párovaným elektronům vykazují trvalý, nulový magnetický moment. *Paramagnetické* látky vykazují magnetismus v okolí vnějšího mag. pole, jsou tedy tímto polem přitahovány. V nepřítomnosti vnějšího mag. pole mají magnetické momenty náhodně orientované a výsledný mag. moment je tedy nulový. Při kontaktu s vnějším mag. polem se magnetické momenty natočí ve směru tohoto vnějšího mag. pole a výsledný mag. moment je také orientován ve směru tohoto vnějšího mag. pole. Vnější magnetické pole je tedy při paramagnetismu slabě zesilováno. Příkladem paramagnetické látky je hliník, vápník sodík apod. Při *ferromagnetismu* je také bez přítomnosti vnějšího mag. pole natočení mag. momentů náhodné, nicméně tyto látky obsahují tzv. magnetické domény a značně zesilují vnější mag. pole. Navíc při odpojení od vnějšího mag. pole, zůstává látka částečně zmagnetizována. Ferromagnetické látky tedy mohou vykazovat tzv. spontánní magnetizaci, záleží na intenzitě vnějšího mag. pole a teplotě. Mezi ferromagnetické látky patří také zvláštní typ látek, kterým jsou *ferrimagnetické* látky (ferrity). Rozdíl mezi nimi je, že ferromagnetické látky vykazují lineární chování a

ferrimagnetické látky nelineární chování a hysterezi (ferrimagnetické látky nevykazují znaky Curie-Weissova zákona nad Curieovou teplotou přechodu). Příklady ferromagnetických látek jsou železo, kobalt a nikl. Mezi ferrity řadíme sloučeniny Fe_2O_3 a další látky např. BaO nebo SrO. [5], [6]

1.1.2 Superparamagnetismus

Při zmenšování velikosti železité částice do nano rozměrů se klasické ferromagnetické vlastnosti železa velice pozoruhodně mění a vzniká tzv. superparamagnetismus. Tímto radikálním snížením velikosti dochází ke kvantovému omezení pohybu elektronů, zvýšení počtu atomů na povrchu nanočástice a rozpadu krystalové symetrie na povrchu nanočástice. Toto prostorové „nahuštění“ dále vede k zeslabení výměnných interakcí mezi magnetickými momenty jednotlivých atomů na povrchu těchto nanočástic. [6]

Velmi důležité změny nastávají s anizotropní energií, která určuje tzv. magnetickou energii, vytváří magnetické osy a tím určuje uspořádanost mag. materiálu. U běžného železa je anizotropní energie dostatečná k udržení stabilního stavu, zatímco u nanočástic se tato energie blíží k energii teplotních fluktuací. Tyto energie mezi sebou „soutěží“ a „předbíhají se“. V praxi to znamená, že energie teplotních fluktuací může samovolně překlopit směr magnetizace z jednoho směru do druhého a naopak, bez přítomnosti vnějšího mag. pole. Průměrný čas, mezi jednotlivými změnami těchto směrů určuje tzv. *relaxační čas*: [6], [7], [8]

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (2)$$

τ_0 - časová konstanta materiálu

ΔE – rozdíl mezi anizotropní energií a energií teplotních fluktuací

K_B – Boltzmannova konstanta

T – teplota

1.1.3 Jednodoménovost

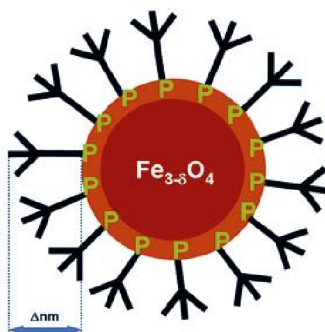
Klasické ferromagnetické železo má své atomy uspořádány do magnetických domén, tzv. Weissových domén. V těchto doménách mají všechny atomy své mag. momenty shodně orientovány, nicméně domény jako takové jsou orientovány různě, což souvisí se zákonem zachování energie. Při tvoření SPIO nanočástic se rozměry železité částice tak rapidně snižují, že již není energeticky výhodné tvořit více domén, ale mag.

nanočástice zůstávají v jednodoménové podobě. [5], [6]

Všechny atomy SPIO nanočástice tedy mají v jedné doméně stejný směr magnetických momentů a tím, že jsou atomy blízko sebe tak jejich magnetické momenty spolu „kooperují“ a tím utváří obrovský magnetický moment SPIO nanočástice jako celku. Výsledný mag. moment se pohybuje řádově v tisících až desetitisících Bohrových magnetonů¹ a díky tomu se SPIO nanočástice využívají jako kontrastní látka při NMR. [6]

1.2 Struktura SPIO nanočástic

Základní struktura SPIO nanočástic sestává obvykle z jádra a polymerního obalu, na kterém mohou být navázány další látky, záleží na konkrétním využití. Jádro je složeno z oxidu železitého nebo železnatého, jehož velikost ovlivňuje magnetické vlastnosti popsané výše. Obal se používá jednak kvůli hydrodynamickým vlastnostem SPIO nanočástic, tzn. „aby mohly SPIO nanočástice volně plout v krvi na cílové místo“ a také kvůli tomu aby se neshlukovaly a volně se rozpustily. Dále se na polymerní obal někdy přidávají ligandy – např. léčiva pro „magnetický“ transport léčiv na cílové místo. Obaly mohou být tvořeny umělými polymery (např. polyethylenglykol (PEG)), přírodními polymery (např. dextran) nebo mastnými kyselinami, jako je např. kyselina palmitová. [8], [10]



Obrázek 2: Schéma SPIO nanočástice obalené polymerním obalem (P). Na obale jsou umístěny vazebné místa, pro navázání funkční skupiny. [38]

¹ Bohrov magneton je konstanta pro magnetický moment elektronu, jeho hodnota je:

$$\mu_B = 9,274 \times 10^{-24} \frac{J}{T} [9]$$

1.3 Využití v medicíně

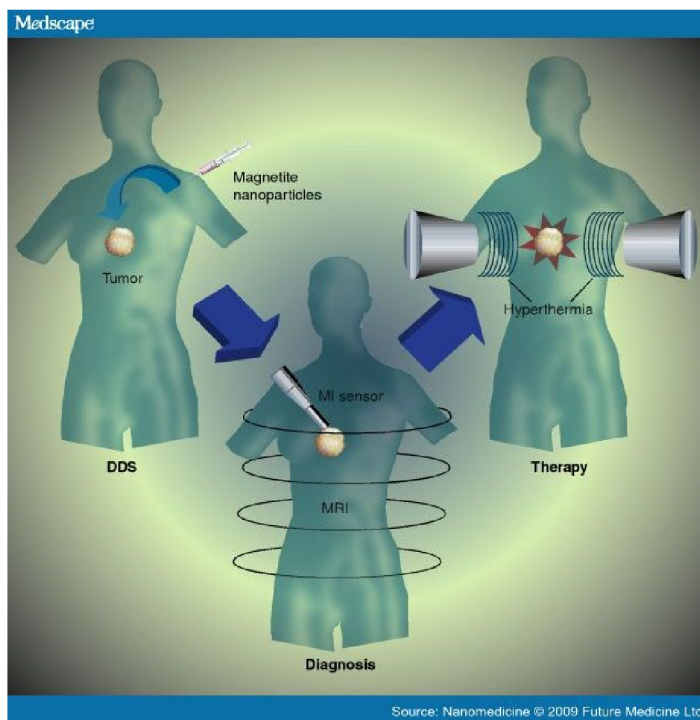
SPIO nanočástice mají mnoho využití jak při aplikaci *in vitro*, tak při aplikaci *in vivo*. Základní myšlenkou těchto aplikací je využití magnetických vlastností SPIO nanočástic a využití možnosti vázat na obal biologicky aktivní látky.

V *in vitro* aplikacích se nejčastěji potřebují oddělit určité, něčím specifické buňky ze vzorku mnoha buněk. Takovému postupu se říká magnetická separace. Proveďte se navázání určitého antigenu na obal SPIO nanočástice a suspenze těchto nanočástic se stříkne do vzorku buněk. Antigen SPIO nanočástice se naváže na specifickou protilátku např. nádorových buněk. Poté se využije magnetické pole, které oddělí SPIO nanočástice s navázanými rakovinovými buňkami mimo vzorek. Podobně se dají ve vzorku značit specifické buňky nebo patogeny a následně hledat jejich umístění na MRI nebo v mikroskopu apod. [4], [8]

In vivo aplikace jsou známější. Jedná se o transport léčiv, kontrastní značení pro MRI nebo hypertermické ničení nádorových buněk. Transport léčiv je vynikající alternativa pro použití chemoterapie nádorového onemocnění. Při chemoterapii, která se nejčastěji provádí intravenózně, se lék v krvi dostane do všech buněk v těle a na tyto buňky má toxické účinky. Proto se používá biokompatibilní SPIO nanočástice s navázaným cytotoxickým lékem, tzv. ferrofluid. Tyto SPIO nanočástice se do místa nádoru cíleně vedou magnetickým polem s velkým gradientem a zde se různými způsoby (změna teploty, pH, osmolality nebo enzymaticky apod.) uvolní léčivo ze SPIO nanočástice. [4], [8], [11]

Hypertermické ničení nádorových buněk je v současné době ve fázi klinických testů. [8] Doprava buněk na cílové místo probíhá stejně jako u předchozích metod – pomocí vysoce gradientního mag. pole. Jakmile jsou SPIO nanočástice dopraveny do místa nádoru, provádí se ničení nádoru pomocí teploty. Bylo zjištěno, že pro ničení nádorových buněk bude dostačující teplota 42 °C s časem zahřívání 30 min. Principem generace tepla je využití vnějšího, silného, střídavého magnetického pole o určité intenzitě a frekvenci nebo laserového záření. Teplo se po aplikaci laseru generuje na základě absorpce elektromagnetického záření, čímž se zvýší celková energie v tkáni, která se projeví zvýšením teploty. U magnetického zdroje je principem elektromagnetická indukce. Vnější magnetické pole generuje v nanočásticích střídavé elektrické pole. Kvůli odporu železitých nanočástic se v nich u vyšších proudů generuje teplo. Menší část tepla se v nanočásticích generuje v důsledku hysterezních ztrát. Použitá frekvence a amplituda magnetického pole se pohybuje v rozmezí $f = 0.05 - 1,2$ MHz a $H = 0 - 15$ kAm⁻¹ podle konkrétního nádoru. V současné době se hledá

optimální poměr mezi výkonem aplikovaného magnetického pole a koncentrací vstříkovaných nanočástic. [4], [11]



Obrázek 3: Multifunkční využití magnetických nanočástic. DDS - drug delivery system - kontrolovaný přenos léčiv. Diagnostický prostředek - MRI kontrastní látka. Terapie - léčení nádoru teplem. Převzato z [39]

2 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Konfokální mikroskop (KM) je speciální druh světelného mikroskopu. V klasickém světelném mikroskopu projde běžné, polychromatické, viditelné světlo z lampy přes vzorek a objektiv do okuláru. Výsledkem je zvětšený obraz, který reprezentuje transmitanci prošlého světla. KM využívá jako zdroj světla laser a na základě fluorescenčního jevu, snímá po řádcích emitované světlo ze vzorku. Díky tomu, že můžeme tyto optické řezy posunovat i v rovině Z (rovina hloubky obrazu), tak nám nevadí pozorovat i tlustší vzorky, se kterými měl klasický mikroskop problém. KM nemá tak velkou rozlišovací schopnost jako elektronový mikroskop, ale má ji mnohem vyšší než klasický optický, resp. fluorescenční mikroskop. Dá se tedy říci, že v historii mikroskopů je KM mezičlánek mezi optickou a elektronovou mikroskopií, přesto dokáže většinou KM snímat funkční buněčné struktury lépe a přehledněji.

2.1 Stavba

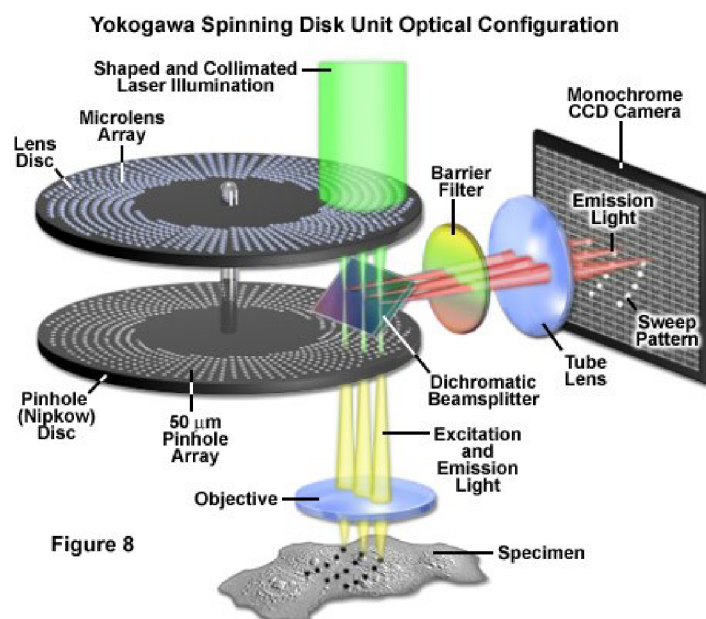
Objev konfokálního mikroskopu datujeme na rok 1957 panu Marvinu Minskému. Ve své době nenašel vhodný zdroj světla, a proto se stvoření prvního funkčního KM přisuzuje dvou Čechům: M. Petráňovi a M. Hadravskému, kteří ho vymysleli v roce 1967 na LF v Plzni. Jejich přístroj je jedním ze dvou základních druhů KM a to konkrétně tandemový skenovací (konfokální) mikroskop (TSM). Druhým, modernějším typem je LSKM (Laserový skenovací konfokální mikroskop). U obou těchto KM je zdrojem světla laser. [12], [13]

2.1.1 TSM – tandemový skenovací mikroskop

Ze zdroje laseru svítí monochromatické světlo o určité vlnové délce. To dále prochází tzv. Nipkowovým kotoučem² a dichroickým zrcadlem, a dopadá přes objektiv na vzorek. Zde se provede excitace na vyšší energetický stav a nové emitované fotony se odrazí přes dichroické zrcadlo na čočku a z ní na fotonásobič. Zpravidla jsou zde umístěny dva nipkowovy kotouče – jeden před dichroickým zrcadlem a druhý za ním. Vstupní laserové světlo a emitované světlo jsou v těchto discích v jednotlivých bodech konjugovány a tím tedy v živém čase skenovány po bodech. [14]

² Deska kruhového tvaru, která obsahuje několik desítek až stovek tisíc miniaturních děr uspořádaných do Archimédova kotouče. Tento disk rotuje velkou rychlostí a tím se z emitovaného světla berou pouze určité body. [14]

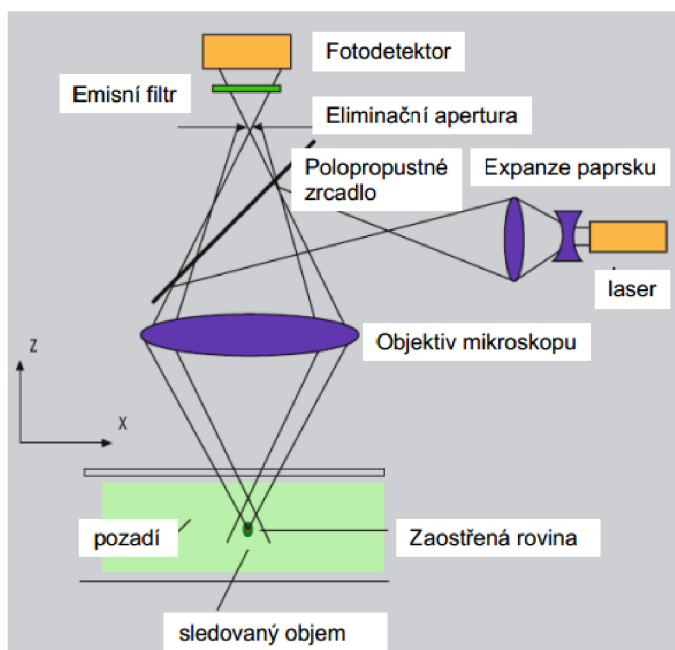
Výhoda TSM oproti LSKM je v rychlosti. Pokud potřebujeme snímat krátkodobé, velmi rychlé děje v buňkách, je vhodnější použít TSM. [14]



Obrázek 4: Tandemový konfokální mikroskop. Je vidět dva konjugované Nipkowovy kotouče. Převzato z [14]

2.1.2 Laserový skenovací konfokální mikroskop

Podobně jako u TSM se bodový laserový paprsek dostává přes dichroické zrcadlo a objektiv na vzorek. Zde se emituje světlo o vyšší vlnové délce a postupuje odrazem od dichroického zrcadla na dírkovou clonu a emisní filtr do okuláru (fotonásobiče). Rastrování bod po bodu je zajišťováno: pohybem podložky, pohybem zdroje laseru, pohybem zrcadla nebo jejich kombinací. Software potom přiřazuje ke každé souřadnici určitého bodu jejich hodnotu amplitudy jasu a propojí body do obrazu. [12], [13]



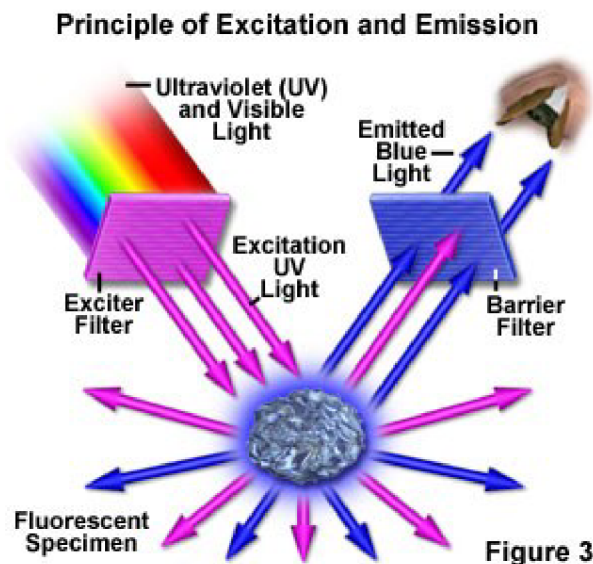
Obrázek 5: Schéma laserového skenovacího mikroskopu. [13]

2.2 Fluorescence

Základní vlastností KM pro biologické účely je fluorescenční jev. Fluorescence je společně s fosforescencí typ luminiscence (konkrétně fotoluminiscence). *Luminiscence* je jev, při kterém mají určité chemické látky schopnost samovolně vyzařovat fotony světla nad jejich tepelným vyzařováním. Těmto speciální chemickým látkám říkáme luminofory (resp. fluorofory). Aby k tomuto jevu došlo, musíme vybudit atomy luminoforu ze svého základního energetického stavu do stavu excitovaného. Elektrony se pak následně samovolně vrací zpět do svých původních hladin a přebytečnou energii vyzáří ve formě fotonů. Nové tzv. emisní světlo má vždy větší vlnovou délku, než původní (excitační) světlo. Tomuto posunu vlnové délky se říká *Stokesův posun* a je zapříčiněn ztrátami energie, při přecházení elektronů mezi excitační a emisní hladinou. Luminiscenci rozdělujeme, podle typu excitačního záření. Nejznámější je právě fotoluminiscence (kam patří fluorescence a fosforescence), kde je zdrojem excitačního záření foton světla. Existují další druhy: elektroluminiscence (zdrojem exc. záření je elektrické pole), termoluminiscence (zdrojem exc. záření je teplo) apod. [14]

Rozdíl mezi fluorescencí a fosforescencí je v typu energetického přechodu. Při Fluorescenci nastává excitace spontánními přechody. U fosforescence se při excitaci uplatňuje tzv. metastabilní hladina, která zapříčiní prodloužení emise. Z praktické

stránky je fluorescence velmi rychlý děj, kdy se doba emise po vypnutí zdroje pohybuje řádově v nanosekundách (10^{-8} s). Fosforescence je naopak děj s delším trváním emise. [15]



Obrázek 6: Princip fluorescence, je vidět vstupní excitované a výstupní emitované světlo. Převzato z [40]

2.3 Fluorescenční barviva – fluorofory

Jak již bylo řečeno, fluorofory jsou látky, které mají schopnost fluorescence. Dělíme je do dvou základních tříd: vnitřní a vnější. Vnitřní fluorofory jsou ty, které se vyskytují v organismu (resp. buňkách) přirozeně a říkáme, že se jedná o vlastní fluorescence. Vnitřní fluorescence je pozorována převážně u fytoplanktonu (pigmenty řas a sinic), vlastní fluorescence vykazuje také zelený fluorescenční protein (z angličtiny GFP), který se získává z bioluminiscenčních medúz *Aequorea victoria*. U biosenzorů se pracuje s vlastní fluorescencí některých enzymových kofaktorů, jako je např. NADH apod. [15]

U konfokální a fluorescenční mikroskopie se uplatňují především vnější fluorofory a vzniká jev zvaný nevlastní fluorescence. Rozdělujeme je podle toho, jak se váží ke vzorku. Dle české literatury [16] se nevlastní fluorescence rozděluje podle typu vazby fluoroforu na vzorek. Pokud se váže kovalentně, nazýváme je *fluorescenční značky* a pokud se fluorfor váže nekovalentně, nazýváme jej *fluorescenční sonda*. U kovalentních se reaktivní skupina fluoroforu spojuje s aminovým, sulfhydrolovým nebo histidinovým postranním řetězcem proteinu. Fluorescenční značky se využívají pro imunofluorescenční metody. Často se využívá specifických interakcí antigen/protilátka a proto toto použití se využívá např. spojení avidin-biotin nebo protilátka-hapten. Jako

protilátka/antigen poslouží látka, kterou hledáme (protein, léčivo, polynukleotid, polysacharid, receptor). Tento analyt označíme biotinem nebo haptenem a před aplikací fluorescenčního mikroskopu přivedeme fluorescenčně značený avidin nebo protilátku k haptenu. Tím se nám fluorescenční značka „rozsvítí“ jen v místech kde se protilátka navázala na antigen, resp. jen v místech kde je náš hledaný analyt. Pro imunofluorescenční značkování se nejznámější fluorescenční značky jmenují fluoresceinizothiokyanát (FITC) a tetrametylrhodaminizothiokyanát (TRITC). [15], [16]

Fluorescenční sondy se využívají např. pro fluorescenční značení membrán. Tyto membránová barviva se vážou na nepolární uhlovodíkové řetězce (zbytky mastných kyselin). Jako příklad těchto membránových fluorescenčních sond můžeme uvést: mastná kyselina cis-parinaric, fluorescenčně značené fosfolipidy, sfingolipidy apod. Dále se pro značení membrán využívají látky jako je např. DPH (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) nebo 1,8-ANS (1-anilinonaftalén-8-sulfonová kyselina) apod. Další velké využití fluorescenčních sond je značení nukleových kyselin. Příkladem těchto sond můžou být: akridinová oranž, ethidium bromid, propidium jodid, Hoechst 33342, 4',6'-diamidino-2-fenylindol dihydrochloride (DAPI) apod. Fluorescenční sondy se používají také pro fluorescenční spektroskopii. [15], [16]

Tato kapitola je pouze výběr pár typů fluoroforů, pospáním všech by byl značně překročen rozsah této práce.

2.4 Rozdíl mezi světelným a fluorescenčním mikroskopem

2.4.1 Světelný mikroskop

Klasický *optický mikroskop* je založen na principu sledování prošlého světla vzorkem. U klasického světelného mikroskopu (SM) je zdroj světla pod vzorkem, u inverzního je nad vzorkem. Světlo jde po projití vzorkem přes objektiv, kde vznikne převrácený, lehce zvětšený obraz a pak jde světlo do okuláru, kde pozorujeme konečný, zvětšený obraz (okulár funguje podobně jako lupa). Celkově zvětšení je dáno součinem zvětšení objektivu a okuláru. Velice důležitá je rozlišovací schopnost objektivu, protože limituje minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů a okulár pouze zvětšuje rozměr obrazu podobně jako lupa, ale nezlepšuje jeho detaily. Používáme většinou neměnné okuláry se zvětšením 20-25. Minimální vzdálenost dvou rozlišitelných bodů neboli rozlišovací schopnost mikroskopu R se počítá podle: [17]

$$R = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} \quad (3)$$

0,61 – optická konstanta používaná pro mikroskopy

λ - vlnová délka použitého světla

NA = numerická apertura objektivu

$$NA = n \cdot \sin\alpha \quad (4)$$

n index lomu prostředí před objektivem

α polovina otvorového úhlu kužele paprsků, které mohou vstoupit do objektivu

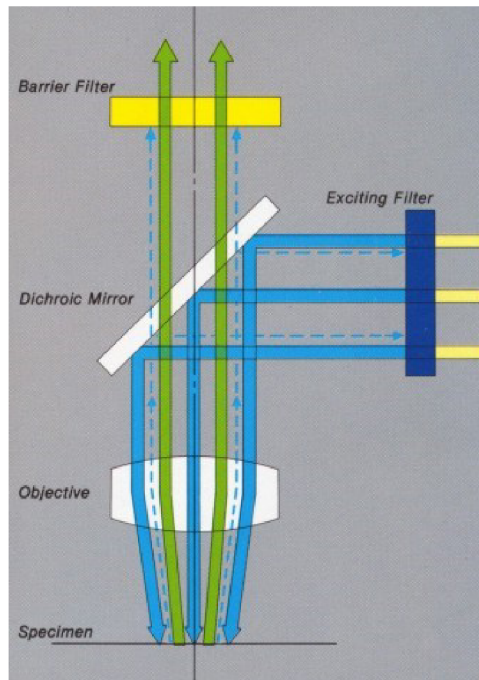
2.4.2 Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop (FM) je vhodný pro pozorování funkčních částí buňky pomocí speciálních specifických fluoroforů. Pokud bychom světelným mikroskopem chtěli pozorovat např. průhledné buňky tak bychom neviděli skoro žádné detaily a těžko bychom rozlišili buněčné struktury. Při použití specifických barviv např. kalceinu, vidíme ve fluorescenčním mikroskopu pouze živé struktury membrán buněk. [18], [19]

Největší rozdíl mezi SM a FM je v uspořádání optické soustavy. Známe dva typy FM a to *transmisní fluorescenční mikroskop (TFM)* a *epifluorescenční mikroskop (EM)*. U obou těchto typů jsou zásadní dvě součástky – excitační a bariérový filtr. Excitační filtr slouží k tomu, aby se z polychromatického vstupního světla vybrala jen vlnová délka, které odpovídá excitaci použitého fluorofu. Po excitaci je opět rovněž velice důležité, aby se k detektoru dostalo jen to emitované světlo, které je pro použitý fluorofor specifické. Tím zajistíme, že výsledný obraz bude složen jen z těch částí buňky, na které se navázal fluorofor. [18], [19]

U TFM se používá speciální zástinový kondenzor, který přivádí zdroj světla na vzorek z boku, což způsobí, že se excitační světlo nedostane do objektivu. Do objektivu se dostane pouze emitované fluorescenční světlo a není potřeba použití dichroického zrcadla. [18], [19]

Mnohem známější EM je principem podobný, ale neobjede se bez dichroického zrcadla. Světlo prochází ze zdroje přes vzorek a objektiv a odráží se od dichroického zrcadla pryč. Přes dichroické zrcadlo pronikne pouze emitované světlo s vyšší vlnovou délkou, které jde následně do bariérového filtru, kterým projde jen to záření, které potřebujeme najít. Cesta emitovaného světla končí v detektoru. [18], [19]



Obrázek 7: Princip epifluorescenčního mikroskopu. Je zde patrná úloha všech důležitých částí. [18]

2.5 Rozdíl mezi fluorescenčním a konfokálním mikroskopem

První je potřeba říct, že KM může fungovat ve dvou základních módech: epi - iluminační reflexe³ a fluorescence. U klasického konvenčního FM dochází k mnoha problémům, které řeší právě KM. Zřejmě největší problém nastává, když se fluorescence emituje ze vzorku z několika rovin současně. Obrazy těchto rovin dopadají na detektor současně a výsledkem je rozmazání obrazu. KM dokáže provést skenování vzorku po jednotlivých bodech. Snímáme body vždy patřící do jedné roviny a obraz tak neobsahuje parazitní světlo z vyšších a nižších rovin. Obraz je tak daleko čistější než z obyčejného fluorescenčního mikroskopu. [18], [20]

Další rozdíl je ve zdroji světla a ve snímacím detektoru. U FM se používají jako zdroj převážně vysokotlaké výbojky plněné rtutí nebo xenonem, které poskytují světlo se spojeným spektrem. Zdroje světla u KM je laser a obvykle je zde možnost přesně

³ epi - iluminační reflexe pracuje na principu skenování odraženého světla od vzorku, místo dichroického zrcadla obsahuje dělič svazků a neobsahuje bariérový filtr. Pro jednoduchost se tato práce bude zabývat jen fluorescenčním módem. [18]

nastavit vlnovou délku excitačního paprsku. K detekování emitované fluorescence stačí u FM pouhé oko, případně kamera. Při použití KM je třeba zajistit ideálně soustavu fotonásobičů, kde každý bude uzpůsoben ke snímání určité emitované vlnové délky. Posouváním fokusované roviny se všem nasnímaným bodům přidělí jejich souřadnice a pomocí softwarového zpracování se vytvoří 3D rekonstrukce vzorku. Každá barva, která ve vzorku reprezentuje jednotlivé fluorofory se ve výsledném obrazu zabarvila pomocí softwaru pseudobarvou, protože fotonásobiče měří pouze intenzitu přijatého světla. [20]

2.6 Princip skenování vzorku konfokálním mikroskopem

Každý jeden bod (pixel) vzorku se získává filtrací emitovaného světla miniaturními clonkami. Rozměr tohoto bodu je určen minimální vzdáleností dvou rozlišitelných bodů, čili difrakční mezi. Laserový paprsek je hned u zdroje filtrován zrcadlovou bodovou clonkou na jednotlivé velmi úzké svazky. Poté můžeme excitačním filtrem vyfiltrovat jen určité vlnové délky laseru, které budou směřovat na dichroické zrcadlo, kde se odrazí na objektiv a následně na vzorek. Objektiv tyto paprsky zaostří do jedné optické roviny a okamžitě se vyše emitované světlo. Emitované světlo prochází ze vzorku na objektiv, následně přes dichroické zrcadlo na druhou zrcadlovou bodovou clonku. Touto clonkou projde jen to světlo, které odpovídá ohniskové rovině fokusace vzorku. Tedy obě dvě zrcadlové clonky jsou nastaveny tak, aby světlo, které detekujeme, bylo konfokální (mělo stejné ohnisko). Světlo z jiných rovin, než těch, které jsou konfokální, se na druhé zrcadlové clonce zastaví a neprojde k bariérovému filtru a následně k fotonásobiči. [20]

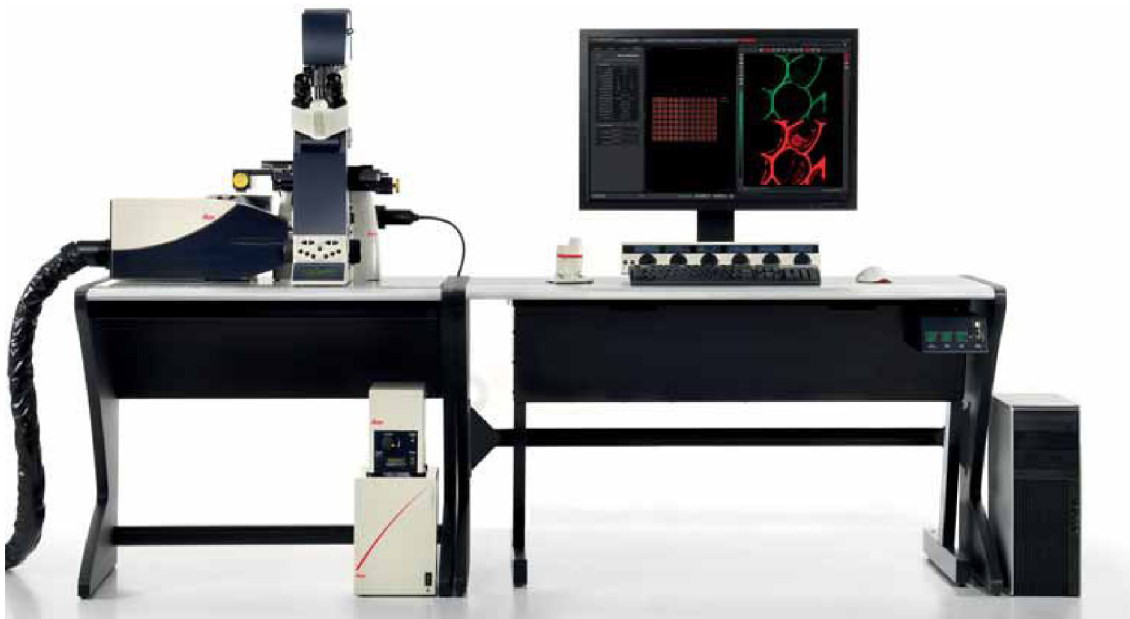
Aby byl vytvořen celistvý 3D obraz, musí se laserem projít zvolená část vzorku, bod po bodu. Této technice se někdy říká rastrování (laser prochází vzorek po řádcích). Metody rastrování jsou založeny buď na pohybu preparátu a fixního laseru, nebo rozmítáním laseru při fixním preparátu, případně jejich kombinace. Úplně jiná a rychlejší varianta je využití Nipkowova disku. Při posouvání rovin v ose z, se využívá vertikálního posunu vzorku pod objektivem nebo vertikálním posunováním objektivu. K vertikálním posuvům se využívá krokového motorku a u běžných snímků se nasnímá několik desítek až stovek rovin. Veškeré nastavení bodových clonek, excitačních a bariérových filtrů, rychlosti posunování vzorku nebo objektivu ve všech rovinách se řídí PC softwarem, a výsledkem je ostrá 3D rekonstrukce vzorku. [20]

2.7 Použitý konfokální mikroskop

Pro sledování aktivity SPIO nanočástic se využil konfokální mikroskop ve fluorescenčním módu značky Leica, s přesným označením: Leica TCS SP8 X.

Tento KM je vybaven několika druhy vstupních laserů, ať už spojitých nebo pulzních, pro různé vlnové délky, dále se dá jako zdroje světla využít: dioda, argonová výbojka, helio-neonová výbojka, UV výbojka – pro sledování fluorescence v modré oblasti spektra apod. Volbu zdroje záření si může uživatel vybrat sám, nebo jej doporučí software podle potřebného excitačně emisního spektra. Přístroj dále umožňuje měření v módu STED a FLIM. Pro zajištění stabilního, ostrého obrazu je přístroj položen na antivibračním stole. Je možnost nastavit inkubační atmosféru pro vzorky, což se využívá pro vytvoření přirozeného prostředí buněk. Nastavuje se zejména teplota a vlhkost. [21]

Spektrum použitého světla lze měnit po 1 nm v intervalu 470 – 670 nm. Maximální rozlišení obrazu z jedné roviny je 8192 x 8192 pixelů. [21]



Obrázek 8: Leica TCS SP8 X. Převzato z [41]

3 FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ VYBRANÝCH BUNĚČNÝCH ORGANEL

Při sledování organel ve fluorescenčním, resp. konfokálním mikroskopu, je velice důležité označit každou organelu jinou barvou, abychom je mohli od sebe rozlišit. Pro potřeby této práce je velice důležité fluorescenčně označit lysozomy a také mitochondrie.

3.1 Fluorescenční značení lysozomů

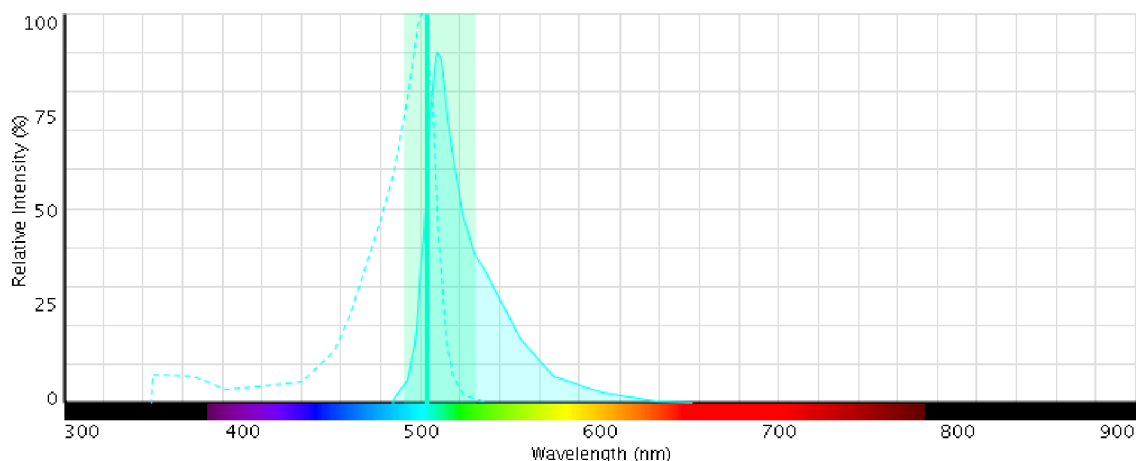
Při měření této práce je při aplikaci SPIO nanočástic potřeba obarvit lysozomy, aby se dalo spolehlivě říci, zda se SPIO nanočástice v lysozomech vyskytují.

Pro sledování lysozomů se využívá jejich speciální vlastnost - kyselé prostředí. Zjednodušeně se dá představit, obalenou chem. látku, která prostoupí přes buněčnou membránu do buňky, pohltí ji lysozom a tam se díky působení kyselého pH vytváří fluorescence. Potřebujeme proto látku, která má specifickou schopnost vázat se na kyselé prostředí. Pro tento účel se používá slabých bazických amidů, např. látka zvaná DAMP (N-(3-(2,4-Dinitrophenyl) Amino) propyl) -N-(3-Aminopropyl) Methylamine, Dihydrochloride). Bohužel DAMP není fluorescenční a proto se na něj musí navázat nějaký fluorofor. Fluorofor se k DAMP váže přes anti - DNP protilátky (anti-barvivo a anti-haptenové protilátky). Přesný mechanismus vychytávání tohoto lysozomálního fluoroforu není znám, ale zřejmě to souvisí s protonizací slabě bazického amidu. Jelikož se vlastně do lysozomu přidává lehce zásaditá látka, může dojít ke zvýšení pH lysozomu, což by mohlo vést k patologickým stavům buňky a proto se doporučuje barvit buňku jen chvíli před měřením (max 5 min.) a používat nízké koncentrace (50 nM). [31]

3.1.1 LysoTracker® Green DND-26

Pro fluorescenční barvení lysozomů se může použít barvivo *LysoTracker® Green DND-26* (výrobce Invitrogen – Molecular Probes; USA). Jeho emisní spektrum má vrchol v 504 nm a emise dosahuje vrcholu v 511nm. Navázání proběhne podle výše popsaného principu, nicméně výrobce neuvádí přesný typ fluoroforu, který se naváže k bazickému amidu DAMP. Zřejmě se bude jednat o formu fluoresceinu, konkrétně lze uvažovat o barvivo Oregon green 514. Oregon green 514 má oproti klasickému fluoresceinu řadu výhod. Je u něj menší pravděpodobnost zhašení (quenchingu), dále je

fotostabilnější a dokážeme z něj dostat více fotonů než se barvivo „vyzáří“. Důležitá vlastnost Oregonu green 514 je nižší hodnota disociační konstanty pKa (4,7), což se využívá jako zvýšená citlivost fluorescence v kyselém prostředí – lysozomech. [31], [32], [33]



Obrázek 9: Excitační a emisní spektrum fluoroforu LysoTracker Green DND-26. Excitace je naznačena přerušovaně a emise plně. V obrázku je také naznačen excitační a emisní filtr a započítán rozdíl intenzity kvůli ztrátám laseru. Stokesův posun je cca 7 nm. Vygenerováno přes generátor fluorescenčních spekter [42]

3.1.2 Cell Navigator™ Lysosome Staining Kit

Další možností je použití barviva *Cell Navigator™ Lysosome Staining Kit* (výrobce AAT Bioquest, USA). Toto barvivo svítí v červené (resp. oranžové) oblasti světla. Excitace probíhá na 575 nm a emise při 597 nm. Výrobce uvádí, že jeho barvivo je mnohem lepší než barvivo firmy Invitrogen. Doslova uvádí, že Barviva LysoBrite™ mohou zůstat v živých buňkách déle než týden, s velmi minimální toxicitou buněk, zatímco barvy LysoTracker mohou být použity pouze po dobu několika hodin. Barviva LysoBrite™ jsou opravitelná, a mohou přežít několik generací buněčného dělení. Navíc jsou barviva LysoBrite™ mnohem fotostabilní než barviva LysoTracker. [34] Původ těchto lepších vlastností nicméně výrobce neuvádí.

3.2 Fluorescenční značení mitochondrií

Žádný zdroj doposud neuvádí agresivní pronikání SPIO do mitochondrií. Nicméně je vždy možné, že nějaká malá část se do nich dostane a proto je pro účel této práce značíme také.

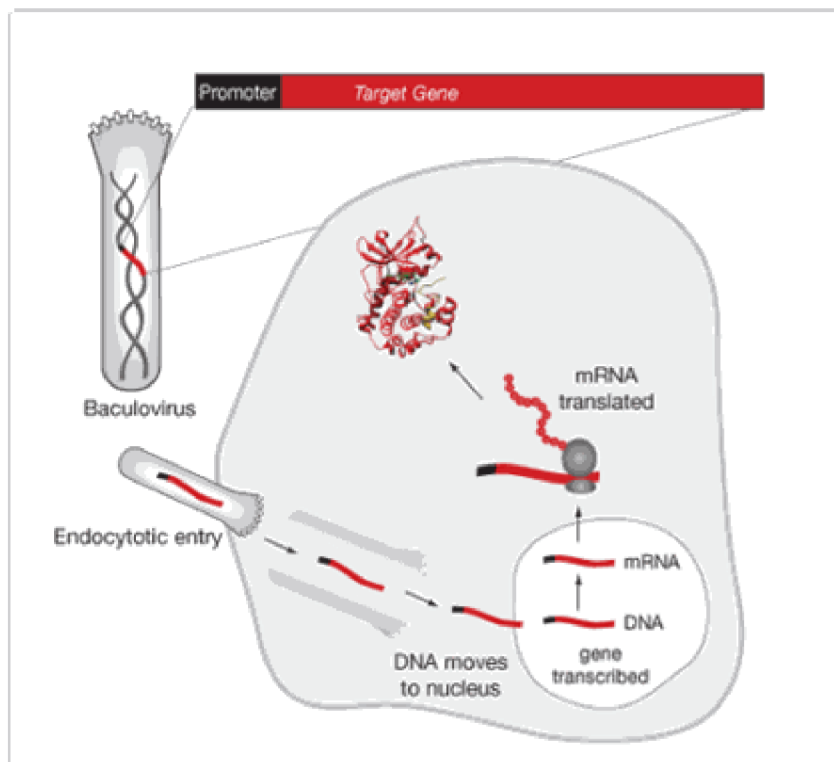
3.2.1 Mitochondrie

Mitochondrie je dvou membránová buněčná organela, většinou válcovitého až kulovitého tvaru. Rozměry mitochondrií se pohybují kolem 0,5 - 20 μm s šířkou do 5 μm . Vnitřní membrána je nejčastěji zvlněná v útvary zvané kristy a obklopuje vnitřní matrix. Kristy mnohonásobně zvětšují plochu vnitřní membrány, což je důležité pro dynamickou vlastnost mitochondriálního metabolismu. Kristy jsou selektivně polopropustné, kvůli transportním proteinům a pumpám. Základem vnitřní membrány je samozřejmě lipidová dvojvrstva. Funkční vlastnost mitochondrií udává přítomnost multienzymových komplexů dýchacího řetězce a ATP-syntázy. Jako jediná organela, kromě buněčného jádra, obsahuje své vlastní mitochondriální DNA. [35]

Hlavní funkcí mitochondrií je výroba energie. Ta probíhá na základě citrátového cyklu, což je systém reakcí sloužící k oxidaci živin, který následně navazuje na další oxidaci, známou jako dýchací řetězec. Při těchto oxidacích se uvolňují elektrony, které se zachytávají v makroergické sloučenině ATP. ATP je univerzální zdroj energie pro celou buňku. [35]

3.2.2 Barvení mitochondrií

Jednou z možností je použití BacMan technologie označovanou jako Organelle LightsTM barvivo. Použije se rostoucí baculovirus, do jehož DNA se zakultivuje fluorescenční protein, obsahující ligand pro sledovanou organelu. Virus vstoupí endocytózou do buňky a vpraví své DNA do jádra. DNA se transkribuje na RNA a v ní dojde k translaci proteinů, mezi nimiž bude i fluorescenční protein, který poputuje do mitochondrie. Jako fluorescenční protein se zde používá převážně zelený fluorescenční protein (GFP) nebo červený fluorescenční protein (RFP). Tyto proteiny jsou připojeny na „naváděče“ k buněčné organelle. Pro mitochondrie se používá naváděcí látky: hlavní sekvence E1 α pyruvát dehydrogenáza. Takto vyrobené fluorofory se nazývají CellLight Mitochondria-GFP A CellLight Mitochondria-RFP. Na rozdíl od běžných kationtových barviv (MitoTracker Red CMXRos, TMRE, rhodamine 123 apod.) není barvivo na bázi BacMan závislé na přenosu přes membránu, resp. není závislé na membránovém potenciálu. Na principu BacMan se dají značit i výše zmíněné lysozomy, pomocí naváděcí látky LAMP (Lysosome-associated membrane proteins). [36]



Obrázek 10: Schéma technologie BacMan. Do DNA viru se vloží gen na tvorbu fluorescenčního proteinu a jako promotér je speciální ligand pro určitou buněčnou organelu. [43]

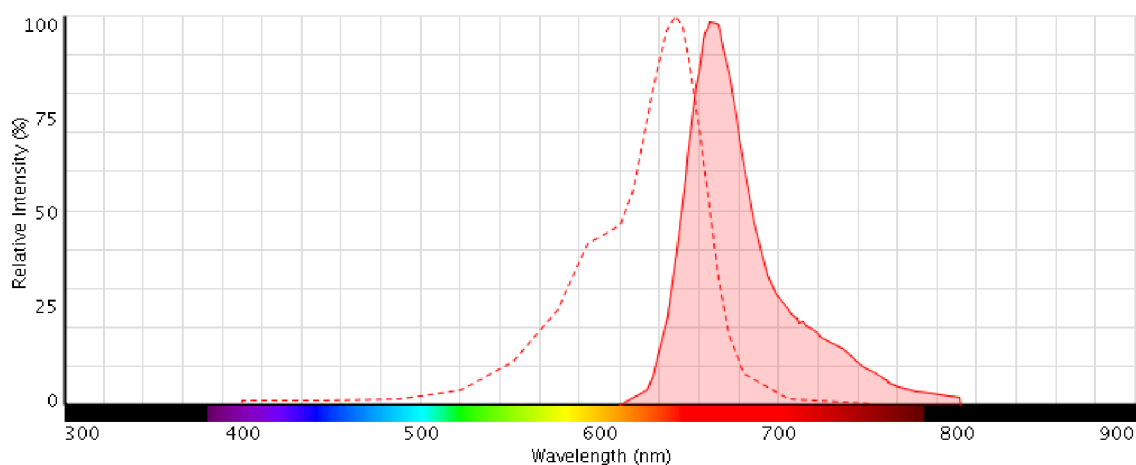
Konvenčně používané barviva obsahují obecně thiol-reaktivní chloromethylové skupiny, které mají schopnost se vázat k mitochondriím. Přes buněčnou membránu se dostává pasivní difuzí v submikromolárních koncentracích. Intenzita fluorescence těchto barviv je závislá na gradientu membránového potenciálu mitochondrií. Barvivo se na této bázi se komerčně vyrábí po značce MitoTracker. Barvivo MitoTracker je celá řada, s různým excitačně emisním spektrem. Známe např. Orange, Red nebo Green. Při použití oranžového Mitotrackeru se využívá fluorescenční látka tetramethylrosamine. Pokud potřebujeme červenou fluorescenci, využívá se látka X-rosamine. Redukované formy tetramethylrosaminu mají dokonce schopnost fluoreskovat jedině, pokud vstoupí do dýchacího řetězce mitochondrií, kde jsou tyto barviva oxidována do fluorescenčního stavu a drží se v mitochondriích. Tyto barviva nesou název MitoTracker Orange CM-H2TMRos a MitoTracker Red CM-H2XRos. [36]

Ještě trochu jinak pracuje barvivo MitoTracker Green FM. Přednostně se hromadí v mitochondriích jen určitých typů buněk. Výhodou je téměř nulová fluorescence ve vodných roztocích, fluorescence se objeví jen v přítomnosti lipidů mitochondriální membrány. Díky tomu se při použití tohoto barviva dá fluorescence pozorovat hned po aplikaci barviva a máme jistotu, že se objeví, jen když barvivo

vstoupí do mitochondrie. [36]

Dá se samozřejmě použít daleko více fluoroforů označených pro mitochondrie. Často se také používá barvení mitochondrií pomocí Rhodaminu 123. Jedná se o kationtové barvivo, které se do několika minut navazuje na mitochondrie a na rozdíl od některých jiných barviv se nedostává do endoplazmatického retikula a není pro buňku toxické. [36]

Všechny předchozí barviva vyrábí společnost Invitrogen – Molecular Probes (USA). Pro objektivnost je potřeba uvést, že barviva podobná Mitotracker, vyrábí také např. firma AAT Bioquest, USA, s označením MitoLite™ nebo Cell Navigator™ Mitochondrion Staining Kit. Výrobce na svých stránkách píše, že se jedná o kationtové barvivo, které je specifické pro mitochondrie pravděpodobně na základě gradientu jejich membránového potenciálu. [37] Z důvodu velmi podobných emisních spekter, bude zřejmě i podobné složení těchto barviv jako u prvně zmiňovaného výrobce.



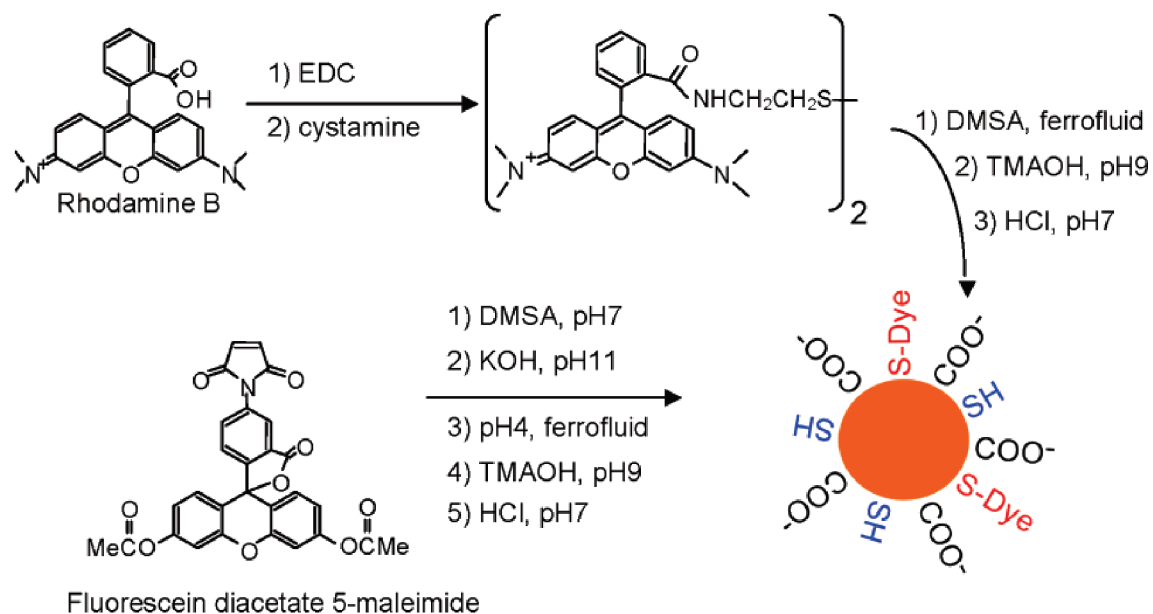
Obrázek 11: Spektrum fluoroforu MitoTracker Deep Red FM, který by mohl být variantou pro značení mitochondrií u této práce. Excitace má vrchol v 644 nm a emise v 665 nm. Vygenerováno z [42]

4 METABOLISMUS NANOČÁSTIC V BUŇKÁCH A JEJICH ZNAČENÍ

4.1 Fluorescenční značení SPIO nanočástic

Chemická syntéza fluorescenčně značených SPIO nanočástic funguje na principu přidělení organického fluoroforu k obalené SPIO nanočástici. Doposud nebyla prokázána technika přímé vazby fluoroforu na čistou SPIO nanočástici bez funkcionalizovaného povrchu (dextran, polyethyleneglycol (PEG), silica apod.) [23] Dva hlavní organické fluorofory, které se pro tyto účely používají, jsou fluorescein a rhodamin. Tyto organické fluorofory se kovalentně navážou k látce zvané DMSA (m-2,3 dimerkaptojantarová kyselina), která má schopnost silně interagovat s povrchem SPIO nanočástic. Vznikne SPIO nanočástice obalená směsí DMSA a fluoroforu. Kvůli obsahu DMSA kyseliny, obsahuje povrch SPIO nanočástic negativní povrchové náboje a díky tomu se zabrání agregaci jednotlivých SPIO nanočástic v roztoku. Výsledkem této syntézy je nestabilní koloidní roztok fluorescenčně značených SPIO nanočástic. [22]

Při výrobě těchto fluorescenčních SPIO částic je zapotřebí přidat několik různých chemických látek a různě upravovat pH roztoku. Pro znázornění je průběh těchto reakcí zobrazen nákresem:



Obrázek 12: Syntéza fluorescenčně značených SPIO nanočástic. Základem je vazba fluoroforu Rhodamine nebo fluorescein kovalentně k látce zvané DMSA. [22]

Další možností zavedení fluoroforu je použití SPIO nanočástic potažených obalem zvaným silica (oxid křemičitý). Jako fluorofor se používá fluorescein isothiokyanát (FITC) nebo rhodamin B isothiokyanát, který je začleněn do silikového obalu. [23] Podobně se dá využít fluoroforu FITC zabudovanému do dextranu (také obal).

Novinkou je zajímavá metoda přímé vazby rhodaminu B isothiokyanátu na SPIO nanočástici obohacenou o OH⁻ skupiny bez potřeby SPIO polymerního obalu. Vazba funguje na principu opačného náboje – rhodamin má kladný náboj a SPIO nanočástic záporný. Tato metoda fluorescenčního značení je použita při konfokální mikroskopii u této práce. Na takto značenou SPIO částici se mohou dále vázat další biofunkční látky (např. enzym glukózo oxidáza), prostřednictvím kovalentní vazby s isothiokyanátovou skupinou rhodaminu. Díky tomu, že takhle upravená nanočástice neobsahuje obal, který může velmi zeslabovat její magnetickou odezvu, hodí se výborně pro lékařské aplikace (MRI kontrast, hypertermie tumoru apod.) [23]

4.2 Použité buňky

Z důvodu perspektivy kmenových buněk v regenerativní medicíně (např. opravy poškozených chrupavek) se při této práci použily mezenchymální kmenové buňky (MSC). SPIO nanočástice se aplikují do MSC a následně se takto značené MSC vpraví do „opravované“ cílové tkáně (většinou přes krevní oběh). Díky tomu, že SPIO nanočástice fungují jako výborná kontrastní látka pro MRI, můžeme in vivo sledovat polohu MCS v tkáních.

U této práce je také důležité zjistit, kde přesně se SPIO nalézá v buňce, zda se jeho poloha v čase mění a zda má SPIO schopnost transportu z jedné buňky do druhé.

4.2.1 Lysozomy

Při sledování metabolismu SPIO nanočástic je klíčová role na buněčné organele zvané lysozom. Jedná se o membránovou organelu, různých tvarů s průměrem mezi 0,2 až 2 μm. V membráně lysozomu je aktivní transportní ATPáza typu V, která funguje jako protonová pumpa. Protonová pumpa přináší do lysozomu protony a tím způsobuje v lysozomu kyselé prostředí mezi 4,5 až 5 pH. [28]

Lysozom je v podstatě „trávicí trakt buňky“. Primární lysozom do sebe přijímá odumřelé organely, cizorodé částice, bakterie apod. Lysozomy obsahují asi 40 druhů hydroláz (enzymy na štěpení proteinů, sacharidů, tuků apod.). Takové enzymy se

spouštějí jen v kyselém prostředí (kvůli zabezpečení cytoplazmy). Tyto enzymy se tvoří v Golgiho aparátu a jsou uzavřeny do membrány, čímž se rodí primární lysozom. V momentě kdy lysozom přijme odumřelou organelu nebo částici, označuje se jako sekundární lysozom. V sekundárním lysozomu probíhá rozklad vnitřní molekuly pomocí enzymů. Znovu využitelné látky jdou s lysozomu zpět do buňky a nestravitelné zbytky vytvoří terminální lysozom zvaný autofagická vakuola. Autofagická vakuola může být vyloučena z buňky nebo v buňce zůstává jako „odpadní látka“. [28]

V případě, že buňka přijala cizorodou částici endocytózou (např. SPIO nanočástice), dochází první obalení částice endolytickým váčkem. Následně se z něj vytvoří endozom a endozomy pohltí specializovaný primární lysozom zvaný fagolysozom. [28]

4.3 Metabolismus SPIO nanočástic v buňkách

4.3.1 Pronikání do buňky

Nanočástice se do buňky dostávají nejčastěji endocytózou. Endocytóza může probíhat více způsoby: nejznámější je fagocytóza – funguje na principu navázání antigenů na povrchu cizorodé částice na membránové receptory a probíhá jen u speciálních buněk (např. makrofág). Pinocytóza je „buněčné pití“ – nespecifický transport roztoku. Třetím typem je receptorová endocytóza, kde je receptorem protein zvaný klathrin. Receptorová, klathrinová endocytóza je vysoce specifický transport a při aplikaci SPIO nanočástic se vyskytuje velmi často. Z toho plyne, že na povrchu SPIO částice někdy bývá navázán ligand ke klathrinu. [30]

4.3.2 Metabolismus

Pro pochopení metabolismu železa je velice důležité znát dvě bílkoviny: transferin a feritin. Transferin je bílkovina v krevní plazmě, která obsahuje bílkovinu apotransferin a dva atomy železa. Transferin slouží k transportu železa z krve do buněk tkání. Feritin je nitrobuněčná bílkovina, do které se železo shromažďuje „do zásoby“.

Při aplikaci SPIO nanočástic se železo naváže na transferin a pomocí receptorové endocytózy se dostane dovnitř buňky. Vznikne endozom, ve kterém je nízká hodnota pH, která způsobí disociaci železa od transferinu. Dále se železitá nanočástice může spojit s primárním lysozomem a následně se obvykle promění v perinukleární váčky (sekundární lysozom, případně autofagická vakuola). Další možností degradace je transport železa z endozomu do cytosolu buňky, většinou za

pomocí malomolekulárního citrátu, případně isocitrátu. V cytosolu buňky se železo naváže na ferritin a může posloužit např. jako zdroj železa pro tvorbu hemu. [24]

Pro použití SPIO nanočástice jako kontrastní látky pro MRI je potřeba, aby biodegradace v lysozomech trvala co nejdéle. Bylo zjištěno, že komerčně vyráběné SPIO nanočástice (sloužící jako MRI kontrastní látka) pokryté dextranskem s velikostí 120-180 nm mají velkou tendenci k rychlé biodegradaci v buňkách. Zejména se degradují pomocí intercelulárních enzymů, kyselin a rychlým dělením buněk. Určitým řešením je použití menších SPIO, pokrytých tenkou vrstvou oxidu křemičitého (silica), kde se konečná velikost pohybuje kolem 8 nm. U těchto menších SPION se může použít větší množství částic a je zde větší pravděpodobnost jejich distribuce i po množení buněk. Pro další zlepšení transportu SPIO do buněk, se ke SPIO-SiO₂ přidala aminová skupina (na základě elektrostatické reakce) a výsledkem je Fe₃O₄@SiO₂-NH₂. Pokud je potřeba můžou si na vrstvu SiO₂ přidat monoklonální protilátky nebo jiné, podobné molekuly. Při aplikaci Fe₃O₄@SiO₂ nebo Fe₃O₄@SiO₂-NH₂ do buňky se při pozorování v elektronovém mikroskopu, objevily nanočástice pouze v lysozomech. Nebyly nalezeny v žádných jiných organelách a nedošlo k apoptóze, nekróze, či jiným problematickým jevům. Při přidání NH₂ pomocné skupiny bylo velmi zlepšené pronikání SPION do lysozomů oproti obyčejným SPION s SiO₂ obalem. [27]

V článku [29] se věnují sledování buňky ve fluorescenčním mikroskopu po přidání SPIO nanočástic. Zjistili, že aplikace SPION způsobila výraznou expresi proteinu zvaného ferroportin. Ferroportin je trans membránový protein, který slouží k čerpání železa z buněk. Aktivita tohoto proteinu je důkazem zvýšené koncentrace železa v buňkách po aplikaci SPIO nanočástic. Zároveň je to důkaz rozkladu SPIO – obalového komplexu na čisté železo.

4.3.3 Toxicita SPIO

Podle článku [24] se SPIO částice dostávají do endozomů/lysozomů za 3 hodiny od aplikace nanočástic a některé komplexy SPIO + polymerní obal se v endozomech (resp. lysozomech) rozpouští vlivem sníženého pH a některé ne. Autoři tohoto článku použili SPIO nanočástice s polymerem poly-L-lysine (PLL). Při redukci komplexu SPIO-PLL v endozomech/lysozomech se kvůli kyselému pH objevilo nepatrné množství kyslíkových radikálů, které mohou být pro buňku toxické.

Mnohé studie prokázaly sníženou životaschopnost buněk při překročení koncentrace 12,5 µg/ml roztoku SPIO nanočástic. Straší články např. [24] uvádějí tuto koncentraci na 50 µg/ml. Při těchto vyšších koncentracích se také snižuje chondrogenese a osteogenese fibroblastových kmenových buněk a byly pozorovány

změny buněčného markéru Oct-4 a markéru buněčného povrchu CD45. Přesný mechanismus těchto poškození není znám, zřejmě se jedná o fentonovou reakci (druh Haber-Weiss reakcí), při které dvojmocné železo reaguje s peroxidem vodíku a vznikají problematické hydroxilové radikály. [25]

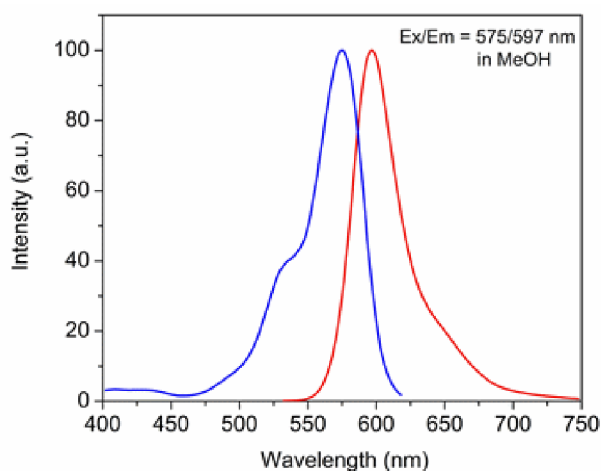
Schäfer ve svém článku [26] upozorňuje na sníženou schopnost migrace a sníženou schopnost tvořit kolonie u kmenových buněk po označení SPIO nanočásticemi. Nicméně přesný mechanismus těchto funkčních důsledků v tomto článku nebyl objasněn.

5 TESTY FLUOROFORŮ

5.1 Test fluorescence lysozomů

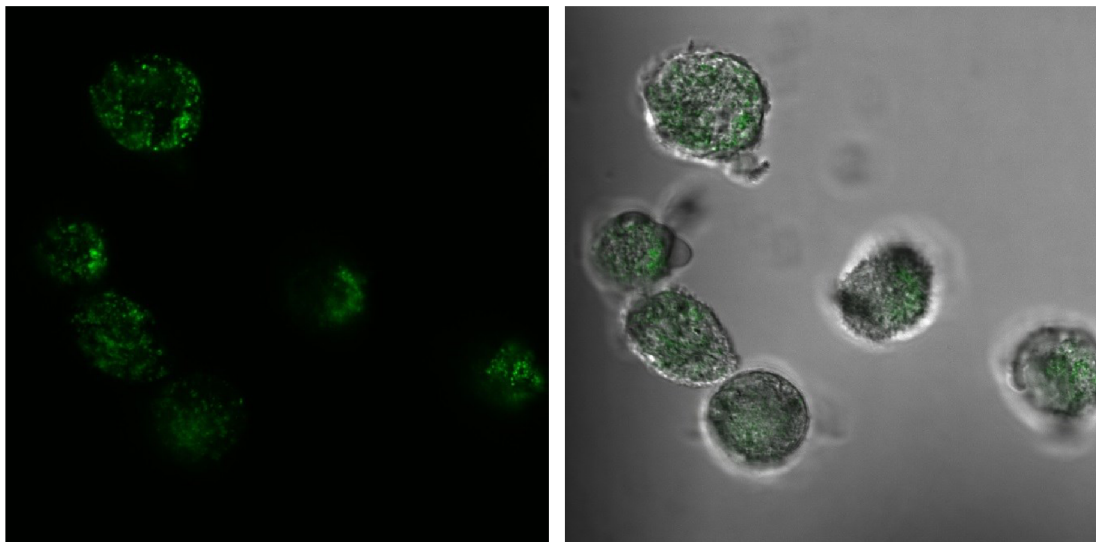
Jako první bylo potřeba zjistit, jak dobře se dají v KM značit lysozomy. Lysozomy jsou buněčné orgány, kde se uchovávají malé cizorodé částice, právě třeba SPIO nanočástice.

Použilo se mezenchymální kmenové buňky umístěné v médiu. Aby se dalo buňky pod KM pozorovat, přikápl se 100 μ l barviva s názvem *CellNavigator-LysozomeStainingKit*, které je přímo určené pro pozorování lysozomů. Toto barvivo má doporučenou excitační vlnou délku laseru na 575 nm a emitovanou na 597 nm. Z důvodu potřeby zjištění, jak dlouho dokážou lysozomy vyzařovat emitované světlo, umístily se buňky do režimu dlouhodobého snímání – 50 hodin.

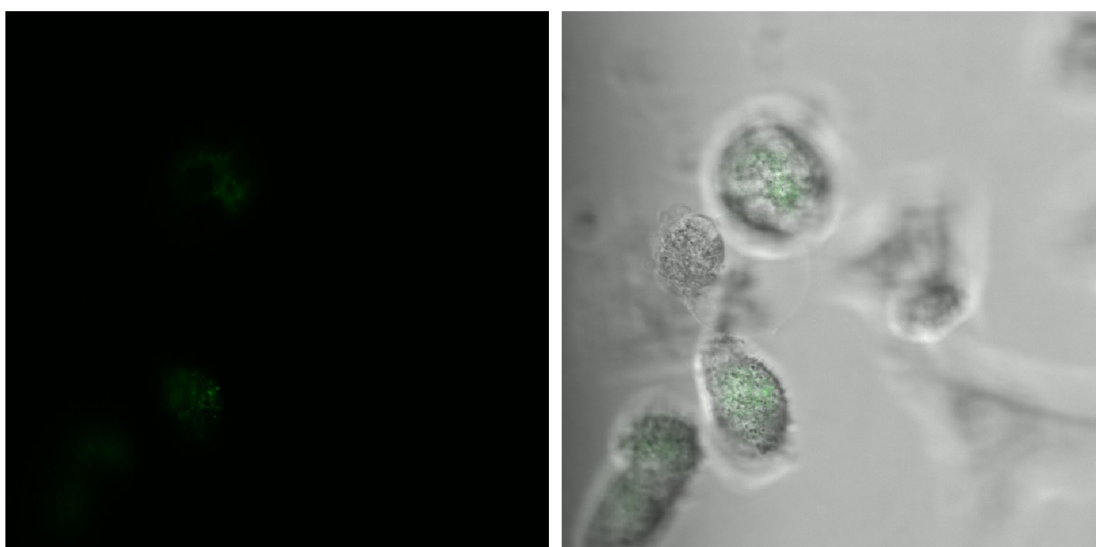


Obrázek 13: excitační a emisní spektra barviva CellNavigator-LysozomeStainingKit red. [44]

Potvrdilo se, že barvivo pro značení lysozomů funguje dobře a spolehlivě. Buňky přežily pod mikroskopem 25 hod, přičemž fluorescence lysozomů šla pozorovat zhruba do 15. hodiny. Jelikož nelze v dlouhodobém snímání pod KM měnit zaostřování v rovině Z, tak nastal problém s neostrotí obrazu v průběhu času, z důvodu pohybu buněk v médiu. Tento nedostatek by se dal vyřešit fixací buněk k podkladu, ale to se nedělalo z časových důvodů.



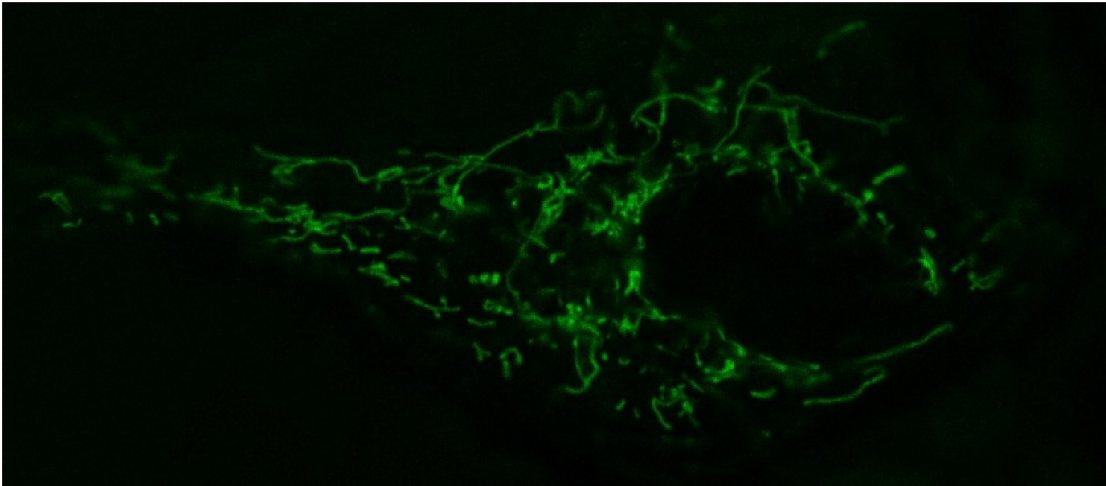
Obrázek 14: čas pozorování 0, jasně zřetelná fluorescence lysozomů na levé straně, na pravé straně je fluorescence v kombinaci s klasickým opt. mikroskopem



Obrázek 15: čas pozorování 10 hodin, jasný úbytek fluorescenčního barviva

5.2 Test fluorescence mitochondrií

Dalším kontrolním krokem před pozorováním nanočástic bylo zjistit, jak v KM vypadají mitochondrie. Mitochondrie jsou v podstatě metabolická centra buňky se svou vlastní DNA. Použili jsme fluorofor *cytopainter mitochondrial staining kit - green fluorescence* od firmy *abcam*. Výrobce u tohoto barviva uvádí spektrum ex/em: 485 /525 nm.



Obrázek 16: Mitochondrie značená pomocí *cytopainter mitochondrial green*. Vidíme ukázkové „řetízky“, které tvoří MSC buňka v cytoplazmě kolem jádra.

5.3 Test fluorescence nanočástic

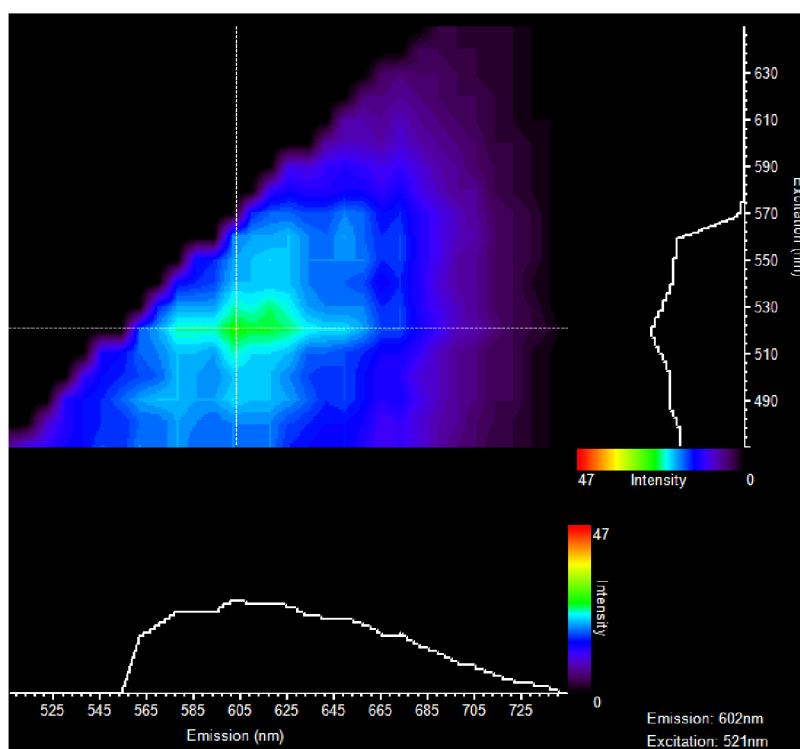
Výroba železitých nanočástic probíhala ve spolupráci s UP Olomouc. V UP Olomouc se podařilo vyrobit tři typy nanočástic: QCD, FeNV-R, PEG. QCD jsou SPIO nanočástice obalené vrstvou kvantových teček⁴ z uhlíku, díky nimž mají fluorescenční aktivitu. FeNV-R jsou SPIO částice s navázanou povrchovou vrstvou fluoroforu rhodamin (viz kapitola 4.1) a PEG jsou kvantové tečky na bázi uhlíku bez přítomnosti železa. U SPIO se pro kultivaci s buňkami používá koncentrace 50 µg/ml (ověřeno testováním, že tato koncentrace při 24. hodinové inkubaci ještě není pro buňky toxická). Všechny tyto typy nanočástic jsou experimentální a nedají se běžně zakoupit.

⁴ QD jsou polovodivé nanokrystaly o velikosti několika nanometrů, existují buď samostatně, nebo mohou být uspořádány do klastrů. Asi nejčastější je uspořádání, kdy jeden typ polovodiče vytváří jádro QD (core, např. CdSe) a několik vrstev atomů druhého typu polovodiče vytváří obal kolem tohoto jádra. Výhodné jsou jejich optické vlastnosti: Při ozáření přejdou jejich elektrony na vyšší energetickou hladinu a po určité době dochází k uvolnění této energie ve formě fotonů, které mají delší vlnovou délku, než měla excitační energie. [45]

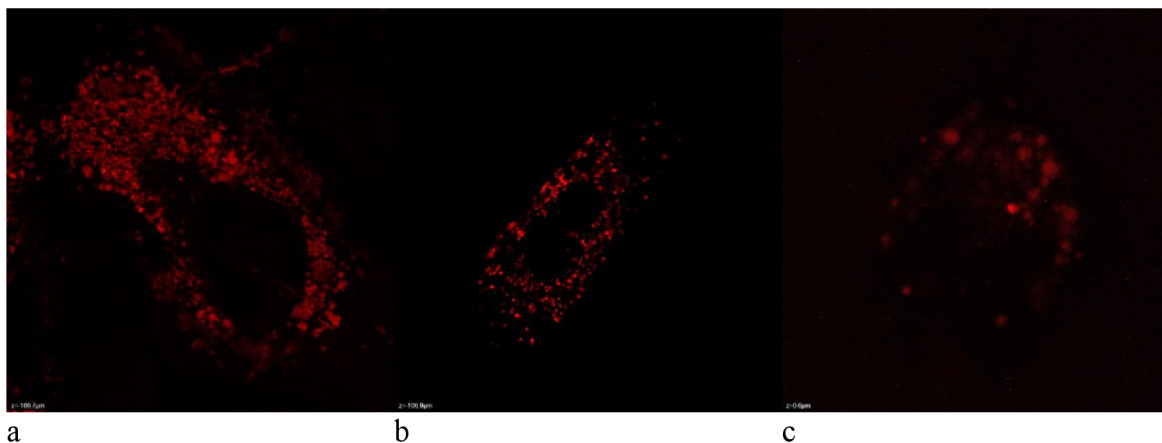
Při použití experimentálních, nekomerčně vyráběných železitých nanočástic nastal problém s neznalostí jejich excitačně / emisního spektra. Jejich spektrum se nám podařilo nalézt pomocí analýzy spekter, tzv. λ -scanem přímo v Leica softwaru (Obrázek 16). Spektrum QCD je poměrně široké (excitační peak 510-520 nm a emisní peak 600 nm) a může zasahovat např. do fluorescenčního spektra použitého lyzozomálního barviva *cell navigator- lysosome staining kit*, které má excitační vrchol v 575 nm a emisi na 597 nm.

Podobné spektrum vykazují FeNV-R nanočástice značené rhodaminem. Podařilo se nalézt nejlepší fluorescenci při excitaci 570 nm a emisi pozorovat při 600 – 700 nm. I zde je nebezpečí překryvu s červeným fluoroforem na lyzozomy. Tato podezření na překryv se následně potvrdila a v dalších kapitolách práce bude popsána i úprava těchto původních spekter.

Spektrum uhlíkových nanočástic PEG jsme úspěšně optimalizovali na hodnotu 500/550-600 nm. Tyto nanočástice jsme použili navíc, jen pro zajímavost, úkolem bylo především zjistit jejich dynamiku pronikání do buňky a proto jsme je nelokalizovali s buněčnými organelami.



Obrázek 17: λ -scan železitých nanoteček (QCD). Vodorovná osa značí emisi a svislá excitaci v nm. Největší jas fluorescence ukazuje žluto-zelená barva přibližně uprostřed grafu.

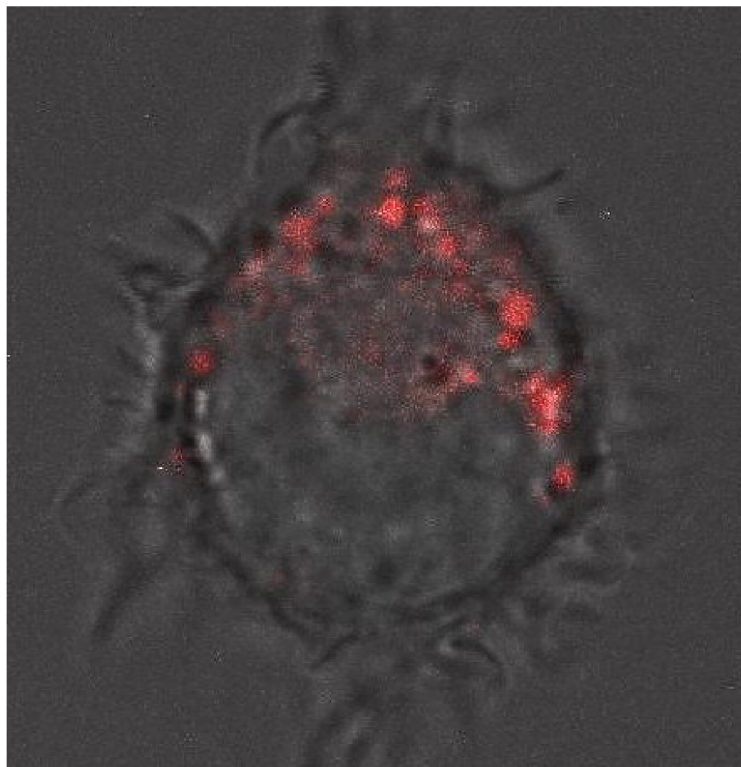


Obrázek 18: Srovnání fluorescence tří typů použitých nanočástic. a-QCD, b-FeNV-R, c-PEG. Rozdíly jasu mohou být způsobené jiným nastavením intenzity excitačních laserů. Vidíme, že tvarem jsou si QCD a FeNV-R podobné. PEG mají v buňce jiné uspořádání.

5.3.1 Detekce PEG nanočástic v buňce

PEG nanočástice jsou experimentálně připravené kvantové tečky vyrobené na uhlíkovém základě. Jejich nejsilnější excitačně / emisní spektrum jsme našli na 500 / 550-600 nm.

PEG nanočástice měly v buňkách mnohem menší jas fluorescence než FeNV-R nebo QCD nanočástice. PEG vytvářejí slabé kulovité útvary, které pravděpodobně signalizují umístění PEG v lysozomech. Tuto myšlenku jsme se snažili potvrdit společným značením pro lysozomy z časových důvodů.



Obrázek 19: Značení PEG nanočástic (červeně) v buňce. Je vidět slabá fluorescence a hromadění PEG do kulovitých útvarů

6 KOLOKALIZACE NANOČÁSTIC A ORGANEL

6.1 Kolokalizace QCD a lysozomů

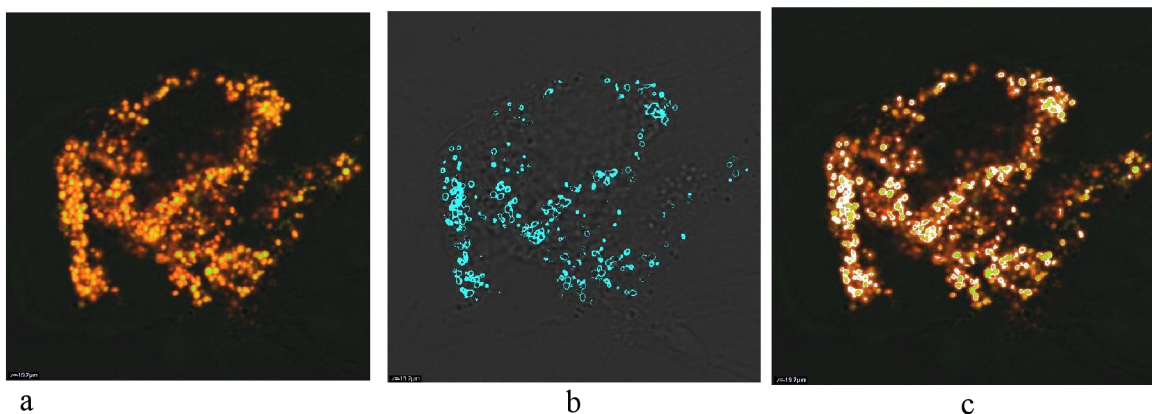
Jak již bylo zmíněno výše, lysozomy jsou ideální buněčná organela pro ukládání nanočástic. Fyziologicky by si lysozom měl poradit s metabolickou cestou rozkládání železitých nanočástic, měl by je pohltnout a chránit tak důležité funkční části jako je jádro nebo mitochondrie.

Provedlo se mnoho pozorování, při různých nastaveních mikroskopu, než jsme našli optimální řešení. Jedno z prvních pozorování bylo při použití železitých QCD s exc. / em. spektrem 520 / 570-600 nm s 24 hodinovou kultivací a lysozomálním fluoroforem *cell navigator- lysosome staining kit* od firmy AAT Bioquest s exc. / em. spektrem 575 / 600-700 nm. Lysozomální barvivo bylo v buňce kultivováno rovněž 24 hodin, zkusili jsme i variantu 3. denního barvení, ale ta se neosvědčila.

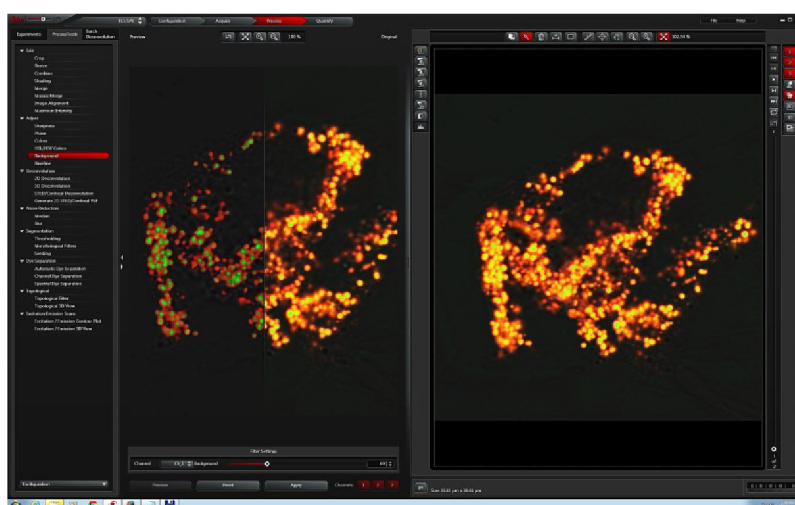
Tabulka 1: Analýza nanočástic a lysozomů pomocí programu v Matlabu. Hodnoty jsou sečteny (zprůměrovány) pro všechny roviny (viz kap. 2.6) a tím se vytváří objektivní hodnocení celého objemu buňky – aproximace rovin. Práh zvolen manuálně.

obsah obrázku celkem	1024	pix ²
Obsah μm v oblasti	1.1371e+03	μ
počet pixelů vybrané oblasti	752335	pix
suma pixelů organel v oblasti	292045	pix
suma nanočásticových pixelů v oblasti	141713	pix
suma překrytých pixelů celkem	135111	pix
suma překrytých pixelů v oblasti	130723	pix
průměrná kolokalizace celkem	0.8590	%
průměrná kolokalizace v oblasti	1.1584	%
průměrný obsah nanočástic v oblasti	1.58	%
průměrný obsah organel v oblasti	2.79	%
průměrná saturace nanočástic	93.1003	%
průměrné zaplnění organel	34.7108	%
počet nanočástic v oblasti na μ^2	124.6275	pix
počet organel v oblasti na μ^2	256.8349	pix
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	114.9625	pix

Z tabulky 1 vyplývá, že necelých 90 % nanočástic bylo umístěno v lysozomech, ale jen necelá třetina lysozomů byla obsazena nanočásticemi. Z tohoto faktu vyplývá, že jen velmi málo nanočástic bylo rozmístěno v cytoplazmě a existovalo ještě hodně volných lysozomů, která mohly čerpat další částice. Výsledky patří pro níže uvedené snímky.



Obrázek 20: a) Spojené tři vstupní kanály (nanočástice červeně, lysozomy zeleně a průchozí světlo) b) Grafická lokalizace překryvu lysozomů a nanočástic. c) bílé jsou zvýrazněné pixely překryvu na obrázku a). Je vidět tendence nanočástic obklopovat zelené lysozomy, překryté pixely tvoří kruhovitě útvary. Rovina=1



Obrázek 21: Ukázka zpracování obrázků v Leica softwaru. Jedná se o spojení obrázků tří vstupních kanálů a úprava výstupu pomocí práhování. Je vidět podobný výsledek jako v Matlabu.

6.1.1 Další zkrácené statistiky pro QCD a lysozomy

Tabulka 2: Čtyři různé buňky ve dvou různých miskách. Jedná se o výběr analýzy QCD a lysozomů v prostředí Matlab. Volba prahu je manuální, podle tvaru struktur. Vybraná byla vždy jedna buňka pomocí nástroje *imfreehand* a analýza proběhla aproximací všech rovin buňky.

	buňka 1	buňka 2	buňka 3	buňka 4	průměr
průměrná saturace nanočástic (%)	58.9545	11.0646	36.4764	34.2631	35,18965
průměrné zaplnění organel (%)	53.1048	2.38	17.2065	17.9593	22,66265
počet nanočástic v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	30.6670	9.89	59.9827	18.6551	29,7987
počet organel v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	33.5516	25.1890	106.9796	33.7757	49,87398
počet kolokalizace v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	26.6131	0.8596	24.5637	6.33	14,5916

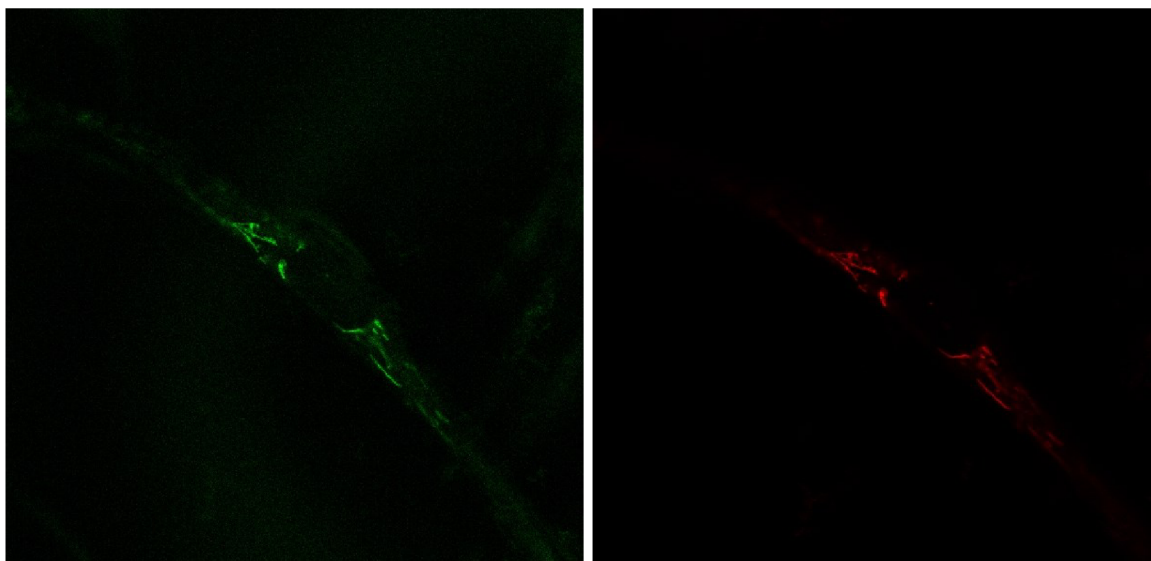
Je vidět, že hodnoty zaplnění organel a průniku nanočástic jsou zvláště u druhé buňky velmi různé. Toto kolísání může být způsobeno nevhodně zvoleným prahem (v případě zvolení automatického prahu jsou hodnoty ještě horší), nehomogenitou intenzity fluorescence v jednotlivých rovinách, případně počítání s nezafokusovanými rovinami. Z těchto důvodů je vždy přesnější počítat tyto statistiky v rámci jedné předem vybrané roviny, avšak nerespektuje se tím přirozená prostorová nehomogenita rozložení struktur samotné buňky.

6.2 Kolokalizace QCD a mitochondrií

Pro úspěšnou lokalizaci mitochondrií bylo rovněž potřeba zjistit, jak se chovají spektra barviva a nanočástic najednou. Podobně jako u lyzozomálního barviva jsme zjistili, že spektrum mitochondriálního fluoroforu je mnohem širší, resp. má silnou intenzitu i v jiných částech spektra, než v kterých uvádí výrobce. Použili jsme výše zmíněný *cytopainter mitochondrial staining kit - green fluorescence*. Na základě pár desítek snímání jsme úspěšně optimalizovali spektra pro snímání nanočástic a mitochondrií bez překryvu takto:

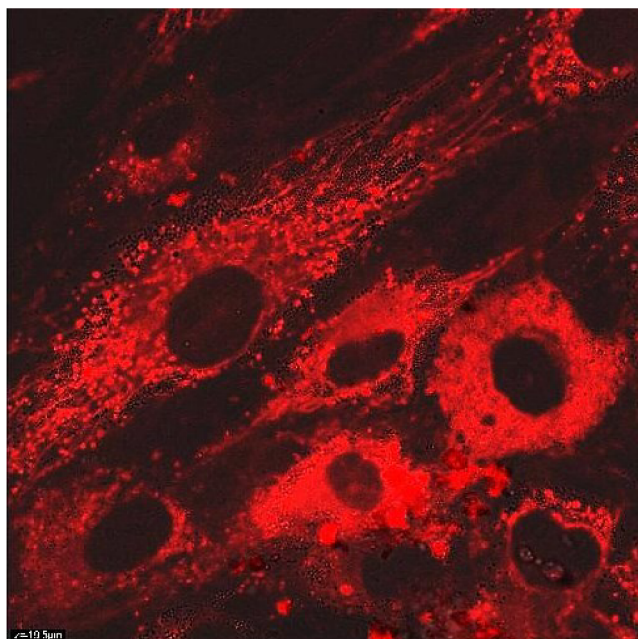
Tabulka 3: Nastavení excitačně-emisního spektra pro použité zelené mitochondriální barvivo. Vidíme nutnost posunutí emisních vlnových délek nanočástic na vyšší hodnoty.

Fluorofor	Excitace (nm)	Emise (nm)
QCD železa	540	640-750
FeNV-R + rhodamin	570	680-760
cytopainter mitochondrial staining kit - green fluorescence	490	500-550
cytopainter mitochondrial staining kit - green fluorescence: doporučeno výrobcem	485	520



Obrázek 22: fluorescence mitochondrií před úpravou spekter. Vlevo je zelená fluorescence mitochondrií podle nastavení výrobce. Vpravo je snímáno původní spektrum nanočástic, které tam nyní nejsou a detekují se stejné mitochondrie jako vlevo. Můžeme tedy vidět parazitní, falešnou fluorescenci, která je způsobena zásahem části jednoho spektra do druhého.

V průběhu času jsme zjistili zajímavou, leč nepříjemnou skutečnost. Rhodamin, který je součástí částic FeNV-R, se v průběhu času z komplexu rozpadl, uvolnil se z polymeru a zachytává se na povrch mitochondrií (z literatury, např. [36] je známo, že samotný rhodamin má silnou afinitu k mitochondriím). Bez tohoto zjištění bychom ze scanu vyvozovali že FeNV-R se váže na nebo do mitochondrií. Pro dokázání tohoto tvrzení jsme použili i barvivo mitochondrial green, které vykazovalo úplně stejný tvar mitochondrií jako rhodamin. Rozpad FeNV-R komplexu je zobrazen na následujícím obrázku.



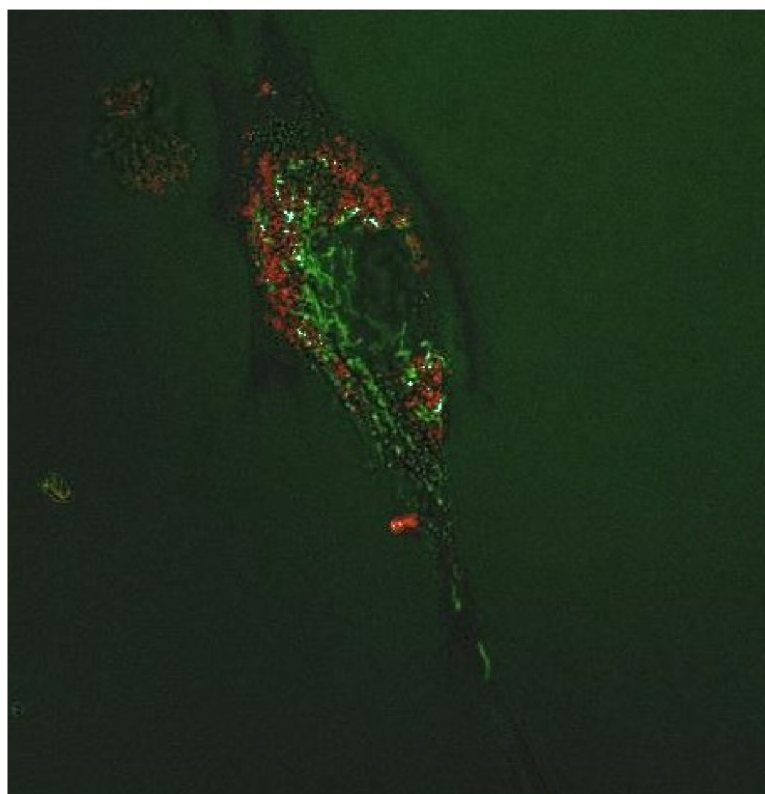
Obrázek 23: Samotné FeNV-R v MSC buňkách. Podlouhlé červené "řetízky" jsou mitochondrie, které vyznačil rhodamin. Skutečné FeNV-R jsou malé, kulaté útvary, což jsou shluky FeNV-R v lysozomech.

6.2.1 Analýza kolokalizace mitochondrií a QCD

Úvodem se dá obecně říct, že umístění mitochondrií a QCD se po úpravě spekter moc neshodovalo, což je z hlediska toxicity dobrá zpráva. Nanočástice byly v analyzované buňce kultivovány 24 hodin. Vidíme, že i když bylo v oblasti relativně hodně nanočástic (15545 pix) a mitochondrií (9484 pix), tak skutečná kolokalizace byla velmi malá. Jen cca 2% nanočástic se dostaly do mitochondrií a 2% mitochondrií byly obsazené nanočásticemi. Výsledky potvrzuje i níže přiložený obrázek (Obrázek 24). Analýza proběhla aproximací tří rovin. Níže následuje analýza provedená v prostředí Matlab a Tabulka 4 ukazuje výše pospaný výsledek.

Tabulka 4: Statistika QCD nanočástic a mitochondrií v oblasti jedné vybrané buňky.

Práh pro nanočástice	0.0700	manual
Práh pro organely	0.1200	manual
hrana obrázku celkem	1024	pix ²
Obsah μm v oblasti	2.4245e+03	μ
počet pixelů vybrané oblasti	186036	pix
suma pixelů organel v oblasti	9484	pix
suma nanočásticových pixelů v oblasti	15545	pix
suma překrytých pixelů celkem	1380	pix
suma překrytých pixelů v oblasti	479	pix
průměrná kolokalizace celkem	0.0439	%
průměrná kolokalizace v oblasti	0.0858	%
průměrný obsah nanočástic v oblasti	2.53	%
průměrný obsah organel v oblasti	1.93	%
průměrná saturace nanočástic	2.02	%
průměrné zaplnění organel	2.03	%
počet nanočástic v oblasti na μ^2	6.16	pix/ μ^2
počet organel v oblasti na μ^2	3.17	pix/ μ^2
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	0.1976	pix/ μ^2



Obrázek 24: Mitochondrie a QCD pro výše uvedenou statistiku. Zeleně jsou vyznačeny mitochondrie, červeně QCD. Modře jsou vyznačeny pixely překryvu. Je vidět, že i přes velké množství nanočástic je překryv minimální.

6.2.2 Analýza kolokalizace QCD a mitochondrií u dalších buněk

Analýzy proběhly pro 4 náhodně vybrané buňky s různým počtem rovin. Práh byl volen manuálně a u buňky číslo 3 automaticky. Vidíme, že výsledky (Tabulka 5) potvrzují očekávání, když je pouhých cca 20% nanočástic lokalizováno v mitochondriích a jen cca 10% mitochondrií obsazeno QCD nanočásticemi. Dle subjektivního posouzení viability, rozložení a tvaru mitochondrií se zdá, že nejsou QCD nanočásticemi nijak poškozovány.

Tabulka 5: Výsledky kolokalizace QCD a mitochondrií pro 4 náhodné buňky.

	buňka1	buňka2	buňka3	buňka4	průměr
průměrná saturace nanočástic	35,6926	32,3898	14,6256	0,735	20,86075
průměrné zaplnění organel	6,88	25,8677	6,5	0,626	9,968425
počet nanočástic v oblasti na μ^2	3,98	3,0741	26,8557	35,0958	17,2514
počet organel v oblasti na μ^2	14,5731	4,61	46,8401	45,0173	27,760125
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	1,0104	1,3	4,0522	0,3303	1,673225

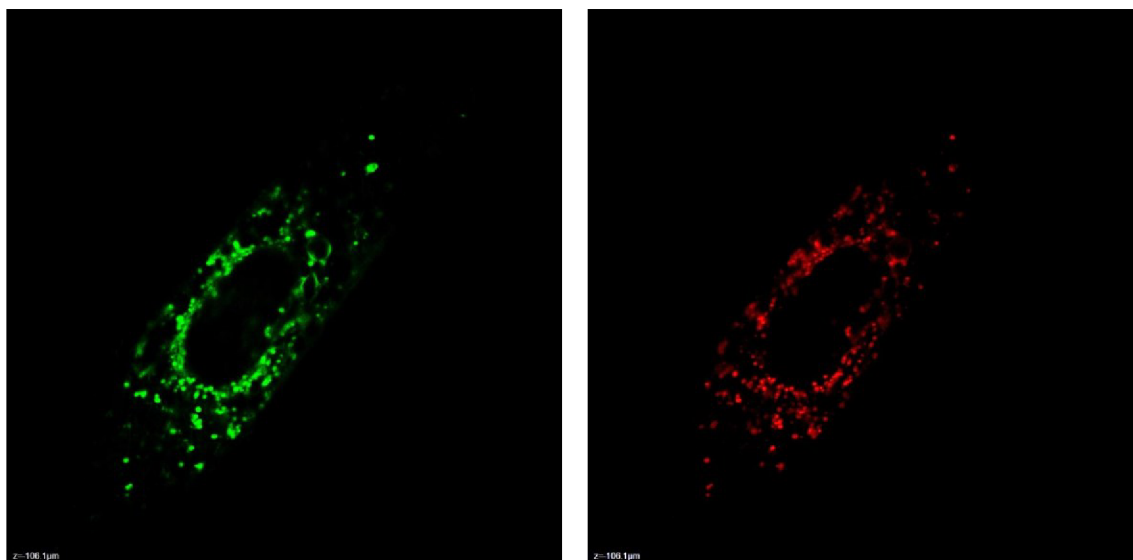
6.3 Kolokalizace FeNV-R a lysozomů - první metoda (původní spektrum barviva lyso RED)

Z důvodů prevence překryvu spekter FeNV-R (rhodamin) a barviva *cell navigator-lysosome staining kit RED* (deklarované maximum emise 600 nm) jsme se rozhodli pozorovat FeNV-R a barvivo *cell navigator™ lysosome staining kit GREEN* (deklarované maximum emise 525 nm), čili barvivo které má emisi fluorescence ve vzdálenější oblasti od fluorescence FeNV-R. U tohoto barviva uvádí výrobce exc. / em. spektrum 490 / 525 nm a tím by rozhodně nemělo tvořit parazitní obrazy v oblasti nanočástic (570 / 600-700 nm). Tento předpoklad se nicméně nenaplnil, protože zelené lysozomální barvivo mělo ve skutečnosti velmi silné široké spektrum (490 / 525-650) a tvořilo parazitní, zavádějící překryvy. Kdyby se snímalo s tímto nastavením spekter (FeNV-R: 570/600-700; Lyso green: 490/525), došlo by k znehodnocení celého experimentu a výsledky by byly velmi neobjektivní.

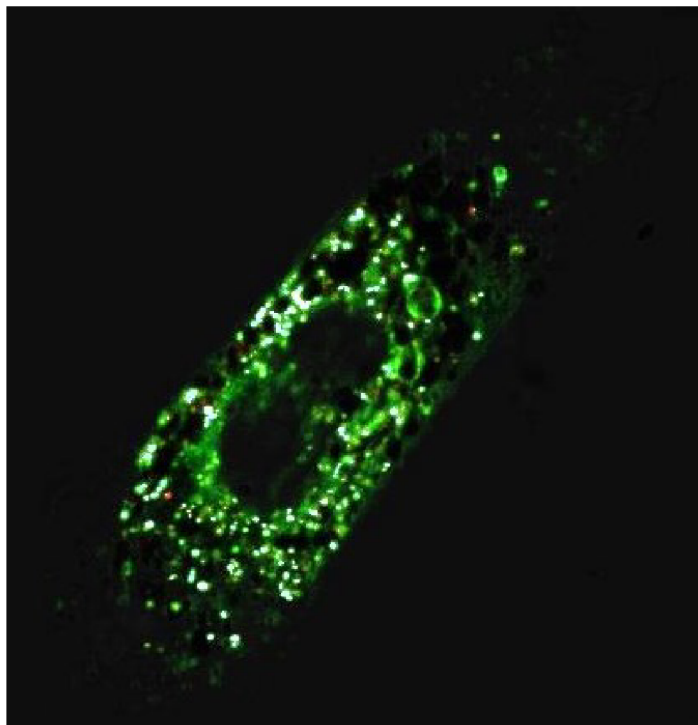
Z těchto důvodů jsme upravili nastavení excitace a detekce mikroskopu takto:

Tabulka 6: Úprava spekter pro společné pozorování zeleného lysozomálního barviva a FeNV-R nanočástic

Fluorofor	Excitace (nm)	Emise (nm)
FeNV-R + rhodamin	600	710-800
Cell navigator lysosome staining kit GREEN	470	479-513
Cell navigator lysosome staining kit GREEN, dle výrobce	490	525



Obrázek 25: Společné pozorování před úpravou spekter. Vlevo zelená fluorescence lysozomů, vpravo FeNV-R. Je vidět, až příliš nápadná podobnost, která byla způsobena přesvitím zelené do červené.

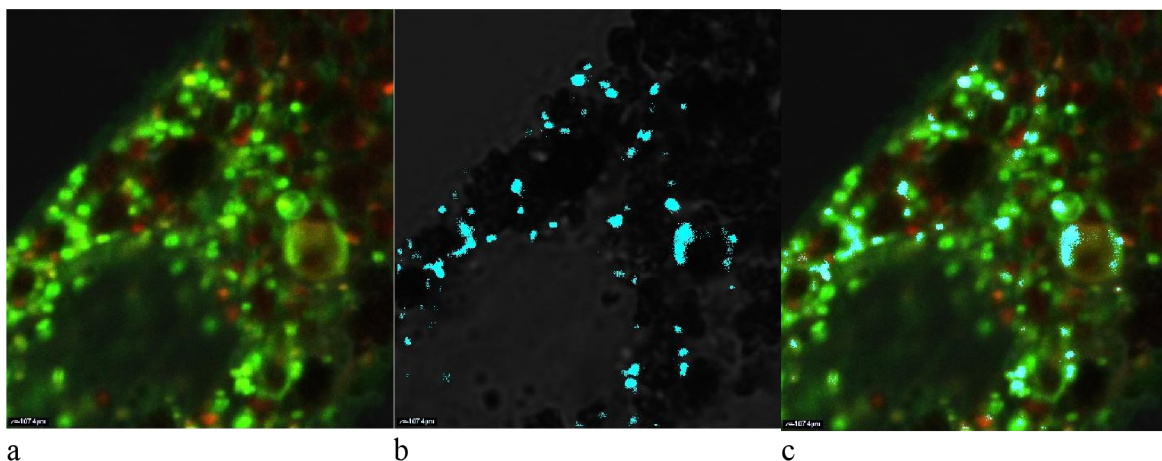


Obrázek 26: Zajímavý snímek dělící se buňky. Zeleně jsou značeny lysozomy, pár červených pixelů značí samotné nanočástice a modře je vykreslena kolokalizace. Snímek je zachycen před úpravou spekter a je tedy možné, že došlo k určitému překryvu. Dělící se buňka s relativně velkým obsahem nanočástic je důkazem, že nedošlo k toxikaci buňky.

Analýza současného značení FeNV-R a lysozomů podle výrobcem doporučeného spektra a FeNV-R nanočástic dopadla podle očekávání. U analyzované buňky se do cytoplazmy dostalo relativně málo nanočástic, takže obsadili jen cca 20 % lysozomů. Nicméně z celkového počtu nanočástic se jich do lysozomů dostaly téměř 2/3. Je možné, že zbylá 1/3 by postupně obsadila i zbylé neobsazené organely. Analýza byla aplikována na všechny roviny. Maximální hodnota byla u saturace necelých 73 % (3. rovina) a u zaplnění 46 % (1. rovina). Výsledky jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Analýza společného značení lysozomů podle výrobcem doporučeného spektra a FeNV-R nanočástic.

Práh pro nanočástice	0.0900	manual
Práh pro organely	0.2200	manual
hrana obrázku celkem	1024	pix ²
Obsah μm v oblasti	395.7799	μ
počet pixelů vybrané oblasti	1016064	pix
suma pixelů organel v oblasti	394431	pix
suma nanočásticových pixelů v oblasti	135491	pix
suma překrytých pixelů celkem	91751	pix
suma překrytých pixelů v oblasti	90303	pix
průměrná kolokalizace celkem	0.8750	%
průměrná kolokalizace v oblasti	0.8888	%
průměrný obsah nanočástic v oblasti	1.35	%
průměrný obsah organel v oblasti	3.20	%
průměrná saturace nanočástic	61.7054	%
průměrné zaplnění organel	22.0198	%
počet nanočástic v oblasti na μ^2	342.3392	pix/ μ^2
počet organel v oblasti na μ^2	996.5917	pix/ μ^2
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	228.1647	pix/ μ^2



Obrázek 27: Grafické výsledky pro analýzu v tabulce (Tabulka 7). a) překryté vstupní kanály, b) kolokalizační pixely na průchozím světle, c) kolokalizační pixely překryté přes obrázek a. na obrázku b je krásně vidět, že nanočástice vytvořili v buňce hustou černou síť. Excitační laser nedokáže prosvítit tak hrubou strukturu a proto se z fluorescenčního pohledu zdá, že bylo v buňce nanočástic málo a možná proto, není kolokalizace vyšší než 61 resp. 22 %.

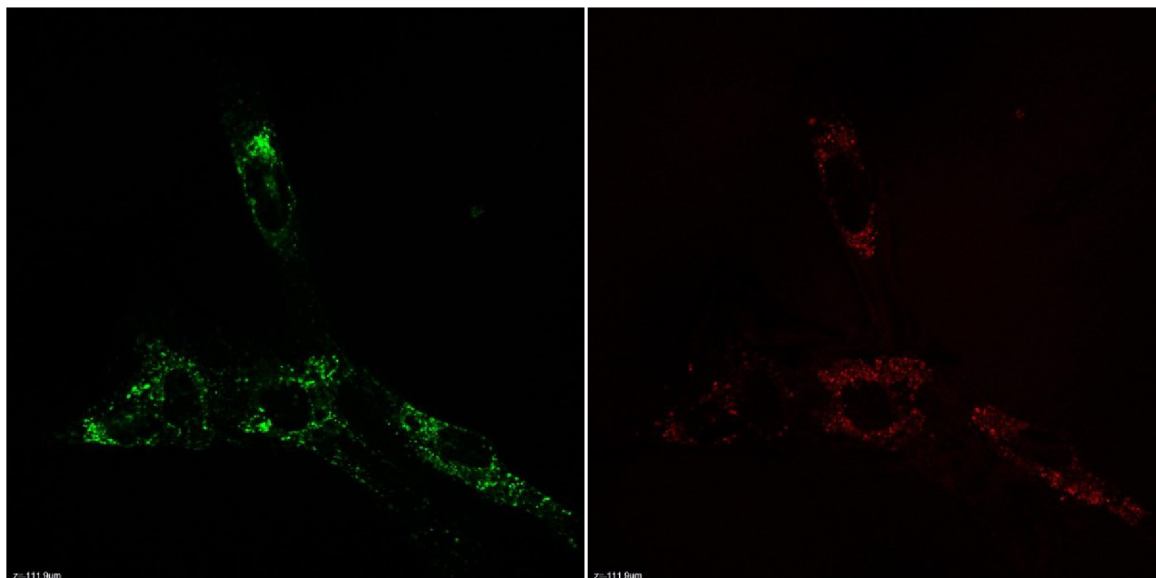
6.3.1 Zkrácená statistika pro další buňky značené FeNV-R a zeleným lysozomálním barvivem (první metoda)

Tabulka 8: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green. Analýza proběhla před úpravou spekter a tak mohou být hodnoty znehodnoceny. Je vidět silná saturace nanočástic, přičemž je ještě dost lysozomů volných. Analýza proběhla aproximací všech rovin buňky.

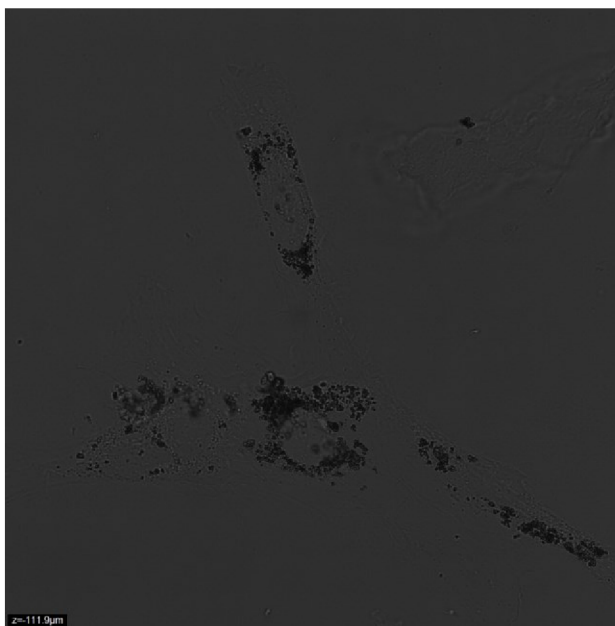
	buňka1	buňka2	buňka 3	buňka 4	průměr
průměrná saturace nanočástic (%)	97.7334	92.6909	54.1865	76.5058	80,27915
průměrné zaplnění organel (%)	15.7649	43.4642	34.0723	43.3155	34,15423
počet nanočástic v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	10.85	13.6285	116.2990	12.1171	38,22365
počet organel v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	64.8348	28.3628	375.2114	22.3474	122,6891
počet kolokalizace v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	10.61	12.00	62.6466	9.89	23,78665

6.4 Kolokalizace FeNV-R a lysozomů – druhá metoda (upravené spektrum barviva lyso GREEN)

Z důvodu překryvu spekter jsme u další misky použili optimalizované spektrum, kde by mě nyní měly vykazovat fluorescenci jen skutečné FeNV-R, nikoliv parazitní obrazy lysozomů.



Obrázek 28: Stejná miska jako v obrázku (Obrázek 25), ale nastavení spekter podle tabulky (Tabulka 6). Je vidět, že zelené lysozomy tvoří menší kuličky a nanočástice tvoří prostornější shluky a kuličky s větším jasně pravděpodobně značí průnik do lysozomu.



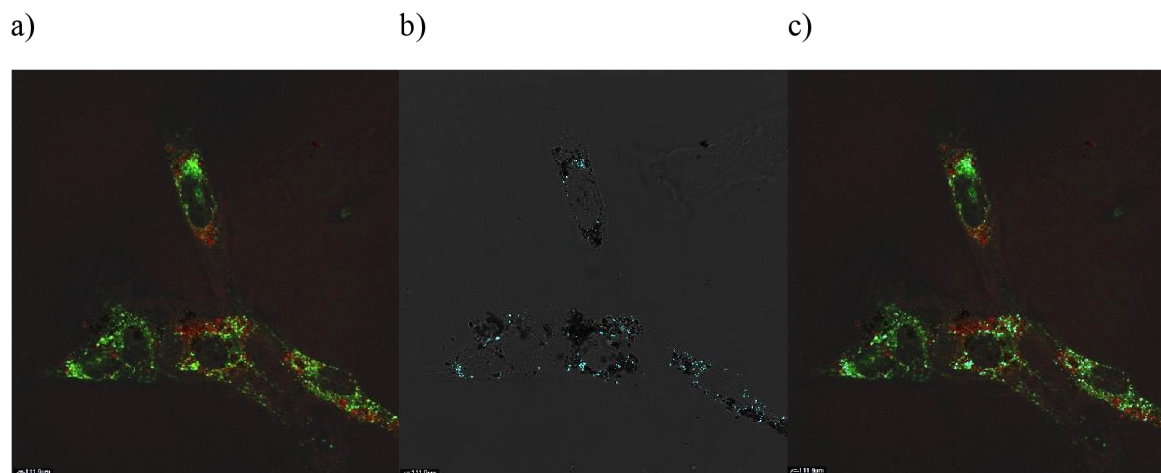
Obrázek 29: Pro ilustraci - obrázek stejné pozice jako v přechodím obrázku, ale jedná se transmissní světlo. I v klasickém optickém mikroskopu je jasně vidět, jak vypadá černá železitá nanočástice v buňce.

Tabulka 9: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green.

obsah obrázku celkem	1024	pix ²
Obsah µm v oblasti	1.0900e+04	µ
počet pixelů vybrané oblasti	335691	pix
suma pixelů organel v oblasti	22501	pix
suma nanočásticových pixelů v oblasti	207060	pix
suma překrytých pixelů celkem	21525	pix
suma překrytých pixelů v oblasti	18205	pix
průměrná kolokalizace celkem	0.2053	%
průměrná kolokalizace v oblasti	0.5423	%
průměrný obsah nanočástic v oblasti	6.1682	%
průměrný obsah organel v oblasti	0.6703	%
průměrná saturace nanočástic	6.1682	%
průměrné zaplnění organel	66.7338	%
počet nanočástic v oblasti na µ ²	18.9963	pix/µ ²
počet organel v oblasti na µ ²	2.0643	pix/µ ²
počet kolokalizace v oblasti na µ ²	1753896	pix/µ ²

Z výsledků v tabulce (Tabulka 9) vidíme, že 2/3 lysosomů jsou již obsazené nanočásticemi a spousta nanočástic je ještě v cytoplasmě. Tato obrovská saturace byla

viditelná i na obrázku (Obrázek 29). Práh byl zvolen manuálně a analýza proběhla aproximací všech rovin. Nanočástice byly kultivovány 24 hodin, lysozomy byly barvené 40 minut.



Obrázek 30: a) Spojené tři vstupní kanály (nanočástice červeně, lysozomy zeleně a průchozí světlo) b) Grafická lokalizace překryvu lysozomů a nanočástic na průchozím světle. c) Modrý překryv na původním obrázku a. Je vidět, že nanočástice obsazují okrajový prostor buňky a nevstupují do jadra. Rovina=4, upravená spektra.

6.4.1 Zkrácená statistika pro další buňky značené FeNV-R a zeleným lysozomálním barvivem (druhá metoda)

Tabulka 10: Analýza FeNV-R nanočástic a barviva lyso green. Jedná se o měření s upravenými spektry, bez překryvu. Povedlo se nasnímat jen dvě buňky v 10 rovinách. U buňky 2 došlo zřejmě k chybnému nastavení parametrů. Analýza proběhla aproximací všech rovin buňky.

	buňka1	buňka2	buňka 3	buňka 4	průměr
průměrná saturace nanočástic (%)	69.3148	6.1682	36.8859	45.5481	32,81704
průměrné zaplnění organel (%)	7.1560	66.7338	66.6550	27.2232	46,90036
počet nanočástic v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	3.58	18.9963	2.19	42.7339	17,2993
počet organel v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	38.3295	2.0643	1.63	77.3680	24,29122
počet kolokalizace v oblasti na μ^2 (pix/ μ^2)	3.17	1753896	1.0040	28.6834	701565

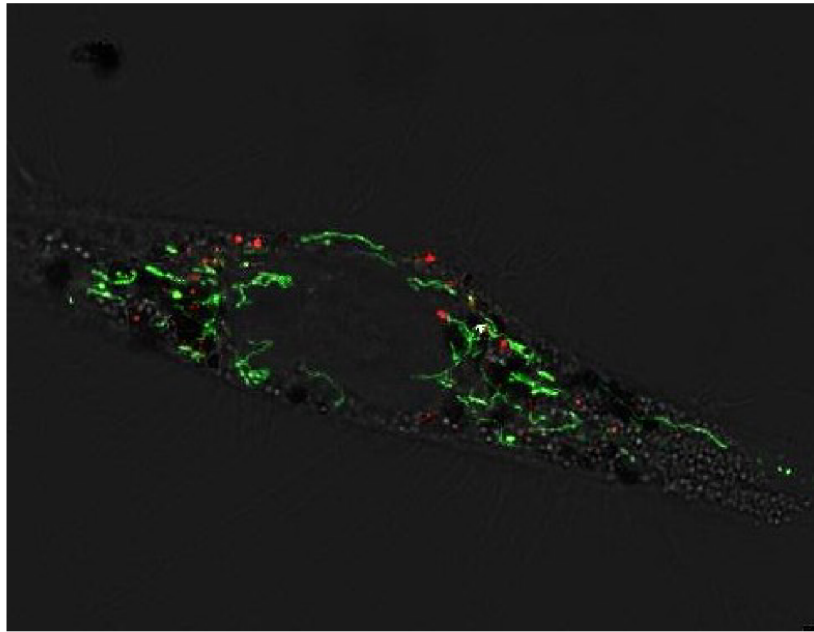
6.5 Kolokalizace FeNV-R a mitochondrií

Opět bylo potřeba první optimalizovat nastavení excitace a emise, protože FeNV-R mají jiné spektrum než QCD. Toto nastavení je uvedeno v tabulce (Tabulka 3). Obecně se dá říct, že FeNV-R nanočástice mají oproti QCD tendenci tvořit malé kruhové shluky podobné lysozomům.

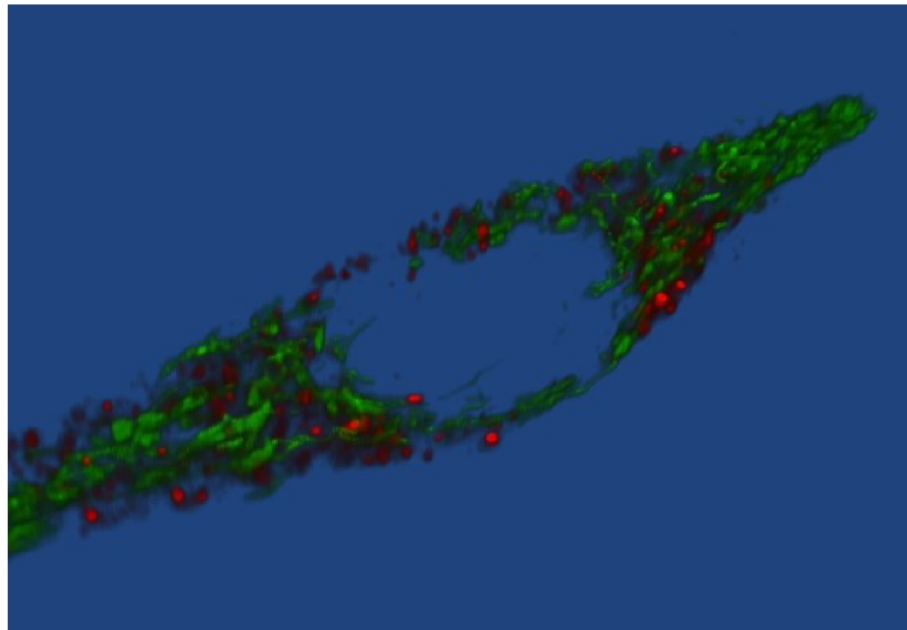
Tabulka 11: Analýza společné detekce mitochondrií a FeNV-R nanočástic. Výsledky jsou aproximací všech rovin.

Práh pro nanočástice	0.0800	manual
Práh pro organely	0.1700	manual
hrana obrázku	1024	pix
rozměr hrany obrázku	76.6200	μ
Obsah μm v oblasti	1.3359e+03	μ
počet pixelů vybrané oblasti	238602	pix
suma pixelů organel v oblasti	36467	pix
suma nanočásticových pixelů v oblasti	3691	pix
suma překrytých pixelů celkem	2418	pix
suma překrytých pixelů v oblasti	264	pix
průměrná kolokalizace celkem	0.0384	%
průměrná kolokalizace v oblasti	0.0184	%
průměrný obsah nanočástic v oblasti	0.2578	%
průměrný obsah organel v oblasti	2.73	%
průměrná saturace nanočástic	6.58	%
průměrné zaplnění organel	0.5844	%
počet nanočástic v oblasti na μ^2	2.30	pix/ μ^2
počet organel v oblasti na μ^2	27.2987	pix/ μ^2
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	0.1976	pix/ μ^2

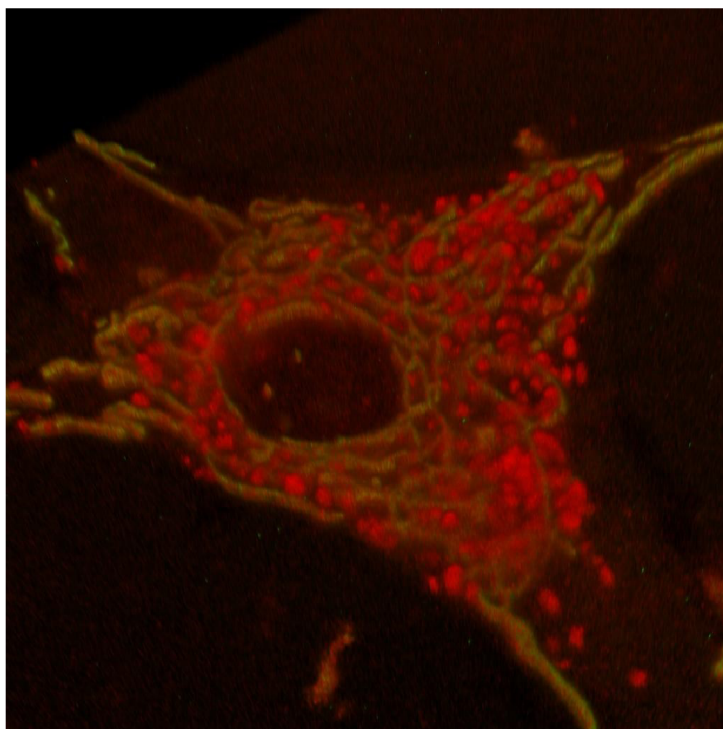
Z tabulky (Tabulka 11) můžeme vyčíst podobné výsledky jako u tabulky (Tabulka 4). Pouze necelých 6 procent FeNV-R se dostalo do mitochondrií, které byly zaplněné zhruba z půl procenta. Z toho vyplývá, že velké množství nanočástic je lokalizováno v cytoplazmě (pravděpodobně v lysozomech) a neovlivňuje funkci mitochondrií. Výsledky opticky potvrzuje i níže vložený obrázek.



Obrázek 31: Společná detekce FeNV-R (červeně) a mitochondrií (zeleně). Pár modrých pixelů značí pixely překryvu. Na obrázku je snímek 1. roviny buňky, která posloužila pro statistiku v tabulce (Tabulka 11).



Obrázek 32: 3D zobrazení 10 rovin v Leica softwaru. Zeleně jsou značeny mitochondrie a červeně FeNV-R. Zde je kolokalizace značena oranžovou barvou. Je vidět, že nanočástice jsou umístěny zcela mimo mitochondrie a jádro.



Obrázek 33: 3D zobrazení 10 rovin jiné buňky (Leica software). Stejně jako v předchozím obrázku jsou červeně barveny FeNV-R a žluto-zeleně mitochondrie. Opět vidíme, že se nanočástice do mitochondrií převážně nedostaly. Buněčné jádro je rovněž bez nanočástic.

6.5.1 Analýza FeNV-R a mitochondrií u dalších buněk

Tabulka 12: Analýza detekce FeNV-R a mitochondrií současně u čtyř náhodných buněk.

	buňka1	buňka2	buňka3	buňka4	průměr
průměrná saturace nanočástic	18,9394	28,3881	4,31	51,9869	25,9061
průměrné zaplnění organel	0,9958	3,1028	0,1904	8,95	3,30975
počet nanočástic v oblasti na μ^2	0,0373	0,1473	0,1559	0,5298	0,217575
počet organel v oblasti na μ^2	0,7088	1,75	2,21	3,179	1,96195
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	0,0071	0,0418	0,0073	0,336	0,09805

Pro objektivní potvrzení výsledků v tabulce (Tabulka 11) se opět provedla tatáž analýza pro čtyři náhodně vybrané buňky z různých kultivačních misek. Výsledky jsou zprůměrovány pro všechny roviny. Dle výsledků v tabulce (Tabulka 12) je vidět, že se potvrdil předpoklad z tabulky (Tabulka 11). Necelá čtvrtina FeNV-R se dostala zhruba do 3 % mitochondrií, což se dá požadovat za velmi nízkou kolokalizaci.

7 LOKALIZAČNÍ SOFTWARE

Pro potřeby této práce byl vytvořen lokalizační software ve vývojovém prostředí Matlab. Hlavní motivace byla vytvořit algoritmus, který bude porovnávat obrázky organel a nanočástic. Hlavními analyzovanými vlastnostmi je otázka překryvu vstupů: pronikání nanočástic do organel, dále kvantifikovaná analýza počtu nanočástic a organel a objektivní procentuální zhodnocení.

7.1 Nastavení mikroskopu pro tvorbu vstupních dat

Existuje spousta okolností, které mohou znehodnotit objektivnost výsledků. Proto je velice důležité hodnotu následujících nastavení optimalizovat a držet se ho pro všechny další experimenty. Jedná se především o nastavení intenzity excitačních laserů. V případě, že je nastavení excitační intenzity silnější, tak ve výsledném obrázku je samozřejmě více pixelů daného fluoroforu na jednotku plochy. Proto jsme po několika experimentech optimalizovali excitační emisi u nanočástic na 7 % intenzity laseru, při smartgainu hybridního detektoru (koeficient násobení intenzity) 369 %. U organel jsme postupně optimalizovali 1% intenzity laseru a smartgain hybridního detektoru jsme nastavovali na 100 %.

Další nastavovaná hodnota je zoom mikroskopu, jedná se o rozměr oblasti vzorku, kterou mikroskop rastruje. Čím větší zoom nastavíme, tím více pixelů bude znázorňovat emisi fluoroforu (za cenu snížené ostrosti obrazu). Ukázalo se, že zoom 1,75 při 60x zvětšujícím objektivu je ideální poměr přiblížení celé buňky a ostrého obrazu.

Poslední důležitá hodnota je tzv. pinhole. Jedná se o bodovou clonku, základ rozdílů mezi fluorescenčním a konfokálním mikroskopem. Velikost pinhole určuje, jaké množství světla doputuje k detektoru – čím větší pinhole je, tím více signálu mimo fokusovaný bod (ohnisko) doputuje k detektoru (viz kap. 2.5, 2.6). Při velice slabých emisích (PEG) jsme nastavovali pinhole na hodnotu 2,62. U většiny kolokalizačních detekcí jsme nastavili pinhole na výchozí hodnotu 1.

7.2 Zpracování a nastavení vstupních parametrů dat

Snímání a detekce každého objektu, respektive každé roviny daného objektu, se realizuje většinou paralelně v několika intervalech emisních vlnových délek a KM pak realizuje ukládání snímků paralelně v několika výstupních kanálech. Buňka tedy může

být například snímána v oblasti zeleného emisního světla, červeného emisního světla a navíc ještě v módu průchozího světla. V našem případě např. při snímání mitochondrií (zelená fluorescence), nanočástic (červená fluorescence v buňce) a průchozího světla máme zapnuté tři detektory a můžeme exportovat až tři výstupní kanály, přičemž odpovídají postupně: kanál 1: zelené organely, kanál 2: červené nanočástice a kanál 3: průchozí světlo.

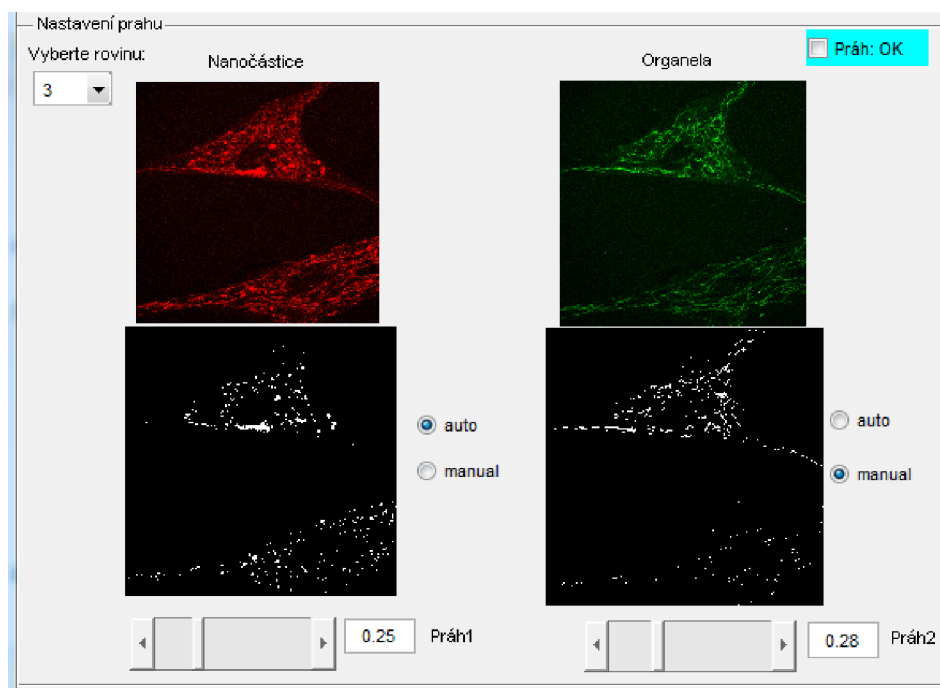


Obrázek 34: Ukázka nastavování detektorů v Leica softwaru. V tomto případě je zapnut fotonásobič 2 (emisní filtr 500-540 nm), hybridní detektor 3 (emisní filtr 580-650 nm) a fotonásobič pro detekci prošlého světla.

Celý software byl rozdělen na dva typy úloh: Analýza kolokalizace z jedné roviny buňky (dále jen analýza 1) a analýza kolokalizace pro více rovin (časů snímání), dále jen analýza 2 (ukázka výběru úlohy je v příloze 1). Základní rozdíl mezi programy je v množství vstupních dat. Analýza 1 má tři vstupy, které se vkládají zvlášť. Každý vstup náleží jednomu kanálu. Analýza 2 potřebuje na vstupu pouze určit cestu k adresáři kde je libovolný počet trojic kanálů. Tím pádem je analýza 2 vhodná pro detailní snímky např. 20 rovin jedné buňky (20 x 3 kanál = 60 vstupních obrázků) nebo snímek jedné buňky v jedné rovině ve 20 časových okamžicích, kde bude rovněž 60 vstupních obrázků.

U obou typů analýz je důležité nastavení prahů intenzity detekovaného signálu pro organely i nanočástice. Prahování slouží k filtraci pozadí, šumu a možných

spektrálních překryvů. Je umožněn dvojitý výběr prahu: automaticky a manuálně. Automatický práh je počítán na základě tzv. Otsu metody⁵. Manuální práh si uživatel vybírá pomocí posuvníku a má hodnotu v intervalu (0,1). Práh by měl mít ideálně takovou hodnotu, aby tvar organel a nanočástic fyziologicky odpovídal skutečnosti, dále tak aby bylo odstraněno pozadí a šum.

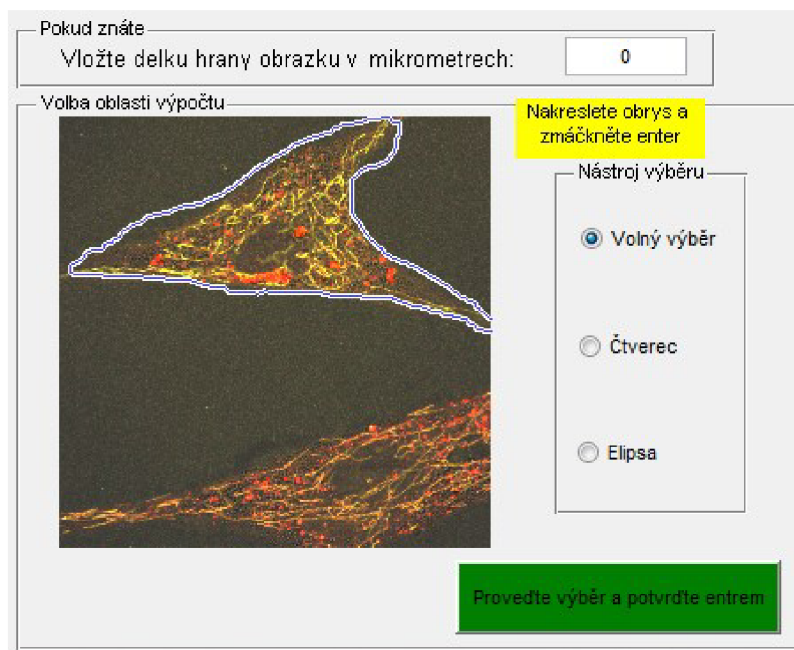


Obrázek 35: Ukázka výběru prahu v okně GUIDE. Vidíme možnost volby mezi automatickým a manuálním výběrem prahu pro organely i nanočástice.

Dalším krokem je výběr oblastí výpočtu. Tato práce se zaměřuje na analýzu vnitřního obsahu buňky, čili ideálně by měla vybraná oblast kopírovat přesnou hranici buňky (například Obrázek 36). Oblast vybíráme proto, abychom nezabíraly případné fluorescenční (například anorganické) komplexy mimo buňku a zároveň abychom důsledně analyzovaly všechny organely a veškeré místa v cytoplazmě buňky. Na výběr jsou tři typy výběru oblastí: čtverec, elipsa a nakreslení oblasti myší, přičemž vždy nejpřesnější oblast nakreslíme pomocí nástroje *imfreehand* (nakreslení myší). *Imfreehand* může být někdy zdlouhavý a proto je zde výběr i rychlejších nástrojů. Aditivní informace je o rozměru obrázku v mikrometrech. Tento údaj ukládá mikroskop

⁵ Otsu metoda je relativně jednoduchá metoda na výpočet prahu, která realizuje hledání prahu na základě výpočtu rozptylu. Hledání rozptylu probíhá na základě výpočtu histogramu. Otsu hledá vnitřní rozptyl a mezi rozptyl, přičemž práh leží v místě maximálního mezi rozptylu nebo minimálního vnitřního rozptylu. [46]

v přídatných souborech ke všem analýzám. V případě použitého Leica KM lze tento výdaj vyčíst ze souboru „Název experimentu_Properties.xml“, který je standardně uložen do složky „Metadata“. V tomto souboru najdeme rozměr obrázku v mikrometrech nahoře ve soupci „Physical Length“. V případě určení této hodnoty získáme objektivní posouzení kvantifikace pixelů na mikrometr čtvereční.



Obrázek 36: Ukázka volby oblasti výpočtu. Je vidět panel pro výběr výběrového nástroje. Zelené dolní tlačítko aktivuje začátek kreslení a při stisku klávesy *enter* se spustí další výpočty. Nahoře je vidět editovací pole pro vypsání hrany obrázku v reálném rozměru.

7.3 Analýza kolokalizace z jedné roviny

Po nastavení výše uvedených vstupních parametrů (vlození obrázků, nastavení prahu, výběru oblasti výpočtu a vložení hrany obrázku v mikrometrech) se přistupuje k samotnému výpočtu a analýze kolokalizace. Využívá se toho, že vstupní obrázky mají stejné rozměry a tím je bereme jako matice, které se prochází bod po bodu a v případě, že se prahované pozice dvou obrázků shodují, uloží se tato pozice do nové již kolokalizační výsledné matice. Z této matice jsou následně odebrány hodnoty, které se neshodují s maskou obrysu uživatelem vybrané oblasti. Následně se po stisku tlačítka na otevření grafických výsledků objeví modře označené kolokalizované pixely v buňce, je možnost také prohlédnout si vstupy. V tomto okně jsou tři tlačítka- jedno pro přiblížení obrázku na oblast zájmu, druhé je pro vykreslení vybrané oblasti a třetí je pro export

obrázku do nového *figure* okna, kde si uživatel může výsledný obrázek exportovat např. do jpg formátu a uložit na disk.

The screenshot shows a window titled "Výsledky" containing a table with 19 rows and 4 columns: "typ", "hodnota", and "jedr". The table lists various metrics such as pixel counts and percentages. To the right of the table are three buttons: a green button labeled "Zobrazení grafických výsledků", a red button labeled "Restart", and a yellow button labeled "Aktualizovat". Below the "Aktualizovat" button is a red button labeled "Zavřít okno".

	typ	hodnota	jedr
6	počet pixelů vybrane oblasti	446430 pix	
7	počet pixelů organel v oblasti	76277 pix	
8	počet nanocasticovych pixelů v oblasti	113701 pix	
9	počet překrytých pixelů v celém obrázku	83084 pix	
10	počet překrytých pixelů v oblasti	75791 pix	
11	zastoupení kolokalizace v celém obrázku	7.9235 %	
12	zastoupení kolokalizace v oblasti	16.9771 %	
13	zastoupení nanočástic v oblasti	25.4689 %	
14	zastoupení organel v oblasti	17.0860 %	
15	saturace nanočástic v oblasti	66.6582 %	
16	zaplnění organel nanočásticemi v oblasti	99.3628 %	
17	počet nanočástic v oblasti na μ^2	88.2847 pix	
18	počet organel v oblasti na μ^2	59.2263 pix	
19	počet kolokalizace v oblasti na μ^2	58.8490 pix	

Obrázek 37: Ukázka výstupní tabulky kolokalizační analýzy z jedné roviny. Vidíme zelené tlačítko pro otevření okna s výběrem výstupních obrázků a žluté tlačítko pro aktualizaci hodnot v tabulce.

V případě, že se uživatel rozhodl změnit hodnoty prahu, ale chce zachovat nakreslenou oblast, nemusí spouštět celé měřit znovu, ale stačí stisknout tlačítko aktualizovat, které aktualizuje tabulku výsledků a grafické výsledky podle nových prahů. Vysvětlení významu vybraných výsledků v tabulce (viz Obrázek 37) je uvedeno níže.

Zastoupení kolokalizace v celém obrázku a zastoupení kolokalizace v oblasti

Určuje kolik procent pixelů z celého obrázku (nebo oblasti) jsou pixely překryvu organely a nanočástic.

Saturace nanočástic v oblasti

Určuje kolik procent nanočásticových pixelů z celku se překrývá s pixely organel (v uživatelem vybrané oblasti). Je to statisticky důležitá hodnota, v případě lysozomů by měla být vyšší než v případě mitochondrií.

Zaplnění organel nanočásticemi v oblasti

Vypovídá o tom, kolik procent organel je již zaplněno nanočásticemi z celkového počtu pixelů organel v uživatelem vybrané oblasti. V případě lysozomů by mělo být toto číslo vysoké. Je to rovněž velice důležitá hodnota.

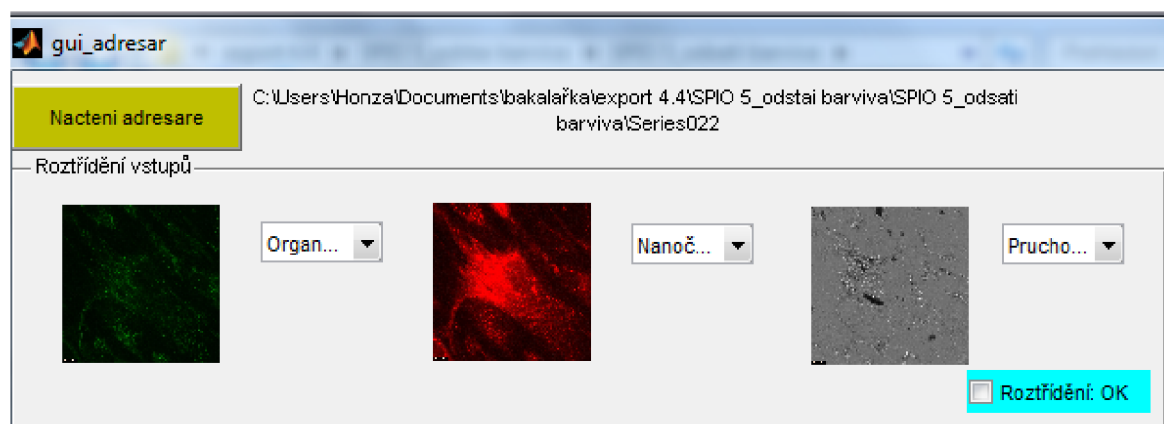
Počet nanočástic v oblasti na μ^2 , počet organel v oblasti na μ^2 , počet kolokalizace v

oblasti na μ^2

Objektivní výpověď obsahu pixelů na jednotku reálného rozměru. Tento poměr je počítán v uživatelem vybrané oblasti. Pokud se vybraná oblast blíží (resp. rovná) velikosti buňky, tak tato hodnota přidává informaci o poměru počtu pixelů a velikosti buňky. Ukázka celého programu analýza 1 je v příloze č. 2

7.4 Analýza kolokalizace z více rovin (z adresáře)

Vstupem pro analýzu je cesta k adresáři, kde jsou uloženy trojice vstupů. Jako první zde musí ještě proběhnout rozřídění vstupů. Probíhá na základě načtení první trojice snímků v adresáři a uživatel sám rozhodne, zda je první v trojici nanočástice, organely nebo průchozí světlo a stejně to provede pro druhý a třetí vstup trojice (viz Obrázek 38). Předpokládá se, že u dalších trojic je pořadí stejné, protože mikroskop ukládá své výstupy vždy stejným způsobem a logicky je seřazuje. Dále si uživatel podobně jako v předchozí kapitole nastaví práh, oblast výpočtu a může si nastavit rozměr obrázku v mikrometrech. Práh si uživatel vybírá v jakékoliv rovině, program ale počítá jen s jedním prahem pro všechny roviny a to s tím, který je napsán v editovacím okénku.



Obrázek 38: Ukázka rozřídění vstupů na jednotlivé trojice.

Zdalo by se říct, že výpočet kolokalizace bude stejný jako v předchozím zjednodušeném programu. Je sice podobný, ale v mnoha záležitostech odlišný. Největší odlišnost je v rozřídění vstupů, kde se musí respektovat nastavení trojice podle uživatele. V každé trojici probíhá výpočet podobné analýzy jako v předchozí kapitole a ukládá se do vektoru, kde jsou na konci všechny mezivýsledky uloženy. Výpočet je celkem komplikovaný, protože každý vstupní obrázek je rastrován a rozměry obrázků z mikroskopu jsou většinou minimálně 1024x1024 pixelů. Těchto důvodů je doba výpočtu přímo závislá na počtu vstupů.

Výsledky jsou v tabulce vyhodnoceny primárně pro všechny roviny. Znamená to, že pixely kvantifikace jsou sečteny a procentuální zastoupení je zprůměrováno pro jednotlivé trojice. Díky tomu máme komplexní hodnoty pro celý objem buňky. Dělá se to z důvodu, že velké množství buněk je nehomogenní, jejich tvar je různě zohýbán a proto se může stát, že ne vždy je prostřední rovina nejvíce zaplněná organelami a nanočásticemi apod. Toto komplexní zhodnocení je nicméně závislé na člověku, který snímal buňky. Pro správné a objektivní výsledky je nutné nasnímat roviny celého objemu buňky, ale nesnímat roviny mimo buňku. Detailnější statistiky je možné otevřít v případě stisku tlačítka pro otevření okna statistiky pro jednotlivé roviny. Tato analýza se dá výhodně využít i v případě, že neanalyzujeme roviny, ale časové snímky. Zde se zobrazí hodnoty postupně podle časů. Další možnost je otevření statistiky maximálních hodnot a přiřazení jednotlivých rovin.

K otevření grafických výsledků slouží další tlačítko (Grafické výsledky). Je možnost zobrazit stejné grafické výsledky jako v analýze z jedné roviny. Uživatel si vždy vybere z které roviny a jaký typ výsledků chce vidět. Je zde opět možnost přiblížení, zobrazení oblasti výpočtu a exportu. Ukázka grafického okna této části programu je v příloze č. 4

Výhoda analýzy 2, oproti analýze 1 je ve větším množství statisticky důležitých dat a respektování prostorové struktury buňky. Další výhodou je alternativní využití jako analyzátoru časových snímků. Analýza 2 se dá využít i na analýzu jedné roviny, nicméně z důvodu složitějšího a delšího algoritmu trvá déle. Proto je pro rychlé vyhodnocení jedné roviny nebo jednoho času výhodnější využít program Analýza 1. Ukázka celého programu analýza 2 je v příloze č. 3

8 DISKUZE A ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Cílem této práce bylo získat objektivní posouzení chování nanočástic v buňkách. Zjistili jsme, že doba pro kumulaci maximálního množství nanočástic do buňky se pohybuje mezi 12 – 24 hodinami, při koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$. Většina buněk byla po této době ještě živá a bez známek poškození (zdravé kulaté jádro, normální tvar buňky apod.). Při lokalizování nanočástic v buňkách jsme se zaměřili na dvě buněčné organely: mitochondrie a lysozomy. Tyto dvě organely byly vybrány na základě literární rešerše, z důvodu pravděpodobného vylučování nanočástic do lysozomů a možného nebezpečí toxicity nanočástic při vstupu do mitochondrií (viz kap. 4.3). Tyto analýzy probíhaly pro dva typy fluoroforů v železitých nanočásticích: Rhodamin (FeNV-R) a kvantové tečky z uhlíku (QCD). Níže je uvedeno srovnání zjednodušených statistik pro 5 náhodně

vybraných buněk z každého typu experimentu. U každé buňky bylo vybráno 5 parametrů, které se dají považovat za nejvíce objektivní. Jedná se o: průměrnou saturaci nanočástic (%), průměrné zaplnění organel (%), počet nanočástic v oblasti na μ^2 (pix/μ^2), počet organel v oblasti na μ^2 (pix/μ^2) a počet kolokalizace v oblasti na μ^2 (pix/μ^2). Popis těchto parametrů je uveden v kap. 7.3.

8.1 Statistika společné detekce nanočástic a lysozomů

Z vyhotovených výsledků vyplývá, že FeNV-R mají větší tendenci pronikat do lysozomů než QCD. Obecně vychází, že cca polovina nanočástic se dostává v buňce do zhruba třetiny lysozomů. Zbytek nanočástic je buď v cytoplazmě, nebo je možné, že pronikly do jiných organel, viz tabulka (Tabulka 13).

Tabulka 13: Společné vyhodnocení tabulek: Tabulka 1, Tabulka 2, Tabulka 7, Tabulka 8, Tabulka 9, Tabulka 10

	průměrná hodnota pro QCD	průměrná hodnota pro FeNV-R			Celkový průměr
		První metoda	Druhá metoda	průměr	
průměrná saturace nanočástic (%)	46,77178	32,81704	76,5644	54,69072	52,05107
průměrné zaplnění organel (%)	25,07228	46,90036	31,72734	39,31385	34,56666
počet nanočástic v oblasti na μ^2 (pix/μ^2)	48,76446	17,2993	99,04676	58,17303	55,03684
počet organel v oblasti na μ^2 (pix/μ^2)	91,26616	24,29122	297,46962	160,8804	137,6757
počet kolokalizace v oblasti na μ^2 (pix/μ^2)	34,66578	701564,9715	64,66226	350814,8	233888,1

8.2 Statistika společné detekce nanočástic a mitochondrií

V rámci statistického zhodnocení kolokalizace nanočástic a mitochondrií vyplývá, že QCD nanočástice se dostávaly do mitochondrií více než FeNV-R. U QCD bylo využito na obsazení necelých 8. % mitochondrií 17% nanočástic z celku a u FeNV-R se obsadily jen necelé 3 % mitochondrií, s tím, že zhruba 80 % obsadilo jiný buněčný prostor. Celkově to vypadá, že do mitochondrií se dostává zhruba 20 % železitých nanočástic a zaplňují přibližně 5% jejich objemu, viz tabulka (Tabulka 14).

Tabulka 14: Společné vyhodnocení tabulek Tabulka 4, Tabulka 5, Tabulka 11 a Tabulka 12

	Průměrná hodnota pro QCD	Průměrná hodnota pro FeNV-R	Celkový průměr
průměrná saturace nanočástic	17,0926	22,04088	19,56674
průměrné zaplnění organel	8,43474	2,76468	5,59971
počet nanočástic v oblasti na μ^2	15,03312	0,63406	7,83359
počet organel v oblasti na μ^2	22,8421	7,0293	14,9357
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	1,3781	0,11796	0,74803

8.3 Porovnání průměrných obsahů železitých nanočástic v lysozomech a mitochondriích

Ze společného srovnání tabulek: Tabulka 13 a Tabulka 14 vyplývá, že se potvrzuje teoretický předpoklad z kapitoly 4 a další literatury. V lysozomech se průměrně usazuje kolem 50 % inkubovaných nanočástic, které obsazují zhruba třetinu všech lysozomů. Mitochondrie jsou obsazovány jen z pěti procent a selektuje se do nich jen necelých 20 % nanočástic. Tyto výsledky potvrzuje i srovnání na reálný rozměr. Vidíme, že na jeden μ^2 buňky (oblasti) se dostává několika násobně více pixelů nanočástic do lysozomů, než do mitochondrií, viz tabulka (Tabulka 15).

Tabulka 15: Společné srovnání tabulek: Tabulka 13 a Tabulka 14.

Železitá nanočástice	QCD		FeNV-R		Celkově	
	Lyso.	Mito.	Lyso.	Mito.	Lyso.	Mito.
organela						
průměrná saturace nanočástic	46,77178	17,0926	76,5644	22,0409	52,05107	19,56674
průměrné zaplnění organel	25,07228	8,43474	31,72734	2,76468	34,56666	5,59971
počet nanočástic v oblasti na μ^2	48,76446	15,03312	99,04676	0,63406	55,03684	7,83359
počet organel v oblasti na μ^2	91,26616	22,8421	297,46962	7,0293	137,6757	14,9357
počet kolokalizace v oblasti na μ^2	34,66578	1,3781	64,66226	0,11796	233888,1	0,74803

9 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zhodnocení chování železitých nanočástic v mezenchymálních kmenových buňkách. Zaměřili jsme se na optimalizaci metody barvení dvou organel: lysozomů a mitochondrií. V průběhu optimalizace jsme se rozhodli použít jiná fluorescenční barviva než ty, která jsou napsána v zadání této práce. Z důvodu prevence spektrálních překryvů s excitačně-emisním spektrem použitých nanočástic jsme optimalizovali metodu pro barvivo *cell navigatorTM lysosome staining kit GREEN* (lysozomy) a *cytopainter mitochondrial staining kit - green fluorescence* (mitochondrie). Dále jsme úspěšně optimalizovali nastavení konfokálního mikroskopu pro snímání tří typů experimentálních nanočástic. Dva typy byly nanočástice železa a jeden typ byl z uhlíkových kvantových teček, který byl použit jen pro srovnání detekce. Úspěšně jsme našli řešení pro společné snímání fluoroforu k barvení organel a nanočástic.

Na základě teoretických poznatků získaných při literární rešerši se železité nanočástice dostávají primárně do lysozomů a jen malá část nanočástic by měla obsazovat mitochondrie. Tento předpoklad byl potvrzen u statistiky z dvaceti pěti náhodně vybraných buněk. Pro aplikaci v medicíně je to velice pozitivní zpráva, protože lysozomy jsou organely, které by měly biodegradaci nanočástic zvládnout bez toxikace buňky, kdežto u mitochondrií hrozí vznik nebezpečných radikálů a poškození DNA. Rovněž velice pozitivní zpráva je, že se v žádném experimentu nanočástice neobjevily v jádře buňky, což by také mohlo vést k toxikaci buňky. Provedli jsme mnohem více experimentů než 25 náhodně vybraných buněk, ale uvedení rozsáhlejší statistiky by značně přesáhlo rozsah už tak rozsáhlé práce. Z důvodu zkoumání jen dvaceti pěti buněk je těžké říct do jaké míry je výsledek statistiky významný a objektivní. Další práce by se tedy mohla zabývat vytvořením rozsáhlé analýzy několika desítek až stovek experimentů a potvrzením výsledků v této práci.

Analýza snímků z konfokálního mikroskopu probíhala v softwaru vytvořeném v prostředí Matlab (verze 2010a). Program byl vytvořen tak, aby ho zvládat ovládat i člověk, který běžně s Matlabem nepracuje (biolog, farmakolog, biochemik apod.) a je zde proto kladen důraz na grafickou jednoduchost a přehlednost. Software bude s největší pravděpodobností využíván dále farmakologickým ústavem MU pro analýzu podobných mikroskopických dat. V případě analýzy několika desítek snímků není potřeba zkoumat každý snímek zvlášť, ale je zde možnost zadat pouze cestu k adresáři se snímky a program vypočte veškeré parametry sám pro všechny roviny řezu buňky. Podobně se dá software využít i pro analýzu několika desítek snímků jedné buňky

z více časových okamžiků. Je zde také možnost uspořádat si vstupy ve složce rovnou před výpočtem v Matlabu, což se dá považovat za velkou výhodu oproti komerčním programům na analýzu obrazu. Program zvládá výpočet minimálně patnácti důležitých kolokalizačních parametrů. Jedná se jednak o pixelovou kvantifikaci jednotlivých složek, jednak o objektivní procentuální vyjádření jednotlivých složek snímků.

Celý projekt bakalářské práce trval přes půl roku. Jednalo se o vědeckou práci s nutností vynaložení spousty volného času k optimalizaci metody. Z důvodu studia vědeckých odborných článků a publikací zejména v oblasti metabolismu a značení nanočástic a zobrazení grafických výsledků do textu je práce obsahově rozsáhlejší než běžné bakalářské práce. Práce byla rovněž prezentována na soutěžní konferenci *STUDENT EEICT 2014*, kde obsadila 2. místo v sekci Biomedicínské inženýrství a bioinformatika. V tuto chvíli je práce připravena na pokračování výzkumu dalších velice důležitých parametrů nanočástic. Jedná se především o sledování dynamiky vstupu nanočástic do buněk, jejich koncentrace v buňce v průběhu času, sledování viability buněk s inkubovanými nanočásticemi, studium transportu nanočástic přes membránu z jedné buňky do druhé a sledování redistribuci nanočástic při dělení buněk. Na tyto úlohy bude velice vhodné připravit vyhodnocovací software. Při určitých malých úpravách se dá kolokalizační software přítomný v této práci upravit na software sledující pouze nanočástice a vyhodnocování jejich pozice, koncentrace, tvaru apod.

LITERATURA

- [1] HUBER, Dale?L. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small* [online]. 2005, vol. 1, issue 5, s. 482-501 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1002/sml.200500006. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/sml.200500006>
- [2] LIU, Zhe, Fabian KIESSLING a Jessica GÄTJENS. Advanced Nanomaterials in Multimodal Imaging: Design, Functionalization, and Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2010, vol. 2010, issue 5, s. 1-15 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1155/2010/894303. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jnm/2010/894303/>
- [3] SALADO, Javier, Maite, INSAUSTI, Luis LEZAMA, Izaskun GIL DE MURO, Maria MOROS, Beatriz PELAZ, Valeria GRAZU, Jesus M DE LA FUENTE a Teofilo ROJOA. Functionalized Fe₃O₄@Au superparamagnetic nanoparticles: in vitro bioactivity: Design, Functionalization, and Biomedical Applications. *Nanotechnology* [online]. 2012-08-10, vol. 23, issue 31, s. 315102- [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1088/0957-4484/23/31/315102. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0957-4484/23/i=31/a=315102?key=crossref.5919d02092f6b4f63b5e01e8c215123b>
- [4] MAHMOUDI, Morteza. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface engineering, cytotoxicity, and biomedical applications*[online]. New York: Nova Science Publishers, c2011, xii, 225 p. [cit. 2014-05-28]. Nanotechnology science and technology series. ISBN 16-166-8964-1.
- [5] Magnetické pole v látkách. MATEMATICKO FYZIKÁLNÍ FAKULTA UK, Praha. Katedra fyziky povrchů a plazmatu. *Kurzy fyziky pro studenty distančního studia mat. fyz. fak. UK* [online]. 2011 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/skripta/kurz_fyziky_pro_DS/display.php/elmag/3_5
- [6] TUČEK, Jiří. Úvod do magnetismu, magnetické vlastnosti materiálů a magnetické jevy v nanosvětě: Nanosystémy – Workshop 14.04.2010 – Magnetické vlastnosti materiálů. KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY PŘF UP OLOMOUC. *Pokročilé vzdělávání ve výzkumu a aplikacích nanomateriálů: akce* [online]. 2010 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: <http://nanosystemy.upol.cz/upload/10/tucek-uvod.pdf>
- [7] PANKHURST, Quentin, John CONNOLLY, Steve K JONES a Jon P DOBSON. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2003-07-07, vol. 36, issue 13, R167-R181 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/201. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201?key=crossref.3e466fa3dbc8e71868fa521781326623>
- [8] POLÁKOVÁ, Kateřina. Magnetické nanočástice v medicíně. VÝZKUMNÉ CENTRUM NANOMATERIÁLŮ, Univerzita Palackého, Olomouc. *Pokročilé vzdělávání ve výzkumu a aplikacích nanomateriálů* [online]. 2012 [cit. 2014-05-28]. Dostupné

- z: http://nanosystemy.upol.cz/upload/15/polakova_ls_ii_pdf.pdf
- [9] Bohr magneton. MHRD, Govt. of India. *Towards Benchmarking of Information and Communication Technology (ICT) Modules in Physics and Chemistry* [online]. 2011 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: http://pms.iitk.ernet.in/wiki/index.php/Bohr_magneton
- [10] MÜLLER, Karin, Jeremy N. SKEPPER, Mihaly POSFAI, Rikin TRIVEDI, Simon HOWARTH, Claire COROT, Eric LANCELOT, Paul W. THOMPSON, Andrew P. BROWN a Jonathan H. GILLARD. Effect of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) on human monocyte-macrophages in vitro. In: *Biomaterials*. Oxford: Elsevier Ltd., 2007, s. 1629-1642. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.12.003. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206010180>
- [11] PANKHURST, Quentin, John CONNOLLY, Steve K JONES a Jon P DOBSON. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2003-07-07, vol. 36, issue 13, R167-R181 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1088/0022-3727/36/13/201. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0022-3727/36/i=13/a=201?key=crossref.3e466fa3dbc8e71868fa521781326623>
- [12] MASON, Edited by W.T. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity a practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press, 1999, s. 303-310. ISBN 9780080531779.
- [13] VIKOVÁ, Martina. Mikroskopie V. KATEDRA TEXTILNÍ CHEMIE, TU Liberec. *Pedagogická činnost* [online]. 2009 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: http://www.ft.tul.cz/depart/kc/sylaby/Textilni_Fyzika/8.Mikroskopie%20V.pdf
- [14] TOOMRE, Derek K, Matthias F. LANGHORST a Michael W. DAVIDSON. Introduction to spinning disk confocal microscopy. CARL ZEISS SPOL. S R.O. [14] *Education in Microscopy and Digital Imaging* [online]. 2010 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>
- [15] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [16] FIŠAR, Zeněk. Fluorofory v biomedicině. 1. LF UK. *FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH* [online]. 2009 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [17] HAMPL, Vladimír, Hana DVOŘÁKOVÁ, Eva NÝVLTOVÁ, Luboš VOLEMAN, Vojtěch VACEK, Jan PYRIH a Ondřej ŠEBESTA. SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, Přírodovědecká fakulta. *Mikroskopická technika* [online]. 2012 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/svetelnamikroskopie.htm>
- [18] HAMPL, Vladimír, Hana DVOŘÁKOVÁ, Eva NÝVLTOVÁ, Luboš VOLEMAN, Vojtěch VACEK, Jan PYRIH a Ondřej ŠEBESTA. Fluorescenční a konfokální mikroskopie. UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, Přírodovědecká fakulta. *Mikroskopická technika* [online]. 2012 [cit. 2013-12-25]. Dostupné z: <http://>

- <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/>
- [19] SPRING, Kenneth a Michael DAVIDSON. Introduction to Fluorescence Microscopy. FLORIDA STATE UNIVERSITY, Nikon, Inc. *MicroscopyU* [online]. 2000 - 2013 [cit. 2013-12-25]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- [20] PADDOCK, Stephen, Thomas J. FELLERS a Michael W. DAVIDSON. Confocal microscopy - Basic Concepts. FLORIDA STATE UNIVERSITY, Nikon, Inc. *MicroscopyU* [online]. 2000 - 2013 [cit. 2013-12-25]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>
- [21] LEICA MICROSYSTEMS CMS GMBH, Mannheim, Germany,. Leica TCS SP8 Technical Documentation [online]. 2013 [cit. 2013-12-25]. Dostupné z: http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8%20X/Brochures/Leica%20TCS%20SP8-Technical%20Documentation_EN_Dec2013.pdf
- [22] BERTORELLE, Franck, Claire WILHELM, Jacky ROGER, Florence GAZEAU, Christine MÉNAGER a Valérie CABUIL. Fluorescence-Modified Superparamagnetic Nanoparticles: Intracellular Uptake and Use in Cellular Imaging. *Langmuir* [online]. 2006, vol. 22, issue 12, s. 5385-5391 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1021/la052710u. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la052710u>
- [23] MAGRO, Massimiliano, Giulietta SINIGAGLIA, Luca NODARI, Jiri TUCEK, Katerina POLAKOVA, Zdenek MARUSAK, Sara CARDILLO, Gabriella SALVIULO, Umberto RUSSO, Roberto STEVANATO, Radek ZBORIL a Fabio VIANELLO. Charge binding of rhodamine derivative to OH⁻ stabilized nanomaghemite: Universal nanocarrier for construction of magnetofluorescent biosensors. *Acta Biomaterialia* [online]. 2012, vol. 8, issue 6, s. 2068-2076 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.02.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706112000578>
- [24] ARBAB, Ali S., Lindsey B. WILSON, Parwana ASHARI, Elaine K. JORDAN, Bobbi K. LEWIS, Joseph A. FRANK, Sara CARDILLO, Gabriella SALVIULO, Umberto RUSSO, Roberto STEVANATO, Radek ZBORIL a Fabio VIANELLO. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine* [online]. 2005, vol. 18, issue 6, s. 383-389 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1002/nbm.970. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/nbm.970>
- [25] FAN, Jingjing, Yanbin TAN, Liyong JIE, Xinying WU, Risheng YU, Minming ZHANG, Sara CARDILLO, Gabriella SALVIULO, Umberto RUSSO, Roberto STEVANATO, Radek ZBORIL a Fabio VIANELLO. Biological activity and magnetic resonance imaging of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeled adipose-derived stem cells: implications for cellular magnetic resonance imaging. *Stem Cell Research* [online]. 2013, vol. 4, issue 2, s. 44- [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1186/scrt191. Dostupné z: <http://stemcellres.com/content/4/2/44>
- [26] SCHÄFER, Richard, Rainer KEHLBACH, Michaela MÜLLER, Rüdiger BANTLEON, Torsten KLUBA, Miriam AYTURAN, Georg SIEGEL, Hartwig WOLBURG, Hinnak NORTHOFF, Klaus DIETZ, Claus D. CLAUSSEN a Jakub WISKIRCHEN. Labeling of human mesenchymal

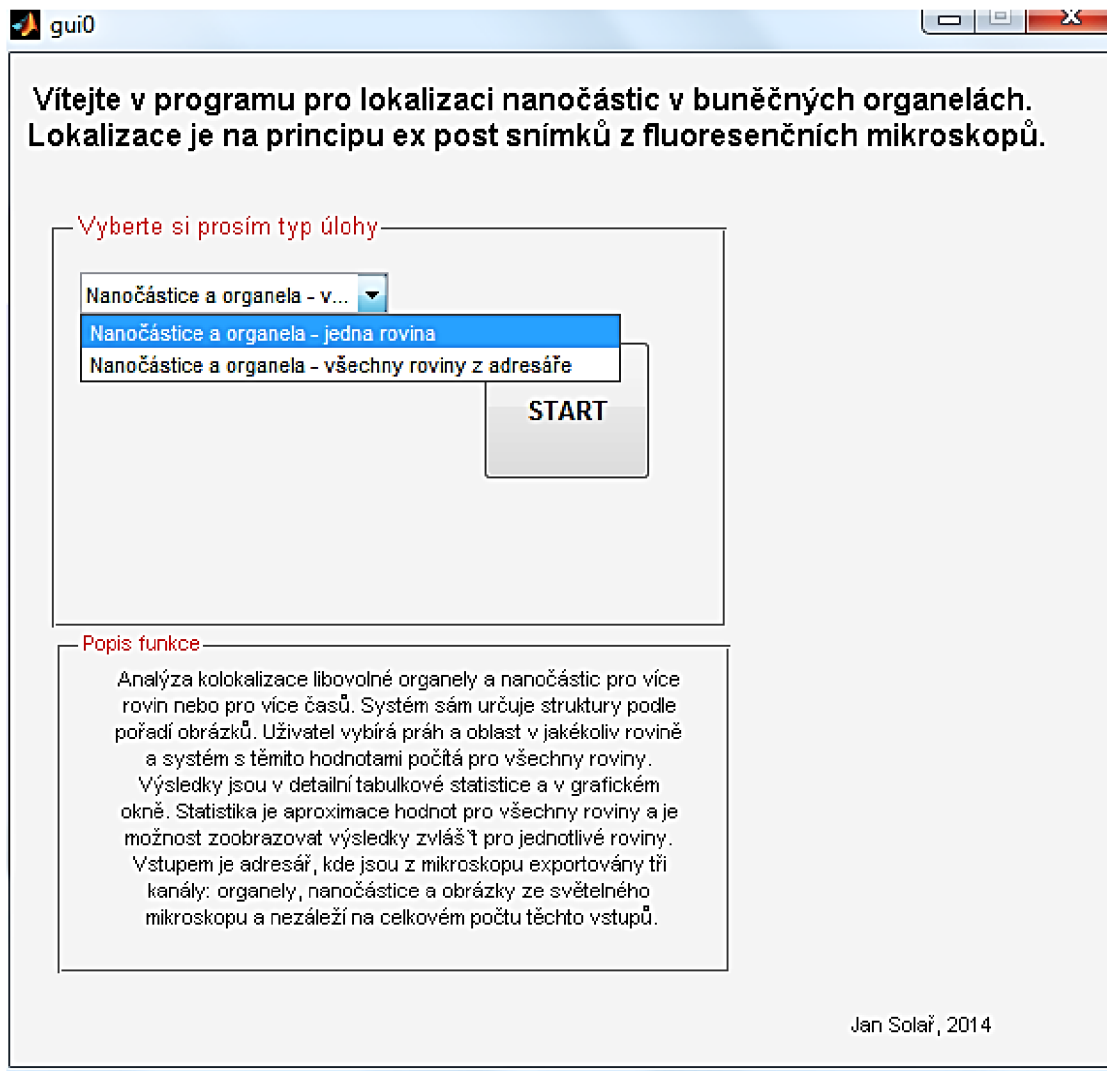
- stromal cells with superparamagnetic iron oxide leads to a decrease in migration capacity and colony formation ability: implications for cellular magnetic resonance imaging. *Cytotherapy* [online]. 2009, vol. 11, issue 1, s. 68-78 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.1080/14653240802666043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324909702506>
- [27] CO-ORGANIZED AND SPONSORED BY: INSTITUTE OF BIOMEDICAL AND HEALTH ENGINEERING, Shenzhen Institute of Advanced Technology. *International Conference on Technology and Applications in Biomedicine, 2008: ITAB 2008 ; 30 - 31 May 2008, Shenzhen, China ; in conjunction with 2nd International Symposium*. Piscataway, NJ: IEEE, 2008. ISBN 9781424422555.
- [28] Lysozomy. *Institut Galenus* [online]. 2009 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-bunka-lysozomy>
- [29] LASKAR, Amit, Moumita GHOSH, Sikander Iqbal KHATTAK, Wei LI a Xi-Ming YUAN. Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response. *Nanomedicine* [online]. 2012, vol. 7, issue 5, s. 705-717 [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.2217/NNM.11.148. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/nnm.11.148>
- [30] KIM, Jun-Sung, Tae-Jong YOON, Kyeong-Nam YU, Mi Suk NOH, Minah WOO, Byung-Geol KIM, Kee-Ho LEE, Byung-Hyuk SOHN, Seung-Bum PARK, Jin-Kyu LEE a Myung-Haing CHO. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *Journal of Veterinary Science* [online]. 2006, vol. 7, issue 4, s. 321- [cit. 2014-05-28]. DOI: 10.4142/jvs.2006.7.4.321. Dostupné z: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2006.7.4.321>
- [31] Probes for Lysosomes, Peroxisomes and Yeast Vacuoles: LysoTracker Probes: Acidic Organelle-Selective Cell-Permeant Probes. INVITROGEN. *The Molecular Probes® Handbook* [online]. 11. vydání. September 14, 2010 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-organelles/probes-for-lysosomes-peroxisomes-and-yeast-vacuoles.html>
- [32] LysoTracker® Green DND-26 - Special Packaging. INVITROGEN. *Lifetechnologies* [online]. Jan 2013 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/L7526>
- [33] Fluorescein, Oregon Green and Rhodamine Green Dyes: Oregon Green 488 and Oregon Green 514 Dyes. INVITROGEN. *The Molecular Probes® Handbook* [online]. 11. vydání. September 14, 2010 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/fluorophores-and-their-amine-reactive-derivatives/fluorescein-oregon-green-and-rhodamine-green-dyes.html#head5>
- [34] Cell Navigator™ Lysosome Staining Kit Red Fluorescence. AAT BIOQUEST, Inc. *AAT Bioquest* [online]. 2006 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=22658>

- [35] SLÁDEK, Zbyšek. Mitochondrie. ÚSTAV MORFOLOGIE, fyziologie a genetiky zvířat Agronomická fakulta, MENDELU. *Webové stránky Zbyška Sládka* [online]. 2010 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/sladek/cytologie/mitoch1.htm>
- [36] Probes for Mitochondria. INVITROGEN. *Lifetechnologies* [online]. 2010 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-organelles/probes-for-mitochondria.html>
- [37] MitoLite™ Red. AAT BIOQUEST. *AAT Bioquest* [online]. 2006 [cit. 2013-12-28]. Dostupné z: <http://aatbio.com/gen4prst.pl?Cid=22677>
- [38] Schematic representation of dendronized iron oxide nanoparticles through phosphonate anchor. In: *The Institute of Physics and Chemistry of Materials of Strasbourg* [online]. © 2013 THE INSTITUTE OF PHYSICS AND CHEMISTRY OF MATERIALS OF STRASBOURG. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://www-ipcms.u-strasbg.fr/spip.php?article2283&lang=en>
- [39] Magnetically Modulated Nanosystems: A Unique Drug-delivery Platform. In: *WEBMD HEALTH PROFESSIONAL NETWORK* [online]. © 2009 Medscape. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: http://www.medscape.com/viewarticle/712338_7
- [40] Principle of Excitation and Emission. In: *Introduction to Fluorescence* [online]. © 2012 OLYMPUS. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluorointroduction.html>
- [41] Leica TCS SP8-Brochure. LEICA. *Leica-microsystems* [online]. 2012 [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: http://www.leica-microsystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TCS%20SP8%20X/Brochures/Leica%20TCS%20SP8-Brochure_EN.pdf
- [42] Fluorescence SpectraViewer. In: *Lifetechnologies* [online]. © 2013 INVITROGEN. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>
- [43] BacMam-mediated gene delivery. In: *BacMam Technology Overview* [online]. © 2013 INVITROGEN. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/drug-discovery/target-and-lead-identification-and-validation/pathway-biology/cellular-pathway-analysis/bacmam-system/bacmam-technology-overview.html>
- [44] Spectrum. In: *AAT Bioquest* [online]. © 2006 AAT Bioquest. [cit. 2013-12-31]. Dostupné z: <http://aatbio.com/graph/S22658>
- [45] HLAVÁČEK, Antonín a Petr SKLÁDAL. Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy*, Praha: Česká společnost chemická, 2011, roč. 105, č. 8, s. 611-615. ISSN 0009-2770.
- [46] FEICHTINGER, František. *Studium vlivu parametrů vybraných segmentačních metod na analýzu obrazů buněk* [online]. Brno, 2008 [cit. 2014-05-28]. Dostupné z:

https://is.muni.cz/th/73327/fi_m/diplomova_prace.txt. Diplomová práce. Masarykova univerzita.
Vedoucí práce RNDr. Pavel Matula, Ph.D.

PŘÍLOHY

Příloha 1: úvodní okno kolokalizačního programu



Příloha 2: Ukázka programu pro analýzu buněk z jedné roviny (Analýza 1, kap. 7.3)

Načtení obrázků a nastavení prahu

Načtěte obrázek organely Načtěte obrázek nanočástic Načtěte obr. průchozího světla

auto manual auto manual

0.26667 0.16

Práh OK

Kontrola vstupů

organely
nanocastice
pruchozi svetlo
Spojene kanaly
organely prahovane
nanocastice prahovane

Výběr oblastí a spuštění výpočtu

Vybrat oblast zájmu a spustit výpočet

Nástroj výběru

Volný výběr
 Čtverec
 Elipsa

Výsledky

	typ	hodnota	jednotka
1	práh pro org...	0.2667	automaticky
2	práh pro nan...	0.1600	manuálně
3	rozměr hran...	1024	pix
4	rozměr hran...	50	μ
5	Obsah μ v o...	945.9686	μ
6	počet pixelů ...	396768	pix
7	počet pixelů ...	21927	pix
8	počet nanoc...	72138	pix
9	počet překryt...	26058	pix
10	počet překryt...	21512	pix
11	zastoupení k...	2.4851	%
12	zastoupení k...	5.4218	%
13	zastoupení n...	18.1814	%
14	zastoupení o...	5.5264	%
15	saturace nan...	29.8206	%

Zobrazení grafických výsledků

Aktualizovat Restart Zavřít okno

Příloha 3: Ukázka programu pro analýzu buněk z více rovin (Analýza 2, kap. 7.4)

gui_adresar

C:\Users\Honza\Documents\bakalařka\Matlab\dobře skripty\spio+lyso^{13.2} Vysledky pro všechny roviny:

Nactení adresare

Roztřídění vstupů

Organ... Nanoč... Prucho...

Roztřídění OK

Nastavení prahu

Vyberte rovinu: Nanočástice Organela Práh: OK

3

0 Práh1 0.07 Práh2

Pokud znáte: Vložte delku hrany obrazku v mikrometrech: 64.89

Volba oblasti výpočtu

Nástroj výběru

Volný výběr

Čtverec

Elipsa

Provedte výběr a potvrďte entrem

	typ	hodnota	jednotka
1	Práh pro nan...	0.0941	automaticky
2	Práh pro org...	0.0700	manual
3	hrana obrázku	1024	pix
4	rozměr hran...	64.8900	μ
5	Obsah μm v ...	294.0257	μ
6	počet pixelů ...	73220	pix
7	suma pixelů ...	14623	pix
8	suma nanoč...	1354	pix
9	suma překryt...	4132	pix
10	suma překryt...	300	pix
11	průměrná kol...	0.0563	%
12	průměrná kol...	0.0585	%
13	průměrný ob...	0.2642	%
14	průměrný ob...	2.8530	%

Aktualizovat

Analyza jednotlivých rovin

statistika maxim

Grafické výsledky

Restart

Zavřít okno

Příloha 4: Ukázka okna pro získání grafických výsledků

