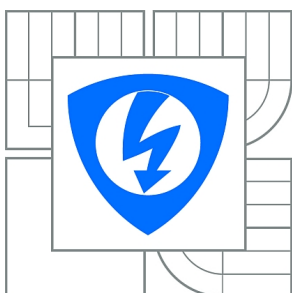




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ**

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

VYUŽITÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE KE STUDIU DEGRADACE ORGANICKÉHO BARVIVA V BUNĚČNÉ BIOLOGII

UTILIZATION OF CONFOCAL MICROSCOPY TO STUDY OF DEGRADATION OF ORGANIC DYE
IN CELL BIOLOGY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA TRNOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Studentka: Bc. Kateřina Trnová

ID: 136492

Ročník: 2

Akademický rok: 2014/2015

NÁZEV TÉMATU:

Využití konfokální mikroskopie ke studiu degradace organického barviva v buněčné biologii

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti konfokální mikroskopie a využití metody měření doby života fluorescence v buněčné biologii. Prostudujte metody měření spektrálních změn fluorescence. 2) Seznamte se s možnostmi využití laditelného laseru (WLL), funkce TimeGate a funkce spektrálního skenu dostupných u konfokálního mikroskopu na UBMI. 3) Pořídte sadu fluorescenčních intenzitních snímků a spektrálních snímků různých typech buněk (MSC, fibroblasty, myocyty) v dlouhodobém experimentu (6-24 hod.). 4) Využijte WLL, TimeGate a spektrálního skenu k vytvoření systému sloužícího k měření a hodnocení doby života fluorescence podobného metodě FLIM a posuvu spektra s využitím Rhodaminu. Navrhněte schéma algoritmu včetně vytvoření grafické reprezentace a vyjádření časové změny při dlouhodobém snímání. 5) Realizujte navržený algoritmus v prostředí Matlab. 6) Porovnejte vliv různého prostředí u různých buněk.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] LAKOWICZ, Joseph R. Principles in Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York: Plenum Press, 1993. ISBN-13: 978-0387312781

[2] GOLDMAN, Robert D., SPECTOR, David L. Live Cell Imaging: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. ISBN-13: 978-0879698935

Termín zadání: 9.2.2015

Termín odevzdání: 22.5.2015

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium doby života fluorescenčního barviva. Dále zkoumá změny v jeho emisním spektru určované za pomoci vývoje intenzity fluorescence v průběhu dlouhodobého snímání u několika druhů buněk. Obecná část práce pojednává o problematice konfokální mikroskopie, fluorescenčního záření a značek. Dále je proveden rozbor metod měření doby života fluorescence. V práci je vypracován popis programu, který byl navržen pro analýzu získaných výstupů použitého konfokálního mikroskopu. Následně jsou vyhodnoceny dosažené výsledky.

Klíčová slova

Fluorofor, konfokální mikroskop, životnost, spektrum.

Abstract

This thesis focuses on the study of the life of a fluorescent dye. It also examines changes in its emission spectrum determined with the aid of development of fluorescence intensity over the long term sensing in several kinds of cells. The general part of the thesis with the issues of confocal microscopy, fluorescent radiation and marks. Furthermore, an analysis of methods for measuring fluorescence lifetime is done. In the thesis there is elaborated a description of the program, which was designed for the analysis of the collected output of the used confocal microscope. Subsequently, the results are evaluated.

Keywords

Fluorophore, confocal microscope, lifetime, spectrum.

Bibliografická citace

TRNOVÁ, K. *Využití konfokální mikroskopie ke studiu degradace organického barviva v buněčné biologii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2015. 65 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma „Využití konfokální mikroskopie ke studiu degradace organického barviva v buněčné biologii“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

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

V Brně dne

.....

Bc. Kateřina Trnová

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Konfokální laserová skenovací mikroskopie	9
2.1	Lasery	11
2.1.1	Laser bílého světla.....	12
2.2	Zaměření do roviny	13
2.3	Snímání vzorku.....	14
2.4	Detektory	16
2.4.1	Fotonásobiče (PMT).....	16
2.4.2	Lavinová fotodioda (APD).....	17
2.4.3	Hybridní detektor	18
2.5	Použitý konfokální mikroskop.....	18
3	Fluorescence.....	22
3.1	Životnost a kvantová výtěžnost fluorescence	27
3.2	Fluorofory	28
3.3	Nanočástice.....	30
3.3.1	Zlaté nanočástice	31
3.3.2	Stříbrné nanočástice	31
3.3.3	Nanočástice s oxidy železa.....	32
3.3.4	Nanočástice s oxidy dalších kovů	32
3.3.5	Nanočástice na bázi uhlíku.....	32
4	Měření a zobrazování doby života fluorescence	33
5	Použité buněčné kultury	36
5.1	Fibroblasty	36
5.2	Kardiomyocyty	37
5.3	Mezenchymální kmenové buňky.....	37
6	Naměřená data.....	39
7	Programové řešení.....	47
7.1	Uživatelské prostředí	51
8	Popis dosažených výsledků.....	54
8.1	Fibroblasty	54
8.2	Kardiomyocyty	57

8.3	Mezenchymální kmenové buňky	58
8.4	Srovnání buněk	60
9	Závěr.....	61
	Seznam použité literatury	62
	Seznam obrázků	64
	Přílohy	65

1 Úvod

V posledních dvaceti letech došlo k velkému rozmachu využití fluorescence ve výzkumu v oblasti biochemie a biofyziky, ale i v klinické praxi. Fluorescence se dnes běžně používá v klinické chemii, genetických analýzách i monitorování životního prostředí. Jedná se především o složení buněk, identifikaci jejich organel a stavu jejich dělení. Dále se pak využívá například v průtokové cytometrii, DNA sekvenování, genetické analýze, v různých testech jako je např. ELISA a mnoha dalších oblastech. Na rozdíl od radioaktivně značených látek nejsou látky se schopností fluorescence tolik toxické.

Fluorescenční mikroskopie je jedním z nejčastěji používaných nástrojů v molekulární biologii. Protože často pozorujeme jevy, které nejsou za běžných podmínek viditelné, používáme zvýrazňující látky. V tomto případě fluorescenční barviva, fluorofory. Nejvíce omezujícím faktorem této metody zkoumání mikrosvěta, je znalost rozložení lokální koncentrace fluorescenční sondy ve zkoumané buňce. Následně je nutnost mít přehled o emisních vlastnostech použitého zvýrazňujícího fluoroforu a jeho chování v průběhu doby použití. Pro korektní analýzu je požadována co největší stálost parametrů všech vlastností fluoroforu. Nejvíce je kladen důraz na stálost intenzity snímaného záření.

V ideálním případě by fluorescenční barvivo mělo vykazovat v libovolném okamžiku stejné vlastnosti. V reálném světě ovšem v průběhu doby musí nutně docházet k degradaci použité fluorescenční značky. Ať už kvůli chemické interakci molekuly barviva s okolím nebo jiným způsobem. Tato degradace by měla být ovšem co nejmenší.

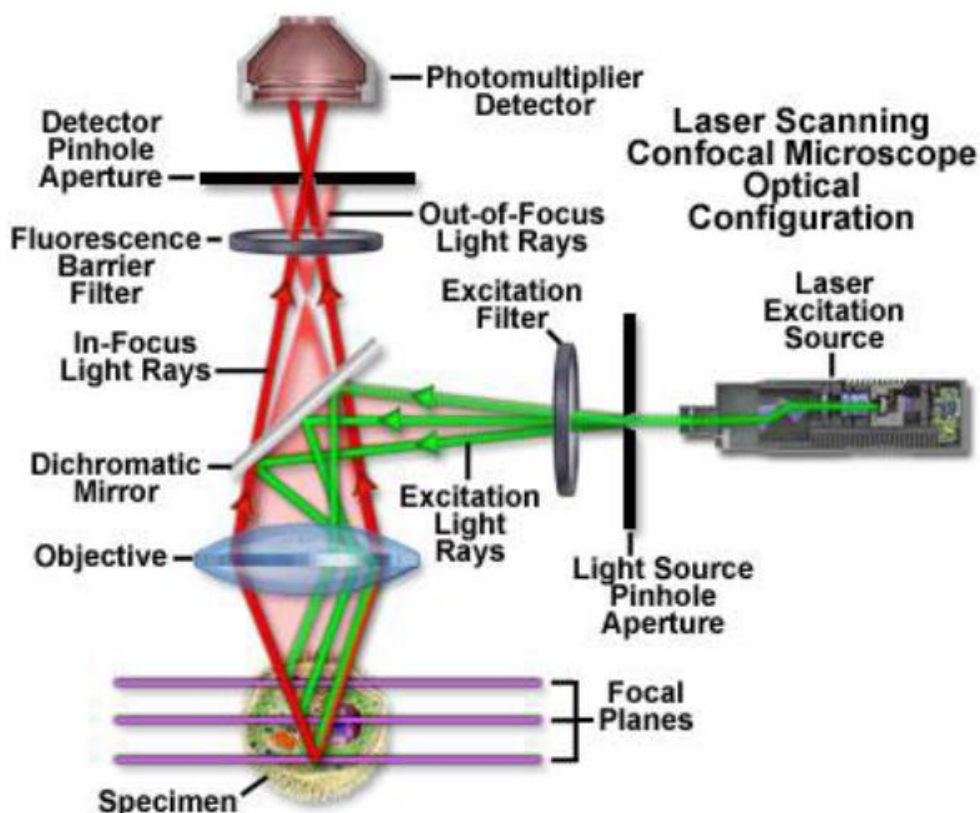
Tato práce se bude zabývat možnostmi využití fluorescence v konfokální mikroskopii při studiu degradace organického barviva v buněčné biologii. K tomu se bude využívat změny intenzity emise fluoroforu v průběhu času. Dále bude hodnocen vliv prostředí na změnu spektrálních vlastností při dlouhotrvajícím snímání různých druhů buněk. Pro tuto práci byly vybrány kultury fibroblastů, kardiomyocytů a kmenových mezenchymálních buněk.

Práce bude obsahovat podrobný popis programového řešení pro analýzu získaných sérií snímků fluorescence v módu dlouhodobého snímání a zhodnocení dosažených výsledků.

2 Konfokální laserová skenovací mikroskopie

Konfokální mikroskop je typ mikroskopu, pomocí kterého je pozorována určitá oblast vzorku v rovině, do níž je mikroskop zaostřen. Tato rovina je nazývána ohniskovou rovinou. Tento mikroskop lze použít také v případě „tlustých“ vzorků. Tlusté vzorky jsou preparáty, které se nelze pozorovat klasickým optickým mikroskopem, díky nemožnosti jejich prosvícení. Konfokální mikroskop je proto možné nazvat molekulární výpočetní tomografií. Při konfokální mikroskopii objekty mimo rovinu ostrosti nezpůsobí rozostření, protože nejsou zobrazeny. Podobně jako u CT je i u tohoto typu mikroskopie možné snímat sérií řezů v požadovaných rovinách. Toto je podmíněno zvýšenými nároky na výpočetní kapacitu, tj. technické vybavení, zpracovávajícího PC.

Charakteristickým rysem konfokální mikroskopie je vyšší rozlišení ve srovnání s klasickými optickými mikroskopy. Hlavní výhodou této metody spočívá v potlačení signálů nacházející se nad a pod rovinou zaostření.



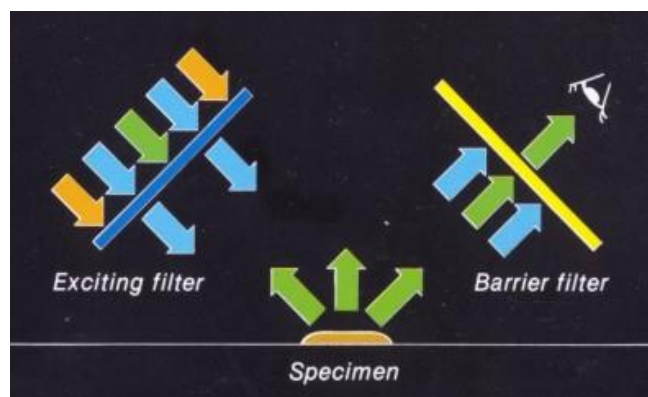
Obrázek 2.1: schéma laserového konfokálního mikroskopu [3]

Technicky se konfokální mikroskopie především využívá ve spojení s fluorescenční mikroskopií. Získaný obraz představuje intenzitu fluorescenčního záření ze vzorku v dané rovině. Tento obraz je vytvořen řídicím počítačem na základě intenzity fluorescence, která je snímána bod po bodu.

Laserový parsek, který představuje ve zjednodušeném pojetí bodový zdroj světla. Bodový parsek získáme průchodem paprsku clonou, která ho patřičně omezí. Dále paprsek prochází objektivem na preparát, kde je obraz clonky fokusován do bodu, jehož průměr odpovídá difrakčnímu minimu.

Po stejné trase, tady přes objektiv, putuje i světlo na vzorku odražené či rozptýlené, případně fluorescence. Bodový obraz je s pomocí děliče paprsků veden před fotonásobič. Zde je umístěna sekundární konfokální bodová clonka, pomocí níž je filtrováno světlo přicházející z oblasti mimo ohniskovou rovinu mikroskopu. Obraz celé ohniskové roviny je následně získán jejím skenováním několika možnými postupy. Jedná se o rozkmitání laserového paprsku, posuv vzorku před objektivem nebo posuv objektivu nad vzorkem v horizontálním směru, viz kapitola 2.3.

Omezení metody je způsobeno velmi intenzivním osvětlením, které prochází vzorkem. Jeho průchodem dochází k rychlejší degradaci použitých fluorochromů. Blednutí (bleaching) fluorescence snímaného objektu je možné omezit zkrácením doby expozice excitačním zařízením laserového paprsku. Filtry navržené pro absorpci parazitního fluorescenčního záření jsou vyráběny ze skla nebo plastu. Z důvodu pohlcování záření dochází k jejich zahřívání a k hrozbě jejich prasknutí. Obvyklá je jejich malá strmost přechodu mezi propustnými a nepropustnými pásmy filtru v transmisní charakteristice.



Obrázek 2.2 filtry záření [24]

Základním konstrukčním požadavkem je nutnost užití monochromatického laserového světla. Z tohoto důvodu rozeznáváme několik typů konfokálních mikroskopů:

- s jedním laserem/ více lasery (až 8)
- s jedním paprskem/ více paprsky
- jedno/ dvou/ vícefotonová konfokální mikroskopie
- speciální fluorescenční metody [3].

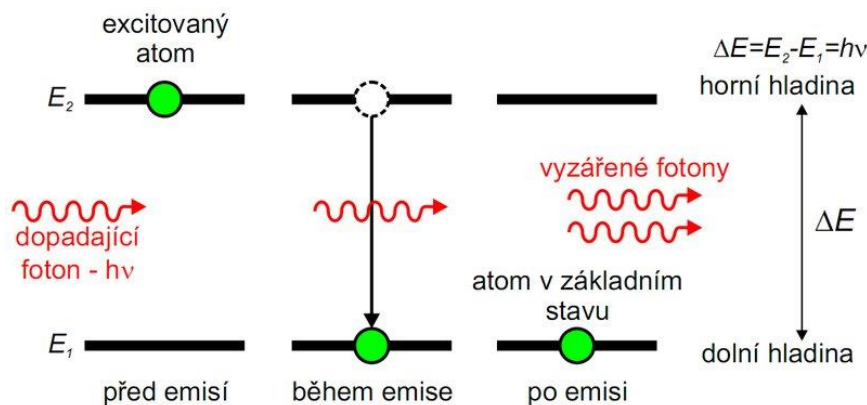
2.1 Lasery

Atomy a molekuly s přechodem z vyššího excitovaného energetického stavu E_1 do nižšího stavu E_2 vyzáří foton

$$hf_{12} = E_1 - E_2 . \quad 2.1$$

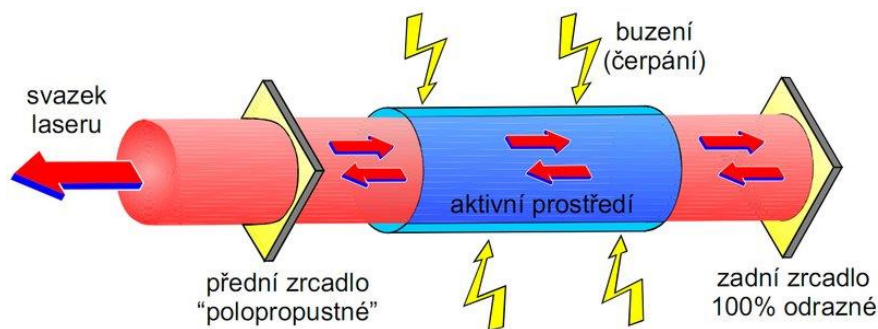
Přechod z vyššího stavu s vyzářením fotonu je samovolný děj, který se nazývá se spontánní emise. Při přechodu dochází k nekoordinovanému vyzařování a vzniká elektromagnetické záření nekoherentního charakteru. Nekoordinované vlnění nemá na rozdíl od koherentního stejné frekvence, jejichž vzájemný fázový posun v uvažovaném bodě prostoru se s časem nemění. Tímto způsobem se projevuje záření zahřátého tělesa.

A. Einstein ve své práci roku 1916 popsal existenci jevu, kdy foton dopadá na atom ve vyšším energetickém stavu a přiměje ho k přechodu do stavu energeticky nižšího za vyzářením fotonu. K pohlcení excitačního fotonu ovšem nedojde a oba fotony dále pokračují stejným směrem. Takto vzniklý foton má stejný kmitočet a fázi jako budící foton. Tento jev nazval *stimulovanou emisí*.



Obrázek 2.3: stimulovaná emise [19]

Pokud dojde k překročení energie, kterou dodáváme tělesu stanovenou prahovou hodnotu, dochází ke stimulované emisí a vzniku laseru. Slovo laser je zkratka pro „zesilování světla stimulovanou emisí záření“ z anglického Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. Laser vytvoříme umístěním bodového zdroje světla mezi dvě rovnoběžná zrcadla, z nichž jedno bude polopropustné. Světelný paprsek se bude mnohonásobně odrážet od zrcadel a na své cestě vyvolá v aktivním prostředí lavinu přechodů z metastabilní hladiny. Tento princip je zobrazen na Obrázek 2.4. Dojde tedy k postupnému zesilování paprsků.



Obrázek 2.4: schéma laseru [19]

Paprsek laseru se vyznačuje vysokou směrovostí, což znamená, že svazek záření má malou rozbíhavost od své osy. Jeho odchylka vzniká pouze difrakcí na výstupní cloně laseru a průchodem prostředím.

Další vlastností je jeho přesná fokusace do bodu. Laserový paprsek přenáší elektromagnetické záření soustředěné do malé oblasti prostoru, v krátkém časovém intervalu a úzké oblasti vlnových délek, tedy že fázový rozdíl mezi dvěma body se nemění. Reálně je tato tzv. koherenční vzdálenost velká (až metry) [6].

Ideální zdroj světla pro konfokální mikroskopy by měl mít dostatečnou intenzitu a laditelnou vlnovou délku pro současné buzení řady vzorků. Dále by měl mít pulzní režim pro experimenty zaměřené na délku doby trvání fluorescence.

Tyto požadavky splňuje laser bílého světla, který je kombinován s úzkopásmovými filtry. Pro konkrétní případy se ovšem výhodnější použít lasery o definované vlnové délce:

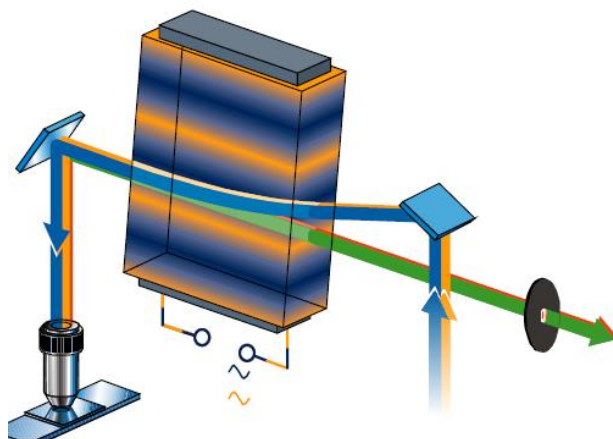
- HeNe 633 nm,
- HeNe 594 nm,
- DPSS 561 nm,
- HeNe 543 nm,
- Ar laser 458, 476, 488, 496, 514 nm [3].

2.1.1 Laser bílého světla

Laser bílého světla je takový typ laseru, který obsahuje všechny složky barevného spektra. Z důvodu jejich adice do jednoho svazku se výstup z generátoru záření jeví bílý.

Tento typ laseru se skládá z pulsního vláknového laseru s vysokou energií, který se přivádí před fotonický krystal. Akusticko-optický laditelný filtr (krystal, kterým prochází ultrazvukové vlnění) umožňuje vybrat jeden úzký pás spektra záření a odvést jej do požadovaného směru. Zbytek spektra projde krystalem bez změny.

Barva světla po průchodu akusticko-opticky laditelným filtrem je plynule laditelná mechanicky budící frekvencí přiloženého ultrazvukového vlnění. Probíhá pouze kontrola vychýlení pro volbu spektra. Šířka tohoto pásma je přibližně 1 až 3 nm, v závislosti na vlnové délce. Jak je na Obrázek 2.5 znázorněno rozdělení signálů podle různých vlnových délek.



Obrázek 2.5: akusticko-optický jev [3]

Energie výstupního paprsku je v rozmezí jednotek mW. Přidáním dalších elektronických ovladačů pro ovládání mechanické vlny v krystalu, je možné získat řadu barev současně. Použití osmi barev současně, je v dnešní době standardem. Nejedná se však o technický limit této metody. Každé z těchto pásem je laditelné na konkrétní vlnovou délku i intenzitu s vysokou přesností [16].

2.2 Zaměření do roviny

Úzký svazek laseru (intenzivní bodový zdroj světla) směřuje skrz první konfokální clonu na dichroické zrcadlo. Jedná se o typ zrcadla, které propouští pouze určitý rozsah vlnových délek záření. Přitom rozlišuje mezi zářením excitačním a emitovaným. Pro každé má různý transmisní rozsah. Je předsazeno pře objektiv.

Průměr ozářené oblasti vzorku v případě laserového zdroje odpovídá difrakčnímu minimu. Toto minimum je zároveň i rozlišovacím minimem mikroskopu. Rozlišovací schopnost mikroskopu tedy závisí na numerické apertuře objektivu, použitém laseru, respektive barvě použitého laseru paprsku, a průměru konfokální clony.

Preparát je umístěn v ohniskové rovině. Světlo emitované vzorkem prochází opět objektivem, dichroickým zrcadlem, bariérovým filtrem a druhou konfokální clonou. Poslední úsek cesty emitovaného světla probíhá přes fotonásobič. Sekundární clona slouží k filtraci světla pocházející z oblastí mimo ohniskovou rovinu. Získané informace jsou předány spolu s informacemi o poloze daného bodu v ose X-Y počítači, který je na jejich podkladě schopen sestavit obraz vzorku.

Clona, která je umístěná před detektor, omezuje průchozí paprsky. Obraz zaostřené roviny je proto bez parazitních paprsků přicházející z okolních rovin. Velikost konfokální štěrbinu určuje tloušťku tomografické vrstvy. To znamená, že ovlivňuje axiální rozlišení. Tato velikost je v rozsahu 1 AU (AU-Airy unit). Jedná se o průměr prvního difrakčního minima. Velikost jednoho AU bude různá pro každou vlnovou délku a numerickou aperturu objektivu. Šířka konfokálního otvoru je obvykle 1 AU. Při nižší hodnotě AU můžeme takto získat i lepší axiální hodnotu rozlišení, ale nastává problém s poměrem signál/šum.

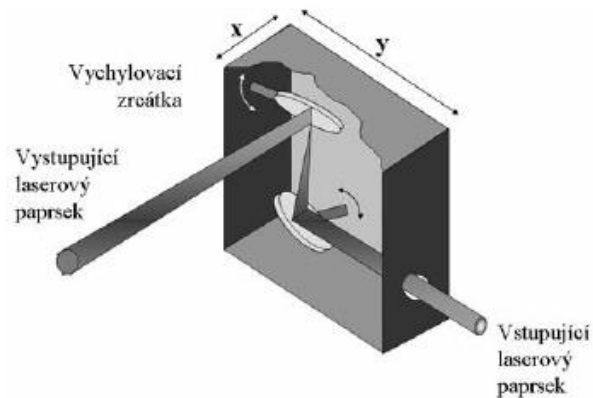
Ostření do různých hloubek je prováděno pohybem preparátu v ose Z. Běžně se jedná o vertikální pohyb stolku. V tomto případě je kladen velký důraz na přesnost nastavení polohy stolku. Hlavní předností tohoto postupu je, že není potřeba pohyblivé optiky. Optické elementy jsou fixní. Čočky pracují na difrakčním limitu. Velikost zorného pole není ovlivňována fokusací. Poloha vzorku je vždy nezávislá na nastavení optiky [3].

2.3 Snímání vzorku

Snímání vzorku je založeno na principu vytvoření obrazu bod po bodu. Přesným zaměřením do roviny Z dojde k vymezení snímané hloubky. Nejdříve je nasnímána scéna v rovině XY. Tím dojde k úplnému vymezení zkoumaného prostoru. Ke sběru informace dochází postupným ozařováním zaostřeným laserovým paprskem do požadované roviny. Fluorescence emitovaná z míst nad a pod ozářeným bodem je potlačena clonou před detektorem. Tímto způsobem se získává postupně série zaostřených řezů vzorkem v požadovaných rovinách.

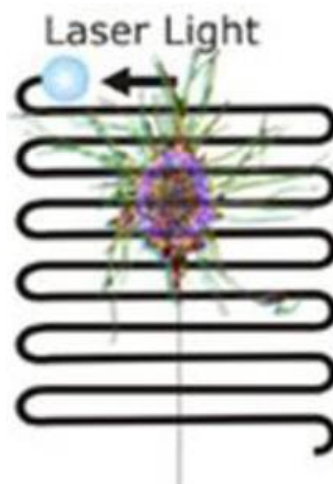
Existuje několik principů pro skenování vzorku. Jedním z nich je posun stolku se vzorkem. Řešení touto technikou není tak časté. Předností této techniky je podélné osvětlení. Intenzita skenovacího paprsku a úhel snímání vzorku je po celou dobu sběru informací stejný. Tímto způsobem se snižují odchylky měření a je zabezpečena úplná rovnoměrnost odezvy při snímání vzorku.

U jiné, častěji využívané techniky se pohybuje zdroj světla a preparát je statický. K pohybu paprsku dochází pomocí vychylování zrcátek, které slouží pro odraz laserového paprsku. Tento pohyb zapříčiní změnu směru paprsku.



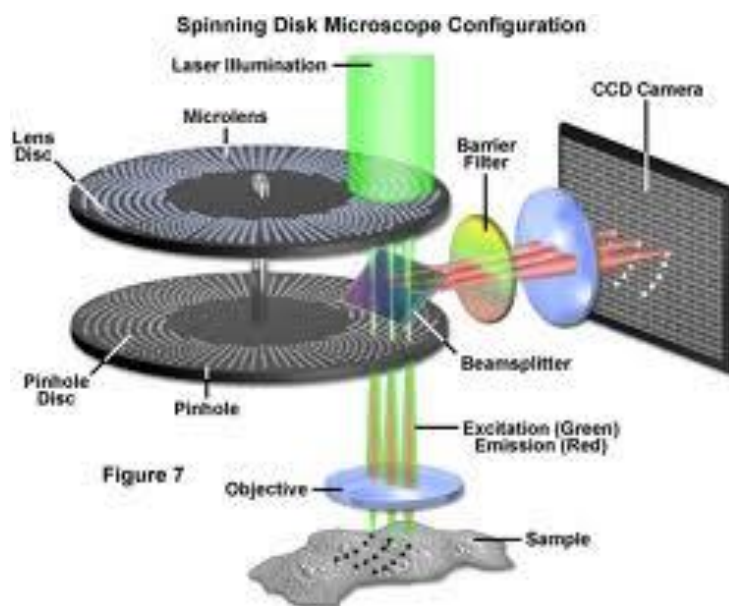
Obrázek 2.6: skenovací systém [3]

Samotný skenovací systém pro snímání vzorku sestává ze systému pro vychylování laserového paprsku ve směrech x-y, viz Obrázek 2.6. Frekvence vychylování dosahuje až jednotek kHz.



Obrázek 2.7: geometrie snímání vzorku [3]

Další možností skenování preparátu je pomocí rotujícího disku, který je známý jako Nipkowův kotouč. Jedná se o rychle rotující perforovanou destičku, na které je mnoho vzájemně oddělených clonek, přes kterou je světlo zaměřováno na studovaný objekt. Skenování preparátu umožňuje zobrazovat několik bodů z analyzovaného preparátu najednou. Hlavními výhodami této skenovací techniky jsou její rychlost a ozáření pozorovaného objektu světlem s nižší intenzitou, což vede k menšímu poškození fluoroforu. Proto je tato metoda výhodná pro pozorování rychlých dějů v živých buňkách [3], [4].



Obrázek 2.8: schéma snímání Nipkowovým diskem [20]

2.4 Detektory

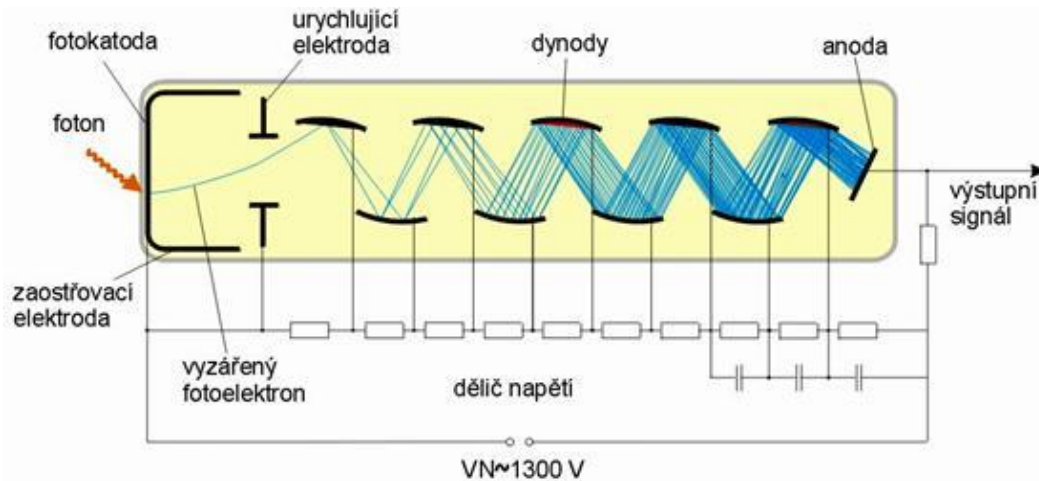
Existují různé typy detektorů. Rozdělujeme je podle několika kritérií. Nejčastější dělení je podle doby snímání, principu anebo podle komplexnosti detekce.

Z časového hlediska jsou používány kontinuální detektory podávající okamžitou informaci o stavu záření, nebo kumulativní detekující záření po určitou dobu. Podle principu jsou rozdělovány na fotografické (dozimetry), elektronické (část záření se převede na elektrické proudy nebo impulzy, ionizační komory, scintilační detektory), materiálové (změna vlastností při snímání). Z komplexního hlediska bereme detektory pro detekci záření a jeho intenzitu nebo spektrometry, které měří parametry záření s dalšími charakteristikami.

2.4.1 Fotonásobiče (PMT)

Fotonásobiče jsou detektory, které se používají k detekci velmi slabých úrovní signálů, díky jejich schopnosti dosáhnout velkého zesílení. Používají se především ve fluorescenčních technikách a spektrofotometrii.

Dopad fotonu na fotokatodu způsobí postupnou lavinovitou emisi elektronů z dynod. Dynody jsou elektrody, na které je přivedeno vysoké napětí. Kontaktem elektronu s povrchem elektrody dojde k emisi většího množství elektronů. Tímto způsobem dojde ke zvýšení signálu. Na konci trubice je anoda, která funguje jako snímač. Proud na výstupu z anody je přímo úměrný intenzitě dopadajícího světla.



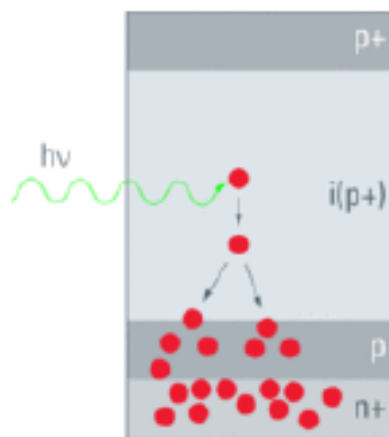
Obrázek 2.9: schéma fotonásobiče [21]

Parametry detektoru jsou ovlivňovány tloušťkou a kvalitou materiálu fotokatody. Kvantová účinnost je kolem 40%. Tedy 60% fotonů interaguje bez vytvoření elektronu. Pomocí tloušťky fotokatody je určen počet absorbovaných fotonů. To je ale vykoupeno nižší produkcí elektronů. Pokud je fotokatoda tenká, méně fotonů interaguje s materiálem. Na volbě materiálu závisí spektrální citlivost. Citlivost také ovlivňuje zesílení přijatého signálu, která je ovlivněna počtem dynod a velikostí napětí na dynodách [3].

2.4.2 Lavinová fotodioda (APD)

Jedná se o typ detektoru, který je využíván pro snímání rychlých scén. Dopadající foton generuje na snímači pár elektron-díra. Přiložením napětí dojde ke spuštění lavinového jevu. Snímaný výstupní proud je přímo úměrný počtu fotonů dopadajícího světla. Hlavní nevýhodou je zvyšující se tepelný šum.

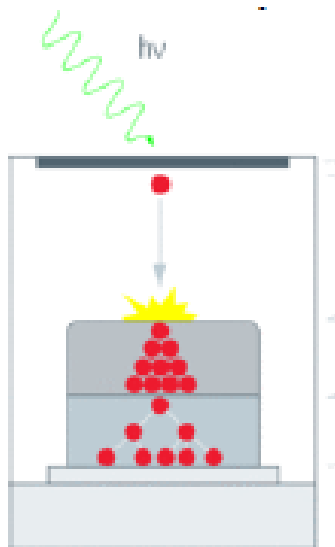
Účinnost tohoto detektoru se pohybuje kolem 80 %. Citlivost je rovnoměrná pro celé spektrum vlnových délek. Tento detektor má velkou citlivost, ale vykazuje nižší dynamický rozsah [3].



Obrázek 2.10: schéma lavinové fotodiody [3]

2.4.3 Hybridní detektor

Hybridní detektor vzniká spojením fotonásobiče a lavinové fotodiody. Je využíván k rychlému měření pro jeho velký dynamický rozsah. Z fotonásobiče převzal velký dynamický rozsah a robustnost. Z lavinové fotodiody je využita možnost detekce jednotlivých fotonů. Tato kombinace umožnila tvorbu vysoce citlivého detektoru s rychlou reakční dobou. Proto je výhodný při použití laseru s velmi krátkými impulzy.



Obrázek 2.11: schéma hybridního detektoru [3]

2.5 Použitý konfokální mikroskop

V této diplomové práci byl použit konfokální mikroskopu Leica TCS SP8 X. K experimentům bylo zároveň použito několik softwarových balíčků náležejících ke standardnímu vybavení.



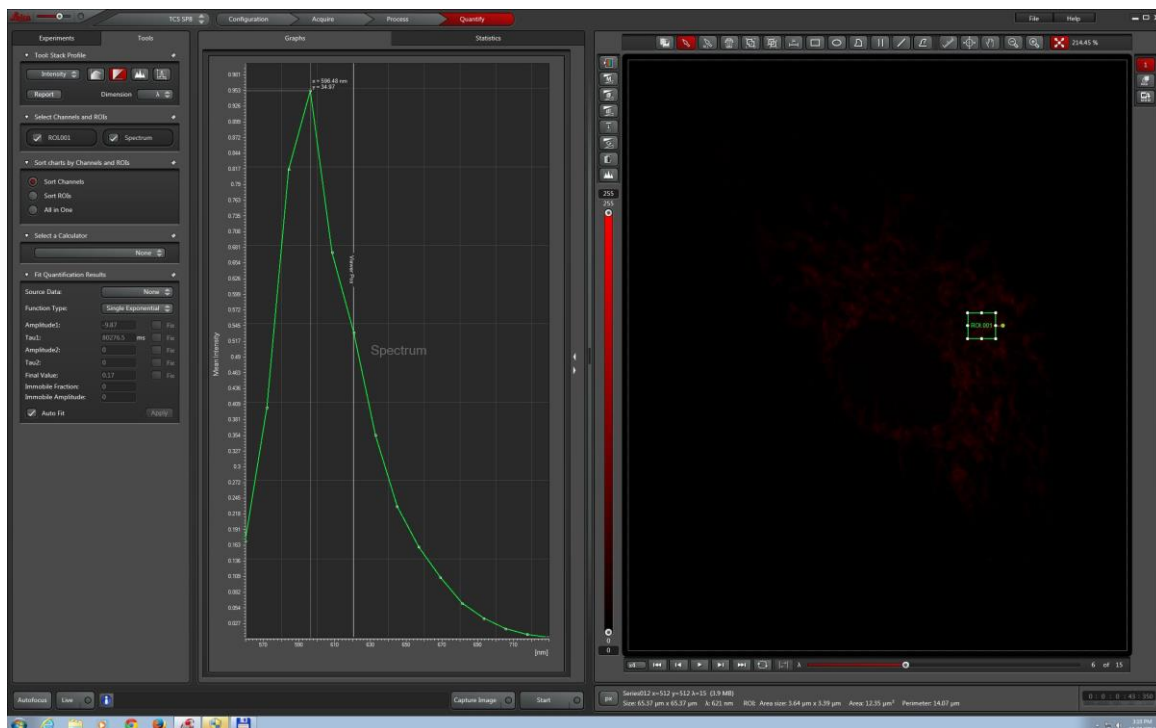
Obrázek 2.12: konfokální mikroskop Leica TCS SP8 s vybavením

Jedná se o mikroskop vybavený několika detekčními kanály, díky čemuž je schopen měřit velký dynamický rozsah použitého bílého laseru a zabezpečuje možnost využití celé spektrální šířky.

Pro dostatečně rychlé skenování, které by zachytilo buněčné procesy, je nejdůležitější citlivost k velmi rychlému snímání. Následkem toho je nižší úroveň detekovaného signálu. Tyto nedostatky kompenzuje hybridní detektor. Vysoká citlivost těchto detektorů umožňuje snížení dávek světla přiváděného na vzorek, čímž se zvyšuje délka životnosti fluorescence. Při snímání rychlých změn scény, je potřeba nalézt rovnováhu mezi rychlostí akvizice a intenzitou expozičního osvětlení. Tandemové skenování o frekvenci 8 až 12 kHz ponechává dostatek prostoru pro průměrování nebo kumulace informace. V poslední generaci detektoru je vestavěný Peltierův chladič, který zlepšuje poměr signál/šum. Detektor používá ultra-krátké snímání pro rychlý sběr výsledků o frekvenci až 40 MHz.

Při využití laseru jako zdroje, je nebezpečí detekce přímo laserového impulsu. Z tohoto důvodu je zapotřebí zpozdit sepnutí detektoru. Nastavením časového okna pro délku snímání fluorescence můžeme zlepšit obraz v podobě zablokování snímání v době probíhajícího používání laseru. Jedná se o funkci TimeGate. Časem řízená detekce funguje sama o sobě jako filtr. Tímto způsobem se dá získat snímek lepší kvality. Další možností jejího využití, je možnost nastavení snímání do stanoveného okamžiku po laserovém impulsu. Mezi snímáním může být definovaný rozestup v jednotkách nanosekund.

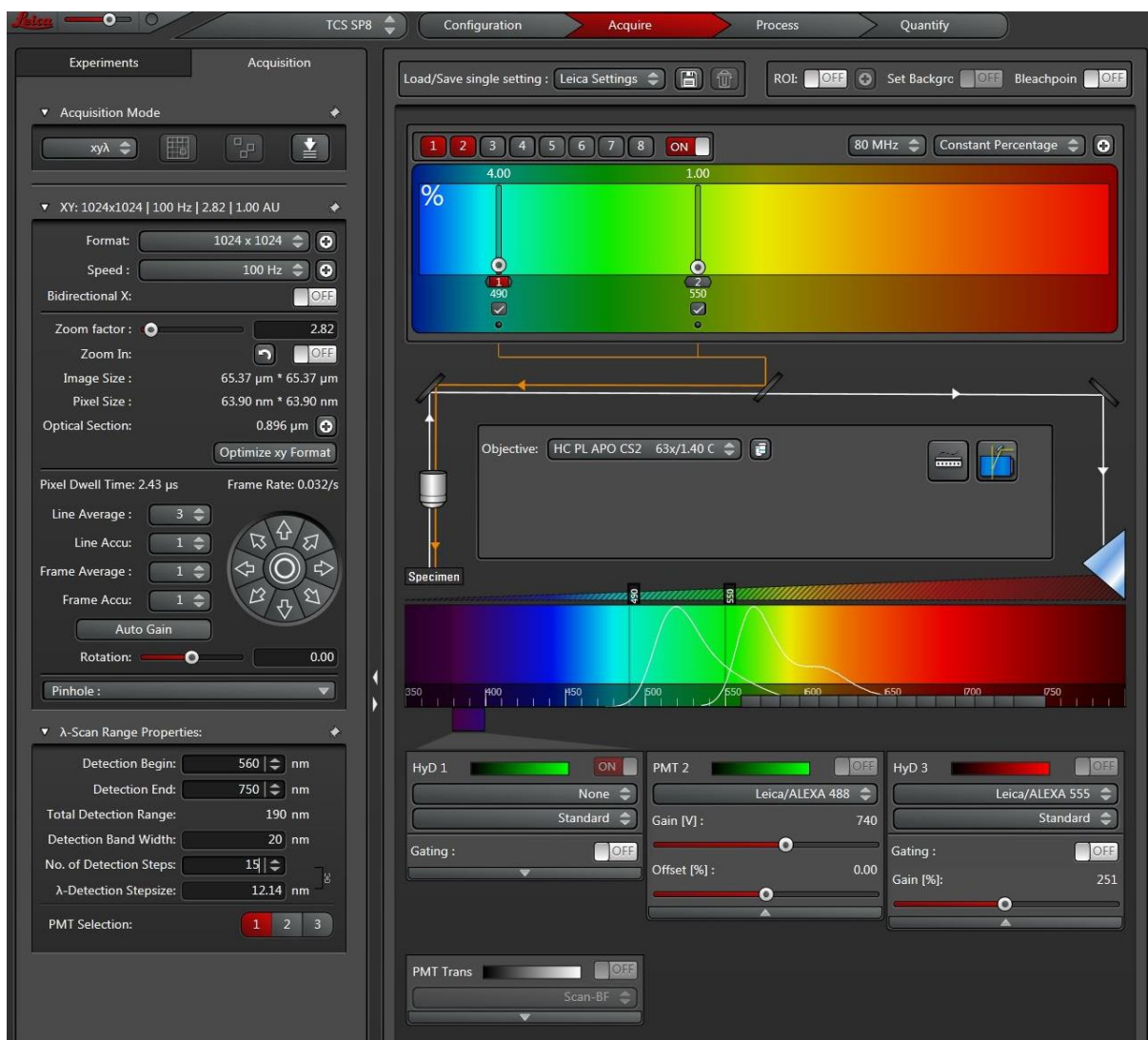
Lambda skenování je označení pro snímání emisního spektra přes uživatelsky zadaný rozsah vlnových délek. Každý snímek bude přiřazen k určité emisní vlnové délce. Seskupením výsledných emisí je vytvořeno emisní spektrum konkrétního fluoroforu o stanoveném kroku s minimálním možným odstupem o 5 nm. Z těchto výsledků je dále posuzována vhodnost použitých laserů nebo fluoroforu.



Obrázek 2.13: ukázka výsledného emisního spektra pro konkrétní část prostoru

Obrázek 2.13 zobrazuje Lambda sken vpravo zeleně vyznačené oblasti zájmu ve snímku. Nalevo je zeleně vyznačena křivka emisního spektra. Výrazné body napojení po částech spojitě křivky určují bod měření na konkrétní vlnové délce. Úsečka mezi nimi, je interpolované propojení těchto snímaní.

Mezi okny je barevná paleta přiřazující získané hodnotě intenzity hodnotu na barevné stupnici jasu. Jak je patrné ze snímku, naměřené hodnoty intenzity fluorescence vzorku nejsou příliš velké. Proto není na snímku příliš dobře rozeznán výsledný fluorescenční obraz.

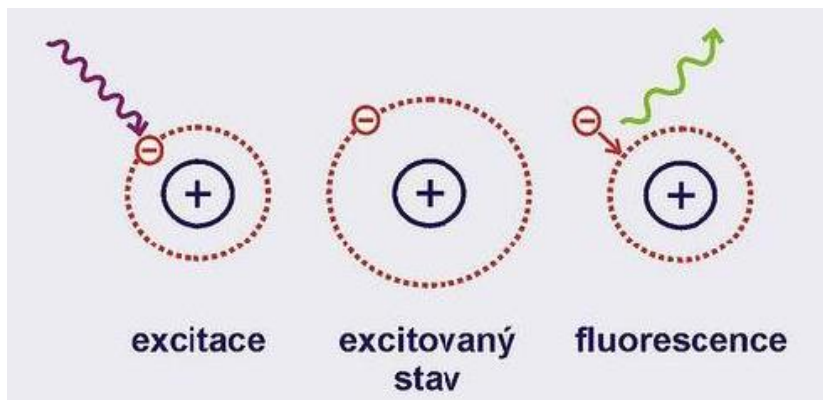


Obrázek 2.14: grafické prostředí pro dvoukanálové snímání

Na tomto obrázku Obrázek 2.14 je přestaveno grafické prostředí softwaru komunikujícího s použitým konfokálním mikroskopem. Vlevo je panel pro zadávání parametrů měření, jako je rozsah zkoumaných vlnových délek, interval mezi jednotlivými měřeními vlnovými délkami, velikost výsledných snímků a rychlost snímání.

3 Fluorescence

Atomy se mohou nacházet v základním energetickém stavu, jehož charakteristickou vlastností je minimální hodnota energie. Dalším možným stavem je stav excitovaný. Tento stav je charakterizovaný přítomností alespoň jednoho elektronu ve vyšší energetické hladině. Extrémním případem excitace atomu je stav ionizace, při níž dochází k odštěpení elektronu z atomu.



Obrázek 3.1: excitace a fluorescence [25]

Aby byl dosažen stav excitace, nebo ionizace, musí atom absorbovat energii. Velikost absorbované energie je minimálně rovna rozdílu mezi základním energetickým stavem a energií stavu excitace popřípadě ionizace. Nadbytečná energie atomu je obvykle změněna v energii tepelnou. U excitovaných atomů je nadbytečná energie přeměněna na kinetickou energii daného atomu. V případě ionizovaných atomů dochází k uvolnění elektronu.

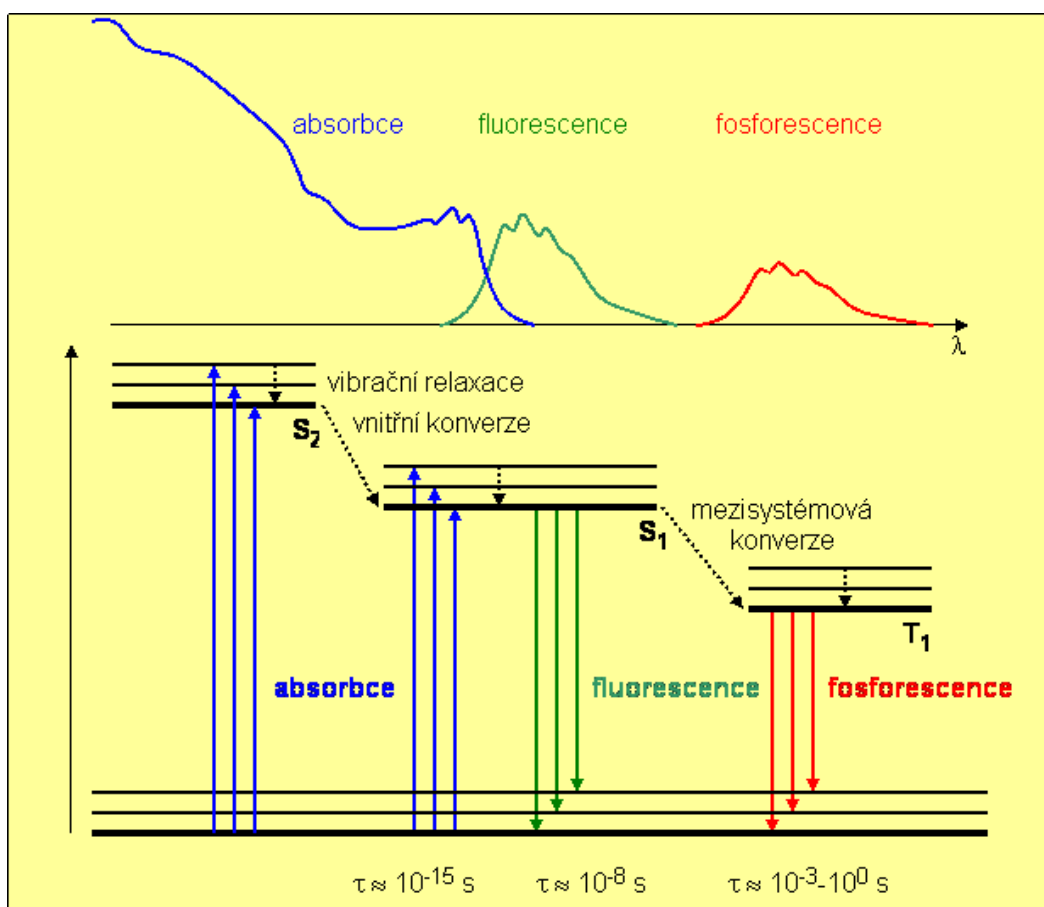
Energie, pomocí které je přiveden atom do excitovaného nebo ionizovaného stavu, může být různé fyzikální povahy. Energie potřebná k ionizaci atomu, se též nazývá energie vazebná. Tato energie je číselně shodná s energií elektronu. Je-li atomu dodána větší energie než je energie vazebná, např. ve formě kvanta elektromagnetického záření, dojde k přeměně jejího přebytku v kinetickou energii uvolněného elektronu.

Atom, u kterého došlo k excitaci nebo ionizaci, se nachází v tomto stavu jen velmi krátkou dobu (10^{-8} až 10^{-5} s). Některé z excitovaných stavů se však vyznačují vyšší pravděpodobností výskytu. Vzniká tak stav, který je označován též jako stav metastabilní. Metastabilní stav je stav, ve kterém může atom setrvat mnohem delší, měřitelnou dobu, např. na minuty či hodiny. Od teorie metastabilních stavů se též odvíjí princip laseru, viz kapitola 2.1.

Elektromagnetické záření, vznikající při přechodu z metastabilního do základního stavu, je označováno jako luminiscence. Luminiscence je emise elektromagnetického záření jakýchkoliv látek, ve kterých převažuje světelné záření nad tepelným vyzařováním. Podle doby trvání je rozdělováno na fluorescenci a fosforescenci. Trvá-li metastabilní stav krátce, hovoříme obvykle o fluorescenci. Trvá-li delší dobu, hovoříme o fosforescenci.

Fluorescence je emise záření vyvolané spontánním energetickým přechodem elektronu z excitovaného stavu z jedné nebo více energetických hladin, na hladiny o nižší energii. Jedná se o zářivý přechod elektronu z rovnovážné hladiny na hladinu základního stavu. Energie emitovaného záření je vždy nižší než energie záření excitačního. Tedy emitované světlo má větší vlnovou délku.

Procesy, které se vyskytují mezi absorpcí a emisí světla látkou jsou ilustrovány Jablonského diagramy. Jedná se o diagramy, které jsou používány pro ilustraci různých molekulárních procesů, které mohou nastat u excitovaných stavů. Diagramy jsou pojmenovány po profesoru Alexandru Jablonski, který je považován za otce fluorescenční spektroskopie.



Obrázek 3.2: zobrazení přechodů mezi energetickými hladinami [26]

Singletová hladina, elektronová úroveň, je zobrazena jako S_0 , S_1 , S_2 . Na každé se většinou vyskytují dva elektrony s opačným spinem. Tím, že se jejich spiny vzájemně kompenzují, je jejich kvantové číslo 0. Tento stav se nazývá singletní. Z každé z těchto energetických hladin se mohou molekuly excitovat a přejít na jinou vibrační hladinu, 0,1 nebo 2. Přechody mezi stavy jsou znázorněny jako svislé barevné čáry, pomocí kterých je znázorňována okamžitá tendence k absorpci světla. Doba přechodu je příliš krátká pro významnou změnu vlastností atomu fluorescenční molekuly. Tepelná energie nemá dostatečně velkou energii, aby k

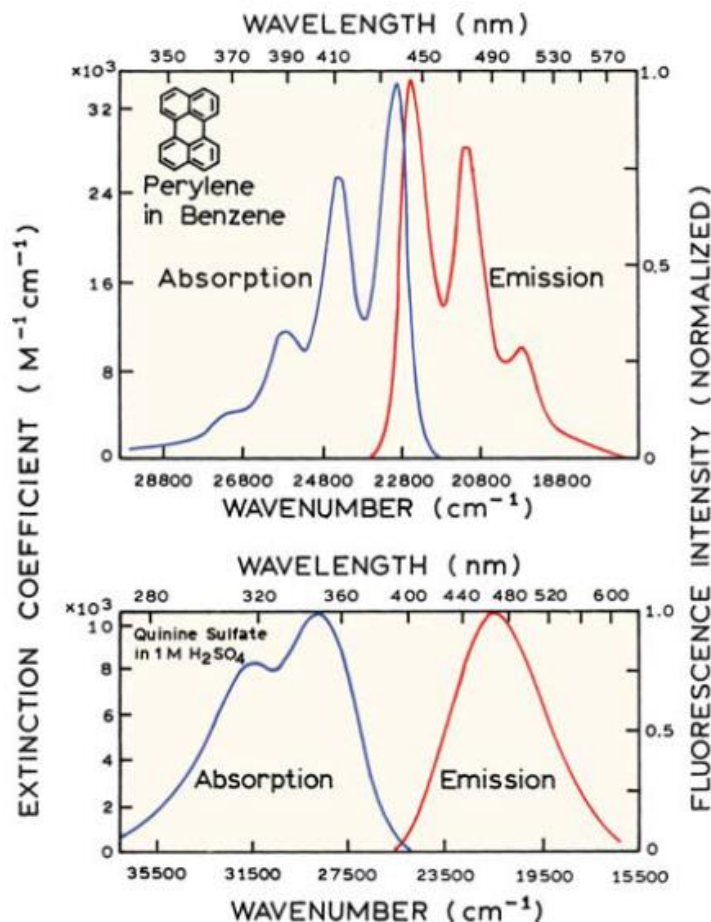
tomuto přechodu vedla. Z tohoto důvodu používáme k vyvolání fluorescence světlo a ne teplo [1].

Molekuly ve stavu S_1 mohou přejít na první tripletní stav T_1 . Jedná se o stav, kdy po excitaci nejsou spárovány elektrony a jejich celkové spinové kvantové číslo má jinou hodnotu. Tento jev je podstatou *fosforescence*. Doba fosforescenčního záření je tedy delší. Trvá obvykle milisekundy až sekundy. Po vystavení budícímu signálu, kterým je světlo, se fosforescence po určité době začne vytrácet [5].

Konverze S_1 na T_1 se nazývá mezisystémový přechod. Důsledkem tohoto přechodu jsou emise tří fotonů o energii několik řádů nižší, než jaký je pozorován u fluorescence. Odlišnost od fluorescence je patrná ve spektru emitovaného záření. Fosforescence má spektrum posunuté k delším vlnovým délkám. Důsledkem tohoto jevu je nižší energie záření. Molekuly obsahující těžké atomy, jako jsou atomy bromu a jodu, fosforeskují [1], [7].

Každá látka má charakteristické odstupky mezi jednotlivými absorpčními hladinami. Excitované luminofory se pomalu vrací do základního stavu. Atom v excitovaném nebo ionizovaném stavu se vrátí do stejného základního stavu tak, že některý z elektronů ve vyšší energetické hladině, případně volný elektron, obsadí volný energetický stav na nižší energetické hladině. Atom při tomto procesu vyzáří kvantum elektromagnetického záření. Tento jev je podstatou vzniku emisních spekter atomů či molekul.

Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce buzení. Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emitovaného záření. Vavilovo pozorování v roce 1926 vedlo k poznatku, že kvantové výtěžky jsou obecně nezávislé na vlnové délce excitace. Stejně emisní spektrum látky je proto pozorováno bez ohledu na excitační vlnovou délku. Pravděpodobně se jedná o výsledek silného překryvu mezi mnoha dosaženými excitovanými stavy, které se vyznačují stejnou energií. Výjimku z tohoto pravidla tvoří fluorofory, které mají dva ionizační stavy, z nichž každý vykazuje odlišná absorpční a emisní spektra. Pro většinu fluoroforů ovšem platí, že emise je zrcadlovým obrazem absorpce, ne obrazem celkového absorpčního spektra.



Obrázek 3.3: zobrazení symetrie excitačního a emisního spektra [1]

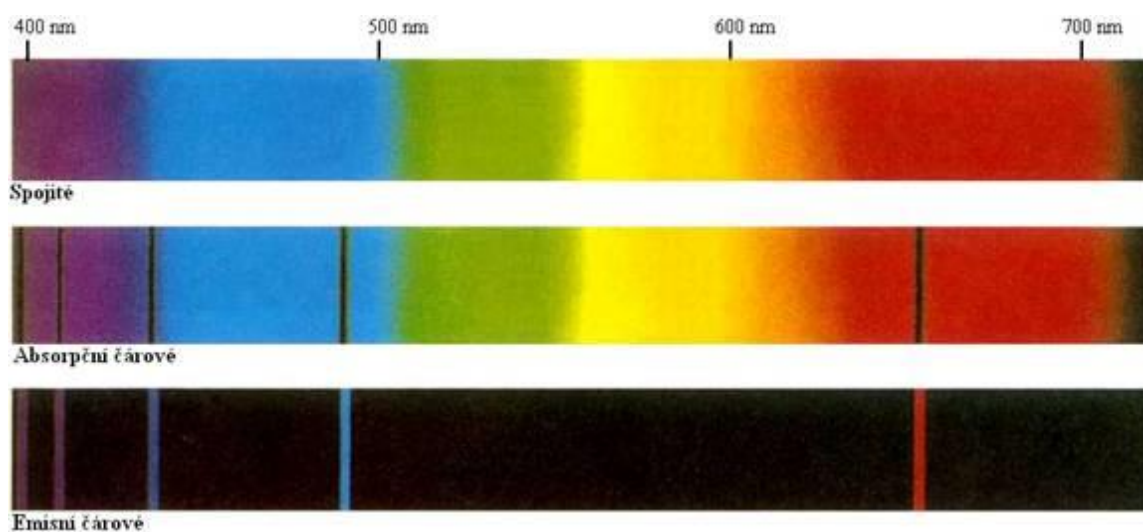
Emisní spektra jednotlivých látek jsou výrazně odlišná a jsou závislá na chemické struktuře flouoroforu a nosného rozpouštědla. Spektra některých látek vykazují výraznou strukturu v důsledku jednotlivých vibračních energetických excitovaných stavů [1].

Při posuzování emisních spekter je nutné si uvědomit, že se jedná o jev vyvolaný obrovským počtem fotonů uvolňovaných při všech možných přeskočích elektronů. Podle emisních spekter lze identifikovat jednotlivé prvky. Na emisních spektrech je založena přístrojová metoda označovaná emisní spektrofotometrie.

Intenzita záření je definována jako počet fotonů prošlých v daném směru šíření jednotkou plochy za jednotku času. Intenzita je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výběžkem fluorescence. Emisní spektrum tedy vyjadřuje závislost intenzity vyzařování na vlnové délce [nm] nebo vlnovém čísle [cm⁻¹]. Z Jablonského diagramu vyplývá, že energie z emisí je obvykle nižší, než je absorpce [8].

Zrcadlově symetrický charakter mezi absorpčním a emisním spektrem je výsledkem stejného přechodu, do kterého jsou zapojeny jak absorpce, tak emise. Rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu je označován pojmem Stokesův posuv. Výjimku

z pravidla zrcadlové symetrie vykazují látky za rozdílného geometrického uspořádání jader v excitovaném stavu vůči uspořádání v základním stavu.



Obrázek 3.4: spektrum atomu vodíku [21]

Emisní spektra atomů v plynném stavu jsou čárová, protože dochází k uvolňování pouze určitých kvant energie. U molekul je situace složitější, protože energetické hladiny elektronů mají pásový charakter, čemuž odpovídají i pásová spektra. Tyto pásová spektra jsou pro každou látku specifická.

V plynech se objevují skupiny spektrálních charakteristických čar, které jsou označovány jako série. Každá série má tzv. hranu, které odpovídá přeskoku z „nekonečna“ na danou hladinu. Tato hrana série reprezentuje foton o největší energii, tj. o nejkratší vlnové délce.

Při nízké hodnotě pH prostředí obsahujícího fluorescenční značku je hydroxylová skupina protonizována. Emisní spektrum vykazuje posun. V opačném případě nenastává žádná změna v absorpčním spektru. Rozdíl mezi emisním a absorpčním spektrem je způsoben ionizací hydroxylové skupiny. Disociační skupina (pK_a) hydroxylové skupiny klesá v excitovaném stavu a tato skupina se stává ionizovanou. Emise tedy nastane na ionizovaném prvku, což se projeví velkou šířkou spektra. Emisní spektrum je zrcadlovým obrazem absorpcí za vysokého pH [1].

Fluorescenci obvykle pozorujeme pouze v průběhu dodávání potřebné energie k přechodu, buzení. Přestaneme-li dodávat energii, jev za krátkou dobu vymizí. Toto vymizení je způsobeno vyčerpáním excitovaných atomů. Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání.

Fluorescenční záření je zkoumáno jako statický jev nebo jako dynamická změna vyzařování v čase. Zkoumání statické fluorescence nejčastěji provádíme s konstantním osvětlením. Vzorek je osvětlen kontinuálním paprskem světla a je zaznamenávána intenzita fluorescence,

popřípadě její emisní spektrum. Doba emise fluorescence je obvykle 10 ns. Z důvodu takto krátkého časového intervalu, je většina měření považována za statická.

Při měření změny intenzity fluorescence v závislosti na čase, je vzorek vystaven pulzu světla. Doba pulzu je kratší, než doba útlumu intenzity fluorescence vzorku. Útlum intenzity je následně zaznamenán vysokorychlostním detektorem.

3.1 Životnost a kvantová výtěžnost fluorescence

Emise fluorescence je náhodný proces. Kvantový výtěžek je počet emitovaných fotonů vzhledem k počtu absorbovaných fotonů. Životnost fluorescence udává dobu, po kterou bude fluorofor interagovat s okolím nebo se v něm bude šířit. Životnost emise je rovna průměrné době pobytu elektronu v excitovaném stavu. Obecně je doba života fluorescence kolem 10⁻⁸ s. Fluorescenční životnost a kvantový výtěžek patří mezi nejdůležitější charakteristiky jednotlivých fluoroforů. Látky s největšími kvantovými výtěžky, jako je rhodamin, vykazují nejjasnější emise.

Význam kvantového výtěžku a životnosti je nejlépe reprezentován zjednodušeným Jablonského diagramem. Rychlostní konstanty Γ (emisní konstanta fluoroforu) a k_{nr} (rychlost jeho radiačního úpadku) popisují snížení populace excitovaných stavů. Část fluoroforu se rozpadá v průběhu emise. Kvantový výtěžek je dán vztahem

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad 3.1$$

Kvantový výtěžek fluorescence může být blízký jedné, pokud je pokles záření mnohem menší než rychlost radiačního rozpadu.

Ve skutečnosti je energetická výtěžnost fluorescence vždy menší než jedna, z důvodu Stokesova posunu. Pro zjednodušení jsou všechny nezářivé procesy rozpadu zahrnuté pod jednu konstantu, k_{nr} . Životnost excitovaného stavu je definována průměrnou dobou setrvání elektronu v excitovaném stavu. Obecně se tento časový úsek blíží 10 ns.

Zhášení fluorescence lze definovat jako proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence, bez změny fluorescenčního emisního spektra. Ke koliznímu zhášení dochází, když je excitovaný stav fluoroforu deaktivován při kontaktu s jinými molekulami. Tyto molekuly jsou nazývány zhášeče. Molekuly nejsou v tomto procesu chemicky změněny. Při kolizním zhášení dojde k poklesu intenzity podle Stern-Volmerovy rovnice

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 3.2$$

Konstanta K ve výše uvedené rovnici zastupuje Stern-Volmerovu zhášecí konstantu, k_q biomolekulární zhášecí konstantu, τ_0 představuje životnost a $[Q]$ je koncentrace zhášečla ve vzorku. Konstanta K udává citlivost fluoroforu ke zhášení. Větší hodnoty Stern-Volmerovy

zhášecí konstanty se vyskytují v případech volného fluoroforu nacházejícího se v rozpouštědlech (roztocích) nebo na povrchu biomolekuly.

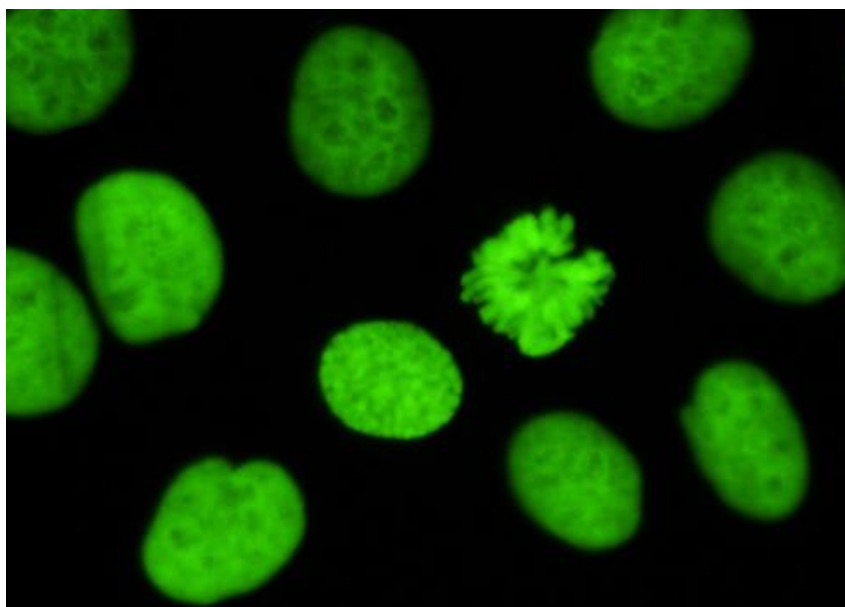
Jako kolizní zhášee lze použít širokou škálu molekul, například kyslík, halogeny, aminy a elektronové diferencní molekuly jako je akrylamid. Mechanismus zhášení se mění v závislosti na páru fluorofor - zhášee.

Fluorofory mohou také tvořit komplexy se zhášeci. Tento proces je označován jako statické zhášení, protože není závislý na difuzi nebo molekulárních interakcích. Zhášení může nastat také pomocí nemolekulárních útlumů, jako je útlum dopadajícího světla na fluorofor [1].

3.2 Fluorofory

Fluorofory jsou látky vykazující fluorescenci. Z tohoto důvodu jsou používány jako příměsi, ke zvýrazňování jevů, které obvykle fluorescenci nevykazují. Mají vysokou kvantovou výnosnost. Jejich životnost je ale časově omezená.

V každodenním životě narazíme na mnoho fluoroforů. Zelené nebo červenooranžové záření je někdy pozorováno u nemrznoucí směsi, protože obsahuje stopová množství fluoroforů fluoresceinu a rhodaminu. Vícejaderné aromatické uhlovodíky, jako např. antracen a pyren, jsou také fluorescenční a jsou používány pro monitorování znečištění životního prostředí olejem. Některé substituované organické sloučeniny také vykazují fluorescenční vlastnosti. Například 1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen je využíván ve scintilačním čítači a akridinová oranž je používána jako značka při DNA analýzách.



Obrázek 3.5: fluoresceinem obarvená kultura buněk nádoru děložního hrdla [26]

Fluorofory jsou rozděleny do dvou kategorií, vnitřní a vnější. Vnitřní fluorofory jsou takové, které se vyskytují přirozeně. Příměsově, vnější, fluorofory jsou přidávány do vzorku, který nezobrazuje požadované vlastnosti, tedy nefluoreskuje.

Většina organických molekul nevykazuje fluorescenci. Intenzivní fluorescence je pozorována u některých aromatických sloučenin. Mezi tyto patří například polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly, které jsou nazývány *fluorofory* nebo *fluorescenční barviva*.

Typické fluorofory jsou např.:

- chinin (tonik)
- fluorescein, rhodamin B (nemrznoucí směsi, fluorescenční značení)
- POPOP (scintilátory)
- akridinová oranž (DNA)
- umbeliferon (ELISA)
- antracén, perylén (znečištění životního prostředí oleji)

Na rozdíl od aromatických organických molekul jsou atomy obecně nefluorescenční. Zde se objevuje výjimka v podobě lanthanoidů. Fluorescence erbiových a terbiových iontů je výsledkem elektronového přechodu mezi f orbitaly. Lanthanoidy vykazují dlouhou dobu rozkladu, protože mají nižší míry emise z důvodu malých extinkčních, tj. molárních absorpčních, koeficientů.

V roztocích za pokojové teploty obvykle nelze fluorescenci vidět. Je to z důvodu existence mnoha deaktivčních procesů, které soutěží s emisí záření. Jedním z těchto procesů je například nezářivý rozpad látky na ionty. Přechodné komplexy kov-ligand, které obsahují kov a jeden nebo více organických ligandů, vykazují smíšené singlet-triplet stavy. Tyto komplexy mají dobu života v řádech od stovek nanosekund až do několika mikrosekund.

Proces fluorescence je cyklický, to znamená, že tentýž fluorofor může být opakovaně excitován a může emitovat opakovaně záření, jestliže není nenávratně zničen. Toto je základem vysoké citlivosti fluorescenčních technik.

Živostnost fluoroforu v nepřítomnosti neradiačních procesů se nazývá vnitřní nebo přírodní živostnost. Tuto přírodní životnost lze určit z absorpčního spektra, excitačního koeficientu a emisního spektra fluoroforu. Další možností určení přírodní životnosti je pomocí poměru zjištěné živostnosti τ a kvantového výtěžku.

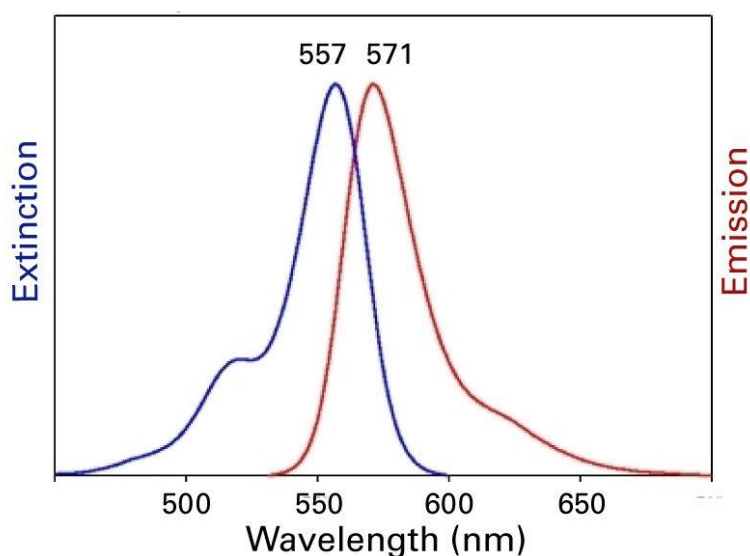
Jednou z vlastností ideálního barviva je jeho fotostálost. Energie záření absorbovaná barvivem musí být rychle degradována v nezářivém přechodu do základního stavu, aniž by excitovaná molekula měla čas chemicky reagovat.

Fluorescence je obvykle buzena absorpcí jednoho fotonu o vlnové délce v absorpčním pásmu konkrétního fluoroforu. Pulsní lasery mohou degradovat fluorofory absorpcí dvou fotonů. Pokud k tomuto jevu dojde, hovoříme o tzv. fotovybělování (photobleaching). Tento proces je silně závislý na intenzitě světla a dochází k němu pouze v ohnisku laserového paprsku [1].

Systémy, které pracují pouze s jedním „dobovým“ zdrojem světla, se nacházejí v těsné blízkosti hranice saturace flouoroforu zářením. Pro tvorbu kvalitního obrazu je potřeba poměrně velká intenzita excitačního světla. Vícepaprskové systémy pracují na principu několikanásobného ozáření snímané scény excitačním světlem menší intenzity a složením takto získaných hodnoty intenzit dohromady. Tato menší intenzita snižuje riziko fytoxicity, a tedy zmenšuje fotobleaching [3].

Pro tuto práci bylo použito barvivo rhodamin B. Rhodaminy jsou rodina příbuzných chemických látek vykazující fluorescenci. Jedná se o relativně levné fluorofory. Běžně jsou používány v biotechnických aplikacích, fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii a nebo u metody ELISA. Rhodaminy jsou toxické, rozpustné ve vodě, methanolu a ethanolu. Mezi nejznámější zástupce této rodiny patří rhodamin B a rhodamin G.

Rhodamin B je fluorescenční barvivo s emisním maximem kolem 570 nm. Jeho kvantový výtěžek je závislý na teplotě. Rhodamin G se používá jako indikační barvivo ve vodě k určení rychlosti a směru proudění [1].



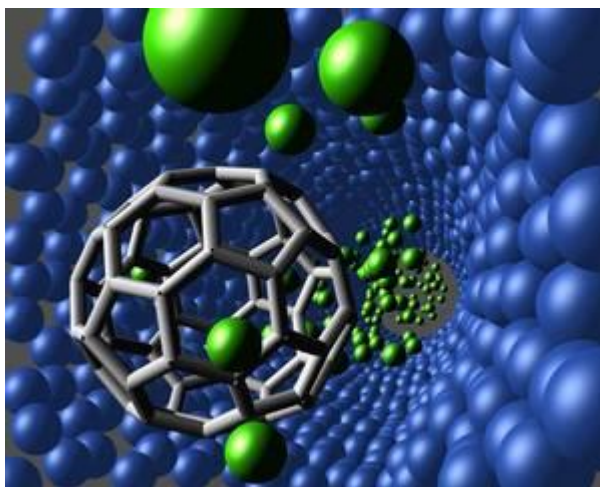
Obrázek 3.6: excitační a emisní spektrum rhodaminu B [27]

3.3 Nanočástice

Jedná se o kovové nebo nekovové miniaturní částice, které jsou složeny z atomů nebo molekul podle přesně daného stavebního principu. Jejich velikost se pohybuje v intervalu jednotek až stovek nanometrů. Za nanočástice nejsou považovány přírodní makromolekuly, viry nebo enzymy. Nanočástice mohou obsahovat jeden nebo více typů atomů. Nejčastěji mají kulovitý tvar. Výjimkou není ani trubicový, diskový nebo hvězdicový tvar [10].

Vlastností, která je u nanočástic velmi ceněna, je schopnost neinteragovat se svým okolím a nevytvářet shluky částic. Dále je využívána možnost použít je jako nosiče nebo nanoobaly. Takto by se daly dopravovat látky dovnitř buňky a v ní by se obal snadno odboural. Pokud by byla na povrch nanočástice navázána např. protilátka proti určitému enzymu, mohly

bychom takto získat specifické nosiče látek. Jejich klasifikace je prováděna podle materiálu použitého na jejich vytvoření.



Obrázek 3.7: nanočástice [23]

Hlavní vlastnost, pro kterou nanočástice využíváme, je jejich schopnost průniku do buňky. Nejčastěji jsou do buňky vpraveny *endocytózou*. Rozlišujeme tři druhy endocytózy. Samotná endocytóza představuje jeden z nich. Jedná se o inkorporaci látky z okolí za pomoci proteinu klathrinu do zkoumaného objektu, buňky. Z důvodu nutnosti použití proteinu k přenosu, vykazuje endocytóza vysokou specifickou aplikací. Další možností, jak vpravit nanočástice do buňky je *fagocytóza*. Fagocytóza je navázání antigenů na povrch cizorodé částice na membránové receptory. V neposlední řadě mohou nanočástice do buněk proniknout *pinocytózou*, která představuje nespecifický transport roztoku do buňky [11].

3.3.1 Zlaté nanočástice

Jedná se o nejstarší vyrobené nanočástice. Vyskytují se již v antických pohárech. Jsou vytvářeny řízenou redukcí solí zlata v roztoku. Využití našly jako nosiče fragmentů při transkripčních metodách nebo jako značka protilátky při histologické analýze[10].

3.3.2 Stříbrné nanočástice

Nejčastěji jsou vyráběny redukcí nitrátu stříbra. Z důvodu toxicity nejsou používány jako značky v in vivo systémech. V současnosti se začínají se uplatňovat jako antibakteriální přípravek. Své uplatnění nacházejí také ve vodivostních biosenzorech [10].

3.3.3 Nanočástice s oxidy železa

V přírodě se tyto částice vyskytují jako výsledek sopečné činnosti. Komerčně jsou vyráběny precipitací železnatých a železitých solí, teplotní dekompozicí železo obsahujícího prekurzoru a elektrochemickou syntézou.

Nanočástice s oxidy železa obsahují kovové jádro s povrchovou vrstvou. Nejčastěji se jedná o vrstvu z dextransu, citrátu nebo PEG. Jsou hojně využívány pro jejich magnetické vlastnosti. Prvními in vitro aplikacemi, bylo jejich použití jako nosiče enzymů. Jejich hlavní výhodou je snadná degradovatelnost po skončení požadované reakce. V bioaplikacích jsou proto často využívány jejich magnetické vlastnosti k separaci buněk nebo mezibuněčné hmoty z jejího nativního prostředí [10].

3.3.4 Nanočástice s oxidy dalších kovů

Jsou tvořené například TiO_2 , ZnO , ZnS , CdS a dalšími oxidy a sulfidy. Dnes jsou z velké části využívány buď jako pigmenty, katalyzátory řady biochemických procesů in vitro a in vivo aplikací, nebo jako nanosenzory.

Do skupiny nanosenzorů patří fluorescenční kvantové tečky. Kvantové tečky začínají nahrazovat klasické fluorochromy. Výhodou kvantových teček je vyšší svítivost, menší fotodegradace a menší vzájemný spektrální překryv jednotlivých typů teček [10].

3.3.5 Nanočástice na bázi uhlíku

Testuje se možnost využití tohoto typu fluorescenčních značek jako přenašečů vakcín. Mají vyšší biokompatibilitu a nižší toxicitu.

Nepolymerní nanočástice tohoto typu mají trubicové struktury o šířce několika nm a délce až několik desítek nm. Na jejich povrchu mohou být umístěny protilátky nebo bioaktivní molekuly. Po modifikaci vykazují fluorescenci ve fluorescenčním mikroskopu [10].

4 Měření a zobrazování doby života fluorescence

Fluorescence je cyklický jev. Postupem času dochází k degradaci fluorescenční látky a útlumu intenzity emise. Délka života fluorescence a změna intenzity její emise je hlavním parametrem, který potřebujeme znát při dlouhodobém snímání fluoreskujících vzorků. Bylo by totiž nepříjemné zjistit na konci několikahodinového experimentu při zběžné kontrole nasnímaných výsledků, že záření již v polovině měření zaniklo. Tato metoda hodnocení fluorescence šla ruku v ruce s vývojem vysokorychlostních snímačů.

FLIM (fluorescence lifetime image) je zobrazení fluorescence vytvářené na základě změny intenzity emise záření ze vzorku v průběhu časového období. Intenzita je přitom závislá na koncentraci fluoroforu. Nicméně její životnost na koncentraci nezávisí. Zároveň životnost nezávisí ani na tloušťce pozorovaného vzorku. Fluorescenční životnost je závislá na ekologických parametrech, jako jsou např. pH prostředí, okolní ionty nebo koncentrace kyslíku.

Vycházejme z předpokladu, že buňka má dvě oblasti o stejné ustálené hodnotě intenzity. Kvantové výtěžky intenzity mohou být stejné v obou oblastech. Pokud se liší, může to být v důsledku částečného vyloučení fluorescenčních značek z buňky. Ta oblast, která bude blíže středu buňky, bude vykazovat delší životnost než ta, která se bude nacházet na jejím okraji.

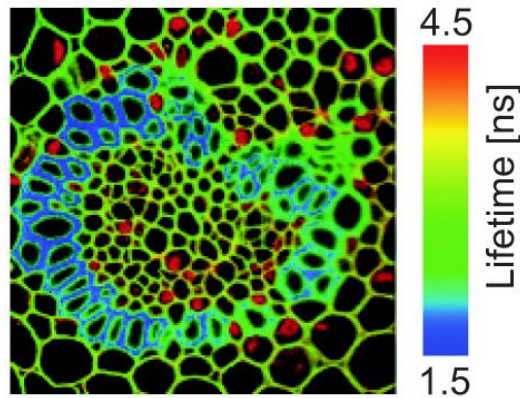
Fluorescenční (nebo obecně luminiscenční) životnost je charakteristická pro každou fluoreskující nebo fosforeskující molekulu. Je potřeba brát v potaz i chemické složení prostředí vzorku. Změny životnosti mohou být proto použity k získání informace o okolním chemickém prostředí. Tím pádem je možné sledovat reakční mechanismy.

Samotné zobrazení časové změny fluorescence je možné vynést zobrazení barevným škálováním životnosti slícováním fluorescenčních snímků nebo křivkou v grafu [7].

Základní FLIM nastavení:

- pulsní laserový zdroj
- jednofotonový citlivý detektor
- zaměření excitačního světla do vzorku a sběr signálu
- TCSPC jednotka pro měření doby mezi excitací a emisí fluorescence

Na Obrázek 4.1 je zobrazena změna fluorescence v časovém intervalu. Toto zobrazení je vytvořeno za pomoci snímků pořízených v různých časových intervalech. Intenzita fluorescence se v čase měření. Tato změna je znázorněna jako barevný odstín korespondující s konkrétním časovým intervalem na stupnici.

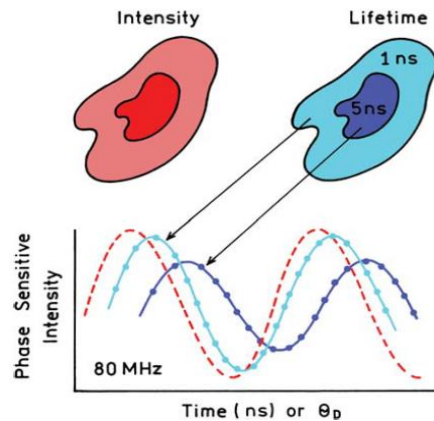


Obrázek 4.1: zobrazení ve FLIM v 2D modu [7]

V časově korelovaném jednofotonovém měření (TCSPC) probíhá měření doby mezi buzením vzorku pulzním laserem a příjmem emitovaného fotonu na detektoru. Tato metoda vyžaduje přesně definovaný začátek měření. Elektronika řídí laserový puls nebo fotodiodu. Konec je definovaný jako detekce fotonu citlivým jednofotonovým snímačem. Měření této časové prodlevy se mnohokrát opakuje a statisticky zpracovává. Doby zpoždění jsou seřazeny do histogramu, který znázorňuje vznik emise v průběhu času [7].

Nejstarší metodou měření doby života fluorescence je metoda fáze. Fázový úhel detektoru je nastaven na známou hodnotu fáze dopadajícího světla. Měří se detekce intenzity fluorescence v závislosti na fázi. Fázově citlivá intenzita je ustálený signál, který je úměrný kosinu rozdílu mezi fázovým úhlem detektoru a fázovým úhlem snímané emise. Pokud je intenzita měřena pomocí několika fázově citlivých detektorů, potom může být určen fázový úhel snímání nebo životnost emise záření. Zobrazení životnosti je prováděno měřením scény pomocí frekvenčně modulovaného PMT, viz kapitola 2.4.1.

Výsledek měření je pomocí zesilovače modulován stejnou frekvencí, jakou byla frekvence buzení. Získané signály jsou fázově zafixovány, takže mezi nimi není žádný posun. Tento výsledek je vyjádřen v zobrazení, kde je intenzita v každém bodě obrazu úměrná kosinu tohoto rozdílu fázového úhlu emise v daném bodě a detektoru.

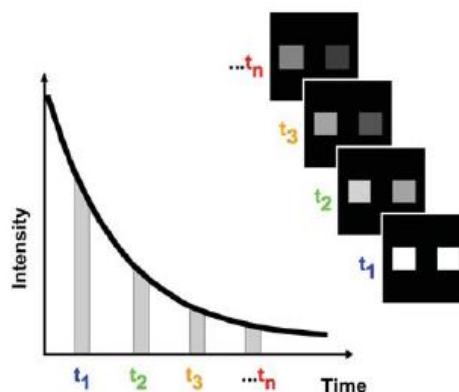


Obrázek 4.2: schématické znázornění zobrazení délky života za pomoci fáze [1]

Měření jedné intenzity citlivé na fázi není dostatečné pro určení životnosti. Fázový úhel a modulační emise může být určena získáním série fázově citlivých snímků prostřednictvím jiného detektoru fázového úhlu [1].

Další metodou určování degradace fluorescenčního barviva je hodnocení zotavení fluorescence po fotodegradaci (FRAP - fluorescence recovery after photobleaching). Tato metoda sleduje opětovný návrat fluorescence na místo, které bylo úmyslně vysvíceno [3]. Tato metoda je podobná magnetické rezonanci, protože využívá k měření intenzity signálu ze vzorku. U MRI jsou měřeny relaxační časy protonů, které jsou podobné jako fluorescenční konfokální mikroskopie, závislé na složení zkoumaného vzorku.

Pro studium délky života fluorescence je možno využít vzorků s velmi krátkým časovým intervalem snímání. Shromáždíme snímky v různých časových okamžicích oproti vyslanému pulzu excitačního světla a z nich následně určíme životnost pro každý pixel zvlášť. Časové okamžiky by se neměly překrývat. Tato metoda studia intenzity je dostupná ve všech detektorech. Detektor je při ní otevřen na velmi krátký definovaný okamžik po ukončení pulzu. Snímání jsou prováděna přibližně po velmi krátkou dobu v definovaném časovém odstupu po skončení impulzu [1].



Obrázek 4.3: schématické znázornění měření doby života časovaným snímáním [1]

5 Použité buněčné kultury

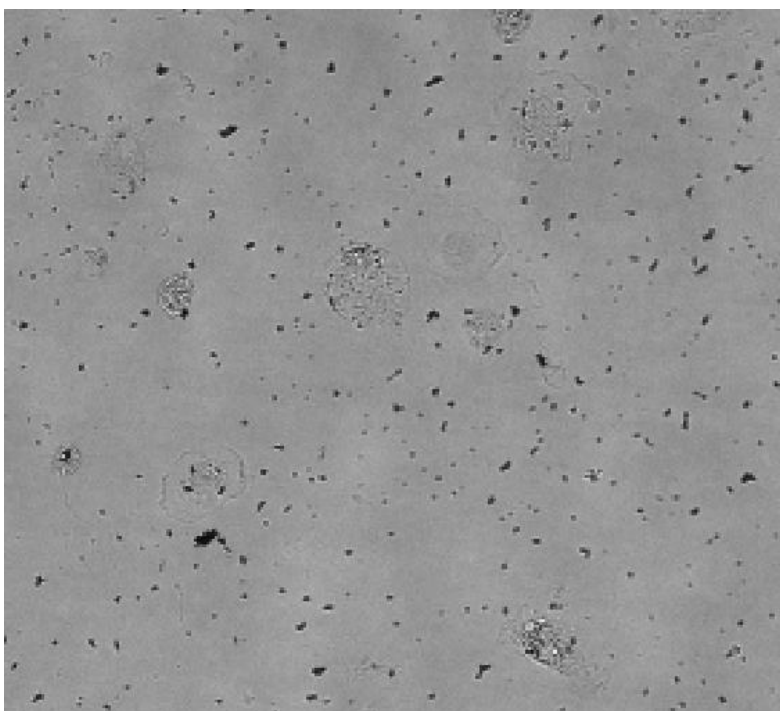
Buňky představují značně heterogenní a funkčně mnohotvárné složky experimentů. Jejich výskyt a kvantitativní zastoupení v organismech jsou typické pro každý buněčný typ. V této kapitole je uveden stručný výčet vlastností tkáňových kultur použitých pro experimenty v rámci diplomové práce.

5.1 Fibroblasty

Jedná se o typ buněk patřících do skupiny vazivových elementů. Jsou velmi podobné fibrocytům. Fibroblasty jsou vývojově mladší a velmi aktivní buňky, které mají protáhlé vřetenovité tělo. Jejich výběžky se přichycují k povrchu kolagenních vláken.

Jsou to protáhlé, vřetenovité až hvězdicovité buňky, které se přikládají přilnuté k povrchu vazivových vláken. Vzhled odpovídá jejich aktuálnímu funkčnímu stavu. Obsahují granulární endoplazmatické retikulum, které je dobře viditelné. Produkují prekurzory vláknité, tropokolagen, a amorfní hmoty kosti, proteoglykany.

Fibroblasty mají za normálních podmínek velkou regenerační schopnost a jsou hlavními stavebními kameny vyplňujícími tkáňové defekty, jizvy. Za normálních podmínek u nich nedochází k fagocytóze [12], [28].



Obrázek 5.1: fibroblasty (konfokální mikroskop, transmisi kanál, zvětšení 20x), zvětšenina

5.2 Kardiomyocyty

Jedná se o buňky svalové tkáně. Jednotlivé typy svalové tkáně se funkčně a strukturálně odlišují. Podle tohoto hlediska jsou rozdělovány myocyty na kosterní, srdeční a hladké svaloviny

Základní funkcí myocytu je kontrakce nebo mechanické napětí. Jejich základním stavebním prvkem je aktino-myosinový komplex, který zajišťuje kontrakci buňky. Při snímání mikroskopem je aktino-myosinový komplex zobrazen jako vlákna, myofibrily.

Kardiomyocyty jsou protáhlé na koncích rozvětvené svalové buňky a tvoří tkáň srdeční svaloviny. V každém kardiomyocytu je uloženo několik jader, která jsou uložena přibližně uprostřed buňky. Samotné uspořádání aktino-myozinových komplexů je stejné jako u příčně pruhované svaloviny.

V okolí jádra se nachází výrazný Golgiho komplex. Mitochondrie se vyskytují jako u všech svalů v hojném počtu a vykazují velký počet pravidelně uspořádaných vnitřních krist [12].



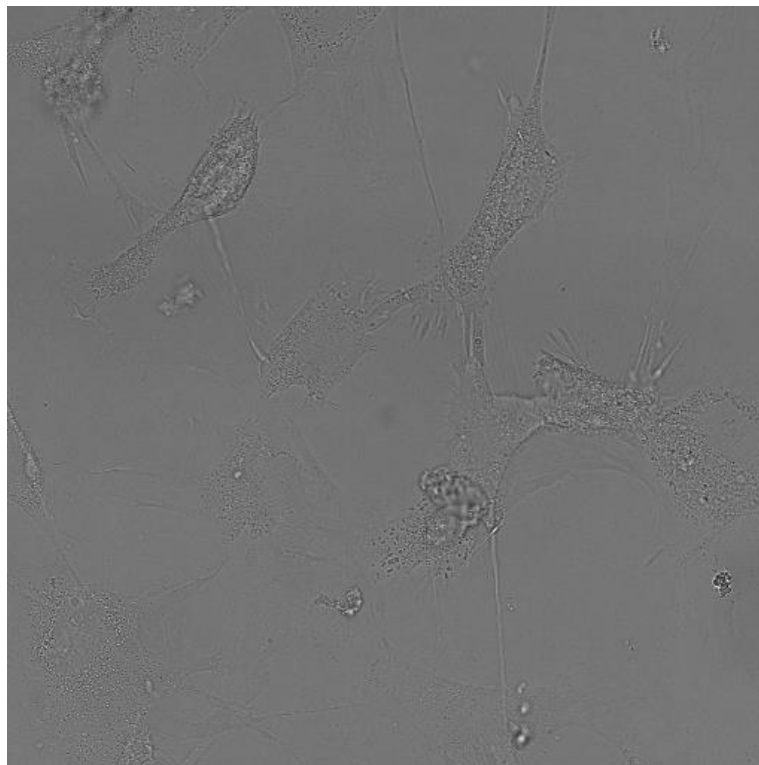
Obrázek 5.2: kardiomyocyty (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)

5.3 Mezenchymální kmenové buňky

Jedná se o ještě nediferencované zárodečné buňky, které se dělením mohou přeměnit na tkáň mezenchymální řady. Mohou se přeměnit např. na chondroblasty, osteoblasty, myoblasty, fibroblasty.

Z důvodu možnosti jejich pozdější diferenciaci mají schopnost nahrazovat již poškozené buněčné kultury. Proto jsou vhodnými kandidáty pro použití k regeneraci v buněčné terapii. Nejsou však primárně schopné tvořit buňky krevní řady.

Jejich zdroj je v kostní dřeni, pupečnickové krvi a v tkáni pupeční šňůry. V dospělém věku jsou lokalizovány v tukové tkáni. Běžně se vyskytují ve specifickém místě v tkáni. Po zničení tohoto mikroprostředí nebo jeho narušení, dojde k jejich diferenciaci. Pokud ale z tohoto prostředí kmenová buňka vylučuje, ale prostor zůstane zachován, je osídlen jinou kmenovou buňkou. Z toho vyplývá, že počet kmenových buněk tohoto typu je regulován počtem těchto útvarů [13].

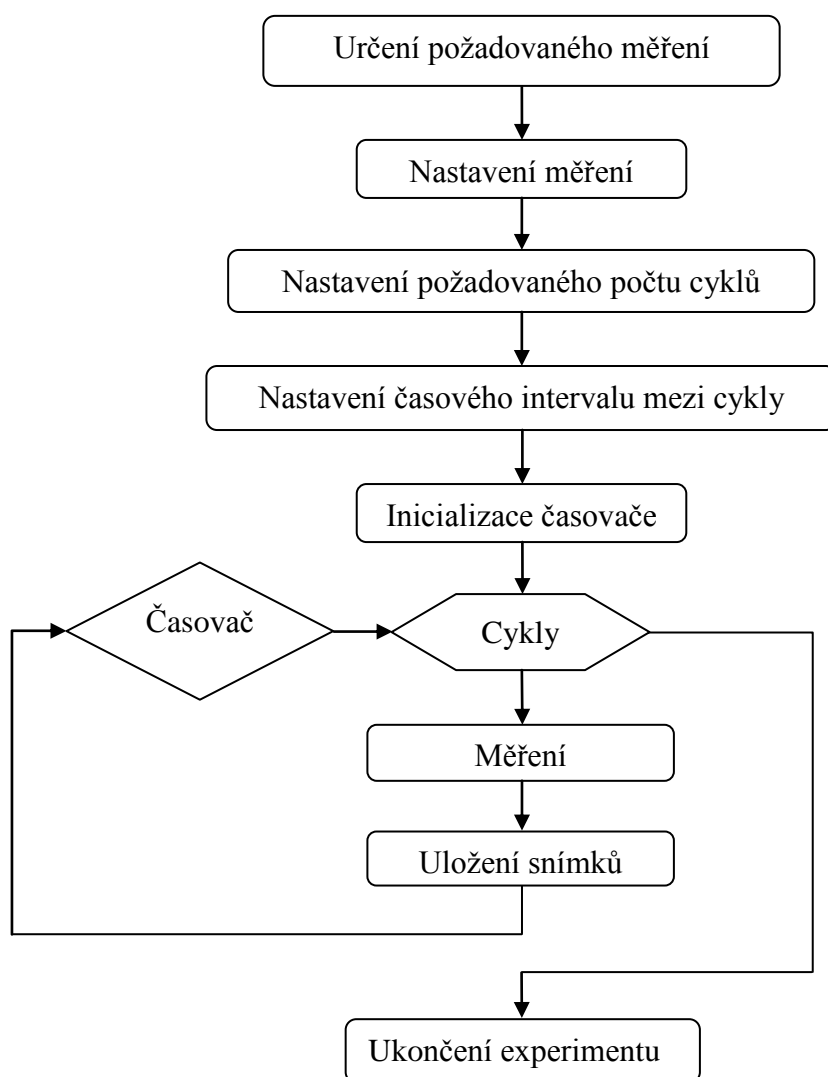


Obrázek 5.3: mezenchymální kmenové buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)

6 Naměřená data

Měření bylo provedeno na konfokálním mikroskopu Leica SP8 X. Před začátkem každého měření proběhlo základní nastavení scény snímání, při kterém došlo k optimalizaci měření. Tento krok obsahuje nastavení nejlepší zkoumané roviny, která obsahuje nejlepší zkoumanou oblast zájmu. Dále byla nastavena optimální intenzita používaného laseru tak, aby nedošlo ke zbytečnému poškození fluoroforu.

V rámci práce byly měřeny tři typy buněk, fibroblasty, kardiomyocyty a mezenchymální kmenové buňky.



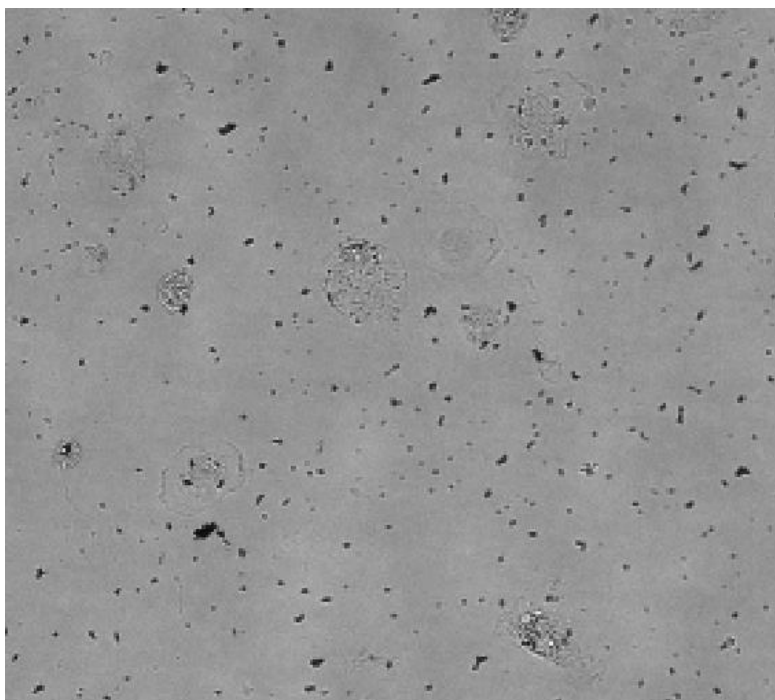
Obrázek 6.1 algoritmus snímání

V každém cyklu bylo měřeno několik parametrů charakterizujících fluorofor. Jednalo se o pozorování změny jeho emisního spektra v průběhu času a poklesu fluorescence v několika časových intervalech po vypnutí excitačního laseru. Tyto experimenty byly prováděny pro jednu zaměřenou rovinu nebo několik řezů vzorkem.

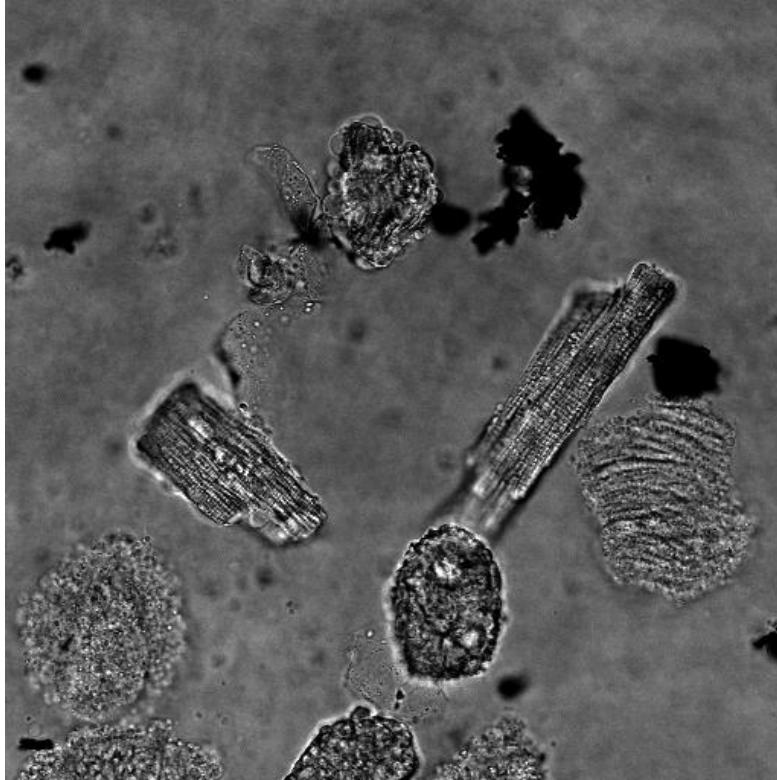
Výsledkem těchto měření jsou série snímků změny fluorescence pozorované v časovém rozestupu. Tyto série jsou uloženy do uživatelem zvolené složky spolu s nastavením parametrů experimentu a barevnou paletou použitou při znázornění snímané fluorescence.

Pro každé snímání byly použity různé parametry nastavení experimentů. V základním nastavení se objevuje změna emisního spektra a snímání pohasínání fluorescence po vypnutí laseru. Toto základní nastavení se objevuje ve všech používaných buňkách.

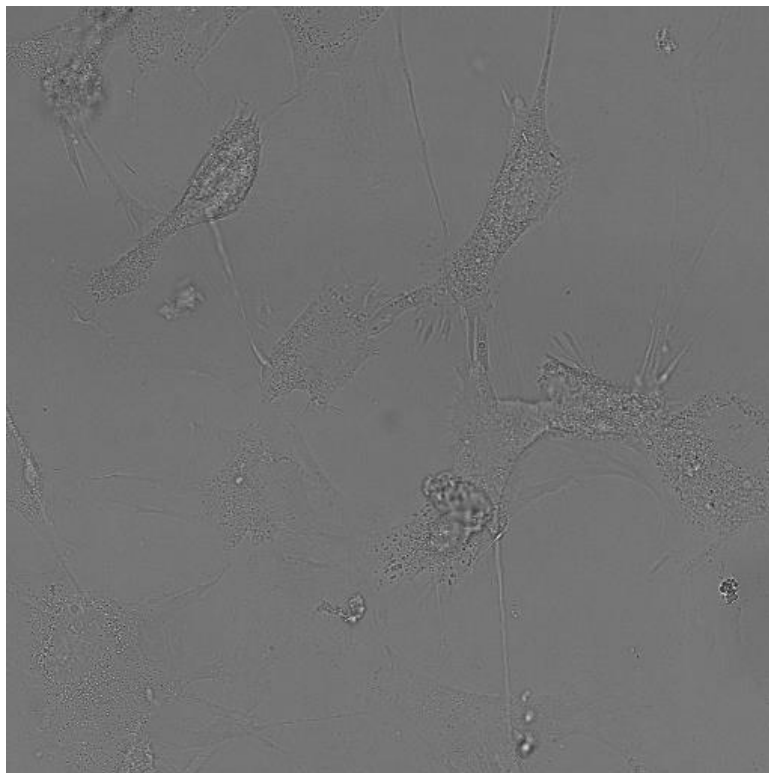
Pro každé snímané buňky byly vytvořeny transmisní snímky, které jsou použity v kapitole Měření a zobrazování doby života fluorescence. Jedná se o nativní zobrazení buněk, podle něj dochází k optimálnímu zaostření do optimální roviny vzorku.



Obrázek 6.2: fibroblasty (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 20x), upraveno

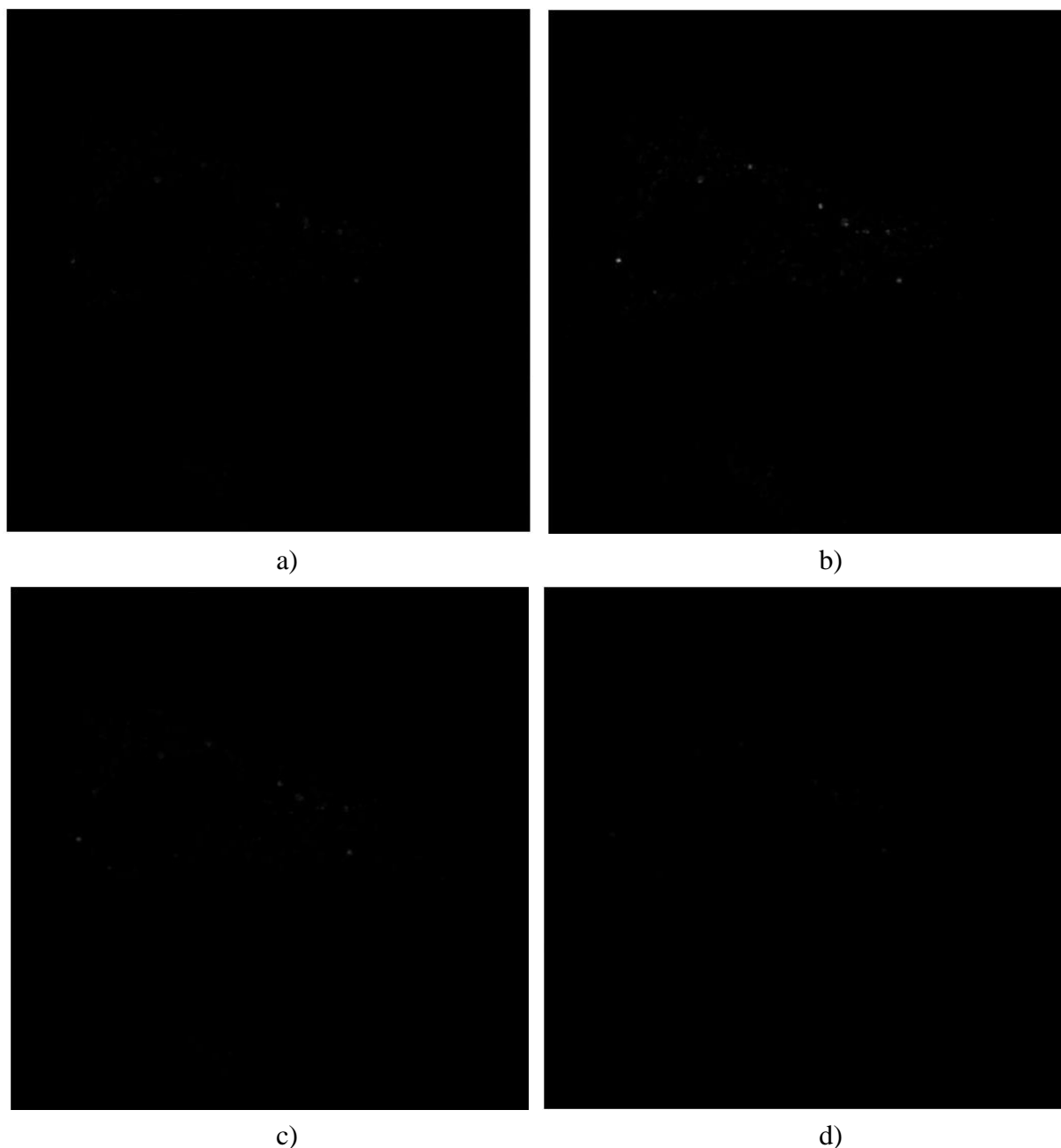


Obrázek 6.3: kardiomyocyty buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)



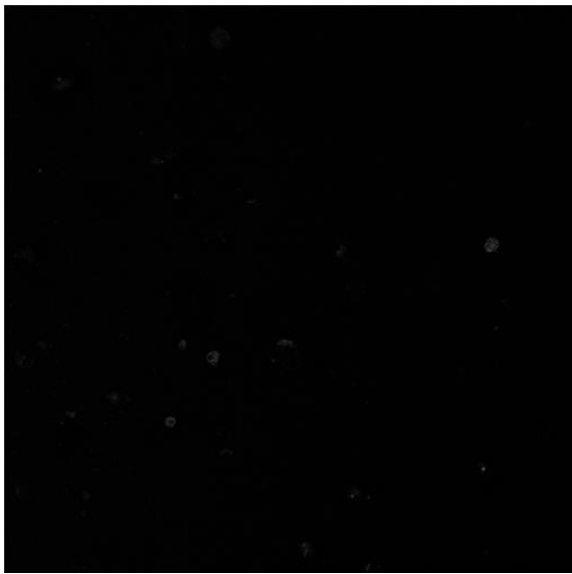
Obrázek 6.4: kmenové mezenchymální buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)

Základní charakteristikou pro hodnocení fluoroforu je jeho emisní spektrum. Emisní spektra byla snímána od nastavené počáteční vlnové délky s definovaným krokem po koncovou vlnovou délku. Pro již zmiňované kmenové buňky je rozsah zkoumaných vlnových délek od 550 do 750 nm. Mezi kroky snímáními je vzdálenost 10 nm.

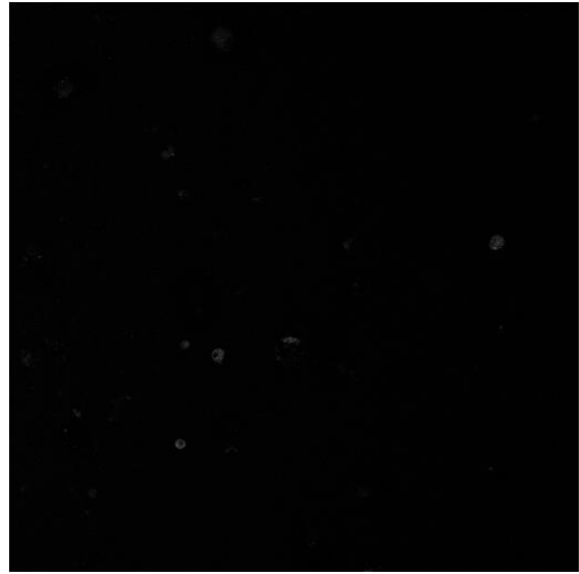


Obrázek 6.5: emise fluorescence kmenových mezenchymálních buněk na vlnových délkách a) 550, b) 600, c) 650 a d) 700 nm

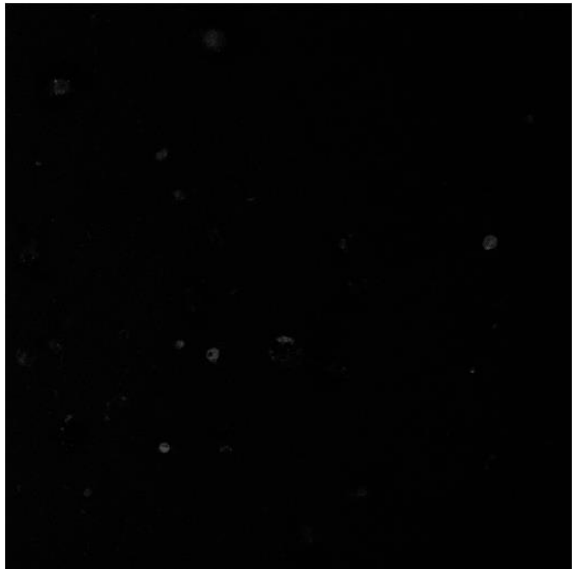
Pro získání komplexnější informace o charakteristice fluorescence vzorku v jednotlivých jeho vrstvách, byl využit dostupný konfokální mikroskop. Rozměr snímané jednotky, voxelu, je v tomto případě $0,085 \times 0,085 \times 0,755 \mu\text{m}$. Rozlišení je $1024 \times 1024 \text{ px}$. Fluorescence se mění v závislosti na průniku měřených buněk se zkoumanou rovinou.



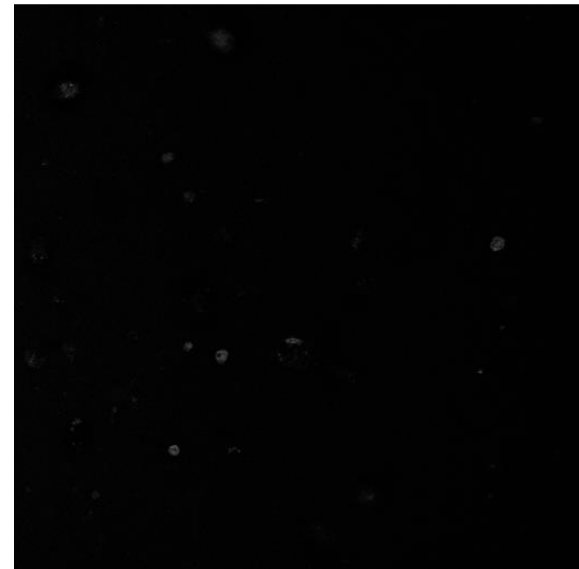
a)



b)

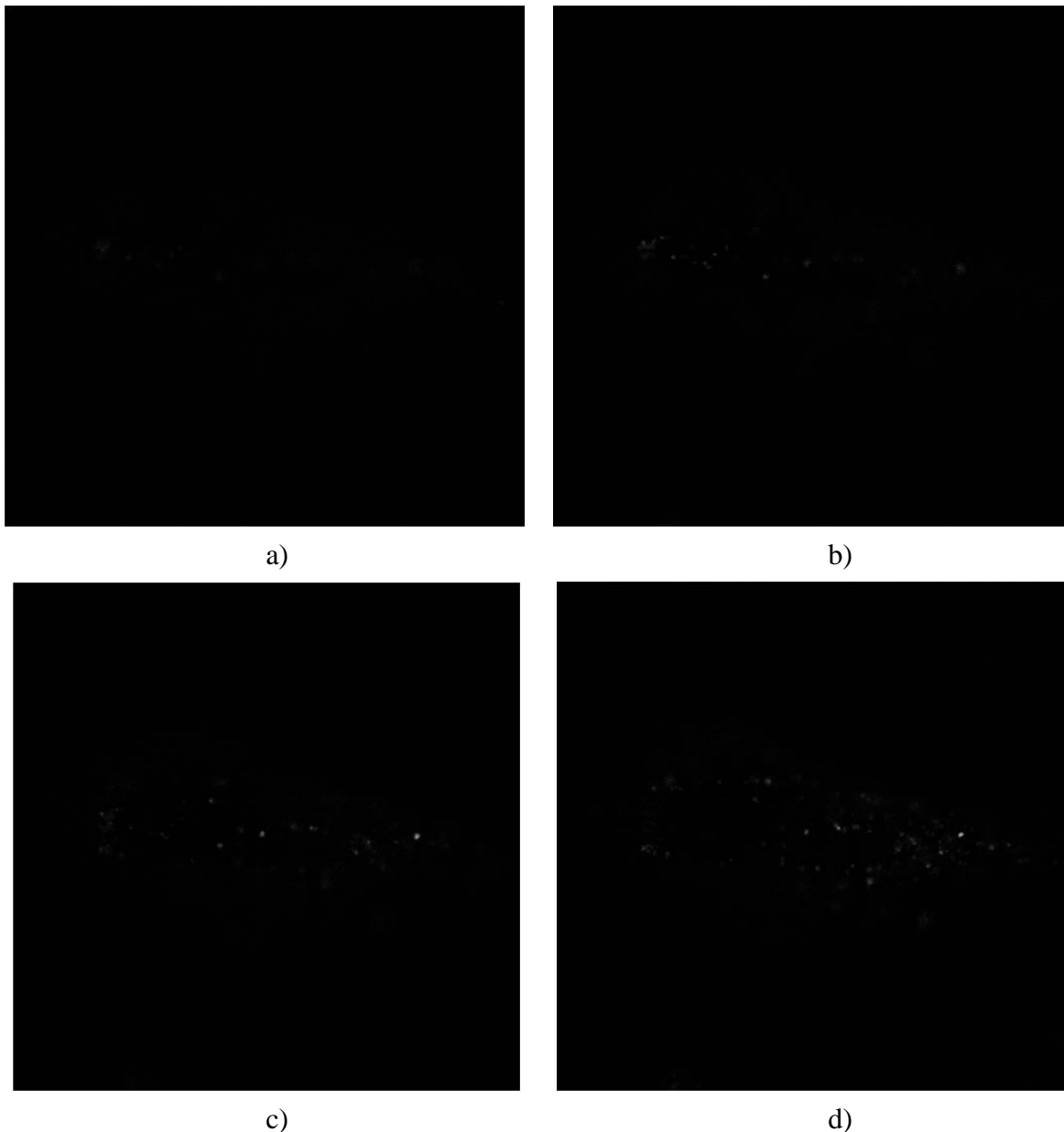


c)



d)

Obrázek 6.6: změna fluorescence ve čtyřech po sobě jdoucích vrstvách vzorku fibroblastů (konfokální mikroskop, zvětšení 20x)



Obrázek 6.7: změna fluorescence v několika vrstvách vzorku mezenchymálních buněk (konfokální mikroskopie, zvětšení 63x)

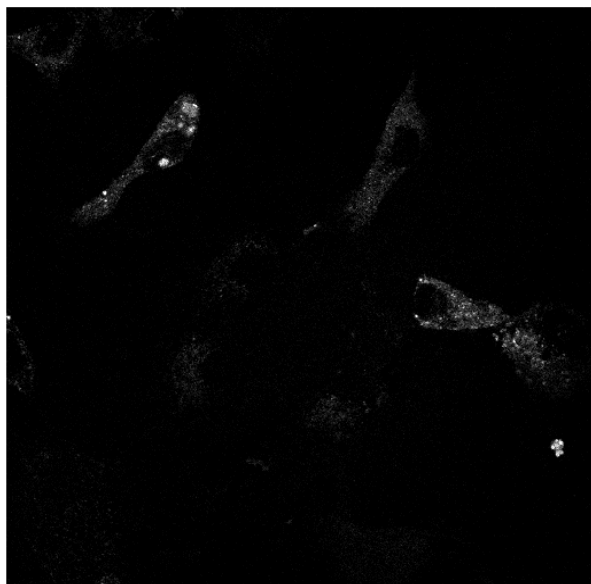
Další měřenou charakteristikou je fluorescence po vypnutí excitačního zdroje. Tento experiment je prováděn pomocí funkce TimeGate, viz kapitola 2.5.

Pro tento experiment bylo provedeno snímání po dobu 11,5 ns. Doba měření každého snímku byla 3,5 ns. Protože se jedná o opravdu velmi krátkou dobu sběru informace o záření, je získaný jas fluorescence velmi malý. Obrázek 6.7 znázorňuje pouze část experimentu prováděného na kmenových mezenchymálních buňkách.

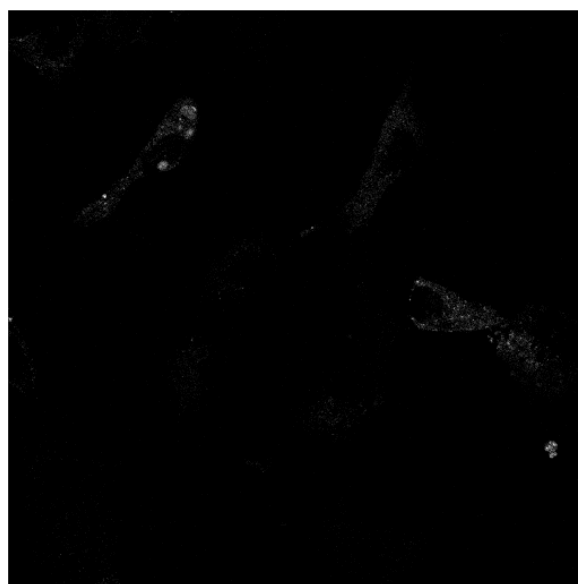
Snímky museli být pro vložení do této práce převedeny na stupně šedi a zvětšeny na desetinásobek své původní hodnoty jasu. Důvodem těchto prací je velmi malá jasová hodnota fluorescenčního záření, která se navíc nachází v nekонтastním zbarvení vůči pozadí a zaniká na něm. Originální snímky vykreslují intenzitu v odstínech červené, která na černém pozadí

zaniká. Z upravených snímků je již pouhým okem patrný výrazný útlum intenzity fluorescence.

Celá série jednoho snímání je přiložena v příloze. Rozlišení těchto snímků 512 na 512 px. Rychlost snímání byla 100 Hz.



a) 0 - 3,5 ns



b) 1 - 4,5 ns



c) 2 - 5,5 ns

Obrázek 6.8: změna fluorescence mezenchymálních kmenových buněk po vypnutí laserové zdroje

V Obrázek 6.8 a) zobrazuje snímání fluorescence v intervalu těsně po vypnutí laseru. Snímání bylo prováděno po dobu tří a půl nanosekundy. Obraz b) a c) mají mezi sebou odstup

počátku snímání o velikosti jedné nanosekundy o stejné délce pracovní doby detektoru, tedy tři nanosekundy.

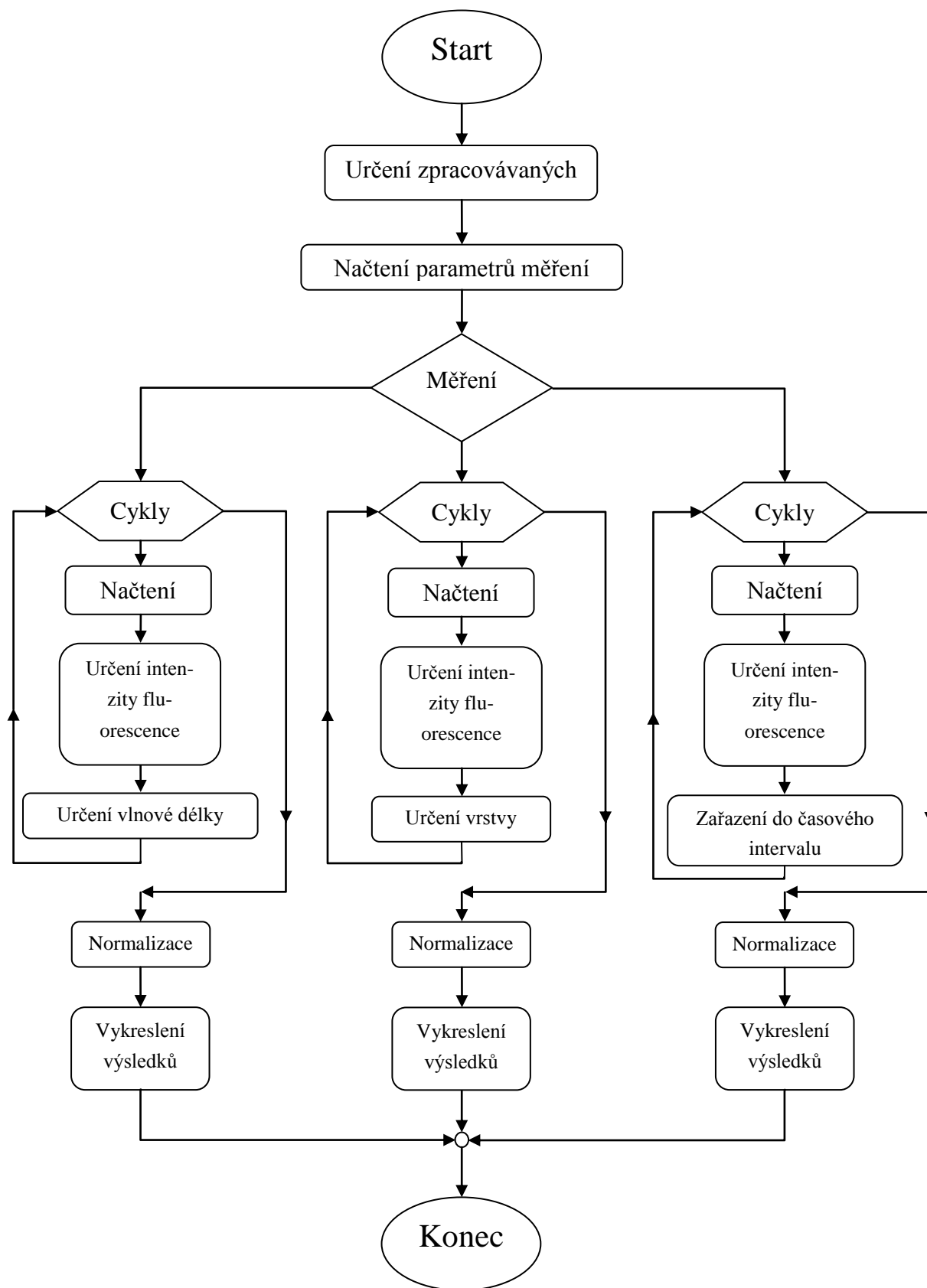
U některých buněk nedošlo k inkorporaci barviva do buňky. Okolí buňky proto září více než samotná buňka. Tento jev nastal buď z důvodu odumření zkoumané buňky nebo nevhodností použitého fluoroforu.

7 Programové řešení

Série výstupních snímků měření z konfokálního mikroskopu jsou dále zpracovávány. Pro zpracování je použit parametr změny fluorescence v dlouhodobém snímání fluorescenční aktivity ve vzorcích. Zpracování dat sestává z bloků pro načtení, zpracování a prezentace výsledků. Zpracování je přizpůsobeno výstupům konkrétního typu mikroskopu. Tedy Leica SP8 X, který byl pro měření k dispozici.

Protože programové řešení je uzpůsobeno na konkrétní typ výstupu, je požadováno, aby zkoumaná data obsahovala složku MetaData, která se automaticky vytváří při ukládání naměřených dat a obsahuje parametry měření. Program je na této složce závislý. Pokud budou tyto data chybět, dojde k předčasnému nekorektnímu ukončení programu.

Vstupem vytvořeného skriptu zpracování jsou získané snímky změny fluorescence, výstupem grafy zobrazující časovou změnu fluorescence.



Obrázek 7.1: vývojový diagram programového řešení

Po zpuštění programu je uživatel vyzván k určení zpracovávaným dat. Z parametrů měření, které jsou standardně softwarem vkládány do souboru s měřeními, jsou vyhledány parametry nastavení dotyčného experimentu

Z těch pak dojde k získání základních informací o zpracovávaných datech. Tímto způsobem je určen typ zpracovávaných dat, zda se jedná o měření změny emisních spekter, zkoumání fluorescence v jednotlivých rovinách nebo o změnu hodnoty fluorescenčního jasu v čase. Dále je zjištěn celkový počet získaných snímků daného experimentu, počet snímků v rámci jednoho cyklu měření a počet cyklů měření. Následné zpracování je rozděleno podle zjištěných parametrů. Zautomatizováním je zajištěno, že nedojde k nechtěnému zaměnění snímaných dat.

Dotazovacím oknem je uživateli nabídnuta možnost výběru omezení zpracování na zájmovou oblast. Pokud bude odpověď kladná, bude zpracován jeden vzorový snímek, z něhož bude vybrána oblast zájmu ke zpracování. Výběr oblasti je proveden označením dvou bodů. Není potřeba zadávat ohraničení jako body hlavní nebo vedlejší diagonály. Program si sám určí, která ze souřadnic patří hornímu a která dolnímu rohu.

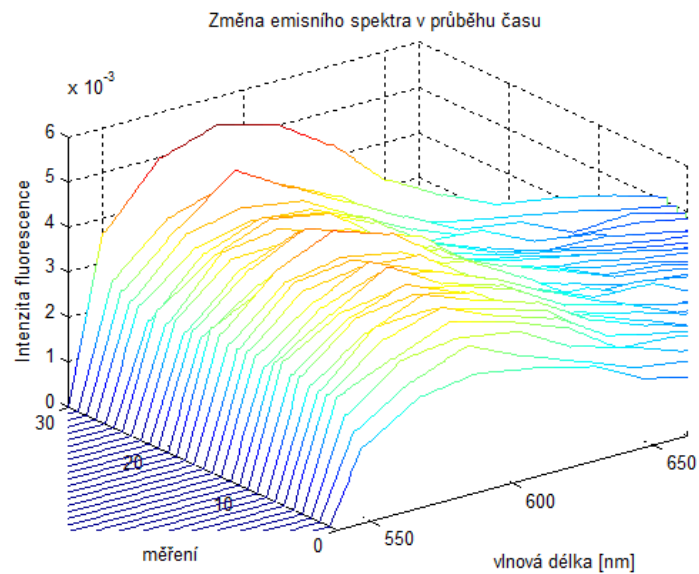
Změna emise fluorescence je určena sumací hodnot fluorescence snímků měření. Výsledné spektrum je vytvořeno poskládáním zjištěných součtů a přiřazením na příslušné vlnové délky. Seřazením spekter nasnímaných v dlouhodobém časovém horizontu dostaneme emisní charakteristiku fluoroforu.

Výsledkem zpracování je ovšem pouze řídká matice změny emise fluorescence pro konkrétní vlnové délky. Mezi těmito body ve spektru se nachází mezera způsobená posunem snímaného úseku spektra. U takto zjištěných dat by došlo de facto k zobrazení změny čárového spektra v čase. Z tohoto důvodu jsou emise nacházející se v této mezeře lineárně interpolovány. Tento krok zanáší do zobrazení nepřesnosti. Jejich hlavním projevem je „hranatost“ výsledného spektra způsobená interpolací. Další je nepřesné vyhledání vrcholu emisního spektra, které je způsobeno právě krokováním měření. Vrchol spektra se může nacházet v intervalu kroku a proto je takto vytvořený obraz pouze orientační.

Studie délky života fluorescence po vypnutí laserového excitačního zdroje je také prováděna sumací hodnot fluorescenčního jasu. Výsledkem analýzy je matice zastupující hodnoty jasu fluorescence v konkrétním počátečním okamžiku otevření detektoru.

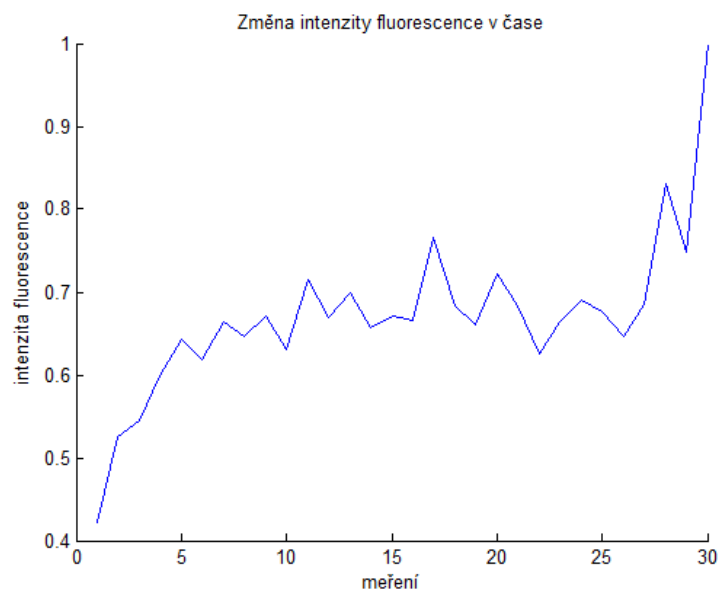
Výsledek analýzy jednotlivých vrstev je suma fluorescence dané vrstvy.

Výstup programu je obrazový. Výstupy jsou v podobě křivkových a komplexnějších 3D grafů změny fluorescence v závislosti na čase. Samotný vývoj intenzity fluorescence v čase, je možné zobrazit několika způsoby. Tuto časovou reprezentaci je možno provést 3D grafy znázorňující hodnotu intenzity pseudobarvením. Změna barvy charakterizuje změnu intenzity jak je patrné z Obrázek 7.2.



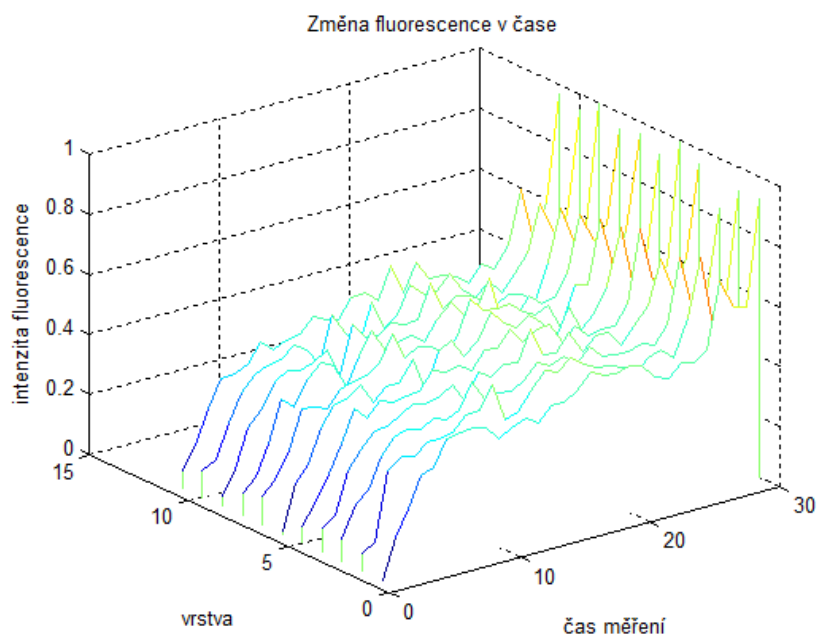
Obrázek 7.2: změna emisního spektra kultury fibroblastů

Zobrazení křivky závislosti změny emisního maxima fluorescence na čase kompenzuje nedostatečnou přehlednost Obrázek 7.2. Na druhou stranu není vhodná pro podrobnější analýzu změny fluorescence, ale pouze pro odhad chování fluoroforu v časovém horizontu.



Obrázek 7.3: křivka maxima emisního spektra fluorescence fibroblastu v průběhu experimentu

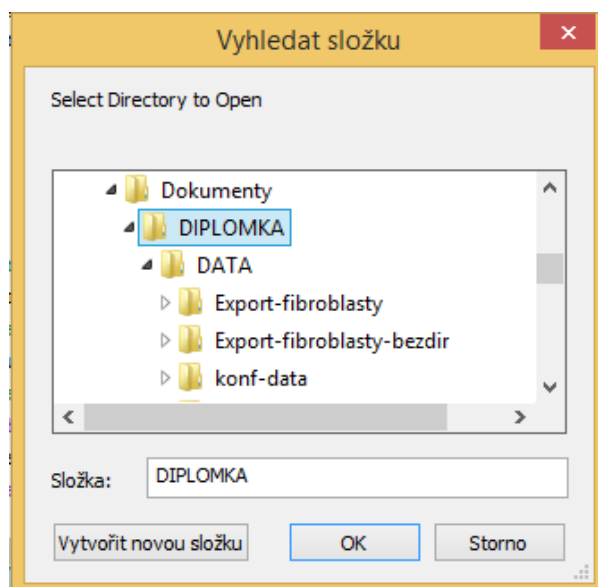
Podobně jako pohyb emisního spektra v průběhu měření může být zobrazena i změna intenzity fluorescence v různých rovinách.



Obrázek 7.4: změna intenzity fluorescence ve fibroblastech v několika vrstvách

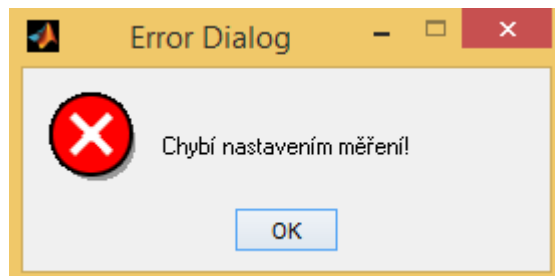
7.1 Uživatelské prostředí

Pro větší komfort uživatele je vytvořeno několik aplikací. Uživatelská volba zpracovávaných dat je vedena přes dotazovací okno znázorněné na Obrázek 7.5. Uživatel v tomto rozhraní zvolí soubor se zkoumanými daty.



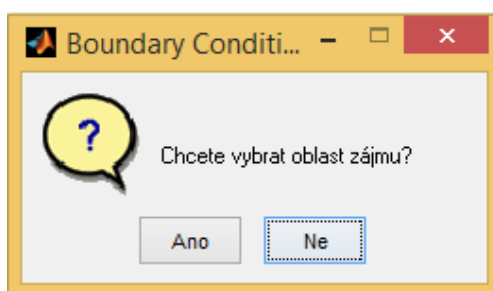
Obrázek 7.5 dialogové okno pro vyhledání dat

Pro program je zcela zásadní existence parametrů snímání. Kontrola existence nastavení měření při jejich nenalezení uživatele na tuto skutečnost upozorní dialogovým oknem.

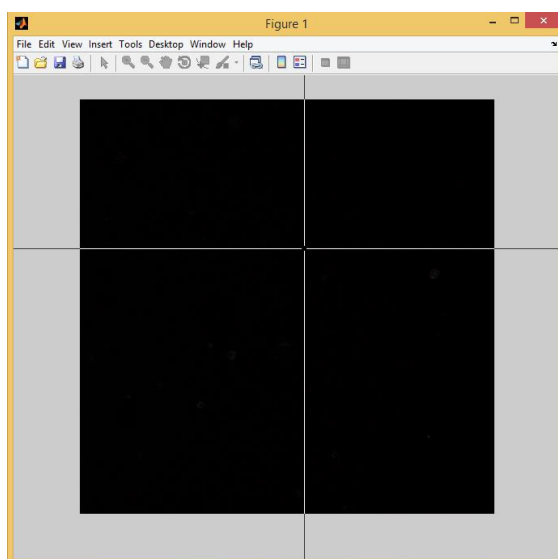


Obrázek 7.6: chybová hláška

Dalším dotazováním uživatele je zjištěna oblast zájmu ve zkoumaném obraze. Uživatel zadá dva body do dotazovacího okna.

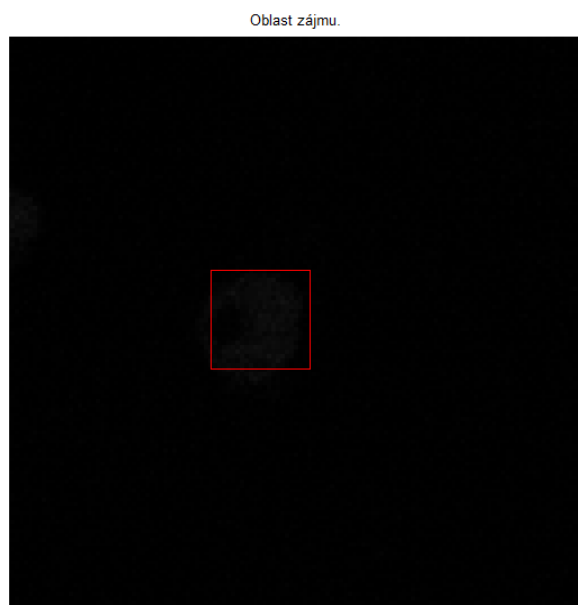


Obrázek 7.7: dotazovací okno pro oblast zájmu



Obrázek 7.8: okno pro určení oblasti zájmu

Následně je automaticky vymezen zkoumaný prostor ve tvaru obdélníku, který obsahuje vrcholy zadané uživatelem nacházející se na diagonále.



Obrázek 7.9: vymezený prostor kultury fibroblastu obsahujícího buňku

8 Popis dosažených výsledků

V této kapitole jsou shrnuty dosažené výsledky hodnocené z výstupů realizovaného programu. Výsledky jsou nejdříve hodnoceny pro každý typ buněk zvlášť. Poté jsou zhodnoceny buněčné kultury mezi sebou.

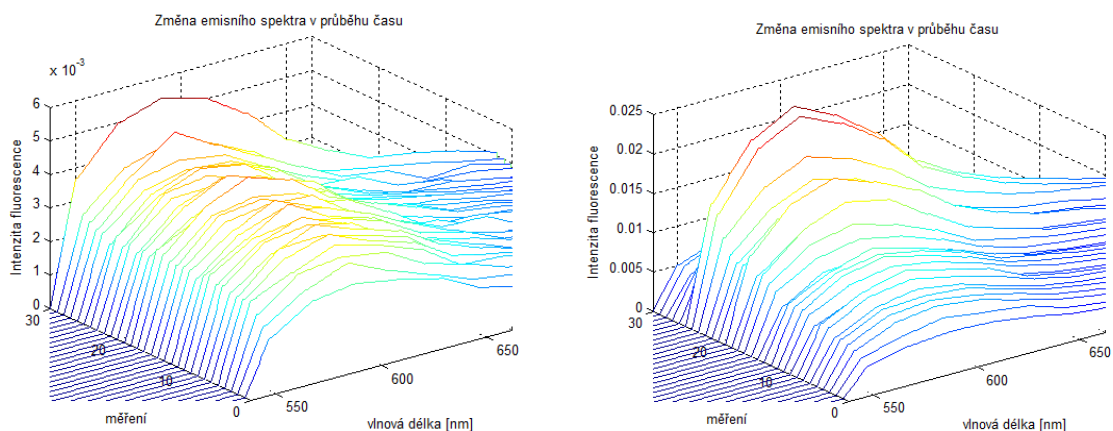
8.1 Fibroblasty

Pro tuto práci byly měřeny tři kultury fibroblastů. První měření bylo prováděno na mladých fibroblastech s čerstvě podaným rhodaminem. Druhý a třetí vzorek představuje fibroblasty s delší inkubací barviva.

Jako první bude rozebrán výsledek měření mladých fibroblastů. Experiment s tímto vzorkem sestával z měření změny emisního spektra a změny fluorescence v rámci několika si blízkých rovin. Každé měření bylo opakováno třicetkrát.

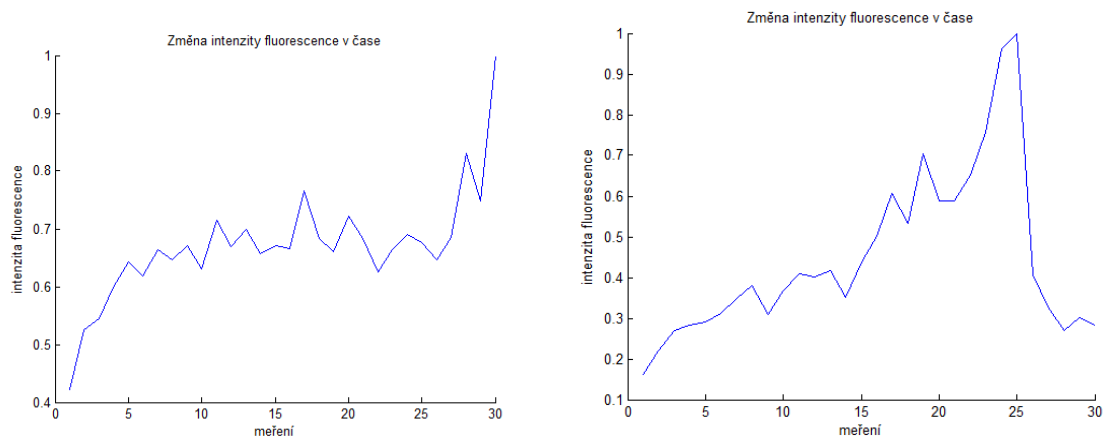
Emisní spektrum bylo měřeno pro rozsah vlnových délek od 550 do 650 nm s posunem 20 nm mezi každým měřením. Jedná se tedy o 11 snímků. Změna je zkoumána pro emisi z buňky a jejího okolí. Pro oblast nacházející se uvnitř fibroblastu byl vybrán nejvýraznější fibroblast a jeho blízké okolí.

Emisní spektra vykazují velkou rozdílnost. Obrázek 8.1 vlevo znázorňuje emisní spektrum fluorescence v buňce fibroblastu. Pravé spektrum emise, které pocházejí z oblasti mimo buňku, nevykazuje velké odchylky ve svém průběhu. Levé spektrum, které představuje emisní spektrum zjišťované z oblasti uvnitř buňky, má evidentně menší hodnoty intenzity. Lépe je to parné na to Obrázek 8.2. Zároveň je ze zobrazení viditelná změna velikosti dosažených hodnot intenzity fluorescence. Z výsledků je patrné, že spektrum okolního prostředí vykazuje větší hodnoty jasu fluorescence o více než 80%. Vrcholy naměřených emisních spekter byly zjištěny na hodnotě 590 nm. Tedy v průběhu času nedošlo ke změně vlnové délky emisního záření.



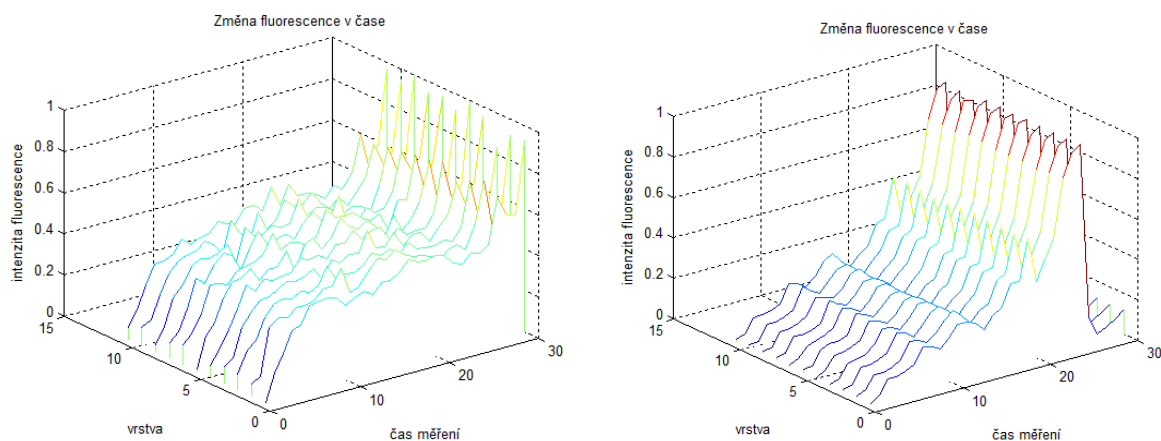
Obrázek 8.1: změna emisního spektra v časovém horizontu v buňce a mimo buňku

Jak je patrné z Obrázek 8.2 maxima vrcholů emisních spekter vykazují v průběhu času velké rozdíly. V emisním spektru z nitra buňky je patrná změna jasu fluorescence přibližně o 30% v posledních pěti cyklech měření. Tento nárůst je zřejmě způsoben opožděnou aktivací fluoroforu nebo zvýšeným průchodem barviva do buňky. V okolí buňky je situace opačná. Zde dochází k postupnému nárůstu fluorescence, ale v 25. cyklu měření dochází k rychlému 60% poklesu jasu. Vzhledem k tomu, že ve stejné době nastal pokles hodnot jasu v mimobuděčném prostoru a v samotné buňce došlo ke zvýšení fluorescence, je možné že došlo buď k pozdější aktivaci barviva nebo jeho zvýšenému průniku do buňky. Naproti tomu rhodamin v okolí buňky mohl v tomto okamžiku začít degradovat.



Obrázek 8.2: průběh vrcholu emisního spektra v a mimo buňku fibroblastu

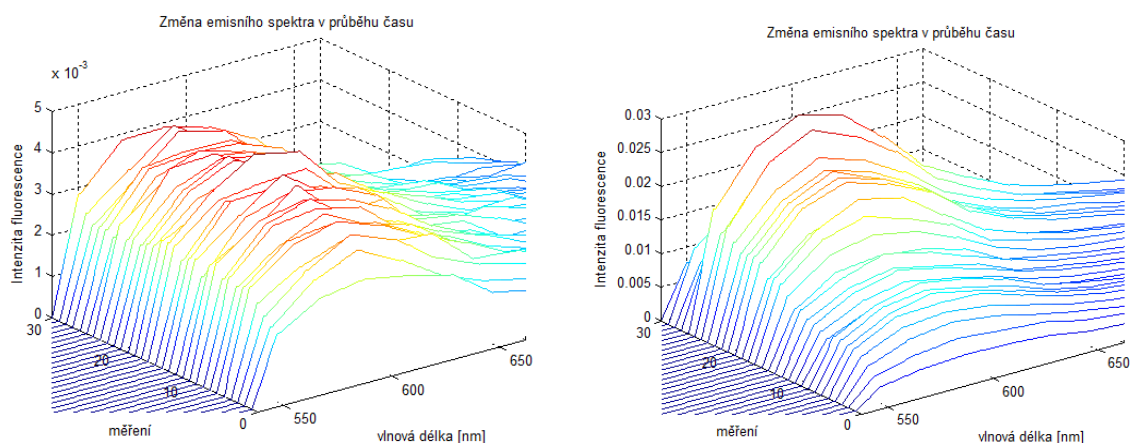
Pokud budeme zkoumat tento vzorek v různých rovinách, dospějeme se k podobným výsledkům jako u vrcholů maxim emisních spekter.



Obrázek 8.3: fluorescence fibroblastu v rámci vrstev v buňce a mimo buňku

Emisní spektra na Obrázek 8.4 patří vzorku fibroblastů, který byl starší než předchozí. Emisní spektrum bylo měřeno pro rozsah vlnových délek od 550 do 650 nm s posunem 20 nm mezi každým měřením.

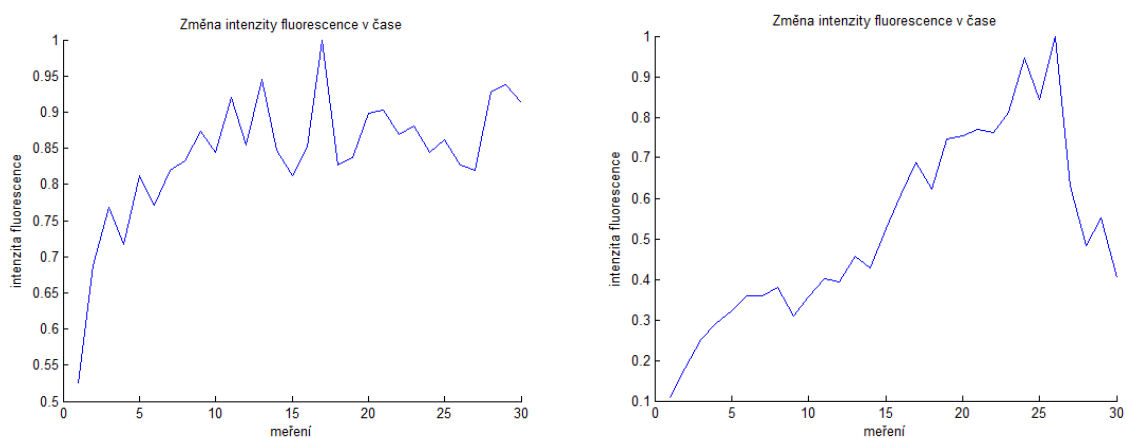
Podobně jako ony jsou zpracovány dvě oblasti zájmu. Jedna uvnitř a druhá vně buňky. Emisní spektrum se stejně jako u předchozích odlišuje uvnitř a vně buňky. Opět je zde patrný velký rozdíl v hodnotě jasu mezi okolními a buňkou.



Obrázek 8.4: změna emisního spektra kultury fibroblastu vně a uvnitř buňky

Při pohledu na zobrazení maxim jednotlivých emisních měření je zde patrná pozvolná aktivace fluorescence, která je rychlejší u fluorescence nacházející se ve fibroblastu a v průběhu času vykazuje přibližně konstantní průběh fluorescence u emisního spektra uvnitř buňky.

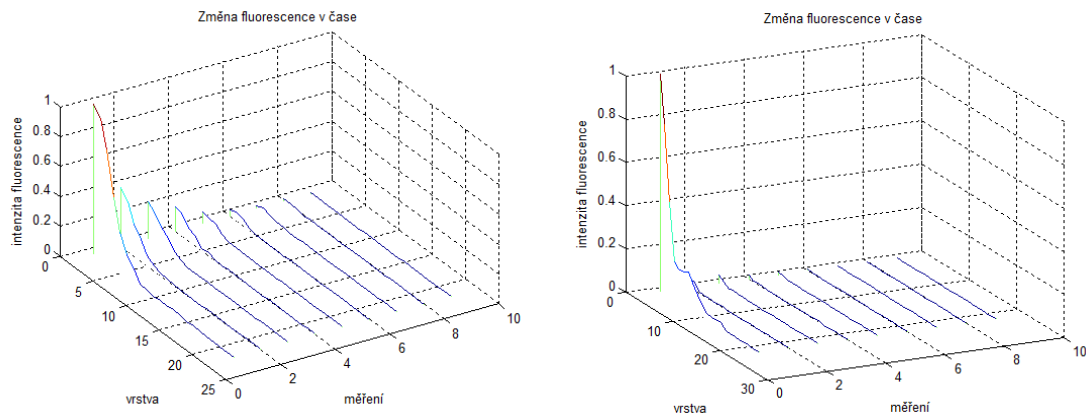
U emisního spektra mimo fibroblast je lineární nárůst jasu po dobu 25 cyklů a pak jeho následuje prudký sestup o 60%. Důvody pro tuto odlišnost mohou být stejné jak v předchozím případě.



Obrázek 8.5: průběh vrcholu emisního spektra v a mimo buňku fibroblastu

V poslední vzorku fibroblastů jsou snímány jednotlivé vrstvy vzorku v průběhu času. Z výstupů je parné, že na začátku měření je jak v buňce, tak mimo buňku, největší fluorescence v první vrstvě. Ve všech vrstvách dochází k exponenciálnímu útlumu fluorescence.

Ve vrstvách nasnímaných v buňce fibroblastu je útlum fluorescence mezi jednotlivými časovými okamžiky přibližně 50% oproti předchozím. Ve vrstvách vzorku mimo buňku je fluorescence pozorována pouze v první vrstvě.

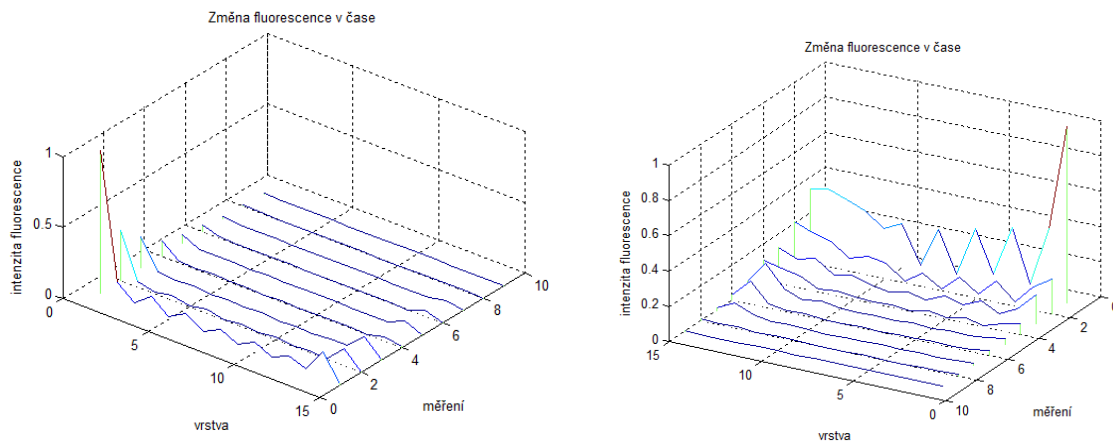


Obrázek 8.6: změna fluorescence v kultuře fibroblastu ve vrstvách vzorku v čase v buňce a mimo ni

8.2 Kardiomyocyty

Hodnocení fluorescence u těchto buněk je provedeno na nasnímaném průřezu vzorkem. U obou prostředí je parný výrazný rozdíl v poklesu mezi první a zbylými vrstvami.

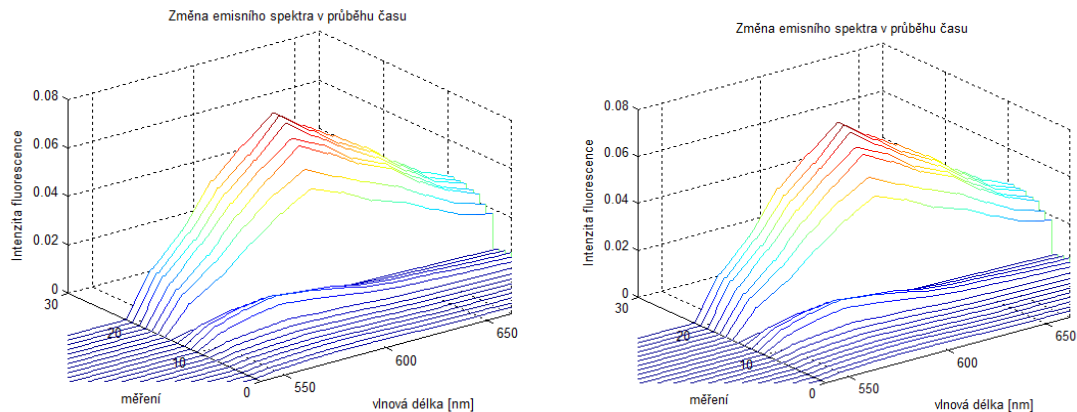
U obou lokalit dochází k poklesu fluorescence mezi prvním a druhým měřením o více než 60%. Fluorescence u obou okolí vymizí po šestém měření.



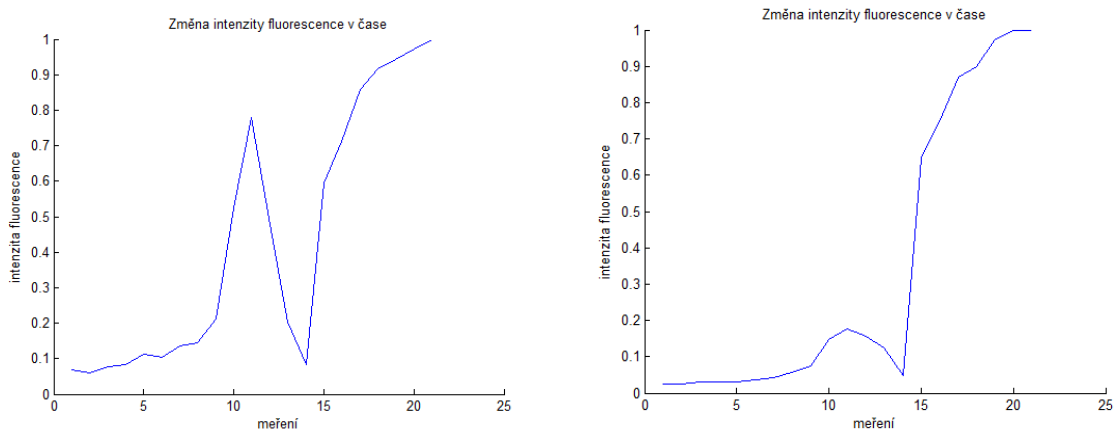
Obrázek 8.7: změna fluorescence kardiomyocytů v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni

8.3 Mezenchymální kmenové buňky

Emisní spektrum bylo měřeno pro rozsah vlnových délek od 550 do 650 nm s posunem 20 nm mezi každým měřením. Průběh emisních spekter obou okolí je přibližně stejný. Jediný rozdíl je v hodnotě výrazného fluorescenčního vrcholu nacházejícího se v okolí dvanáctého měření výraznějšího v Obrázek 8.9. U lokálního okolí fluorescence buňky má tento vrchol velikost o 75% větší, než vykazuje fluorescence mimo buňku.



Obrázek 8.8: emisní spektrum kultury mezenchymálních buněk v a mimo buňku

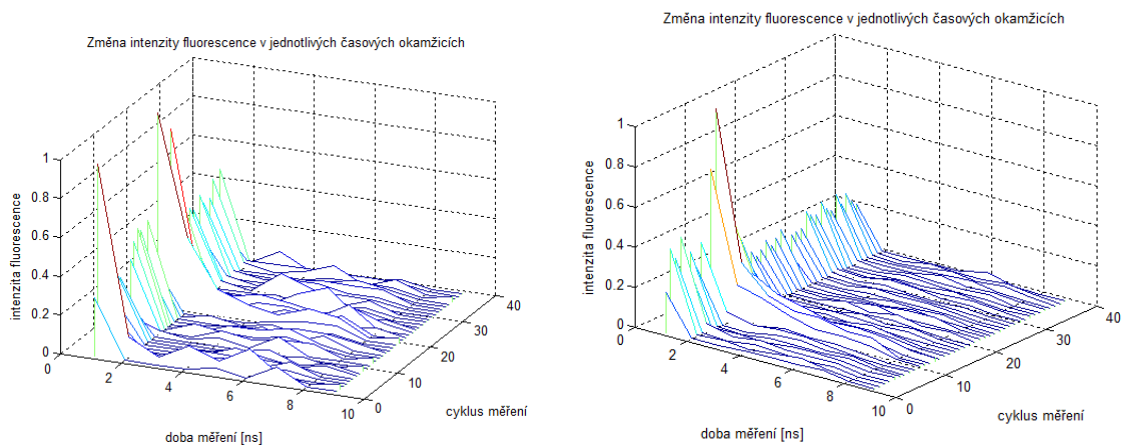


Obrázek 8.9: průběh maxima emisního spektra mezenchymálních kmenových buněk v a mimo buňku

Snímání fluorescence tohoto vzorku pomocí TimeGate, viz 2.5, vykazuje značné rozdíly mezi jednotlivými měřeními i prostředím. Nejvyšší hodnoty vykazuje fluorescence v druhém, osmnáctém a devatenáctém měření v buňce. Tyto měření vykazují snížení intenzity mezi počátkem měření a 4 ns o 80%. Ostatní cykly měření vykazují oproti nim o 60% menší intenzitu již v počátku. V těchto měřeních dojde k výraznému útlumu fluorescence po 1 ns.

Výsledky z okolí buňky vykazují nejlepší parametry v devátém, desátém a jedenáctém měření a k absolutnímu útlumu fluorescence u nich dochází po 8 ns. Mezi první a druhou na-

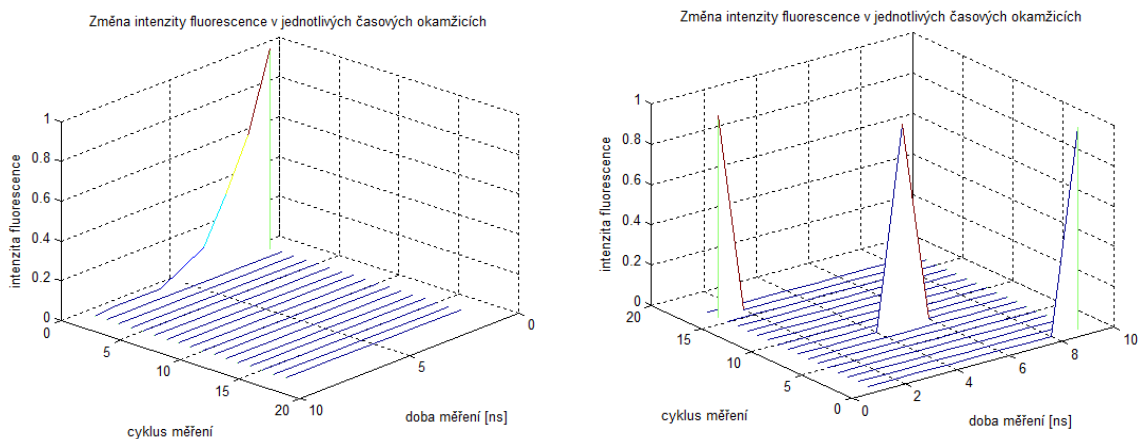
nosekundou dochází k 80% útlumu u zbylých měření. Ostatní snímání mají o 80% nižší hodnoty již na počátku měření a dále nevykazují žádnou výraznou fluorescenční činnost.



Obrázek 8.10: změna fluorescence mezenchymálních kmenových buněk v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni

Dle Obrázek 8.11 vykazuje prvním měření v buňce exponenciální pokles, který končí v 5 ns. Ve zbytku měření již není zřejmá žádná fluorescence. Vzhledem k tomu, že byla pozorována fluorescence pouze u prvního měření, došlo zřejmě k naprostému zničení použitého rhodaminu silným excitačním zářením. Dalším možným vysvětlení je, že se jednalo o velmi starý vzorek a fluorofor byl již chemicky degradován. Popřípadě byla jeho koncentrace na velmi nízké úrovni.

Výsledky získané z analýzy okolí buňky vykazují tři velmi odlišné fluorescenční oblasti a nejsou interpretovatelné.



Obrázek 8.11: změna fluorescence mezenchymálních kmenových buněk v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni

8.4 Srovnání buněk

Při hodnocení buněk zkoumaných buněčných kultur vykazují největší stabilitu ve vztahu buňky a jejího okolí mezenchymální buňky. Z výsledků je patrná minimální odchylka fluorescence mezi zkoumanými prostředími.

Nejstabilnější fluorescence ve vrstvách vzorku vykazovaly fibroblasty. Jejich rozložení fluorescence bylo stejné po dlouhou dobu.

Největší hodnoty emisních spekter mají mezenchymální kmenové buňky.

Nejstabilnější měření změny fluorescence v čase mají mezenchymální kmenové buňky. Naproti tomu nejdelší naměřená změna fluorescence v čase patří kardiomyocytům

9 Závěr

V diplomové práci byla vypracována rešerše z oblasti konfokální mikroskopie a metod měření doby života fluorescence v buněčné biologii. Proběhlo seznámení se s možnostmi využití laditelného laseru (WLL), funkcí TimeGate a Labda sken pro tvorbu spektrálního skenu, dostupných u konfokálního mikroskopu na UBMI.

Bylo pořízeno několik sérií snímků dlouhodobého pozorování fluorescence u kultury buněk fibroblastů, kardiomyocytů a mezenchymálních kmenových buněk. Získaná data byla prezentována

Byl vypracován programová část přizpůsobený pro zpracování dat získaných z mikroskopu značky Leica, který je na UBMI k dispozici. Program pro toto zpracování byl otestován na získaných datech.

Naměřená data byla zpracována pomocí vytvořeného programu. Z výstupů byl proveden rozbor parametrů jednotlivých experimentů. Z výsledků vyplývá, že největší stabilita fluorescence patří mezenchymálním kmenovým buňkám z důvodu jejich minimální odchylky mezi zkoumanými prostředími.

Nejstabilnější fluorescence ve vrstvách vzorku vykazovaly fibroblasty. Jejich rozložení fluorescence bylo stejné po dlouhou dobu. Největší hodnoty emisních spekter mají mezenchymální kmenové buňky. Nejstabilnější měření změny fluorescence v čase mají mezenchymální kmenové buňky.

Výsledky nejsou objektivní z důvodu malého počtu dat. Malý počet nasnímaných vzorků byl způsoben omezeným strojovým časem konfokálního mikroskopu a jeho odstávkou z důvodu poruchy. Dalším faktorem ovlivňujícím množství dat je fakt, že používané vzorky byly připravovány mimo UBMI.

Seznam použité literatury

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. Principles in Fluorescence Spectroscopy. 3th ed. New York: Plenum Press, 1993. IBSN – 13: 978-0387312781
- [2] GODMAN, Robert D., SPECTOR, David L. Live Cell Imagine: A Laboratory Manual. 2td ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. IBSN-13: 978-0879698935
- [3] Výukové materiály k přednáškám předmětu Mikroskopická zobrazovací technika
- [4] SEDLÁŘOVÁ, Michaela. Katedra botaniky: Konfokální mikroskopie. Dostupné z: <http://www.botanika.upol.cz/atlasy/confmicro/fluorochroms.php>
- [5] Výukové materiály k přednáškám předmětu Fyzika 2
- [6] ŠTOLL, Ivan. *Fyzika pro gymnázia: fyzika mikrosvěta*. 3., přeprac. vyd. Praha: Prometheus, c2002, 190 s. IBSN 80-719-6241-4.
- [7] PicoQuant. *Time-Resolved Fluorescence*. Dostupné z: <http://www.picoquant.com/applications/category/life-science/time-resolved-fluorescence>
- [8] LAPČÍK, Lubomír. *Fotochemické procesy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1989, 418 s. IBSN 80-050-0049-9.
- [9] University of Houston. *Leica Lambda Scan*. Dostupné z: <http://bbic.nsm.uh.edu/protocols/leica-lambda-scans>
- [10] Zpravodaj Čs. biologické společnosti, roč. 23 (2). ISSN 1805-9619.
- [11] 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.
- [12] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Přehled obecné histologie*. 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 127 s. IBSN 978-80-210-5543-8.
- [13] Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni. Dostupné z: <http://kmenova-bunka.webnode.cz/kmenove-bunky/adultni-kmenove-bunky/mesenchymalni-kmenove-bunky/>
- [14] PETRULA, J. *Možnosti systému FLIM v konfokální mikroskopii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 46 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vratislav Čmiel.
- [15] Leica microsystems. *Spectral Characterization of Images Leica TCS SP8 X*. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/details/product/leica-tcs-sp8-x/>
- [16] White Light Laser. *Leica microsystems*. Dostupné z: <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/white-light-laser/>
- [17] Science Direct. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326979290112K>
- [18] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001, 381 s. IBSN 80-902896-1-4.

- [19] LAO – průmyslové systémy, s.r.o. *Základní principy laseru a jejich dělení*. Dostupné z: <http://www.lao.cz/lao-info-49/serial-na-tema-lasery---zakladni-princip-laseru-a-jejich-deleni-127>
- [20] University of Alberta, Department of Oncology, Cross cancer institute. *Cell imaging facility*. Dostupné z: <http://www.graduate-studies-in-cancer-research.org/CIF/CIFequip3.htm>
- [21] Encyklopedie fyziky. *Fotonásobič*. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/747-fotonasobic>
- [22] Nikon. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/yfp/yfphyq/stains/yfpfitchistonehelacells.html>
- [23] Gate2Biotech. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/nanotechnologie-versus-rakovina/>
- [24] *Fluorescenční mikroskopie*. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescenci.htm>
- [25] Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc. *Fluorescenční barvivo*. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescenci%20barvivo.htm>
- [26] *Principy fluorescenční spektroskopie*. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [27] TERPETSCHING, Edward, Yevgen POVROZIN, John EICHORST. *Polarization Standard*. Dostupné z: http://www.iss.com/resources/research/technical_notes/PC1_PolarizationStandards.html
- [28] Patobiomechanika a Patokinesiologie KOMPENDIUM. *Vazivová tkáň*. Dostupné z: http://biomech.ftvs.cuni.cz/pbpk/kompendium/anatomie/tkane_pojive_vazivo.php

Seznam obrázků

Obrázek 2.1: schéma laserového konfokálního mikroskopu [3].....	9
Obrázek 2.2 filtry záření [24].....	10
Obrázek 2.3: stimulovaná emise [19].....	11
Obrázek 2.4: schéma laseru [19].....	12
Obrázek 2.5: akusticko-optický jev [3].....	13
Obrázek 2.6: skenovací systém [3].....	15
Obrázek 2.7: geometrie snímání vzorku [3].....	15
Obrázek 2.8: schéma snímání Nipkowovým diskem [20]	16
Obrázek 2.9: schéma fotonásobiče [21]	17
Obrázek 2.10: schéma lavinové fotodiody [3]	17
Obrázek 2.11: schéma hybridního detektoru [3].....	18
Obrázek 2.12: konfokální mikroskop Leica TCS SP8 s vybavením.....	18
Obrázek 2.13: ukázka výsledného emisního spektra pro konkrétní část prostoru	20
Obrázek 2.14: grafické prostředí pro dvoukanálové snímání.....	21
Obrázek 3.1: excitace a fluorescence [25]	22
Obrázek 3.2: zobrazení přechodů mezi energetickými hladinami [26].....	23
Obrázek 3.3: zobrazení symetrie excitačního a emisního spektra [1].....	25
Obrázek 3.4: spektrum atomu vodíku [21].....	26
Obrázek 3.5: fluoresceinem obarvená kultura buněk nádoru děložního hrdla [26]	28
Obrázek 3.6: excitační a emisní spektrum rhodaminu B [27].....	30
Obrázek 3.7: nanočástice [23].....	31
Obrázek 4.1: zobrazení ve FLIM v 2D modu [7].....	34
Obrázek 4.2: schématické znázornění zobrazení délky života za pomoci fáze [1].....	35
Obrázek 4.3: schématické znázornění měření doby života časovaným snímáním [1].....	35
Obrázek 5.1: fibroblasty (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 20x), zvětšenina	36
Obrázek 5.2: kardiomyocyty (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x).....	37
Obrázek 5.3: mezenchymální kmenové buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)	38
Obrázek 6.1 algoritmus snímání.....	39
Obrázek 6.2: fibroblasty (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 20x), upraveno.	40
Obrázek 6.3: kardiomyocyty buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)	41
Obrázek 6.4: kmenové mezenchymální buňky (konfokální mikroskop, transmisní kanál, zvětšení 63x)	41
Obrázek 6.5: emise fluorescence kmenových mezenchymálních buněk na vlnových délkách a) 550, b) 600, c) 650 a d) 700 nm	42

Obrázek 6.6: změna fluorescence ve čtyřech po sobě jdoucích vrstvách vzorku fibroblastů (konfokální mikroskop, zvětšení 20x).....	43
Obrázek 6.7: změna fluorescence v několika vrstvách vzorku mezenchymálních buněk (konfokální mikroskopie, zvětšení 63x).....	44
Obrázek 6.8: změna fluorescence mezenchymálních kmenových buněk po vypnutí laserové zdroje.....	45
Obrázek 7.1: vývojový diagram programového řešení	48
Obrázek 7.2: změna emisního spektra kultury fibroblastů.....	50
Obrázek 7.3: křivka maxima emisního spektra fluorescence fibroblastu v průběhu experimentu.....	50
Obrázek 7.4: změna intenzity fluorescence ve fibroblastech v několika vrstvách.....	51
Obrázek 7.5 dialogové okno pro vyhledání dat.....	51
Obrázek 7.6: chybová hláška	52
Obrázek 7.7: dotazovací okno pro oblast zájmu	52
Obrázek 7.8: okno pro určení oblasti zájmu	52
Obrázek 7.9: vymezený prostor kultury fibroblastu obsahujícího buňku	53
Obrázek 8.1: změna emisního spektra v časovém horizontu v buňce a mimo buňku.....	54
Obrázek 8.2: průběh vrcholu emisního spektra v a mimo buňku fibroblastu	55
Obrázek 8.3: fluorescence fibroblastu v rámci vrstev v buňce a mimo buňku	55
Obrázek 8.4: změna emisního spektra kultury fibroblastu vně a uvnitř buňky.....	56
Obrázek 8.5: průběh vrcholu emisního spektra v a mimo buňku fibroblastu	56
Obrázek 8.6: změna fluorescence v kultuře fibroblastu ve vrstvách vzorku v čase v buňce a mimo ni	57
Obrázek 8.7: změna fluorescence kardiomyocytů v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni	57
Obrázek 8.8: emisní spektrum kultury mezenchymálních buněk v a mimo buňku	58
Obrázek 8.9: průběh maxima emisního spektra mezenchymálních kmenových buněk v a mimo buňku.....	58
Obrázek 8.10: změna fluorescence mezenchymálních kmenových buněk v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni.....	59
Obrázek 8.11: změna fluorescence kardiomyocytů v čase v rámci několika vrstev v buňce a mimo ni	59

Přílohy

Obrázky – TimeGate
Katerina_Trnova_DP
mereni