



# Vizualizace biologických vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie

## Bakalářská práce

*Studijní program:* B3944 – Biomedicínská technika  
*Studijní obor:* 3901R032 – Biomedicínská technika  
*Autor práce:* **Nikola Bulířová**  
*Vedoucí práce:* Ing. Iveta Danilová





# Visualization of biological samples by the fluorescence microscopy

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3944 – Biomedical Technology  
*Study branch:* 3901R032 – Biomedical Technology

*Author:* **Nikola Bulířová**  
*Supervisor:* Ing. Iveta Danilová



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola Bulířová**  
Osobní číslo: **D17000160**  
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**  
Studijní obor: **Biomedicínská technika**  
Název tématu: **Vizualizace biologických vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie**  
Zadávací katedra: **Fakulta zdravotnických studií**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Úkolem bakalářské práce je seznámit se s principem a ovládním fluorescenčního mikroskopu. Budeme se snažit vyvinout metodu pro vizualizaci pomocí mikroskopie. Cílem bude také seznámit se s různými druhy fluorescenčních filtrů a osvojit si postupy navazování fluorescenčních barviv na biologické materiály. Vizualizovány budou pomocí obarvení fluorescenčními barvami různé druhy biologických látek vyvíjených na naší univerzitě (např. nanovlákná s imobilizovanými biomolekulami). Zkoumány budou také biologické vzorky, které samy o sobě vykazují fluorescenční aktivitu, a také vybrané druhy bakteriálních kmenů.

Fluorescenční mikroskop se řadí mezi nejkvalitnější zobrazovací techniky. Díky fluorescenčním barvám, které mohou být zvoleny tak, aby se navazovaly vždy pouze na zkoumanou strukturu (protein, antibiotikum) je to velmi přesná analyzační metoda. Pomocí tohoto druhu optického mikroskopu je možné zobrazit velmi podrobně struktury, které není možné zobrazit pomocí jiných metod, přitom obrazová analýza nově vyvíjených vzorků je ve vědě velmi důležitá.

Cílem praktické části bakalářské práce je osvojení si velmi náročné obsluhy fluorescenčního mikroskopu a obrazová analýza nanovláken s imobilizovanými biomolekulami, které buď vykazují samy o sobě fluorescenční aktivitu, nebo budou barveny pomocí fluoroforů. Předpokládá se výběr různých druhů vzorků a provedení jejich rozsáhlé analýzy. Bude zvoleno větší množství různých druhů biologických vzorků a testováno více druhů fluoroforů o odlišné koncentraci. Vzorky budou analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu LEICA DM6000B za pomoci vhodných fluorescenčních barviv a vyhodnocení bude provedeno pomocí obrazové analýzy snímků.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy: **50 - 70**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce:

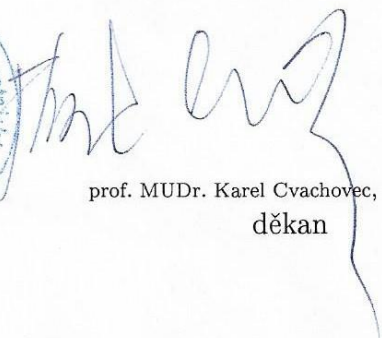
**Ing. Iveta Danilová**

Fakulta zdravotnických studií

Datum zadání bakalářské práce: **28. dubna 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2018**



  
prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA  
děkan

V Liberci dne 30. listopadu 2017



## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

- KREMER, Bruno P. Mikroskop zcela jednoduše: preparace, barvení i digitální mikrofotografie krok za krokem. Praha: Aventinum, 2013. Fotografické atlasy. ISBN 978-80-7151-372-8.
- ŠLAMBOŘOVÁ, I., ZAJÍCOVÁ, V., EXNAR, P. a STUDNIČKOVÁ, J. Nanovláknenná struktura s imobilizovaným organickým agens a způsob její výroby [patent]. Udělen dne 9. 5. 2013 pod číslem 303911.
- MU, Haibo, Amin ZHANG, Lin ZHANG, Hong NIU a Jinyou DUAN. Inhibitory effects of chitosan in combination with antibiotics on *Listeria monocytogenes* biofilm. *Food Control*. 2014, 38, 215-220. DOI 10.1016/j.foodcont.2013.10.032. ISSN 09567135.
- HICKOK, Noreen J. a Irving M. SHAPIRO. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, 64(12), 1165-1176. DOI 10.1016/j.addr.2012.03.015. ISSN 0169409x.
- HOŠEK, Jan. Úvod do nanotechnologie. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8.
- DRUMMEN, Gregor. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques Illuminating Biological and Biomedical Research. *Molecules* [online]. 2012, 17(12), 14067-14090 [cit. 2017-04-27]. DOI 10.3390/molecules171214067. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/12/14067/>
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana a Josef TRÖGL. Standardní postupy environmentální mikrobiologie: návody úloh a laboratorní cvičení. Ústí nad Labem: Univerzita J.E. Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta životního prostředí, 2014. ISBN 978-80-7414-817-0.
- ROSINA, Jozef. Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3.
- DRBOHLAVOVÁ, Jana. Nanomateriály pro biomedicínské aplikace: Nanomaterials for biomedical applications: zkrácená verze habilitační práce. Brno: VUTIUM, 2015. ISBN 9788021452855.
- ŠTERN, Petr. Nové trendy v imunochemii. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2016, 24(4), 164-169. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=casopisy-kbm-casopisy-kbm-archiv>
- BURDÍKOVÁ, Zuzana a Zdeněk ŠVINDRYCH. Biologické vzorky zobrazované konfokální a dvoufotonovou mikroskopií. *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*. 2011, 52(1), 23-32. ISSN 0009-0646.
- RIMPELOVÁ, Silvie a Tomáš RUMML. Od mikroskopie k nanoskopii. *Bioprospect*. 2014, 24(4), 83. ISSN 1210-1737. Dostupné také z: <http://bts.vscht.cz/?q=node/19>
- SEHADOVÁ, H., J. NEBESÁŘOVÁ a R. KAŇA. Mikroskopy v rukou biologů. *Vesmír*. 2015, 94(6), 348-351. ISSN 0042-4544. Dostupné také z: <http://casopis.vesmir.cz/>

Vážená paní  
**Nikola Bulířová**  
Sobákov 19  
463 43 Český Dub

Vyřizuje/linka: Holá/485 353 738


V Liberci dne 4.5.2018  
č.j.18/8515/019904

**Vyjádření k žádosti o ponechání zadání a prodloužení termínu odevzdání bakalářské práce**

Vážená paní Bulířová,

na základě Vaší žádosti ze dne 30.4.2018, zaevidované pod č.j.: 18/8515/019562, Vám sděluji, že **souhlasím** s ponecháním zadání bakalářské práce a s prodloužením termínu odevzdání do 30.4.2019.

S pozdravem

  
prof. MUDr. Karel Cvachovec, CSc., MBA

děkan

**Technická univerzita v Liberci**  
Fakulta zdravotnických studií  
Studentská 2, 461 17 Liberec 1



## Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 29. 6. 2018

Podpis:



## **Abstrakt**

**Autor:** Nikola Bulířová

**Instituce:** FZS – Biomedicínská technika

**Název práce:** Vizualizace biologických vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie

**Vedoucí práce:** Ing. Iveta Danilová

**Počet stran:** 62

**Rok obhajoby:** 2018

**Anotace:** V této bakalářské práci se snažíme osvojit si velmi náročnou obsluhu fluorescenčního mikroskopu. Teoretická část spadá převážně do oblasti fotochemie, fluorescence a mikroskopie. Naším cílem je osvojit si postupy navazování fluorescenčních barviv na biologické materiály. Snažíme se vizualizovat především biologické látky vyvíjené naší univerzitou (např. nanovlákná s imobilizovanými biomolekulami aj.). Zkoumáme také vzorky, které samy o sobě vykazují fluorescenční aktivitu a vizualizujeme je pomocí fluorescenčního mikroskopu LEICA DM6000B a spektroskopu Biotek Synergy HT.

**Klíčová slova:** fluorescence, mikroskopie, spektroskopie, fluorescenční barvy, nanovlákná



## **Abstract**

**Author:** Nikola Bulířová

**Institution:** FZS – Biomedical technology

**Title:** Visualization of biological samples by the fluorescence microscope

**Supervisor:** Ing. Iveta Danilová

**Pages:**62

**Year:** 2018

**Annotation:** The bachelor thesis is concerned in complicated operations of the fluorescence microscope. The theoretical part is focused on photochemistry, fluorescence and microscopy. Our main goal is to learn how to effectively bond dyes to biological materials. We try to visualize especially biological substances developed by our university (eg nanofibers with immobilized biomolecules, etc.). We also research samples that themselves exhibit fluorescence activity. We visualize samples using a LEICA DM6000B fluorescence microscope and a spectroscope Biotek Synergy HT.

**Keywords:** fluorescence, microscopy, spectroscopy, fluorescent colors, nanofibers

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Ivetě Danilové za odborné vedení mé bakalářské práce, za vstřícnou spolupráci a za poskytnutí cenných rad. Rovněž bych chtěla poděkovat za možnost využití fluorescenčního mikroskopu a spektroskopu v laboratoři FZS, a také za možnost spolupráce s Ústavem pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, kde mají jiný typ fluorescenčního mikroskopu. Dále děkuji své rodině, kamarádům, příteli a všem, kteří to semnou nevzdali při psaní práce, za podporu.

# Obsah

Seznam použitých zkratk	13
1 ÚVOD	14
2 TEORETICKÁ ČÁST	15
2.1 Fotochemie	15
2.1.1 Světlo	15
2.1.1.1 Vlnový charakter	15
2.1.1.2 Elektromagnetické spektrum	16
2.1.1.3 Částicový charakter	17
2.1.2 Zákony fotochemie	18
2.1.3 Luminiscence	19
2.1.3.1 Rozdělení luminiscence	19
2.1.3.2 Fotoluminiscence	20
2.1.3.3 Excitovaný stav a jeho vlastnosti	21
2.1.3.4 Zhasínání excitovaných stavů	22
2.1.4 Fluorescence	24
2.1.4.1 Základní zákonitosti fluorescence a jejího spektra	24
2.1.4.1.1 Stokesův posun	24
2.1.4.1.2 Excitační a emisní pásmo	26
2.1.4.2 Fluorofory	27
2.1.4.2.1 Fluorescein – FITC	27
2.1.4.3 Měření fluorescence	28
2.1.4.4 Fluorescenční mikroskopie	29
2.1.4.4.1 Fluorescenční mikroskop	30
3 PRAKTICKÁ ČÁST	31
3.1 Cíle a výzkumné předpoklady	31
3.2 Použitý materiál a pomůcky	32
3.3 Druhy analýz praktické části	32
3.3.1 Měření a vizualizace aktivních aminoskupin po reakci křemičitých nanovláken s APTES	32

3.3.2 Imobilizace proteolytických enzymů na nanovláknna a analýza aktivity enzymů pomocí casein-FITC .....	46
3.3.3 Vizualizace širokospektrého antibiotika tetracyklinu .....	48
3.3.4 Vizualizace bakterií v kalu .....	50
4 Návrh a doporučení pro praxi .....	53
5 Závěr .....	54
Seznam použité literatury .....	56
Seznam obrázků.....	59
Seznam tabulek .....	61
Seznam grafů .....	62



## Seznam použitých zkratek

f	Frekvence
$\lambda$	Vlnová délka
c	Rychlost světla ve vakuu
E	Energie částic
h	Planckova konstanta
$k_r$	Rychlostní konstanta
nm	Nanometr
tyr	Tyrozín
phe	Fenylalanin
try	Tryptofan
UV	Ultraviolet
RTG	Rentgen
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
FITC	Fluorescein-5- isothiokyanát
TRITC	Tetrametylrhodaminizothiokyanát
DNS-Cl	Dansyl chlorid
LCD	Liquid crystal display (displej z tekutých krystalů)
IPA	Isopropylalkohol
DV	Destilovaná voda
EtOH	Ethanol
NaOH	Hydroxid sodný
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
RFU	Relativní fluorescenční jednotka
TCA	Kyselina trichloroctová

# 1 ÚVOD

Fluorescence spadá do fotochemie, která byla objevena na konci 19. století. Spadá do oblasti luminiscence, která je založena na emisi světla z látky. Fluorescenci můžeme také nazvat jakýmsi fyzikálním jevem, při kterém jsou molekuly některých látek schopny absorbovat záření světla o určité vlnové délce (excitace) a poté ho následně emitovat. Fluorescence probíhá při vlnových délkách na úrovni viditelného a ultrafialového záření. Emitované a absorbované světlo mají rozdílné vlnové délky a energie.

Bakalářská práce poukazuje na téma vizualizace biologických vzorků pomocí fluorescenční mikroskopie. Fluorescenční mikroskop využívá jevu fluorescence, což je druh luminiscence, která spadá do oboru fotochemie, a proto se teoretická část převážně zabývá vlnovým a částicovým charakterem světla a přiblížením principu vzniku fluorescence popř. jeho využitím v zobrazování biologických vzorků. V této části je tedy zahrnuta fotochemie, fluorescence a fluorescenční mikroskopie.

Fluorescenční mikroskopie je v dnešní době velmi rozšířená jak v rostlinné, tak živočišné histologii a buněčné imunologii. Usilovný rozvoj v minulých i současných letech přináší stále nové postupy pro určování struktur nebo molekul.

V praktické části je bližší seznámení s nanovlákný, které jsou vyvíjeny naší univerzitou, v neposlední řadě také práce s velkým množstvím chemických látek a především s fluorescenčním mikroskopem.

Fluorescenční mikroskop se řadí mezi nejkvalitnější zobrazovací techniky. Díky fluorescenčním barvám, které mohou být zvoleny tak, aby se navazovaly vždy pouze na zkoumanou strukturu, je to velice přesná analyzační metoda. Pomocí tohoto druhu optického mikroskopu je možné zobrazit velmi podrobně struktury, které není možné zobrazit pomocí jiných metod.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fotochemie

Fotochemie je oblastí chemie, studující chemické reakce a fyzikální změny, které mohou být způsobeny vzájemným působením mezi látkou a zářením. Od ostatních chemických vědních oborů se liší především tím, že studuje vlastnosti částic, nikoli v základních elektronových stavech, ale ve stavech excitovaných – s vyšší energetickou hladinou. Základní princip fotochemie je tedy absorpce světla - fotonu látkou a následná reakce popř. změna elektronového stavu molekuly. Základní zákony fotochemie byly zformulovány až v 19. a 20. století. Fotochemie, jakožto mnohostranný vědní obor využívá poznatky nejen chemie a fyziky, ale i biologie, medicínských věd a věd o životním prostředí. [1] [2]

#### 2.1.1 Světlo

Světlo je pro nás velice důležitou formou energie. Jedná se o elektromagnetické záření viditelné okem. Díky světlu máme šanci vidět předměty, které vyzařují, nebo odráží, pohltí nebo propustí světelné záření. Člověk dokáže získat okolo 90% všech informací pomocí zrakového aparátu, resp. pomocí světla. Lidská bytost si tak úplně nedokáže představit, jak by mohlo světlo vypadat, a proto mu přidělujeme 2 charaktery. Jedná se o tzv. vlnový a částicový charakter. [3]

##### 2.1.1.1 Vlnový charakter

Již v roce 1865 J. C. Maxwell odvodil teorii, která říká, že světlo je jedna z forem elektromagnetické energie, která se šíří v podobě vln. Tuto teorii popsal jako oscilaci elektrické a magnetické složky, které jsou na sebe kolmé. Můžeme říci, že všechny typy elektromagnetického záření např. rádiové vlny, infračervené paprsky, gama záření aj. se pohybují v podobě vln a ve vakuu o rychlosti světla. Tato teorie světla vedla k vysvětlení různých vlastností např. odrazu, polarizaci nebo lomu světla. [4]

Vlnová délka je dána podílem rychlosti světla ve vakuu a frekvencí. [5] Vztah mezi těmito dvěma veličinami je popsán rovnicí 1.

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad \text{Rovnice 1 [9, str. 1034]}$$

Rovnice 1:  $\lambda$  = vlnová délka [m],  $c$  = rychlost světla ve vakuu [ $c=3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]  
 $f$  = frekvence [ $\text{s}^{-1}$ ]

### 2.1.1.2 Elektromagnetické spektrum

Elektromagnetické spektrum zahrnuje záření o všech možných vlnových délkách a frekvencích. Přesto, že je dělení docela přesné, může docházet k překrytí sousedních druhů.

Rádiové vlny mají vlnovou délku v rozmezí kilometrů až metrů. Zdrojem tohoto záření je elektromagnetický oscilátor a využívá se např. v rádiovém či televizním signálu, mobilních telefonech, nebo radiokoagulaci.

Mikrovlnné záření má vlnovou délku v rozmezí metru až mikrometrů. Zdrojem záření je magnetron a využívá se např. k ohřívání v mikrovlnné troubě, při léčbě nádorů nebo pro bezdrátovou komunikaci zvanou Wi-Fi.

Rozpětí vlnových délek infračerveného záření je v řádu mikrometru až cca 760 nm. Zdrojem tohoto záření je infrazářič a využití nachází v dálkových ovládacích, mobilních telefonech nebo např. lymfatickém odvodňování.

Částí spektra, na kterou je citlivé lidské oko, nazýváme viditelné světlo. Toto záření má vlnovou délku v rozmezí 400-800 nm. Viditelné záření má duální charakter, což znamená, že se chová jako částice i jako vlnění. Využití nachází např. ve fotosyntéze, LCD obrazovkách nebo mikroskopech.

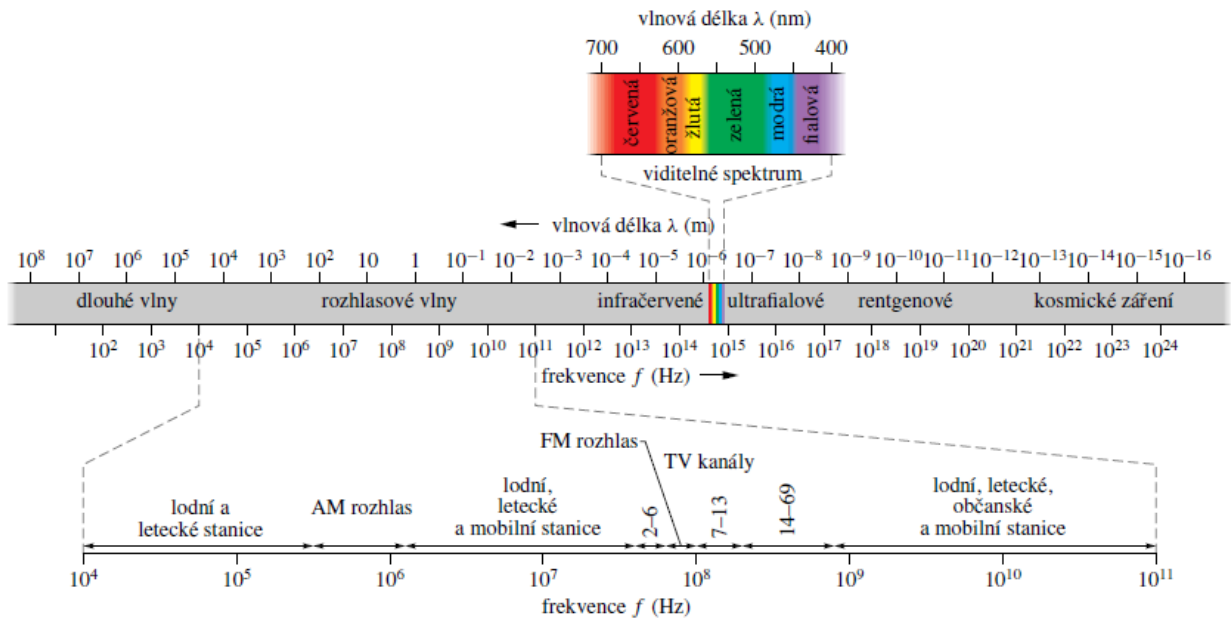
Ultrafialové záření je v rozpětí 400-10 nm. Zdrojem jsou hvězdy (Slunce) nebo třeba výboje v plynu. Při dopadu na určité látky se mění na světlo viditelné. Ve vyšších dávkách způsobuje zhnědnutí nebo dokonce rakovinu kůže. V medicíně se UV záření využívá při sterilizaci přístrojů v nemocnicích.



Rentgenové záření je v rozmezí 10 nm – 1 pm. Zdrojem tohoto záření je rentgenka a využívá se například při léčbě nádorů nebo v antropologii. RTG záření je nebezpečné pro lidský organismus, proto je vhodné používat stínící prvky.

Gama záření, které vzniká při radioaktivních a jiných jaderných dějích. Vlnové délky u tohoto záření přesahují 1 pm. Využití v neurochirurgii.

Na Obrázku 1 vidíme elektromagnetické spektrum, které popisuje všechny typy záření – dané oblasti, jejich frekvence a vlnové délky.



Obrázek 1 *Elektromagnetické spektrum* [9, str. 890]

### 2.1.1.3 Částicový charakter

Počátkem 20. století zavedl Max Planck teorii, která popisuje světlo jako jisté množství energie, tzv. světelné kvantum. Světelné kvantum nám říká, v jaké energetické hladině může částice existovat. Částice, která může existovat v určité velikosti energetické hladiny, se nazývá foton. Velikost energie fotonu můžeme vyjádřit vztahem v Rovnici 2.

$$E = h \cdot f \quad \text{Rovnice 2 [9, str. 1034]}$$

Rovnice 2:  $E = \text{energie částice [J]}$ ,  $h = \text{Planckova konstanta [} h = 6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s]}$ ,  
 $a \cdot f = \text{frekvence záření [s}^{-1}\text{]}$

Foton se vyznačuje jako stabilní částice s nulovou klidovou hmotností a nulovým elektrickým nábojem. Energie je přímo úměrná frekvenci, jak vyplývá ze vzorce. Díky tomu, že se elektromagnetické záření pohybuje rychlostí světla, se i foton musí pohybovat stejnou rychlostí. energii, kterou nese foton, lze emitovat nebo absorbovat s interakcemi jiných částic. Touto teorií se poté více zabývá kvantová fyzika.[5] [6]

### 2.1.2 Zákony fotochemie

Mezi základní fotochemické zákony můžeme zařadit dva zákony – kvalitativní a kvantitativní. První fotochemický zákon zformulovali na počátku 19. století chemici Theodor von Grotthuss a John Draper. Kvalitativní zákon Grotthuss-Draperův říká, že fotochemicky aktivní je pouze takové záření, které je soustavou absorbováno.

Druhý fotochemický zákon upřesňuje platnost prvního, který na základě kvantové teorie odvodili Johannes Stark a Albert Einstein. Tento kvantitativní zákon se tedy nazývá Stark-Einsteinův, ale častěji bývá nazýván Fotochemický zákon ekvivalence. Zákon říká, že počet částic podílejících se na primárním fotochemickém ději se rovná počtu absorbovaných fotonů. Jeden foton může tedy excitovat pouze jedinou částici.

*„Počet aktivovaných molekul se rovná počtu absorbovaných světelných kvant.“*

Dalším důležitým zákonem je zákon o zachování energie, který nám říká, že ve všech izolovaných systémech můžeme energii transformovat z jednoho určitého druhu na jiný, ale nemůže být úplně zničena nebo vytvořena. [2] [5]

Mezi základní fotochemické veličiny můžeme zařadit čtyři parametry vyjadřující fotochemickou reaktivitu – rychlostní konstanta dezaktivace, prahová energie, kvantový výtěžek a doba životnosti excitovaných částic. *Rychlostní konstanta  $k$*  je kinetická veličina, kterou můžeme definovat stejně jako termické procesy. *Kvantový výtěžek  $\Phi_i$*  je kineticko-statistická veličina, míra účinnosti dezaktivace excitovaných částic  $i$ -tým dějem. Veličina je rovna podílu množství molekul vzniklých produktů a počtu absorbovaných kvant záření. Excitovaná částice se musí vždy dezaktivovat. *Doba životnosti  $\tau$*  je průměrná doba excitovaných částic. *Prahová energie  $E_{th}$*  je kvazi-termodynamická veličina vyjadřující nejmenší energii fotonů, jejichž absorpce ještě způsobí příslušný dezaktivací proces. [1]

### 2.1.3 Luminiscence

Luminiscence byla poprvé definována již v roce 1889 E. Wiedemannem. Pár drobných úprav zavedl A. M. Gurvič, a díky nim můžeme luminiscenci definovat jako spontánní záření určitého tělesa, představující přebytek nad teplotním zářením, které můžeme charakterizovat jako doznávání, jehož doba trvání převyšuje periodu světelných kmitů. [3]

Látka, která je schopna absorbovat záření o určité vlnové délce se nabudí do stavu s vyšší energetickou hladinou, tzv. excitovaného stavu. Tento vyšší energetický stav je ale nestabilní, dodaná energie se po určité době vyzáří zpět ve formě elektromagnetického záření. Přitom platí, že doba života excitovaného stavu je delší, než perioda světelných kmitů  $\tau = 10^{-15}$ s. Menší energie atomu má větší vlnovou délku.

Luminiscence tedy vzniká excitací atomu působením jiného záření, elektronů apod., a následným návratem atomu do základního stavu, čímž dochází k vyzáření fotonu. Luminiscenci určité látky lze tedy pozorovat po jejím ozáření jiným zdrojem záření. Pokud po odstranění zdroje ozařování látky luminiscence vymizí (v řádu nanosekund), hovoříme o fluorescenci. Pokud luminiscence přetrvává i po odstranění zdroje ozařování, jedná se o fosforescenci. [7]

Většina organických látek je schopna vykazovat luminiscenci neboli světélkování. Nositelem tohoto luminiscenčního záření je molekula. Luminiscenční záření může také vznikat u anorganických látek, záření ale není zapříčiněno molekulou, nýbrž shlukem atomů, tzv. krystalů. [7]

#### 2.1.3.1 Rozdělení luminiscence

Luminiscenci můžeme dělit dle způsobu, jakým je dodávána excitační (budící) energie a také doba, za kterou se atom vrací do svého základního stavu.

Fotoluminiscence – druh luminiscence, ke kterému dochází po ozáření jiným zdrojem záření – neionizujícím elektromagnetickým zářením (např. v případě žárovky), excitační energie je v tomto případě dodávána formou viditelného nebo ultrafialového záření. [5]

Elektroluminiscence – luminiscence je zde vyvolána elektrickým polem nebo průchodem elektrického proudu látkou (např. elektroluminiscenční fólie

nebo LED). Nejvhodnějšími látkami jsou až na pár výjimek polovodiče se širokým zakázaným pásmem.

Chemiluminiscence – luminiscence je v tomto případě vyvolána nějakou chemickou reakcí. Existuje pouze pro určitý typ exotermních chemických reakcí, kdy je uvolněné teplo nebo určitá jeho část vyzářena formou světla. Do tohoto typu patří i bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organismy.

Mezi další typy patří katodoluminiscence (dopadající elektrony), termoluminiscence (vzrůst teploty po předchozím dodání energie), radioluminiscence (působení ionizujícího záření) nebo triboluminiscence, která je vyvolána působením tlaku atd. [3]

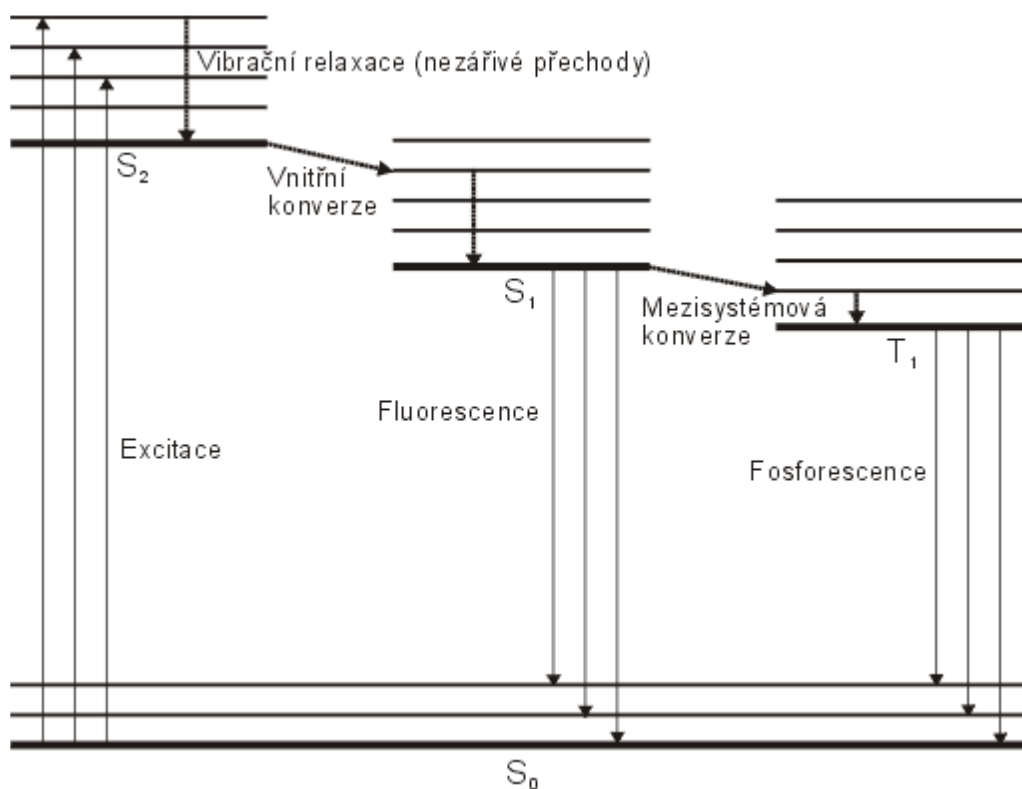
Z hlediska využití je nejdůležitější fotoluminiscence, která nachází své užití v analytické chemii (ke kvantitativnímu a kvalitativnímu určení látek), biochemii atd. Široké využití našla také v optoelektronice (luminiscenční diody, stínítka obrazovek apod.) nebo v lékařství (luminiscenční sondy a značky).

Látky, u kterých nastává luminiscence, se označují jako luminofory. Jsou to především pevné látky s příměsí vytvářejícími tzv. luminiscenční centra. [3] [5]

### **2.1.3.2 Fotoluminiscence**

Fotoluminiscence je tedy druh luminiscence, ke kterému dochází po ozáření jiným zdrojem záření. Excitační energie je dodávána formou viditelného nebo ultrafialového záření. Dochází k interakci fotonu o frekvencích těchto záření s částicí a dochází k předání energie valenčním elektronům molekuly. Častý výskyt fotoluminiscence je u organických molekul s dvojnými vazbami (např. aromatické uhlovodíky). Absorpce je z velké části závislá na skupenství a struktuře látky, ale může být i na teplotě, pH a dalších faktorech prostředí. Valenční elektrony využívají dodanou energii jako možnost dostat se na vyšší hladiny do tzv. excitovaného stavu. V tomto stavu nevydrží dlouho, a proto mají relativně krátkou dobu životnosti a dochází k návratu do tzv. základního stavu. Shrnutí průběhu těchto procesů nám vysvětluje Jablonského diagram na Obrázku 2. [5] [8]





Obrázek 2 Jablonského diagram znázorňující energetické hladiny a energetické přechody molekuly [8]

Obrázek 2:  $S_0$  – základní stav;  $S_1$ ,  $S_2$  – excitované singletové stavy;  $T_1, T_2$  – excitované tripletové stavy

Jablonského diagram znázorňuje energetické hladiny a energetické přechody molekuly. Tento schematický diagram nese jméno po profesoru Alexandru Jablonském, který je považován za otce fluorescenční spektroskopie. [8]

### 2.1.3.3 Excitovaný stav a jeho vlastnosti

V základním stavu  $S_0$  dochází při absorpci jednoho fotonu molekulou k excitaci jednoho valenčního elektronu do nejbližšího volného orbitalu s vyšší energií, do tzv. excitovaných stavů. Existují dva druhy těchto stavů:

- a) *singletový stav* – označujeme  $S_1$  – tento stav je charakterizovaný energií  $E_S$ , kde spiny obou elektronů jsou antiparalelní; Stavy  $S_2, S_3$  jsou charakterizovány relaxací v krátkém čase nezářivými pochody do stavu  $S_1$ .

- b) *tripletový stav* –  $T_1, T_2$  – tento stav je charakterizovaný energií základního stavu  $E_T$ , kde spiny obou elektronů jsou paralelní. Stavy  $T_2, T_3$  atd., jsou charakterizovány relaxací v krátkém čase nezářivými pochody do stavu  $T_1$ . Ze stavu  $S_1$  je tripletový stav získán mezisystémovým zakázaným přechodem.

Tvar molekuly v excitovaném stavu může být úplně odlišný než ve stavu základním. Toto je způsobeno rozdílnou elektronovou konfigurací. Elektron je před excitací umístěn v určitém orbitalu např.  $1s$  a po excitaci je přesunut do orbitalu jiného např.  $2p$ . Tento nový orbital má jiný tvar a symetrii. Elektronová konfigurace způsobí hybridizaci atomů v excitovaných stavech a je doprovázena změnou délky vazeb nebo rozložení elektronové hustoty v atomu. [5]

### 2.1.3.4 Zhasínání excitovaných stavů

Jak už bylo dříve zmíněno, doba životnosti excitovaných molekul je opravdu krátká, protože dochází ke zpětné emisi získané energie absorpcí, tzv. zhasínání excitovaných stavů. Jinak řečeno dochází k přechodu ze stavu excitovaného do stavu základního. Emise může mít různé formy projevu:

- a) *zářivé přechody* – v tomto přechodu excitované molekuly přechází z vyššího energetického stavu do nižšího, díky tomu, že vyzařují energii formou fotonu. Existují 2 typy emisí – samovolná (spontánní) a stimulovaná. Spontánní emise vzniká, když k vyzáření dojde bez účinku vnějšího zdroje záření. U stimulované emise dochází k tomu, že účinkem vnějšího elektromagnetického záření, které vstupuje do excitované molekuly a vyvolává elektromagnetickou poruchu molekuly, která vede k vyzáření energie formou fotonu o stejné frekvenci, jako dopadající vnější elektromagnetické záření. Přechod molekuly z excitovaného singletového stavu  $S_1$  do základního stavu  $S_0$  je dovolený emisní proces, který můžeme charakterizovat rychlostní konstantou  $k_f = 10^6-10^7 \text{ s}^{-1}$ . Tento přechod je nazýván *fluorescence*. Přechod molekuly z excitovaného tripletového stavu  $T_1$  do základního stavu  $S_0$  je zakázaný emisní proces, který charakterizujeme konstantou  $k_p = 10^{-2}-10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Tento přechod nazýváme *fosforescence*. Pokud molekula ve stavu  $T_1$  absorbuje tepelnou energii, přejde do stavu  $S_1$  a následuje fluorescenční přechod do  $S_0$ , tak se tomuto stavu se říká

*zpožděná termická fluorescence* neboli *zabrzděná fluorescence* – mnohem pomalejší přechod na základní hladinu. Pokud je délka vlny absorbovaného záření stejná jako délka vlny emitovaného záření, tomuto stavu se říká *rezonanční fluorescence*.

- b) *nezářivé přechody* – tyto přechody se mohou vyskytovat mezi vibračně-rotacími hladinami. Energie systému se nemění, a proto vůbec nedochází k emisi záření. Dovolený přechod mezi stavy se stejnou spinovou multiplicitou, např.  $S_1 \rightarrow S_2$  můžeme charakterizovat rychlostní konstantou  $k_{ic}$ . Tento přechod nazýváme *vnitřní konverze*. Zakázaný přechod v tomto případě přechod mezi excitovanými stavy s rozdílnou multiplicitou, např.  $S_1 \rightarrow T_1$ , můžeme charakterizovat rychlostní konstantou  $k_{isc}$ . Tento *přechod* se nazývá *mezisystémový*. Poslední přechod z vyšších vibračních stavů do stavu základního za uvolnění tepla se nazývá *vibrační relaxace*.
- c) *fotochemické reakce* – zde dochází ke změnám látky [5]

Nyní shrneme Jablonského diagram z informací, které jsou již popsány. Po absorpci světelného kvanta budícího záření přechází elektrony ze základního stavu  $S_0$  do excitovaných singletových stavů  $S_1, S_2, \dots$  a tripletových stavů  $T_1, T_2, \dots$  molekula obvykle přechází z rovnovážné vibrační hladiny základního stavu  $S_0$  do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď zářivými přechody (luminiscence) nebo nezářivými přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze a vibrační relaxace). Doba trvání jednotlivých procesů je pro absorpci řádově  $10^{-15}$  s, pro fluorescenci cca  $10^{-8}$  s, pro fosforescenci je mnohem delší než  $10^{-8}$  s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci  $10^{-12}$ - $10^{-13}$  s, pro vnitřní konverzi  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  s, pro mezisystémovou konverzi  $10^{-4}$ - $10^{-12}$  s.

Fluorescenci můžeme nazvat jako spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . [5]

## 2.1.4 Fluorescence

Fluorescence je fyzikální jev, který můžeme zařadit mezi tzv. luminiscenční jevy, které jsou charakteristické emisí záření z určité látky. Látky, které jsou schopné fluorescence, nazýváme fluorofory. Jedná se o látky, které dokážou emitovat elektromagnetické záření převážně z oblasti viditelného světla popř. ultrafialového světla. Emise záření může nastat jako odezva na dodání daného množství energie, kterou je určitý fluorofor schopný absorbovat a poté část přijaté energie postupně vyzářit po časový úsek do svého okolí. Tento čas emise nazýváme jako délka dohasínání fluoroforu - doba dosvitu, která se po ukončení excitace pohybuje v řádech  $10^{-6}$  až  $10^{-9}$  s.

Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_1$  do některé z vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . [8]

### 2.1.4.1 Základní zákonitosti fluorescence a jejího spektra

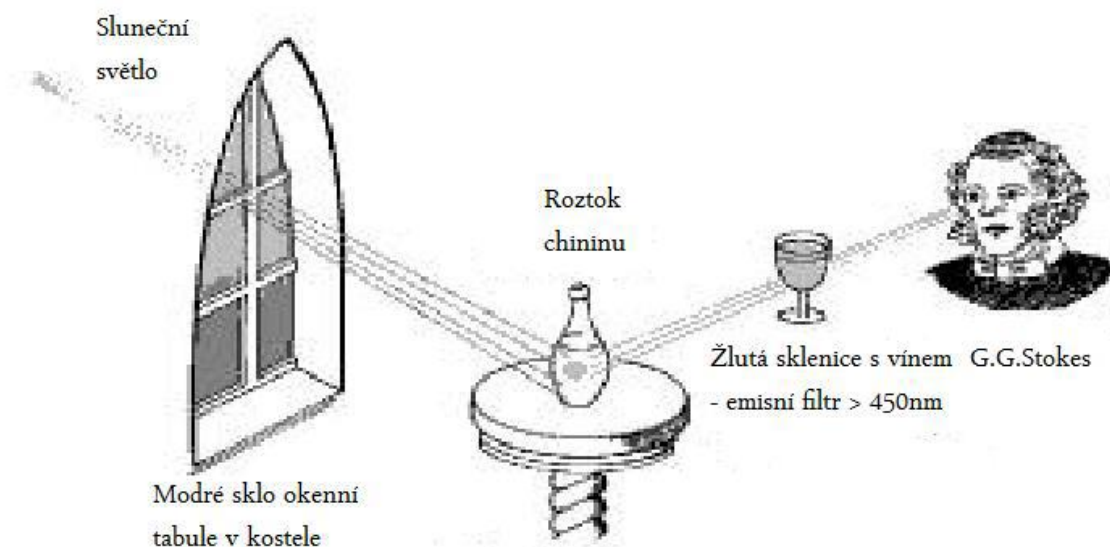
Fluorescenční spektrum je charakterizováno jako závislost absorbance systému na vlnové délce. Toto spektrum lze charakterizovat několika pojmy.

#### 2.1.4.1.1 Stokesův posun

Z Jablonského diagramu (viz Obrázek 2) si můžeme všimnout, že vyzářená energie při emisi je menší než energie pohlcená při absorpci. Tento jev je zapříčiněn tím, že emise záření nastává z nižších energetických hladin, než z hladin, na které byla látka vybudena. S tím právě souvisí, že fluorescenci můžeme pozorovat na vlnových délkách vyšších, než kterými byl fluorofor excitován. Rozdílu v těchto energiích mezi maximy emisního a absorpčního pásu se říká Stokesův posun (viz Obrázek 4). Tento jev poprvé pozoroval Sir George Gabriel Stokes v roce 1852 na Univerzitě v Cambridge. [8]



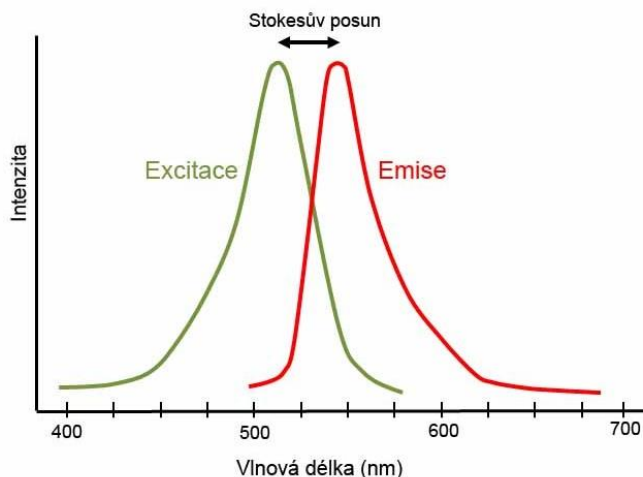
G. G. Stokes sledoval průchod slunečního světla přes okenní tabuli do nádoby, ve které byl roztok chininu. Přes sklenici naplněnou vínem mohl sledovat, jak se z světla ultrafialového stává světlo viditelné. Pokus je zaznamenán na Obrázku 3. [8]



Obrázek 3 Stokesův pokus s roztokem chininu [8]

Po sledování tohoto pokusu definoval G. G. Stokes zákon, který říká, že vlnová délka vyzářené fotoluminiscence je delší než vlnová délka budícího záření. Tento zákon je známý jako Stokesův posun, který je zaznamenán na Obrázku 4. Poukazuje na to, jak se energie fotonu absorbovaného změní oproti fotonu, který vyzáří fluorofor při přechodu z excitovaného do základního stavu. Rozdíl mezi energií fotonů vyzářených a absorbovaných je pro každou molekulu charakteristický a nazývá se Stokesův posun. Vlnová délka fluorescenčního záření je větší než vlnová délka záření absorpčního. [8]

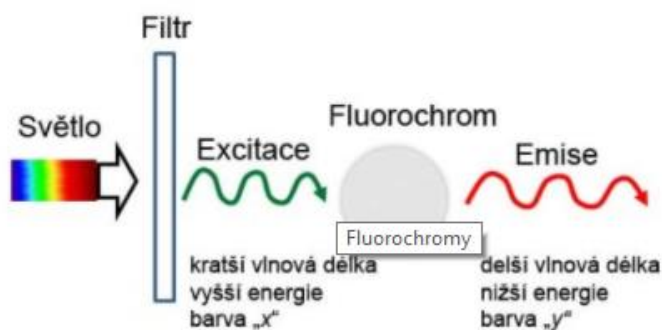
Energetické ztráty mezi emisí a excitací můžeme pozorovat u všech roztoků fluorescenčních molekul. Jednou z příčin Stokesova posunu je opravdu rychlý zánik vyšších energetických hladin a jejich přechod na nejnižší vibrační hladinu  $S_1$ . Jako druhou z příčin můžeme uvést přechod ze stavu  $S_1$  na jinou z vyšších vibračních hladin základního stavu  $S_0$ . Oba přechody způsobují ztrátu excitační energie. [8]



Obrázek 4 Stokesův posun- excitační a emisní pásma [8]

### 2.1.4.1.2 Excitační a emisní pásma

Každý fluorochrom má svá specifická excitační a emisní pásma. Excitační pásma nám ukazují, jaký je rozsah vlnových délek, které vedou přímo k excitaci dané látky. Emisní pásma nám poukazují na rozsah vlnových délek, při kterém dochází k emisi fluorescence. Obě pásma mají svá maxima, takže pokud je fluorochrom ozářen světlem o vlnové délce odpovídající maximu excitačního pásma, následná fluorescence nabývá maximální intenzity. Pokud použijeme jinou vlnovou délku, intenzita fluorescence se sníží. Výsledný rozdíl mezi vlnovými délkami excitačního a emisního maxima se nazývá Stokesův posun (viz Obrázek 4), který je důležitým faktorem při různých biologických experimentech. Někdy je velmi obtížné odlišit emitované světlo od excitačního, v důsledku malého Stokesova posunu. [8]



Obrázek 5 Schéma excitace a emise fluorochromu [8]

### 2.1.4.2 Fluorofory

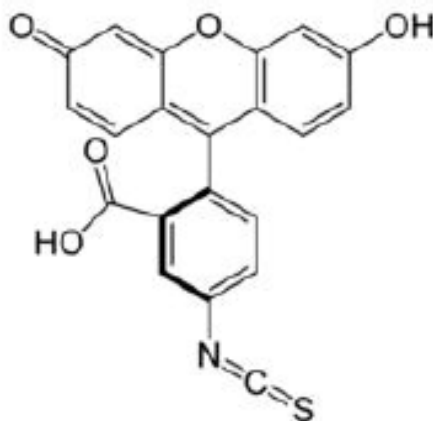
Fluorofory můžeme charakterizovat tím, že jsou schopny absorbovat záření o vlnové délce viditelného popř. UV záření a poté ho emitovat o vlnové délce jiné. Emisní záření se udává funkční skupinou, kterou molekula zahrnuje. Mezi známé fluorofory se řadí chinin, který je velice rozšířený a je obsažen ve známém nápoji „tonic“. Pokud bychom vystavili sklenku toniku na přímé sluneční záření, s velkou pravděpodobností bychom mohli na povrchu pozorovat slabé modré záření. Fluorescence chininu je dnes stále nejvíce využívanou ukázkou fluorescence. Mezi další známé fluorofory patří např. fluorescein, který se využívá na fluorescenční značení, nebo rhodamin, jehož stopu můžeme pozorovat v nemrzoucích směsích a může vyzařovat světlo zelené popř. červeno-oranžové záření. [10]

Fluorofory se dělí na dva typy – vlastní a nevlastní. Vlastní, neboli vnitřní fluorofory se vyskytují přirozeně a můžeme mezi ně zařadit proteiny s aromatickými aminokyselinami např. tyrozin (Tyr), fenylalanin (Phe) nebo tryptofan (Try), jejichž fluorescence se nachází v ultrafialové oblasti (mezi 240 a 300 nm). Redukované formy nikotinamidadenin dinukleotidu (NADH), nikotinamidadenin dinukleotid fosfátu (NADPH), oxidované formy flavoproteinů a vitamin A mají fluorescenci ve viditelné oblasti (modrá až žlutá). Cytochromy, hemoglobin, myoglobin a chlorofyl mají fluorescenci ve viditelné oblasti (červená). Nevlastní, neboli vnější fluorofory se přidávají ke studovanému vzorku a užívají se mnohem častěji než vlastní. Můžeme je označit jako tzv. fluorescenční sondy nebo značky, a přidávají se k látce, která nefluoreskuje. Pokud jsou látky k vzorkům vázány kovalentní vazbou, nazýváme je fluorescenčními značkami. Pokud jsou vázány vazbou nekovalentní, jsou to fluorescenční sondy. Mezi nejvíce známé nevlastní fluorofory patří fluorescein (FITC), tetrametylrhodaminizothiokyanát (TRITC) a ostatní deriváty. Mezi další velmi často užívané fluorescenční značky patří jednoznačně dansyl chlorid (DNS-Cl), který reaguje s volnými aminoskupinami bílkovin, stejně jako fluorescein. [10]

#### 2.1.4.2.1 Fluorescein – FITC

Tento fluorofor označujeme celým názvem jako fluorescein-5-isothiokyanát, Fluorescein je nejvíce užívaná fluorescenční značka, což znamená, že se ke vzorku váže kovalentní vazbou, a jeho funkční skupinou je isothiokyanát – N = C = S. Užívá se pro

značení proteinů, peptidů a jiných biomolekul. Je výhodný pro svou nasákavost a snadnou měřitelnost. FITC má vlnové délky excitačního a emisního spektra přibližně 495 nm/521 nm. Podobně jako většina fluorochromů je náchylný k tzv. photobleachingu neboli fotovybělování, při kterém dochází k nevratnému zničení excitovaného fluoroforu. Tento jev většinou omezuje možnost užití intenzivnějšího buzení fluorescence. [10] Fluorescein vidíme na Obrázku 6.



Obrázek 6 Konstituční vzorec - fluorescein-5-isothiokyanát [10]

### 2.1.4.3 Měření fluorescence

Existují 4 metody, kterými je možno měřit a detekovat fluorescenci. Vyskytují se však i jiné přístroje, které slouží k detekci fluorescence. Spektrofotometry neboli spektrofluorimetry měří fluorescenci vzorku umístěného nejčastěji v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky. Fluorescenční spektrofotometrie se nejčastěji používá k měření dané koncentrace, u které není možné stanovit koncentraci pomocí absorbance. V kvantitativní analýze probíhá měření metodou kalibračních křivek, ve které jsou vzorky o různých koncentracích. Fluorescenční skenery jsou moderní přístroje, které měří fluorescenci dvojrozměrných objektů. Tento přístroj je schopen rozlišit fluorofory se stejnými excitačními i emisními spektry, což je výhodné. Průtokové cyklotometry jsou schopny měřit fluorescenci většího množství buněk a umožňují tak identifikovat a oddělovat jejich koncentrační rozložení podle kategorií (subpopulací). [11] [12]

#### 2.1.4.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence je molekulární jev, při kterém látka absorbuje světelné záření určité vlnové délky a téměř okamžitě vyzařuje záření opět v podobě světla o delší vlnové délce, tj. s nižší energií a jinou barvou. Tento proces je známý jako excitace (buzení) a emise. Emisní a absorpční spektrum dané fluorescenční látky je ovlivňováno podmínkami prostředí, např. pH, koncentrací iontů nebo splynutím s jinými molekulami. Čas potřebný k fluorescenci molekuly se pohybuje v řádech nanosekund.

Fluorescenční mikroskopie je v dnešní době velmi rozšířená metoda buněčné biologie. Rozvoj a intenzivní výzkum přináší spoustu nových informací a postupů, jak určovat struktury, orgány nebo samotné molekuly. Fluorescenční mikroskop se využívá především díky jeho vysoké citlivosti. Zdroj vysoké citlivosti je vyšší kontrast oproti pozadí. U fluorescence bývá nejčastěji světlý signál na tmavém pozadí. Tento jev způsobují dva filtry, které oddělují na základě vlnových délek emisní a excitační záření. Excitační filtr udává rozsah vlnových délek pro excitaci. Bariérový filtr zachycuje zbytky světla excitačního, které k excitaci nebylo vůbec použito, a propustí pouze světlo fluorescenční. Kombinací obou filtrů vzniká optimální signál, který se nekryje s vlastním fluorescenčním signálem. [13] [14]

Fluorescenční mikroskop je vybaven světelným zdrojem, obvykle se používá vysokotlaká rtuťová (50-200W) nebo xenonová výbojka (75-150W). Další důležitou součástí fluorescenčního mikroskopu je systém filtrů – excitační filtr, dichroické zrcadlo a bariérový filtr. Filtry se umisťují do tzv. optické kostky. Moderní mikroskopy dokážou pojmout až 6 takovýchto kostek. [16] [17]

Některé látky jsou schopné sami o sobě vykazovat fluorescenci. Tehdy mluvíme o látkách s primární fluorescencí popř. autofluorescencí. Na látky, které nejsou schopny fluorescence, můžeme navázat fluorescenční barviva nebo sondy. Tomuto typu fluorescence se říká sekundární neboli nepřímá fluorescence. Látky, které jsou schopné fluorescence, označujeme jako fluorochromy. U vnější neboli nevlastní fluorescence, jak již bylo zmíněno dříve, rozlišujeme fluorescenční značky a sondy podle typu vazby.

Při excitaci a emisi máme určitá barevná spektra, která jsou kvantitativně popsána vlnovou délkou světla. Nejběžnější jednotkou vlnové délky pro popis fluorescenčních spekter je nanometr (nm). Barvy viditelného spektra lze rozdělit na přibližné hodnoty vlnových délek. Fialová barva značí 400 až 450 nm, modrá 450 až 500 nm, zelená 500 až 570 nm, žlutá a oranžová 570 až 610 nm a červená 610 až cca 750 nm. Na konci kratší

vlnové délky viditelného spektra je pásmo blížící se ultrafialovému záření (near-UV) od 320 do 400 nm, a na konci s delší vlnovou délkou se blížíme infračervenému záření (near-IR) s pásmem od 750 do cca 2500 nm. [18] [19]

U našeho fluorescenčního mikroskopu LEICA DM6000B je možno využít 4 filtry. Prvním je filtr A, vyznačuje se UV světlem a jeho excitace je při 340 až 380 nm a emise nad 425 nm. Druhý je filtr D, který je též vyznačen UV/Violet světlem a jeho excitace je při 355 až 425 nm a emise nad 470 nm. Třetí je filtr I3, který se ukazuje jako světlo modré a jeho excitace je při 450 až 490 nm a emise nad 515 nm (světlo zelené). Poslední je filtr N21, který se vyznačuje zeleným světlem a jeho excitace je při 515 až 560 nm a emise nad 590 nm (červené světlo). [20] [23]

#### **2.1.4.4.1 Fluorescenční mikroskop**

Fluorescenční mikroskop se řadí mezi nejkvalitnější zobrazovací techniky. Díky barvám, které mohou být zvoleny tak, aby se navazovaly vždy pouze na zkoumanou strukturu např. protein, antibiotikum, je to velmi přesná analyzační metoda. Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop, který je založen na principu posunu vlnové délky mezi dopadajícím a emitovaným světlem. Pomocí tohoto druhu optického mikroskopu je možné zobrazit dopodrobna struktury. U mikroskopu dopadá excitační světlo na preparát a emisní světlo je odraženo do objektivu. Fluorescenční mikroskop je schopen soustřeďovat energii excitačního záření přímo na objekt, ale zároveň dokáže velmi přesně filtrovat excitační a emisní záření. [13] [21]

Existují dva typy fluorescenčního mikroskopu – transmisní (pozorování v procházejícím světle) a epifluorescenční (pozorování v odraženém světle). U transmisního fluorescenčního mikroskopu světlo prochází excitačním filtrem a na preparát se dostává zespodu, jak je tomu u normálního světelného mikroskopu. U epifluorescenčního mikroskopu excitační světlo prochází objektivem, a poté dopadá na preparát, přičemž se emisní světlo vrací zpět do objektivu. U tohoto typu mikroskopie je nutno použít speciální typ zrcadla, které odrazí excitační světlo do objektivu a propustí emisní světlo do okuláru. Speciální zrcadlo se nazývá dichroické, které propouští světlo podle vlnové délky. Vždy je možné použít jen takový typ zrcadla, který odrazí maximum excitačního světla a propustí maximum světla emisního podle daného fluoroforu. Pro pozorování fluorescence se v dnešní době častěji používá právě epifluorescenční mikroskop. [16] [22]

## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části jsme se seznámili s dvěma typy fluorescenčního mikroskopu. Jeden mikroskop byl v laboratoři FZS – LEICA DM6000B a další Olympus BX51 v laboratoři biotechnologií na Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace. Vizualizovali jsme vzorky křemičitých nanovláken pomocí fluoresceinu-isothiokyanátu, které byly modifikovány 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES) s odlišnou koncentrací. Prováděli jsme také měření fluorescence ve spektrofotometru/spektrometru Biotek Synergy HT. V rámci bakalářské práce jsme analyzovali pomocí fluorescence několik druhů vzorků, které se vyvíjejí na naší univerzitě. Praktickou část jsme rozdělili celkem na 4 části podle druhu analýzy. První část se věnovala měření a vizualizaci aktivních aminoskupin při různé koncentraci a době reakce křemičitých nanovláken s APTES. Křemičitá nanovláknina se upravují tak, aby je bylo možné využít v léčbě těžce se hojících ran, infikovaných ran, popř. popálenin. Jednou z možností, jak by se dala vlákna využít v dermatologických aplikacích je vytvořená vlákna nechat reagovat s APTES a poté na jejich povrch kovalentně navázat např. antibiotika. Druhá část se zaměřovala na imobilizaci proteolytických enzymů na nanovláknina a analýze aktivity enzymů pomocí casein-fluorescein-isothiokyanátu. V neposlední řadě jsme zkoumali širokospektrální antibiotikum tetracyklin, které by samo o sobě mělo vykazovat fluorescenční aktivitu. Jako poslední analýzou byla vizualizace bakterií v kalu čističky odpadních vod.

### 3.1 Cíle a výzkumné předpoklady

V rámci tématu této bakalářské práce bylo naším cílem osvojit si velmi náročnou obsluhu fluorescenčního mikroskopu. Cílem bylo také osvojit si postupy navazování fluorescenčních barviv na biologické materiály. Vizualizovali jsme vzorky křemičitých nanovláken, které jsme barvili pomocí fluoroforu fluorescein-5-isothiokyanátu. Byl proveden výběr vzorků o různých koncentracích, které byly nasnímány a jsou zahrnuty v této bakalářské práci. Cílem práce bylo zjistit, zda bude mít nějaký vliv různá koncentrace a čas na počtu navázaných aminoskupin. Vzorky byly vizualizovány pomocí fluorescenčního mikroskopu LEICA DM6000B. Funkční navázané skupiny ale nemohly být kvantifikovány pomocí mikroskopu, a z toho důvodu jsme vzorky kvantifikovali ve spektrofotometru. Bylo proto zpracováno laboratorní měření, kterým

bylo možné zjistit fluorescenci ze spektrofotometru. Spektrometr je vhodný pro stanovení velkého počtu vzorků a je založen na bázi mikrodestiček.

### **3.2 Použitý materiál a pomůcky**

Stabilizovaná křemičitá nanovláknna vyhřátá na 150°C vyvíjená na naší univerzitě, 3-aminopropyltriethoxysilan 98% od výrobce SIGMA-ALDRICH (dále jen APTES), fluorescein-5-isothiokyanát od výrobce SIGMA (dále jen FITC), isopropylalkohol g.r. C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O od výrobce LACH-NER (dále jen IPA), absolutní ethanol p.a. C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O od výrobce PENTA (dále jen EtOH), 2M roztok hydroxidu sodného (NaOH), enzym bromelain EC 3.4.22.32 (from pineapple stem) od výrobce SIGMA ukládaný v -20°C, casein fluoresceinisothiokyanát (from bovine milk) od výrobce SIGMA, glutaraldehyd 25% in H<sub>2</sub>O od výrobce SIGMA-ALDRICH, antibiotikum tetracyklin, fosfátový pufr, kyselina trichloroctová, destilovaná voda (dále jen DV), plastové zkumavky s víčkem, kádinky, filtry, stavitelné pipety s plastovými špičkami, Petriho misky, fluorescenční mikroskop LEICA DM6000B, inverzní olej od výrobce CARGILLE, podložní sklíčka, spektrofotometr Biotek Synergy HT, centrifuga Z36HK-Hermle od výrobce Biotek

### **3.3 Druhy analýz praktické části**

Praktickou část bakalářské práce jsme rozdělili na několik částí, podle druhu analýzy zkoumaných biologických vzorků. První část výzkumu byla analýza množství aktivních aminoskupin po reakci křemičitých nanovláken s APTES. Dále imobilizace proteolytických enzymů na nanovláknna a analýza aktivity enzymů pomocí casein-FITC. V neposlední řadě jsme zkoumali tetracyklin, který sám o sobě vykazuje fluorescenční aktivitu, a poslední částí byla vizualizace bakterií v kalu.

#### **3.3.1 Měření a vizualizace aktivních aminoskupin po reakci křemičitých nanovláken s APTES**

Materiál, ze kterého se vyrábí křemičitá nanovláknna se nazývá tetraethoxysilan a vzniká kyselou katalyzovanou polykondenzací. Při této reakci vzniká postupem času gel, ze kterého se daná nanovláknna připravují. Připravená křemičitá nanovláknna mají povrchové hydroxilové skupiny, které lze využít pro případnou funkcionalizaci



nanovláken. Častým činidlem, které se navazuje na povrch nanovláknů navazuje je aminopropyltriethoxysilan (APTES). Vlákná díky tomu získají výše zmíněné povrchové aminoskupiny, na které se dají následně navázat např. antibiotika tetracyklinu. Aminoskupiny mohou být rozmístěny náhodně na povrchu funkcionalizovaných nanovláken, dokonce mohou být i ve vrstvách. Díky tomu jsou pro reakci s tetracyklinem vhodné jen některé skupiny. Pro určení reaktivních skupin se používá činidlo (značka), které reaguje s aminoskupinami kvantitativně a jehož množství jsme schopni přesně určit. Pro tyto účely je vyhovující fluorescein-isothiokyanát, který tvoří s aminoskupinami derivát thiomocoviny. Množství tohoto derivátu jsme schopni stanovit spektrometricky. [24]

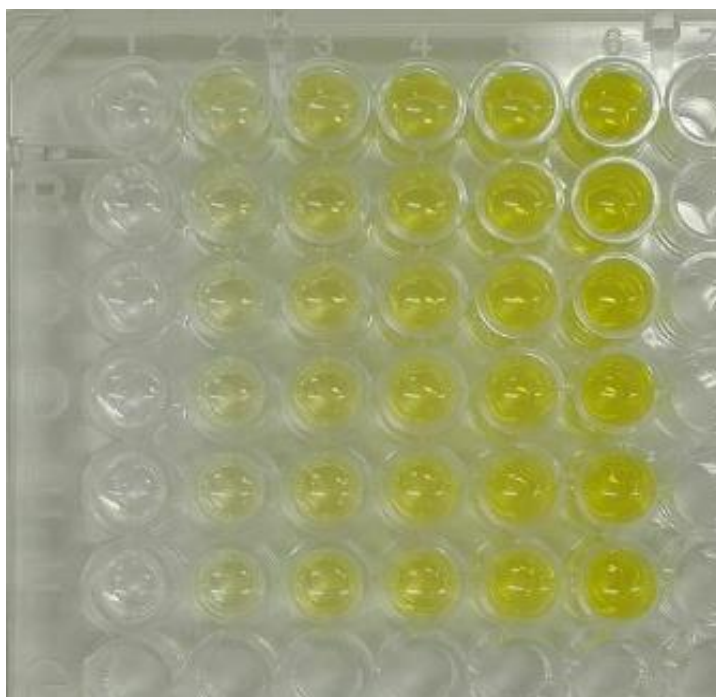
V praktické části jsme nejdříve koukali, zda bude mít různá koncentrace APTESU a různý čas reakce vliv na množství aktivních aminoskupin na povrchu vláken, což bylo naším hlavním cílem. Abychom zjistili vliv koncentrace a času na množství aminoskupin, nechali jsme je reagovat s fluoresceinem, který se naváže právě na tyto aktivní aminoskupiny.

V první části bakalářské práce jsme si vyzkoušeli pracovat s pipetou a zkusili si naředit různé koncentrace bez závislosti na čase. Nejprve jsme připravili vzorky APTESU o 5 různých koncentracích. Zvolili jsme koncentrace 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5% a 1% APTES. Potřebovali jsme 10% roztok APTESU, kdy celkový objem měl být 10 ml. Tedy 1 ml APTESU a 9 ml destilované vody. Dále jsme si připravili FITC 0,5 mg/1 ml absolutního etanolu, celkem 100 ml. Vzali jsme tedy 50 mg FITC a dolili jsme po rysku do 100 ml EtOH. Z našeho připraveného 10% roztoku APTES jsme potřebovali vždy 15 ml roztok DV + IPA v poměru 1:9 abychom dostali 10 dílů pro 5 předem určených koncentrací. V běžné praxi se využívá 0,2% roztok APTESU. Hodnoty všech potřebných látek jsou vyčísleny v Tabulce 1.

*Tabulka 1 Příprava koncentrací 5 roztoků APTES*

<b>APTES</b>	<b>V<sub>APTES</sub></b>	<b>V<sub>H<sub>2</sub>O</sub></b>	<b>V<sub>IPA</sub></b>
0,05%	0,075 ml	1,4925 ml	13,4325 ml
0,1%	0,15 ml	1,485 ml	13,365 ml
0,2%	0,3 ml	1,47 ml	13,23 ml
0,5%	0,75 ml	1,425 ml	12,825 ml
1%	1,5 ml	1,35 ml	12,15 ml

Dále bylo potřeba křemičitá nanovlákná, která byla předem 2 hodiny vyhřívána v peci na 150°C, rozstříhat na čtverce o velikosti cca 1x1 cm. Potřebovali jsme celkem 2x5, tedy 10 čtverců - 5 vláken na fluorescenční mikroskop a 5 na spektroskop. Nanovlákná jsme navázili a dali do malé Petriho misky, kde reagovaly s APTES 60 minut a dali jsme je protřepat. Po důkladném protřepání jsme vlákna opláchli 2x v destilované vodě. Ta vlákna, u kterých probíhalo měření pomocí spektroskopu, jsme proplachovali etanolem a poté přidali pipetou 4 ml 0,5M NaOH a třepali do rozpuštění nanovláken. Po oplachu jsme přidali FITC do zkumavky se vzorkem a nechali reagovat 26 hodin v lednici při 4°C. Nejdříve jsme roztoky pipetovali do průhledné mikrodestičky, poté jsme výzkum prováděli v destičce tmavé. Jako ukázkou různé koncentrace APTESU s FITC je možné pozorovat na Obrázku 7.



Obrázek 7 Ukázka koncentrace roztoku APTES + FITC

Dalším krokem analyzování první části bakalářské práce bylo proměření 3x6 vzorků, celkem tedy 18 vzorků o 3 různých koncentracích APTESU, přičemž jsme vždy potrebovali 50ml vzorku. Koncentrace můžeme vidět v Tabulce 3.

Tabulka 2 Příprava 0,08%; 0,01% a 1% roztoku APTES

<b>koncentrace</b>	<b>0,08%</b>	<b>0,01%</b>	<b>1%</b>
APTES	0,04 ml	0,005 ml	0,5 ml
DV	4,96 ml	4,999 ml	4,95 ml
IPA	45 ml	44,996 ml	44,55 ml

Naše měření bylo závislé i na 6 různých časových úsecích. Nejdéle byly vzorky v roztocích 4 hodiny, poté 2 hodiny, 1 hodinu, 30 minut, 5 minut a nakonec jen 1 minutu. Celkem jsme tedy získali 18 vzorků, které jsme předem navážili. Navážené vzorky jsme vložili do malé Petriho misky, přidali 5 ml roztoku APTES podle zvolené koncentrace na danou dobu (4h, 2h, 1h, 30min, 5min, 1min). Vždy po uplynulé době jsme vzorky opláchli v DV, podle potřeby. Ke vzorkům jsme přidali 2 ml roztoku FITC a nechali ve zkumavkách s víčkem přes noc louhovat. U 1 % roztoku jsme po 1-2 hodinách zpozorovali, že se již nanovláknem rozpouští na menší kousky, což může vnášet chybu do našeho měření.

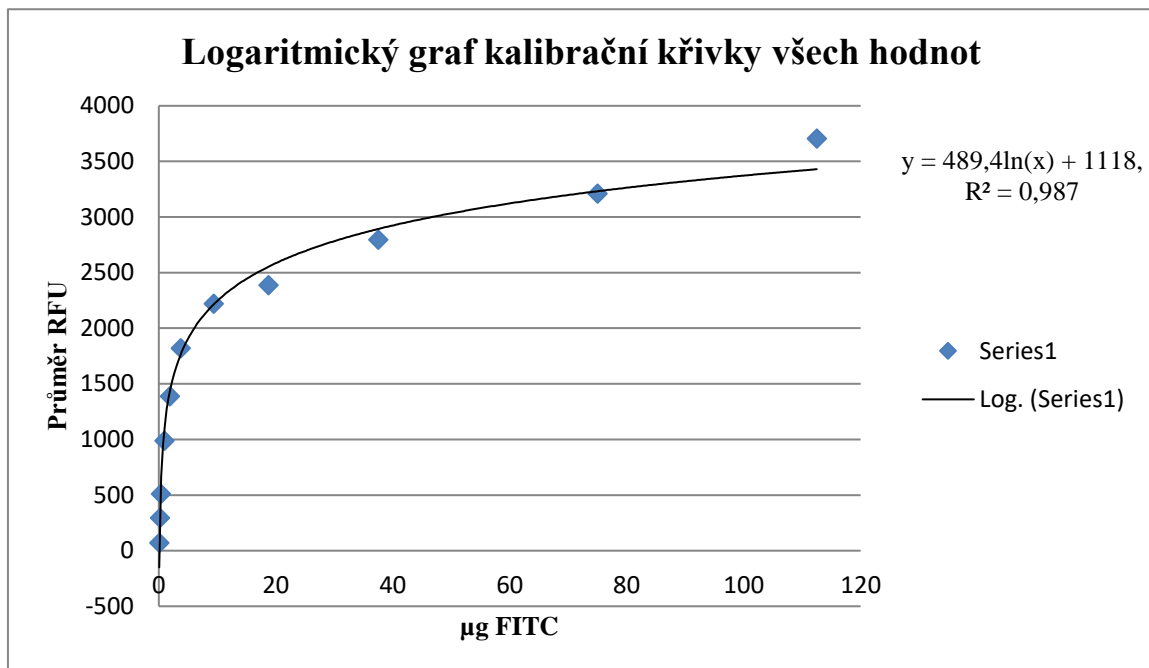
K dalším krokům našeho měření jsme potřebovali vytvořit kalibrační křivku. Kalibrační křivka byla potřebná z důvodu přesného určení aktivních aminoskupin. Připravili jsme roztoky ke kalibraci 0,5 mg FITC/1 ml EtOH ze standardního roztoku o koncentraci  $1,572 \cdot 10^{-4}$  mol/l. Dále jsme pipetovali 0  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l, 2000  $\mu$ l a 3000  $\mu$ l roztoku a do každé plastové zkumavky s víčkem jsme přidali 4 ml 0,2M NaOH. Nanesli jsme tedy 12 kalibračních roztoků a vzorku z rozpuštěných nanovláken do jamek na vzorkovací destičce přístroje Biotek Synergy HT, a z každého roztoku jsme provedli 8 měření po 300  $\mu$ l, které byly později zprůměrovány. Výpočtem jsme zjistili, kolik FITC bude v každém z roztoků. Ze zředění roztoku a navážení našeho vzorku se provedl výpočet množství stanoveného činidla  $\mu$ mol na 1g vzorku, což odpovídalo obsahu reaktivních aminoskupin na nanovlákněch v  $\mu$ mol/g. Pro 1000  $\mu$ l to vycházelo 0,0375 mg. V následující Tabulce 4 vidíme kolik  $\mu$ g FITC bylo obsaženo v námi zvolených roztocích, průměr RFU a směrodatnou odchylku. RFU představuje relativní fluorescenční jednotku, což je záznam intenzity fluorescence na CCD kameru spektrofotometru.

Tabulka 3 Kalibrační křivka zvolených roztoků

	1	2	3	4	5	6
<b>μg FITC</b>	0	0,075	0,1875	0,375	0,9375	1,875
<b>μl</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
<b>Průměr RFU</b>	0,25	70,125	293,5	511	987,625	1387,38
<b>Směrodatná odchylka</b>	0,43301	8,22249	18,4865	36,8239	44,7771	120,22

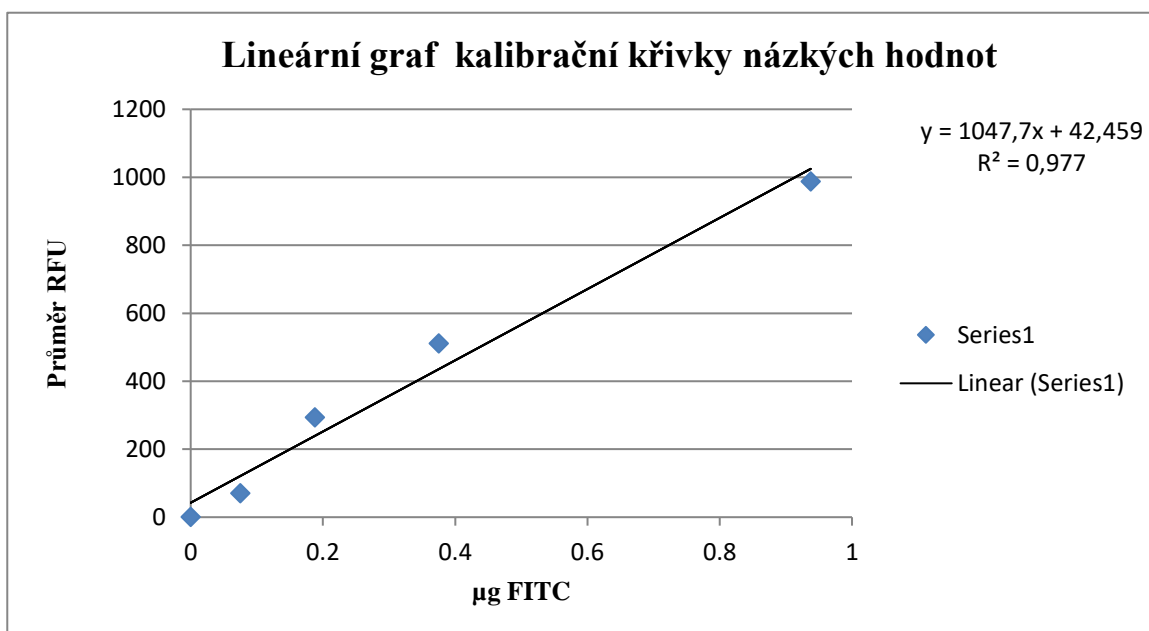
	7	8	9	10	11	12
<b>μg FITC</b>	3,75	9,375	18,75	37,5	75	112,5
<b>μl</b>	<b>100</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>2000</b>	<b>3000</b>
<b>Průměr RFU</b>	1820,75	2219,88	2387	2794,5	3211	3704,88
<b>Směrodatná odchylka</b>	93,7027	104,291	89,8276	340,065	99,0631	88,8164

Hledali jsme závislost mezi koncentrací a fluorescencí ze široké škály hodnot, čemuž nejvíce odpovídala logaritmická závislost. Tuto závislost je možné pozorovat v Grafu 1.



Graf 1 *Logaritmický graf intenzity fluorescence v závislosti na FITC*

Můžeme si ale všimnout, že u nízkých hodnot, cca do 1µg FITC byla závislost lineární. Pracovali jsme právě s těmito nízkými hodnotami, a proto jsme tedy přidali graf nižších hodnot s lineární závislostí a přímkou lineární regrese  $y = 1047,7x + 42,459$ , ze které se vycházelo při dalších výpočtech. Rovnici můžeme vidět v Grafu 2.



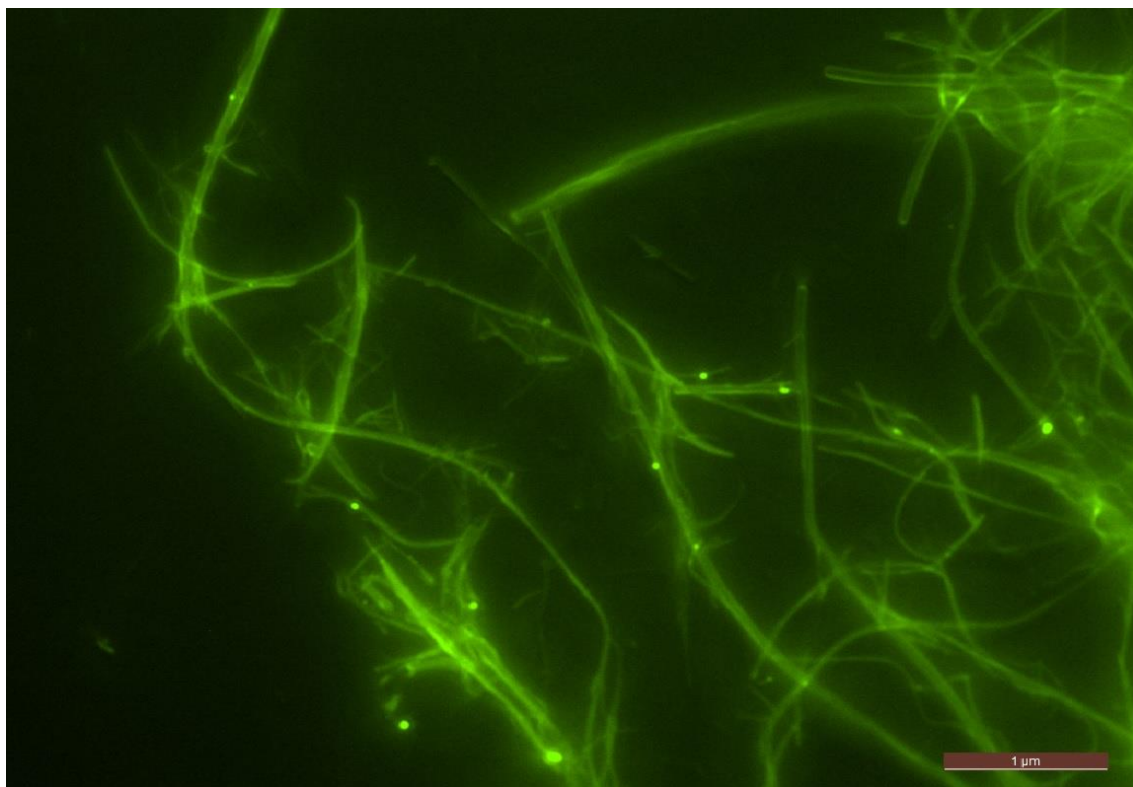
Graf 2 *Lineární závislost nižších hodnot intenzity fluorescence a FITC*

Jak již bylo dříve zmíněno, 18 navážených vzorků bylo na vždy předem zvolenou dobu (4h, 2h, 1h, 30min, 5min a 1min) ponořeno ve 3 koncentracích APTES (0,08%, 0,01% a 1%). Poté byly vzorky přefiltrovány, aby ve zbylém roztoku nezůstaly menší kousky rozpuštěných nanovláken. Nanesli jsme 18 kalibračních roztoků z rozpuštěných nanovláken do jamek na vzorkovací destičce přístroje Biotek Synergy HT, a z každého roztoku jsme provedli 5 měření po 300  $\mu$ l, které byly později zprůměrovány. Hodnoty FITC dle kalibrace jsme získali pomocí rovnice regrese  $y = 1047,7x + 42,459$  a jsou zvýrazněny tučně. Dále jsme zjišťovali hmotnost FITC v  $\mu$ g na 1 gram nanovláknů. To bylo určeno poměrem množství FITC, který byl ve vzorku a hmotností samotného nanovláknů. Výsledky našeho měření jsou znázorněny v Tabulkách 4, 5 a 6.

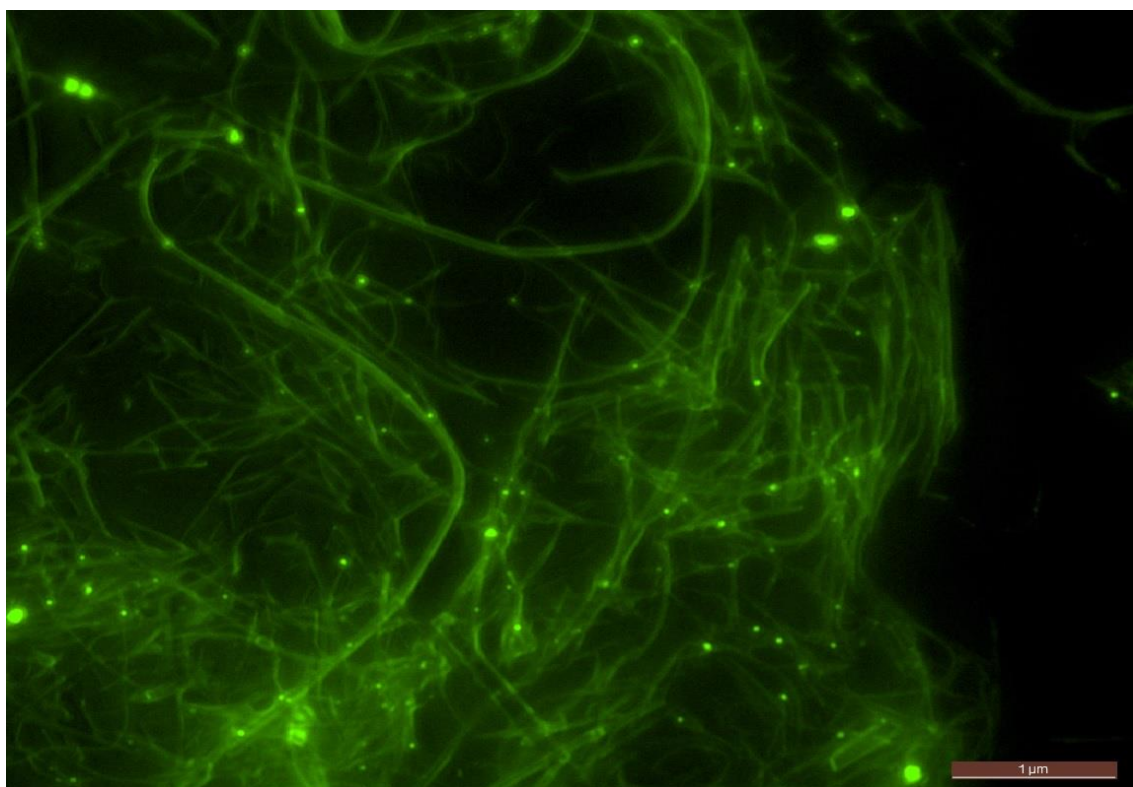
Dalším krokem v našem měření bylo promytí 5 vzorků, které byly namočeny do FITC. Promytí se opakovalo až do té doby, dokud nebyl proplach čistý (cca 6x). Takto promyté vzorky jsme vložili na podložní sklíčka, které jsme později zkoumali pod mikroskopem. Na snímkách jsme mohli vidět porovnání koncentrací APTESU. Vizualizovali jsme křemičitá nanovláknů, vyvíjená na naší univerzitě, která byla pokryta fluoresceinem. Vizualizovat nanovláknů se dalo, ale bohužel je nešlo kvantifikovat nebo porovnat množství APTESU a aminoskupin, jako tomu bylo ve spektrometru. Vizualizace probíhala v laboratoři FZS, pod mikroskopem LEICA DM6000B, v programu LAS V3.7. Snímky bylo možné vidět buďto v odstínech šedi (angl. greyscale), nebo v pseudo barvě (angl. pseudo-colour), což je barva, kterou vidíme v mikroskopu. U všech obrázků byl použit excitační filtr v rozpětí 450-490 nm modrého světla a emisní filtr (nad 515 nm) světla zeleného. Zkoumaná nanovláknů jsou vizualizována na Obrázcích 8-18.

Tabulka 4 Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (1min, 5min)

koncentrace	1 minuta			5 minut		
	<b>0,01%</b>	<b>0,08%</b>	<b>1%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,08%</b>	<b>1%</b>
RFU	199,4	118,8	99,2	122,4	195,8	147
nanovláknů [mg]	6,15	4,93	4,73	5,1	5,55	4,39
FITC dle kalibrace	0,14980	0,07287	0,05416	0,07630	0,14636	0,09978
$\mu$ g FITC/1 g nanovláknů	<b>24,35707</b>	<b>14,77999</b>	<b>11,44983</b>	<b>14,96106</b>	<b>26,37111</b>	<b>22,72925</b>



Obrázek 8 *Nanovláknna pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 5 minut*



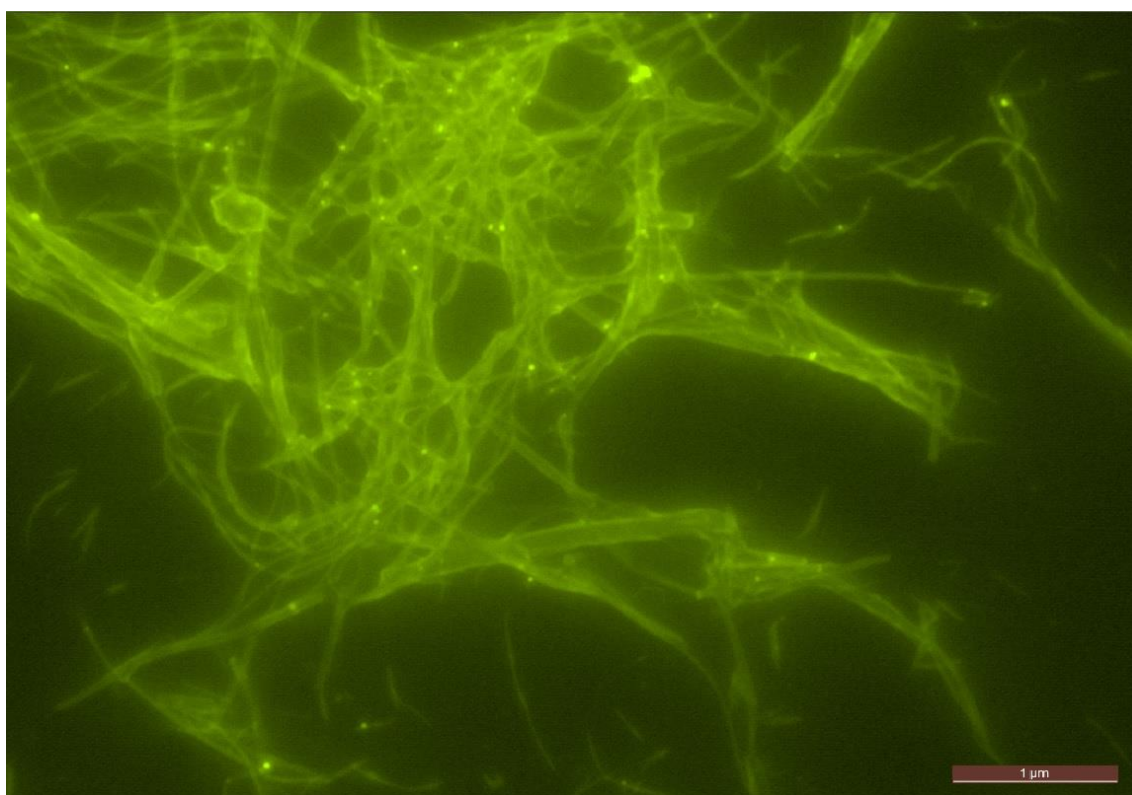
Obrázek 9 *Nanovláknna pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 5 min*



Tabulka 5 Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (30min, 1hod)

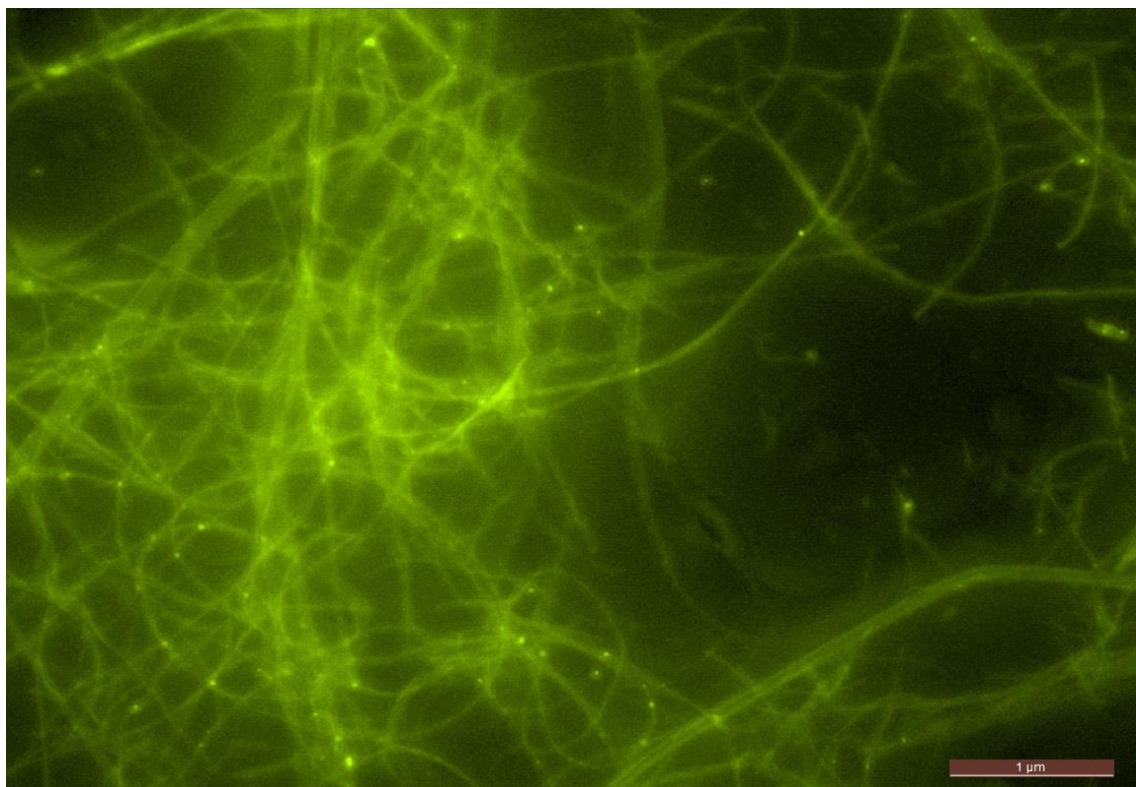
čas	30 minut			1 hodina		
koncentrace	0,01%	0,08%	1%	0,01%	0,08%	1%
RFU	116	167,8	129,6	122,8	212,8	302,2
nanovláknno [mg]	5,76	5,05	4,48	4,84	5,06	4,69
FITC dle kalibrace	0,07019	0,11963	0,08317	0,07668	0,16259	0,24791
$\mu\text{g FITC}/1\text{ g nanovláknna}$	<b>12,18625</b>	<b>23,68999</b>	<b>18,56554</b>	<b>15,84364</b>	<b>32,13155</b>	<b>52,86043</b>

V běžné praxi se nejčastěji používá koncentrace 0,08% po dobu reakce jedné hodiny. V tabulce je tato hodnota znázorněna zelenou barvou. Z Tabulky 5 můžeme pozorovat, že nižší koncentrace (0,01%) neměla tolik aktivních aminoskupin, což je pro naše měření podstatné. U vyšší koncentrace (1%) po jedné hodině již docházelo k rozpadu nanovláken, což mohlo vnášet chybu do měření.

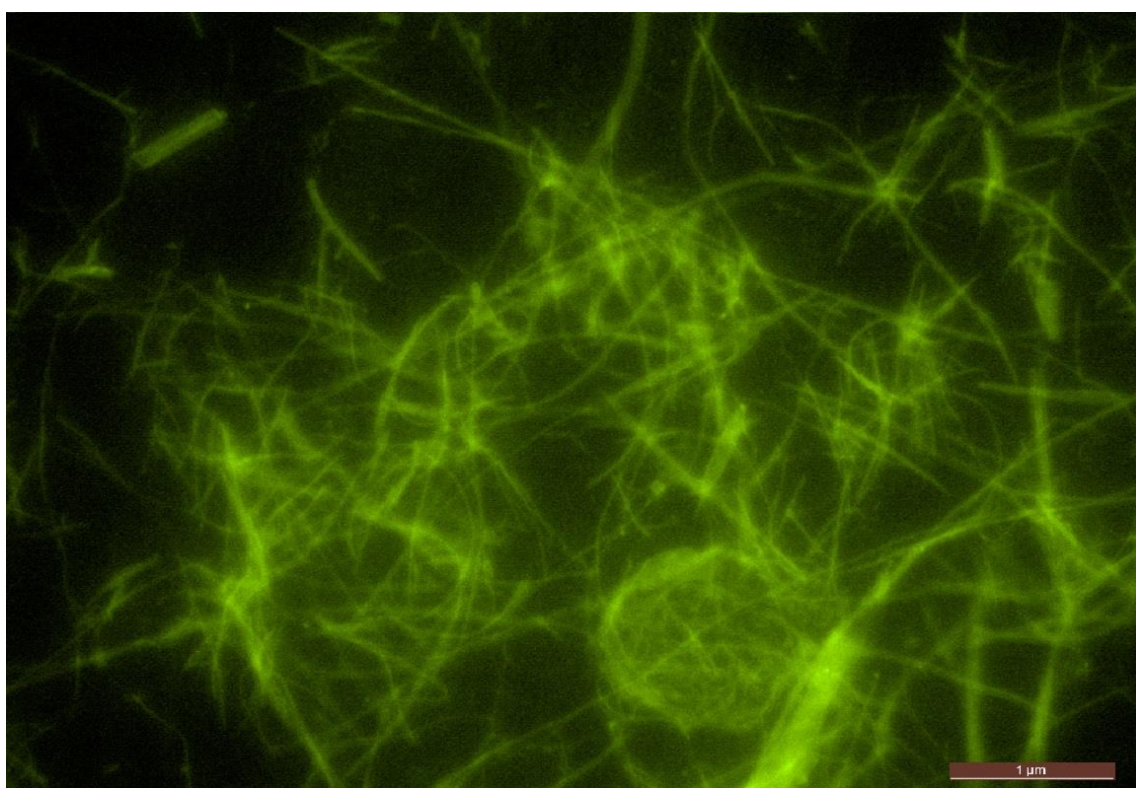


Obrázek 10 Nanovláknna pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 30 minut

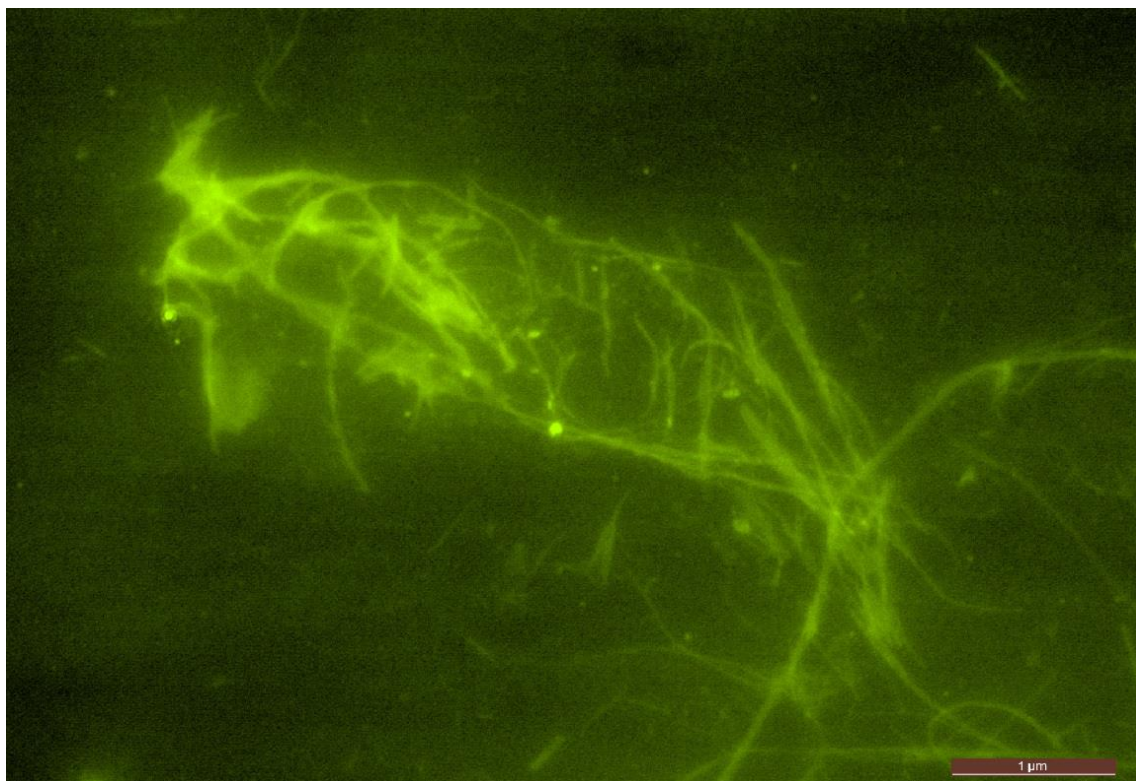




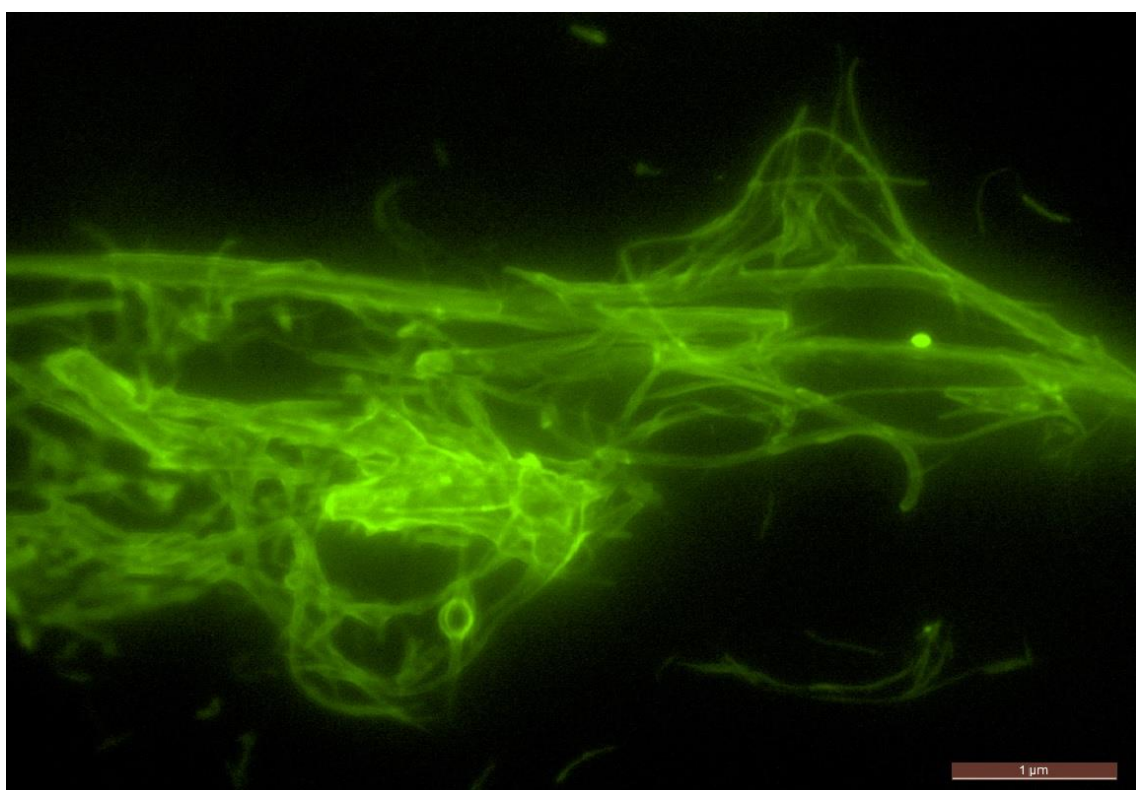
Obrázek 11 *Nanovláknna pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 30 min*



Obrázek 12 *Nanovláknna pokrytá FITC, koncentrace 0,01%, 1hodina*

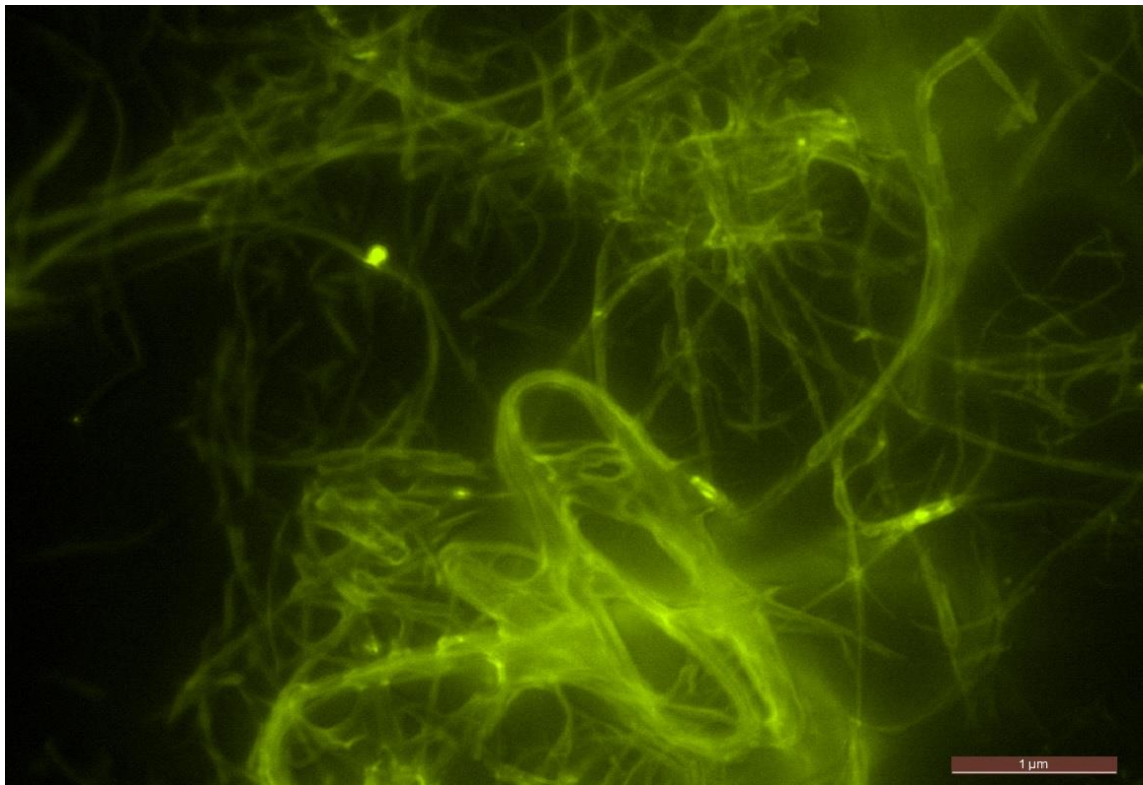


Obrázek 13 *Nanovláka pokrytá FITC, koncentrace 0,01%, 1hod*

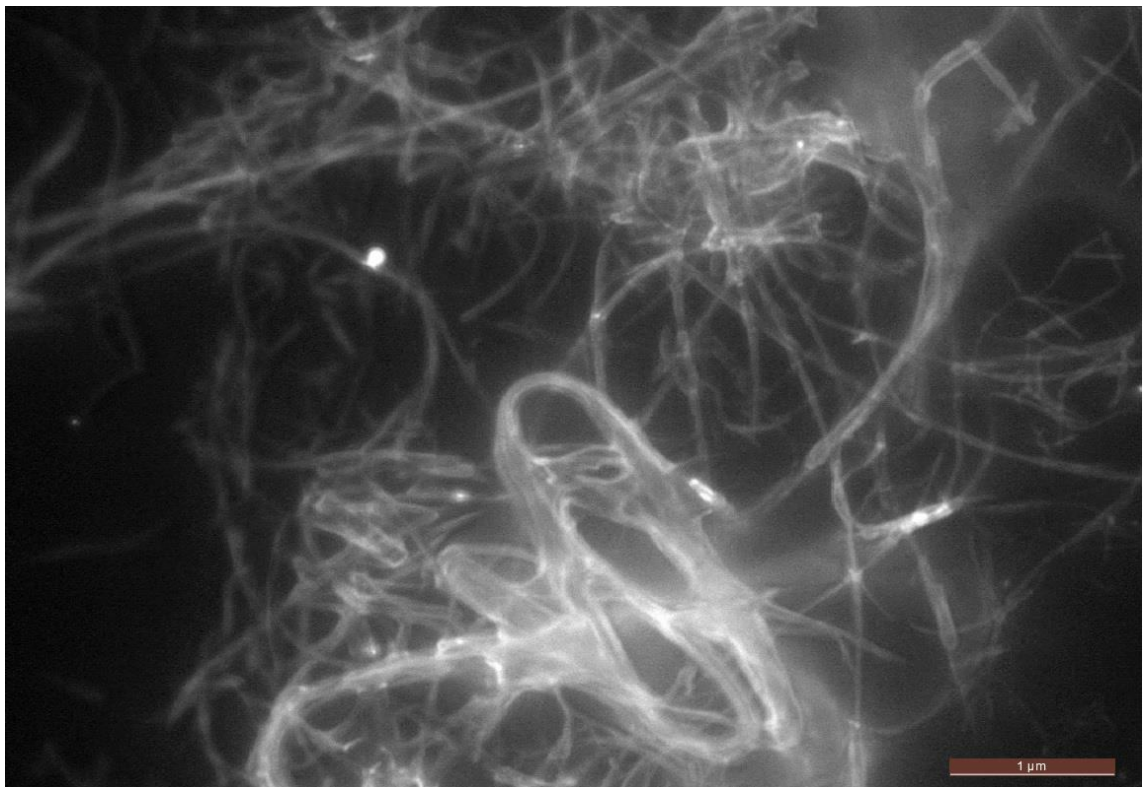


Obrázek 14 *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina*

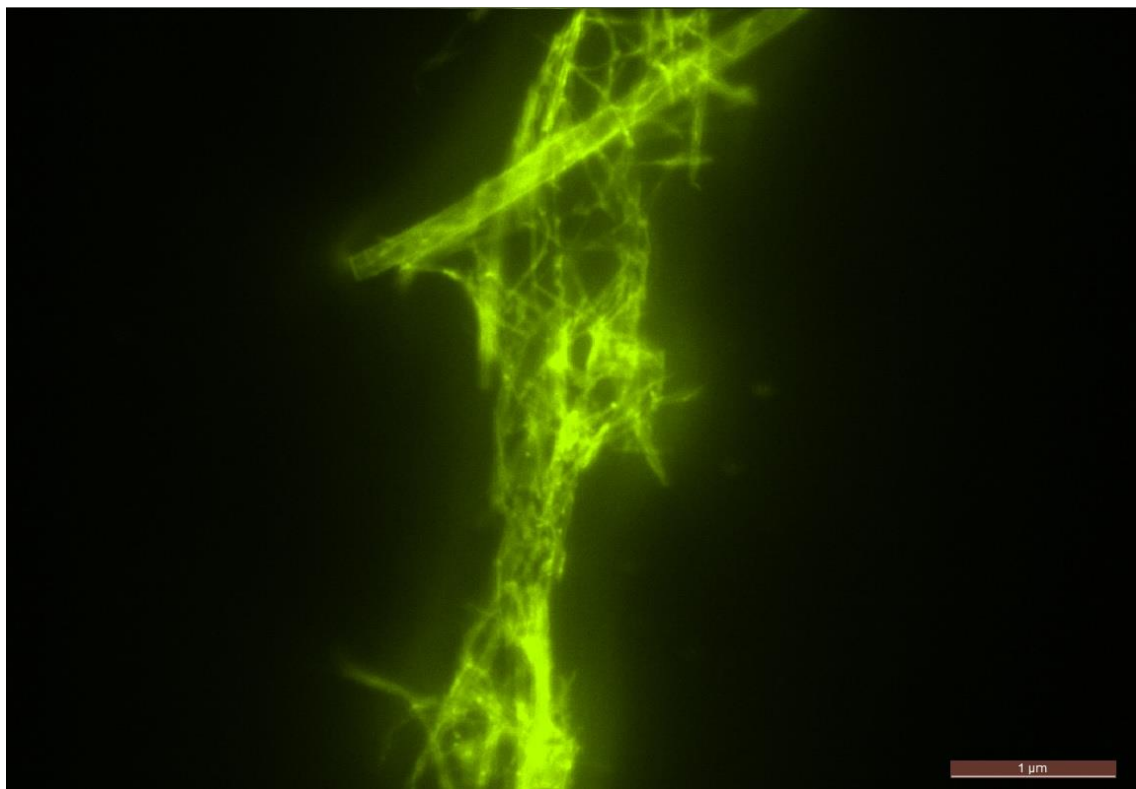




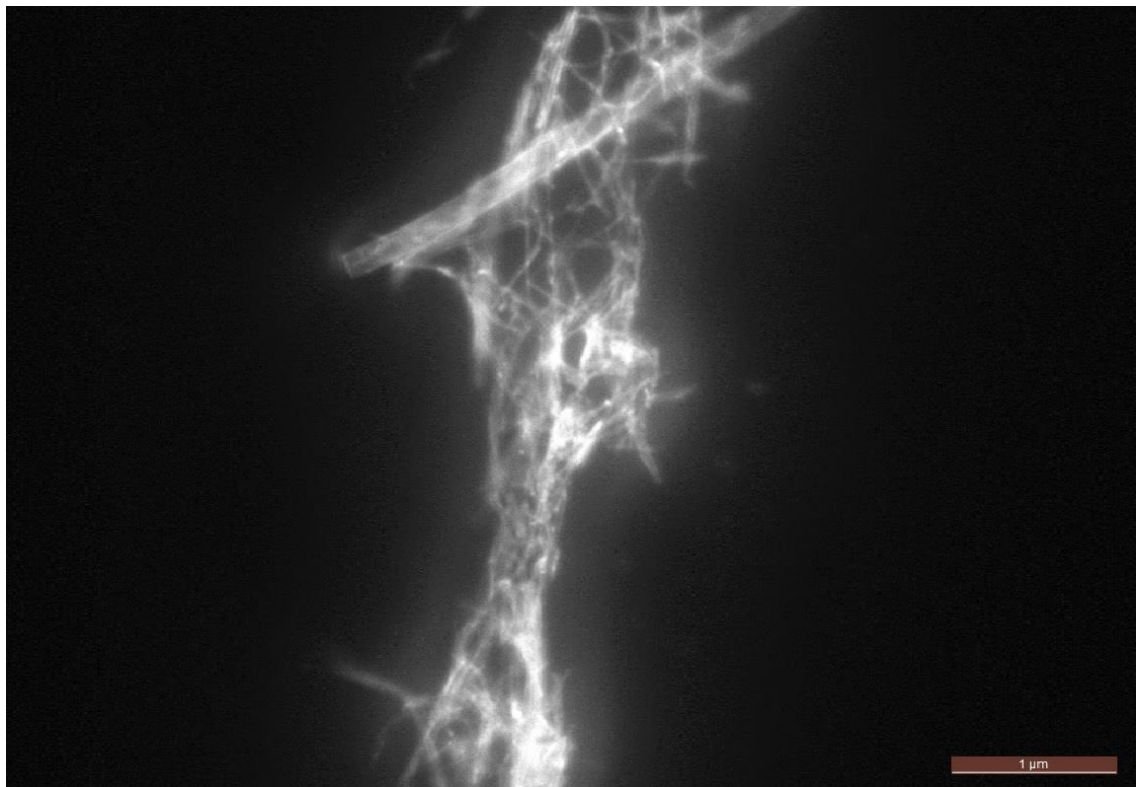
Obrázek 15 Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina, pseudocolour



Obrázek 16 Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina, greyscale



Obrázek 17 *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 1%, 1 hodina, pseudocolour*



Obrázek 18 *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 1%, 1 hodina, greyscale*

Tabulka 6 Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (2hod, 4hod)

čas	2 hodiny			4 hodiny		
koncentrace	0,01%	0,08%	1%	0,01%	0,08%	1%
RFU	78,6	189,4	322,8	115,4	285	290,2
nanovláknno [mg]	6,07	4,52	4,64	4,85	5,61	4,17
FITC dle kalibrace	0,03450	0,14025	0,26758	0,06962	0,23150	0,23646
$\mu\text{g FITC}/1\text{ g nanovláknna}$	<b>5,68296</b>	<b>31,02899</b>	<b>57,66758</b>	<b>14,35466</b>	<b>41,26533</b>	<b>56,70546</b>

Měření jsme rozdělili do 3 tabulek, viz Tabulka 4, 5 a 6. V každé z tabulek jsme znázornili 3 různé koncentrace a 6 různých časových úseků reakce s APTES. Na snímkách jsme vizualizovali křemičitá nanovláknna, vyvíjená na naší univerzitě, která byla pokryta fluoresceinem. Porovnání koncentrace APTESU a kvantifikování aktivních aminoskupin bohužel nebylo možné pomocí fluorescenčního mikroskopu, tudíž byly v tabulkách znázorněny hodnoty ze spektrofotometru. Na Obrázku 19 vidíme fluorescenční mikroskop LEICA DM6000B, na kterém probíhalo vizualizování nanovláken, a ze kterého byly všechny snímky pořízeny.



Obrázek 19 Fluorescenční mikroskop LEICA DM6000B

### 3.3.2 Imobilizace proteolytických enzymů na nanovlákná a analýza aktivity enzymů pomocí casein-FITC

Další z analýz naší praktické části byla imobilizace proteolytických enzymů na nanovlákná a analýza aktivity enzymů pomocí caseinu-fluorescein-isothiokyanátu. Toto je jedna z dalších metod, která je využívána při fluorescenci.

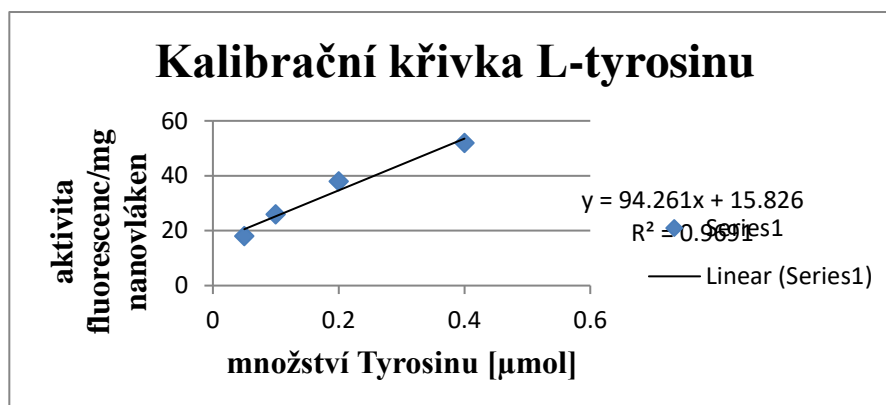
Pracovali jsme s rostlinným proteolytickým enzymem bromelainem, který je obsažen v čerstvém ananasu. Jedná se o skupinu proteolytických enzymů, které se podílejí na štěpení bílkovin za přítomnosti vody. Enzymy samy o sobě jsou známé tím, že urychlují reakce. Bromelain je také vyznačován jako silně protizánětlivá látka, což je dobré při bolestech, otocích či hojení tkání.

Casein je velká složitá bílkovina, na kterém jsme měli navázaný FITC. Casein obsahuje aminokyselinu tyrosin, na které jsou aktivní místa pro navázání enzymu, v našem případě bromelainu a ten aminokyseliny odštěpí.

Postup našeho měření byl následovný. Navázili jsme si 3 vzorky nanovláken (0,00475 g, 0,00577 g a 0,00516 g). Připravili jsme si 15 ml roztoku glutaraldehydu ve fosfátovém pufru 7,44 pH (1,2 ml glutaraldehydu a 13,8 ml pufru). Glutaraldehyd je bifunkční činidlo, které reaguje na jedné straně s aminoskupinou s APTES a na druhém svém konci reaguje s aminoskupinou enzymu. Tímto postupem dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi povrchem nanovláken a enzymem. Fosfátový pufr má podstatnou roli v udržování acidobazické rovnováhy v tekutinách. Navážená nanovlákná se poté na 1 hodinu vložili do 3 různých koncentrací roztoku (0,01%; 0,08% a 1%). Vzorky jsme po cca 25 minutách promyli fosfátovým puftrem. Na nanovlákná jsme přidali enzym s puftrem (na 15 ml pufru bylo potřeba 0,075 g bromelainu) a nechali 30 minut reagovat. Po přidání enzymu probíhala na nanovlákněch reakce aminokyselin. Nanovlákná s enzymem jsme opět 2x promyli puftrem, poté jsme je rozstříhali na čtvrtiny, aby se nám vešly do plastové zkumavky. Mezitím jsme si připravili roztok 500  $\mu$ l C-FITC, 37°C a kyseliny trichloroctové (1:55), což bylo 0,57 g do 200 ml. Kyselina trichloroctová (TCA) nám způsobila srážecí reakci, protein již nebyl tolik aktivní a díky tomu došlo ke sražení, přičemž se i snížilo pH.

Měli jsme tedy 3 zkoumané vzorky, ze kterých jsme provedli kalibrační křivku L-tyrosinu a FITC-caseinu, kterou vidíme v Grafu 3. Z kalibrační křivky aminokyseliny L-tyrosinu jsme zjistili, kolik  $\mu$ molu tyrosinu se vytvořilo za 20 minut reakce a našim cílem bylo zjistit aktivitu enzymu imobilizovaného na nanovlákněch, která je uváděna

v jednotkách proteolytické aktivity na mg nanovláken (units/mg). Čím vyšší je proteolytická aktivita enzymu, tím se za daný čas z caseinu odštěpí více aminokyseliny tyrosinu. Na tyrosin je navázaný FITC, který je pouze v této formě schopný fluorescence. Velikost proteolytické aktivity enzymu bromelainu je tedy přímo úměrná zvýšení fluorescence ve vzorku. Hodnoty pro výpočet fluorescence jsou znázorněny v Tabulce 7.



Graf 3 Kalibrační křivka aminokyseliny L-tyrosinu

Tabulka 7 Hodnoty pro výpočet aktivity fluorescence

koncentrace	čas	Průměr RFU	Hmotnost vláken [g]	n-tyrosinu [ $\mu\text{mol}$ ]	Aktivita [units/mg vláken]
<b>0,01%</b>	1 hod	34,5	0,00475	0,005742304	<b>10,42682</b>
<b>0,08%</b>		26,5	0,00577	0,004273161	<b>4,906359</b>
<b>1%</b>		57	0,00516	0,007663306	<b>21,1632</b>

Čím více bylo tyrosinu + FITC, tím více byl enzym bromelain aktivnější a vykazoval více fluorescence. Výsledky aktivity jsou znázorněny modře v Tabulce 7. Nebylo prokázáno, že při nejnižší koncentraci bylo nejméně aktivity na mg nanovláken, jak jsme předpokládali. To mohlo být způsobeno tím, že aminoskupiny nanovláken byly překryty ve vrstvách.

Postup, kterým jsme vypočítali aktivitu fluorescence na mg nanovláken můžeme vidět v Rovnici 3.

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg vláken}} = \frac{n_{\text{tyr}}[\mu\text{mol}] * V_r[\text{ml}]}{M_{\text{vl}}[\text{mg}] * T_r[\text{min}] * V_{\text{col}}[\text{ml}]}$$

Rovnice 3:  $V_r = \text{objem celkové reakce, 1,5 ml (0,5 ml FITC-Caseinu + 1 ml TCA) [ml]}$ ;  
 $M_{\text{vl}} = \text{hmotnost vláken [mg]}$ ;  $T_r = \text{čas reakce, 20 min, [min]}$ ,  $V_{\text{col}} = \text{objem vstupující do spektrofotometru. 0,3 ml, [ml]}$

### 3.3.3 Vizualizace širokospektrého antibiotika tetracyklinu

V neposlední řadě, jsme se pokusili vizualizovat látku, která je sama o sobě schopná fluorescence. Pro tento případ jsme zvolili širokospektré antibiotikum, tetracyklin. Snažili jsme se především o prokázání fluorescence na tetracyklinu. Postup, kterým jsme měření prováděli, byl převzat z odborného článku Imobilizace antibiotika tetracyklinu na křemičitých nanovláčkách z Technické univerzity v Liberci.

Reakce silanů jsou známou a důležitou součástí výzkumu materiálů, zejména v úpravách a modifikacích povrchu. První krok silanizace je absorpce alkylalkoxysilanů na alkoxyspinách (methoxy nebo ethoxy skupiny), což vede k tvorbě hydroxylových skupin, které mohou kovalentně reagovat se silanolem na povrchu. Aktivní skupiny Si-OH nebo Al-OH jsou potřebné pro správný silanizační proces. Nereaktivní organické skupiny (methyl, fenyl, hexadecyl atd.) na povrchu substrátů způsobují pouze povrchové změny a mění smáčivé vlastnosti (hydrofobní a hydrofilní povrch). Pokud jsou aminoskupiny připojeny k silanům, mohou s těmito skupinami reagovat léky nebo biologické látky. Toto je jedna z možných aplikací silanizačních reakcí. Existuje množství komerčně dostupných kondenzačních činidel, které mohou být použity k imobilizaci, např. DNA, jiných biologických molekul nebo léků. Například (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES), (3-aminopropyl)trimethoxysilan (APTMS), (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilan (GPS) a další byly k tomuto účelu značně využívány. Antibiotika se používají ve farmaceutickém a chemickém průmyslu kvůli jejich vysokému stupni specifčnosti. Imobilizace antibiotik je účinným způsobem, jak do jisté míry zvýšit právě tyto specifika. Nanovláčka mají velký potenciál a mohou být slibné v prosazení imobilizace antibiotik. Nanovláčka s imobilizovaným lékem mohou být využívány ve zdravotnictví. [24]

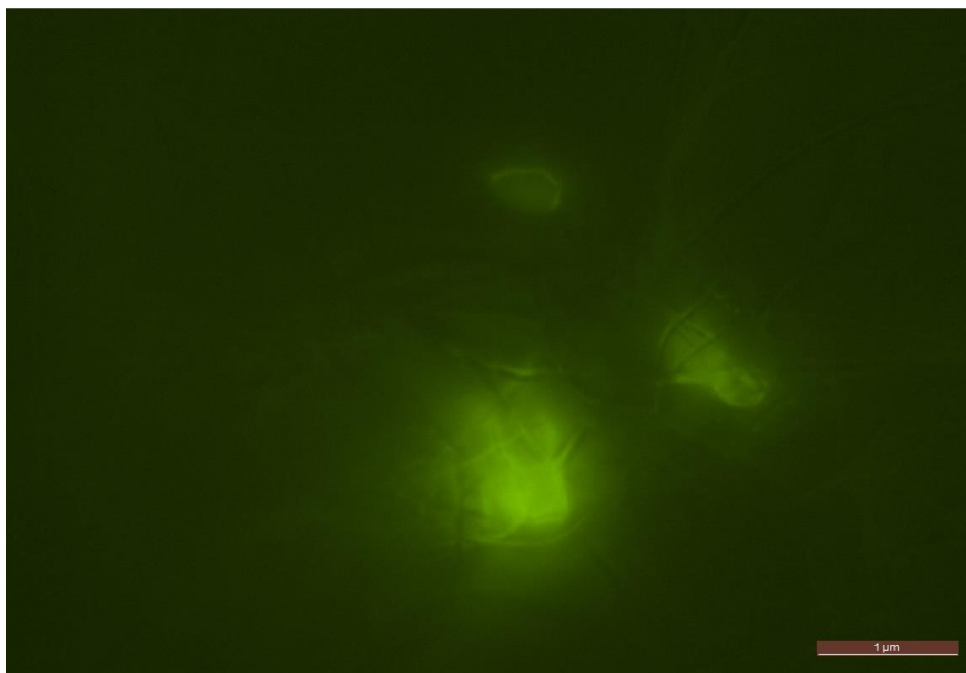
Experimenty probíhají s jedním typem nanovláček připraveným elektrospinningovou metodou prováděnou na Technické univerzitě v Liberci. Křemičitá



nanovlákná se připravují z tetraethylortosilikátu (TEOS, Merck, 98%) jako prekurzoru metody sol-gel. Pro imobilizaci bylo použito antibiotikum tetracyklin (Sigma-Aldrich >88%). Antibiotika byla imobilizována na substrátech nanovláken následující metodou. Tetracyklin reagoval s APTMS křemičitými nanovláknky v suchém ethanolu za stálého míchání. Směs byla filtrována a promyta a imobilizovaná nanovlákná byla zahřívána na teplotu 75°C ve vakuu po dobu 20 hodin. Ze všech testovaných vzorků jednoznačně dosáhly křemičitá nanovlákná nejlepších výsledků při imobilizaci antibiotika. [24]

Povrchy křemičitých nanovláken byly úspěšně silanizovány pomocí různých procesů. Nejlepších výsledků bylo dosaženo silanizací ve vodě s oplachem kyselinou octovou. Tetracyklin je bakteriostatické antibiotikum, které snižuje množení bakterií. Tyto výsledky jasně ukazují možnost použití antibiotik imobilizovaných nanovláken jako obvazy pro pacienty s těžko léčitelnými ranami. Tento mechanismus imobilizace může být také použit jako prostředek k imobilizaci jiných typů antibiotik. [24]

Z celého článku jsme se tedy dozvěděli, že silanizace substrátů, které obsahují Si-OH skupiny na svém povrchu, je jednou z používaných metod v současné době ve speciálním materiálovém inženýrství. Tato metoda nám umožňuje například imobilizaci léčiv na rozličné povrchy. [24] Imobilizaci tetracyklinu vidíme na Obrázku 20 pořízeného z fluorescenčního mikroskopu (LEICA DM6000B).



Obrázek 20 Nanovlákná s tetracyklinem, 0,08%, 1 hodina

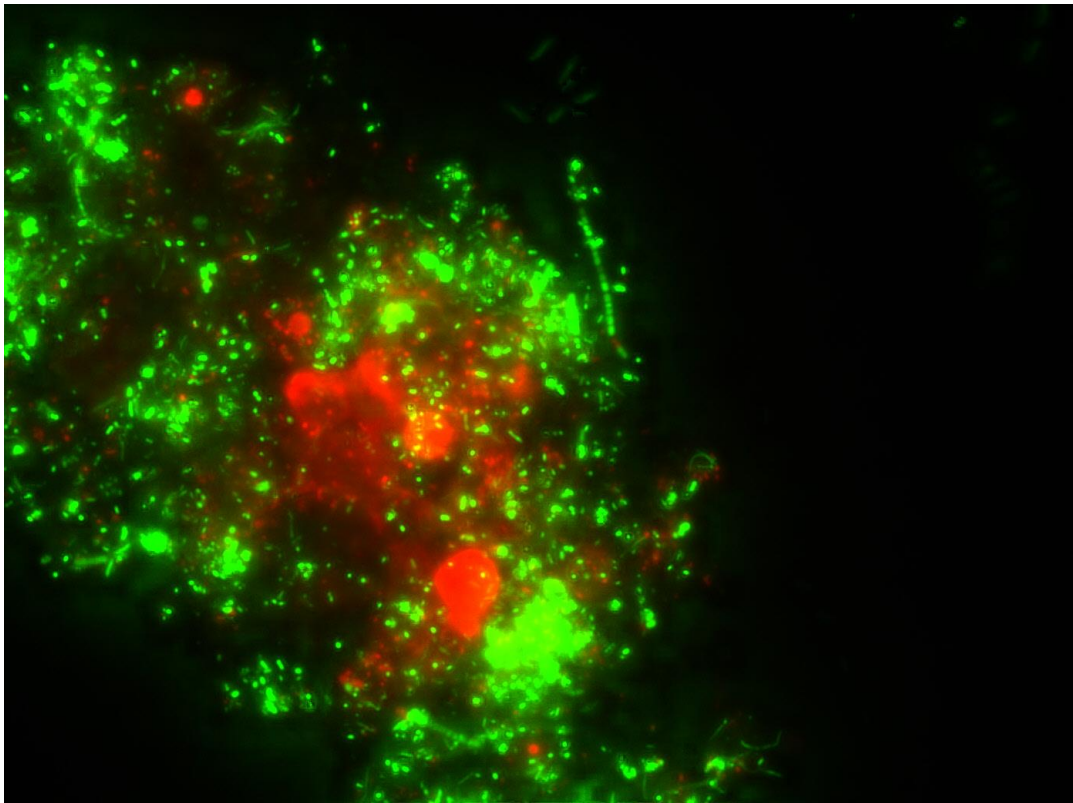
### 3.3.4 Vizualizace bakterií v kalu

Další částí mé bakalářské práce byla spolupráce s laboratoří biotechnologií na Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, kde díky fluorescenčnímu mikroskopu Olympus BX51 pomocí programu AxioVission, provádí vizualizace bakterií z kalu čističek odpadních vod. V této laboratoři se snaží o vývoj a využití nanomateriálů v technologiích a to konkrétně čištění odpadních vod a odstranění škodlivin z prostředí. Nachází se zde přímý fluorescenční mikroskop pro obrazovou analýzu povrchů, především imobilizovaných mikrobiálních společenstev a čistírenských kalů. Ověřují zde nové filtry a technologie např. využití uměle imobilizovaných mikroorganismů pro znečištěné odpadní vody, které jsou průmyslově zužitkovávány a optimalizují in-situ a ex-situ sanační technologie.

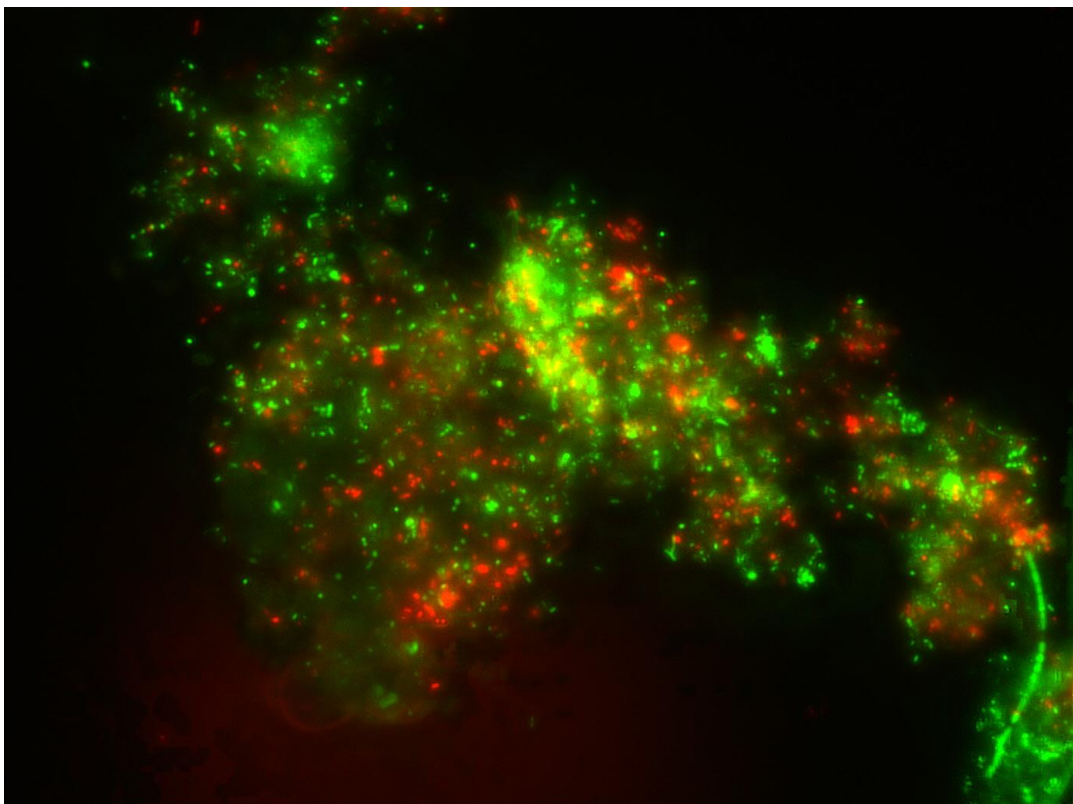
Nejdříve jsme se zabývali testem LIVE/DEAD na bakteriích kalu, který se nachází v reaktorech simulací čističek odpadních vod. Při této vizualizaci se odebírá 5  $\mu$ l kalu a 3  $\mu$ l chromogenního substrátu. Tento substrát můžeme označit jako fluorochrom a najdeme ho pod názvem Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit od výrobce ThermoFisher. Kity jsou malé lahvičky, které se uchovávají v mrazničce a musí být, co nejvíce chráněny před světlem. Tento kit je vhodný pro pozorování životaschopnosti bakteriálních kmenů. Excitace je zde při 485 nm a emise při 498 nm. Buňky, které jsou považovány za mrtvé nebo umírající jsou zbarveny červeně, zatímco buňky živé jsou zelené. Živé a mrtvé buňky můžeme vidět na Obrázku 21 a Obrázku 22.

Dále jsme se přesunuli do vedlejší laboratoře, kde jsme provedli stěr bakterie *Micrococcus luteus* pomocí inokulační kličky, kterou se nejprve muselo sterilizovat a to vypálením. Očkovanou bakterii, která se nacházela na agaru, jsme rozředili ve fyziologickém roztoku opět 5  $\mu$ l + 3  $\mu$ l chromogenního substrátu. Tento roztok se poté vložil na podložní sklíčko a pozorovali jsme jej pod fluorescenčním mikroskopem, což můžeme vidět na Obrázku 23.

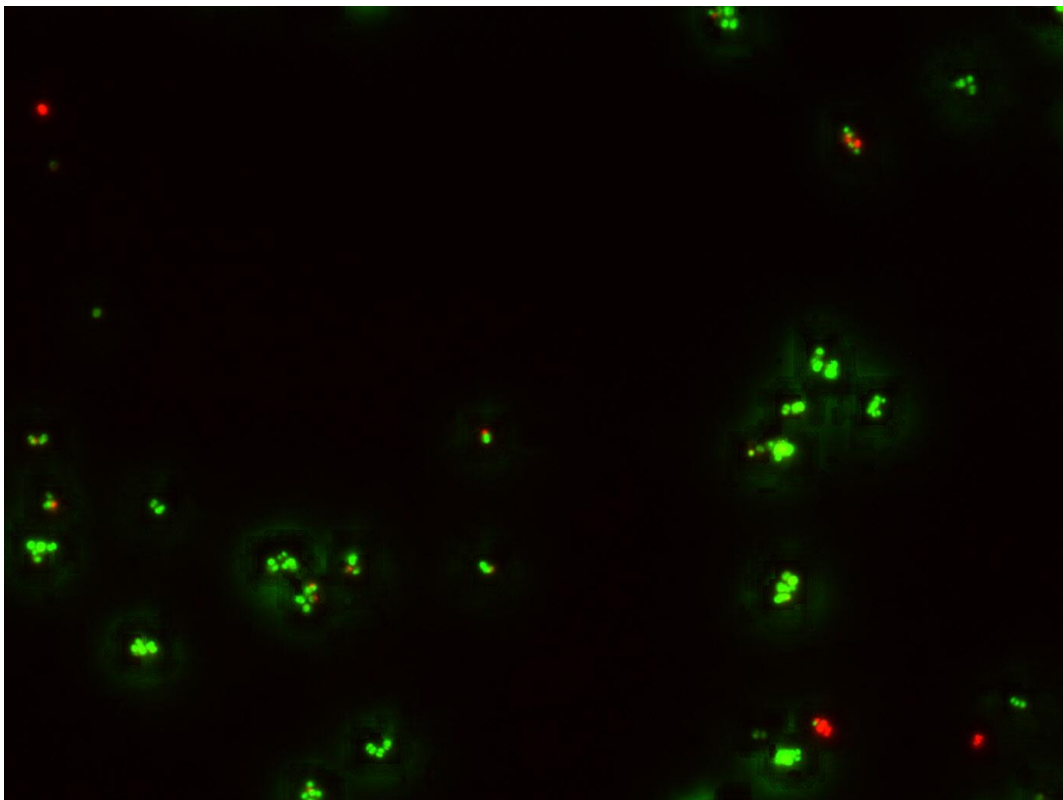
Třetím a zároveň posledním pozorováním byla bakterie *Microthrix* metodou FISH. Fluorescenční In Situ Hybridizace je neinvazivní molekulární diagnostická metoda. Díky této metodě jsou rozbíjeny membrány buněk a je možné se dostat přímo k jádru, až na chromozomy. Červeně je obarvena bakterie *Microthrix*, kterou vidíme na obrázku 24.



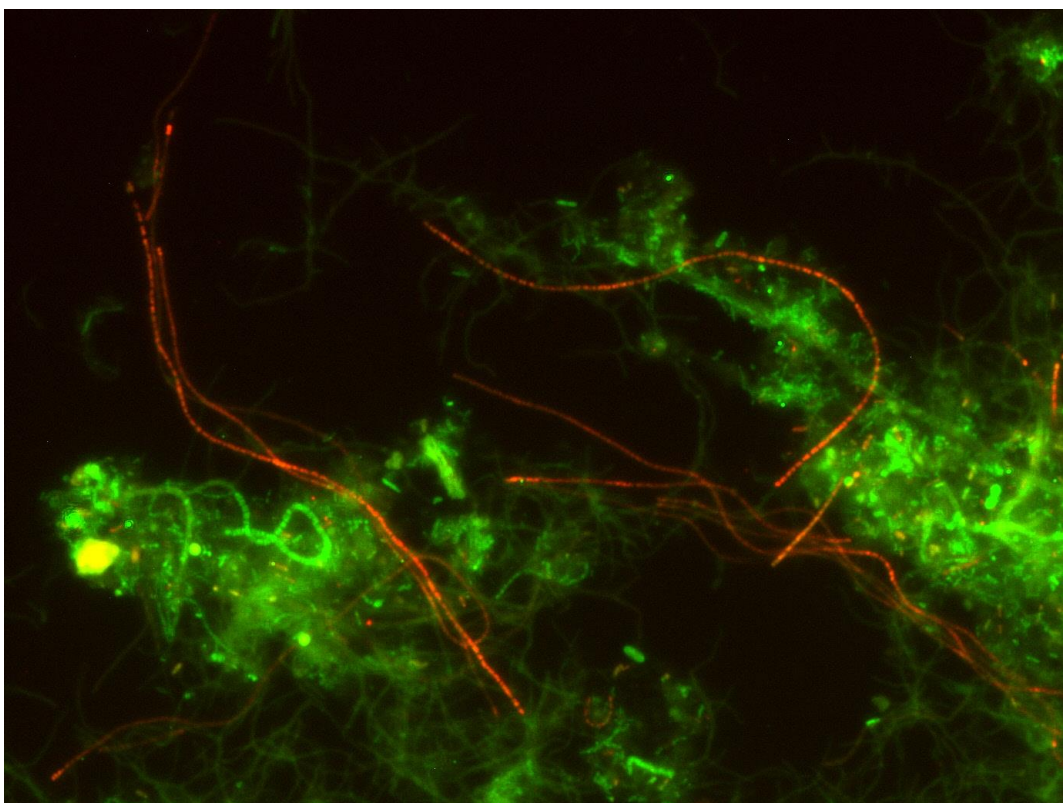
Obrázek 21 *Test LIVE/DEAD na bakteriích kalu*



Obrázek 22 *Test LIVE/DEAD na bakteriích kalu - živé a mrtvé buňky*



Obrázek 23 Pozorování očkované bakterie *Micrococcus luteus*



Obrázek 24 Pozorování bakterie *Microthrix* pomocí FISH

## 4 Návrh a doporučení pro praxi

Zkoumaná nanovlákná mají tu výhodu, že na svém povrchu mají hydroxilové skupiny, kterých lze využít pro případnou funkcionalizaci. Často se navazuje na povrch nanovlákná právě námi zkoumaný 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) a na jejich povrchové aminoskupiny lze navázat např. antibiotikum tetracyklin. Bylo by dobré prozkoumat, jaká přesná nejnižší koncentrace APTESU by byla potřebná k léčení těžce hojících se ran, infikovaných ran nebo popálenin.

Podle získaných výsledků lze pro získání většího počtu navázaných aminoskupin doporučit měření, ve kterém by se prodlužovala doba reakce, než případné zvýšení koncentrace roztoku APTES.

Při měření jsme museli být pozorní a opatrní, protože fluorescein velice barvil a díky tomu se lehce mohlo stát, že byly do měření vnášeny chyby. Bylo by vhodné provést větší množství měření, abychom mohli uvést nějaký závěr. Ověření většího množství měření by bylo ale časově i finančně dost náročné. Při našem měření jsme se setkali při vyšší koncentraci s rozpadem nanovláken, což opět mohlo vnášet chybu do měření. Jako námět pro další výzkumná opatření bychom navrhovali provést opakované měření například s větším počtem různých koncentrací vzorků.

Nanovlákná mají velký potenciál a mohou být do jisté míry slibné v prosazení imobilizace antibiotik. Tetracyklin je antibiotikum, které snižuje množství bakterií, a proto by se dalo využít ve zdravotnictví například jako obvazy pro pacienty s těžko léčitelnými ranami. Enzym bromelain, se kterým jsme též pracovali je vyznačován jako silně protizánětlivá látka, která se využívá při bolestech či při hojení tkání. Většinu látek lze tedy zkoumat a dále vyvíjet nové metody, které by byly efektivnější v dalších léčebných postupech.

## 5 Závěr

V této bakalářské práci jsme se snažili osvojit si velmi náročnou obsluhu fluorescenčního mikroskopu a prostudovat obsáhlý manuál. Prošli jsme si postupy navazování fluorescenčních barviv na biologické materiály/látky, které byly především z naší univerzity (křemičitá nanovlákná s imobilizovanými biomolekulami).

V teoretické části jsme shrnuli základní poznatky o fotochemii, fluorescenci a samotné fluorescenční mikroskopii. Při sepisování těchto informací jsme vycházeli především z odborné literatury.

Praktickou část jsme rozdělili na části, podle typu analýzy zkoumaných biologických vzorků. První část byla analýza množství aktivních aminoskupin po reakci nanovláken s APTES. Vizualizovali vzorky křemičitých nanovláken pomocí fluorescein-isothiokyanátu a snažili jsme se zjistit, zdali bude mít různá koncentrace APTESU a času vliv na počtu navázaných aminoskupin. Fluorescenční mikroskopie je rychlá skenovací metoda, avšak není dobrá na kvantifikaci. Funkční navázané aminoskupiny nemohly být kvantifikovány pomocí fluorescenčního mikroskopu, a proto bylo vhodné při našem měření použít současně i spektrofotometr, ze kterého jsme získali hodnoty intenzity fluorescence. Po našem měření jsme usoudili, že pro získání většího počtu navázaných aminoskupin bychom mohli provést měření, ve kterém by se prodlužovala doba reakce, než případné zvýšení koncentrace roztoku, protože cca po hodině louhování se vzorky již rozpadaly na menší kousky a to zajisté mohlo vnášet chybu do našeho měření. U 1 % koncentrace APTES a delší době reakce (4hod) se již intenzita fluorescence nijak zásadně neměnila. V běžné praxi se nejčastěji setkáme s koncentrací 0,08% APTES po dobu reakce jedné hodiny. Při našem zkoumání jsme zjistili, že nižší koncentrace neměla tolik aktivních aminoskupin, což nám vyšlo i při opakovaném měření, a u vyšších koncentrací již docházelo k rozpadu nanovláken. V práci byly zahrnuty snímky z fluorescenčního mikroskopu LEICA DM6000B. Museli jsme použít inverzní olej, který je určen při použití v mikroskopech se zvětšením objektivu 100x. Olej totiž propojil preparát s objektivem a umožnil tak jeho prosvětlení a pozorování, jinak by bylo zorné pole tmavé. Problémy při mikroskopii by mohly nastat s 3D vzorky, které by vnášely chybu do měření.

Další metodou při využití fluorescence byla imobilizace proteolytických enzymů na nanovlákná a analýza aktivity enzymů pomocí casein-FITC. Čím více tyrosinu + FITC

bylo, tím aktivnější byl enzym. Nebylo prokázáno, že při nejnižší koncentraci roztoku bylo nejméně aktivity na mg nanovláknů, jak jsme předpokládali. To mohlo být způsobeno tím, že aminoskupiny byly překryty v několika vrstvách.

V práci byla představena i metoda vizualizace širokospektrého antibiotika tetracyklinu. Zde jsme postup prováděli dle článku „Imobilizace tetracyklinu na křemičitých nanovlákněch“ z naší univerzity a ověřovali tak látku, která byla sama o sobě schopna vykazovat fluorescenci.

Další metodou vizualizace pomocí fluorescenční mikroskopie a naší poslední částí bakalářské práce byla vizualizace bakterií v kalu. Tato metoda je optimální např. při odstranění škodlivin z prostředí nebo při výzkumu čištění odpadních vod. Na fluorescenčním mikroskopu jsme pozorovali životaschopnost bakteriálních kmenů v reaktorech čističek odpadních vod. LIVE/DEAD testy jsou určeny právě ke zkoumání a pozorování živých a mrtvých buněk. Poznali jsme také metodu FISH, která nezobrazovala živé nebo mrtvé buňky, ale vizualizovala pouze bakterii, kterou jsme chtěli, v našem případě to byla bakterie *Microthrix*. Tato metoda přináší spoustu nových poznatků, které jsou průmyslově využitelné.

## Seznam použité literatury

- [1] ŠIMA, Jozef. *Fotochémia: princípy a aplikácie*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2011. ISBN 978-80-227-3440-0
- [2] WARDLE, Brian. *Principles and applications of photochemistry*. Chichester, U. K.: Wiley, 2009. ISBN 04-700-1494-6
- [3] DVOŘÁK, Lubomír a Zdeněk KUPKA. *Fyzikální podstata a využití luminiscence*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1980. Odborná literatura pro učitele
- [4] Fyzik James Clerk Maxwell. Dostupný z WWW: <http://www.converter.cz/fyzici/maxwell.htm>
- [5] LAPČÍK, Lubomír, Michal ČEPPAN a Peter PELIKÁN. *Fotochemické procesy*. Bratislava: Alfa, 1989. ISBN 80-050-0049-9
- [6] VANČURA, Antonín. *Elementární částice*. Praha: Academia, 1970. Cesta k vědě (Academia)
- [7] PELANT, Ivan a Jan VALENTA. *Luminiscenční spektroskopie*. Praha: Academia, 2006. ISBN 80-200-1447-0
- [8] LAKOWICZ, Joseph R.. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. Ilustrované vydání. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0-387-31278-1
- [9] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER. *Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky*. Brno: Vutium, 2000. ISBN 80-214-1868-0
- [10] *Fluorofory v biomedicíně* [online]. [Cit. 2018-06-20]. Dostupné také z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfsar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [11] *Molecular Probes: The Handbook* [online]. [Cit. 2018-06-20]. Dostupné také z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>



- [12] FIŠAR, Zdeněk: *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách*. Dostupné také z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf>
- [13] *HandBook of optical filters* [online]. [Cit. 2018-06-20]. Dostupné také z: <https://www.chroma.com/sites/default/files/HandbookofOpticalFilters.pdf>
- [14] Herman, B. Wells. *Fluorescence Microscopy*, 2nd Ed.; SpringerVerlag: New York, 1998
- [15] ABRAMOWITZ, Milton. *Fluorescence Microscopy: The Essentials*; Olympus America, Inc., Melville, New York, 1993
- [16] KREMER, Bruno P. *Mikroskop zcela jednoduše: preparace, barvení a digitální mikrofotografie krok za krokem*. Praha: Aventinum, 2013. Fotografické atlasy. ISBN 978-80-7151-372-8
- [17] HOŠEK, Jan. *Úvod do nanotechnologie*. V Praze: České vysoké učení technické, 2010. ISBN 978-80-01-04555-8
- [18] DRUMMEN, Gregor. *Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques Illuminating Biological and Biomedical Research*. 2012, 17(12), 14067-14090 [cit. 2018-06-20]. DOI 10.3390/molecules171214067/ ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/12/14067/>
- [19] ROSINA, Jozef. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-4237-3
- [20] DRBOHLAVOVÁ, Jana. *Nanomateriály pro biomedicínské aplikace: Nanomaterials for biomedical applications: zkrácená verze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-214-5285-5
- [21] RIMPELOVÁ, Silvie a Tomáš RUML. *Od mikroskopie k nanoskopii*. Biorprospect. 2014, 24(4), 83. ISSN 1210-1737. Dostupné také z: <http://bts.vscht.cz/?q=node/19>

[22] SEHADOVÁ, H., J. NEBESÁŘOVÁ a R. KAŇA. *Mikroskopy v rukou biologů*. Vesmír. 2015, 94(6), 348-351. ISSN 0042-4544. Dostupné také z: <http://casopis.vesmir.cz/>

[23] ROSINA, Jozef, Hana KOLÁŘOVÁ a Jiří STANEK. *Biofyzika pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1383-7

[24] ŠLAMBOROVÁ I., ZAJÍCOVÁ, V., KARPÍŠKOVÁ J. A EXNAR P. *Immobilisation of antibiotic tetracycline on silica nanofibres*. Vlákná a Textil. 2012, 19(2), 3-9. ISSN 1335-0617

## Seznam obrázků

Obrázek 1: *Elektromagnetické spektrum*

Obrázek 2: *Jabloňského diagram znázorňující energetické hladiny a energetické přechody molekuly*

Obrázek 3: *Stokesův pokus s roztokem chininu*

Obrázek 4: *Stokesův posun- excitační a emisní pásma*

Obrázek 5: *Schéma excitace a emise fluorochromu*

Obrázek 6: *Konstituční vzorec - fluorescein-5-isothiokyanát*

Obrázek 7: *Ukázka koncentrace roztoku APTES + FITC*

Obrázek 8: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 5 minut*

Obrázek 9: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 5 min*

Obrázek 10: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 30 minut*

Obrázek 11: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 30 min*

Obrázek 12: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,01%, 1 hodina*

Obrázek 13: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,01%, 1 hod*

Obrázek 14: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina*

Obrázek 15: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina, pseudocolour*

Obrázek 16: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 0,08%, 1 hodina, greyscale*

Obrázek 17: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 1%, 1 hodina, pseudocolour*

Obrázek 18: *Nanovlákná pokrytá FITC, koncentrace 1%, 1 hodina, greyscale*

Obrázek 19: *Fluorescenční mikroskop LEICA DM6000B*

Obrázek 20: *Nanovlákná pokrytá tetracyklinem, koncentrace 0,08%, 1 hodina*

Obrázek 21: *Test LIVE/DEAD na bakteriích kalu*

Obrázek 22: *Test LIVE/DEAD na bakteriích kalu - živé a mrtvé buňky*

Obrázek 23: *Pozorování očkované bakterie *Micrococcus luteus**

Obrázek 24: *Pozorování bakterie *Microthrix* pomocí FISH*

## Seznam tabulek

Tabulka 1: *Příprava koncentrací 5 roztoků APTES*

Tabulka 2: *Příprava 0,08%; 0,01% a 1% roztoku APTES*

Tabulka 3: *Kalibrační křivka zvolených roztoků*

Tabulka 4: *Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (1min, 5min)*

Tabulka 5: *Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (30min, 1 hod)*

Tabulka 6: *Zjištění FITC v závislosti na různých koncentracích a čase (2hod, 4hod)*

Tabulka 7: *Hodnoty pro výpočet aktivity fluorescence*

## **Seznam grafů**

Graf 1: *Logaritmický graf intenzity fluorescence v závislosti na FITC*

Graf 2: *Lineární závislost nižších hodnot intenzity fluorescence a FITC*

Graf 3: *Kalibrační křivka aminokyseliny L-tyrosinu*