

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou fixačních médií vhodných pro fluorescenční mikroskopii liposomů. Teoretická část obsahuje literární rešerši zaměřenou především na charakterizaci, dělení a využití fixačních prostředků v chemické praxi. Experimentální část se dále zabývá výběrem vhodného fixačního prostředku pro přípravu mikroskopických preparátů na bázi liposomů.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the synthesis of fixation medias suitable for fluorescence microscopy of liposomes. The theoretical part contains a literature search focused primarily on the characterization, classification and use of chemical fixatives in chemical practice. Experimental section also deals with the selection of appropriate fixative for preparation of microscopic preparations based on liposomes.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fixační prostředky, fixace, liposomy, fluorescence, fluorescenční mikroskopie.

KEYWORDS

Fixatives, fixation, liposomes, fluorescence, fluorescence microscopy.

KVASNICOVÁ, K. *Fixační média pro fluorescenční mikroskopii liposomů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje byly správně a úplně citovány. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., za odborné vedení, čas, ochotu a hlavně že to se mnou nevzdal. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zuzaně Adamcové za veškerou pomoc s mícháním vzorků, ochotu, čas a vstřícnost. Nakonec bych ráda poděkovala kolegyním Adéle Škarvadové a Anetě Peškové za tolik potřebnou morální podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Fixace.....	8
2.1.1	Dělení fixačních médií	8
2.1.2	Fyzikální fixační prostředky.....	8
2.1.3	Chemické fixační prostředky	8
2.1.4	Faktory ovlivňující fixaci	9
2.1.4.1	Teplota fixačního roztoku	9
2.1.4.2	Čas.....	9
2.1.4.3	Rychlost penetrace	9
2.1.4.4	Rozměry vzorku.....	9
2.1.4.5	Objemový poměr	10
2.1.4.6	pH a pufrů	10
2.1.4.7	Osmotické vlastnosti	10
2.1.5	Fixační činidla	10
2.2	Fluorescence	12
2.2.1	Obecná teorie.....	12
2.2.2	Jablonského diagram	13
2.2.2.1	Absorpce	13
2.2.2.2	Nezářivé přechody	13
2.2.2.3	Zářivé přechody	14
2.3	Fluorescenční barviva.....	14
2.3.1	Vnitřní fluorofory	14
2.3.2	Vnější fluorofory	15
2.3.2.1	Fluorescenční značky.....	15
2.3.2.2	Fluorescenční sondy.....	15
2.4	Fluorescenční mikroskopie.....	16
2.5	Liposomy	17
2.5.1	Stavba liposomů	17
2.5.2	Velikosti liposomů	18
2.5.3	Příprava liposomů	18
2.5.4	Lecitin.....	19
2.5.5	Cholesterol	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1	Použité chemikálie.....	20

3.2	Přístrojové a softwarové vybavení	21
3.3	Pracovní postupy	21
3.3.1	Příprava zásobních roztoků	21
3.3.1.1	Zásobní roztok fosfátového pufru	21
3.3.1.2	Příprava zásobních roztoků DABCA	21
3.3.1.3	Příprava zásobních roztoků glycerolu	21
3.3.3	Příprava vzorků	22
3.3.3.1	Příprava vzorků liposomů pro fluorescenční měření	22
3.3.3.2	Příprava vzorků fixačních médií DABCO-glycerolu	22
3.3.3.3	Příprava vzorků fixačních médií agarosového gelu	22
3.3.4	Metody aplikace fixačního média	23
3.3.5	Měření konfokálním fluorescenčním mikroskopem	23
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1	Vyhodnocení vzorků	24
4.1.1	Fixační medium DABCO-glycerol	24
4.1.2	Agarosový gel	26
5	ZÁVĚR	27
6	POUŽITÁ LITERATURA	28
7	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	30
7.1	Seznam symbolů	30
7.2	Seznam zkratk	30
8	PŘÍLOHY	31

1 ÚVOD

Pořizování obrazů mikroskopických objektů, ať už mikrobublin, micel či jiných útvarů, není vždy úplně jednoduché a jsou na ně kladeny jisté požadavky. Všechny mikročástice totiž vykazují jistý pohyb. Je jím tzv. Brownův pohyb, který je definován jako ustavičný neuspořádaný pohyb částic v kapalinách či plynech. Čím menší částice, tím větší je tento pohyb. Právě k zastavení těchto pohybujících se částic používáme fixační média a jsme díky nim schopni získat kvalitní obrazy sledovaných objektů.

Mikroskopické částice je samozřejmě možné pozorovat pod mikroskopem i bez použití fixačních médií. Naneseme-li vzorek na sklíčko, dochází k usazování největších částic dole na skle, kde se dají pozorovat. V laboratoři ale může docházet k nechtěným otřesům, jejichž následkem se pozorovaný vzorek pohne nebo se rozjede, což by se v ideálním případě stávat nemělo. Tomu právě můžeme předcházet použitím fixačních médií.

U menších částic, které jsou vystaveny většímu Brownovu pohybu, je již použití fixačních médií nezbytné. Fixační média se např. používají u zkoumání vzorků na konfokálních mikroskopech, které potřebují poměrně dlouhý časový interval na provedení jemného skenu vzorku.

Cílem této bakalářské práce je pak nalézt co nejvhodnější fixační prostředek pro mikroskopii liposomů. Tyto poznatky by mohli být dále uplatněny pro fixaci objektů, které jsou strukturálně liposomům podobné.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fixace

Fixace je jednou z metod užívaných během přípravy mikroskopických preparátů. V momentě, kdy je oddělena část vzorku od organismu, dochází uvnitř něj k intracelulárnímu trávení enzymy (autolýze) způsobené přerušáním přísunu kyslíku k buňkám i tkáním a dalším degradačním procesům (vysychání, mikrobiální rozklad, osmoticky způsobené změny,...). Cílem fixace je co nejvíce zabránit těmto procesům a snaha o maximální zachování buněčné struktury oproti nativnímu stavu. [1] [4]

Fixace samozřejmě není ideální proces a dochází při ní, i během následujících kroků, k mnoha změnám vlastností či vzhledu buněčných a tkáňových složek. Mohou to být změny jako je smrštění, otok nebo tvrdnutí komponent. Důležité je, aby byly vzorky chráněny před škodlivými účinky zpracování, ale zachovaly si reaktivitu vůči barvení a jiným reakčním činidlům. Proto je nutné věnovat zvýšenou pozornost výběru vhodného typu fixace a fixačního činidla, jelikož mohou různě ovlivňovat vlastnosti vzorku. Z tohoto důvodu se používají i fixační směsi, které potlačují nežádoucí vlastnosti jednoho činidla a podporují vlastnosti druhého, např. směs Formaldehydu, etanolu a kyseliny octové. [2] [4]

2.1.1 Dělení fixačních médií

Jedním z kritérií, kterým můžeme dělit fixační média, je na základě jejich schopnosti srážet (koagulovat) bílkoviny. Dělíme je na:

- Koagulující fixativa – hlavním mechanismem je denaturace bílkovin. Rozpustnost bílkovin ve vodném prostředí je určována uspořádáním řetězce, kdy hydrofobní část řetězce leží uvnitř a hydrofilní vně terciární struktury bílkovin. Koagulující fixativa způsobují změny sekundární a terciární struktury bílkovin. Mají za následek ovlivnění funkce bílkoviny a snížení její rozpustnosti. Interakcí hydrofobních částí mezi bílkovinami dochází k jejich vzájemnému propojení, zesíťování a celkové stabilizaci. Síla koagulátu a koncentrace bílkoviny má vliv na rozsah srážení. Příkladem těchto látek může být aceton, etanol, kyselina dusičná, kyselina pikrová,...
- Nekoagulující fixativa – k propojení bílkovin dochází prostřednictvím chemické vazby, nikoliv jejich srážení. Propojením protoplasmatických komponent jsou lépe zachovány intracelulární detaily, než je tomu v prvním případě. Příkladem jsou albuminy (formaldehyd, glutaraldehyd (GA), akrolein) a oxid osmičelý.

Dále mohou být fixační prostředky rozděleny podle toho, zůstávají-li po ukončení procesu fixace navázány v pletivu. Dělíme je na neaditivní (neváží se do pletiva, např. koagulující fixativa) a aditivní (tvoří stabilní vazby s částmi pletiva, např. aldehyd a oxid osmičelý). Tyto dva druhy dělení se však v mnohém překrývají. [4]

2.1.2 Fyzikální fixační prostředky

Fyzikální fixační prostředky zahrnují tyto metody: fixace suchým teplem nebo varem (na tkáňových vzorcích používána výjimečně, využívá se u rychlého zhotovování preparátů z biopsií), lyofilizace (známá také jako freeze-drying, vysoušení za nízké teploty má některá využití v histochemii, ale nebývá aplikována na diagnostikování vzorků tkáně), mrazová substituce a stabilizace pomocí mikrovláken (jejich působením se vytvoří v tkáni kanálky, kterými lépe prostupuje fixační činidlo). [2] [5]

2.1.3 Chemické fixační prostředky

Fungují na základě reakcí fixačních prostředků s jednotlivými částmi biologického vzorku. Jedná se o roztoky anorganických i organických sloučenin, které svým působením zapříčiňují imobilizaci a celkovou stabilizaci vzorku. Po dokončení procesu fixace je ve většině

případech nutné odstranit nadbytečný fixační prostředek ze vzorku jeho vypíráním v pramenité vodě nebo v 80% etanolu.

Existují dvě metody, kterými můžeme provést chemickou fixaci. Jsou jimi imerze (ponoření) a perfúze (promývání): [1] [5]

- Imerze – vzorek je ponořen do fixačního činidla na potřebnou dobu. Tato doba se pohybuje v řádu několika minut či hodin, ojediněle je to v rámci dnů až týdnů.
- Perfúze – používá se převážně u celých orgánů či malých zvířat. Fixační prostředek je skrze krevní řečiště dopraven k buňkám daného orgánu.

2.1.4 Faktory ovlivňující fixaci

2.1.4.1 Teplota fixačního roztoku

Zvýšením teploty fixačního prostředku v určité míře zvýšíme rychlost jeho difúze do tkáně a rychlost chemické reakce mezi fixativem a vzorkem tkáně. Na druhou stranu tím ale zvyšujeme rychlost autodegradačních a autolytických procesů v nefixovaných částech vzorku. Pro zbrzdění autodegradačních procesů je výhodná nižší teplota, ale ta naopak výrazně zpomaluje fixační proces. U světelné mikroskopie se většinou praktikuje fixace za laboratorní teploty, která může být následována další fixací do 45°C. Při použití mikrovlnné fixace se po krátkou dobu používá teplota až 65°C. Částečně nám může pomoci určit teplotu způsob fixace, kdy se při perfúzní fixaci doporučuje upravit teplotu na teplotu živého organismu. Určení teploty je i přesto nejednoznačné a záleží vždy na momentálních preferencích a ostatních faktorech. [1] [3]

2.1.4.2 Čas

Vzorky potřebují dostatek času, aby fixativum proniklo difúzí do středu vzorku a tam mohlo zreagovat. Rozhodně ale neplatí pravidlo, že čím déle vystavíme vzorek fixačnímu médiu, tím lépe bude fixován. Při příliš dlouhém styku fixačního činidla se vzorkem může dojít např. ke zkapalnění proteinů přeměněných při reakci s GA na gel a jejich následnému vyplavení během dalšího zpracování vzorku. Příliš velké snížení doby působení má za následek nekvalitně fixované části vzorku, které budou při pozorování výsledků vykazovat zkreslení. Doba se tedy liší v závislosti na velikosti fixovaného materiálu, teplotě fixačního roztoku, jeho složení, způsobu fixace atd. [1] [3]

2.1.4.3 Rychlost penetrace

Je závislá na difúzních vlastnostech, které jsou pro každý fixační prostředek specifické. Rychlost penetrace může být vyjádřena jako:

$$d = K \cdot \sqrt{t} \quad (1)$$

kde d je hloubka průniku, K je koeficient difúze (charakteristický pro každou látku) a t je čas. Koeficient difúze K tedy určuje, do jaké vzdálenosti vzorku (v mm) dokáže proniknout fixativum za 1 hodinu. Je-li tedy např. u formalínu koeficient $K = 0,78$, potrvá jeho průnik do centra vzorku tloušťky 10 mm přibližně 25 hodin ($= 5^2$ h). Rychlost ovlivňují i další faktory, kterými jsou teplota, velikost vzorku a jeho povaha (např. fixační média obtížně procházejí kompaktním pletivem, ale lehce parenchymatickým pletivem). [3] [4]

2.1.4.4 Rozměry vzorku

Jak již bylo řečeno v 2.1.4.2, dobu fixace ovlivňují i rozměry vzorku. Je dáno, že by vzorek neměl být silnější než 4 mm. Ideální fixaci a zpracování poskytuje už ale vzorek o tloušťce 3 mm. Navíc vzorky určené pro transmisní elektronovou mikroskopii by neměly přesahovat velikost 1 mm³. [1] [3]

2.1.4.5 Objemový poměr

Pro kvalitně fixovaný vzorek je potřeba mít určitý přebytek fixačního média. Dostatek fixativa brání jeho vyčerpání či naředění působením přidaného objektu. V literatuře se nejmenší přebytek uvádí v poměru 20:1 a největší kolem 100:1. [3] [4]

2.1.4.6 pH a pufrů

pH fixačních prostředků, používaných při světelné mikroskopii, nemá zásadní vliv na uchování a kvalitu fixace. Většina z těchto médií se vyznačuje nízkým pH, např. obsahují-li kyselinu octovou nebo pikrovou. pH je ale důležité třeba u formaldehydu. Jeho rozpadem na kyselinu mravenčí vzniká kyselý roztok, který dále reaguje s hemoglobinem. Proto se tento hojně používaný roztok pufruje na pH mezi 6,8–7,2.[3]

U fixačních prostředků, používaných při elektronové mikroskopii, je velikost pH mnohem významnější a měla by mít přibližně fyziologickou hodnotu. Použití pufrů je tak nezbytné třeba v případě oxidu osmičelého, jehož hodnota pH se může pohybovat mezi 2–3. Doporučená hodnota pH se pohybuje v rozmezí 6,7–7,1. [1] [3]

2.1.4.7 Osmotické vlastnosti

Intracelulární roztoky v buňce jsou od sebe odděleny semipermeabilními membránami, které propouštějí jen vodu a některé jiné látky. Pohyb těchto látek přes membránu je určen rozdílem koncentrací těchto roztoků. Se zvyšujícím se rozdílem koncentrací se zvyšuje i tlak vody na membránu (osmotický tlak), který určuje velikost hydrostatického tlaku potřebného na straně koncentrovanějšího roztoku, aby do něj neproudila voda. Fixační roztoky by neměly výrazně měnit osmotický tlak a tím by nemělo docházet k objemové změně buňky přijímáním nebo uvolňováním vody. Roztoky zvětšující objem buněk se nazývají hypotonické, zmenšující objem jsou hypertonické a nevyvolávající změnu objemu jsou izotonické. Posledními zmíněnými by měli být fixační média. [1]

2.1.5 Fixační činidla

Pro fluorescenční mikroskopii se například používá PPD-glycerol. Parafenylendiamin se využívá v případě, kdy je pH vyšší než 8. Je-li nižší, dochází k vyblednutí. Tomu předcházíme použitím pufru. Výsledná směs tak obsahuje 0,1–0,01% PPD, 50–70% glycerol v PBS a 50% glycerol v 20 nM fosfátového pufru (pH 8,5). Nesmí se však použít metafenylendiamin, který se slabou kyselinou tvoří žlutě fluoreskující bazofilní skvrny.

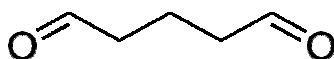
Dále je možné použít DABCO-PVA. Je to směs 2,5% DABCA, 10% polyvinylalkoholu, 5% glycerolu a 25 mM tris pufru (pH 8,7). Směs se uchovává v lednici. Se vzduchem degraduje, proto se po rozmrazení nespotebovaný zbytek vylévá.

Třetím příkladem je NPG-glycerol, kdy se smíchá 2% n-propyl-galát, 49% PBS a 49% glycerol. Výsledná směs má by měla mít pH 7,4.

V mé bakalářské práci jsem pracovala s několika koncentracemi agarosového gelu a různými koncentracemi a poměry DABCO-glycerolu. Na následujících odstavcích je výčet několika známých fixačních prostředků. [6]

Glutaraldehyd (GA)

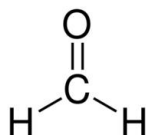
Prodává se jako vodný, čirý, štiplavě zapáchající roztok o koncentraci do 70 %, vyšší koncentrace mohou mít nepříznivý účinek na fixaci. GA má ve své struktuře dvě aldehydické skupiny schopné se vázat např. se dvěma bílkovinnými molekulami. Je to velmi silné fixační činidlo. Reaguje především s peptidy a bílkovinami a to díky rychlé reakci s aminoskupinou lysinu. Reaguje také s deoxyribonukleovou kyselinou, ale nereaguje zase např. s lipidy, proteoglykany a některými polysacharidy. Dobře zachovává jemné cytologické detaily. Po fixaci GA si membrány udržují své permeabilní vlastnosti. Využívá se k ultrastrukturálním studiím, které vyžadují elektronový mikroskop. [1] [4]



Obrázek 1 Strukturální vzorec GA

Formaldehyd (FA)

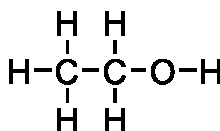
Při standardních podmínkách se jedná o štiplavý plyn dobře rozpustný ve vodě. Prodává se jeho vodný roztok (formalín) o koncentraci do 40 %. Na aminoskupiny bílkovin se na rozdíl od GA váže pouze jednou aldehydickou skupinou. Proto je také fixace FA oproti GA výrazně slabší, ale díky malé velikosti molekuly mnohem rychlejší. Z tohoto důvodu se právě často využívá kombinace těchto dvou činidel. FA se využívá k přípravě preparátů pro následné imunoznačení. Je to nekoagulující fixativum. [1] [4]



Obrázek 2 Strukturální vzorec FA

Etanol

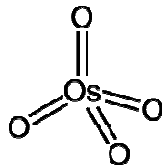
Je to poměrně rychle pronikající fixační prostředek, kdy se využívá jeho vodný roztok o koncentraci 50–70 %. Pravděpodobně narušuje hydrofobní interakce bílkovin a ovlivňuje tak jejich terciární strukturu. Posiluje vodíkové můstky, čímž pomáhá zachovávat sekundární strukturu bílkovin. Je to koagulující fixativum. [4]



Obrázek 3 Strukturální vzorec etanolu

Oxid osmičelý

Při pokojové teplotě je to průsvitná nažloutlá krystalická látka, která je silně těkavá s dráždivými účinky. Pro fixaci se používá jeho 1–4% vodný roztok, s kterým je ale třeba pracovat v digestoři. Je to silné oxidační činidlo, které jako jedno z mála fixuje lipidy. Reaguje s α -aminokyselinami za vzniku α -ketokyselin a karboxylových kyselin. S organickými látkami tvoří tzv. osmiovou čern, která zbarví preparáty po fixaci černě. Při pH vyšším než 7 se zase osmiové ionty redukuje, čímž se sníží účinek fixačního roztoku. To se projeví zružovněním a následným ztmavnutím roztoku, který se pak už nedá použít. Nereaguje s glycidy, nedenaturovanou deoxyribonukleovou kyselinou a jinými buněčnými součástmi. Využívá se k sekundární fixaci po primární aldehydové fixaci. [1]

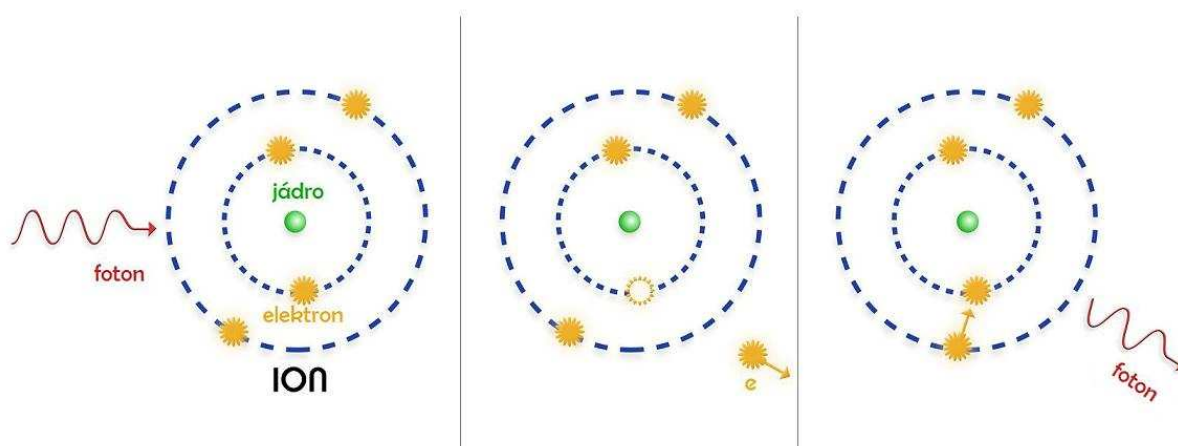


Obrázek 4 Strukturální vzorec oxidu osmičelého

2.2 Fluorescence

2.2.1 Obecná teorie

Atomové orbitály představují určitou míru energie potřebnou na udržení elektronu v obalu. Čím jsou vzdálenější, tím je na udržení elektronů třeba více energie. V základním stavu elektrony obíhají nejbližce jádru, takže má atom minimální energii. Absorbací energie dopadajícího záření (nebo elektronů) dochází k přechodům elektronů do vzdálenějších orbitalů a tím ke zvětšení energie atomu. Tento stav atomu se nazývá excitovaný (vybuzený). Je ale velice nestabilní, a tak dochází k návratu atomu do základního stavu. Přebytková energie je vyzářena (emitována) v podobě kvanta zářivé energie – fotonu. Na tomto principu fungují všechny luminiscenční jevy (viz **Obrázek 5**). [7]



Obrázek 5 Princip fluorescence – absorpce fotonu (vlevo), excitace elektronu (uprostřed), návrat atomu do základního stavu a vyzáření fotonu (vpravo). Upraveno a převzato z [8]

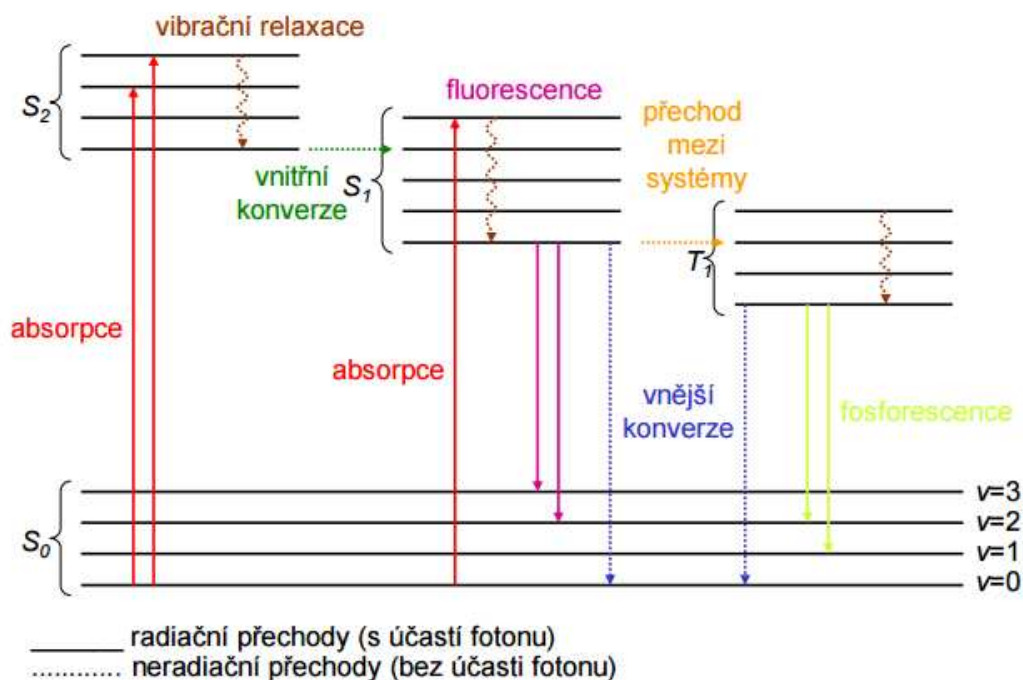
Luminiscenci (lumen = světlo) představil poprvé fyzik Eilhardt Wiedemann v roce 1888. Na rozdíl od inkandescence se jedná o emisi světla, u které převažuje vlastní záření nad tepelným. Je tedy také nazývána jako studené světlo. Při luminiscenčních jevech jsou z excitovaných stavů emitovány ultrafialové (UV), viditelné (VIS) a infračervené (IR) fotony mechanismem chemickým, fyzikálním (absorpce) nebo mechanickým (tření). Na základě druhu excitačního záření pak dělíme luminiscenci na elektroluminiscenci, radioluminiscenci, chemiluminiscenci, bioluminiscenci, triboluminiscenci, termoluminiscenci, sonoluminiscenci a fotoluminiscenci. [9] [9] [10]

Fotoluminiscence je založena na excitaci záření v UV a VIS oblasti. Je dále rozdělena na dvě podskupiny – fosforescenci a fluorescenci, na základě jejich emisní dráhy, excitovaného stavu a elektronické konfigurace. V dalších odstavcích se však budeme věnovat pouze druhé zmíněné podskupině. [9]

Fluorescence byla poprvé objevena v roce 1852 sirem Georgem G. Stokesem, který ji pojmenoval po minerálu fluoritu (kazivci), u něhož byla poprvé pozorována modro-bílá fluorescence. Po ukončení excitačního (primárního) záření je fluorescence tzv. sekundárním zářením. To se také označuje jako dosvit. Fluorescence je typická absorbováním světla o určité vlnové délce a následným vyzářením světla o větší vlnové délce v časovém intervalu 10^{-9} – 10^{-6} s. Elektrony tak přecházejí z prvního singletového stavu (S_1) na základní hladinu (S_0). Fluorescenci pozorujeme zřídka u anorganických látek, ale často se s ní setkáváme u organických látek, zvláště pokud obsahují aromatické jádro. [7] [9]

2.2.2 Jablonského diagram

Pro vizualizaci procesů, probíhajících od absorpce světla až po jeho emisi, slouží tzv. Jablonského diagram, který je pojmenován podle profesora Alexandra Jablonski. Do těchto procesů spadá: absorpce fotonů, vnitřní konverze, fluorescence, mezisystémový přechod, fosforescence a zpožděná fluorescence. Jablonského diagram zobrazuje singletové elektronové stavy S_0 , S_1 , S_2 , tripletové stavy T_1 , T_2 a vibrační hladiny jednotlivých stavů. [9] [11]



Obrázek 6 Jablonského diagram, převzato z [13]

2.2.2.1 Absorpce

Absorpce (excitace) ve většině případech začíná při pokojové teplotě na 0 vibrační hladině stavu S_0 . Absorpcí fotonu dochází k přechodům molekul na jednu z vibračních hladin stavů S_1 či S_2 . Tento proces je velmi rychlý a trvá přibližně 10^{-15} s. Poté probíhají následující nezářivé a zářivé přechody. [10] [11]

2.2.2.2 Nezářivé přechody

Vnitřní a vnější konverze

Při *vnitřní konverzi* dochází k přestupu molekuly mezi dvěma stavy, jež disponují stejnou spinovou multiplicitou (např. $S_2 \rightarrow S_1$). To se odehrává mezi 10^{-14} – 10^{-10} s. Tento typ konverze je typický pro alifatické molekuly, ale u rigidních cyklických struktur nebývá častý.

Srážkami excitovaných molekul s molekulami rozpouštědla může dojít k převedení přebytečné vibrační energie do rozpouštědla. Tento jev je známý jako *vnější konverze*.

Vibrační relaxace

Doprovodným procesem v roztoku je *vibrační relaxace*, při které přechází molekula z vyšší vibrační hladiny do nejnižší vibrační hladiny daného elektronového stavu. Probíhá v rozmezí 10^{-12} – 10^{-10} s.

Mezisystémový přechod

Jedná se o zakázaný přechod mezi systémy o různé spinové multiplicitě, $S_1 \rightarrow T_1$. Po vibrační relaxaci a vnitřní i vnější konverzi jde o další nezářivý přechod. Přejde-li molekula do vyšší vibrační hladiny T_n , následuje vibrační relaxace. Celý děj se odehrává během 10^{-9} – 10^{-7} s. [9] [10] [11]

2.2.2.3 Zářivé přechody

Fluorescence

Jak již bylo řečeno v 2.2, je to přechod z S_1 do S_0 . Přechod 0-0 bývá stejný jak pro absorpci, tak pro fluorescenci. Fluorescenční spektrum je charakteristické většími vlnovými délkami (nižší energií) než absorpční spektrum, což je dáno ztrátou energie během vibrační relaxace. Většinou je však fluorescenční spektrum částečně překryto absorpčním spektrem. Následkem toho je část světla emitována v nižších vlnových délkách než absorbované světlo. To však odporuje *Stokesovu pravidlu*, podle kterého by měla být vlnová délka fluorescenční emise vždy vyšší než absorpční. Je to tedy dáno tím, že jsou některé molekuly při pokojové teplotě ve vyšší vibrační hladině. Tato odchylka se dá redukovat snížením teploty. [9]

Fosforescence

Stejně jako u fluorescence je to sekundární záření, jehož doba dosvitu je 10^{-3} – 10^2 s. Přechod nastává z T_1 na S_0 . Tento přechod je však zakázaný, takže při pokojové teplotě převažují nezářivé deexcitace jako je mezisystémový přechod a vibrační relaxace. Za nízkých teplot a v tuhém médiu je už upřednostňována fosforescence. Energie nejnižší vibrační hladiny stavu T_1 je nižší než odpovídající hladina stavu S_1 . Proto se nachází fosforescenční spektrum na vyšších vlnových délkách než fluorescenční. [7] [9]

Zpožděná fluorescence

Je-li malý rozdíl energie mezi S_1 a T_1 a navíc má T_1 dostatečnou dobu života, tak může nastat tepelně vyvolaný zpětný mezisystémový přechod z T_1 na S_1 . Zpožděná fluorescence přechází stejně jako běžná fluorescence z $S_1 \rightarrow S_0$, ale její doba dohasínání je delší o časový interval potřebný na přechod z tripletového stavu. Tepelně vybuzené zpožděné fluorescenci se také říká fluorescence E-typu. U aromatických uhlovodíků není běžná. Lze ji pozorovat u fullerenu.

V koncentrovaných roztocích mohou nastávat srážky mezi dvěma molekulami v T_1 , což poskytne dost energie na přenos jedné molekuli zpět do S_1 . Nastane-li tato situace, mluvíme o triplet-tripletové anihilaci, která způsobuje tzv. zpožděnou fluorescenci P-typu. [9]

2.3 Fluorescenční barviva

Fluorofory (fluorochromy) jsou chemická barviva, jejichž molekuly jsou schopny fluorescence. Tyto sloučeniny obsahují funkční skupinu schopnou reakce se skupinou nukleofilní (NH_2 , OH , SH). Fluorofory mohou být dvojího typu, buď tzv. vnitřní (vlastní) nebo vnější (nevlastní). [7]

2.3.1 Vnitřní fluorofory

Způsobují vnitřní fluorescenci, jelikož se přirozeně vyskytují ve vzorcích. Řadí se mezi ně proteiny, redukované formy NADH a NADPH, oxidované formy flavoproteinů, vitamin A, cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin a chlorofyl. Všechny tyto zmíněné látky, krom proteinů, vyzařují ve VIS spektru (modrá, žlutá nebo červená fluorescence). Pro proteiny je charakteristické vyzařování fluorescence v UV oblasti. Mezi fluorofory přítomné v proteinech patří aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tryptofan a tyrosin), pro něž leží absorpční i emisní spektrum v oblasti mezi 240–300 nm. Existují však i třídy proteinů, u nichž se projevuje fluorescence při větších vlnových délkách, např. fykobiliproteiny

(z cyanobakterií a modro-zelených či červených řas), zelený fluorescentní protein (z bioluminiscentní medúzy) nebo fytofluory (ve fotosyntetizujících organismech). [7] [13]

2.3.2 Vnější fluorofory

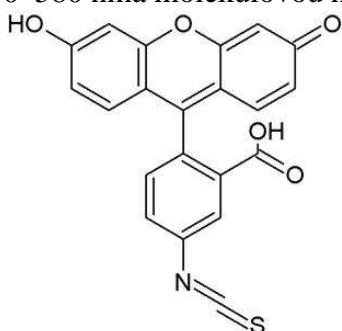
Jsou využívány více než vnitřní fluorofory. Na rozdíl od vnitřních fluoroforů je musíme ke zkoumanému vzorku přidat. Jedním z kritérií pro dělení vnějších fluoroforů je na základě jejich kvantového výtěžku fluorescence. Jsou jimi buď látky používané běžně v cytochemii, které přidáním ke vzorku nemění kvantový výtěžek fluorescence (např. fluorescein, akridinová oranž, eozin,...), nebo látky, jejichž kvantový výtěžek je ovlivněn přímým okolím fluoroforu (např. 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien).

Druhým možným kritériem dělení, je podle typu vazby. Váží-li se na studovaný vzorek kovalentně, tak mluvíme o fluorescenčních značkách. Nekovalentně vázané fluorofory se nazývají fluorescenční sondy. [7] [13]

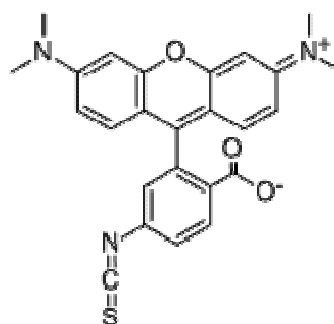
2.3.2.1 Fluorescenční značky

Fluorescenční značky se váží ke vzorkům pomocí kovalentní vazby. Využívají se tak ke značení např. peptidů, oligonukleotidů, ligandů a především proteinů, ke kterým se váží kovalentně přes aminový, histidinový a sulfhydrylový řetězec nebo i thiolovou skupinu. Často využívanými značkami při imunofluorescenčních metodách jsou fluoresceinizokyanát (FITC) a tetramethylrhodaminizothiokyanát (TRITC). [7] [13]

- FITC – má absorpční maximum při 495 nm, fluorescenční maximum při 519 nm a molekulovou hmotnost 389. Nevýhodami je, že lehce podléhá fotodestrukcii a že pH silně ovlivňuje jeho citlivost.
- TRITC – jeho absorpční maximum se pohybuje mezi 535–545 nm, fluorescenční mezi 570–580 nm a molekulovou hmotnost má 479.



Obrázek 7 Strukturní vzorec FITC

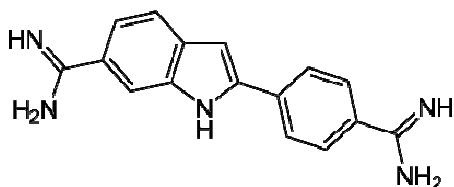


Obrázek 8 Strukturní vzorec TRITC

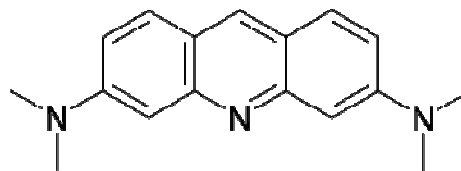
2.3.2.2 Fluorescenční sondy

Fluorescenční sondy se váží ke vzorkům nekovalentně, což je často doprovázeno změnou jejich fluorescenčních vlastností. Využívají se ke zjišťování změn konformace bílkovin, membránového potenciálu, tloušťky membrán atd. Nejpoužívanějšími sondami jsou 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) a akridinová oranž. [7]

- DAPI – používá se pro vizualizaci jaderné DNA, absorpční maximum při 345 nm, fluorescenční maximum při 455 nm a molekulová hmotnost je 277.
- Akridinová oranž – absorpční i emisní spektrum závisí na substrátu, s kterým je vázána (DNA/RNA)



Obrázek 9 Strukturní vzorec DAPI



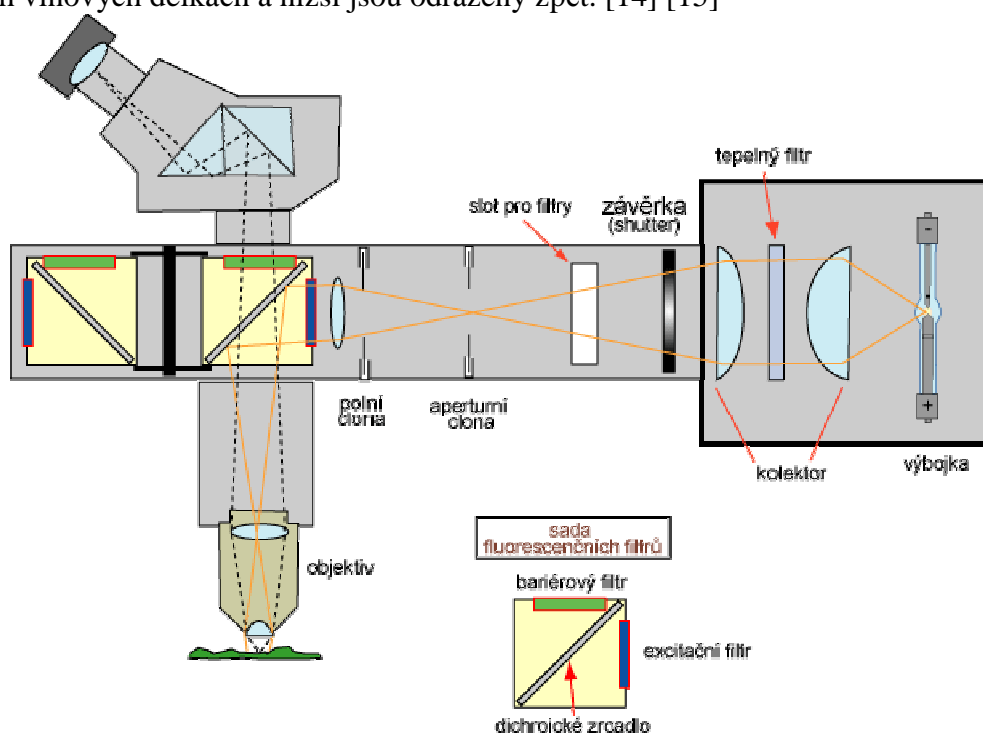
Obrázek 10 Strukturní vzorec Akridinové oranže

2.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie slouží ke studiu látek vyskytujících se ve velmi malých množstvích. Má vysokou citlivost danou velkým kontrastem vůči pozadí, kdy pozorujeme jasný signál na tmavém pozadí. Díky tomu je metoda vhodná ke studiu rozložení látek v živých buňkách. Nejčastěji se využívá v oblasti biologie a medicíny.

Fluorescenční mikroskop se od běžného optického mikroskopu liší použitým zdrojem světla a upravenou detekcí pozorovaných objektů. Jako zdroj světla využívá nejčastěji vysokotlakou rtuťovou výbojku emitující záření o dostatečné intenzitě v UV-VIS oblasti. Tato výbojka tvořena trubicí z křemenného skla plněná inertním plynem a rtuť vyzáří nejvíce světelné energie ve vlnových délkách 356–546 nm. Proto se používají k excitaci elektronů fluorescenčních barviv. [5] [14]

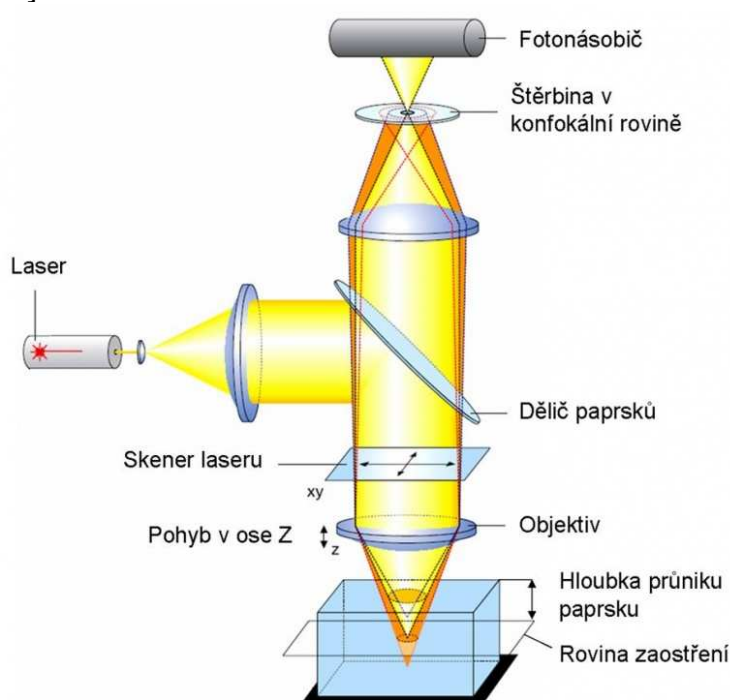
Záření z výbojky prochází přes excitační filtr, který je propustný pro vlnové délky potřebné k excitaci fluorochromu. Není však propustný pro stejné či podobné vlnové délky jako má emisní záření, které vytváří při pozorování nežádoucí barevné pozadí. Průchozí záření dopadá na dichroické zrcadlo natočené v úhlu 45°. To odráží excitační paprsky a ty pak procházejí přes objektiv na sledovaný preparát. V preparátu dojde k excitaci elektronů a při jejich návratu do původního energetického stavu se do všech stran vyzáří fluorescenční světlo o vyšší vlnové délce. Imerzní objektiv s imerzním olejem pak propouští jen některé záření, které prochází přes dichroické zrcadlo a dopadá na bariérový filtr. Bariérový filtr brání průchodu odraženého excitačního záření s vyšší intenzitou, než má záření emisní, protože je oku škodlivé zkresluje pozorování. Do okulárů prochází tedy jen fluorescenční záření o vyšších vlnových délkách a nižší jsou odraženy zpět. [14] [15]



Obrázek 11 Schéma klasického fluorescenčního mikroskopu. Převzato z [4]

Většina mikroskopů počítá s nekonečně malou tloušťkou vzorků. Všechny pozorované objekty jsou ale trojrozměrné. U klasických mikroskopů pozorujeme jen určitou zaostřenou rovinu řezu, proto může u tlustších objektů docházet ke zkreslení výsledného obrazu rovinami nad a pod zaostřenou rovinou. Je to dáno tím, že se tyto roviny nachází mimo ohniskovou vzdálenost objektivu. Zkreslení ve formě šumu je možné omezit použitím konfokálního mikroskopu. [7]

Konfokální mikroskop se od klasického mikroskopu liší použitým zdrojem světla. Je jím laserový paprsek, který prochází přes úzkou štěrbinu, čímž se zaostří do jediného bodu vzorku. Následně emitované záření je fokusováno objektivem na další úzkou štěrbinu (pinhole). Emitované světlo z nezaostřených bodů se na štěrbinu nezaměřuje, takže dále neprochází. Záření procházející přes štěrbinu je zpracováno detektorem (fotonásobičem) a výsledný signál je poslán do počítače. Takto jsou postupně proskenovány všechny body celého objektu. [13]



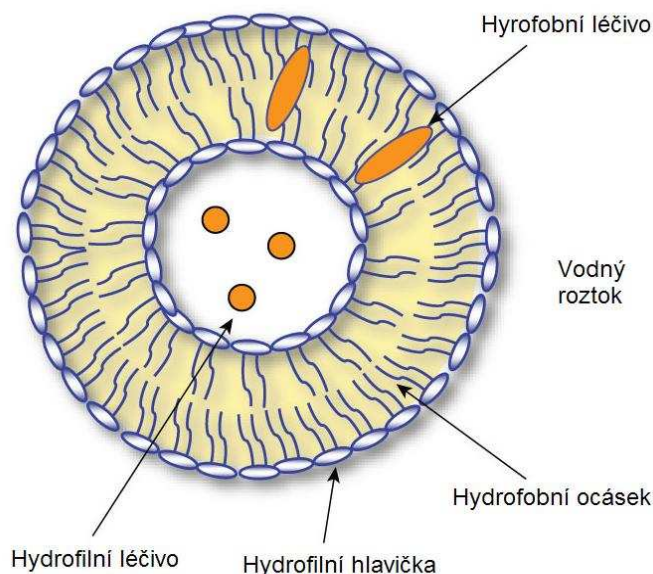
Obrázek 12 Schéma konfokálního mikroskopu. Převzato z [16]

2.5 Liposomy

Liposomy jsou uměle vytvořené membránové váčky (vezikuly) sférického tvaru vytvořené z cholesterolu a jiného přírodního netoxického fosfolipidu (např. lecitinu). Díky svému hydrofobnímu a hydrofilnímu charakteru, stabilitě a velikosti jsou liposomy potenciálními prostředky pro transport léčivých látek. Obecně liposomy považujeme za kulovité vezikuly, které jsou biokompatibilní, biodegradabilní a málo toxické. [17]

2.5.1 Stavba liposomů

Fosfolipidy ve vodných roztocích tvoří dvouvrstvy (lamely). Liposomy se skládají z jedné nebo více těchto dvouvrstev. Ty jsou tvořeny hydrofilními polárními hlavičkami, orientovanými k polární vnitřní a vnější vodné fázi, a hydrofobními nepolárními ocásky orientovanými k sobě. Nenasycené fosfolipidy tvoří méně stabilní propustné membrány, zatímco nasycené fosfolipidy s dlouhými řetězci tvoří membrány pevné a poměrně nepropustné. Vlastnosti liposomů se značně mění podle jejich složení, velikosti, povrchového náboje či metody přípravy. [17]



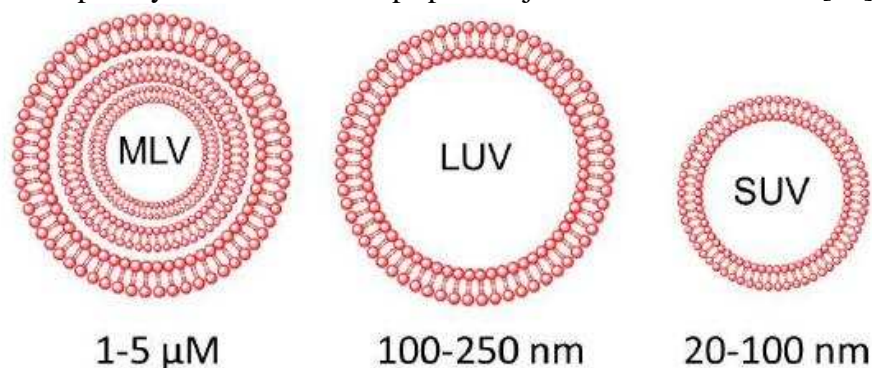
Obrázek 13 Schéma struktury liposomu a zobrazení možností přenosu léčivých látek. Upraveno a převzato z [18]

2.5.2 Velikosti liposomů

Jejich velikost může být od 25 nm až po 2,5 μm a mohou být tvořeny jednou nebo více dvouvrstevnými membránami. Dle velikosti a počtu dvouvrstev je dělíme na:

- Malé unilamelární vezikuly (SUV)
- Velké unilamelární vezikuly (LUV)
- Multilamelární vezikuly (MLV)

Unilamelární vezikuly jsou tvořeny jednou dvouvrstvou fosfolipidů a multilamelární jsou tvořené více fosfolipidovými dvouvrstvami připomínajících strukturu cibule. [17]



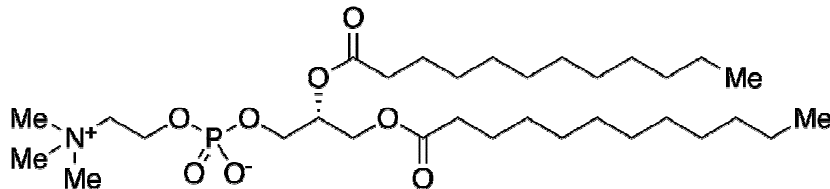
Obrázek 14 Velikosti liposomů. Převzato z [19]

2.5.3 Příprava liposomů

Existuje několik způsobů přípravy liposomů a každý z nich jinak ovlivňuje výsledný tvar, velikost či stabilitu liposomů. Mezi nejznámější patří odpařování na tenké vrstvě, kdy se nejprve lipidy nechají rozpustit v chloroformu nebo metanolu. Poté se nechá rozpouštědlo vysušit na rotační odparce nebo při malých koncentracích proudem vzduchu. Vzniklý lipidový film se rehydratuje vodným roztokem. Takto se připravují MLV, které mohou být rozděleny na menší liposomy sonifikací. Další možnosti přípravy jsou etanolové vstřikovávání, odpařování reverzní fáze či metoda French press. [19]

2.5.4 Lecitin

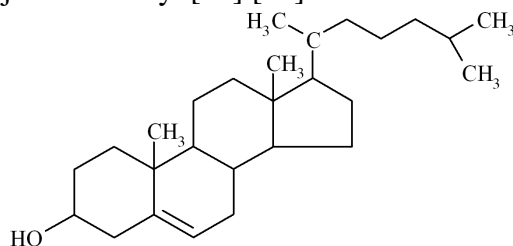
Lecitin (fosfatidylcholin) je jedním z nejpoužívanějších fosfolipidů využívaných pro syntézu liposomů. Nejvyšší obsah má ve vaječných žloutcích, ale nachází se i ve slunečnicových semínkách, vnitřnostech, másle, sádle, obilí a zelenině. Rafinací rostlinného oleje vzniká průmyslový preparát lecitinu, který obsahuje acylglyceroly, steroly, volné mastné kyseliny atd. Používá se hojně v potravinářském průmyslu jako emulgátor. [21]



Obrázek 15 Strukturální vzorec lecitinu

2.5.5 Cholesterol

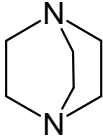
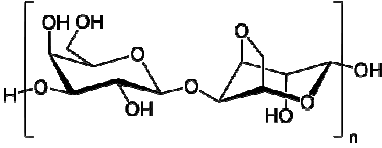
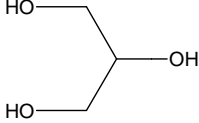
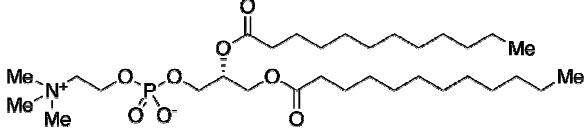
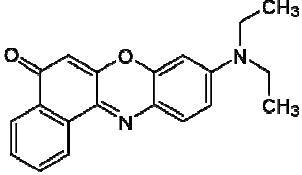
Jedná se o nejčastější živočišný steroid s větveným 8–10 uhlíkatým alifatickým řetězcem. Je jednou ze složek buněčné membrány a také nedílnou součástí lipoproteinů krevní plazmy. Slouží jako metabolický prekurzor steroidních hormonů, které regulují mnoho fyziologických dějů jako např. pohlavní vývoj či metabolismus cukrů. Rostliny však obsahují cholesterol jen v malém množství. Cholesterol se přidává k liposomům pro zpevnění liposomové dvouvrstvy. Tvoří přibližně 30–45 % jejich struktury. [19] [20]



Obrázek 16 Strukturální vzorec cholesterolu

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)	 CAS 280-57-9, Sigma Aldrich $M = 112,17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Agaróza	 CAS 9012-36-6, Serva $M = 630,55 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Deionizovaná voda	H_2O Přečištěná voda přístrojem PURELAB Flex $M = 18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Lachema $M = 156,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Glycerol	 CAS 56-81-5, Sigma Aldrich, čistota $\geq 99,5$ % číslo šarže: BCBK9967V $M = 92,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ CAS: 10039-32-4, Lach:ner, číslo šarže: 319061205 $M = 358,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
L- α -fosfatidylcholin (lecitin)	 Egg, Chicken, CAS 97281-44-2, Avanti PolarLipids, > 99%, číslo šarže: EPC-599 $M = 770,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (průměr)
Nilská červeň	 CAS 7385-67-3, Sigma Aldrich číslo šarže: BCBM0136V $M = 318,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

3.2 Přístrojové a softwarové vybavení

Přístroje

přístroj	typ
Fluorescenční mikroskop	MicroTime 200, PicoQuant GmbH
Laboratorní váhy	DENVER INSTRUMENT
Míchačka magnetická s ohřevem	IKA RH digital KT/C safety control
Mikropipety	Eppendorf Research, Finnpiette
Systém na úpravu vody	PURELAB flex
Ultrazvuk s vodní lázní	BANDELIN SONOREX DIGITEC
Vortex	IKA MS2 Minishaker

Software

ChemSketch
Microsoft Excel
Microsoft Word
SymPhoTime 64

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Příprava zásobních roztoků

3.3.1.1 Příprava zásobního roztoku fosfátového pufru

Pro přípravu 100 ml 0,1 M zásobního roztoku fosfátového pufru byl nejprve připraven roztok A. Na něj bylo naváženo 7,04 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, který se nechal za mírného zahřívání rozpustit ve vodě a poté byl doplněn na finální objem 100 ml.

Na roztok B se nejprve navázilo 3,05 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Navážka se nechala rozpustit ve vodě a výsledný roztok byl opět doplněn vodou na objem 100 ml. Smíšením 40,5 ml roztoku A s 9,5 ml roztoku B a doplněním vodou na objem 100 ml vznikne fosfátový pufr o pH 7,4.

3.3.1.2 Příprava zásobních roztoků DABCA

Různé koncentrace zásobního roztoku DABCA byly získány smísením určitých hmotností DABCA a fosfátového pufru. Množství potřebná pro výsledné roztoky jsou uvedena níže, viz Tabulka 1.

Tabulka 1 Navážená množství DABCA a fosfátového pufru pro výslednou koncentraci

Výsledná koncentrace roztoku DABCA (%)	DABCO (g)	Fosfátový pufr (g)
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6

3.3.1.3 Příprava zásobních roztoků glycerolu

Stejným způsobem, jakým byly namíchány zásobní roztoky DABCA, byly namíchány i zásobní roztoky glycerolu. Množství glycerolu a fosfátového pufru pro výslednou koncentraci zásobního roztoku jsou opět uvedeny v tabulce, viz Tabulka 2.

Tabulka 2 Navážená množství glycerolu a fosfátového pufru pro výslednou koncentraci

Výsledná koncentrace roztoku glycerolu (%)	Glycerol (g)	Fosfátový pufr (g)
90	9,0	1,0
95	9,5	0,5
100	10	-

3.3.3 Příprava vzorků

3.3.3.1 Příprava vzorků liposomů pro fluorescenční měření

Nejprve se do prázdných vialok napipetoval roztok předem připravené nilské červeně v acetonu o koncentraci takové, aby výsledná koncentrace v roztoku byla $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Rozpouštědlo se nechalo odpařit proudem vzduchu. Na odparek sondy se napipetovalo příslušné množství již připraveného zásobního roztoku lecitinu v chloroformu o koncentraci $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Obsah se znovu nechalo odpařit proudem vzduchu. Vzniklý film fosfolipidů se rehydratoval příslušným množstvím deionizované vody. Nakonec se vzorek nechal protřepat na vortexu. Vzorek byl připraven celkem třikrát, kdy se poprvé vůbec nesonifikoval, podruhé jen lehce a potřetí se nechal úplně sonifikovat.

3.3.3.2 Příprava vzorků fixačních médií DABCO-glycerolu

Fixační médium DABCO-glycerol se připravilo smísením zásobního roztoku DABCA a zásobního roztoku glycerolu v náma daných poměrech. Výsledné koncentrace a použité poměry zásobních roztoků jsou uvedeny v tabulce, viz Tabulka 3.

Tabulka 3 Zastoupení jednotlivých látek ve vzorcích DABCO-glycerolu

Číslo vzorku	Roztok DABCA (%)	Roztok glycerolu (%)	Poměr
1	-	100	1:4
2	1	95	1:4
3	1	90	1:5
4	1	100	1:4
5	2	90	1:4
6	3	90	1:4
7	4	90	1:4

3.3.3.3 Příprava vzorků agarosového gelu

Pro každý vzorek se vždy navázilo příslušné množství agarosy, které se nechalo nabobtnat v požadovaném množství fosfátového pufru. Výsledné koncentrace roztoků viz Tabulka 4.

Tabulka 4 Výsledné koncentrace agarosového gelu

Výsledná koncentrace vzorku (%)	Agarosa (g)	Fosfátový pufr (ml)
2	0,1	5
1	0,05	5
0,5	0,025	5
0,1	0,005	5

Vzorky se vložily do kádinky s vodou, která se dala zahřívát na magnetickou míchačku s ohřevem. Teplota ohřevu byla volena tak, aby došlo k úplnému rozpuštění agarosy a vznikl tak čirý gelový roztok.

3.3.4 Metody aplikace fixačního media

U agarosového gelu jsme nejdříve na sklíčko aplikovali liposomální suspenzi, a pak ji běžným způsobem zalili daným mediem. U media DABCO-glycerol jsme vyzkoušeli metod více. První možností bylo stejně jako u agarosového gelu zalévání. Druhý způsob byl, že jsme nejprve na sklíčko nanесли medium a do něho pomocí mikrodávkače aplikovali liposomální suspenzi. Posledním druhem aplikace bylo, že jsme mikropipetou odměřili do zkumavek typu ependorff 10 μm suspenze, zalili jsme to 190 μm fixačního media a nechali promíchat na vortexu.

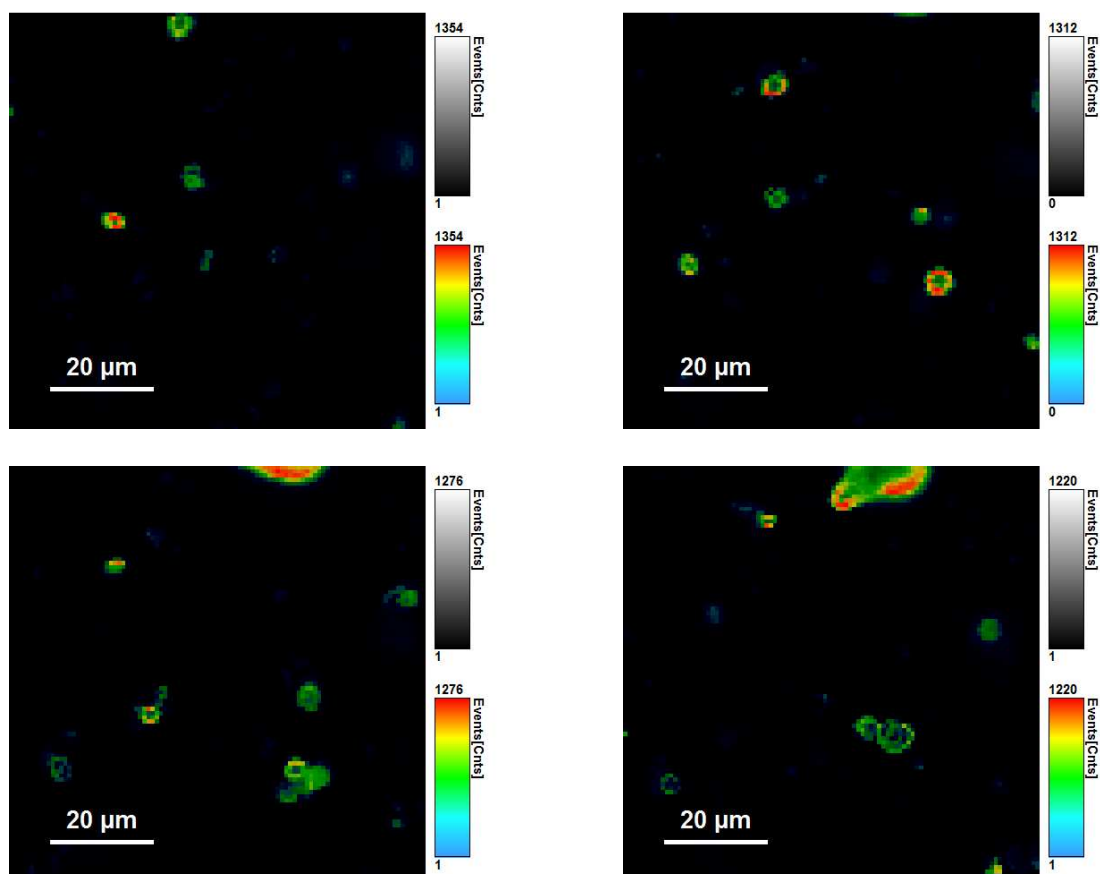
3.3.5 Měření konfokálním fluorescenčním mikroskopem

Měření bylo prováděno pomocí přístroje MicroTime 200, který je tvořen konfokálním mikroskopem značky Olympus IX 71. Při skenování se nejprve mechanicky zaměřil vzorek. Ověřilo se, jestli vzorek fluoreskuje. Pokud tomu tak bylo, provedl se hrubý sken. Jeho výsledkem je obraz o rozloze 80x80 μm a rozlišení 100x100 pixelů. Nejmenší čas pohybu skeneru je 0,8 ms, k tomu se přičítá tzv. learning time (2 s), tedy doba potřebná na převod napětí na krystaly, a doba samotného snímání. Jen hrubý sken tedy trvá nejméně 18,6 s. Když bylo něco pozorováno, udělal se další hrubý sken menší oblasti v ose xy, který trval dalších 19 s. K tomu je potřeba přičíst i čas potřebný na vybrání vhodné oblasti ke skenování, který odhadujeme na 10 s. Poté se provedl jemný sken v ose xz (ověřilo se zaostření v ose z). Nakonec se udělal poslední jemný sken v ose xy. Jeden podrobný sken trval kolem 15–20 minut.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vyhodnocení vzorků

Na následující sérii obrázků je vidět výsledek 4 hrubých skenů liposomální suspenze prováděných na jednom místě (80 x 80 mikronů), bez použití fixačního prostředku. Celkový čas byl 30 s a odstupy mezi koncem jednoho a začátkem druhého měření byly přibližně 10 s. Ze snímků je jasně patrný pohyb liposomů v roztoku. Ani při takto krátkých skenech tedy není možné získat v jednom místě stejný obraz. Vždy se částice liposomu někam pohne a není ji tedy možné samostatně zaměřit. Zde se nám tedy potvrzuje důležitost používání fixačních médií.



Obrázek 17 Měření suspenze liposomů bez použití fixačního média (obrázky jdou zleva doprava).

4.1.1 Fixační medium DABCO-glycerol

Vzorek č. 1

Prvním zkoumaným vzorkem byl 100% glycerol. Nejprve jsme ho zkusili aplikovat na suspenzi pomocí zalévací metody. Už ale při samotném nalévání vzorku bylo pouhým okem patrné, že nedošlo téměř k žádnému smísení média se vzorkem. V tomto případě nebylo možné provést ani hrubý sken, jelikož veškeré liposomy byly buď vytačeny do strany, nebo vyzlínaly.



Obrázek 18 Liposomální suspenze zalitá 100% glycerolem. Na krajích lze poměrně dobře vidět, že došlo k vytlačení liposomální suspenze do strany a roztok se tak nsmísil.

Vyzkoušeli jsme proto i jiné metody, jako je pouhé promíchání média se vzorkem nebo aplikaci suspenze do media pomocí mikroinjektoru. Ani v jednom z těchto případů však nedošlo k většímu promíchání roztoků a liposomy byly stále vytlačovány do strany.

Nakonec jsme dali glycerol s liposomální suspenzí do mikrozkušavky v poměru 1:19 a nechali je promíchat na vortexu. Tímto způsobem už došlo k promíchání suspenze s médiem a daly se i pozorovat liposomy, ale příliš v roztoku tekly, takže se nedal ani pořádně udělat hrubý sken, viz příloha **Obrázek 19**.

Vzorek č. 2

Druhým vzorkem je 1% DABCO s 95% glycerolem v poměru 1:5. Vzorek č. 2 se stejně jako glycerol při obyčejném zalévání s liposomy nemísil a bylo tedy nutné použít vortex. Výsledný roztok sice tekł o něco méně než původní glycerol, ale ani tak nebylo možné provést základní hrubý sken.

Vzorek č. 3

Je to směs 1% DABCA a 90% glycerolu v poměru 1:5. Liposomy jsme opět nechali promíchat s médiem pomocí vortexu. Stejně jako v předchozích dvou případech liposomy příliš tekly a nebylo možné udělat hrubý sken.

Vzorek č. 4

1% DABCO se 100% glycerolem v poměru 1:4. Z předchozích měření jsme usoudili, že obecně DABCO-glycerolu pomáhá vortexování pro lepší promísení se suspenzí. Proto jsme tuto metodu pak již používali pořád. Tento vzorek liposomy mírně zpomalil, takže bylo možné provést hrubý sken viz příloha **Obrázek 20**. Pro jemnější skeny je to však stále nevhodné médium.

Vzorek č. 5

2% DABCO s 90% glycerolem v poměru 1:4. Tento vzorek nebylo vůbec možné naskenovat, jelikož nesrovnatelně více tekla než ostatní vzorky. To, že suspenze teče, se dalo pozorovat i pouhým okem.

Vzorek č. 6

3% DABCO a 90% glycerol v poměru 1:4. U vzorku se dal udělat hrubý sken, ale na pořízené šestici snímků lze pozorovat mírný pohyb. Vzorek mírně tekla viz příloha **Obrázek 21**.

Vzorek č. 7

4% DABCO a 90% glycerol v poměru 1:4. Tento vzorek jsme nejprve míchali v poměru 1:1, což zpomalilo liposomy pro fotku, ale nebylo to vhodné pro nejjemnější sken. Když jsme ale změnil poměr na 1:19, tak se liposomy úplně zastavily a bylo tak u něj jako u jediného media na bázi glycerolu možné provést jemný sken, viz příloha **Obrázek 22**

4.1.2 Agarosový gel

V případě agarosového gelu byla situace mnohem jednodušší než u DABCA-glycerolu. U všech čtyř vzorků se nám povedlo velice dobře dané liposomy fixovat a provést nejjemnější sken. Stalo se tak i přes náš prvotní předpoklad, že by mohla vyšší teplota liposomy deformovat. S rostoucí koncentrací agarosy totiž roste i její viskozita a tedy i teplota, při které tuhne. My jsme však žádné deformace u našich vzorků nepozorovali a to ani u **2% agarosy**, která měla ze vzorků největší koncentraci, viz příloha **Obrázek 23**.

Nevýhodou agarosy by však mohlo být její nerovnoměrné vysychání, kdy nevysychá v celém objemu, ale tvoří jakási centra. Vytlačuje z nich vodu a tvoří nehomogenní systém. Tyto vnitřní pochody by mohly liposomy deformovat, ale neměli jsme možnost toto vyzkoušet u unilamelárních lipozomů, které mají mnohem jemnější membránu.

U agarosy jsme taky pozorovali mnohem větší shluky lipozomů než tomu bylo v případě medií DABCA-glycerolu. Tyto shluky jsou dobře patrné na skenu **1% agarosy**, viz příloha **Obrázek 24**. Tyto shluky jsme pozorovali se zvětšující se koncentrací agarosy, což mohlo být pávě způsobeno jejím výše zmíněným vysycháním. Shlukům jsme se taky snažili předcházet použitím sonifikovaných liposomálních suspenzí.

Jako nejlepším fixačním činidlem se nám zde jevila **0,5% agarosa**, která velmi dobře fixovala, nedocházelo u ní k velkým shlukům liposomů a podařilo se nám u ní vytvořit sken s nejlépe zachycenou strukturou liposomu, viz příloha **Obrázek 25**. Překvapivě dobrý sken vyšel i v případě **0,1% agarosy** viz příloha **Obrázek 26**, a to fixovala vzorek i přes svou malou koncentraci, která ještě byla samozřejmě snížena při smísení se vzorkem.

5 ZÁVĚR

V této práci se studovaly účinky některých vybraných fixačních prostředků na liposomální suspenze. Převážně jsme sledovali, jaký vliv mají koncentrace daného fixačního prostředku na suspenzi. K tomu jsme použili několik různých poměrů a koncentrací fixačního média DABCO-glycerol a několik agarosových gelů.

Z našeho měření můžeme usoudit, že média typu DABCO-glycerol nejsou moc vhodná pro liposomální suspenze. U většiny z nich docházelo ke vzlínání či vytěsňování liposomů na okraj vzorku. Navíc vzhledem k jejich viskozitě bylo mnohem obtížnější dosáhnout nějakého dobrého promíchání s liposomální suspenzí. S rostoucí koncentrací DABCA se ale toto poměrně eliminovalo. Z metod zalévání, vstříkávání pomocí mikroinjektoru, promíchání na sklíčku a vortexování se nám nejlépe osvědčila právě poslední zmíněná metoda. Na jednu stranu nám umožňovala jako jediná pořádné promíchání se suspenzí, ale rozptýlené liposomy se v ní hůře hledaly.

Z našich vzorků by se tak tedy pro další práci s liposomy, či jim podobných částic, dal doporučit asi jen vzorek č. 7 tedy směs 4%DABCA a 90% glycerolu v poměru 1:4.

Agarosový gel na druhou stranu vykazoval až překvapivě dobré výsledky. U všech 4 vzorků došlo k dokonalému zafixování a bylo tak možné udělat nejjemnější skeny. Navzdory očekávání vzorky nijak zásadně neovlivnila ani teplota, či negativní vlivy spojené s vysycháním agarosového gelu. Dá se tedy předpokládat, že by agarosový gel v nízkých koncentracích mohl stejně dobře fixovat i látky podobného charakteru jako jsou liposomy. Nejlépe se nám pak asi jevil 0,5% agarosový gel.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] NEBESÁŘOVÁ, Jana. Elektronová mikroskopie pro biology. *Příprava preparátů pro TEM fyzikálními metodami* [online]. 2001 [cit. 2015-12-18]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/4.1.html>.
- [2] ROLLS, Geoffrey. LeicaBiosystems. *Fixation and Fixatives (1) – TheProcessofFixation and theNatureofFixatives* [online]. 2012 [cit. 2015-12-18]. Dostupné z: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-1-the-process-of-fixation-and-the-nature-of-fixatives/>.
- [3] ROLLS, Geoffrey. LeicaByosystems. *Fixation and Fixatives (2) – Factorsinfluencingchemicalfixation, formaldehyde and glutaraldehyde* [online]. 2012 [cit. 2015-12-18]. Dostupné z: <http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/fixation-and-fixatives-2-factors-influencing-chemical-fixation-formaldehyde-and-glutaraldehyde/>.
- [4] SOUKUP, Aleš. Botanická mikrotechnika. *Fixace* [online]. Praha: PřF UK, 2004 [cit. 2015-12-22]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/index.html>.
- [5] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Přehled obecné histologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2005, 140 s. ISBN 80-210-3854-3.
- [6] Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A. QuantitativeComparisonof Anti-Fading Mounting Media forConfocal Laser ScanningMicroscopy. *J HistochemCytochem* 2001; 49(3):305-312.
- [7] KOČÁREK, Eduard, Martin PÁNEK a Drahuše NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky : vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
- [8] Solar system. In: *CHANDRA X-RAY OBSERVATORY* [online]. 2012 [cit. 2016-05-27]. Dostupné z: http://chandra.harvard.edu/xray_sources/solar_system.html
- [9] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence* [online]. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002 [cit. 2015-12-28]. ISBN 35-276-0024-8. Dostupné z: http://physweb.bgu.ac.il/~bogomole/Books/Valeur%20B%20-%20Molecular%20Fluorescence%20Princeples%20And%20Applications%20-%20%28Wiley-Vch%202001_%20399%20P%29.pdf
- [10] DAVIDSON, Michael W. *MolecularExpressions. Fluorescence Microscopy* [online]. 1998, 13. 11. 2015 [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>
- [11] LAKOWICZ, Joseph R. 2006. *Principlesof fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.
- [12] PREISLER, Jan. *Metody chemického výzkumu. Luminiscenční spektroskopie* [online]. 2016 [cit. 2015-12-28]. Dostupné z: <http://bart.chemi.muni.cz/index.php/cs/teaching>

- [13] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch. *Fluorofory v biomedicíně* [online]. 2003, 9. 8. 2009 [cit. 2016-01-05]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>
- [14] ROST, F. W. D. *Fluorescence microscopy*. New York: Cambridge University Press, 1995. ISBN 05-214-1088-6.
- [15] HOFER, Ctirad. Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii. *Fluorescenční mikroskopie* [online]. 2008 [cit. 2016-01-05]. Dostupné z: http://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi7230/um/3973768/12_mikroskopie.pdf
- [16] BÁLKOVÁ, Radka. Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM). In: *Chempoint* [online]. Brno: PhotoChemPoint, 2011 [cit. 2016-05-29]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>
- [17] AKBARZADEH, Abolfazl, Rogaie REZAEI-SADABADY, Soodabeh DAVARAN, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *NanoscaleResearchLetters* [online]. 2013, **8**(1), 102- [cit. 2016-05-29]. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. ISSN 1556-276x. Dostupné z: <http://nanoscalereslett.springeropen.com/articles/10.1186/1556-276X-8-102>
- [18] LEMBO, David a Roberta CAVALLI. Nanoparticulatedeliverysystemsforantiviraldrugs. *AntiviralChemistry and Chemotherapy* [online]. 2010, **21**(2), 53-70 [cit. 2016-05-29]. DOI: 10.3851/IMP1684. ISSN 20402066. Dostupné z: <http://avc.sagepub.com/lookup/doi/10.3851/IMP1684>
- [19] PANDEY, Himanshu, Radha RANI a Vishnu AGARWAL. Liposome and TheirApplications in CancerTherapy. *BrazilianArchivesof Biology and Technology* [online]. 2016, **59**, - [cit. 2016-05-29]. DOI: 10.1590/1678-4324-2016150477. ISSN 1678-4324. Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/babt/v59/1516-8913-babt-2016150477.pdf>
- [20] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 3. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [21] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.

7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

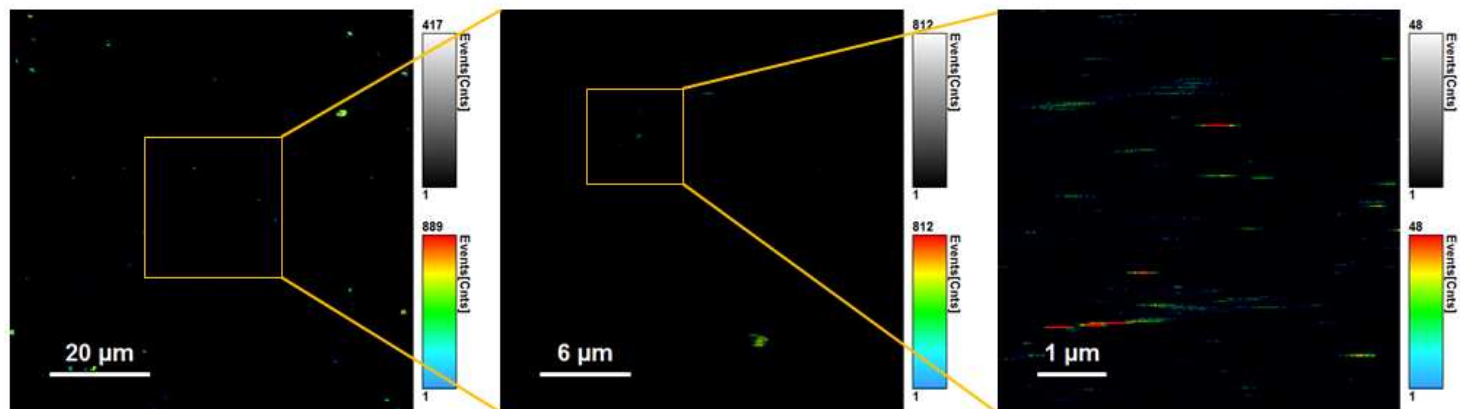
7.1 Seznam symbolů

symbol	celý název
μm	mikrometr
nm	nanometr
s	sekunda
S_0	základní stav atomu
S_n	singletový stav atomu
T_n	tripletový stav atomu

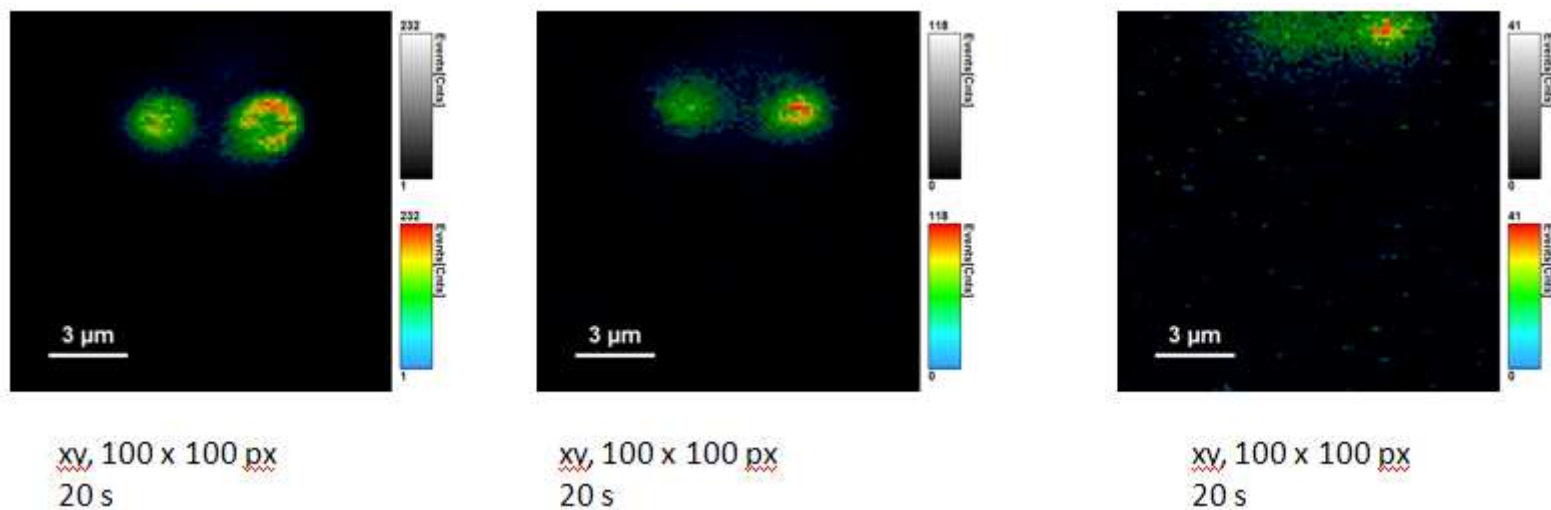
7.2 Seznam zkratk

zkratka	celý název
FA	formaldehyd
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol (z anglického <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
FITC	Fluoresceinizokyanát (z anglického <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GA	glutaraldehyd
IR	infračervená (z anglického <i>infrared</i>)
LUV	Velké unilamelární vezikuly (z anglického <i>large unilamellarvesicle</i>)
MLV	Multilamelární vezikuly
NADPH	nikotinaminadenindinukleotidfosfát
NAHD	nikotinamidadenindinukleotid
NPG	n-propyl-galát
PBS	fosfátový roztok s 0,15 M NaCl (z anglického <i>PhosphateBufferedSaline</i>)
PPD	parafenylendiamin
PVA	polyvinylalkohol
SUV	Malé unilamelární vezikuly (z anglického <i>smallunilamellarvesicle</i>)
TRITC	Tetramethylrhodaminizothiokyanát(z anglického <i>Tetramethylrhodamineisothiocyanate</i>)
UV	ultrafialová (z anglického <i>ultraviolet</i>)
VIS	viditelná (z anglického <i>visible</i>)

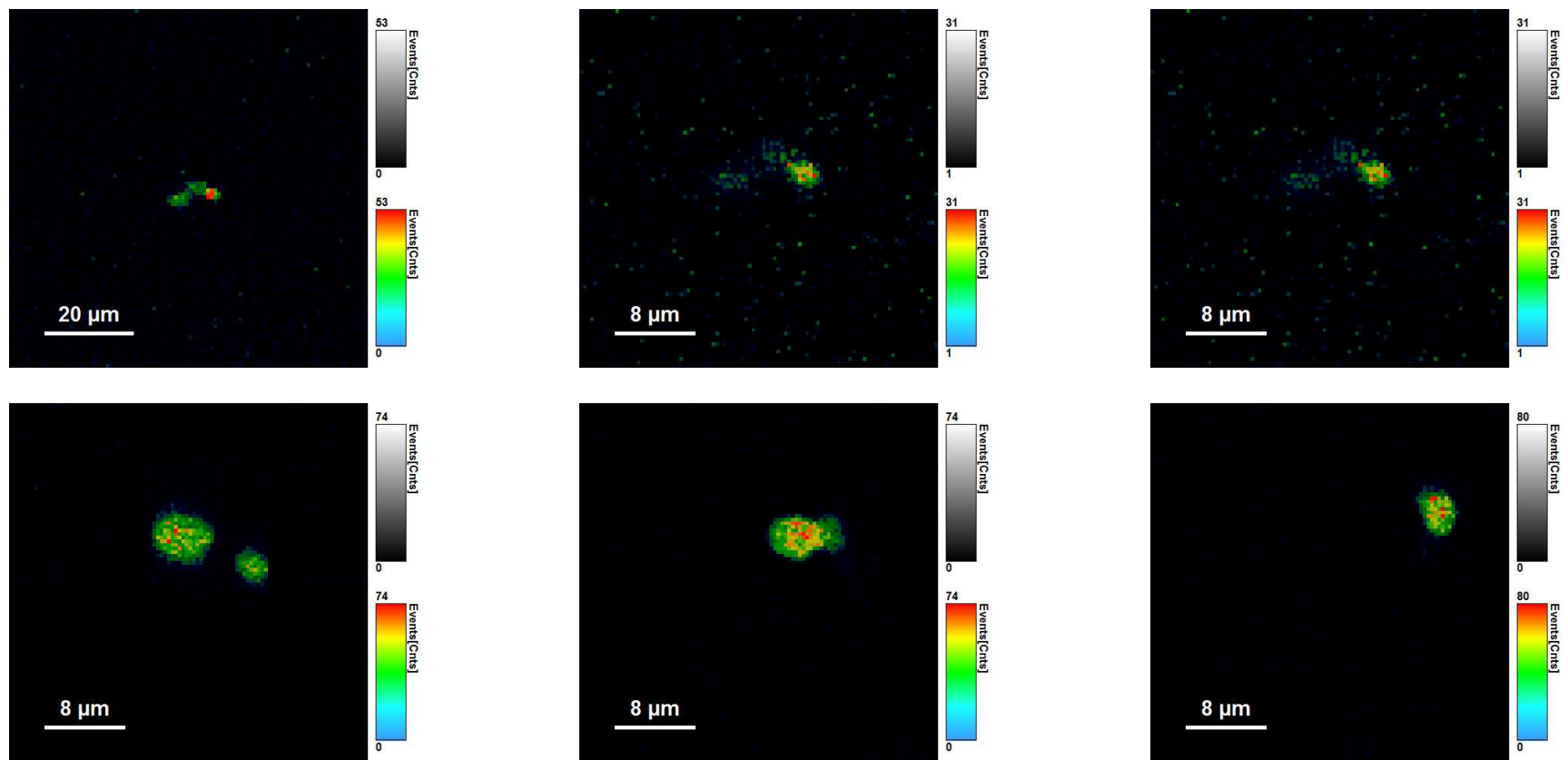
8 PŘÍLOHY



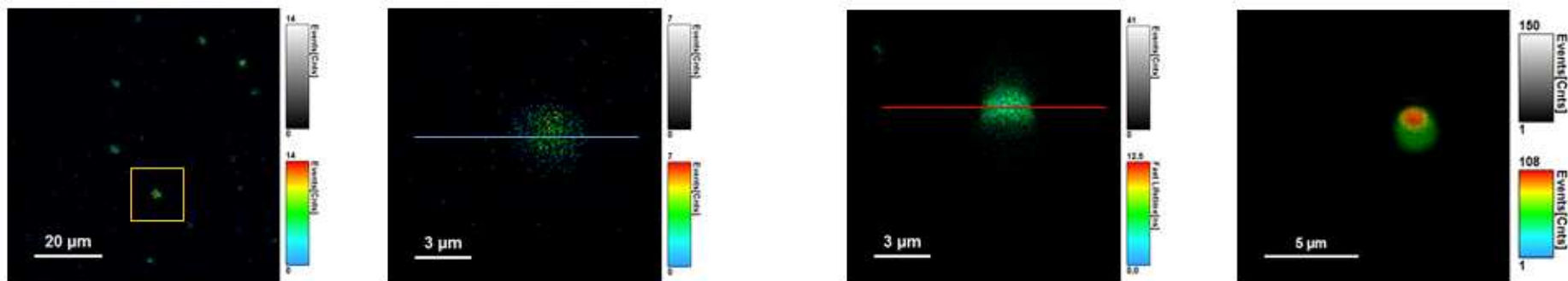
Obrázek 19 Vzorek č. 1. Sekvence zaměření objektu/ů do fokální roviny v glycerolu



Obrázek 20 Vzorek č. 4. Tři skeny jednoho místa (14 x 14 mikronů) o celkovém čase 30 s, s odstupy cca 10 s mezi ukončením jednoho měření a začátkem druhého měření. Pohyb částic se projevil až při větším přiblížení.



Obrázek 21 Vzorek č. 6. Šest skenů jednoho místa (80 x 80 mikronů) o celkovém čase 30 s, s odstupy přibližně 10 s mezi ukončením jednoho měření a začátkem druhého měření.



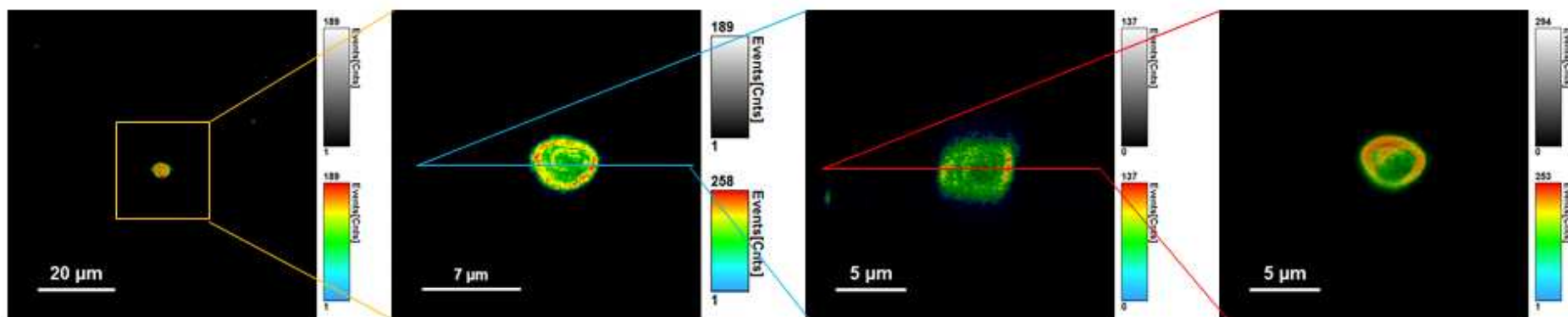
Hrubý sken xy
150 x 150 px

hrubý sken xy menší oblast
150 x 150 px

jemný sken xz
150 x 150 px

Finální jemný sken xy
400 x 400 px

Obrázek 22 Vzorek č. 7. Sekvence zaměření objektu/ů do fokální roviny.



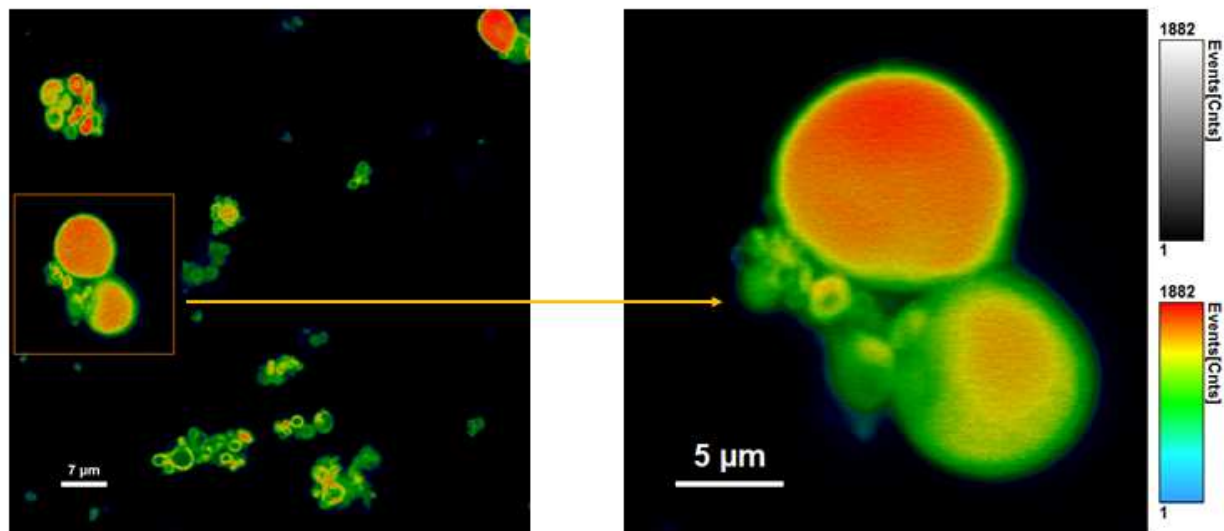
Hrubý sken xy
150 x 150 px

hrubý sken xy menší oblast
150 x 150 px

jemný sken xz
150 x 150 px

Finální jemný sken xy
400 x 400 px

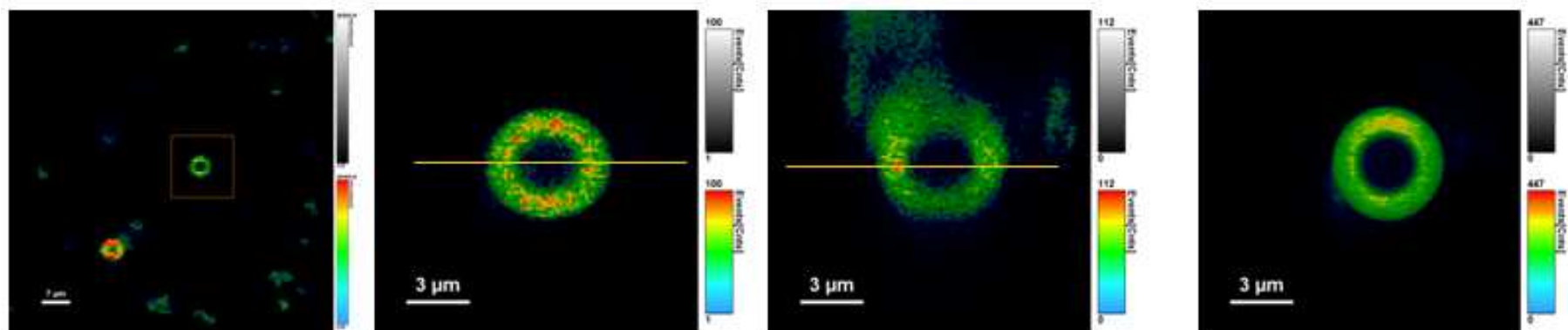
Obrázek 23 Sekvence zaměření objektu do fokální roviny v 2% agarose.



300 x 300 px
Doba pořízení 300 s

300 x 300 px
Doba pořízení 300 s

Obrázek 24 Sekvence zaměření objektu do fokální roviny v 1% agarose.



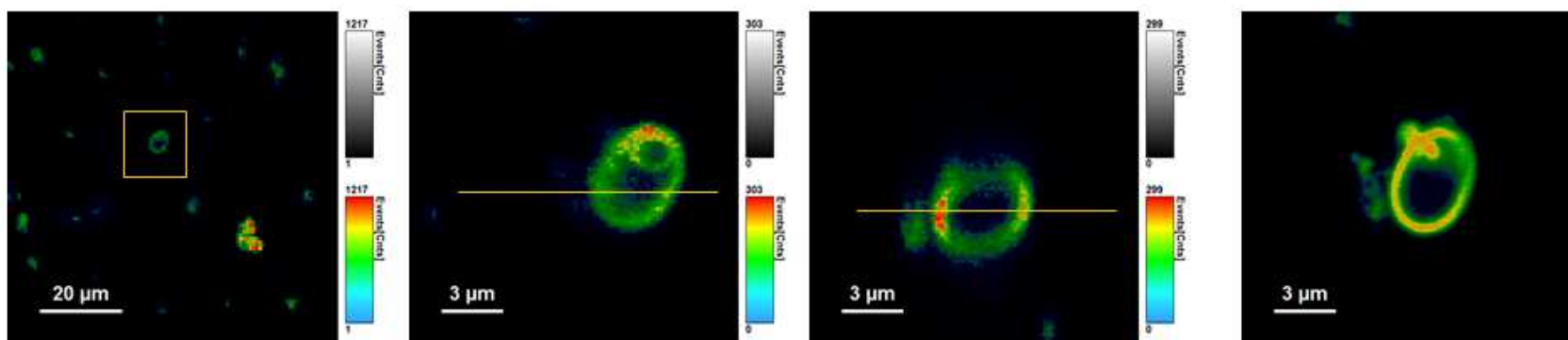
xy, 150 x 150 px
30 s

xy, 150 x 150 px
30 s

xz, 150 x 150 px
30 s

xy, 300 x 300 px
300 s

Obrázek 25 Sekvence zaměření objektu do fokální roviny v 0,5% agarose.



xy, 150 x 150 px
30 s

xy, 150 x 150 px
30 s

xz, 150 x 150 px
30 s

xy, 300 x 300 px
300 s

Obrázek 26 Sekvence zaměření objektu do fokální roviny v 0,1% agarose.