



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

MĚŘENÍ MEMBRÁNOVÉHO NAPĚTÍ POMOCÍ NAPĚŤOVĚ CITLIVÝCH BARVIV VE FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPII

MEMBRANE POTENTIAL MEASUREMENT WITH VOLTAGE SENSITIVE DYES
IN FLUORESCENCE MICROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAN TKÁČ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO, 2013



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské inženýrství a bioinformatika

Student: Bc. Jan Tkáč
Ročník: 2

ID: 121612
Akademický rok: 2012/2013

NÁZEV TÉMATU:

**Měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv
ve fluorescenční mikroskopii**

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proved'te literární rešerši v oblasti metod fluorescenční a konfokální mikroskopie s využitím napětově citlivých barviv pro měření změn membránového napětí. Seznamte se s elektrofyziologií buňky. 2) Vybte vhodnou metodu měření membránového napětí s využitím napětově citlivých sond. 3) Navrhněte postup měření membránového napětí na dostupných volných buňkách s využitím napětově citlivé sondy DI-4-ANEPPS na konfokálním mikroskopu. 4) Realizujte měření s navrženou metodou a proved'te analýzu získaných snímků. Měření kvantitativně vyhodno'te. 5) Srovnajte výsledky s modelovým řešením membránového napětí. 6) Proved'te diskuzi k získaným výsledkům.

DOPORUCENÁ LITERATURA:

- [1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer, 2006. ISBN-13: 978-0387312781.
[2] GONZALES, R. C. Digital Image Processing, 2007. ISBN-13: 978-0131687288.

Termín zadání: 11.2.2013

Termín odevzdání: 24.5.2013

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel
Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
Předseda oborové rady

UPOZORNENÍ:

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 následku 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

Cílem této práce je sestavit literární rešerši v oblasti měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv a navrhnout postup měření membránového napětí na dostupných buňkách s využitím napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS a realizovat ho. Práce obsahuje úvod do elektrofyzologie živočišných buněk, vysvětluje fluorescenci a její typické vlastnosti a věnuje se popisu fluorescenčního mikroskopu. Dokument se z části věnuje charakterizaci a rozdělení napětově citlivých barviv. Velká část práce obsahuje popis realizace a měření experimentu. V dokumentu jsou také zahrnuty různé metody měření a zpracování všech výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buněčná membrána, membránový potenciál, fluorescence, fluorescenční mikroskopie, napětově citlivá barviva, rychle reagující sondy, di-4-ANEPPS

ABSTRACT

The aim of this work is to make a literature search in the measurement of membrane voltage using voltage-sensitive dyes and suggest a method for measuring the membrane voltage on the available cells using the voltage-sensitive dye di-4-ANEPPS and its further implementation. The work contains an introduction to electrophysiology of cells, and explains typical fluorescence characteristics. The thesis contains the description of a fluorescence microscope. The document presents characteristics of voltage-sensitive dyes and their distribution. A large part of the work describes the implementation and measurement of the experiment. The document also includes different methods for measuring and processing of all results.

KEYWORDS

Cell membrane, membrane potential, fluorescence, fluorescence microscopy, voltage-sensitive dyes, fast response probes, di-4-ANEPPS.

TKÁČ, J. *Měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv ve fluorescenční mikroskopii*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 53 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vratislav Čmiel.

Prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma Měření membránového napětí pomocí napětově citlivých barviv ve fluorescenční mikroskopii jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením tohoto projektu jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si 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. 40/2009Sb.

V Brně dne 24. května 2013

.....

podpis autora

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi za odborné vedení, konzultace a další cenné náměty a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne 24. května 2013

.....

podpis autora

Obsah

Úvod	4
1. Elektrofyzilogie buněk.....	5
1.1 Popis buňky	5
1.2 Buněčná membrána	6
1.3 Klidové membránové napětí.....	7
2. Fluorescence	9
2.1 Fluorescenční mikroskop.....	11
3. Konfokální mikroskopie	13
4. Napětově závislá barviva	17
4.1 di-4-ANEPPS.....	18
5. Experiment	20
5.1 Popis experimentu.....	20
5.2 Příprava vzorku	21
5.3 Elektrodový systém.....	22
5.4 Zpracování výsledků	24
5.5 Program pro zpracování výsledků	26
5.6 Naměřené výsledky s použitím elektrodového systému	30
5.7 Metoda založená na výměně roztoků	37
5.7.1 Příprava roztoků	40
5.7.2 Naměřené hodnoty	42
Závěr	45
Použitá literatura	47
A. Popis přiložených souborů na CD	53

Seznam obrázků

obr. 1: Obrázek typické bakterie a lidské buňky. Eukaryota ukazuje typické uspořádání vnitřních organel, včetně jádra. Na prokaryotické buňce lze vidět bakteriální DNA, která se nachází v nukleotidu [3].....	5
obr. 2: Náhradní elektrické schéma buněčné membrány	8
obr. 3: Spektrum viditelného světla.....	10
obr. 4: Zobrazený cyklus fluorescence rozdělený na čtyři fáze (1 - excitace, 2 - přesunutí molekuly do nejnižšího energetického excitovaného stavu, 3 – emise světla a návrat fluoroforu do jeho ustáleného stavu , 4 – excitační záření).....	10
obr. 5: Základní princip fluorescenčního mikroskopu [15]	11
obr. 6: Princip konfokálního mikroskopu [13].....	13
obr. 7: Skenovací jednotka konfokálního mikroskopu [13]	15
obr. 8: Mechanismus rychlých a pomalých barviv [18]	17
obr. 9: Chemická struktura napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS.....	18
obr. 10: Excitační (modré) a emisní (červené) spektrum navázaného barviva di-4-ANEPPS [19]	19
obr. 11: Rozložení náboje na buňce při vložení buňky do elektrického pole	20
obr. 12: Závislost velikosti napětí na membráně, vzhledem k její pozici.....	21
obr. 13: Snímek buňky pod konfokálním mikroskopem při použití di-4-ANEPPS barviva (zvětšení mikroskopu 64x).....	22
obr. 14: Vyrobený elektrodový systém	23
obr. 15: Screenshot programového prostředí mikroskopu.....	24
obr. 16: Naměřené emisní spektrum vzorku	25
obr. 17: Nastavení akvizičních parametrů snímaného obrazu v programovém prostředí mikroskopu	26
obr. 18: Hlavní okno programu. Vlevo se nachází ovládací panel pro práci s naměřenými daty, vpravo jsou informace o analyzované sekvenci dat.....	27
obr. 19: Okno s nasnímanou buňkou pro výběr oblasti určené k detekci jasového profilu celé sekvence	28
obr. 20: Vykreslení jasových křivek vypočtených programem před a po filtraci. Červená část značí signál při spuštěných pulzech, v modré části byly pulsy vypnuty.	29

obr. 21: Originální nasnímaná sekvence z konfokálního mikroskopu postižená šumem. Sekvence odpovídá číslu měření 22 z tab. 2	30
obr. 22: Filtrovaný jasový profil sekvence číslo 1 z tab. 2 a namodelované stimulační napětí s hodnotami v rozmezí 0 až 30 mV. Velikost okna filtru je 5.....	32
obr. 23: Filtrované sekvence pro rozlišení 512 x 512 pixelů. Čísla u grafů odpovídají číslu sekvence z tab. 2. U obou sekvencí jsme použili velikost okna filtru 3	33
obr. 24 Filtrované sekvence pro rozlišení 128 x 128 pixelů. Čísla u grafů odpovídají číslu sekvence z tab. 2. U sekvence čísla 4 jsme použili filtr o velikosti okna 3, u páté sekvence byla velikost okna 13 a u sedmé 9.....	34
obr. 25: Nasnímaná sekvence číslo 14 s rozlišením 64 x 64 pixelů před a po vyfiltrování signálu (velikost okna - 7)	35
obr. 26: Filtrované sekvence pro rozlišení 64 x 16 pixelů. Čísla u grafů odpovídají číslu sekvence z tab. 2. U sekvence čísla 18 jsme použili filtr o velikosti okna 13, u dvacáté sekvence byla velikost okna 11 a u dvacáté třetí 21	36
obr. 27: Posun emisního spektra, kde λ_B značí změnu fluorescence v „modré“ části, tedy při nižších hodnotách vlnové délky a λ_R značí změnu fluorescence v „červené“ části, tedy při vyšších hodnotách vlnových délek [26]	38
obr. 28: Schéma přečerpávání roztoků	39
obr. 29: Obrázek nasnímané buňky před výměnou roztoků (a.) a po výměně roztoků (b.).....	42
obr. 30: Výběr oblasti membrány pro výpočet relativní odchylky fluorescence	42
obr. 31: Relativní odchylka fluorescence obrazů buňky před a po výměně extracelulárního roztoku	43
obr. 32: Emisní spektra fluorescence před a po výměně roztoků	44

Úvod

Studium elektrofyziologických jevů v laboratořích přináší neustále nové poznatky. Bioelektrické děje a jejich signály hrají důležitou roli pro řízení všech orgánů lidského těla, jako je například kontrakce srdečního svalu, kterou je zajištěna jedna ze základních životních funkcí lidského těla. Snímání elektrických signálů z povrchu těla slouží jako základ pro různé diagnostické metody, jako jsou například elektrokardiografie, elektroencefalografie a jiné. Další úrovní pro snímání biologických signálů je snímání signálů na buněčné úrovni, o které pojednává tato práce.

Cílem této diplomové práce je vytvořit rešerši na téma metody fluorescenční a konfokální mikroskopie s využitím napětově citlivých barviv pro měření změn membránového napětí a vybrat vhodnou metodu měření membránového napětí s využitím napětově citlivých sond. Napětově citlivá barviva umožňují měření membránové elektrické aktivity na buňkách, kde je měření pomocí mikroelektrod nevhodné nebo nedostačující. Jedním z cílů v této práci je navrhnout postup měření membránového napětí na dostupných volných buňkách s využitím napětově citlivé sondy di-4-ANEPPS na konfokálním mikroskopu.

Úvodní kapitoly objasňují základní elektrofyziologii buněk a jejich snímání pomocí moderních zobrazovacích technik. Práce dále pojednává o vlastnostech a funkcích napětově citlivých barviv a je v ní věnována velká část popisu experimentu s těmito látkami.

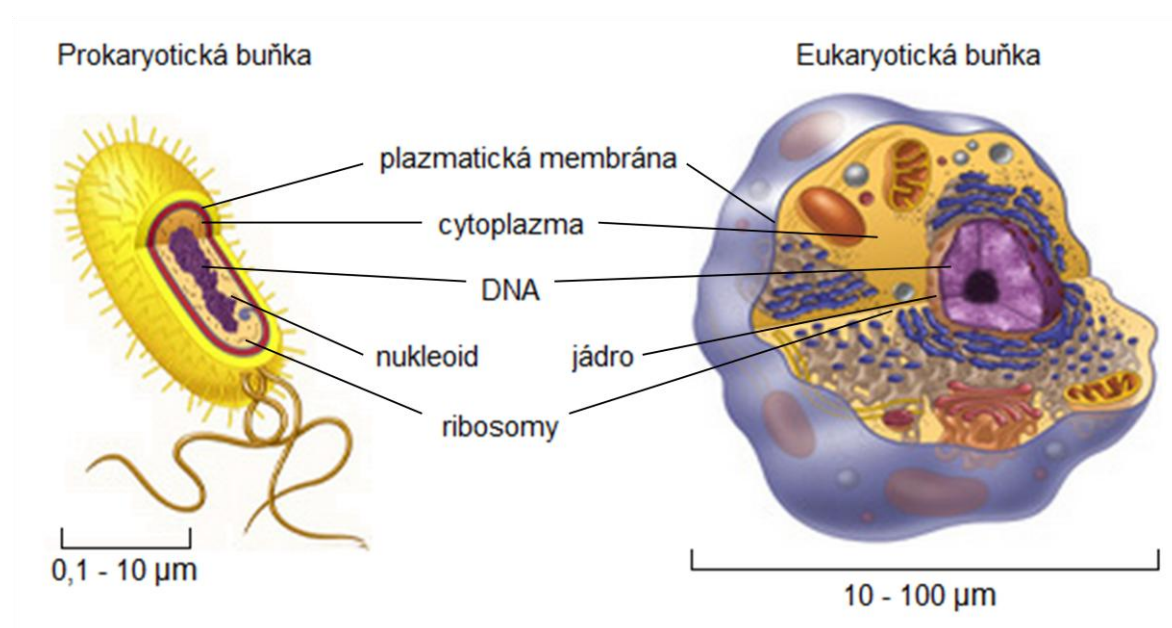
Dalším cílem diplomové práce je realizace experimentu. Experiment ukazuje chování napětově citlivých barviv v konfokální mikroskopii. Tato velká část práce také obsahuje malou kapitolu o jiné metodě, která pomáhá interpretovat výsledky napětově citlivého barviva.

Závěr práce zahrnuje navrhnutí programového prostředí pro přehlednou práci s naměřenými výsledky, ve kterém se snadno analyzují naměřená data. Veškeré výsledky jsou následně zhodnoceny.

1. Elektrofyzologie buněk

1.1 Popis buňky

Buňky jsou základní strukturální a funkční jednotky všech živých organismů. Organismy se dělí na jednobuněčné (např. bakterie), skládající se z jedné buňky a mnohobuněčné, mezi něž patří zejména rostliny, houby a živočichové. Každá buňka může přijímat živiny, převádět je na energii, vykonávat specializované funkce a podle potřeby se množit. Buňky se dělí na dva základní typy: prokaryotické a eukaryotické. Prokaryotické buňky jsou jednobuněčné organismy, které se nerozvíjejí do mnohobuněčných struktur. Některé bakterie rostou ve vláknech nebo ve shluku buněk, ale každá buňka v kolonii je stejná a schopná samotné existence. [1][2][31]



obr. 1: Obrázek typické bakterie a lidské buňky. Eukaryota ukazuje typické uspořádání vnitřních organel, včetně jádra. Na prokaryotické buňce lze vidět bakteriální DNA, která se nachází v nukleotidu [3]

Prokaryoty se od eukaryot liší na základě jaderné organizace, konkrétně nedostatkem jaderné membrány u prokaryot. Tyto buňky také postrádají některé intracelulární organely, které jsou charakteristické pro eukaryotické buňky (obr. 1). Většina z funkcí organel, jakými jsou mitochondrie, chloroplasty nebo Golgiho aparát,

je zajišťována z prokaryotické plazmatické membrány. Genetické informace v prokaryotické buňce jsou obsaženy v nukleoidu pomocí struktury DNA¹. [2][31][36]

Vznik eukaryotické buňky byl milníkem v evoluci života. Přestože eukaryoty používají stejný genetický kód a metabolické procesy jako prokaryoty, vyšší míra jejich organizační komplexnosti dovolila vývoj mnohobuněčných organismů. [1][29]

Mezi eukaryotické organismy patří houby, zvířata, rostliny i některé jednobuněčné organismy. Hlavní a velmi významný rozdíl mezi prokaryoty a eukaryoty je ten, že eukaryotické buňky obsahují organely s membránou, kde probíhají metabolické aktivity buňky. Nejdůležitější rozdíl je přítomnost jádra, kde membrána jádra je obklopena kolem DNA. [2][3][18]

1.2 Buněčná membrána

Buněčná membrána je tenká polopropustná membrána, která obklopuje cytoplazmu buněk. Jejím úkolem je chránit integritu vnitřního prostředí buňky tím, že dovoluje vstup některým látkám do buňky a některým ven. Všechny živé buňky a mnoho organel jsou ohraničeny tenkými membránami. Buněčná membrána je primárně složená ze směsi proteinů a lipidů. V závislosti na funkci a poloze membrány v organismu mohou lipidy tvořit 20 až 80 procent celé membrány, zbytek jsou proteiny. Zatímco lipidy udržují pružnost membrány, proteiny sledují a udržují chemické prostředí v buňce a pomáhají při převodu molekul přes membránu. [4][1]

Základní činnosti buňky jsou přijímání živin a odvádění odpadu. Veškeré látky musí projít buněčnou membránou. Transport látek může probíhat difuzí nebo osmózou. Vylučování látek může dojít také pomocí exostózy, kdy se látky vážou na buněčnou membránu zevnitř, která se pak otevře, aby vytvořila kapsu, a tím jsou odpadní látky vypuzovány do vnějšího prostředí. Na opačném principu funguje endocytóza. Existují také případy, kdy se molekuly pohybují přes membránu z oblasti nízké koncentrace do oblasti s vyšší koncentrací. Pro takový přenos je potřeba zdroje energie, která pumpuje molekuly proti koncentračnímu spádu. Tento proces se nazývá aktivní transport. [5][2][1]

¹ DNA - Deoxyribonukleová kyselina

1.3 Klidové membránové napětí

Z hlediska elektrických jevů na úrovni buňky vynecháme všechny buněčné struktury a soustředíme se pouze na membránu buňky, extracelulární a intracelulární prostředí a ionty, které jsou v obou prostředích obsaženy. Intracelulární a extracelulární koncentrace iontů je různá. V obou prostředích se vyskytují hlavně kationty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} a aniont Cl^- . Jednotlivé koncentrace jsou rozděleny takto:

$$[\text{Na}^+]_e \gg [\text{Na}^+]_i, \quad (1)$$

$$[\text{K}^+]_e \ll [\text{K}^+]_i, \quad (2)$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_e \gg [\text{Ca}^{2+}]_i, \quad (3)$$

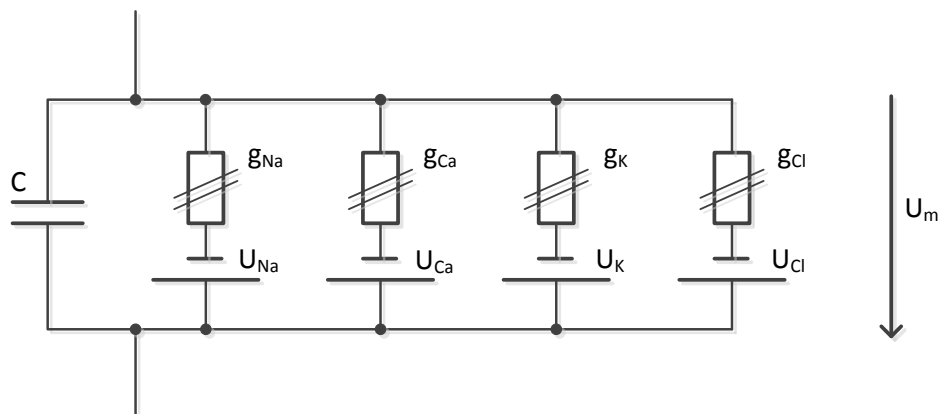
$$[\text{Cl}^-]_e \gg [\text{Cl}^-]_i, \quad (4)$$

kde e značí extracelulární prostředí a i intracelulární prostředí. Nepropustnost iontů přes fosfolipidovou dvojvrstvu umožňuje buňce zachovat různé koncentrace iontů mezi vnitřkem a vnějškem buňky tím, že brání pasivní difuzi iontů z oblasti o vyšší koncentraci do oblasti s nižší koncentrací. Rozdílem elektrických potenciálů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím vznikne membránové napětí. V plasmatické membráně jsou obsaženy kanály a přenašeče, které plní specifické funkce pro zachování klidového membránového napětí. Kanály a přenašeče jsou tvořeny makromolekulami bílkovin a fungují jako transportní mechanismy, kdy umožňují přenos iontů přes nevodivou fosfolipidovou membránu. Pokud se membrána v daném okamžiku stane propustnou pro určité ionty, začnou tyto ionty procházet membránou z místa větší koncentrace do místa s menší koncentrací. Přesunem iontů se naruší elektrická rovnováha a v membráně se vytvoří elektrické pole, které má opačný gradient oproti koncentračnímu gradientu. Při ustálení elektrického proudu protékajícího membránou dojde k rovnovážnému napětí pro dané ionty. Toto rovnovážné napětí je dáno Nernstovou rovnicí

$$U_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X^z]_e}{[X^z]_i}, \quad (5)$$

kde R je plynová konstanta, T absolutní teplota, F Faradayův náboj a z je počet elementárních nábojů, které nese iont X^z . Pro komplexnější popis elektrických jevů na membráně musíme zahrnout všechny ionty, které procházejí přes membránu. Tyto iontové průchody skrz membránu můžeme v elektrickém náhradním schématu buňky

zobrazit jako jednotlivé vodivosti v sérii s napětovými zdroji o velikosti rovnovážného napětí jednotlivých kanálů. Fosfolipidová dvojvrstva izoluje dvě vodivá prostředí a můžeme ji nahradit kapacitou. Spojením jednotlivých složek získáme náhradní elektrické schéma membrány buňky (obr. 2). [6][7][8][19]



obr. 2: Náhradní elektrické schéma buněčné membrány

Z předchozího výkladu a vytvořeného náhradního elektrického schématu buňky můžeme určit klidové membránové napětí (U_{mk}) pomocí vztahu

$$U_{mk} = \frac{g_{Na}U_{Na} + g_KU_K + g_{Ca}U_{Ca} + g_{Cl}U_{Cl}}{g_{Na} + g_K + g_{Ca} + g_{Cl}}, \quad (6)$$

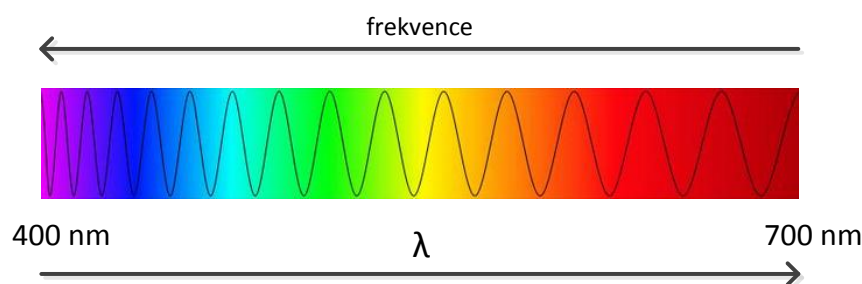
kde g představuje vodivosti a U je napětí jednotlivých iontů. Reálná buněčná membrána obsahuje mnohem více prvků, ale pro základní pochopení funkce klidového membránového napětí postačí popsání části náhradního schématu. [6][8][19][33]

2. Fluorescence

Pro detekci, zobrazení buněčných struktur a procesů na buněčné úrovni se již dlouho využívají barviva. Dnes mnoho používaných barviv obsahuje fluorescenční vlastnosti, jelikož fluorescenční molekuly mohou být detekovány s mimořádnou přesností a selektivitou. Luminiscence je emise světla z jakékoliv látky a nastane od elektronicky excitovaných stavů. Luminiscence je formálně rozdělena do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence – v závislosti na povaze excitovaného stavu. Některé buňky jsou po absorpci světelné energie schopné excitace do vyššího energetického stavu. Energie excitovaného stavu, kterou nelze udržet na dlouhou dobu, se zmenšuje, což má za následek emisi světelné energie. Tento proces vyzařování světla se nazývá fluorescence. [9][10]

Látka potřebná pro fluorescenci je fluorofor, což je molekula, která je schopna fluoreskovat. Ve svém základním stavu má molekula fluoroforu relativně malou energii, stabilní uspořádání a nemůže fluoreskovat. Při dopadu světla z externího zdroje záření na molekulu fluoroforu může molekula absorbovat světelnou energii. Pokud je absorbovaná energie dostatečná, molekula se dostane do vyššího energetického stavu, tzv. excitovaného stavu. Tento proces se nazývá excitace. [12][30]

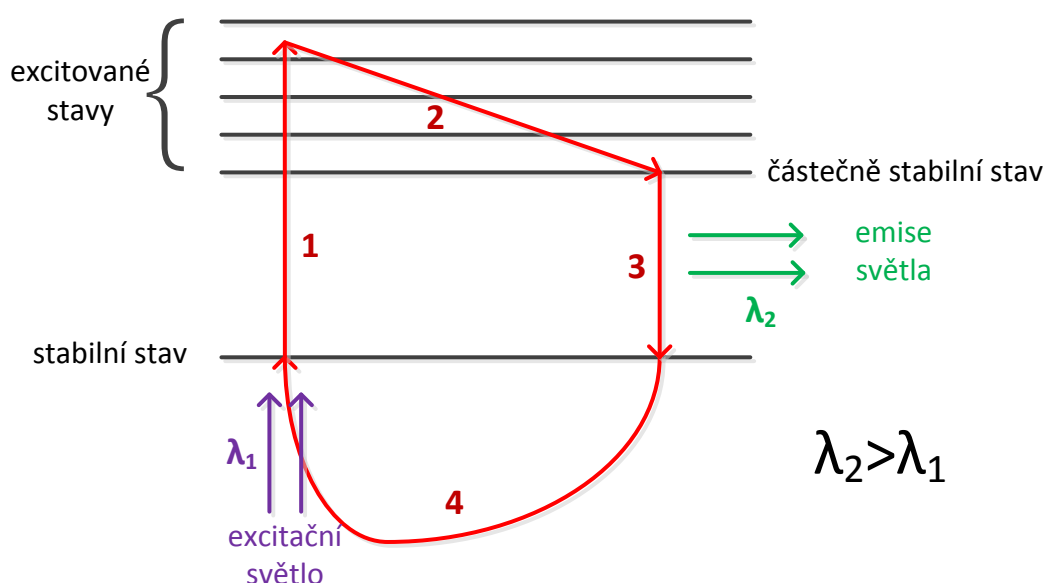
Existuje několik excitovaných stavů, neboli energetických hladin, na které fluorofor může dosáhnout v závislosti na vlnové délce a energii světelného zdroje. Vzhledem k tomu, že fluorofor je nestabilní na vyšších excitovaných hladinách, dochází k přesunutí molekuly do nejnižšího energetického excitovaného stavu, který je částečně stabilní. Čas, kdy je fluorofor v excitovaných stavech, se nazývá excitační doba a je v rozmezí 10^{-15} až 10^{-9} sekund. Po uplynutí excitační doby se fluorofor přeskupí z částečně stabilního stavu zpátky na základní stav, přičemž se uvolní přebytek energie a dojde k vyzařování (emisi) světla. Pokud emise přetrvává déle po ukončení excitačního světla, vzniká jev zvaný fosforescence. Viditelné spektrum světla je v rozmezí přibližně od 400 nm po 700 nm. Světlo s kratší vlnovou délkou má vyšší frekvenci a větší energii než světlo s delší vlnovou délkou, které má naopak nižší frekvenci a tím i menší energii (obr. 3).



obr. 3: Spektrum viditelného světla

Jelikož emitované světlo má menší energii než světlo absorbované, dojde k posunu mezi spektrem světla absorbovaného fluoroforem během excitace a spektrem emitovaného světla. Z toho plyne, že emitované světlo bude mít jinou barvu než světlo absorbované molekulou. [9][12][14]

Emise světla vrací fluorofor do jeho původního ustáleného stavu. Molekula je schopná absorbovat energii znovu a může projít celým procesem opakovaně (obr. 4). Tato vlastnost umožní molekule generovat světelný signál vícekrát, což je velmi užitečné ve fluorescenční mikroskopii, kde se tohoto jevu využívá, jelikož tím umožní velmi citlivé snímání biologických preparátů. [41][42]

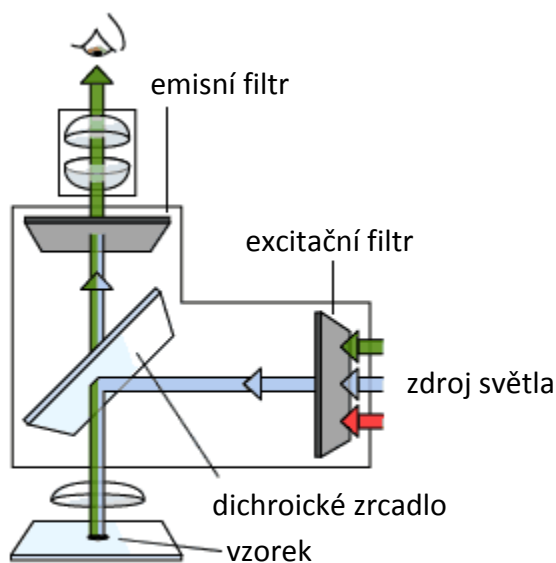


obr. 4: Zobrazený cyklus fluorescence rozdělený na čtyři fáze (1 - excitace, 2 - přesunutí molekuly do nejnižšího energetického excitovaného stavu, 3 - emise světla a návrat fluoroforu do jeho ustáleného stavu, 4 - excitační záření)

Reálně fluorofor nemůže emitovat světlo donekonečna. Struktura molekuly je v excitovaných stavech nestabilní a je náchylná k degradaci. Při opakovaném ozařování vzorku může dojít k destrukci molekuly, tím se ukončí cyklus fluorescence a sledovaný vzorek postupně ztrácí celkovou intenzitu emisního záření a dochází k vybělování vzorku (photobleaching).[9][12][13][16]

2.1 Fluorescenční mikroskop

Základní funkcí fluorescenčního mikroskopu je ozáření vzorku s požadovaným specifickým pásmem vlnových délek a následné oddělení mnohem menší emitované fluorescence z excitačního světla. Při správné konfiguraci mikroskopu dopadá na detektor emise světla tak, aby se výsledné fluorescenční struktury překrývaly s vysokým kontrastem proti velmi tmavému pozadí. Limity detekce jsou obvykle dány tmavostí pozadí a excitační světlo je typicky několik set tisíc až milionkrát jasnější než je emitovaná fluorescence. [12][14][17][20]



obr. 5: Základní princip fluorescenčního mikroskopu [43]

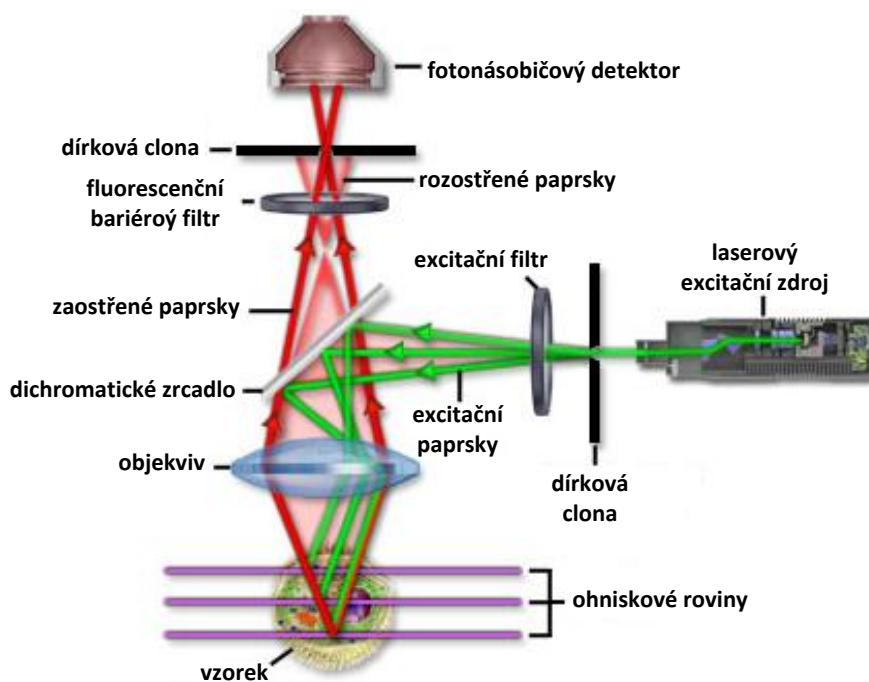
Základní princip fluorescenčního mikroskopu je zobrazen na obr. 5. Jelikož pro excitaci molekul fluoroforu je potřeba specifické excitační světlo o daných vlnových délkách, musíme umístit za světelný zdroj excitační filtr, který propouští pouze požadované vlnové délky. Typickým světelným zdrojem je xenonová lampa nebo rtuťová výbojka. Světlo o excitační vlnové délce odražené od dichroického

zrcadla je přes objektiv zaměřeno na vzorek. Vyzářená energie ze vzorku prochází zpátky objektivem přes dichroické zrcadlo, které propouští světlo dále na emisní filtr. Ten propustí potřebné emitované světlo do okuláru a následně může dojít k detekci fluorescence. [10][15][43]

Moderní fluorescenční mikroskopy kombinují velkou kvalitu optických komponent s výkonnými počítačovými prvky. Tím je při digitálním snímání obrazu dosaženo velmi vysoké kvality snímání, ta pak daleko převyšuje prosté pozorování, které má lidské oko. [10][14][16]

3. Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopy nabízejí několik výhod oproti běžným optickým mikroskopům. Mohou ovládat hloubku ostrosti, eliminovat z obrazu rozostřené prvky a jejich velkou výhodou je vyšší rozlišovací schopnost daná detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Klíčem konfokální mikroskopie je použití prostorové filtrace k odstranění části mimo zaostření světla, nebo odlesků ve vzorcích, které mají větší tloušťku než rovina zaostření. Zde nastal obrovský průlom v popularitě konfokální mikroskopie v posledních letech. Částečně kvůli relativní snadnosti, s níž může mimořádně kvalitní snímky získat ze vzorků připravených pro konvenční optickou mikroskopii, a také kvůli velkému množství aplikací v mnoha oblastech současného vědeckého výzkumu. [44][13][14]



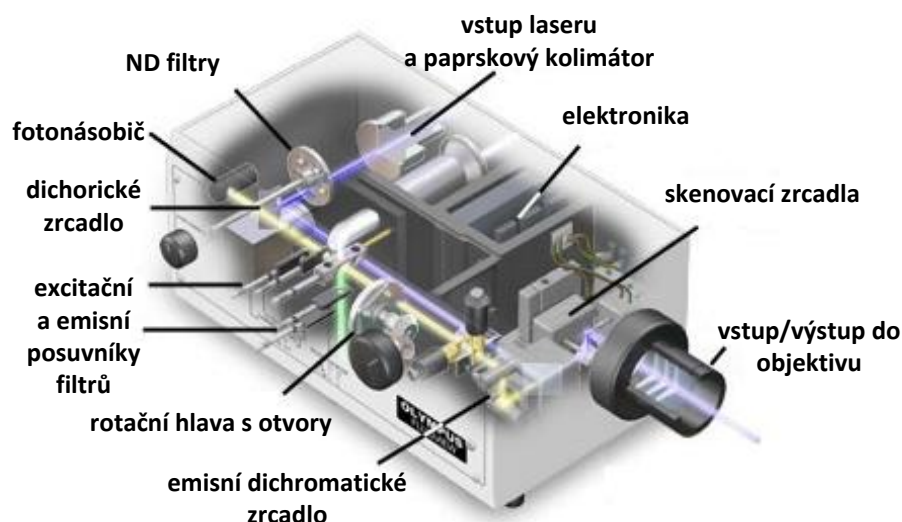
obr. 6: Princip konfokálního mikroskopu [13]

Konfokální princip laserového skenování je schematicky uveden na obr. 6. Koherentní světlo emitované z laserového systému (excitační zdroj) prochází malým otvorem, který se nachází v konjugované rovině (konfokální) se skenovacím bodem na vzorku a druhé clony umístěné v přední části detektoru (fotonásobiče). Laser se odrazí od dichromatického zrcadla a skenuje napříč vzorkem v definované

ohniskové rovině, sekundární fluorescence vyzařované z bodů na vzorku (ve stejné ohniskové rovině) projde zpět přes dichromatické zrcadlo a clonu, kde je signál detekován. [13][20][37]

Významné je množství fluorescenčního záření, které se vyskytuje v bodech nad a pod ohniskovou rovinou a tvoří tzv. rozostřené roviny. Jen malá část rozostřeného záření projde konfokální bodovou clonkou a většina z tohoto vnějšího světla není detekována fotonásobičem a nepřispívá k výslednému obrazu. Dichromatické zrcadlo, bariérový filtr a excitační filtr plní podobné funkce jako identické komponenty ve fluorescenčním mikroskopu. [14][13][26]

V tradiční fluorescenční mikroskopii je celý vzorek podroben intenzivnímu osvětlení z nekoherentního zdroje a výsledný obraz ze sekundární fluorescenční emise lze zobrazit přímo v okulárech, nebo se promítá na povrch elektronického pole detektoru. Na rozdíl od tohoto jednoduchého konceptu, je mechanismus vytváření obrazu v konfokální mikroskopii zásadně odlišný. Jak bylo uvedeno výše, konfokální fluorescenční mikroskop se skládá z několika laserových zdrojů buzení, skenovací hlavy s optickými a elektronickými součástkami, elektronických detektorů (obvykle fotonásobiče) a počítačem pro získávání, zpracování, analyzování a zobrazování obrazů. Skenovací hlava je v centru konfokálního systému a je zodpovědná jak za rastrování, tak za sběr fotonových signálů ze vzorku, které jsou nutné k sestavení výsledného obrazu. Typická skenovací hlava obsahuje vstupy z externích laserových zdrojů, fluorescenčních filtrů, dichromatického zrcadla, rastrovacího snímacího zrcadlového systému, variabilní clony pro generování konfokálního obrazu a detektorů fotonásobiče naladěných na různé fluorescenční vlnové délky. [14][27][45]



obr. 7: Skenovací jednotka konfokálního mikroskopu [13]

V konfokálním mikroskopu jsou fotonásobičové detektory a laserový zdroj světla odděleny od snímaného vzorku objektivem. Komponenty vnitřního fluorescenčního filtru (např. excitační a bariérové filtry, dichromatické zrcadla) a ND² filtry jsou obsaženy v rámci skenovacího zařízení (obr. 7). Interferenční a ND filtry se nachází v rotující hlavě, kterou lze vložit do světelné dráhy. Excitační laserový paprsek je propojen se skenovací jednotkou optickým vláknem, po kterém následuje paprskový expandér, který umožňuje tenkému laserovému paprsku zcela zaplnit místo objektivu za clonou (viz. obr. 6). [13][44][45]

Jedním z nejdůležitějších prvků skenovací jednotky je dírková clona, která funguje jako prostorový filtr na sdružené obrazové rovině umístěné přímo před fotonásobičem. Obvykle mikroskopy obsahují více clon s různou velikostí otvoru. Clony slouží k vyloučení fluorescenčních signálů, které se nachází mimo zaostřenou rovinu umístěných nad a pod ohniskovou rovinou, které jsou promítané clonou jako interferenční proužky, které mají průměr větší než ty, které tvoří obraz. Tyto interferenční proužky jsou rozloženy na poměrně velké ploše, takže jen malá část světla pocházejícího z rovin mimo ohnisko prochází otvorem clony. Tato clona také

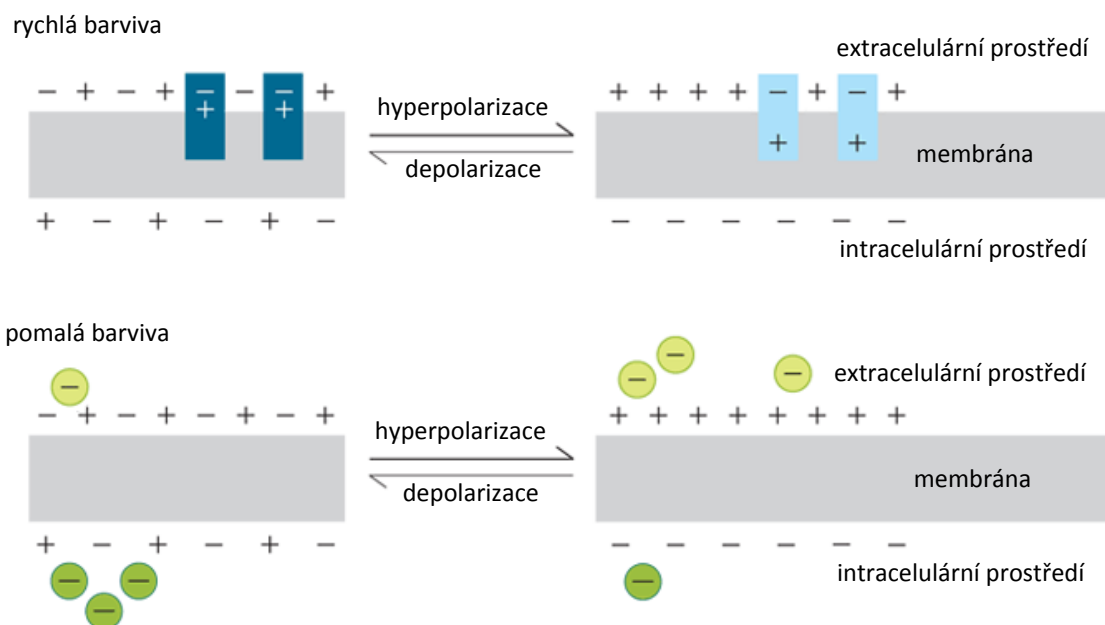
² ND filtr (neutral density – šedý filtr) je filtr, který redukuje, nebo modifikuje intenzitu všech vlnových délek světla (ideálně stejnoměrně).

slouží pro odstranění velkého množství rozptýleného světla procházejícího optickým systémem. [13][14][21]

Nevýhody konfokální mikroskopie jsou zejména dány omezením počtem excitačních vlnových délek u použitého laseru, který pracuje ve velmi úzkých pásmech vlnové délky a pro ultrafialové oblasti je výroba nákladná. Další nevýhoda je škodlivý charakter vysoké intenzity záření na živé buňky a tkáně. Konfokální mikroskopy jsou pro své vlastnosti, i přes své nevýhody, nenahraditelnými přístroji v některých odvětvích vědy. [23][44][45]

4. Napětově závislá barviva

Optická měření membránového potenciálu pomocí napětově citlivých barviv jsou prospěšná v mnoha různých podmínkách. Jednou z výhod je měření z mnoha míst najednou. Tohoto se využívá zejména ve zkoumání nervového systému, kdy je aktivní řada míst, které potřebujeme snímat současně. Velkou výhodou je neinvazivní měření na preparátech. Kromě toho můžeme použít optické měření tam, kde není možné použít klasické elektrody z důvodu velmi malých rozměrů nebo tam, kde by elektrody mohly poškodit zkoumaný vzorek. Některé optické vlastnosti barviv vázaných na membránu jsou citlivé na membránový potenciál včetně fluorescence, absorpce, dichroismu, dvojlomu a jiných. Nicméně většina používaných barviv se týká fluorescence nebo absorpce. Barviva, která mají tyto vlastnosti, jsou rozdělena do dvou skupin, pomalá a rychlá. Pomalá barviva reagují na změny potenciálu v rozmezí milisekund až sekund a používají se pro měření klidového potenciálu ve velkém souboru identických buněk. Jejich pomalé odezvy z nich dělají nevhodná barviva pro použití u rychlejších druhů nervové aktivity. Odezva u rychlých barviv je řádově v mikrosekundách. Změny jsou malé, ale řada barviv je dostatečně citlivá i pro změny u akčního potenciálu. [24][46][47][49][38]

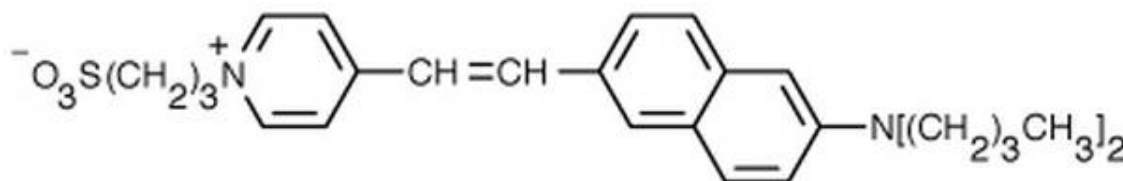


obr. 8: Mechanismus rychlých a pomalých barviv [46]

Barviva s rychlou odezvou procházejí elektrickým polem řízeným změnami v intramolekulárním rozložení náboje, které vytvářejí odpovídající změny spektrálního profilu nebo intenzity jejich fluorescence (barevné změny v obr. 8). Pomalá barviva jsou tvořena lipofilními anionty nebo kationty, které jsou přemístěny přes membránu prostřednictvím elektroforetického mechanismu. Fluorescenční změny spojené s membránovým přerozdělením vzniknou z důsledků citlivosti barviva k intracelulárnímu a extracelulárnímu prostředí. Proto rychlost odezvy je dána rychlostí základních procesů – rychlá intramolekulární redistribuce elektronů oproti relativně pomalému transportu molekul přes membránu. [20][25][46][49][39]

4.1 di-4-ANEPPS

ANEP³ barviva jsou velmi dobré citlivé sondy pro detekci malých změn membránového napětí. Di-4-ANEPPS⁴ (obr. 9) má poměrně rovnoměrnou změnu intenzity fluorescence (10 % na 100 mV) v různých tkáních, buňkách a membránách.



obr. 9: Chemická struktura napětově citlivého barviva di-4-ANEPPS

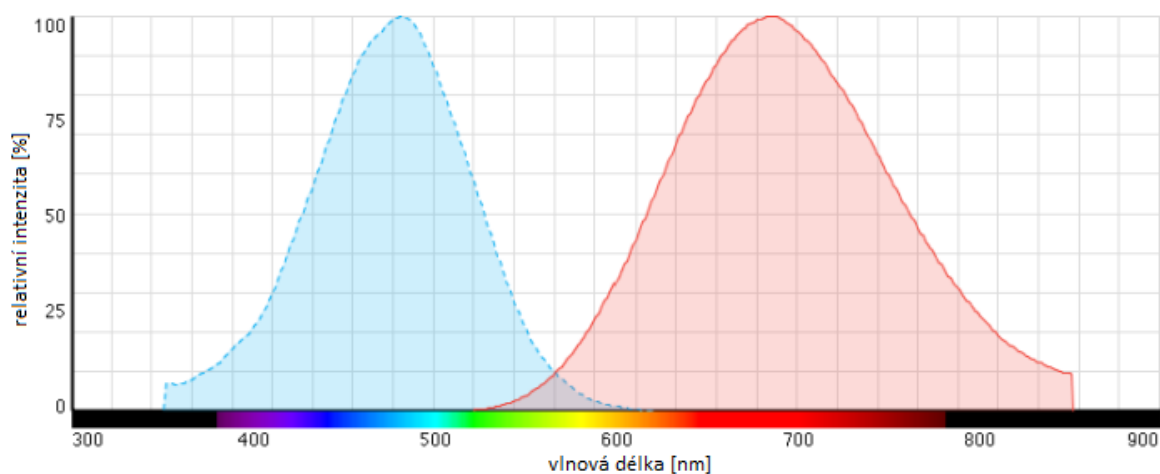
Při použití těchto látek barviva procházejí změnami v jejich elektronové struktuře, a proto se mění jejich fluorescenční spektrum v závislosti na změnách v okolním elektrickém poli. Tato optická odezva je dostatečně rychlá pro použití v měření excitabilních buněk. Tyto barviva navíc zobrazí napětově závislý posun v jejich excitačním spektru, což umožní kvantifikaci membránového potenciálu. [25][47][50][32]

Barviva typu ANEPP samy o sobě nevykazují fluorescenci. Jejich fluorescenční spektrum se projeví až při navázání na dané látky. Proto se maxima

³ ANEP - aminonaphthylethenylpyridinium

⁴ Molekulární vzorec barviva: C₂₈H₃₆N₂O₃S

excitačních a emisních spekter u těchto barviv mění v závislosti na prostředí, v němž je barvivo navázané. [47]



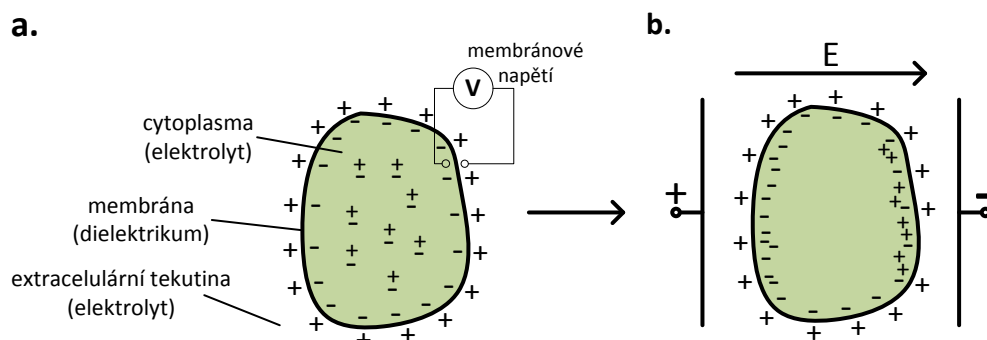
obr. 10: Excitační (modré) a emisní (červené) spektrum navázaného barviva di-4-ANEPPS [47]

Excitační vlnové délky pro měření u těchto barviv se pohybují v rozmezí hodnot okolo 450 až 510 nm. Emise fluorescence lze detekovat nad hodnoty 570 nm, přitom maximum emisního spektra se pohybuje kolem hodnoty 780 nm. Stokesův posun barviva di-4-ANEPPS je tedy přibližně 210 nm (obr. 10). Tyto hodnoty uvádí výrobce pro navázané barvivo na buňky v roztoku při použití pufru o hodnotě pH 7,4. [21][47][48]

5. Experiment

5.1 Popis experimentu

Pro biology je buňka základní stavební jednotka života, která obsahuje řadu různých organel plnící své specifické úkoly a společně umožňují buňce, aby vykonávala své životně důležité funkce. Z elektrického hlediska však vnitřní struktura není příliš důležitá a na buňku lze pohlížet jako na vodivou cytoplasmu ohraničenou izolační membránou, která je obklopena vodivou extracelulární tekutinou. Malá nerovnováha v koncentraci iontů, s přebytkem iontů nahromaděných v blízkosti membrány způsobují výsledné klidové membránové napětí (obr. 11a). Umístěním buňky do elektrického pole způsobíme lokální redistribuci náboje na obou stranách membrány (obr. 11b). [51][40]



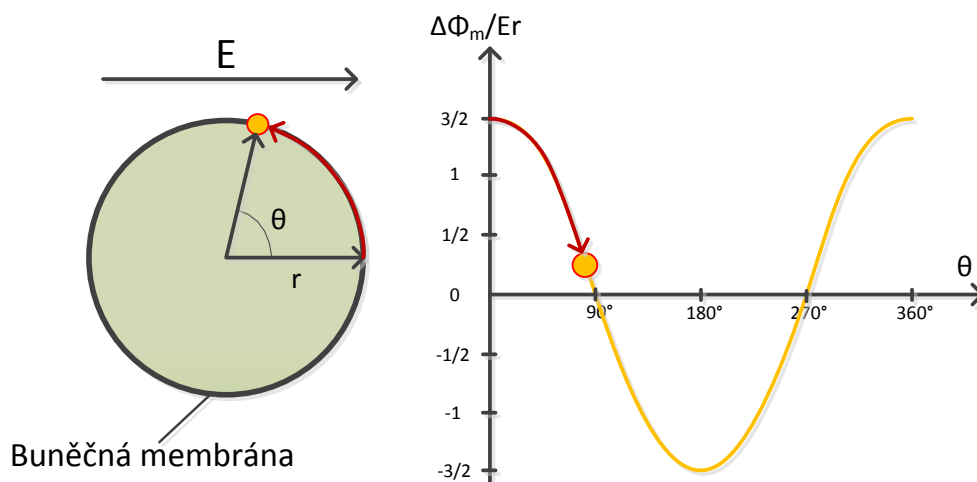
obr. 11: Rozložení náboje na buňce při vložení buňky do elektrického pole

Výsledkem je indukované membránové napětí, které se sčítá s klidovým membránovým napětím a mizí po vypnutí elektrického pole. U buněk s jednoduchými tvary lze indukované membránové napětí vypočítat analyticky. Pro sférické buňky můžeme použít Schwanovu rovnici

$$\Phi_{\Delta_m} = \frac{3}{2} E r * \cos\theta, \quad (7)$$

kde Φ_{Δ_m} reprezentuje indukované membránové napětí a hodnota E nám udává velikost intenzity elektrického pole (obr. 12). Rovnice udává, že napětí je úměrné síle pole a velikosti buňky a sleduje funkci kosinus podél membrány. Z obr. 12 je patrné, že nejvyšší hodnoty napětí budou při úhlu α rovno 0° a 180° , to znamená, že podle

směru intenzity elektrického pole budou místa s maximální hodnotou napětí na membráně ležet nejblíže přiloženým elektrodám. [52]



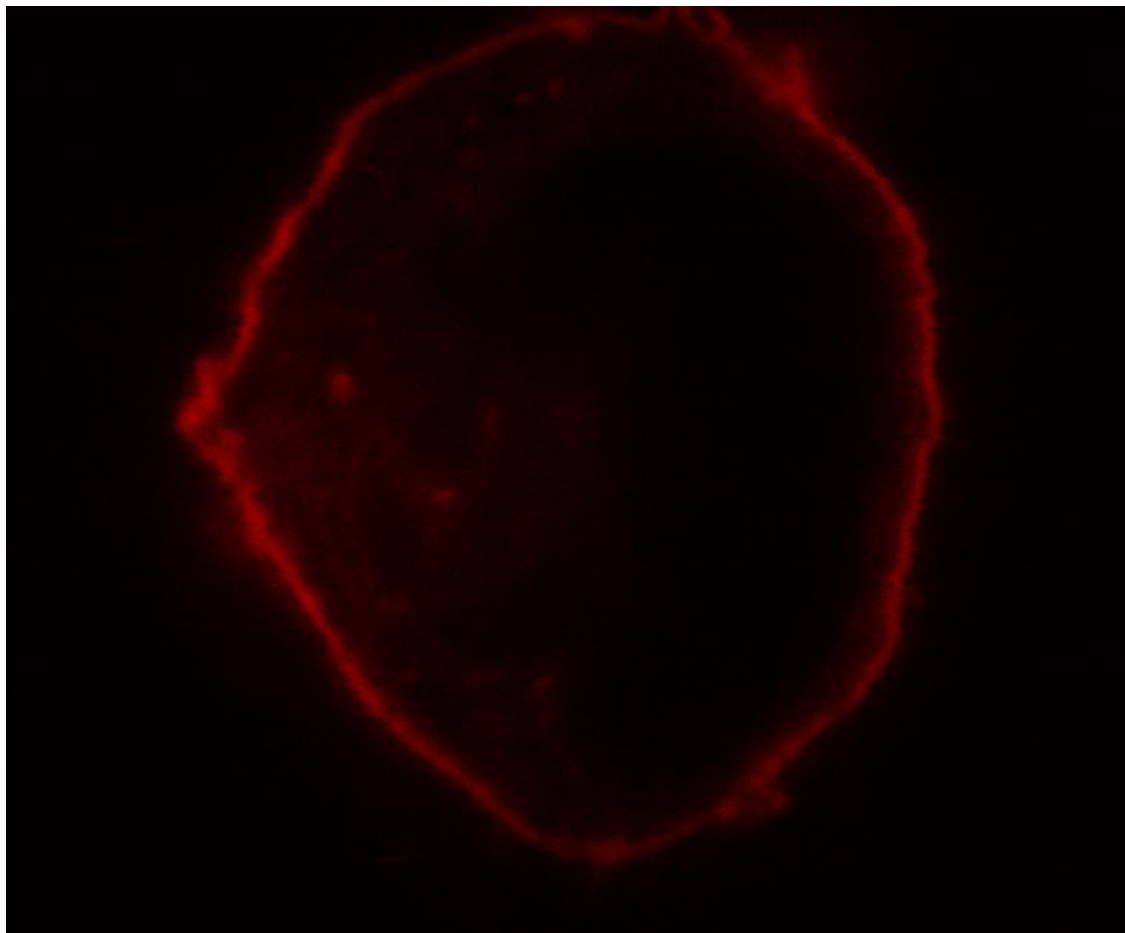
obr. 12: Závislost velikosti napětí na membráně, vzhledem k její pozici

Pro složitější tvary buněk se indukované napětí může značně lišit od kosinové funkce a musí být vypočteno číselně, pomocí počítače nebo experimentálně pomocí napětově citlivých barviv. Jedno z napětově citlivých barviv, které je použito v našem experimentu je di-4-ANEPPS. U tohoto barviva je emisní a excitační spektrum závislé na membránovém napětí. [51]

5.2 Příprava vzorku

Pro experiment je nutno mít přichystané kultivované buňky. Do eppendorfové zkumavky napipetujeme 1ml základního roztoku (tyrodu) a přidáme 100 μ l připravených buněčných kultur. Pro sledování změn pod konfokálním mikroskopem je nutno použít barvivo, které bude napětově závislé. Pro náš experiment je použito 2,5 μ l barviva di-4-ANEPPS, které přidáme do zkumavky s buňkami. Množství barviva můžeme vhodně upravovat během jednotlivých měření, abychom dosáhli co nejlepších výsledků. Při použití velkého množství se barvivo může dostat i do vnitřku buněk a také může být obsaženo v extracelulárním prostředí, což by nám způsobovalo nechtěné fluoreskující elementy. Dále musíme odměřit 10 μ l pluronicu. Pluronic umožňuje barvivu navázat se na membránu buňky. Po přípravě roztoku se musí buňky nechat inkubovat alespoň dvacet minut. Po inkubaci je možné vzorek centrifugovat, buňky se tak oddělí od zbytku roztoku, a tím se můžeme zbavit

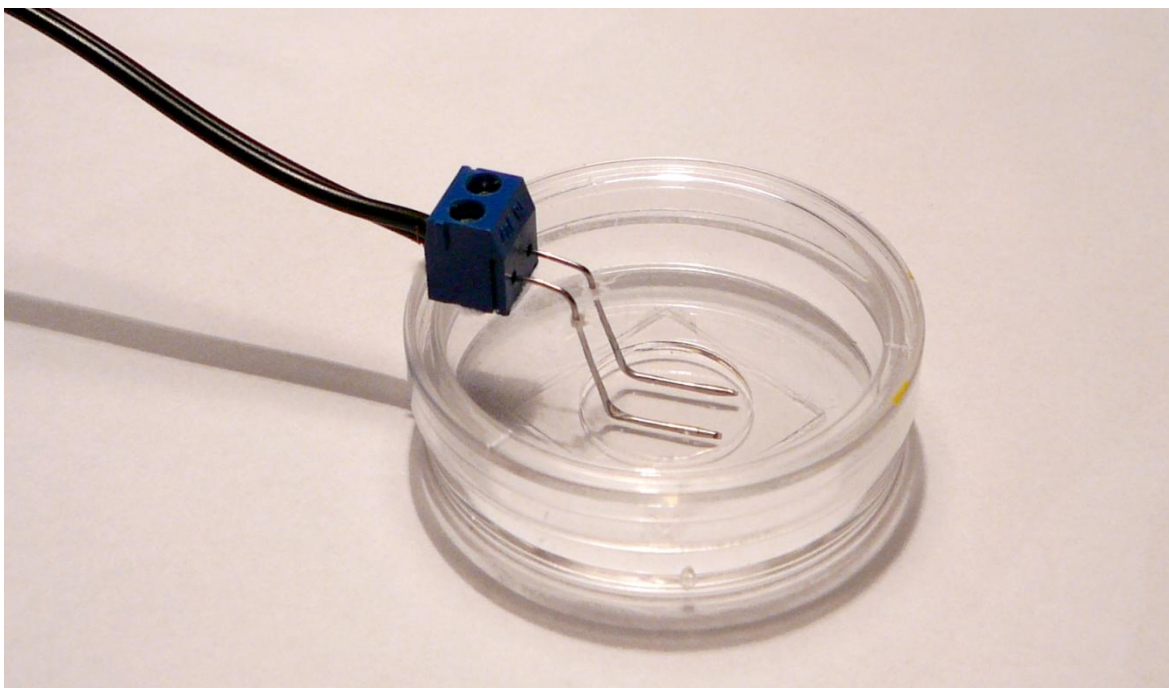
přebytečného barviva, které se nezachytí na membráně. Připravený vzorek již můžeme sledovat v konfokálním mikroskopu (obr. 13). [28]



obr. 13: Snímek buňky pod konfokálním mikroskopem při použití di-4-ANEPPS barviva (zvětšení mikroskopu 64x)

5.3 Elektrodotový systém

Pro sledování změn napětově citlivého barviva v konfokálním mikroskopu je nutné vyvolat změny elektrického pole v misce s buňkami. Pro vyvolání těchto změn lze použít více metod. Jednou z možností je vytvořit elektrické pole kolem buněk pomocí elektrodotového systému. V konfokální mikroskopii používáme pro snímání vzorku misky se středovou jamkou. Běžně dodávané stimulační elektrody však nedosáhnou na dno jamky v misce. Pro náš experiment bylo proto nutno vyrobit elektrodotový systém, který bude stimulovat vzorek v rovině buněk. Pro výrobu těchto elektrod jsme použili běžné dostupné součástky (obr. 14). Elektrody dosahují až na dno jamky uprostřed misky, a tím stimulují buňky v jejich rovině.



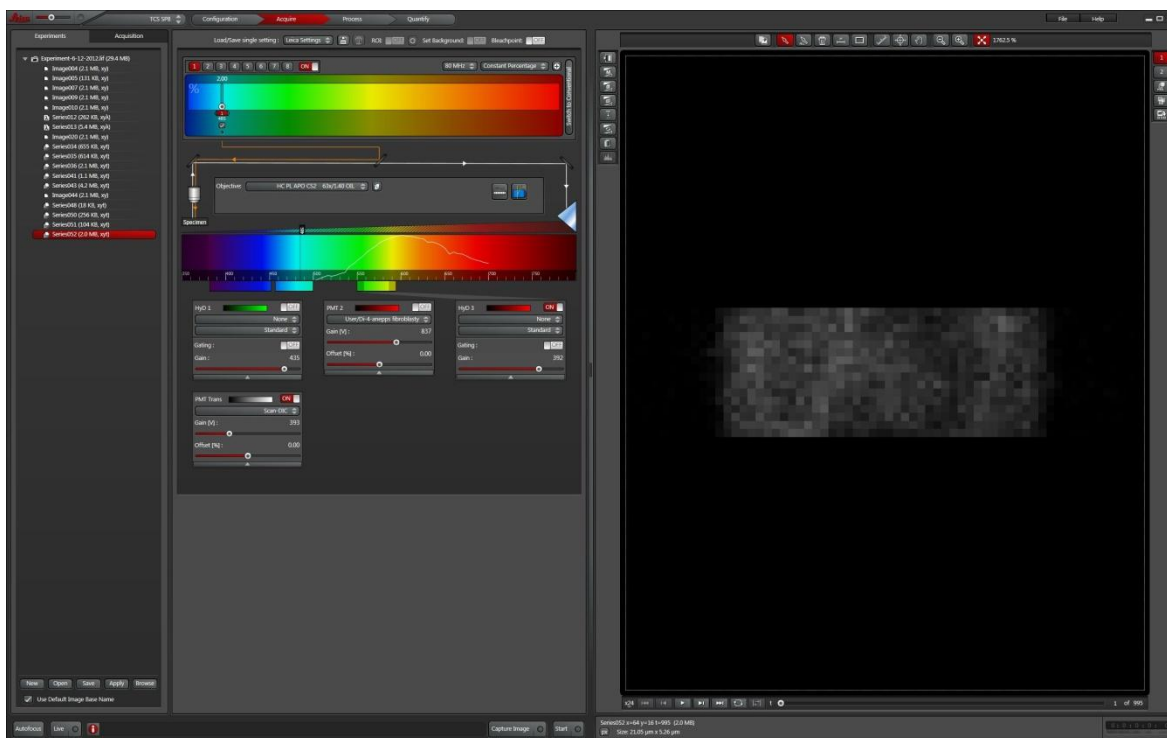
obr. 14: Vyrobený elektrodový systém

Průměr samotných elektrod by měl být co nejmenší, ideálně o velikosti stimulovaných buněk (obr. 11b). Ovšem umístění takových elektrod do roviny stimulované buňky je v našem experimentu nemožné, navíc mechanické a elektrické vlastnosti takového vodiče jsou nereálné. Proto jsou použity elektrody o průměru 0,5 mm. Pro vytvoření elektrického pole kolem elektrod je nutno jednotlivé elektrody izolovat, aby mezi nimi netekl elektrický proud, a tím nepoškodil buňky. Celý stimulační systém obsahuje zdroj elektrického napětí a počítač, který nám generuje napěťové pulsy. Napěťové pulsy nám stimulují preparát v konfokálním mikroskopu vytvořeným elektrickým polem mezi elektrodami, které způsobí změnu citlivosti použitého barviva (di-4-ANEPPS).

Další metodou pro změnu elektrického napětí na buňce je změna roztoku, v níž se buňky nacházejí. Pokud zaměníme roztok kolem buněk roztokem o jiném rozložení iontů, změní se i potenciál na buněčných membránách. Roztok můžeme přečerpávat pomocí perfuzní pumpy. Nevýhodou této metody je pomalá změna elektrického pole v roztoku.

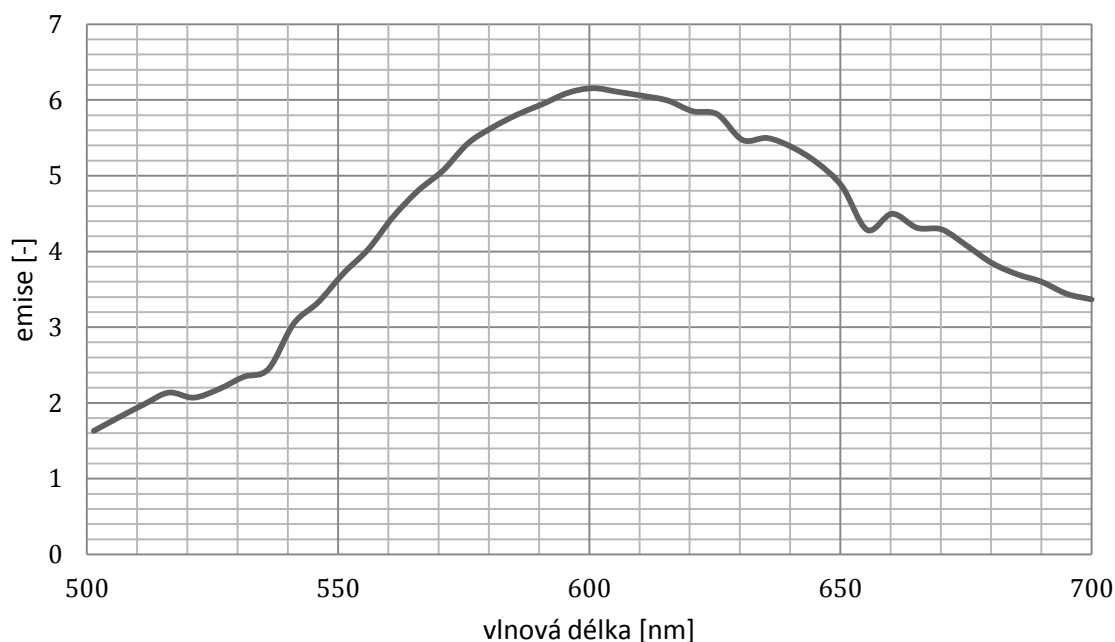
5.4 Zpracování výsledků

Pro zkoumání změn na membránách buněk máme k dispozici konfokální mikroskop Leica TCS SP8 X. Leica dodává s mikroskopem i software pro zpracování a nastavení veškerých vlastností mikroskopu (obr. 15). Můžeme zde volit excitační vlnovou délku mikroskopu i typ detektoru.



obr. 15: Screenshot programového prostředí mikroskopu

Program umožňuje změřit také emisní spektrum měřeného vzorku. Po nastavení excitačního záření se spustí automatická detekce emisní fluorescence. Emisní spektrum jsme změřili u barviva di-4-ANEPPS navázaného na buněčnou membránu vazivových buněk. Maximální hodnota intenzity emisního záření byla při vlnové délce $\lambda = 600$ nm. Emisní spektra stejného barviva se mohou měnit v závislosti na použitém roztoku nebo typu buněk.



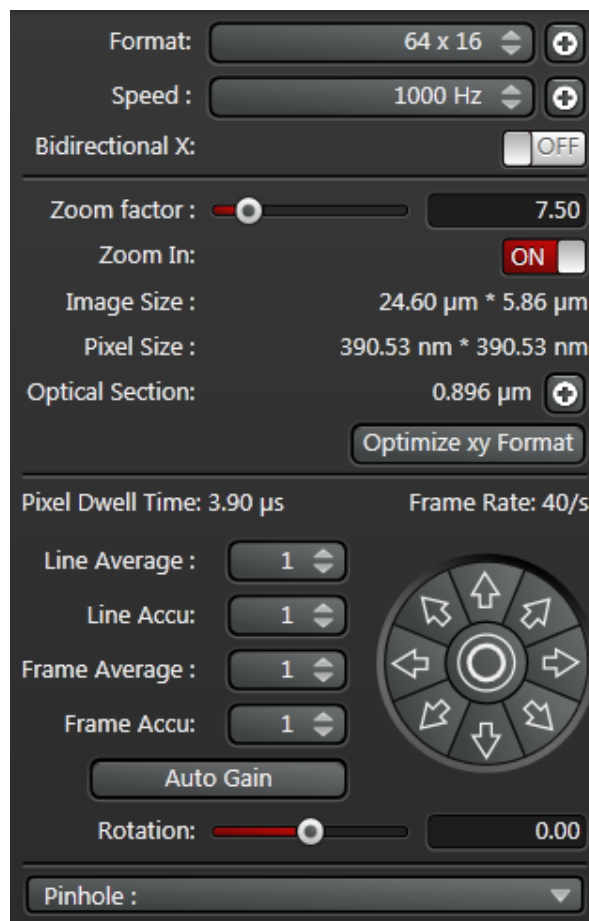
obr. 16: Naměřené emisní spektrum vzorku

Dalšími parametry pro snímání jsou formát obrazu a frekvence skenování. Tyto dvě hodnoty jsou pro nás velmi důležité, jelikož nám udávají počet nasnímaných snímků za sekundu (tab. 1). Počet snímků za sekundu musíme zvolit s ohledem na šířku stimulačního impulsu. Rychlost snímání nastavujeme tak, abychom s jistotou měli snímky při stimulaci elektrickým polem (v době trvání elektrického impulsu stimulačním systémem) i bez něho.

tab. 1: Rychlost snímání mikroskopu v závislosti na formátu a frekvenci snímání

frekvence\formát	Počet snímků za sekundu			
	64x64	512x32	512x512	1024x1024
200 Hz	5,78	10,75	0,773	0,388
1000 Hz	25	41,67	3,79	1,92
1800 Hz	39,65	61,22	6,68	3,43

Zvýšením frekvence snímání se sníží doba akvizice a tím i kvalita snímku. Zároveň však dostaneme větší počet snímků za sekundu (obr. 17 *Frame Rate*). Formát zobrazované oblasti také ovlivňuje rychlost snímání mikroskopu a to tak, že při menších formátech rychlost snímání vzrůstá. Při měření musíme zvolit ideální kombinaci všech parametrů pro získání co nejlepší sekvence snímků. Při dostatečném množství snímků můžeme jednotlivé hodnoty průměrovat a eliminovat tak některé chyby způsobené nepřesnostmi při měření.



obr. 17: Nastavení akvizčních parametrů snímaného obrazu v programovém prostředí mikroskopu

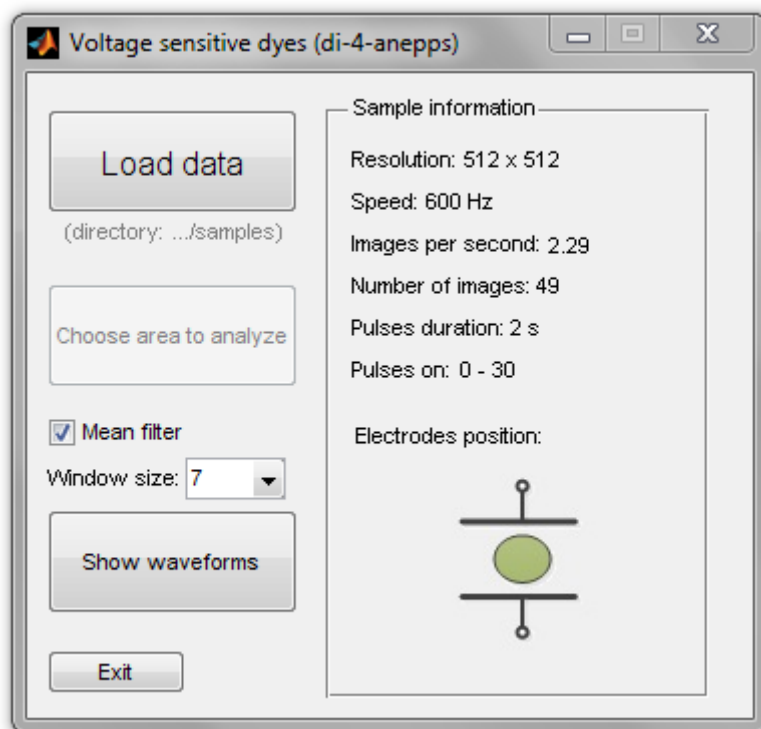
Programové prostředí mikroskopu nabízí mnoho dalších možností, jakými jsou například nastavení oboustranného skenování (obr. 17 *Bidirectional X*), průměrování řádků nebo celého obrazu (obr. 17 *Line Average*, *Frame Average*) a další, které nám udávají jak kvalitu obrazu, tak i rychlost snímání. Pro všechny měření použijeme imerzní objektiv se zvětšením 64x.

5.5 Program pro zpracování výsledků

Experiment vyžadoval naměření několika desítek obrazových dat a sekvencí. Každé jednotlivé měření jsme museli vyhodnotit, proto pro lepší analýzu naměřených výsledků bylo vhodné vytvořit přehledný program, ve kterém snadno zpracujeme naměřená data.

Po spuštění aplikace se zobrazí hlavní okno, které tvoří základní část programu. Hlavní okno je rozděleno na dvě části. První část obsahuje ovládací prvky

programu a ve druhé části jsou zobrazeny informace o naměřených datech, se kterými právě pracujeme (obr. 18).

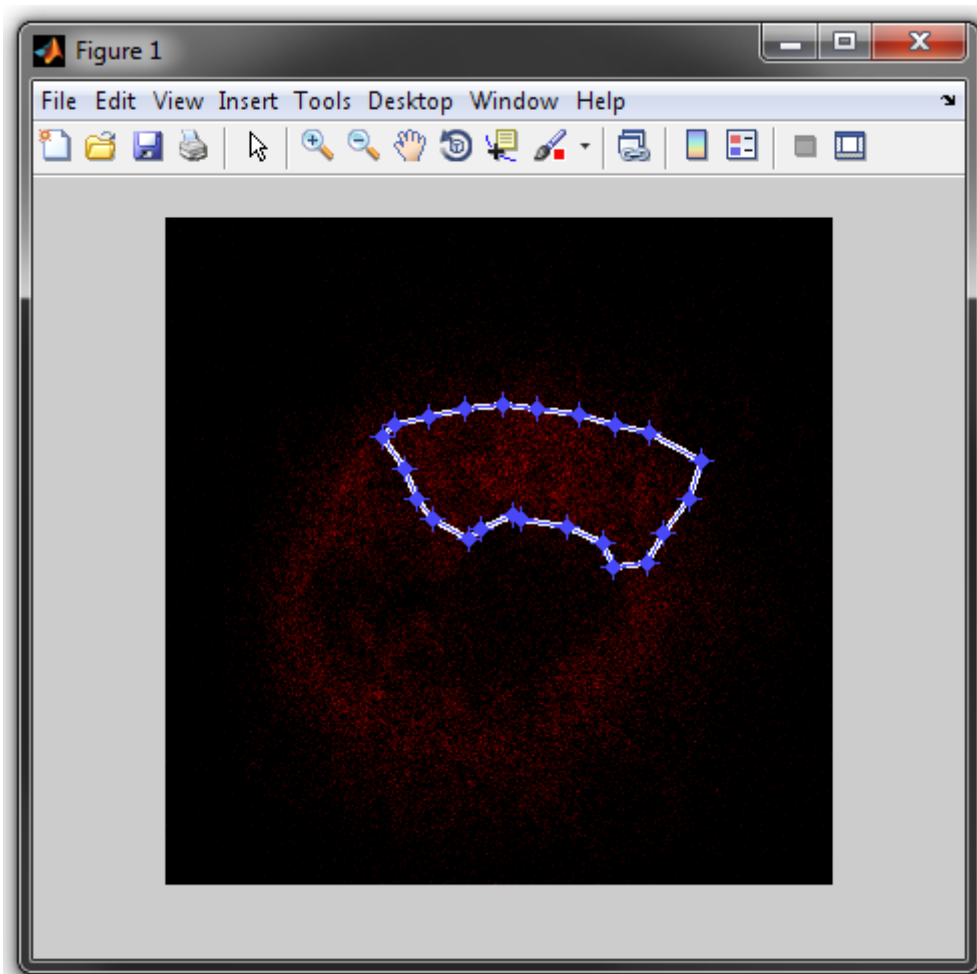


obr. 18: Hlavní okno programu. Vlevo se nachází ovládací panel pro práci s naměřenými daty, vpravo jsou informace o analyzované sekvenci dat

Program umožňuje kliknutím na tlačítko *Load data* načíst naměřená data, která jsou uložena ve složce *samples*. Připravených sekvencí jsou více než dvě desítky. Každé jednotlivé měření je uloženo v samostatném souboru pomocí třírozměrné matice. V prvních dvou dimenzích matice je uložen nasnímaný obraz, třetí rozměr udává počet obrazů v sekvenci, tedy její délku. Z tohoto důvodu program dokáže zpracovat i sekvence, které nebyly vytvořeny speciálně pro tuto aplikaci a také jiná třírozměrná data, která jsou uložena podobnou metodou. Pro příklad jsou ve složce *samples* dva soubory - *data_121206_1* a *data_121206_1*, u kterých nemáme informace o přesném nastavení parametrů. Jsou to tedy čistě třírozměrná data, která pomocí programu můžeme také zpracovávat. Tato data ze dvou měření sloužila pro ověření správné funkce snímání mikroskopu.

Po načtení dat se nám aktivuje tlačítko *Choose area to analyze*, které nám zobrazí okno s nasnímanou buňkou v konfokálním fluorescenčním mikroskopu. V tomto okně si interaktivně vybereme oblast, kterou chceme analyzovat (obr. 19).

Po výběru oblasti k analýze se spočítá jasový profil dané části membrány následovně: program normalizuje osmibitový obraz na šedotónový s rozmezí hodnot od nuly po jedničku. Tmavé, málo fluoreskující pixely náleží nízkým hodnotám jasu (černá = 0) a naopak světlé body (největší jas – bílá = 1) vykazují velkou fluorescenci barviva. Při změně napětí na membráně buňky by mělo dojít ke změně intenzity fluorescence, a tím i ke změně jasové hodnoty v obrazu, kterou budeme analyzovat. Pro každý obraz sekvence se spočítá průměrná hodnota jasu ve vybrané oblasti. Vykreslením těchto průměrných hodnot za sebou získáme jednodimenzionální jasový profil zkoumané oblasti membrány.

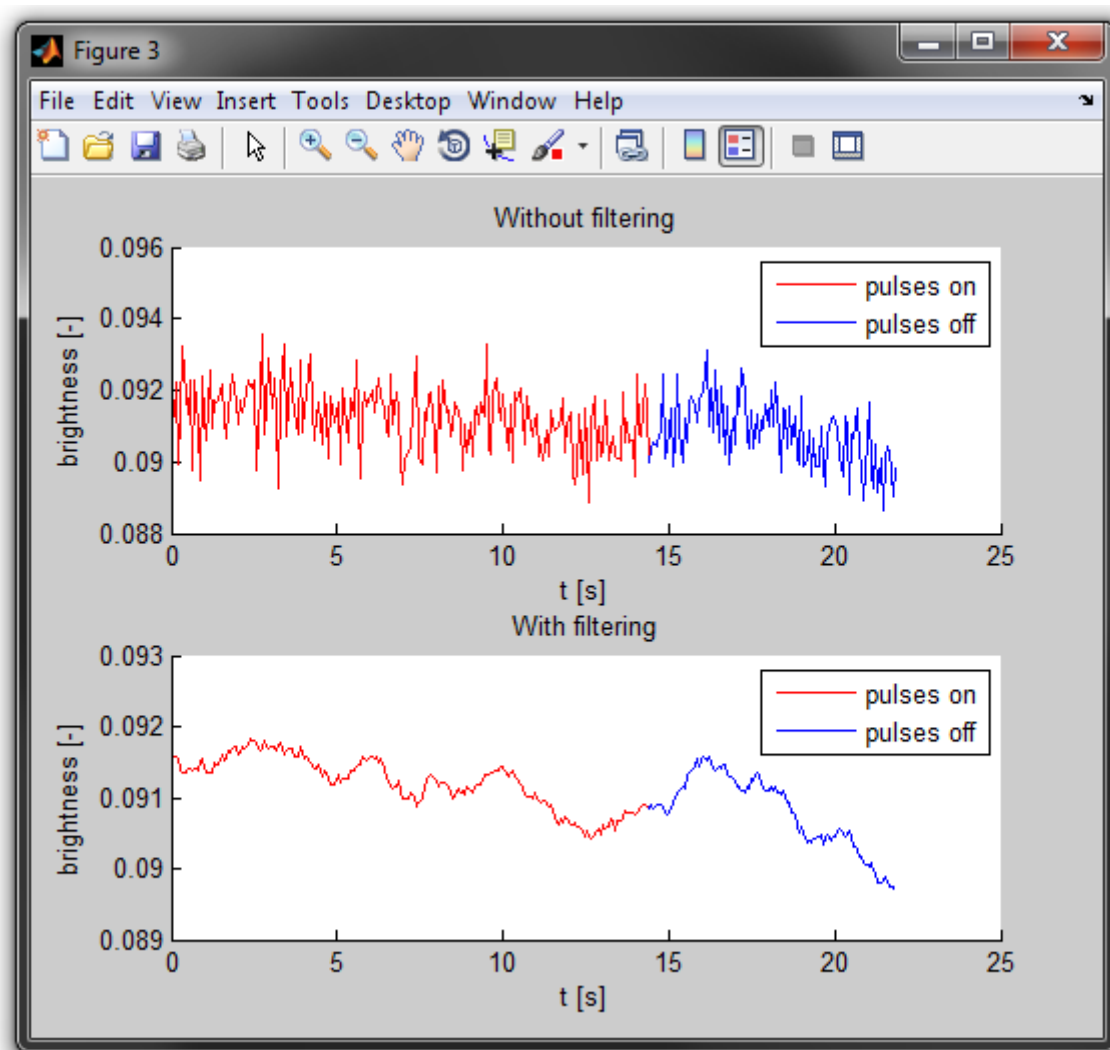


obr. 19: Okno s nasnímanou buňkou pro výběr oblasti určené k detekci jasového profilu celé sekvence

Vypočítaný jasový profil můžeme v programu dále upravovat. Jelikož při snímání sekvencí pomocí konfokálního mikroskopu často dochází k velkému

šumu, je většinou vhodné výsledky před interpretací filtrovat. V programu je použita jednoduchá filtrace průměrováním. Uživatel si může zvolit velikost okna filtru v závislosti na charakteristických vlastnostech jednotlivých sekvencí (obr. 18 *Window size*). Velikost okna filtru znamená, kolik jasových hodnot bude program průměrovat.

Posledním prvkem ovládacího panelu programu je možnost zobrazení vypočítaných jasových profilů. Tlačítko *Show waveforms* vykreslí nefiltrovaný jasový profil nebo profil před i po filtraci v závislosti na nastavení filtru v programu (obr. 20). Celý program je vytvořen ve vývojovém prostředí Matlab verze 7.8.0 (R2009a).

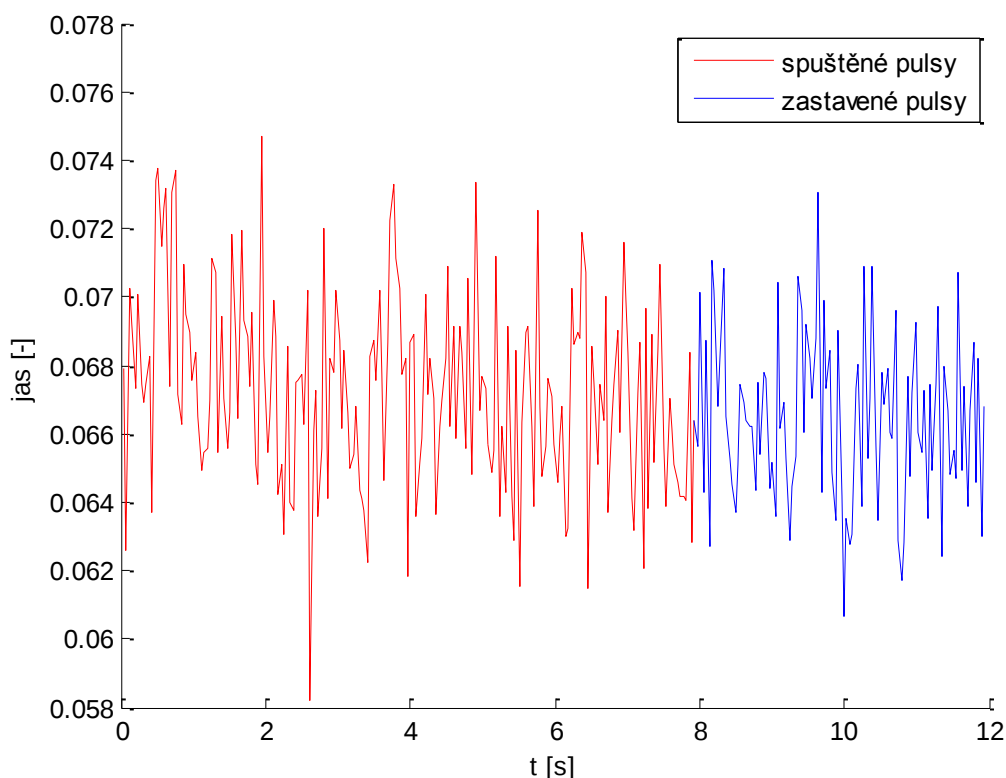


obr. 20: Vykreslení jasových křivek vypočtených programem před a po filtraci. Červená část značí signál při spuštěných pulzech, v modré části byly pulsy vypnuty

5.6 Naměřené výsledky s použitím elektrodového systému

Pro experiment jsme měli možnost použít vazivové buňky – myší fibroblasty. Po zapojení stimulačního systému k celé sestavě (stimulace, mikroskop, vzorek, počítač) můžeme měřit odezvu napětově citlivého barviva navázaného na membránu buňky. U všech měření jsme používali obdélníkové pulsy, jejichž minimum mělo hodnotu 0 mV a maximální hodnota napětí byla 30 mV. Šířku pulsů jsme volili v závislosti na parametrech jednotlivých měření. Nejčastěji jsme používali délku pulsů 2 s, v ostatních případech 0,5 s, 1 s nebo 5 s. V experimentu jsme neměli možnost synchronizace stimulačních impulsů s programovým prostředím mikroskopu, proto jsme spouštěli stimulaci manuálně.

Jelikož při snímání docházelo k velkému šumu v obrazech a tím i k zašumění jasového profilu celé sekvence (obr. 21), museli jsme po každém měření sekvence zpracovat a určit další postup měření, abychom dosáhli co nejlepších výsledků.



obr. 21: Originální nasnímaná sekvence z konfokálního mikroskopu postižená šumem. Sekvence odpovídá číslu měření 22 z tab. 2

V experimentu jsme používali různé kombinace v nastavení akvizičních parametrů. Souhrn vybraných měření ukazuje tab. 2.

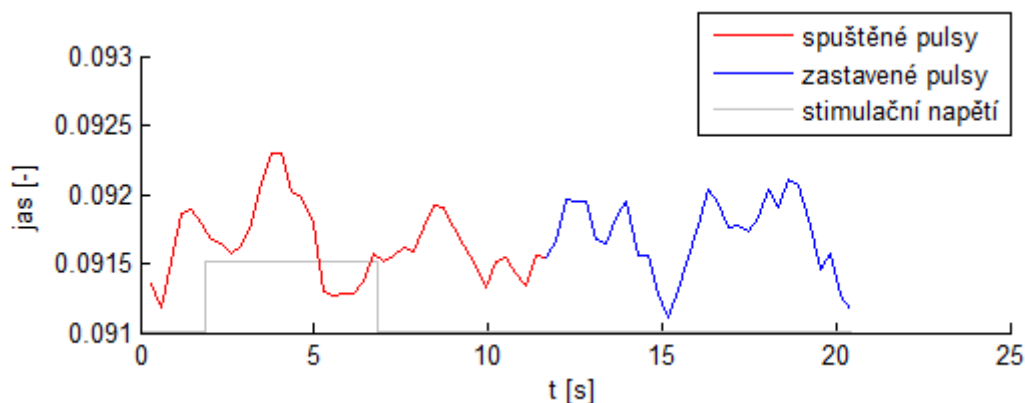
tab. 2: Souhrn vybraných měření s různými parametry

číslo sekvence	rozlišení [pixels]	rychlost snímání skeneru [hz]	počet snímků za sekundu	obousm ěrné skenová ní	počet průměrování řádku
1	1024 x 1024	1800	3,43	ano	1
2	512 x 512	600	2,29	ano	1
3	512 x 512	600	2,29	ano	1
4	128 x 128	100	1,51	ano	1
5	128 x 128	600	8,6	ano	1
6	128 x 128	600	8,6	ano	1
7	128 x 128	700	9,99	ano	1
8	128 x 128	1000	2,51	ne	3
9	128 x 128	1000	7,3	ne	1
10	128 x 128	1000	13,89	ano	1
11	128 x 128	1000	13,89	ano	1
12	128 x 128	1400	3,5	ne	3
13	128 x 128	1800	4,42	ne	3
14	64 x 64	400	5,78	ne	1
15	64 x 64	1000	4,5	ne	3
16	64 x 64	1800	8,36	ne	3
17	64 x 16	30	2,97	ano	1
18	64 x 16	200	18,87	ano	1
19	64 x 16	400	6,54	ne	3
20	64 x 16	700	11,27	ne	3
21	64 x 16	1400	21,81	ne	3
22	64 x 16	1800	25,21	ne	3
23	64 x 16	1800	25,21	ne	3

Všechny parametry nám ovlivňují počet snímků za sekundu, který dokáže konfokální mikroskop sejmout a uložit. Počet snímků za sekundu jsme museli zvolit

s ohledem na délku stimulačních pulsů. Pokud byla frekvence obrazu příliš malá, mohli jsme zvětšit šířku pulsů. Všechny tyto vlastnosti jsme kombinovali tak, aby nám vyšly co nejlepší výsledky. Dalšími parametry, které ovlivňují rychlost snímání sekvence, jsou nastavení průměrování řádků nebo obousměrné skenování. Podle toho jakou hodnotu průměrování si nastavíme, tolikrát nám skener mikroskopu nasnímá jediný řádek, který následně systém zprůměruje a zobrazí. Takto postupuje pro všechny řádky obrazu. Průměrování řádků nám zmenšuje rychlost snímání, tudíž pro větší hodnotu počtu průměrování nám klesá počet uložených snímků za sekundu. Naopak obousměrné skenování zvýší počet snímků za sekundu. Při povolení tohoto parametru v programovém nastavení mikroskopu nám skener snímá řádky obrazů postupně zleva doprava a následně zprava doleva. Skener se tak nemusí po každém řádku vracet na svou výchozí pozici, a tím nám zvýší rychlost sejmutí jednotlivých obrazů. V našem experimentu jsme vyzkoušeli vliv průměrování řádků i obousměrné skenování v závislosti na počet snímků za sekundu.

U první sekvence z tab. 2 jsme měřili s využitím velkého rozlišení. Rozlišení 1024 x 1024 pixelů nám způsobilo rapidní pokles počtu snímků za sekundu. Proto jsme zvolili vyšší snímací frekvenci skeneru, která nám zajistí dostatečnou rychlost snímání obrazů, vzhledem k délce trvání impulsů.

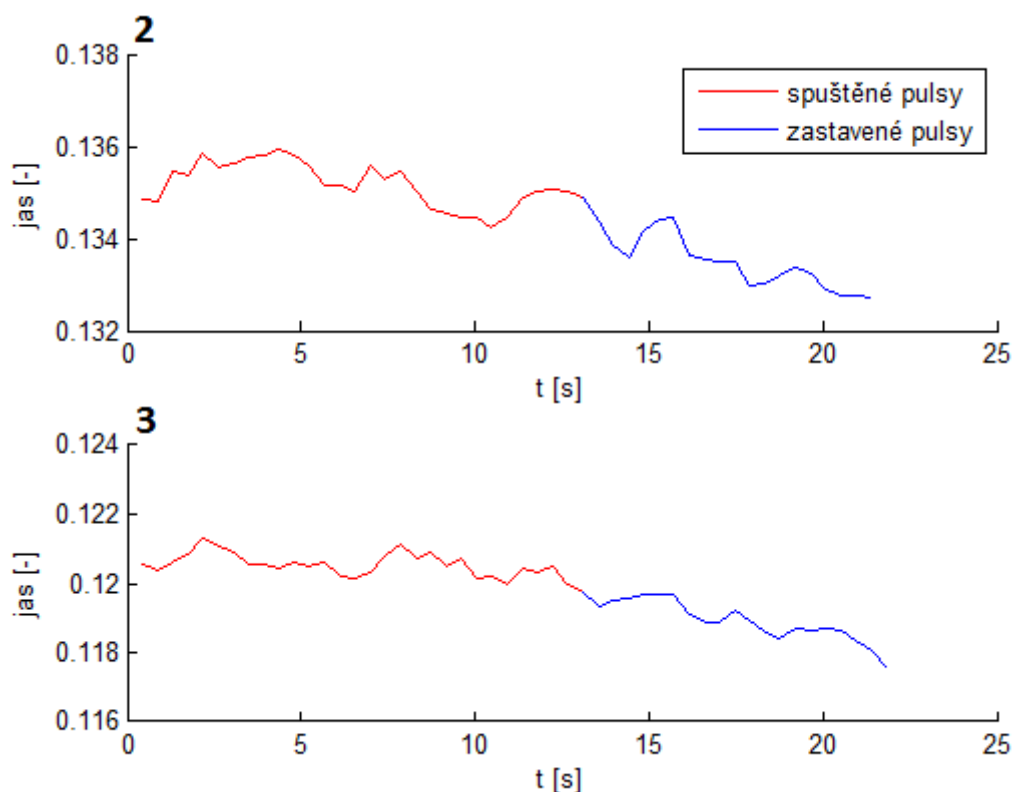


obr. 22: Filtrovaný jasový profil sekvence číslo 1 z tab. 2 a namodelované stimulační napětí s hodnotami v rozmezí 0 až 30 mV. Velikost okna filtru je 5.

Vyšší rychlost snímání skeneru nám ovšem způsobí kratší akviziční dobu při snímání jednotlivých pixelů, a proto dochází k velkému šumu v obraze.

Ani po filtraci sekvence (obr. 22) nedostaneme signál, ve kterém by byly jasné viditelné změny intenzity jasu v závislosti na stimulačním napětí⁵.

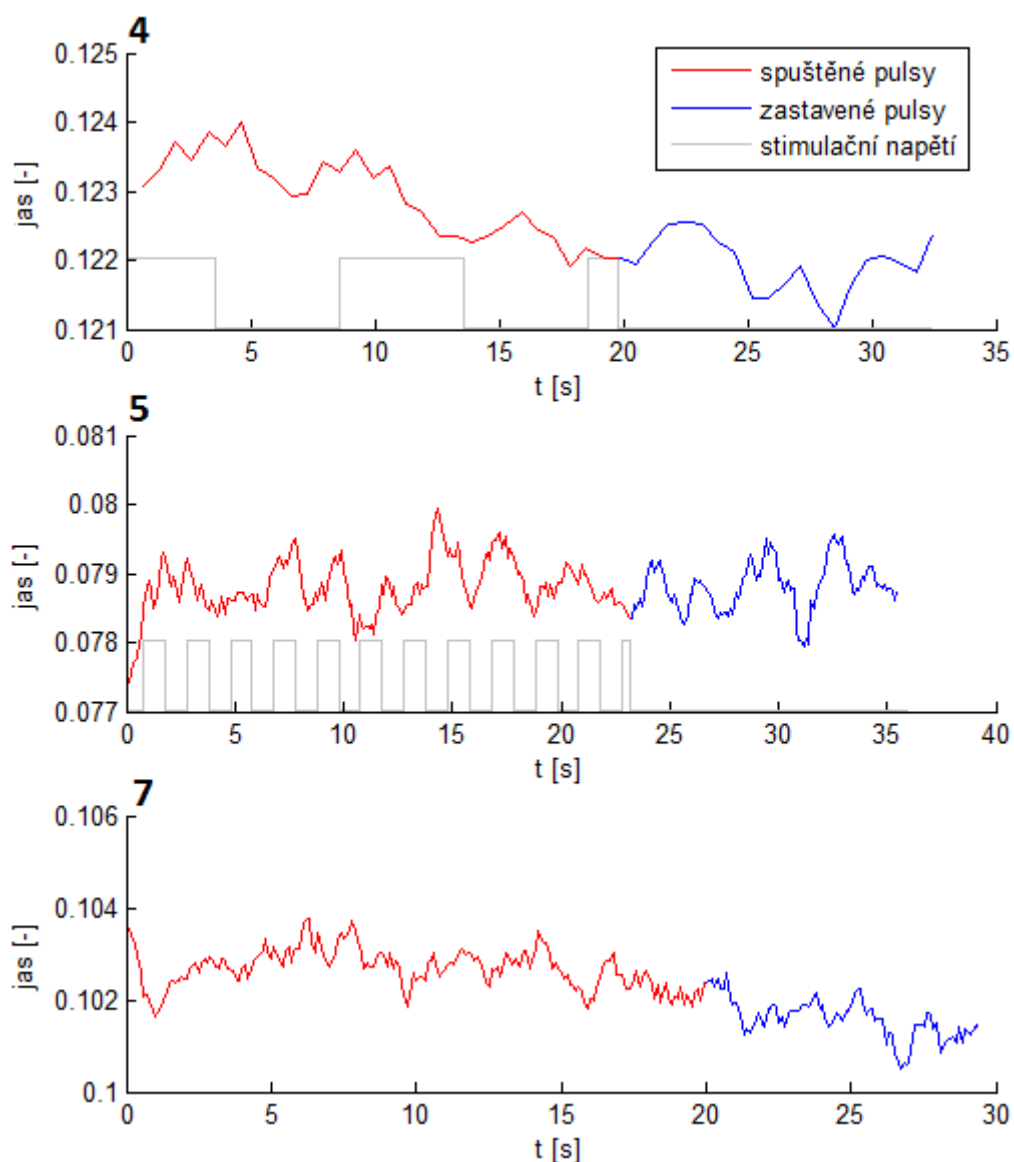
Pro zvýšení akviziční doby bylo nutno zmenšit rychlost snímání skeneru. Nižší hodnoty nám způsobí další pokles počtu nasnímaných obrazů za jednu sekundu. Z tohoto důvodu jsme snížili rozlišovací schopnost mikroskopu, a tím jsme se dostali na potřebné parametry snímání. Na obr. 23 jsou zpracované jasové profily pro menší rozlišení, a to pro 512 x 512 pixelů. Ani u tohoto nastavení není možné rozeznat změny fluorescence v závislosti na stimulačním napětí. Po vypnutí stimulačních proudů (obr. 23 – modré části křivky) jsou viditelná kolísání jasu jako při spuštěných pulzech (obr. 23 – červené části křivky).



obr. 23: Filtrované sekvence pro rozlišení 512 x 512 pixelů. Číslo u grafů odpovídá číslu sekvence z tab. 2. U obou sekvencí jsme použili velikost okna filtru 3

Další možností bylo opět snižovat rozlišení. Tentokrát jsme se dostali na hodnotu 128 x 128 pixelů.

⁵ Pokud jsou vymodelované stimulační pulsy zakreslené v grafech, jsou vždy znázorněny šedě a mají minimální hodnotu 0 mV a maximální 30 mV.

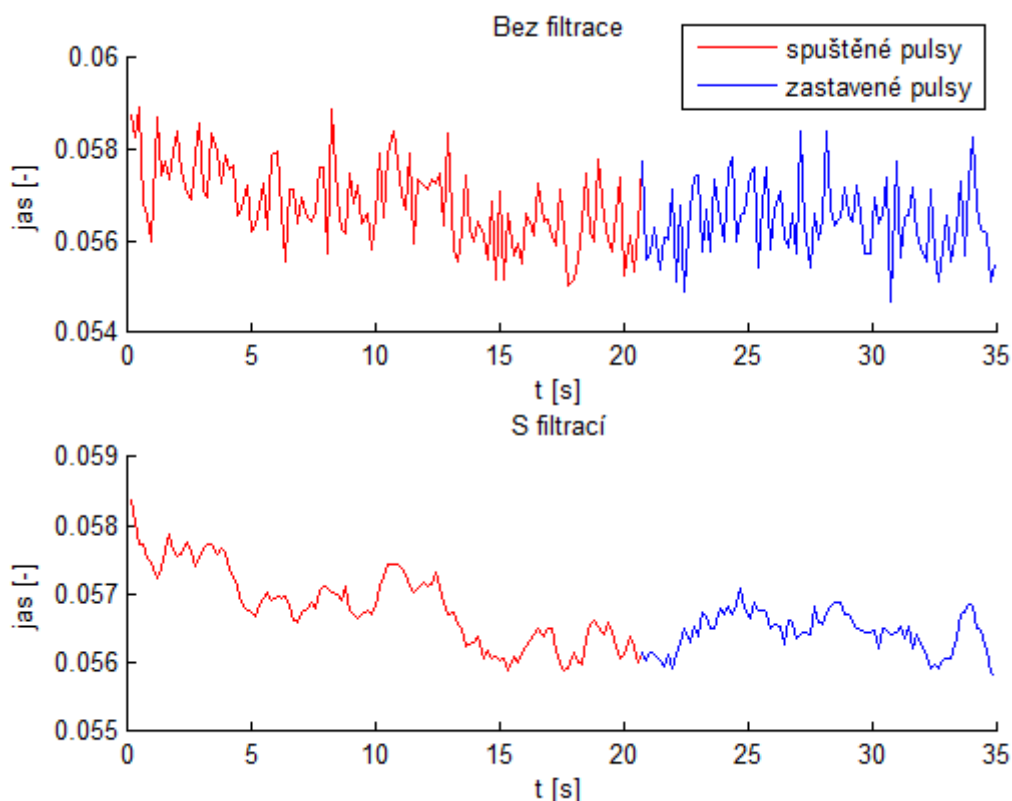


obr. 24 Filtrované sekvence pro rozlišení 128 x 128 pixelů⁵. Číslo u grafů odpovídají číslu sekvence z tab. 2. U sekvence čísla 4 jsme použili filtr o velikosti okna 3, u páté sekvence byla velikost okna 13 a u sedmé 9

Při tomto rozlišení jsme již měli větší možnosti nastavení ostatních parametrů. U sekvence číslo 4 byla použita velmi malá rychlost skeneru (100 Hz) a tím byla dosažena vyšší kvalita jednotlivých obrazů (větší akviziční čas, obr. 24). V části, kde byla spuštěná stimulace již lze vidět jisté změny intenzity jasu, ovšem po vypnutí stimulačních pulsu kolísá hodnota jasu podobně jako při stimulaci. Z těchto vlastností grafu můžeme vyvodit, že změna jasu je způsobena hlavně šumem.

Jakékoliv změny parametrů u tohoto rozlišení nedokázaly vylepšit výsledky. I při použití vysokých hodnot počtu snímků za sekundu byly změny jasu nezávisle

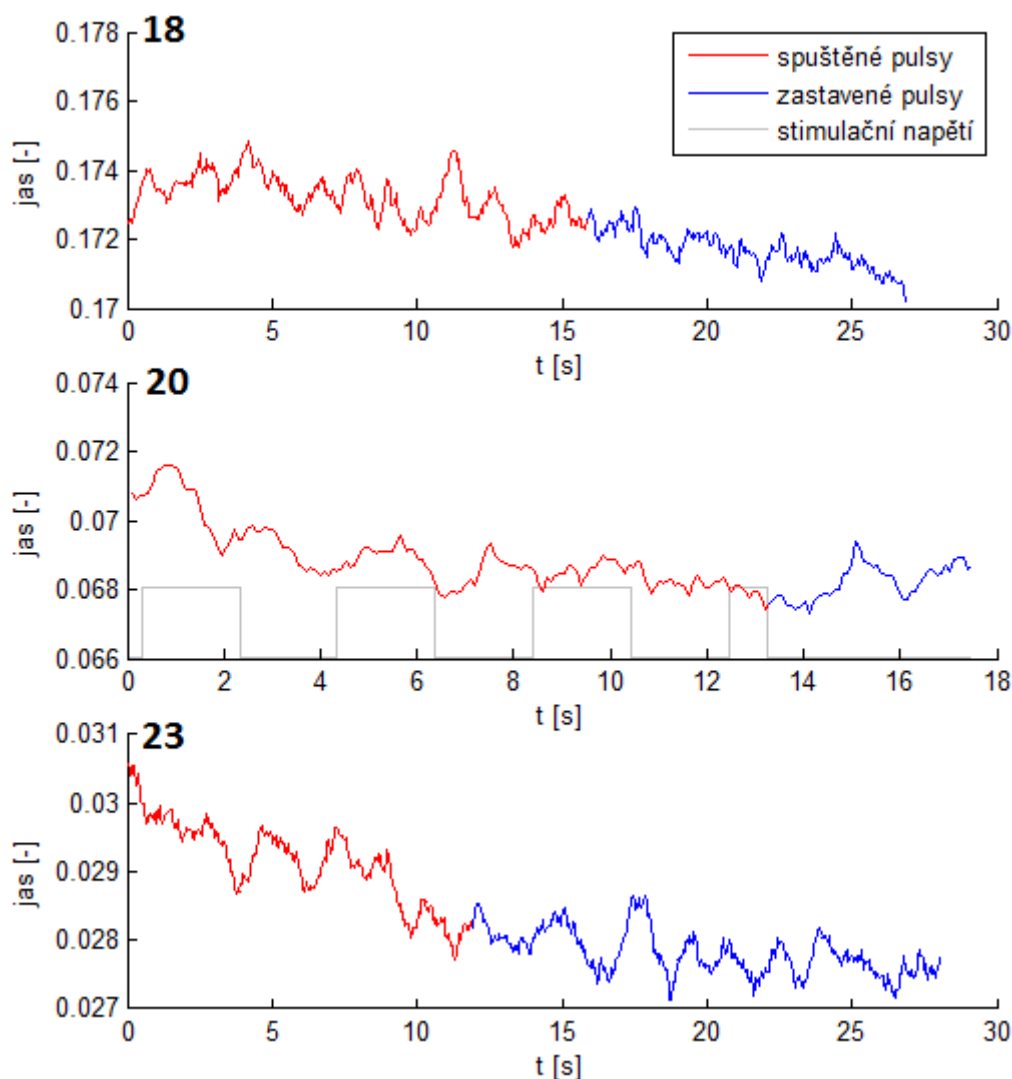
na stimulaci buňky. Proto jsme zmenšili rozlišení, při kterém ještě dokážeme snímat celou buňku. S rozlišením 64 x 64 pixelů jsme nasníмали několik sekvencí (obr. 25). Výsledek byl u většiny měření podobný s předcházejícími grafy.



obr. 25: Nasnímaná sekvence číslo 14 s rozlišením 64 x 64 pixelů před a po vyfiltrování signálu (velikost okna - 7)

Po dalším zmenšení rozlišení by se nám již nevešla celá buňka do snímaného pole mikroskopu. U tohoto měření ovšem analyzujeme pouze část buňky, kde se snažíme najít největší změny intenzity fluorescence (viz. kapitola 5.1 Popis experimentu). Proto jsme si nastavili na mikroskopu nejmenší možné rozlišení, které činí 64 x 16 pixelů.

U nejmenšího možného rozlišení jsme dosáhli hodnoty až 25,21 snímku za sekundu. Vzhledem k tomu, že jsme používali pulsy o minimální délce 0,5 s, je rychlost snímání obrazů plně dostačující. Při tak malém rozlišení naopak můžeme zvýšit dobu akvizice, kdy se zbavíme určitého množství šumu a přitom budeme mít pořád dostatečné časové rozlišení snímků. Na obr. 26 jsou zobrazeny některé tyto signály po filtraci.



obr. 26: Filtrované sekvence pro rozlišení 64×16 pixelů⁵. Číslo u grafů odpovídá číslu sekvence z tab. 2. U sekvence čísla 18 jsme použili filtr o velikosti okna 13, u dvacáté sekvence byla velikost okna 11a u dvacáté třetí 21

U všech naměřených grafů kolísá hodnota jasu nezávisle na stimulačním napětí. Nižší hodnoty rozlišení obrazu nám umožňují zlepšit ostatní parametry snímání, avšak ani to nepomáhá k lepším výsledkům.

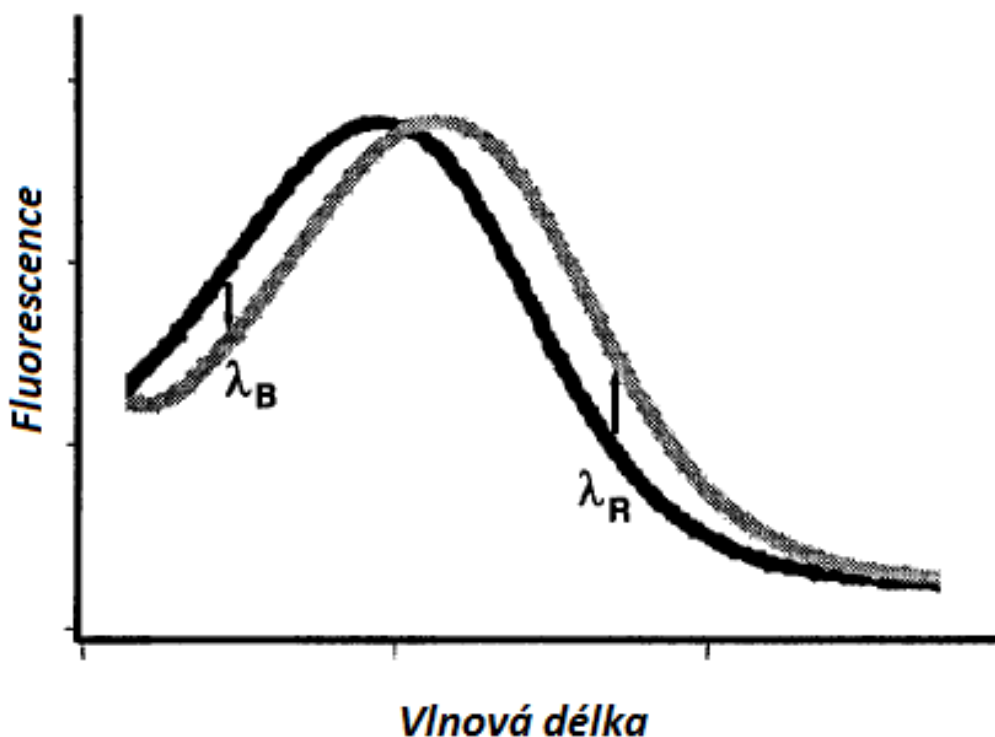
Výsledné jasové profily jsou hodně zašuměné, tudíž nemůžeme určit velikost změny intenzity fluorescence na membráně buňky v závislosti na obdélníkových pulsech. Šum v obrazech a nepřesnosti při měření mohou být způsobeny několika následujícími faktory. U některých připravených vzorků dochází k malému pohybu buněk a při delších sekvencích nám tento pohyb může způsobovat malé nepřesnosti ve výsledném jasovém profilu jednotlivých měření. Pohyb a celkově všechny výsledky

nám také ovlivňuje vitalita buněk. Některé buňky mohou být poškozeny při transportu, a tím ztrácí své vlastnosti. U jiných měření závisí vitalita buněk na jejich stáří. Další šum může být způsobený pohyby kolem mikroskopu, kde i při malých vibracích dochází k značnému zašumění obrazu. U barviva dochází ke ztrátě vlastností, pokud je vystaveno velkému světlu, což může také ovlivňovat výsledky. Barvivo kvalitu ztrácí také stářím, novější barviva mají lepší vlastnosti, proto je vhodné vyhnout se starším vzorkům barviva.

5.7 Metoda založená na výměně roztoků

Jak už bylo zmíněno, jinou možností pro změnu membránového napětí, a tím i změnu vlastností napětově závislých barviv navázaných na membránu buněk, je změna roztoku (tyrodu), který obklopuje buňky. Tato metoda je založena na změně koncentrace iontů v různých extracelulárních roztocích, které nám ovlivní výsledný elektrický potenciál kolem buněk. Úkolem je najít způsob, jak zjistit změny fluorescence vyplývající ze změn koncentrací látek v extracelulárním roztoku, a tím získat odpověď na reakci barviva v elektrickém prostředí. Měření intenzity fluorescence napětově závislého barviva před a po výměně tyrodů může být komplikované, jelikož při čerpání roztoků může dojít k pohybu buněk, a tím může vzniknout problém nasnímat buňku se stejnými parametry před výměnou roztoků a po výměně roztoků. Největší nepřesnost u této metody může být způsobena především nemožností zaostření mikroskopu na stejnou rovinu buňky při jejím pohybu. Konfokální mikroskop nám umožňuje volit si rovinu řezu manuálně a nemá funkci, která by detekovala pohyb objektů v ose z, proto nedojde u měření na konfokálním mikroskopu k synchronizaci pohybu buňky s volbou roviny řezu preparátu. Snímky buňky budou mít v každém svém řezu jiné hodnoty intenzity fluorescence, nezávislé na vlastnostech napětově citlivého barviva, tudíž tato metoda nemusí být příliš vhodná pro měření změn vlastností navázaného barviva.

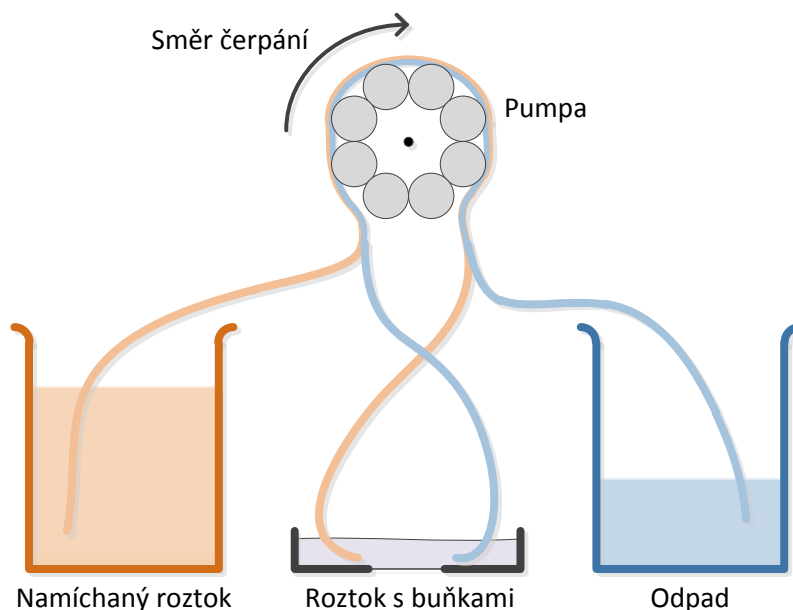
Pro vyhodnocení vlastností napětově citlivých barviv při změně extracelulárního roztoku můžeme použít jinou analýzu, která je založena na jejich emisních spektrech. Samotné barvivo (di-4-ANEPPS) má emisní a excitační spektrum závislé na typu buněk, na které je barvivo navázané a také na prostředí, ve kterém se buňky nacházejí (viz. kapitola 4 Napětově závislá barviva).



obr. 27: Posun emisního spektra, kde λ_B značí změnu fluorescence v „modré“ části, tedy při nižších hodnotách vlnové délky a λ_R značí změnu fluorescence v „červené“ části, tedy při vyšších hodnotách vlnových délek [54]

Spektrum emisní fluorescence je závislé na množství cholesterolu v membráně. Při depolarizaci buňky dochází ke změně absorpčního i emisního spektra. Zvýšením membránového potenciálu dojde k depolarizaci buňky a emisní spektrum se posouvá doleva, tedy ke kratším vlnovým délkám. Při repolarizaci je tato změna opačná, spektrum se posune do vyšších hodnot vlnových délek (obr. 27). [54]

Pro realizaci měření touto metodou jsme museli sestavit přečerpávací systém (obr. 28), kde dojde k výměně extracelulárních roztoků. Hlavním prvkem přečerpávacího systému je perfuzní pumpa, která nám umožní pomalou výměnu roztoků. Součástí přečerpávacího systému jsou také dvě hadičky, přičemž jedna slouží pro přívod roztoku do misky s buňkami a druhá odvádí přebytečný roztok z misky do odpadu.



obr. 28: Schéma přečerpávání roztoků

Nejprve jsme si museli připravit vzorek buněk, který je popsán v kapitole 5.2 Příprava vzorku. Jediným rozdílem bude změna základního tyrodu, ve kterém se namíchá vzorek s buňkami. Tento extracelulární fyziologický roztok, jsme si museli připravit ve dvou variantách tak, aby měly různé vlastnosti, co se týče elektrického potenciálu. Výsledné roztoky budou mít tedy různé koncentrace kladných a záporných iontů. Takto připravený vzorek s prvním roztokem a buňkami jsme vložili do misky se středovou jamkou, která je potřebná pro snímání obrazů u konfokálního mikroskopu. O změnu extracelulárních roztoků se stará perfuzní pumpa. Pumpa čerpá druhý změněný tyrod z připravené nádoby do misky se vzorkem a zároveň odčerpává přebytečné množství původního tyrodu smíchaného s novým roztokem o jiných koncentracích kladných a záporných iontů (viz. kapitola 5.7.1 Příprava roztoků, obr. 28). Důsledkem tohoto čerpání dojde ke změně elektrického potenciálu v extracelulárním prostředí a napětově citlivé barvivo změní své vlastnosti.

Před samotnou výměnou roztoků si musíme změřit emisní spektrum, které budeme porovnávat se spektrem po výměně tyrodů. Během čerpání je dobré sledovat danou buňku v konfokálním mikroskopu a průběžně korigovat její polohu a rovinu zobrazení pomocí ovládacího panelu mikroskopu, protože srovnáváme emisní spektrum před výměnou roztoků a spektrum po výměně roztoků, které následně

změříme. Z tohoto důvodu musí být přečerpávání prováděno pomalu, jelikož během výměny tyrodů může docházet k pohybu buněk, a tím bychom mohli danou buňku ztratit ze zorného pole mikroskopu.

5.7.1 Příprava roztoků

Pro tento experiment si opět musíme nachystat vzorek s buňkami. Postup přípravy vzorku bude podobný jako u předchozí metody s použitím elektrodového systému. Hlavním rozdílem bude změna základního roztoku. Úkolem tohoto externího fyziologického roztoku je zajistit buňkám podobné složení, jaké má mezibuněčný prostor. Tyto vlastnosti můžeme ovlivnit zejména podobným složením iontů.

tab. 3: Rozpis koncentrací látek pro extracelulární fyziologické roztoky

Sloučeniny	Molární hmotnost [g/mol]	Množství látek pro základní tyrod [g/l]	Množství látek pro upravený tyrod [g/l]
NaCl	58,44	7,8894	5,844
KCl	74,55	0,402	7,4556
HEPES	238,3	2,383	2,383
MgCl ₂	203,3	0,183	0,183
NaH ₂ PO ₄	156,01	0,0515	0,0515

Pro měření je nutné si nachystat dva základní roztoky, které budeme v průběhu měření měnit. Jeden roztok slouží pro klidový membránový potenciál, druhý bude depolarizovat membránu buňky, a tím bude měnit vlastnosti napěťově citlivých barviv. U obou takto navržených základních roztoků jsme si odměřili jeden litr deionizované vody. Pro zajištění potřebných vlastností jsme v roztoku rozpustili chemické látky podle tab. 3. Do namíchaného roztoku jsme postupně přidávali tří molární NaOH, dokud jsme nedosáhli hodnoty pH 7,4. Tuto hodnotu jsme nesměli přesáhnout, aby nedocházelo k poškození buněk. Pro první tyrod jsme museli doplnit 1,3 ml nachystaného NaOH, do upraveného roztoku to bylo 1,2 ml tří molárního NaOH.

Rozdílné vlastnosti kladných a záporných iontů obou tyrodů jsou způsobeny hlavně rozdílnými koncentracemi NaCl a KCl. U druhého roztoku jsme zaměnili

100 mM NaCl za ekvimolární množství KCl. Tato změna odpovídá hodnotám použitého množství látek uvedených v tab. 3.

Před samotným měřením na konfokálním mikroskopu je vhodné přidat do základních roztoků glukózu a CaCl_2 . Pro každý experiment jsme si nachystali 50 ml těchto roztoků, ve kterých jsme rozpustili 0,0049 g CaCl_2 a 0,1 g glukózy podle tab. 4. Tyto látky mají vliv na chování buněk a zlepšují jejich vlastnosti. [55]

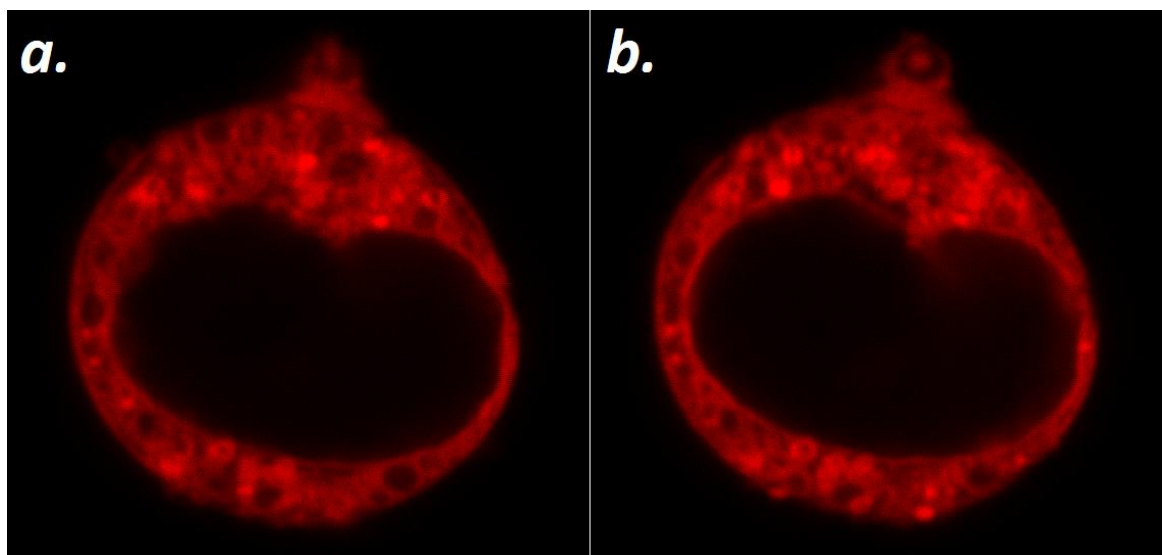
tab. 4: Množství látek, přidanych před samotným měřením na konfokálním mikroskopu

Sloučeniny	Molární hmotnost [g/mol]	Množství látek pro základní tyrod [g/l]	Množství látek pro upravený tyrod [g/l]
Glukóza	180,15	2	2
CaCl_2	110,98	0,0998	0,0998

Tímto jsme si nachystali tyrod, který tvoří základní extracelulární roztok buněk, další postup je podobný jako u předchozího experimentu. Do eppendorfové zkumavky naměříme 1 ml upraveného základního roztoku, do kterého přidáme 100 μl připravených buněčných kultur. Pro obarvení buněk použijeme napět'ově citlivé barvivo di-4-ANEPPS, kterého bude potřeba asi 5 μl . Množství barviva můžeme měnit po analýze jednotlivých měření experimentu. Čím více barviva dodáme, tím lépe zobrazíme buňky pod mikroskopem. Na druhou stranu si musíme dát pozor na to, abychom při velkém množství barviva nezpůsobili nechtěný šum při snímání. Přebytké barvivo může způsobovat fluorescenci v místech, kde není navázáno na membránu buňky. U snímání s konfokálním mikroskopem to má za následek rušivé fluoreskující elementy na pozadí kolem buněk, které by jinak mělo být černé. Dále musíme napipetovat 10 μl pluronicu, což je látka, která umožňuje barvivu navázat se na membránu buňky. Po přípravě roztoku se musí buňky nechat inkubovat alespoň dvacet minut. Po inkubaci je možné vzorek centrifugovat, kdy buňky sednou na dno zkumavky, a tím můžeme odsát zbytek roztoku s barvivem, které se nenaváže na membránu buněk. K buňkám opět doplníme externí fyziologický roztok. Pro lepší výsledky můžeme vzorek opět centrifugovat, odsát přebytké barvivo a doplnit buňky roztokem. Tímto postupem se zbavíme velkého množství nenavázaného barviva na membránu a vzorek je připravený k experimentu.

5.7.2 Naměřené hodnoty

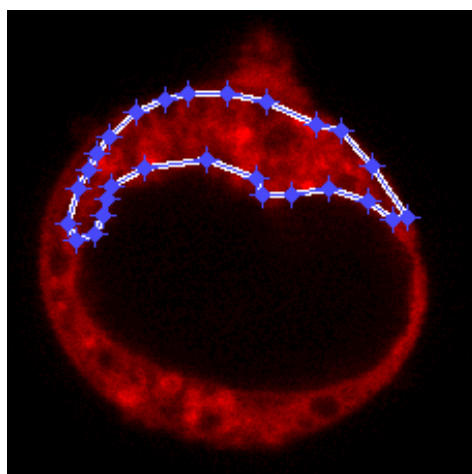
Po přečerpání roztoku došlo k výměně iontů extracelulárního roztoku, to způsobilo depolarizaci buňky a následnou změnu fluorescence napětově citlivého barviva, které je navázané na membránu buňky.



obr. 29: Obrázek nasnímané buňky před výměnou roztoků (a.) a po výměně roztoků (b.)

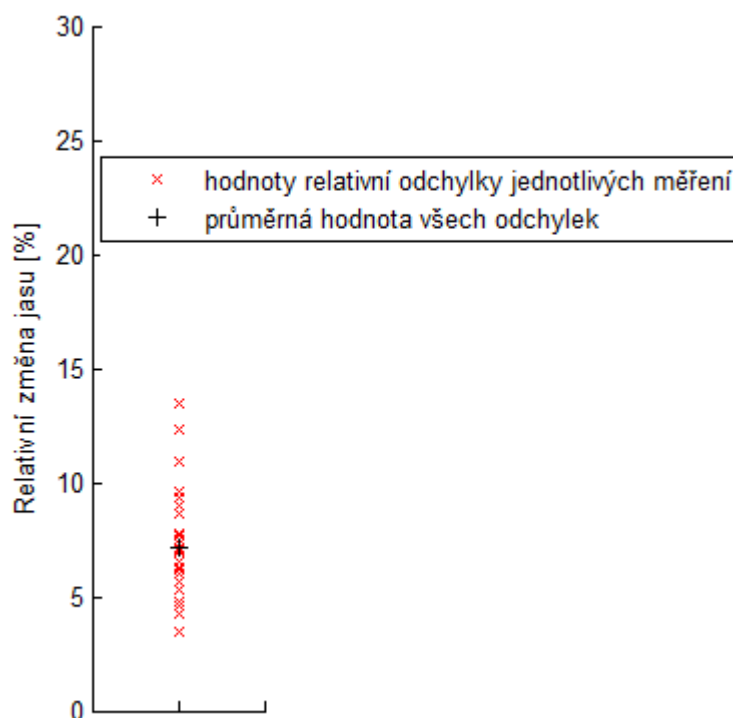
Změna jasu před a po výměně tyrodů není příliš dobře rozpoznatelná lidským okem (obr. 29).

Pro analýzu jsme si museli vytvořit jednoduchý skript, podle kterého můžeme určit změnu intenzity. Oba obrazy jsme si museli před samotnou analýzou slícovat. Pro výpočet relativní odchylky jasu v obou obrazech jsme si určili oblast buňky (membrány), kterou chceme analyzovat (obr. 30). Zpřesnění výsledku dosáhneme opakovaným měřením různých oblastí a vypočtením jejich průměrů.



obr. 30: Výběr oblasti membrány pro výpočet relativní odchylky fluorescence

Po třicátém změření nám vyšla průměrná hodnota relativní odchyly jasu mezi dvěma obrazy 7,1927 % (obr. 31). Tato hodnota se již při dalším měření příliš neměnila. Průměrná hodnota relativní odchyly se bude lišit v závislosti na počtu iterací jednotlivých měření odchylek a také na výběru analyzované oblasti.



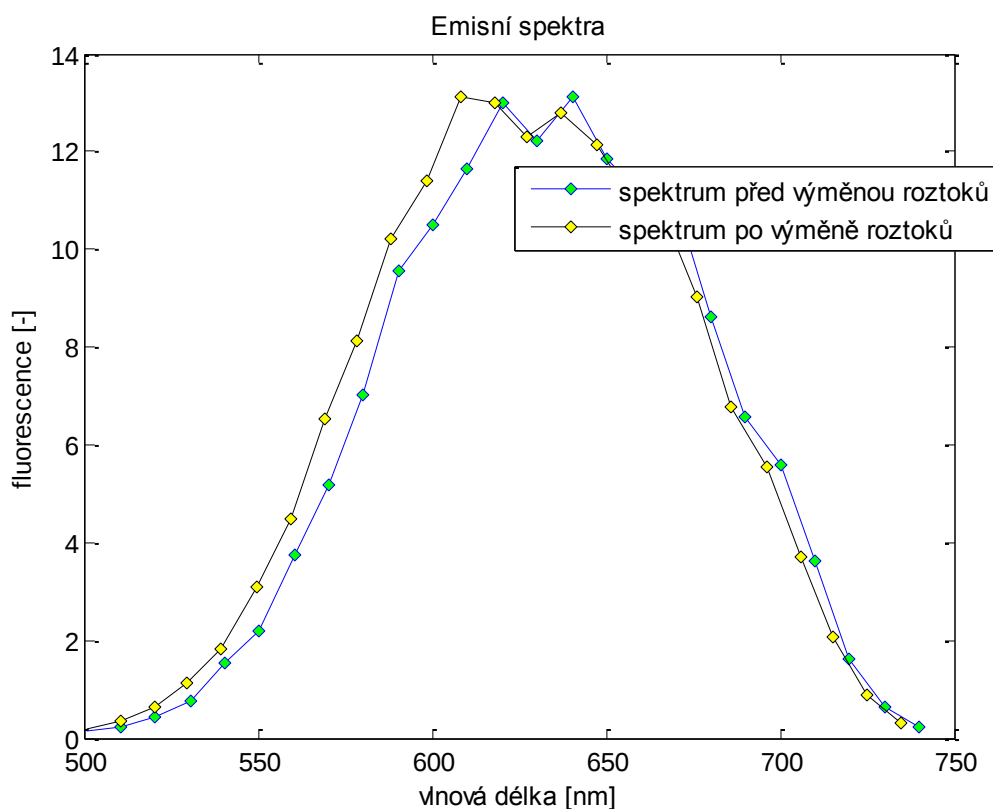
obr. 31: Relativní odchylna fluorescence obrazů buňky před a po výměně extracelulárního roztoku

U tohoto měření intenzity fluorescence napětově závislého barviva před a po výměně roztoků mohlo dojít k nepřesnostem, jelikož při čerpání tyrodů došlo k pohybu buněk. Pohyb buněk v ose x a y jsme vyřešili slícováním obrazů. Větší problém nastal v nasnímání obrazů ve stejné rovině řezu při pohybu buňky (obr. 29), kdy jsme si tuto rovinu museli nastavit manuálně pomocí ovládacího panelu konfokálního mikroskopu (viz. kapitola 5.7 Metoda založená na výměně roztoků). Proto nemůžeme buňku nasnímat vždy ve stejném řezu a tudíž nám změnu jasu může ovlivnit nejenom změna vlastnosti napětově citlivých barviv, ale také různá fluorescence barviva v různém řezu buňkou.

Jinou možností srovnání vlastností napětově citlivých barviv je změření jejich spektrálních vlastností před a po výměně fyziologického externího roztoku. Jak již bylo zmíněno emisní spektrum barviva di-4-ANEPPS se mění v závislosti na typu

buněk, na které se naváže a také na extracelulární prostředí obklopující buňky. Při výměně roztoků dojde k posunu spektra. [49][34][35]

Nejprve jsme si změřili emisní spektrum vzorku před výměnou tyrodů. Po přečerpání 10 ml základního externího roztoku jsme si opět na stejné buňce změřili emisní spektrum fluorescence. Jednotlivé spektra jsme zprůměrovali a zanesli do grafu (obr. 32).



obr. 32: Emisní spektra fluorescence před a po výměně roztoků

Po výměně roztoků došlo k posunu emisního spektra ke kratším vlnovým délkám. Podle obr. 32 je zřejmé, že větší posun spektra nastal na vzestupné části spektra. Průměr tohoto posunu činí 5,7193 nm. Průměrný posun na sestupné části je o něco menší (1,3409 nm). Oba tyto posuny jsou charakteristické pro dané roztoky, kde byly použity myší fibroblasty. Jak již bylo řečeno, každý roztok má své specifické spektrální vlastnosti. Pro přesnější analýzu bychom museli experiment opakovat mnohokrát nezávisle na jednotlivých měřeních s přesným postupem při přípravě vzorků. Naším měřením jsme ovšem dokázali, že změnou roztoků dojde ke změně spektrálních vlastností barviva, avšak z malého počtu měření nemůžeme přesně určit tyto charakteristické vlastnosti barviva navázaného na použité buňky.

Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit rešerši na téma metody fluorescenční a konfokální mikroskopie s využitím napětově citlivých barviv pro měření změn membránového napětí a vybrat vhodnou metodu měření membránového napětí s využitím napětově citlivých sond. Úvodní kapitoly pojednávají o základech elektrofyzologie živočišných buněk, vysvětlují fluorescenci a její typické vlastnosti a věnují se popisu fluorescenčního a konfokálního mikroskopu. Práce dále pojednává o vlastnostech a funkcích napětově citlivých barviv a velká část je v ní věnována popisu experimentu s těmito látkami.

Pro experiment bylo nutné stanovit postup pro měření membránového napětí na dostupných volných buňkách s využitím napětově citlivé sondy di-4-ANEPPS pomocí konfokálního mikroskopu. Pro stimulaci vzorků pod konfokálním mikroskopem je vytvořen elektrodový systém tak, abychom mohli snímat obraz z mikroskopu za současného použití elektrických pulsů, které nám mění vlastnosti napětově citlivých barviv. Tyto změny elektrického pole kolem buněk způsobují změnu intenzity fluorescence.

Během práce bylo naměřeno několik desítek sekvencí, obrazových a spektrálních dat. Veškeré naměřené výsledky byly zpracovány a analyzovány. Po každém měření a zpracování dat se volil postup měření pro další opakování experimentu tak, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků. Pro jednodušší analýzu dat byl vytvořen program, který dokáže přehledně zpracovat naměřené výsledky.

Po zpracování a analýze všech výsledků naměřených s elektrodovým systémem bylo zjištěno, že nasnímané změny fluorescence konfokálním mikroskopem v závislosti na stimulačních pulsech neodpovídají teoretickým předpokladům. Výsledné jasové profily jsou hodně zašuměné, tudíž nelze určit velikost změny intenzity fluorescence na membráně buňky v závislosti na obdélníkových pulsech.

Změna intenzity fluorescence je podle teoretických předpokladů 10 % na 100 mV. V této práci byly použité pulsy o velikosti napětí 30 mV. Celkové změny intenzity barviva v experimentu se tedy předpokládaly v rozmezí tří procent. Velké množství šumu, které bylo měřením způsobeno, již převyšuje takto malé změny

v užitečném signálu. Hlavní nepřesností u tohoto měření byl samotný konfokální mikroskop, který není přizpůsobený ke snímání takto malých změn intenzity fluorescence. Ani po použití filtrů a různého nastavení akvizičních parametrů nebylo možné detekovat změnu fluorescence v závislosti na napětí. Další šum a nepřesnosti měření jsou popsány v kapitole 5.6 Naměřené výsledky s použitím elektrodového systému.

Výsledky experimentu se dají interpretovat tak, že navržená metoda není vhodná ke zkoumání změn intenzity fluorescence napětově citlivého barviva di-4-ANNEPS v konfokální mikroskopii při použití navrhovaného elektrodového systému.

Poslední část práce tvoří metoda založená na výměně roztoků. Pro tuto metodu je v práci vyhrazena podstatně menší část oproti hlavní zkoumané metodě s využitím elektrod. Po několika měřeních a zpracování všech výsledků byly zjištěny změny ve spektrálních vlastnostech barviva navázaného na buňky. V této práci již nebyl prostor pro zkoumání podrobnějších spektrálních vlastností navázaného barviva, což může být téma další samostatné práce.

Použitá literatura

- [1] SILBERNAGL, Stefan a Agamemnon DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004, xiii, 435 s. ISBN 802470630x.
- [2] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 9788024729770.
- [3] PEARSON EDUCATION, Inc. *PHSchool* [online]. 2012 [cit. 2012-10-5]. Dostupné z: http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/intro.html
- [4] HAŠKOVEC, Cedrik. *Plasmatická membrána a buněčná funkce*. 1. vyd. Praha: Academia, 1978, 191 s.
- [5] SALMIVIRTA, Katriina. *Basement membrane components and their receptors in organogenesis*. Uppsala: Uppsala University, 1999, 53 s. ISBN 9155446191.
- [6] The Resting Membrane Potential. SINAUER ASSOCIATES AND SUMANAS, Inc. *Sumanas, Inc* [online]. 2008 [cit. 2012-10-6]. Dostupné z: http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/electricalsignal_ele.html
- [7] ORNA, Mary Virginia a John STOCK. *Electrochemistry, past and present*. Washington: Washington, DC : American Chemical Society, 1988. ISBN 0841215723 9780841215726.
- [8] ŠIMURDA, J. *Bioelektrické jevy*. Brno, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, VUT Brno. 2007. p. 1 - 72.
- [9] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Baltimore: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1.
- [10] MOSSBERG, Karin Sonnek. *Development of instrumental techniques for confrontal laser fluorescence microscopy and of methods for multidimensional digital image analysis: applications in astronomy, neurobiology and nuclear physics*. Stockholm: Royal Institute of Technology, 1991.
- [11] UDENFRIEND, Sidney. *Fluorescence assay in biology and medicine*. 4th print. New York: Academia Press, 1966, 12, 517 s.
- [12] Intoduction to Fluorescence. *Products & Services / Life Technologies* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z:

<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Intro/player.htm>

- [13] OLYMPUS AMERICA INC. *Olympus Microscopy Resource Center* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/>
- [14] NIKON. *Nikon MicroscopyU* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.microscopyu.com/>
- [15] Bachtel, A. D., Gray, R. A., Stohlman, J. M., Bourgeois, E. B., Pollard, A. E., & Rogers, J. M. (2011). A Novel Approach to Dual Excitation Ratiometric Optical Mapping of Cardiac Action Potentials With Di-4-ANEPPS Using Pulsed LED Excitation. *IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING*, 58(7), 2120–2126. doi:10.1109/TBME.2011.2148719
- [16] BETZIG, E., & TRAUTMAN, J. K. (1992). NEAR-FIELD OPTICS - MICROSCOPY, SPECTROSCOPY, AND SURFACE MODIFICATION BEYOND THE DIFFRACTION LIMIT. *SCIENCE*, 257(5067), 189–195. doi:10.1126/science.257.5067.189
- [17] Buschmann, C., & Lichtenthaler, H. K. (1998). Principles and characteristics of multi-colour fluorescence imaging of plants. *JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY*, 152(2-3), 297–314.
- [18] CIONI, P., STRAMBINI, G. B., & FELICOLI, R. A. (1986). COMPARATIVE STRUCTURAL INVESTIGATIONS OF GLUTAMATE-DEHYDROGENASES FROM EUCARIOTIC AND PROCARIOTIC SOURCES - A PHOSPHORIMETRIC APPROACH. *ITALIAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY*, 35(6), A399–A401.
- [19] Clayton, R. H., Bernus, O., Cherry, E. M., Dierckx, H., Fenton, F. H., Mirabella, L., Panfilov, A. V, et al. (2011). Models of cardiac tissue electrophysiology: Progress, challenges and open questions. *PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY*, 104(1-3), 22–48. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.008
- [20] DENK, W., STRICKLER, J. H., & WEBB, W. W. (1990). 2-PHOTON LASER SCANNING FLUORESCENCE MICROSCOPY. *SCIENCE*, 248(4951), 73–76. doi:10.1126/science.2321027
- [21] Dumas, D., Gaborit, N., Grossin, L., Riquelme, B., Gigant-Huselstein, C., De Isla, N., Gillet, R., et al. (2004). Spectral and lifetime fluorescence imaging microscopies: New modalities of multiphoton microscopy applied to tissue or cell engineering. *BIORHEOLOGY*, 41(3-4, SI), 459–467.

- [22] Dunkers, J. P., Cicerone, M. T., & Washburn, N. R. (2003). Collinear optical coherence and confocal fluorescence microscopies for tissue engineering. *OPTICS EXPRESS*, 11(23), 3074–3079.
- [23] EBNER, T. J., & CHEN, G. (1995). USE OF VOLTAGE-SENSITIVE DYES AND OPTICAL RECORDINGS IN THE CENTRAL-NERVOUS-SYSTEM. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY*, 46(5), 463–506. doi:10.1016/0301-0082(95)00010-S
- [24] Fisher, J. A. N., Salzberg, B. M., & Yodh, A. G. (2005). Near infrared two-photon excitation cross-sections of voltage-sensitive dyes. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS*, 148(1), 94–102. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.06.027
- [25] Heilemann, M., Van de Linde, S., Schuttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., et al. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION*, 47(33), 6172–6176. doi:10.1002/anie.200802376
- [26] Hell, S. W. (2009). Microscopy and its focal switch. *NATURE METHODS*, 6(1), 24–32. doi:10.1038/NMETH.1291
- [27] Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *NATURE METHODS*, 2(12), 932–940. doi:10.1038/NMETH818
- [28] Lal, R., & Proksch, R. (1997). Multimodal atomic force microscopy: Biological imaging using atomic force microscopy combined with light fluorescence and confocal microscopies and electrophysiologic recording. *INTERNATIONAL JOURNAL OF IMAGING SYSTEMS AND TECHNOLOGY*, 8(3), 293–300. doi:10.1002/(SICI)1098-1098(1997)8:3<293::AID-IMA7>3.0.CO;2-5
- [29] Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W., & Webb, W. W. (2003). Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *SCIENCE*, 300(5624), 1434–1436. doi:10.1126/science.1083780
- [30] Lichtenthaler, H. K., Langsdorf, G., & Buschmann, C. (2012). Multicolor fluorescence images and fluorescence ratio images of green apples at harvest and during storage. *ISRAEL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, 60(1-2), 97–106. doi:10.1560/IJPS.60.1-2.97
- [31] LING, G. N. (1994). THE NEW CELL PHYSIOLOGY - AN OUTLINE, PRESENTED AGAINST ITS FULL HISTORICAL BACKGROUND, BEGINNING FROM THE

BEGINNING. PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY AND PHYSICS AND MEDICAL NMR, 26(2), 121–203.

- [32] Novakova, M., Bardonova, J., Provaznik, I., Taborska, E., Bochorakova, H., Paulova, H., & Horky, D. (2008). Effects of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS on guinea pig and rabbit myocardium. GENERAL PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS, 27(1), 45–54.
- [33] Oetjen, E., Lechleiter, A., Blume, R., Nihalani, D., Holzman, L., & Knepel, W. (2006). Inhibition of membrane depolarisation-induced transcriptional activity of cyclic AMP response element binding protein (CREB) by the dual-leucine-zipper-bearing kinase in a pancreatic islet beta cell line. DIABETOLOGIA, 49(2), 332–342. doi:10.1007/s00125-005-0087-1
- [34] Osakai, T., Sawada, J., & Nagatani, H. (2009). Potential-modulated fluorescence spectroscopy of the membrane potential-sensitive dye di-4-ANEPPS at the 1,2-dichloroethane/water interface. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 395(4), 1055–1061. doi:10.1007/s00216-009-2915-5
- [35] Petersen, C. C. H., Grinvald, A., & Sakmann, B. (2003). Spatiotemporal dynamics of sensory responses in layer 2/3 of rat barrel cortex measured in vivo by voltage-sensitive dye imaging combined with whole-cell voltage recordings and neuron reconstructions. JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 23(4), 1298–1309.
- [36] Savenkov, S. N., Yushtin, K. E., Parshikova, T. V., & Draga, M. V. (1999). Studying of procariotic and eucariotic microalgae cells with Mueller matrix polarimetry method. In Angelsky, OV (Ed.), FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON CORRELATION OPTICS (Vol. 3904, pp. 562–566). 1000 20TH ST, PO BOX 10, BELLINGHAM, WA 98227-0010 USA: SPIE-INT SOC OPTICAL ENGINEERING. doi:10.1117/12.370455
- [37] Senseman, D. M. (1996). High-speed optical imaging of afferent flow through rat olfactory bulb slices: Voltage-sensitive dye signals reveal periglomerular cell activity. JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 16(1), 313–324.
- [38] SCHAFFER, P., AHAMMER, H., MULLER, W., KOIDL, B., & WINDISCH, H. (1994). DI-4-ANEPPS CAUSES PHOTODYNAMIC DAMAGE TO ISOLATED CARDIOMYOCYTES. PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY, 426(6), 548–551. doi:10.1007/BF00378533

- [39] Siegel, M. S., & Isacoff, E. Y. (1997). A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *NEURON*, 19(4), 735–741. doi:10.1016/S0896-6273(00)80955-1
- [40] Tominaga, T., Tominaga, Y., Yamada, H., Matsumoto, G., & Ichikawa, M. (2000). Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS*, 102(1), 11–23. doi:10.1016/S0165-0270(00)00270-3
- [41] WHITE, J. G., AMOS, W. B., & FORDHAM, M. (1987). AN EVALUATION OF CONFOCAL VERSUS CONVENTIONAL IMAGING OF BIOLOGICAL STRUCTURES BY FLUORESCENCE LIGHT-MICROSCOPY. *JOURNAL OF CELL BIOLOGY*, 105(1), 41–48. doi:10.1083/jcb.105.1.41
- [42] Zheng-hong, X., Zhen-xi, Z., Jing, W., Hong, Z., Zheng, L., Yan-shu, J., & Hai-yan, D. (2007). Spectral study of voltage sensitive dye di-4-ANEPPS. *SPECTROSCOPY AND SPECTRAL ANALYSIS*, 27(7), 1359–1362.
- [43] The Fluorescence Microscope. NOBEL MEDIA. *Nobelprize.org* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/index.html>
- [44] PALA, Jan. *Proceedings of Advances in Widefield and Confocal Fluorescence Microscopy, Ljubljana 2008: National Institute of Chemistry, Ljubljana, Slovenia, March 13-14, 2008*. 1st ed. Brno: Tribun EU, 2008, 39 s. ISBN 9788073993771.
- [45] CHMELÍK, Radim. *Korelační mikroskopie, alternativní metoda vícekanálového konfokálního zobrazení: zkrácená verze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2002, 34 s. ISBN 8021421045.
- [46] Introduction to Potentiometric Probes—Section 22.1. *Products & Services / Life Technologies* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Probes-for-Membrane-Potential/Introduction-to-Potentiometric-Probes.html>
- [47] Di-4-ANEPPS - Life Technologies. *Products & Services / Life Technologies* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/D1199>

- [48] Potential-Sensitive ANEP Dyes. In: *Life Technologies* [online]. 2006, 24.3.2006 [cit. 2013-05-17]. Dostupné z: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp01199.pdf>
- [49] LOEW, L.M. Voltage-sensitive dyes: measurement of membrane potentials induced by DC and AC electric fields. *Bioelectromagnetics Suppl.* 1, 179-189 (1992).
- [50] Di-4-ANEPPS. *Biotium* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: http://www.biotium.com/product/product_types/Fluo_Mem/price_and_info.asa?item=61010&layer1=03&layer2=03A
- [51] PUCIHAR, G., KOTNIK, T., MIKLAVČIČ, D. *Measuring the Induced Membrane Voltage with Di-8-ANEPPS*. *J. Vis. Exp.*(33), e1659, doi:10.3791/1659 (2009).
- [52] SCHWAN, H.P. *Electrical properties of tissue and cell suspensions*. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5, 147-209 (1957)
- [53] MONTANA, V., FARKAS, D.L. & LOEW, L.M. *Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane-potential*. *Biochemistry* 28, 4536-4539 (1989).
- [54] *Pure and applied chemistry. Chimie pure et appliquée* [online]. IUPAC, 1996, s. 1405-1409 [cit. 2013-05-17]. ISSN 0033-4545.
- [55] EARLE, Wilton R. *Production of Malignancy in Vitro: The Mouse Fibroblast Cultures and Changes Seen in the Living Cells*. Oxford: Oxford Journals, 2012, s. 165-212. ISBN 1460-2105.
://www.unm.edu/~toolson/rheobase_chronaxie_determination.htm>.

A. Popis přiložených souborů na CD

Adresář CD:\

- ***Jan_Tkac_DP.pdf*** – elektronická verze diplomové práce
- ***README.txt*** – popis souborů na CD

Adresář CD:\Voltage sensitive dyes

- ***voltage_sensitive_dyes.m*** – spouštěcí soubor hlavního programu pro analýzu nasnímaných sekvencí

Adresář CD:\pomocné skripty\posun spekter

- ***posun_speter.m*** – soubor pro výpočet posunu spektra v metodě založené na výměně roztoků

Adresář CD:\pomocné skripty\ukládání dat

- ***ukladani.m*** – příklad uložení sekvence obrazů do souboru

Adresář CD:\pomocné skripty\změna jasu

- ***brightness_difference.m*** – soubor pro výpočet změny jasu u metody založené na výměně roztoků