

Univerzita Pardubice  
Fakulta Chemicko-technologická

Využití fluorescenčního měření při analýze biologického materiálu

Nikola Czakoiová

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice  
Faculty of Chemical-technology

Use of fluorescence measurement in the analysis of biological material

Nikola Czakořová

Bachelor thesis

2020

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré informace a literární prameny, které jsem ve své práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti, které vyplývají ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 17. 7. 2020

.....  
Nikola Czakoiová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nikola Czakojová**  
Osobní číslo: **C16172**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**  
Téma práce: **Využití fluorescenčního měření při analýze biologického materiálu**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se využití fluorescenčního měření při analýze biologického materiálu.
2. V první části stručně popsat fluorescenci a odběrový biologický materiál.
3. Druhou část věnovat popisu fluorescenční spektroskopii a využití fluorescenčního mikroskopu.
4. V poslední části věnovat pozornost fluorescenčním skenerům a průtokovým cytometrům.
5. Zhodnotit, která fluorescenční technika měření je vhodná pro jednotlivé biologické materiály.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce Mgr. Kataríně Svřčkové, Ph.D. za její pomoc, poskytnutí odborných rad, ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala při psaní této bakalářské práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se věnuje různým typům fluorescenčního měření a jeho využití při analýze biologických materiálů. Popisuje jednotlivé typy fluorescenčních měření a jejich využití při analýze různých biologických materiálů a onemocnění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Fluorescenční spektroskopie; fluorescenční mikroskopy; fluorescenční skenery; průtoková cytometrie

## **TITLE**

Use of fluorescence measurement in the analysis of biological material

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with different types of fluorescence measurement and its use in the analysis of biological materials. Also it describes the various types of fluorescence measurements and their use in the analysis of various biological materials and diseases.

## **KEY WORDS**

Fluorescence spectroscopy; fluorescence microscopy; fluorescence scanners; flow cytometry

## OBSAH

1	ÚVOD.....	14
2	FLUORESCENCE.....	15
2.1	Fluorochromy.....	15
2.2	Vlnové délky světla.....	16
3	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	17
3.1	Příklady biologického materiálu.....	17
3.2	Odběr biologického materiálu.....	17
3.3	Biologický materiál k diagnostickému využití.....	18
4	FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE.....	19
4.1	Princip.....	20
4.2	Využití.....	20
4.2.1	Stanovení kolorektální rakoviny.....	21
4.2.2	Stanovení rakoviny horního dýchacího a trávicího traktu.....	21
4.2.3	Stanovení rakoviny Barretova jícnu.....	22
4.2.4	Stanovení maligních a potenciálně maligních lézí v dutině ústní.....	23
4.3	Porovnání fluorescenční spektroskopie s ostatními metodami.....	25
4.4	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie viditelných fluorescentních proteinových párů.....	25
4.5	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie pro charakterizaci aterosklerotických plaků 27	
5	FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPY.....	28
5.1	Využití pro stanovení stopových prvků.....	29
5.2	Fluorescenční mikroskopie mozkové tkáně.....	29
5.3	Zobrazování vyvíjejících se vnějších a vnitřních urogenitálních orgánů.....	31
5.4	Detekce tuberkulózy pomocí LED fluorescenční mikroskopie.....	33
5.4.1	Porovnání konvenční mikroskopie a fluorescenční mikroskopie.....	34
6	FLUORESCENČNÍ SKENERY.....	36
6.1	Skenery pro DNA čipy.....	37
6.1.1	Princip skenerů.....	37
6.2	Hyperspektrální zobrazovací systém a biomedicínská aplikace pro mikročipy.....	38
6.2.1	Biomedicínská aplikace mikročipů.....	40
6.3	Fluorescenční skener na bázi vačkové hřídele pro multiplexovanou kapilární detekci 40	
6.4	Detekce <i>E. coli</i> pomocí řádkového skeneru.....	42



6.4.1	Princip testu využívající peptidovou nukleovou kyselinu a fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace ve spojení s řádkovým skenerem .....	42
7	PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE .....	44
7.1	Fluorescenčně aktivované třídění buněk .....	45
7.2	Screening mikroorganismů pomocí průtokové cytometrie .....	45
7.3	Využití průtokové cytometrie v hematologii .....	45
7.4	Využití průtokové cytometrie k hodnocení fagocytózy neutrofilů a makrofágů .....	46
7.5	Detekce <i>E. coli</i> O157:H7 pomocí průtokové cytometrie .....	47
7.6	Detekce specifických anti-HLA dárcovských protilátek pomocí průtokové cytometrie .....	48
7.7	Aplikace průtokové cytometrie při studiu buněčné cytotoxicity NK buněk .....	49
7.8	Využití průtokové cytometrie při detekci minimálního zbytku chronické lymfatické leukémie .....	50
8	ZÁVĚR .....	52
9	CITOVANÁ LITERATURA .....	53

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Tabulka 1: Rozdíl spekter mezi jednotlivými tkáněmi při různých vlnových délkách.....	25
Obrázek 1: Viditelné spektrum světla .....	16
Obrázek 2: Schéma fluorescenčního spektrometru .....	20
Obrázek 3: Nákres principu fluorescenčního mikroskopu .....	28
Obrázek 4: Light-sheet mikroskopie .....	32
Obrázek 5: Optické uspořádání skenovacího systému .....	40
Obrázek 6: Různé pohledy na skener .....	41
Obrázek 7: Schéma průtokového cytometru .....	44

## SEZNAM ZKRATEK

5-ALA	5-aminolevulinová kyselina
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
ALL	akutní lymfoblastická leukémie
ASO-PCR	specifický oligonukleotid PCR
ATP	adenosintrifosfát
CD	diferenční antigen
CDC	cytotoxické křížení komplementu
cFCXM	cytotoxické průtokové cytometrické křížení
CLL	chronická lymfocytární leukémie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECFP	azurový fluorescenční protein
ESS	system skladování energie
EYFP	žlutý fluorescenční protein
FACS	fluorescenčně aktivované třídění buněk
FAD	flavinadenindinukleotid
FCXM	průtokové cytotoxické křížení
FDA	fluorescein diacetát
FITC	fluorescence z bakterií značených fluoresceinem
FMN	flavinmononukleotid
FRET	Försterův přenos rezonanční energie
FSC	dopředný rozptyl
GFP	zelený fluorescenční protein
HGD	dysplazie vysokého stupně
HIV	virus lidské imunodeficiency
HLA	lidské leukocytární antigeny
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
LED-FM	fluorescenční mikroskopie pomocí svítivé diody
LGD	dysplazie nízkého stupně

LIFE	laserem indukovaná fluorescenční endoskopie
LIFS	laserem indukovaná fluorescenční spektroskopie
LP	leukoplakia
LSFM	mikroskopie využívající osvit tenké vrstvy vzorku
MEF	tenkovrstvá referenční fólie
MRD	minimální zbytkové onemocnění
MRDF	maximální reprezentace a diskriminace
MVP	vysokotlaká rtuťová výbojka
NADH	redukováná forma nikotinamidadenin dinukleotidu
NK buňky	přirozené zabijácké buňky
OCT	optická koherenční tomografie
OSMF	orální submukózní fibróza
PAM	pulmonální alveolární makrofágy
PACT	technika pasivní jasnosti
PBM	buňky periferní krve
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PFS	prediktor přežití bez progresu
PIXE	rentgenová emise indukovaná protony
PMT	fotonásobičové trubky
PNA	peptidová nukleová kyselina
RIMS	roztok řešící index lomu
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SCC	spinocelulární karcinom
SIM	specializované střevní metaplazie
SMLR	řádká multinomiální logistická regrese
SPIM	mikroskopie se selektivním osvětlením roviny
SSC	rozptyl na straně 90°
SXFM	synchrotronní rentgenová fluorescenční mikroskopie

TB	tuberkulóza
TRFS	časové rozlišená fluorescenční mikroskopie
VFP	viditelný fluorescenční protein
XANES	rentgenová absorpce v blízkosti okrajové struktury
XFM	rentgenová fluorescenční mikroskopie
ZN	Ziehl-Neelsen

# 1 ÚVOD

Biologický materiál je před samotnou analýzou potřeba připravit. Pro stanovení prvků v biologických materiálech je vzorek nutno nejprve rozložit. Mnoho diagnostických metod vyžaduje tekutou formu vzorku. Výhodou tekuté formy vzorku je vhodnější konzistence, nižší viskozita a vyšší homogenita. Dále přejítím vzorku na tekutou formu dojde k uvolnění analytu z různých vazeb a forem a odstraní se složky, které by mohly rušit měření jejich interferencí. [1, 2]

Při rozkladu organického vzorku je nutno překonat vysokou aktivační energii, která vzniká při destrukci organické hmoty. Tuto energii lze překonat několika cestami – metodou rozkladu na suché cestě a metodou rozkladu na mokré cestě. [1, 2]

Rozklad metodou suché cesty je založen na potlačení interakce analytu se stěnami reakční nádoby. Suchý rozklad může být za vysokých anebo za nízkých teplot. Příkladem suchého rozkladu za vysokých teplot je například rozklad v muflové peci, v nádobě s kyslíkem při atmosférickém tlaku, spalování ve vysokotlaké bombě. Rozklad za nízkých teplot může být pomocí radiofrekvenční plazmy a mikrovlnné plazmy. [1, 3]

Rozklad metodou mokré cesty se provádí ve směsi koncentrovaných minerálních kyselin za zvýšené teploty a při atmosférickém tlaku. Biologickou matici oxidují příslušná činidla. Nejprve dochází k rozrušení struktury matrice kyselou hydrolyzou a její meziprodukty jsou následně oxidovány. Mokrý rozklad může také probíhat za vysokých a nízkých teplot. Na mokrý rozklad při vysokých teplotách může být použit peroxid vodíku anebo oxidující minerální kyseliny za normálního tlaku. Na rozklad při nízkých teplotách mohou být použity hydroxylové radikály anebo se využívá mokrý rozklad v mikrovlnné troubě. [1, 3]

Dalšími technikami rozkladu mohou být oxidační tavení, oxidace parami, redukční rozklad, rozklad halogeny, enzymový a hydrolytický rozklad anebo rozklad zářením. [1]

Fluorescence je typ luminiscence. Při fluorescenci dochází k emisi světla v čase kratším než  $10^{-8}$  s. Pro měření fluorescence je potřeba velmi citlivé uspořádání. Intenzita fluorescenčního záření je většinou jen několik procent intenzity excitačního svazku. Fluorescenční světlo má nižší energii, než je energie excitační a obvykle je rozptýleno. Při měření fluorescence je potřeba zamezit falešné detekci excitačního světla. [4, 5]

## 2 FLUORESCENCE

Fluorescence je emise elektromagnetického záření, obvykle viditelného světla, způsobená excitací atomů v materiálu. Molekula při ozáření světlem emituje světlo o specifické kratší vlnové délce. Téměř ihned dochází k reemisi záření (v řádech 8-10 s). Počáteční buzení je obvykle způsobeno absorpcí energie z dopadajícího záření nebo částic, jako jsou rentgenové paprsky nebo elektrony. Jelikož k reemisi dochází rychle, fluorescence přestane, jakmile je excitační zdroj odstraněn. Fluorescenční molekuly se nazývají fluorochromy. [6-9]

Výjimkou je případ multi-fotonové mikroskopie, kdy je světlo dlouhé vlnové délky (červené světlo) schopno excitovat fluorofor tak, že foton krátké vlnové délky (modré nebo zelené světlo) je emitován. [8]

Fluorescenční žárovka je zevnitř potažena práškem a obsahuje plyn. Elektrina způsobuje, že plyn emituje ultrafialové záření, které pak stimuluje povlak trubice, aby emitoval světlo. [7]

Řada vzorků vykazuje autofluorescenci i bez použití fluoroforů, když jsou ozařovány. Tento jev je fenomén využívající se v oborech botaniky, petrologie a polovodičového průmyslu. Studium živočišných tkání a patogenů je často komplikované extrémně slabou nebo jasnou nespecifickou autofluorescencí. Pro tyto studie je mnohem výhodnější použití fluoroforů. Fluorofory jsou excitovány specifickými vlnovými délkami ozářeného světla a emitují světlo definované a užitečné intenzity. Jsou to skvrny, které se připojují k viditelným nebo neviditelným strukturám. Často jsou velice specifické při cílení jejich připojení a mají významný kvantový výtěžek (poměr absorpce fotonu k emisi). [10]

Fluorescenční signál generovaný molekulou může být silně změněn prostředím. Kromě efektů vnitřního filtru je interakcí fluorochromu s okolím další způsob, jak lze snížit jeho intenzitu fluorescence. Tento proces se nazývá kalení. Existují dva druhy kalících procesů. Prvním je dynamické kalení a druhým statické kalení. Účinnost těchto dvou procesů závisí na koncentraci zhašecích molekul. [11]

### 2.1 Fluorochromy

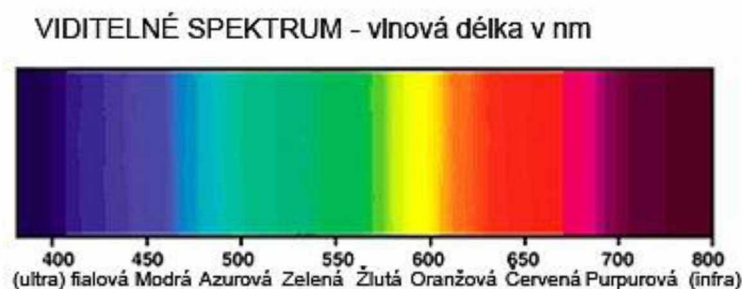
Fluorochromy (fluorescenční reportérové značky) jsou chemické molekuly, které mají schopnost absorbovat světlo o určité vlnové délce a poté znovu emitovat světlo o delší vlnové délce. Světlo je emitováno na delších vlnových délkách kvůli tomu, že molekula ztrácí energii do svého prostředí před fluorescencí. Tento proces se nazývá „vnitřní konverze“. Elektrony

uvnitř fluorescenční molekuly mohou existovat v základním stavu nebo při excitaci světlem o specifické vlnové délce na vyšších úrovních. Po excitaci se elektrony následně vrátí z vyšší úrovně do základního stavu, čímž se dokončí proces vnitřní konverze. Další relaxace z tohoto stavu na základní stav, doprovázená emisí fotonu, vytváří fenomén fluorescence. Vyzařované světlo má specifickou vlnovou délku a barvu v závislosti na tom, kde ve spektru je zobrazeno. Tento cyklus excitace a emise může být proveden mnohokrát předtím, než dojde k odbarvení, když fluorochrom již nemůže fluoreskovat. Některé fluorochromy jsou však vůči fotobělení odolnější než jiné. [12]

Fluorochromy by optimálně měly mít úzká emisní spektra s minimálním překrytím špičkových emisních vlnových délek, aby se optimalizovalo rozlišení každého signálu. [13]

## 2.2 Vlnové délky světla

Viditelné světlo, zobrazené na obrázku č. 1, je malá část spektra elektromagnetického záření, která se skládá z velmi širokého rozsahu vlnových délek nebo energetických úrovní od rádiových vln po gama záření. Relativně dlouhá vlnová délka (červené světlo) světla sestává z nízkoenergetických fotonů. Jak se vlnová délka zkracuje, barva se mění přes červenou, žlutou, zelenou, modrou až po fialovou a poté se zase znovu stává neviditelným světlem na UV konci spektra. Vyšší energie modrého světla a neviditelné UV fotony mají relativně krátkou vlnovou délku a odpovídají způsobům vyšší energie. [8]



Obrázek 1: Viditelné spektrum světla [14]



### **3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL**

Biologickým materiálem se rozumí krev, tkáň, vlasy, sliny, kosti nebo sperma, ze kterých lze získat seskupení markerů DNA. Jedná se o materiál, který je sám schopný se reprodukovat nebo se reprodukovat v biologickém systému. [15]

Lidské biologické materiály jsou identifikovány jako materiály, které jsou užitečné při dekódování lidské rasy. Tyto materiály jsou jedinečné v každé lidské bytosti a získané z různých částí těla, jako je lebka, srdce, ledviny atd. Tyto biologické materiály mohou být klasifikovány jako kódovaný organický materiál, anonymizovaný organický materiál a tajemný organický materiál. Lidské organické materiály jsou velmi užitečné v diagnostických, výzkumných, vzdělávacích a zdravotnických oblastech. [16]

#### **3.1 Příklady biologického materiálu**

Lidské odvozené protilátky – protilátky jsou specializované proteiny. Vznikají, když se do těla zavede antigen, a mají schopnost se s tímto antigenem zkombinovat a zničit jej. [17]

Krev a plazma – krev obsahuje bílé a červené krvinky transportující živiny a odstraňující odpady z těla. Plazma je tekutá část krve, která obsahuje protilátky a další proteiny, ale neobsahuje buňky. [17]

DNA (deoxyribonukleová kyselina) – DNA je nukleová kyselina, která nese genetické informace. Primárně se nachází v jádrech všech živých buněk. [17]

Enzymy – enzymy jsou proteiny, které způsobují nebo urychlují změny v jiných látkách. [17]

Proteiny – proteiny jsou velké molekuly složené z jednoho nebo z více řetězců aminokyselin. Jsou potřebné pro strukturu, funkci a regulaci buněk, tkání a živých orgánů těla. [17]

RNA (ribonukleová kyselina) – RNA je nukleová kyselina, která hraje rozhodující roli v syntéze proteinů. [17]

#### **3.2 Odběr biologického materiálu**

Aby se zachovala kvalita vzorku, musí být věnována pozornost náležitým podmínkám skladování, dokud nejsou analýzy dokončeny. Postupy odběru se liší v závislosti na typu vzorku a zamýšlených analýzách, ale všechny postupy by měly být pečlivě navrženy a zdokumentovány. [18]

K odběru krve se běžně používá evakuovaný zkumavkový systém s vyměnitelnými skleněnými nebo plastovými zkumavkami. Zkumavky, některé s vhodnými přísadami pro konkrétní aplikaci, se rozlišují podle barevně odlišených zátek. Zkumavky na odběr krve by měly být odebírány ve zvláštním pořadí, aby se zabránilo křížové kontaminaci doplňkových látek. Primárními zdroji pro odběr tkání jsou biopsie, chirurgie a pitva. Tkáně musí být odebírány podle přísných etických a právních pokynů a odběr vzorků pro výzkum nesmí nikdy ohrozit diagnostickou integritu vzorku. Obecně je důležité minimalizovat čas mezi odběrem a stabilizací a zpracováním vzorků tkáně. Tato doba se bude lišit podle zamýšleného použití, protože různé biomolekuly se degradují různými rychlostmi. Mnoho analytů, jako jsou steroidní hormony, pesticidy a široká škála léčiv a jejich metabolitů, lze měřit v moči. Sběr moči může být prováděn za několika podmínek, v závislosti na designu studie a analytických cílech. Ranní moč – shromážděna ihned po probuzení ráno, doporučené pro analyty vyžadující koncentraci pro detekci v laboratorních testech. Náhodné vzorky moči jsou vhodné pro sledování léků a cytologické studie. Frakční vzorky – účastník studie se postí po posledním večerním jídle a následující ráno se odebere moč. Tyto vzorky se používají k porovnání hladin analytů moči s jejich koncentracemi v krvi. Sliny s exfoliovanými buňkami jsou vynikajícím zdrojem DNA pro genetické studie. Vlastní odběr buňkami je bezpečná a pohodlná metoda, kterou lze použít ke snížení nákladů na odběr vzorků, a účastníci studie ji často upřednostňují před odběrem krve. [18]

### **3.3 Biologický materiál k diagnostickému využití**

Orientační testy se využívají v mnoha změněných kurzech, které se spoléhají na to, zda je infekce dynamická nebo postupná a zda je léčená anebo je na ústupu. Biologický materiál může být použit k analýze základní nemoci, předběžnému odhadu a koordinaci léčby, monitorování úbytku nebo pohybu, a dokonce k provádění kontroly ohrožených lidí tak, že rozpozná nepravidelnosti v buňkách nebo DNA daných buněk. [16]

Materiály pro symptomatické vyšetření zahrnují pravidelné krevní testy a dodatečné testy moči, které mohou být zkoumány například při kontrole krevních destiček, hladiny cholesterolu, koncentrace glukózy v krvi a močovinnového dusíku. [16]

## 4 FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE

Fluorescenční spektroskopie je metoda, která se snaží zachytit charakteristické spektrální znaky fluoroforů a najít jejich souvislost se zdravotním stavem člověka. Jedná se o neinvazivní metodu, kterou lze použít k rozlišení normální tkáně od tkáně abnormální. Fluorescenční spektroskopie dále poskytuje klinický screening bez nutnosti odebrání nebo zpracování tkáně. Přestože fluorescenční spektroskopie nedosahuje dostatečné specifity, je možné ji využívat pro účely screeningu. Pokud je fluorescenční spektroskopie kombinována s jinými optickými technikami, jako je ESS (Energy Storage System – systém skladování energie) nebo OCT (Optical Coherence Tomography – optická koherenční tomografie), představuje poté komplexní neinvazivní metodu diagnózy tkáně. [19-21]

Všechny tkáně fluoreskují v důsledku obsahu fluorescenčních chromoforů = fluoroforů v nich. Obvyklými fluorofory jsou NADH, kolagen, elastin a kofaktory jako jsou flaviny (FAD, FMN). Fluorescenční spektroskopie dokáže tyto fluorofory detekovat. Fluorofory poskytují charakteristická spektra, která odrážejí biochemické změny v tkáních. V tkáních jsou tři hlavní způsoby získávání fluorescence – autofluorescence (indukovaná UV světlem), laserem indukované a vylepšené obarvením (což může být buď lokálně nebo systémově aplikovaná kyselina 5-aminolaevulinová). Dysplastické a maligní tkáně, mající různé spektrální vlastnosti, mají tendenci mít zvýšenou červenou fluorescenci a sníženou zelenou fluorescenci. Proto je významné zvýšení poměru červená/zelená fluorescence přesným indikátorem dysplasie a zhoubného bujení. [20]

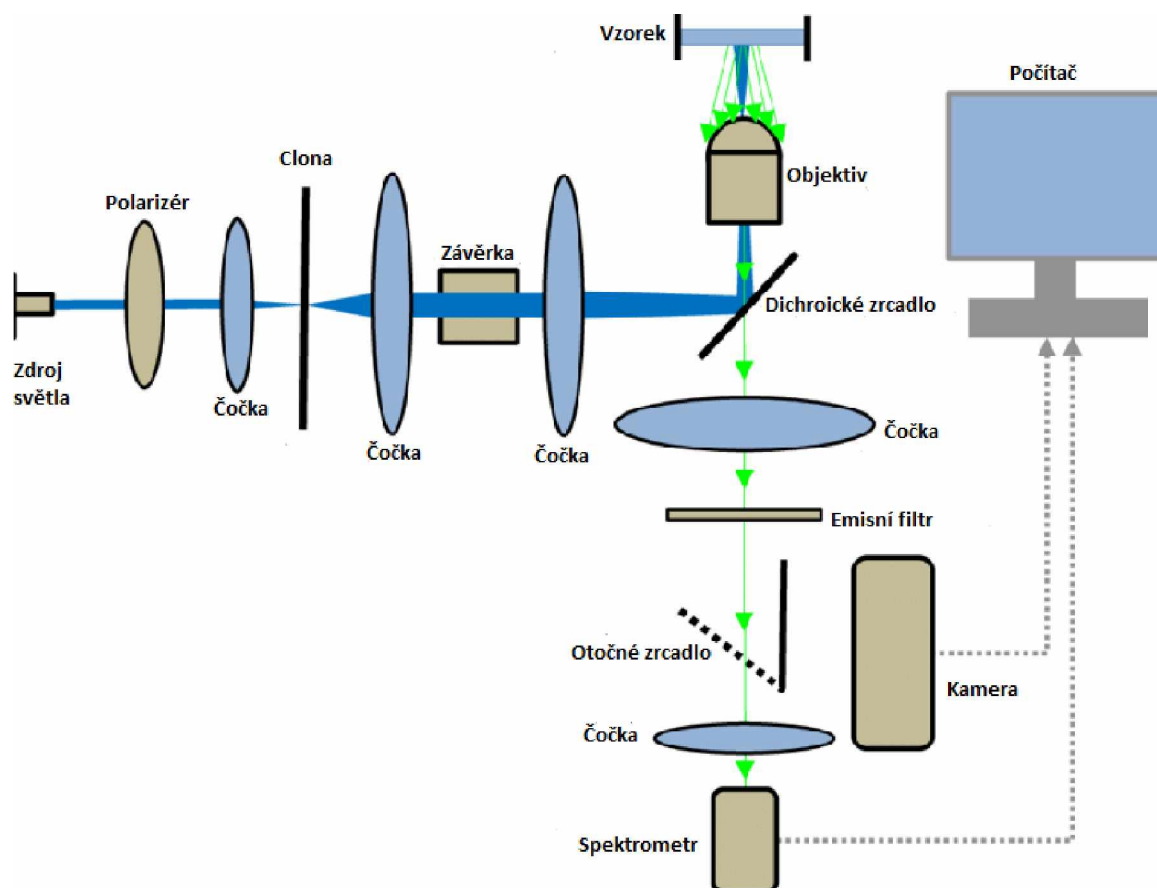
Fluorescenční spektroskopie je vysoce citlivá metoda, díky které lze koncentrace měřit až na miliardtíny. Fluorescenční spektroskopie je široce využívána pro výzkum biomarkerů pomocí značené fluorescence. Při značené fluorescenci jsou využívány fluorescenční sondy pro detekování přítomnosti určitého biomarkeru. [22]

Ve fluorescenci jsou přirozené fluorofory měřeny bez přípravy vzorku nebo jen s minimální přípravou. Fluorescenční signál z fluoroforu je závislý na okolním prostředí. Příprava vzorku je omezena minimálním zředěním a doba měření je až několik minut v závislosti na pokrytí spektrální oblasti a integračním čase. Intenzita fluorescence je také vysoce závislá na celkové absorbanci vzorku. Při nízké koncentraci fluoroforů, anebo při nízké absorbanci, platí pro fluorescenční mikroskopii lineární vztah mezi koncentrací a intenzitou záření, známý z Lambert-Beerova zákona. Při vyšší koncentraci, anebo vyšší absorbanci tento vztah neplatí. Tento jev se nazývá „Concentration quenching“ (potlačení koncentrace) nebo

„Inner filter effect“ (vnitřní filtrový efekt). „Concentration quenching“ je charakterizováno snížením fluorescenčního kvantového výtěžku při zvýšené koncentraci fluoroforu. [22, 23]

#### 4.1 Princip

Instrumentace fluorescenční spektroskopie, zobrazená na obrázku č. 2, se skládá ze světelného zdroje (lampy), čoček a emisního filtru. Okulár je připojen na vysoce citlivý čip, barevnou CCD kameru integrovanou s červeným/zeleným/modrým mozaikovým filtrem. Snímky lze zachytit pomocí sběrnice vybavené analogovým nebo digitálním převodníkem a analyzovat a zobrazovat pomocí softwaru v počítači. [20]



**Obrázek 2:** Schéma fluorescenčního spektrometru [24]

#### 4.2 Využití

Ve snaze stanovit tkáňovou diagnózu během operace byly navrženy metody a nástroje pro optickou biopsii, některé z nich využívají vlastností endogenních nebo exogenních fluorochromů. Bylo navrženo několik matematických metod pro vyhodnocení zaznamenaných spekter pro zvětšení rozlišení mezi benigním a maligním stavem. Nicméně tyto matematické metody zanedbávají vliv tkáňových parametrů na zaznamenaných spektrech. Některý z těchto

parametrů (tloušťka epitelu, uvolnění kolagenní matrix) může poskytnout souvislost s vývojem nemoci, další mohou způsobovat falešnou pozitivitu vzorku. Falešná pozitivita vzorku může nastat, protože skutečně maligní vzorek a neškodná změna mají stejný vliv na spektrum (např. absorpce krve). Proto je žádoucí vliv některých parametrů ovlivňující návrh sond používané k zaznamenávání spekter eliminovat. [19]

Cílem fluorescenčního zobrazování je zvýraznění maligní tkáně, především tam, kde maligní tkáň není patrná pod bílým světlem. Autofluorescenci a fluorescenční indukci léčiv lze zobrazit a detekovat pomocí komerčního vybavení, které se obvykle spoléhá na zachycení fluorescence v jednom nebo ve dvou barevných spektrálních kanálech a remise na kanále jiném. Propracované zpracování obrazu pro kvantifikaci fluorescence nebo eliminaci rušivých signálů je jen omezeně k dispozici. [19]

#### **4.2.1 Stanovení kolorektální rakoviny**

Fluorescenční spektroskopie se využívá například pro měření krve pro určení přítomnosti kolorektálního karcinomu v lidském těle, kdy se fluorescenční excitační emisní matrix vyzařující ze zředěného vzorku krevní plazmy považuje za základ vzorce při sledování zdravotního stavu člověka. Díky vysoké citlivosti této metody je možné pozorovat i velmi malé odchylky fluorescenčního spektra krevní plazmy nemocných od krevní plazmy zdravých jedinců. Krevní plazma je vysoce absorpční, a proto je potřeba ji naředit, aby došlo k potlačení nežádoucího „Inner filter effectu“. [23]

#### **4.2.2 Stanovení rakoviny horního dýchacího a trávicího traktu**

Fluorescenční spektroskopie se využívá při diagnostice rakoviny horního dýchacího a trávicího traktu. Včasná diagnóza často není možná, protože nádorové prekurzory a časně rakovinotvorné buňky jsou stěží viditelné a jsou nezachytitelné běžnými zobrazovacími metodami. Pomocí fluorescenční spektroskopie jsme schopni zlepšit detekci a vymezení těchto lézí. Fluorescenční diagnostické metody obvykle zachycují velké množství signálů z endogenních fluoroforů jako je tryptofan, kolagen, elastin, NADH a FAD. Některé z těchto fluoroforů vykazují distribuci specifickou pro nádor, proto toho lze využít k rozlišení tkání *in vivo*. Fluorescenční kontrast může být mírně zvýšen při použití exogenně aplikovaných fluorescenčních markerů nebo jejich prekurzorů (např. protoporfyrin IX indukovaný 5-aminolevulinovou kyselinou (5-ALA)). Ačkoli citlivost k detekci maligních lézí se zlepšuje kombinováním fluorescenčních diagnostických metod s normální prohlídkou, jsou metody

spíše nespecifické, protože chronické záněty vyvolávají výsledky podobné neoplastické nemoci. [21]

### 4.2.3 Stanovení rakoviny Barretova jícnu

V současné době je velký nárůst adenokarcinomů jícnu a celkově všech gastrointestinálních novotvarů. Tyto karcinomy se vyvíjejí řadou postupných závažných dysplastických změn v Barretově jícnu se specializovanými střevními metaplaziemi (SIM). Včasnou léčbu a tím zlepšení prognózy tohoto onemocnění umožňuje endoskopická vizualizace dysplazie a krátkého segmentu Barretova jícnu. Za tímto účelem se používají další endoskopické metody jako je chromoendoskopie využívající vstřiku barviva – například methylenové modři. Dále laserem indukovaná autofluorescence nebo laserem indukovaná fluorescence a optická koherentní tomografie. Barvivo methylenová modř zlepšuje detekci krátkých segmentů Barretovy sliznice a dysplazie. [25]

Laserem indukovaná fluorescenční spektroskopie (LIFS) a laserem indukovaná fluorescenční endoskopie (LIFE) mají potenciál odlišit premaligní a maligní léze od normální sliznice díky rozdílným vlastnostem jejich fluorescence. S progresí z normální tkáně do neoplazie se snižuje převládající příspěvek zelené autofluorescence, zatímco se zvyšuje červená fluorescence, která je při vyšších vlnových délkách. LIFS a LIFE se používají pro snímání dysplastických změn. Použitím LIFS a LIFE při vysoké citlivosti lze detekovat dysplazii vysokého stupně (HGD), ale pouze s mírnou specifičností a odlišit ji tak od nedysplastické sliznice. Dysplazie nízkého stupně (LGD) může být nesprávně klasifikována jako normální. Dále aktivní zánět Barretovy sliznice může vykazovat falešně pozitivní výsledky a tím může být klasifikován jako premaligní. Pro endoskopické sledování je však nezbytné detekovat všechny tři typy změn sliznice. Přítomnost specializované interstiniální metaplazie je nezbytná pro rozvoj rakoviny Barretova jícnu. Rakovině Barretova jícnu může předcházet dysplazie vysokého stupně nebo dysplazie nízkého stupně, anebo obojí. [25]

Okamžitá fluorescenční spektra dysplastické léze protoporfyrinu IX vykazují fluorescenční pásy při vlnové délce  $\lambda = 635$  nm a při vlnové délce  $\lambda = 690$  nm jsou na vrcholu širokého pozadí autofluorescence. Čas rozpadu autofluorescence je kratší než fluorescenční životnost protoporfyrinu IX, tudíž lze autofluorescenční pozadí potlačit zpožděným pozorováním. Při  $\lambda = 635$  nm, kdy je na vrcholu hlavní fluorescenční pás protoporfyrinu IX, je při odložení elektrického impulsu použitého k otevření detektoru o 20 ns vysoká intenzita zpožděné fluorescence považována za specifický marker pro dysplazii. Naopak nízká intenzita

zpožděné fluorescence je spojená s nedysplatickou sliznicí. Zaznamenaná intenzita fluorescence je silně ovlivňována geometrickými faktory, například vzdáleností mezi sondou a sliznicí a dále pak optickými vlastnostmi tkáně – absorpcí a rozptylem. Pro kvantifikaci je třeba normalizovat zpožděnou intenzitu fluorescence (při  $\lambda = 635$  nm a zpoždění 20 ns) a intenzitu autofluorescence ( $\lambda = 599$  nm, 0 ns) vycházející z bezprostřední hodnoty autofluorescenčního spektra při  $\lambda = 599$  nm. Poměr  $R = I(635 \text{ nm}, 20 \text{ ns})/I(599 \text{ nm}, 0 \text{ ns})$  silně snižuje vliv geometrických vlivů a faktorů optických vlastností tkáně. Kdy hodnota R je normalizovaná fluorescenční intenzita. S pomocí fluorescenční spektroskopie protoporfyrinu IX, lze rozlišit dysplazie nízkého stupně od nedysplastické Barretovy sliznice s citlivostí 76 % a specifitou 63 %. Kromě toho můžeme rozlišovat rozdíl mezi SIM a jinými typy sloupcového epitelu v krátkém segmentu Barretova jícnu. [25]

Možné vysvětlení pro zlepšení detekce dysplazie a SIM je větší hloubka průniku laserového světla spojená s delší excitační vlnovou délkou ( $\lambda = 505$  nm) ve srovnání s hloubkou průniku o vlnové délce 410 nm, používanou dříve. Zesvětlení fluoroforu může být redukováno použitím zeleného světla místo modrého, což vede ke zvýšení citlivosti dysplastických lézí. Kromě toho příprava pacientů s prekurzory (5-ALA) fluoroforů, které se přednostně hromadí v maligní tkáni, může zvyšovat citlivost detekce dysplazie ve srovnání s endogenními fluorofory (kolagen, elastin, NADH, flaviny) detekovaných autofluorescenční spektroskopii. [25]

Časově řízená fluorescenční spektroskopie je spolehlivá metoda pro detekci dysplazie nízkého stupně u pacientů s Barretovou sliznicí. Časově řízená fluorescenční spektroskopie má téměř trojnásobnou rychlost detekce dysplazie ve srovnání se screeningovou endoskopií. Navíc zpožděné pozorování protoporfyrinu IX pomáhá k detekci specializovaných metaplazií v krátkém segmentu Barretova jícnu. [25]

#### **4.2.4 Stanovení maligních a potenciálně maligních lézí v dutině ústní**

Globální výskyt a úmrtnost rakoviny dutiny ústní roste. Screening vizuální kontrolou vysoce rizikové skupiny populace postrádá přesnost, reprodukovatelnost a vyžaduje odbornost. Nejlepší možnost, jak získat definitivní diagnózu je tkáňová biopsie, které podléhá chybné vzorkování a nepohodlí pacienta. Výzkum ukázal, že optické metody mohou představovat proveditelný přístup ke zlepšení screeningu a k detekci malignit v dutině ústní. [26]

Autofluorescenční spektroskopie se využívá ke klasifikaci ústní tkáně do čtyř různých kategorií na základě jejich fluorescenčních spekter – spinocelulární karcinom (SCC),

leukoplakia (LP), orální submukózní fibróza (OSMF) a normální dlaždicová tkáň. Fluorescenční spektroskopie se tak používá k pozorování spektrálních změn v dutině ústní u zdravých jedinců, kteří užívají nebo užívali tabák. [26]

Autofluorescenční spektra *in vivo* se měří pomocí kompaktního a přenosného elektrického systému. Neprodyšně uzavřený vysokotlaký dusíkový laser se používá jako excitační zdroj pro vyvolání tkáňové fluorescence. Pro odběr tkáně se využívá sonda ze 7 optických vláken o velikosti 400  $\mu\text{m}$  sestavených kolem jednoho centrálního vlákna. Šest okolních vláken dodává laserové světlo na povrch tkáně, centrální vlákno shromažďuje fluorescenci z přímo osvětleného povrchu excitačním světlem. Fluorescenční emisní spektrum shromážděné sondou z optických vláken se poté rozptýlí a detekuje čipovým spektrometrem. [26]

Záznam fluorescenčních spekter *in vivo* se získá tak, že se špička sondy z optických vláken umístí jemným dotekem k povrchu tkáně. Pozadí autofluorescenčního spektra se získává sondou umístěnou ve vzduchu. Pozadí se následně odečte od všech následně získaných spekter vzorků z dutiny ústní. Z každého místa byla zaznamenána tři spektra a následně zprůměrována. Soubor referenčních spekter byl také získán z fluorescenčního standardu pro korekci variability mezi pacienty v důsledku změn v energii laserového pulsu před studií každého pacienta. Fluorescenční standard je nízká koncentrace roztoku rhodaminu 6G obsaženého v křemenné kyvetě. Výsledná fluorescenční spektra se dále korigují na nejednotnou spektrální odpověď detekčního systému. *In vivo* autofluorescenční spektra se zaznamenávají v spektrálním rozsahu 375 – 700 nm. [26]

Kvantitativní analýza spektra zahrnuje dva kroky – extrakci diagnosticky relevantních spektrálních informací prostřednictvím maximální reprezentace a diskriminace (MRDF) a klasifikaci pomocí řídké multinomiální logistické regresi (SMLR). MRDF je postup při extrakci prvků, jehož cílem je najít soubor nelineárních transformací na vstupních datech, který optimálně rozlišuje mezi různými třídami ve zmenšeném dimenzionálním prostoru. SMLR odděluje sadu označených vstupních dat do jejich prvkových skupin na základě posteriorní pravděpodobnosti o jejich příslušnosti k dané skupině. V tabulce č. 1 je uveden rozdíl spekter mezi jednotlivými tkáněmi při různých vlnových délkách. [26]



**Tabulka 1:** Rozdíl spekter mezi jednotlivými tkáněmi při různých vlnových délkách

	<b>390 nm</b>	<b>460 nm</b>	<b>635 nm</b>
<b>Nejvyšší intenzita</b>	OSMF tkáň	Normální dlaždicová tkáň	
<b>Pík</b>			Malý – rakovinná tkáň
<b>Fluorescenční emisní spektrum</b>	Kolagen	NADH	Endogenní porfyriny

### **4.3 Porovnání fluorescenční spektroskopie s ostatními metodami**

Spektrofluorometr je ve srovnání s nukleární magnetickou rezonancí a hmotnostní spektroskopii malý a kompaktní. Další výhodou je nižší cena. Ve srovnání se standardními diagnostickými nástroji, jako je rentgen, magnetická rezonance a CT skenování je fluorescenční spektroskopie mnohem levnější, ale v současné době není vhodnou alternativou. Při srovnání s cílenými imunologickými metodami zaměřenými na jednotlivé biomarkery jsou pořizovací náklady fluorescenční spektroskopie vyšší, ale provozní náklady nižší. Fluorescenční spektroskopie je v tomto případě rychlejší a snadno použitelná. [23]

### **4.4 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie viditelných fluorescentních proteinových párů**

Försterův rezonanční přenos energie (FRET) je rychlý způsob pro získání informací o malých vzdálenostech mezi biologickými makromolekulami. Viditelné fluorescentní proteiny (VFPs) jsou široce používány jako spektrálně odlišné FRET páry, kde jeden VFP funguje jako dárce a druhý VFP jako akceptor. VFP jsou obvykle spojeny s cílovými proteiny a tento fúzní produkt je geneticky kódovaný v buňkách. FRET mezi VFPs lze určit analýzou vlastního fluorescenčního rozkladu donorové molekuly anebo dobou náběhu fluorescenčního akceptoru. FRET může být měřen nejen v roztoku, ale také v živých buňkách pomocí techniky průběžné fluorescenční zobrazovací mikroskopie, kde se životnost fluorescence stanoví pomocí prostorového rozlišení optického mikroskopu. Fluorescenční životnost je charakterizována průměrnou dobou, po kterou molekula zůstává ve vzrušeném stavu, což je vlastnost nezávislá na koncentraci. [27]

Mikrospektroskopii lze považovat za kombinaci mikroskopické a spektroskopické techniky a má tu výhodu, že poskytuje lepší optické kontrastní režimy v mikroskopii. Tímto způsobem identifikace a kvantifikace biologických procesů je lze vizualizovat v jejich přirozeném prostředí. Tohoto bylo docíleno kombinací dvou vynikajících metodik, a to fluorescenčně detekovaného přenosu rezonanční energie (FRET) a technologie viditelných fluorescenčních proteinů (VFP). FRET je fotofyzikální proces, ve kterém je excitovaný stav energie z donorové molekuly přenášen neradiačně na akceptorovou molekulu v těsné blízkosti přes slabé dipól-dipól vazby. Vzdálenost, ve které je excitační energie dárce převedena na akceptor s pravděpodobností 0,5, je nazývána Försterova vzdálenost ( $R_0$ ), a lze ji vypočítat pomocí příslušné spektroskopické vlastnosti zúčastněných fluoroforů. FRET je široce používán pro monitorování interakce a konformační změny mezi makromolekulami anebo uvnitř biologických makromolekul konjugovaných s vhodnými páry dárce-akceptor. [27]

Ke sledování buněčných odpovědí a procesů pomocí FRET mají zásadní význam geneticky kódované páry fluorescenčních proteinů. Jednou takto geneticky kódovanou fluorescenční sondou je zelený fluorescenční protein. V současné době celá škála fluorescenčních proteinů emitujících fialové až červené záření je rozsáhle aplikována jako geneticky kódované, jasně fluorescentní markery v buněčné biologii. Nejčastěji používaným párem v buněčné biologii FRET analýzy se však používá kombinace azurového fluorescenčního proteinu (ECFP) a žlutého fluorescenčního proteinu (EYFP). ECFP má však tu nevýhodu, že fluorescenční rozklad je heterogenní. Heterogenní rozklad je způsoben tím, že ECFP může existovat ve dvou hlavních populacích, kde je fluorescence chromoforu v jedné konformaci více utlumená než v druhé konformaci. [27]

Časově rozlišená fluorescenční měření se provádějí za použití excitace laserem s režimově uzamčenou kontinuální vlnou a časově korelovaným počítáním jednotlivých fotonů jako detekční technikou. Vzorky jsou excitovány rovinou polarizovaného světelného impulzu při excitaci frekvence 3,8 MHz a tím byla detekována paralelní a kolmá polarizace intenzity fluorescence. Jedno kompletní měření spočívá v odběru polarizovaných fluorescenčních rozpadů referenční sloučeniny, vzorku, pozadí a opět referenční sloučeniny. [27]

#### 4.5 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie pro charakterizaci aterosklerotických plaků

Aterosklerotické plaky jsou způsobeny sekvencí mnoha patofyziologických jevů, které se vyskytují na dysfunkčním endotelu, což způsobuje akumulaci cholesterolu, makrofágů, pěnovitých buněk, buněk hladkého svalstva, minerálních krystalů a oxidačních produktů v subendoteliálním prostoru. Aterosklerotický plak tvoří základní entitu aterosklerotických onemocnění včetně ischemické choroby srdeční a mozkové mrtvice. Tenkovrstvé fibroatheromy jsou fibroatheromy s vláknitou čepičkou a je u nich vysoké riziko prasknutí. Tenkovrstvé fibroatheromy mají nekrotické jádro a možnost ukládání vápníku. Kalcifikace je považována za aktivní proces, který zahrnuje informace o citlivosti. Ve skutečnosti je v plaku nalezena mikrokalifikace nebo skvrnitá kalcifikace, která je předchůdcem kardiovaskulárních komplikací. [28, 29]

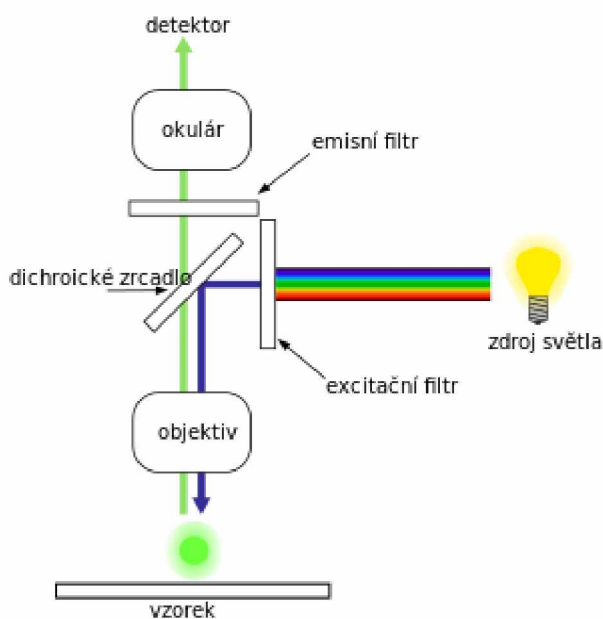
Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie (TRFS) měří průměrnou dobu fluorescence fluoroforu v biologické tkáni strávené v excitovaném stavu, když je excitovaná zdrojem ze svého základního stavu. Životnost fluoroforu se mění v důsledku interakce s molekulárním prostředím. Změna životnosti umožňuje, aby se mohli analyzovat různé parametry týkající se molekulárního prostředí jako je vazba, teplota nebo koncentrace. TRFS poskytuje informace o molekulární prostředí plaku. [29]

Zdrojem excitace je pulzní diodový laser s vlnovou délkou 470 nm. Osvětlení Gaussovského paprsku se získá spuštěním excitačního paprsku do jediného režimu optického vlákna. Pro zaostření excitačního světla na vzorky a také pro sběr emise kvantových teček se používá mikroskopický objektiv, jehož numerická apertura je 0,70. Budicí paprsek je zcela eliminován filtrem s dlouhým průchodem. Kombinace dlouhého průchodu a pásmového filtru byla zavedena do optického systému, aby bylo možné detekovat fluorescenční signály mezi vlnovými délkami 550 nm a 650 nm během měření TRFS. Fluorescenční životnost kvantových teček je určena pomocí počítačového programu pro vícenásobné exponování. [29]

## 5 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPY

Základní funkcí fluorescenční mikroskopie je ozařování vzorku žádoucím a specifickým pásmem vlnových délek a následném oddělení mnohem slabší emitované fluorescence od excitačního světla. Ve správně nakonfigurovaném mikroskopu by se do oka nebo detektoru mělo dostat pouze emisní světlo, aby výsledné fluorescenční struktury byly překryty s vysokým kontrastem na velmi tmavém (nejlépe černém) pozadí. Meze detekce jsou obecně řízeny tmavostí pozadí a excitační světlo je obvykle několik set tisíc až milionkrát jasnější než emitovaná fluorescence. [10]

Na obrázku č. 3 je znázorněn princip fluorescenčního mikroskopu. Konstrukce se skládá ze základního mikroskopu s odraženým světlem, ve kterém je vlnová délka odraženého světla delší než excitovaného. Důležitá je přítomnost systému filtrů, zajišťující vybrání požadovaných vlnových délek ze zdrojového světla. Dále je nutnou součástí zdroj světla a objektiv. [10]



**Obrázek 3:** Náčrt principu fluorescenčního mikroskopu [30]

Rentgenová fluorescenční mikroskopie (XFM) se používá pro elementární a chemickou mikroanalýzu napříč délkovými měřítky (rozsahy) od milimetrů po nanometry. Rentgenová fluorescenční mikroskopie je ideální pro kvantitativní mapování stopových prvků v celých i nařezaných rostlinách, biologických vzorcích jako jsou tkáňové řezy, vzorky životního prostředí a půdy. Vysoká elementární citlivost fluorescenčních mikroskopů spojená s hlubokou

penetrací tvrdých rentgenových paprsků umožňuje měření rozmanitého rozsahu vzorků *in situ* s minimem přípravy. [31]

Metody rentgenové fluorescenční detekce propagované detekčním systémem Maia umožňují zobrazování vysokou frekvencí ve vysokém rozlišení, které se může blížit rychlosti v řádech megapixelů za minutu. Schopnost získat rychle 2D obrazy umožňuje studie ve vyšších dimenzích, jako je fluorescenční tomografie, rentgenová absorpce v blízkosti okrajové struktury (XANES) a XANES tomografie v reálném čase. Plné spektrální zobrazení XANES využívá výhod rychlé rentgenové fluorescenční mikroskopie a má za následek rentgenovou absorpci v blízkosti spektra okrajové struktury z rentgenové fluorescence na každém pixelu obrazu. Rychlost a efektivita je dosahována použitím rastrového skenování a velkým detektorem s velkým pevným úhlem. Detektory jsou často vícesložkové s vysokou rychlostí detekce. Účinnost a rychlost zajišťují nejnižší možnou dávku spolu s vysokým výkonem. [31]

### **5.1 Využití pro stanovení stopových prvků**

Fluorescenční mikroskopie se využívá k analýze stopových prvků v biologickém materiálu. Stopové prvky jsou nezbytné pro existenci života. Jedna třetina všech známých proteinů obsahuje kovové kofaktory a většina z nich funguje jako esenciální metaloenzymy. Například Mn má zásadní roli v enzymatických reakcích, nicméně nadměrné množství Mn může vyvolat neurologické choroby. Zjistilo se, že  $\alpha$ -synuklein mění hladinu intracelulárního Mn, což může přispívat k chronickým neurodegeneracím. Použitím synchrotronní rentgenové fluorescenční mikroskopie (SXFM) ve spojení se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) jsme schopni měřit intracelulární prvky v GFP-pozitivních buňkách, tj. buňkách, které nadměrně exprimují  $\alpha$ -synuklein. S cílem minimalizovat strukturální a elementární střídání a minimalizovat škody způsobené zářením při rentgenové expozici se vzorky kryoprezervují. Kryoskopické mikroskopické metody poskytují vynikající ochranu pro zachování koncentrace stopových prvků. [32, 33]

### **5.2 Fluorescenční mikroskopie mozkové tkáně**

Anorganické prvky jsou všudypřítomné a jsou kritickými kofaktory biologického systému, které hrají zásadní roli ve struktuře bílkovin a jejich funkci, při metabolismu léčiv, dýchání a neurální signalizaci. Hodnocení s vysokým rozlišením elementárního složení komplexních struktur, jako jsou buňky a tkáně, je tradičními analytickými technikami obtížné. Atomová absorpční/emisní spektroskopie a hmotnostní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou nemají prostorovou citlivost a zkoumanou tkáň zničí. Rentgenová fluorescenční

mikroskopie je velmi vhodná pro určení podrobné prostorové organizace stopových prvků uvnitř buněk a v tkáních s vysokým prostorovým rozlišením a citlivostí pro velký počet prvků. [34]

Biologické systémy jsou převážně tvořeny prvky s nízkým protonovým číslem – H, C, N a O. Ostatní prvky z p-bloku (P, S, Cl), alkalické kovy a kovy alkalických zemin (Na, Mg, K, Ca) jsou přítomné v nižších koncentracích, avšak jsou důležitými fyziologickými regulátory. Neurologický systém je zvláště citlivý na změny stopových prvků. Neurologická funkce je závislá na specifických iontových kanálech, které jsou ovlivněné stopovými kovy, mající schopnost regulovat synaptických přenos. Dendritické šíření akčních potenciálů je ovlivněné přítomností těžkých kovů. Existují příklady aberantní kovové homeostázy v mozku spojované s neuropatologickými výsledky, včetně více typů neurodegenerativních chorob, zejména Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. [34]

Pro lokalizaci kovů v mozkové tkáni se využívá především histologické barvení, které má však výrazné omezení. Například u železa se při histochemii detekuje pouze železo nehemované, zatímco histochemie pro měď je nespecifická a technicky náročná. Navíc chybí snadné a kvantitativní hodnocení vzájemných vztahů mezi distribucemi kovů. [34]

Kalibrací rentgenové fluorescence na elementární plošnou hustotu může rentgenová fluorescenční mikroskopie poskytovat simultánní kvantitativní informace o mnoha prvcích přítomných v biologických vzorcích. Tyto kvantitativní informace mohou být také odvozeny z podrobného prediktivního modelu procesu interakce a geometrie měření. Tento přístup však může být obtížný, a proto se preferuje přístup založený na použití víceprvkové tenkovrstvé referenční fólii (MEF), aby byly poskytnuty významné dodatečné informace k přístupu se základními parametry. [34]

Dříve se pro kvantifikaci stopových prvků v mozkové tkáni používala rentgenová fluorescenční mikroskopie na bázi synchrotronů, aby se projevíly zjevné změny hladin Zn, avšak prostorové rozlišení bylo omezeno (cca  $500 \mu\text{m}^2$ ) a pole skenování bylo omezeno kvůli omezeným rychlostem detektorových pixelů. Detekční systém Maia využívá nový přístup k rychlému získávání úplných spektrálních dat a zobrazování stopových kovů v mikronovém měřítku. Detekční systém Maia využívá prstencové pole 384kanálového monolitického křemíkového detektoru orientovaného axiálně v geometrii zpětného rozptylu ( $180^\circ$  k dopadajícímu paprsku) a je konstruován tak, aby fungovalo ve vzdálenosti pouhých 10 mm od vzorku. Maia využívá nízkolatenční přístup, který zahrnuje integraci stupně vzorku

pohybového systému za nepřetržitého skenování letu, což vede k nulovému režijnímu odečtu. Plnospektrální data rentgenové fluorescence se dekonvolují do koncentrace prvků pomocí metody maticové transformace zvané dynamická analýza původně vyvinuté pro zobrazování rentgenovou emisí indukovanou protony (PIXE). K tomuto zpracování může dojít v reálném čase v detekčním systému nebo následně z uložených dat pomocí softwarové sady GeoPIXE. [34]

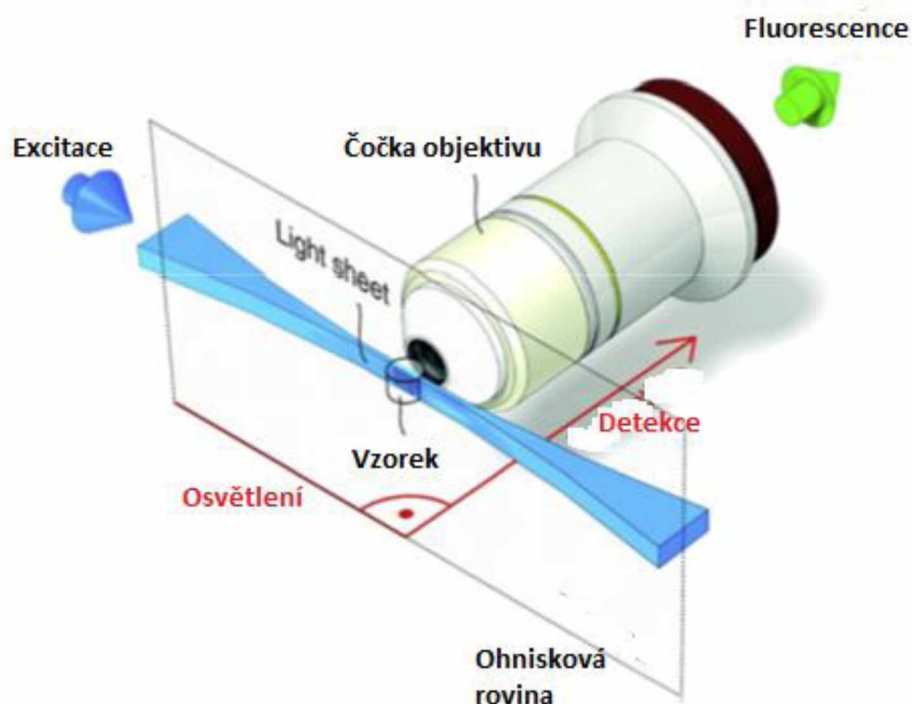
Systém pro studium biologického systému musí ve struktuře co nejpodobnější přirozené konformaci zachovat prostorovou organizaci molekul a iontů spolu se strukturami, ve kterých působí. Fixace musí vydržet následné kroky zpracování, jako je dehydratace a dělení, přičemž musí být v průběhu času stabilní, aby se umožnilo podrobné, i vícekolové zkoumání. Molekuly nebo ionty, které nejsou fixovány, se během zpracování pravděpodobně přemístí ze svého fyziologického umístění a způsobí falešnou lokalizaci. [34]

Systém Maia se výrazně zlepšuje začleněním úzké integrace detektoru se vzorovým skenovacím systémem, který umožňuje velké kolekce s pevným úhlem. Po zefektivnění doby přenosu pixelů, (krátká 50  $\mu$ s), může být míra akvizice desítky megapixelů za hodinu. Tato zvýšená účinnost sběru dat umožňuje mapování stopových prvků ve vysokém rozlišení v biologickém systému, odhalující celkovou anatomii hippocampu. Síla této metody spočívá v zobrazování neporušených anatomických struktur, poskytující náhled do vztahů neurobiologie a struktury a funkce. Například vysoký Zn signál viděný v trisynaptické cestě odpovídá vezikulám bohatým na Zn nacházejících se v glutamatergických neuronech, kde mohou hladiny kovů dosáhnout milimolárních koncentrací. Železo je spojené se zřetelnými lamelami hippocampu a zvýšené železo spojené s touto oblastí je pravděpodobně způsobeno vysokou rychlostí oxidačního metabolismu. Přítomnost zvýšeného Ca signálu je v souladu s vysokou úrovní neurální aktivity. Zvýšený Ca signál je registrován spolu s železem. [34]

### **5.3 Zobrazování vyvíjejících se vnějších a vnitřních urogenitálních orgánů**

Mikroskopie se selektivním osvětlením roviny (SPIM) je jedním z typů light sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM - mikroskopie využívající osvětlení tenké vrstvy vzorku). LSFM mikroskop je zobrazen na obrázku č. 4. SPIM je založena na tomografii řezu, ve které každý bod ve vzorku odpovídá přesnému trojrozměrnému objemovému pixelu. V SPIM je vzorek, který má být opticky řezán, osvětlen z boku rovinou světla emitovaného objektivem mikroskopu. Světelný list pochází z laseru, jehož paprsek je kolimován a expandován uvnitř

paprskového expandéru a zaostřen pomocí cylindrické čočky. Jelikož cylindrická optika má za následek konkávní světelný list, snímky se zaznamenávají v nejužším místě světelného listu. Toto zaznamenávání je dosaženo díky použití druhého záznamového objektivu, orientovaného kolmo k osvětlovacímu objektivu, který detekuje fluorescenční emise ze vzorku, protože je fyzicky připevněný za osvětlující objektiv. Fluorescence může být z přirozeně se vyskytujících se NADH, FAD a dalších biomolekul, tato fluorescence se nazývá autofluorescence. Dále může být exogenní fluorescence z imunolabelů nebo z hybridizační sondy nukleových kyselin. Endogenní fluorescence může být produkcí fluorescenčních proteinů (zelený fluorescenční protein a jeho varianty). [35, 36]



**Obrázek 4:** Light-sheet mikroskopie [35]

Komerčně dostupná SPIM zařízení jsou schopna excitovat fluorescenční štítky ve více vlnových délkách viditelného světla, které umožňují ko-lokalizace více cílových proteinů v jednom vzorku. Vzorky umístěné pro získávání dat musí současně zůstat v pracovní vzdálenosti obou osvětlení a záznamových objektivů. Toho se obvykle dosáhne ponořením vzorku do malé komory skeneru naplněné tekutým médiem ve stejné vzdálenosti od všech mikroskopických objektivů. [35]



Whole-mount zobrazování zárodečných orgánů LSM metodou vyžaduje excitaci terčů uvnitř vzorku při minimalizaci absorpce a rozptylu světelného listu. Proto je velmi důležité optické čištění vzorku. Úspěšné čištění zajistí odstranění ze vzorku látky rozptylující světlo (lipidy a voda) a zároveň vyrovná index lomu daného vzorku s kapalným médiem uvnitř mikroskopické komory. Toho se dosahuje různými způsoby – normalizací indexu lomu vzorku na index lomu těkavého organického rozpouštědla, dehydratací a hyperhydratací pomocí vodných roztoků obsahující směsi močoviny a cukerných alkoholů nebo stabilizací cílových biomolekul v hydrogelových polymerech umožňující jemné rozpouštění lipidů. Využití PACT (Passive Clarity Technique – technika pasivní jasnosti) umožňuje vynikající průhlednost a retenci fluorescenčních signálů a zároveň zabraňuje potenciálnímu poškození zobrazovacích cílů LSM pomocí organických rozpouštědel nebo tkání z kontrakce a expanze vyskytující se u metod založených na hyperhydrataci. [35]

Za účelem stabilizace tkání k udržení jejich integrity a zachování molekulárních cílů během pasivního čištění musí být orgány perfundovány zesíťovacím fixačním činidlem. Na fixaci se používá 4% paraformaldehyd při pokojové teplotě po 3 - 4 hodiny. Tato krátká doba fixace pomáhá zabránit nadměrnému zesíťování. Po fixaci se vzorky promyjí ve sterilním PBS a přenesou do 4% roztoku akrylamidu v PBS doplněném o 0,25% termoiniciátor na dobu 12 - 24 h při 4°C. [35]

Laserové osvětlení a zaznamenávání cílů získává obrazová data prostřednictvím komory uvnitř mikroskopu, která je naplněna RIMS (roztok řešící index lomu), používané taktéž k vyvážení vzorků a zajištění dobré shody indexu lomu. Vzorky byly zajištěny pomocí adaptérů mikroskopové komory a spuštěné do komory pomocí mikroskopických ovládacích prvků. [35]

#### **5.4 Detekce tuberkulózy pomocí LED fluorescenční mikroskopie**

Tuberkulóza (TB) postihuje především rozvojové státy světa, proto se stává vyšetření pomocí běžné mikroskopie nejdostupnějším a široce používaným diagnostickým nástrojem. TB je přenášena kapičkami aerosolu obsahující tyčinkovité bakterie bohaté na lipidy buněčné stěny, která dokáže zadržet barvivo karbol-fuchsin i v přítomnosti kyselého alkoholu (rychlé kyselé barvení). Přímé vyšetření vzorku sputa je standardní testovací metoda pro detekci TB. Přes vysokou specifickou Ziehl-Neelsen (ZN) mikroskopie se citlivost liší, v rozmezí 20 – 80%. Citlivost metody se snižuje u TB pacientů koinfikovaných HIV. [37]

Ve většině vyspělých států světa se však k detekci TB využívá fluorescenční mikroskopie kvůli její vysoké citlivosti. Fluorescenční mikroskopie zahrnuje použití rychlého kyselého

fluorochromového barviva a halogenové nebo vysokotlaké rtuťové výbojky (MVP) jako světelného zdroje. [37]

Bylo zjištěno, že nátěry obarvená auraminem výrazně zvyšují citlivost, prediktivní hodnotu negativního testu, procento falešné negativity a účinnost. Navíc ušetří mnoho času díky rychlejšímu skenování každého pole. Toto lze přisuzovat zvýšené viditelnosti mykobakterií v důsledku lepšího kontrastu. Fluorochromové barvení je navíc mnohem jednodušší než metody ZN. [37]

Kvůli snížení nákladů fluorescenční mikroskopie byly zavedeny LED (Light Emitting Diode – světelná dioda) diody, které jsou kromě ekonomického hlediska i udržitelnější alternativou vysokotlaké rtuťové výbojky. Fluorescenční mikroskopie pomocí LED diod má navíc vyšší specifitu než fluorescenční mikroskopie s MVP. Další výhodou LED fluorescenční mikroskopie je, že ji lze využívat za horších světelných podmínek a nevytváří velké množství tepla. Navíc LED fluorescenční mikroskopie má udržitelnější životnost (více než 50 000 h). Citlivost LED fluorescenční mikroskopie je 84% a specifita 98%. [37]

LED fluorescenční mikroskopie se díky trvanlivosti a přenositelnosti LED diod může využívat při diagnostice dalších nemocí, jako jsou malárie a trypanozomiáza. Auriminové barvení je nejvhodnější pro LED fluorescenční mikroskopii. LED je polovodičové zařízení, které produkuje různé vlnové délky, včetně viditelného světla a světlo blízké infračervenému světlu, když jím prochází proud. [37]

Bylo vyvinuto mnoho modifikací barvení kyselinovzdorných bacilů, nejúčinnější je však ZN metoda Friedrich Neelsen. Při této metodě teplo roztaví voskovou buněčnou stěnu, což způsobuje, že primární barvení (karbol-fuchsin) do ní vstoupí. Přímá mikroskopie světlého pole se používá při výtěru hlenu jako primární diagnostický nástroj pro zjištění TB ve většině programů kontrolujících TB v rozvojových zemích, a to díky jednoduchosti, nízkým nákladům a rychlosti. Metoda je vysoce specifická pro *Mycobacterium tuberculosis*, která se v nátěru projeví růžovými pruhy. Za optimálních podmínek je dodržována prahová hodnota detekce AFB (*Acid-Fast Bacillus*) mezi 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> bacilů na ml. Nicméně citlivost se snižuje v paucibacilárních případech, tj. u HIV/AIDS pacientů, u nichž je hladina *Mycobacterium tuberculosis* sporná. [37]

#### **5.4.1 Porovnání konvenční mikroskopie a fluorescenční mikroskopie**

Konvenční mikroskopie využívá ZN barvicí techniku a používá standardní umělé světlo, anebo přirozené světlo jako světelný zdroj. Fluorescenční mikroskopie kromě toho, že se jedná

o vysoce citlivou metodu, vyžaduje kratší dobu na pořízení. Další výhodou fluorescenční mikroskopie je jednoduchý způsob barvení pomocí fluoroforu. Fluorescenční mikroskopie je však nákladnější a má vyšší nároky na údržbu oproti konvenční mikroskopii. Konvenční mikroskopie poskytuje jednoduchý a rychlý screening, ale jeho nízká citlivost a požadavek na vyšší počet bacilů je jeho nevýhodou. Citlivost testu zvyšuje mikrobiologický nátěr preparátu. [37]

Jedním z důvodů zvýšené citlivosti fluorescenční mikroskopie v porovnání s konvenčními metodami je to, že kyselina mykolová má větší vstřebatelnost pro auramin ve srovnání s karbol-fuchsinem. Tato vlastnost navíc umožňuje skenování větší oblasti pole a získání ostrého kontrastu mezi bacily a pozadím. LED-FM se stává více a více využívanou metodou pro detekci nátěru sputa na detekci TB, protože je levnější a překonává většinu nedostatků konvenčního fluorescenčního mikroskopu. LED-FM nevyžaduje tmavou místnost, navíc může být provozována s přenosnou baterií a spotřebovává tak mnohem méně energie. LED-FM tak umožňuje přesnější a rychlejší diagnostiku. [37]

## 6 FLUORESCENČNÍ SKENERY

Technologie Microarray se široce využívá pro rozsáhlé studie úrovně genové exprese v buňkách. Když je gen spatřen, používají se cDNA mikročipy. Úroveň exprese je obecně měřena jako poměr mezi intenzitou fluorescence dvou vzorků cDNA. Vzorky jsou označeny různými fluorescenčními barvivy a co-hybridizovány do řady DNA sond. Intenzity fluorescence se měří pomocí zobrazování pole v optickém skeneru. [38]

Nejběžnější konfigurace skenování využívá lasery pro excitaci barviva na dvou různých vlnových délkách a fotonásobičové trubky (PMT) se dvěma kanály pro signál detekce. Malá oblast snímku je excitována. Světlo emitované z barviv je odděleno od nežádoucího světla pomocí řady zrcadel, filtrů a čoček, převedeno na elektrický signál a digitalizováno. Dva obrázky celého pole, jeden pro každé barvivo, jsou konstruovány pohybem sklíčka. Obecně jsou nižší signály detekovány s nižší přesností než silnější signály. Zvýšení intenzity signálu může být dosaženo zvýšením výkonu laseru anebo napětím PMT, za předpokladu že expresní poměry jsou nezávislé na nastaveních. [38]

Zvýšení výkonu laseru vede ke zvýšení intenzity světla vycházejícího z barviv. Intenzita tohoto světla je úměrná počtu fluoroforů, a to i u laseru dostatečně vysoké intenzity, aby způsobila nasycení barviva. Základním předpokladem pro použití PMT je, že signál z nich vycházející je úměrný intenzitě emitovaného světla při daném napětí. Při nízkých intenzitách mohou být signály ovlivněny například posuny v elektronice. Navíc saturace signálu nastane, když pixelové body uvnitř dosáhnou horního detekčního limitu intenzity PMT. [38]

Spolehlivá data jsou získána pouze pro střední bodové intenzity v rozmezí 200 až 50 000. Pro rozšíření horní hranice tohoto použitelného rozsahu byl vyvinut algoritmus založený na bodových silách/intenzitách v použitelném rozsahu ve dvou skenech, aby se přepočítaly intenzity jednotlivých bodů se saturací. V důsledku toho je možné použít dostatečné napětí během skenování, aby se zabránilo intenzitám pod použitelným rozsahem a aby se udržela místa nasycení. [38]

Reprodukovatelnost v poměrech intenzity při různých PMT napětí závisí na intenzitě jako takové, a ne na napětí. V důsledku toho by mělo být odlišné napětí PMT používané během skenování různých polí nebo kanálů ve stejném poli v závislosti na intenzitách nejslabších míst. Problémy s reprodukovatelností jsou stejné bez ohledu na to, zda je výkon laseru nebo napětí PMT upraveno, protože k problémům dochází na úrovni detekce, pravděpodobně v analogovém zesilovači před digitalizací signálů. K nastavení použitelných rozsahů intenzit se

spíše použije výkon laseru než napětí. V případě, že nedochází k bělení fotografií, je nejvyššího signálu šumového poměru dosaženo s maximálním výkonem laseru. K minimalizování bělení je zapotřebí snížit výkon laseru. K dosažení bodových intenzit v použitelném rozsahu je zapotřebí vyšší PMT napětí. [38]

## **6.1 Skenery pro DNA čipy**

Technologie DNA čipu je technologie umožňující výzkum v různých oblastech biologie. Jedná se o analytický nástroj umožňující zkoumání genetického materiálu. Technologie DNA čipu ve spojení s fluorescenčním konfokálním skenerem dosahuje pozoruhodných výkonů v citlivosti a přesnosti. K dosažení požadovaného výkonu musí být získávání vzorkování fluorescence dostatečné k získávání spolehlivých dat – četné hodnoty na prvek, a tudíž vysoce kvalitní mechanika a elektronika a také využití malého excitačního bodu. Konfokální čtení se obvykle využívá ke zvýšení citlivosti odmítnutím světla vycházejícího z jiných plánů než z biologických signálů. Čím více je systém konfokální, tím je lepší poměr signálu k šumu, ale tím vyšší je potřeba přesnosti pro zaostření a nastavení sklonu DNA čipu. [39, 40]

### **6.1.1 Princip skenerů**

Čip s optickým formátem je tvořen skleněným substrátem podporujícím vodící dráhy, synchronizační značek a reflexní tenkou vrstvou. Vodící dráhy jsou zhmotněny mikroskopickými drážkami vyleptanými na povrchu destičky. Malá část excitovaného světla se odráží od povrchu čipu s jakýmkoli optickým rozhraním. Toto odražené světlo obsahuje rozptylující příkazy generované sítí vytvořenou vodícími dráhami a promítá se do čtyřčlanku fotosenzoru. Tento senzor generuje informace s názvem „Tracking Error“, které se používají k dynamické kontrole polohy bodu, tak aby byl držen na aktuální následující dráze prostřednictvím zpětné vazby. [39]

Synchronizační značky jsou umístěny v přesných polohách. Na dané trati a pro každý prvek DNA procházející drahou je jedna značka umístěná těsně na začátku objektu a další je umístěna těsně před jeho koncem. Během skenování drah tyto značky generují signál, který byl použit pro synchronizaci fluorescenčního měření. Protože synchronizaci provádí samotný čip bez extérních enkodérů, fluorescenční měření jsou správná, i když má výchozí lineární fáze prodlevy. Tyto značky také umožňují dynamické zpracování dat během skenování čipu a vyhnout se tak použití zpracování obrazu na vysoké úrovni po získání fluorescenčního obrazu. [39]

Hned pod povrchem je umístěna reflexní tenká vrstva čipu. Index lomu a tloušťka této vrstvy jsou vybrány takovým způsobem, že reflektivita DNA povrchu čipu pro dopadající světlo je pevná a relativně nezávislá na indexu lomu biologického pufru přítomného na povrchu DNA čipu během čtení. [39]

Skenování oblasti čipu je dosaženo dvěma lineárními fázemi – první překládá ovladač a zrcadla pro rychlou osu X a druhý přesune čip podél pomalé osy Y. Fluorescenční cesta je tvořena laserem pro excitaci, dvoubarevným děličem paprsků a čelní čočkou pro zaostření světla na oblast sondy. Fluorescenční světlo je shromažďováno přední čočkou, odrážené dvoubarevným filtrem a zaostřováno objektivem na konfokální dírkovou komoru. K měření úrovně fluorescence se používá fotonásobičová trubice. Excitované světlo je zastavené sadou filtrů. [39]

Synchronizační značky jsou detekovány pomocí senzoru „Tracking Error“ s rozdílnou kombinací čtyř buněk k výpočtu „longitudinální chyby“ místo „laterální chyby“ používané k funkci sledování. Signály generované těmito značkami se používají ke spuštění a zastavení měření fluorescence odpovídající vlastnostem DNA. [39]

Kvalita ostření umožňuje snížení hloubky sekce skeneru, kolekci maxima fluorescence a zabraňuje fluktuacím při shromažďování fluorescence přes čip kvůli variabilnímu zaměření. Všechny tyto faktory přispívají ke zvýšení specifického signálu, ke zvýšení poměru signálu k šumu a ke zvýšení spolehlivosti porovnání úrovně fluorescence pocházejících z různých oblastí čipu. Funkce sledování zvyšuje prostorové rozlišení skeneru při nízké kvalitě fáze a související elektroniku. Tím se zvyšuje poměr prostorového signálu k šumu, který také přispívá ke zvýšení spolehlivosti srovnávání úrovně fluorescence z jiné oblasti čipu. Synchronizační značky umožňují normalizaci fluorescenčních signálů podle času, který uplynul mezi značkami definujícími prvek DNA. [39, 40]

## **6.2 Hyperspektrální zobrazovací systém a biomedicínská aplikace pro mikročipy**

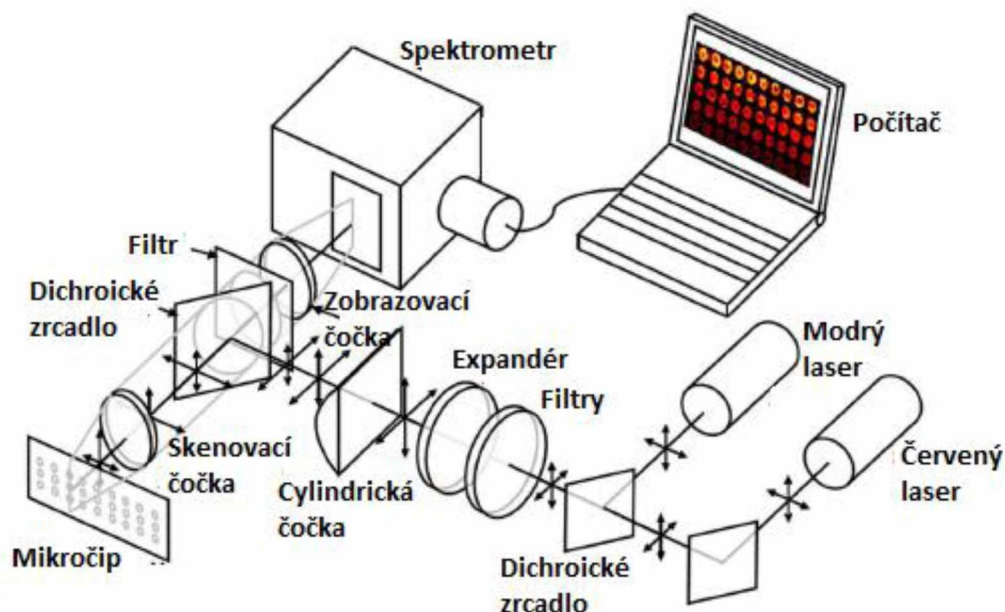
Nástup DNA mikročipů způsobil revoluci v biomedicínském výzkumu a vývoji v genetickém inženýrství. Mikročipový výzkum nabízí velký potenciál pro analýzu profilu genové exprese. Díky činnosti mikročipových skenerů bylo vyvinuto mnoho nových metod analýz mikročipů, jako například chemiluminiscence, povrchová plasmová resonance a fluorescenční markery. Fluorescenční zobrazování je populární pro odečet mikročipů. Většina fluorescenčních skenerů detekuje emisi v pásmu, což odpovídá pásmovému filtru použitému

pro každý fluorofor. V těchto skenerech jeden filtr odpovídá jednomu druhu fluoroforu. U skenerů založených na filtru je obtížné určit, zda byla naměřená data poškozena některými vnějšími zdroji emisí. Například kontaminace lokalizovaná na místě způsobená špiněním a emisemi ze substrátů ovlivňují stanovení genové exprese, zejména u slabě exprimovaných genů. [41]

Hyperspektrální zobrazování překonává omezení zaznamenáváním celé emise spektra pro každý voxel v zobrazované oblasti na rozdíl od záznamu pouze intenzity fluorescence skenerů založených na filtru. [41]

Byl vyvinut kvazi-konfokální paralelní skenovací systém zobrazující fluorescenci. Jedná se o skener na bázi filtrů pro analýzu mikročipů. Na rozdíl od laserových konfokálních skenerů, které zaměřují laserové světlo bodově, kvazi-konfokální metoda soustředí laserové světlo do linie a celá zkoumaná oblast se detekuje paralelním skenováním podél světelné linie kolmo k této linii. Kvazi-konfokální metoda poskytuje vysoký poměr signál-šum a paralelní skenování poskytuje vysokou propustnost, která je důležitá v mikročipové analýze. Následně byl vyvinut kvazi-konfokální multikanálový paralelní hyperspektrální skenovací systém pro analýzu mikročipů. Tento systém je vylepšen speciálně navrhnutým spektrometrem, který nabízí vysoce efektivní spektrální výsledky. [41]

Na obrázku č. 5 je znázorněno optické uspořádání systému. He-Ne laser ( $\lambda = 632,5 \text{ nm}$ ) a polovodičový laser ( $\lambda = 473 \text{ nm}$ ) se používají jako zdroj světla. Fluorescence laseru je upravena tak, aby vyhovovala experimentálním podmínkám pomocí filtračního kola se sadou filtrů s neutrální hustotou. Laserové světlo je rozšířeno paprskem expandéru, směřuje přes válcovou čočku na požadovanou linii osvětlení. Poté následuje dichroické zrcadlo, které se vyznačuje vysokou odrazivostí laseru při nižších vlnových délkách a průhledností při delších vlnových délkách. Fluorescence excitovaná zaostřenou linií světla je shromažďována skenovací čočkou a směřována přes dichroické zrcadlo. Zobrazovací čočka se používá k zaostření fluorescenčních signálů pro linkový obraz, který je předáván do vstupní štěrbině spektrometru pro získání spektrálně rozptýleného obrazu. [41]



**Obrázek 5:** Optické uspořádání skenovacího systému [41]

### 6.2.1 Biomedicínská aplikace mikročipů

Kvazi-konfokální paralelní hyperspektrální fluorescenční skenovací systém se například využívá v biomedicínské aplikaci mikročipů pro identifikaci bakterií. Tímto způsobem lze detekovat například *E. coli*,  $\beta$ -hemolytické streptokoky. Pozitivní sondy vykazují vysokou hodnotu fluorescenčního signálu, zatímco negativní sondy vykazují nulový fluorescenční signál. [41]

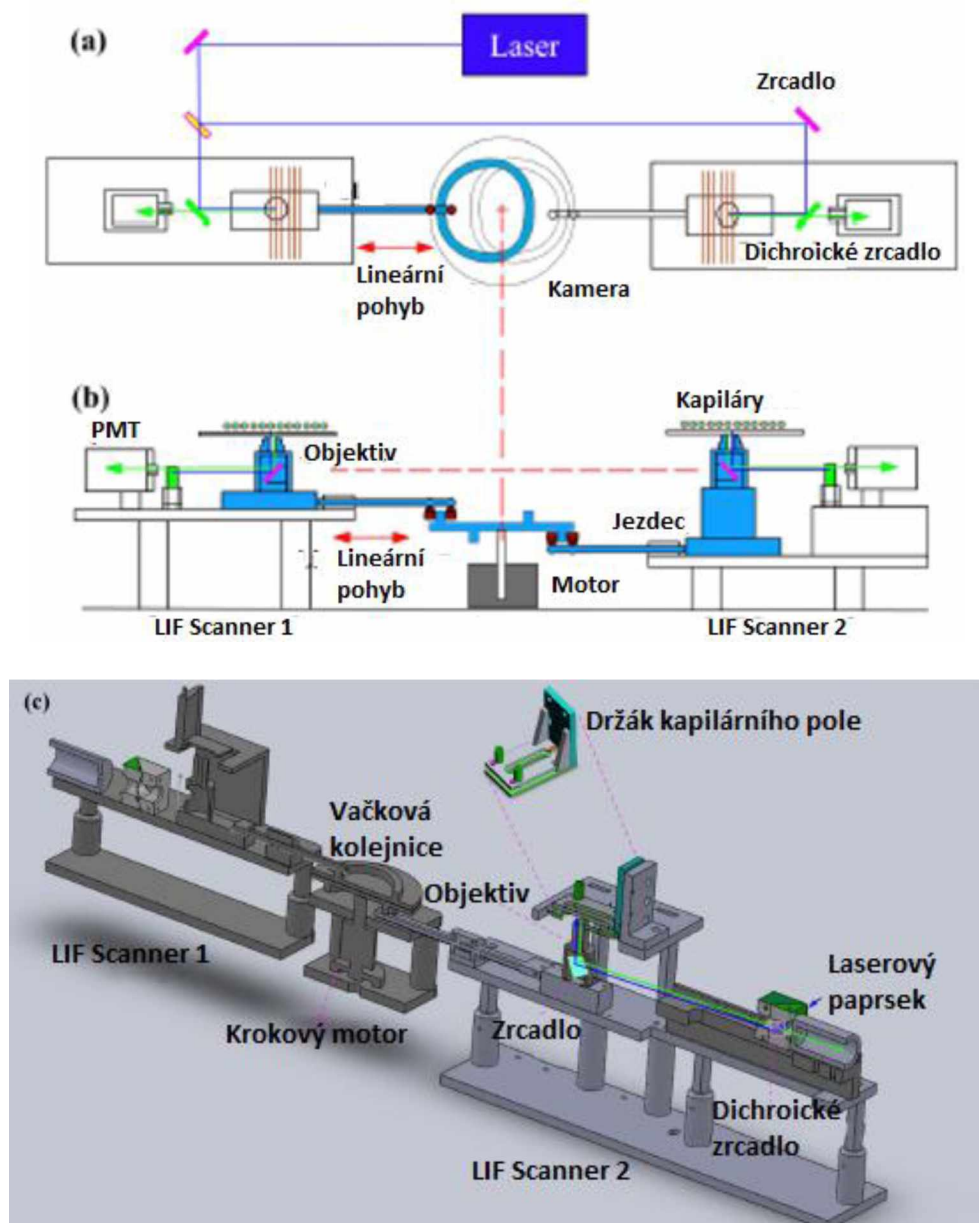
### 6.3 Fluorescenční skener na bázi vačkové hřídele pro multiplexovanou kapilární detekci

Běžně používaným fluorescenčním detektorem pro multiplexované kapiláry je konfokální laserem indukovaný fluorescenční (LIF) skener. V lineárním LIF skeneru jsou paralelní kapiláry uspořádány v rovině a nesou objektiv mikroskopu. Laserový paprsek skenuje všechny kapiláry sériově, z jedné kapiláry na další. Objektiv zaostří laserový paprsek dovnitř kapiláry při skenování, zatímco fluorescence je shromažďována a kolimována stejným objektivem a detekována fotonásobičem (PMT). Po celou dobu separace se objektiv nebo kapilární pole posunou zpět dále prostřednictvím překladové fáze připojené ke krokovému motoru. Toto schéma vyžaduje, aby motor při každém skenování zrychlil a zpomalil dvakrát. Tato zpomalení/zrychlení redukuje cyklus detekce a vytvářejí vibrační zvuky. [42, 43]

Byl vyvinut konfokální rotační LIF skener, ukázaný na obrázku č. 6. V tomto skeneru jsou kapiláry umístěny v kruhovém formátu a skenovací objektiv se otáčí rotačním způsobem. Základní výhodou rotačního skeneru je, že eliminuje zrychlení/zpomalení a potlačuje



mechanické vibrace během skenování, vedoucí ke zlepšení pracovního cyklu, zvýšení rychlosti skenování s vysokou rovnoměrností rychlosti a polohovou přesností a zvýšeným počtem kapilár. Nevýhodou tohoto skeneru je, že kapiláry musí být uspořádány do kruhu, a proto byla následně vyvinuta další metoda, a to LIF založen na vačce. V tomto skeneru je rotační pohyb kruhového motoru převeden pomocí vačky do lineárních pohybů snímacích objektivů, a proto se eliminuje zrychlení a zpomalení motoru. Dvě kolejnice vačky jsou konstruovány tak, že dvě identické skenovací hlavy se vždy pohybují v opačných směrech. Mechanické momenty jsou tedy vyvážené. Tato metoda se využívá k detekci rhodaminu B, trypsinogenu,  $\beta$ -laktoglobulinu, ovalbuminu a sérového albuminu. [42, 43]



**Obrázek 6:** Různé pohledy na skener. (a) pohled z vrchu, (b) pohled z boku, (c) podélný průřez skenerem [42]

## 6.4 Detekce *E. coli* pomocí řádkového skeneru

Bakteriální kontaminace potravin, nápojů a vody představuje vážné ohrožení veřejného zdraví. Referenční metoda pro detekci a výčet bakteriálních kontaminantů často zahrnuje membránovou filtraci s následným růstem na vhodném médiu a následnou identifikaci kolonií pomocí morfologické, biochemické nebo molekulární analýzy. *Escherichia coli* je součástí normální mikroflóry střevního traktu lidí a teplokrevných zvířat a většina kmenů je nepatogenní. Nicméně některé séroskupiny, například enterohemoragické O157:H7, jsou patogenní a infekce způsobuje závažné průjemy a horečky, které mohou vést u dětí, seniorů a lidí s oslabenou imunitou k úmrtí. [44]

Metody rychlé detekce a stanovení počtu mikroorganismů na membránových filtrech založené na aktivitách ATP-bioluminiscence nebo esterázy s komplementárními přístrojovými platformami byli komercializovány. Tyto metody však neposkytnou identifikaci. [44]

Optické skenery založené na laserech nebo kontinuálních světelných zdrojích s vhodnou excitací a emisní filtry se používají pro detekci hybridizační reakce mezi fluorescenčně značenými oligonukleotidy. Tyto skenery jsou navrženy tak, aby rychle skenovali mikročipy na přítomnost fluorescenčních skvrn s vysokým rozlišením. Tato technologie mikročipů umožňuje analýzu exprese více genů. Dále se používají mikročipové skenery pro vysokou propustnost funkční analýzy interakcí protein-protein. [44]

### 6.4.1 Princip testu využívající peptidovou nukleovou kyselinu a fluorescenční *in situ* hybridizace ve spojení s řádkovým skenerem

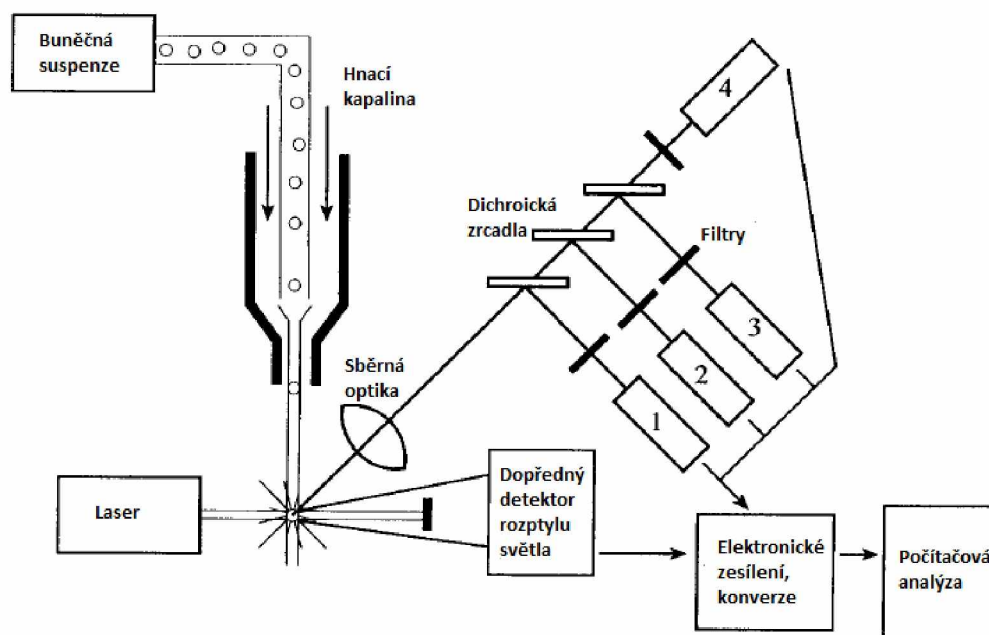
Tato metoda kombinuje membránovou filtraci pro analýzu velkého objemu vzorku s citlivostí a specifitou sond PNA (peptidová nukleová kyselina) zaměřujících se na rRNA a s rychlostí a vysokým rozlišením řádkového skeneru. Lze tak detekovat i nízké hladiny *E. coli*. *E. coli* je detekována, identifikována, vypočtena a následně dalších 5 hodin roste ve formě malých skvrn fluorescence představující jednotlivé kolonie *E. coli* na membránovém filtru. Standardní metody jsou založeny na trvalém růstu a generování viditelných kolonií *E. coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, a proto vyžadují následnou analýzu pro konečnou identifikaci. U standardních metod je potřebná doba růstu minimálně přes noc. Skenování se provádí na 5 mm ploše, tak aby každý pixel obrazu odpovídal ploše 5x5 mm<sup>2</sup> membránového povrchu. Skenování s vysokým rozlišením poskytuje vysoký signál na pozadí, který umožňuje přímou detekci jednotlivých mikrokolonií bez použití enzymatického nebo jiného způsobu zesílení signálu. Ještě silnější signály lze získat pomocí vyššího výkonu laseru, nicméně vlastní

autofluorescence z membránových filtrů zabraňuje dalšímu zvýšení těchto parametrů. Tento rychlý test na detekci *E. coli* lze využít na různé druhy aplikací v klinické, průmyslové a environmentální mikrobiologii. [44]

## 7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Průtoková cytometrie je technika k identifikaci a izolaci buněk ze směsi jiných buněk pomocí fluorescenční aktivity. Jedná se o nástroj měřící více fyzikálních charakteristik jediné buňky jako je velikost a granulitida. Současně s tím se měří, jak buňka proudí v suspenzi přes měřící zařízení. Působení průtokového cytometru závisí na vlastnostech zkoumaných buněk rozptylujících světlo, které mohou být odvozeny z barviv nebo monoklonálních protilátek zaměřených buď na extracelulární molekuly umístěné na povrchu, nebo na intracelulární molekuly uvnitř buňky. Díky tomuto přístupu je průtoková cytometrie výkonným nástrojem pro podrobnou analýzu složitých populací v krátkém časovém období. [45, 46]

Na obrázku č. 7 je zobrazeno schéma průtokového cytometru. Do procesu průtokového cytometru jsou zapojeny různé kroky. Prvním krokem je tok buněk v tekutině obsahující buňky, tj. kapalný proud prochází jedním souborem skrz světelný paprsek laserového světla pro snímání. Druhým krokem je měřící systém, který se běžně používá pro měření vodivosti. Dále je v tomto kroku optický systém obsahující rtuť a xenonovou lampu, což vede ke světelnému signálu. Třetím krokem je detekce rozptylu světla, přičemž je krokový světelný signál převeden z analogového signálu na signál digitální pomocí převodového systému. Čtvrtým krokem je analýza signálu pomocí počítače, v níž se sběr dat ze vzorku pomocí cytometru nazývá akvizice. Tato akvizice se provádí pomocí počítače připojeného k softwaru průtokového cytometru. [45]



**Obrázek 7:** Schéma průtokového cytometru [47]

Průtoková cytometrie je citlivá metoda hlavně díky tomu, že se při ní měří fluorescence (fluorescenční sondy nebo autofluorescence) nebo fluorogeneze. Ke zkoumání strukturálních charakteristik lze použít mnoho sond s nízkou molekulovou hmotností. Lze zkoumat celkový protein, obsah nukleových kyselin (DNA nebo RNA), obsah lipidů, větší protilátky. Oligonukleotidové sondy, které jsou fluorescenčně značeny, jsou používány k identifikaci specifických struktur a sekvencí nukleových kyselin na nebo v buňkách. Ostatní sondy ukazují funkční vlastnosti buněk. Aktivita enzymů může být měřena fluorogenními substráty a pomocí fluorescenčních indikátorů může být měřen membránový potenciál, intracelulární pH, koncentrace vápníku a dalších iontů. [48]

### **7.1 Fluorescenčně aktivované třídění buněk**

Fluorescenčně aktivované třídění buněk (FACS) je specializovaný typ průtokové cytometrie. Poskytuje způsob třídění heterogenní směsi biologických buněk do dvou nebo více nádob po jedné buňce na základě specifického rozptylu světla a fluorescenčních charakteristik jednotlivých buněk. Poskytuje rychlé, objektivní a kvantitativní zaznamenávání fluorescenčních signálů z jednotlivých buněk. [45]

### **7.2 Screening mikroorganismů pomocí průtokové cytometrie**

Průtoková cytometrie použitá v kombinaci s tříděním jednotlivých buněk je výkonnou technikou pro identifikaci a izolaci mikrobiálních buněk se zvláštními charakteristikami, zejména pokud takové buňky rostou pomaleji než další buňky ve velké heterogenní populaci. Existují prostředky pro fluorescenční detekci širokého spektra vlastností, jako je množství různých buněčných složek, specifických sekvencí peptidů a nukleotidů, buněčné funkce a enzymatické aktivity. [48]

### **7.3 Využití průtokové cytometrie v hematologii**

Průtoková cytometrie měří optické a fluorescenční charakteristiky jednotlivých buněk. Fluorescenční barviva se mohou vázat nebo vmezeřovat s různými buněčnými složkami, jako je DNA nebo RNA. Navíc protilátky konjugované k fluorescenčním barvivům mohou vázat specifické proteiny na buněčné membrány nebo uvnitř buňky. Když značené buňky procházejí světelným zdrojem, fluorescenční molekuly jsou excitovány do stavu vyšší energie. Nejčastěji používaná barviva jsou propidium jodid, fykoerythrin a fluorescein. [47]

Měření obsahu buněčné DNA průtokovou cytometrií používá fluorescenční barviva, jako je propidium jodid, který se vmezeřuje do spirálové struktury DNA. Fluorescenční signál je přímo úměrný množství DNA v jádře a může detekovat hrubé zisky nebo ztráty DNA.

Abnormální obsah DNA, též známý jako aneuploidie DNA lze určit v populaci nádorových buněk. Aneuploidie DNA je obecně spojena s malignitou. Koreluje s horší prognózou u mnoha typů rakoviny, ale je spojena se zlepšením přežití při rhabdomyosarkomu, násobném myelomu a dětské akutní lymfoblastické leukémii (ALL). Ačkoli konvenční cytogenetika dokáže detekovat menší rozdíly v obsahu DNA, průtoková cytometrie umožňuje rychlejší analýzu pro větší počet buněk. [47]

Průtokovou cytometrii lze využít pro detekci a kvantifikaci počtu fetálních červených krvinek v mateřské krvi. Použití průtokové cytometrie pro detekci buněk u plodu je mnohem objektivnější, reprodukovatelnější a citlivější. Mohou být použity fluorescenčně označené protilátky proti D antigenu nebo proti hemoglobinu F. Tento intracelulární přístup, který používá permeabilizaci membrány červených krvinek a protilátky proti  $\alpha$  řetězci lidského hemoglobinu, je přesný a citlivý. Tato metoda má schopnost rozlišovat fetální buňky z F-buněk (dospělé červené krvinky s malým množstvím hemoglobinu F). [47]

Imunologické sledování HIV infikovaných pacientů je základem laboratoře klinické průtokové cytometrie. HIV infikuje pomocné nebo indukční T lymfocyty prostřednictvím antigenu CD4. Infikované lymfocyty mohou být lyzovány, když jsou nové viriony uvolňovány nebo mohou být odstraněny buněčným imunitním systémem. Dále se pomocí průtokové cytometrie provádí analýza imunofenotypizace lymfomů a leukémií. Různé leukémie a lymfomy často mají jemné rozdíly ve svých profilech antigenů, které jsou díky tomu ideální pro analýzu pomocí průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je velmi vysoce efektivní při rozlišení myeloidních a lymfoidních linií u akutních leukémií a minimálně diferencované leukémie. Podle fenotypu je ale obtížné klasifikovat nejvíce akutní myeloidní leukémie. Samotná průtoková cytometrie může být užitečná při rozlišení některé akutní myeloidní leukémie, jako je akutní promyelocytická leukémie. Průtoková cytometrie může být také používána k identifikaci leukémií, které mohou být rezistentní na terapii. [47]

#### **7.4 Využití průtokové cytometrie k hodnocení fagocytózy neutrofilů a makrofágů**

Chemotaxe, pohlcení a internalizace cizí částice a intracelulární degradace přijímaného materiálu jsou základní mechanismy, kterými fagocytární buňky (neutrofilů periferní krve, pulmonální alveolární makrofágy – PAM) plní svou ochrannou funkci v těle. Průtoková cytometrie zkoumá hodnocení fagocytózy, protože umožňuje rychlé hodnocení fagocytózy velkého počtu buněk a poskytuje větší přesnost než konvenční metody, které se spoléhají na

počítání buněk nebo na střední odezvu skupiny buněk. Subpopulace buněk mohou být identifikovány a vyhodnoceny bez potřeby předchozí separace buněk, což je časově náročně a může tím dojít ke změně funkce buněk. Průtoková cytometrie se využívá k fenotypovému hodnocení buněk pomocí monoklonálních protilátek k antigenům buněčného povrchu spojené s fluorescenčními markery a pro vyhodnocení obsahu nukleové kyseliny v buňkách pomocí DNA a RNA vázání fluorescenčních barviv. [49]

Pomocí testu průtokové cytometrické fagocytózy lze posoudit podíl buněk schopných interagovat s fluorescenčně značenými částicemi. Počet takových částic na buňku udává rychlost intracelulární degradace částic a intracelulární zabíjení životaschopných bakterií. [49]

Údaje o propustnosti nebo lomu světla z buněk procházejících laserovým paprskem generované jediným vzduchem chlazeným argonovým iontovým laserem se odebírají čtyřmi detektory – dopředný rozptyl (FSC), rozptyl na straně 90° (SSC) a dva fluorescenční detektory. Instrumentální nastavení pro FSC a SSC je třeba upravit tak, aby vyhovovalo pro větší a heterogennější buněčnou populaci ve vzorcích. Pro vyhodnocení byl na FSC stanoven práh 100 – 200 V, aby se vyloučily malé částice, včetně volných bakterií a buněčných zbytků. Diskrétní buněčná populace je rozpoznána na základě FSC/SSC vlastností a dále jsou elektronicky tříděny pro umožnění světelného mikroskopického vyhodnocení buněk. Zelená fluorescence z bakterií značených fluoresceinem (FITC) byla naměřena při  $530 \pm 30$  nm. Červená fluorescence z ethidium bromid bakterií byla naměřena při  $585 \pm 42$  nm. Buňky schopné interagovat s bakteriemi byly určeny jejich zvýšenou fluorescencí v poměru suspenze buněčného séra bez bakterií (negativní kontrola). [49]

### **7.5 Detekce *E. coli* O157:H7 pomocí průtokové cytometrie**

Mnoho ohnisek otravy způsobených *Escherichia coli* je spojeno se zeleninou a ovocem v důsledku fekální kontaminace domácích nebo divokých zvířat během kultivace nebo manipulace. Přenos do zažívacího traktu člověka je spojen s konzumací kontaminovaných surových potravin, mléka a vody. Většina kmenů *E. coli* je pro hostitele neškodná, ale ty kmeny, které produkují podobné toxiny Shiga toxinům, způsobují průjmy a podobné onemocnění. [50]

*E. coli* O157:H7 je sérotyp produkující Shiga toxiny, jedná se o sérotyp nejčastěji asociovaný s patogenitou. Tento organismus může způsobit téměř 50% úmrtnost starší populace a selhání ledvin dětí. Odhaduje se, že požití pouze 10 - 100 buněk *E. coli* O157:H7 může způsobit otravy potravinami. Existuje řada rychlých metod pro jejich detekci v potravinách, které byly vyvinuty pro rozšíření nebo nahrazení technik počítacích desek. Patří

mezi ně enzymově vázaný imunosorbentový test, gelová elektroforéza na pulzním poli, PCR, microarray a průtoková cytometrie. Byly vyvinuty různé strategie použití protilátek, chemické a fyzikální metody pro izolaci patogenů z různých potravin. V případě detekce průtokovou cytometrií izolace z potravin není nutná. Použití průtokové cytometrie přináší výsledky ve stejný den jako příchod vzorku bez nutnosti izolace kmenů před stanovením pomocí průtokové cytometrie. Toto znamená, že *E. coli* O157:H7 může být detekována a odlišena od nepatogenních *E. coli* v potravinách s menším časem na detekci. [50]

Průtokový cytometr s kombinovaným s vhodným selektivním značícím činidlem detekuje několik buněk *E. coli* O157:H7, ale je necitlivý na jiné sérotypy *E. coli* a jiné bakterie. Analýza trvá 1 minutu a přibližně další 2 minuty trvá automatické proplachování a načtení dalšího vzorku. [50]

## **7.6 Detekce specifických anti-HLA dárcovských protilátek pomocí průtokové cytometrie**

Specifické anti-HLA dárcovské protilátky vyvolávají rychlou a nevratnou destrukci transplantátu (hyperakutní rejekce). K této destrukci již v dnešní době dochází zřídka, jelikož se nejprve zjišťuje křížení pacientů čekajících na ledvinový štěp. Obvyklý postup před transplantací zahrnuje hodnocení dárce na základě dvou metod. První metodou je cytotoxické křížení komplementu (CDC) a druhou metodou je průtokové cytometrické křížení (FCXM). CDC křížová zkouška je pozitivní v případě, pokud jsou přítomny protilátky fixující komplement a tím je zjištěna absolutní kontraindikace transplantace ledvin a transplantaci nelze podstoupit. FCXM křížová zkouška je citlivější a detekuje nízké koncentrace doplňků neschopných fixovat provedené protilátky. Je to „index“ možného poškození způsobeného zrychleným odmítnutím. K detekci se používají mononukleární buňky periferní krve. [51]

Pomocí FCXM se detekuje třídy anti-HLA protilátek imunoglobulinů IgG proti IgM pomocí sekundární protilátky. Předpokládá se, že imunoglobuliny třídy IgG jsou zodpovědné za předčasnou ztrátu ledvinového štěpu, a proto je potřeba jejich rychlá detekce. FCXM umožňuje detekci anti-HLA aloprotilátek, které se vážou buď k T-buňkám nebo k B-buňkám, což eliminuje potřebu fyzického oddělení buněčných populací. Tyto informace mohou usnadnit interpretaci výsledků křížení díky diferenciální expresi HLA molekul. T-buňky zobrazují převážně HLA molekuly I. třídy, zatímco B-buňky exprimují jak HLA molekuly I. třídy, tak i HLA molekuly II. třídy. Technika CDC vyžaduje životaschopné buňky. Současně detekuje imunoglobuliny IgM a IgG cytotoxické protilátky, ale vyžaduje více času. Pozitivita FCXM na



B-buňky bez důkazu protilátek HLA II. třídy může být způsobena rozpoznáním non-HLA povrchových molekul. Nutně to tedy nemusí kontraindikovat transplantaci ledvin. Z tohoto důvodu byla vyvinuta nová metoda – cytotoxické průtokové cytometrické křížení (cFCXM) – kombinující specifitu a citlivost FCXM s možností detekovat fixující a nefixující protilátky. [51]

Metoda cFCXM zvýrazňuje dva typy protilátek – cytotoxické komplement-fixační protilátky a nekomplement-fixační necytotoxické protilátky vázající se na povrch lymfocytů. Morfologický a funkční rozdíl mezi těmito protilátkami není známý. Možným vysvětlením by mohlo být, že test rozlišuje různé třídy IgG. Například IgG1 a IgG3 jsou fixačními doplňky k IgG2 a zejména k IgG4. Jedná se o nekompletní fixaci. Tato metoda nabízí několik výhod oproti ostatním metodám. Lze ji využít ve stavu nouze a je citlivější než klasický CDC. Buněčná životaschopnost má na tuto metodu malý vliv. Dále poskytuje dostupnost objektivní interpretace a vyhodnocení současné přítomnosti cytotoxických a necytotoxických protilátek. [51]

## **7.7 Aplikace průtokové cytometrie při studiu buněčné cytotoxicity NK buněk**

Natural killer („přirozený zabiják“ – NK) buňky byly funkčně definovány na základě jejich schopnosti rychle způsobit lýzi jakékoli cílové buňky bez zjevné předchozí imunizace. Nejběžněji používanou metodou detekce buněčné lýzi je test uvolňování Cr. Tento test měří kapacitu efektorových buněk pro lýzu cílových buněk označených Cr. Aktivita NK buněk může být měřena jako funkce uvolňování enzymu cílové buňky inkorporací radioaktivních nukleotidů během buněčné proliferace a dále metodou vylučování barviv. [52]

K detekci se využívají mononukleární efektorové buňky periferní krve (PBM). Buňky se před detekcí promývají v rovnovážném Hankově solném roztoku. Následně se odečítají pomocí průtokové cytometrie při excitační vlnové délce  $\lambda = 488$  nm. Počet živých cílových buněk byl stanoven integrací distribuce pro velké buňky se silnou fluorescencí. Procento mrtvých buněk se vypočítá jako podíl rozdílu živých prekurzorových buněk v kontrole a živých prekurzorových buněk v testu, dělený živými prekurzorovými buňkami v kontrole. [52]

Po 4 hodinách inkubace byly vzorky obarveny propidium jodidem ve fyziologickém roztoku PBS. Distribuce standardní cílové buněčné nukleové kyseliny byla stanovena fixací některých kontrolních prekurzorových buněk se 70% etanolu. Fluorescence byla excitována při vlnové délce 514 nm a měřena za 610 nm. Lineární červené fluorescenční křivky získané

z každého vzorku byly porovnány se standardem. Specifičnost NK buněk a jejich cytotoxické účinky byly stanoveny na určité fáze cyklu. [52]

Použitím dvou parametrů průtokové cytometrie lze pozorovat živé efektorové buňky a cílové buňky současně. Živé buňky se obarvují FDA. Jedná se o nefluorescenční sloučeninu, která je schopná snadno procházet přes buněčnou membránu. Nicméně uvnitř buňky může být tato sloučenina štěpena nescifickými esterázami za vzniku volného fluoresceinu, který je vysoce fluorescenční. Volný fluorescein díky svému náboji neprochází snadno skrz intaktní buněčné membrány, ale může snadno procházet skrz porušenou buněčnou membránu. Buňky, které jsou životaschopné, si zachovají fluorescein, zatímco neživotaschopné buňky fluorescenci vyzařovat nebudou. [52]

### **7.8 Využití průtokové cytometrie při detekci minimálního zbytku chronické lymfatické leukémie**

Úrovně reziduální choroby jsou nezávislým prediktorem přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití u pacientů léčených pro chronickou lymfocytární leukémii (CLL). Eradikace minimálního zbytkového onemocnění (MRD) následuje léčbu chronické lymfocytární leukémie a předpovídá zlepšení výsledků bez ohledu na použitou terapii. Pacienti dosahující negativitu MRD určením pomocí vysoce citlivé průtokové cytometrie nebo polymerázové řetězové reakce prokazují prodloužení přežití bez progresu a celkové přežití. Alelický specifický oligonukleotid PCR (ASO-PCR) imunoglobulinového genu je obecně akceptován, aby vykazoval nejvyšší citlivost na detekci MRD a je považován za zlatý standard. Alternativní technikou je multiparametrová průtoková cytometrie, která má výhody rychlé analýzy bez požadavku na reagenty specifické pro pacienta. Citlivost se liší, ale může se přiblížit ASO-PCR. [53]

Byla vyvinuta 10ti barevná jednoduchá trubice pro průtokovou cytometrii, založenou na metodice mezinárodního standardizovaného přístupu pro optimalizaci přesnosti a citlivosti detekce MRD. Umístění všech informativních značek do jedné zkumavky snižuje celkový počet požadovaných lymfocytů pro analýzu u pacientů s lymfopenií po chemoterapii a umožňuje přímé vyloučení kontaminace T buněk během buněčné analýzy. K detekci se využívá periferní krev a kostní dřeň. [53]

10ti barevný test má citlivost na 0,001% v porovnání s testy používající více zkumavek s menším množstvím protilátek. Účinně rozlišuje CLL buňky od normálních CD5 exprimujících B buněk v krvi a kostní dřeni. Průchodová strategie (Gating Strategy) umožňuje rychlé

posouzení společné lymfocytové subpopulace, která působí jako forma vnitřní kvality vzorku. Průchodová strategie byla založena za účelem sledování reziduálního onemocnění v populaci pacientů s typickým CLL. Použití tohoto testu poskytuje prognostické informace, které by mohly zabránit zbytečné terapii pacientů s MRD blízkou hodnotám limitu detekce. [53]

## 8 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout jednotlivé fluorescenční metody a jejich využití při analýze biologického materiálu.

V první části byla popsána fluorescence, fluorochromy jako fluorescenční značky a vlnové délky světla.

V druhé části byl popisován biologický materiál a jeho využití v diagnostice. Byli zde uvedeny jednotlivé příklady biologického materiálu a dále byl popsán správný odběr biologického materiálu, aby nedošlo k jeho poškození.

Třetí část byla věnována fluorescenční spektroskopii, jejímu popisu, principu a citlivosti. Byl zde věnován prostor pro popis stanovení některých onemocnění, jako jsou například různé druhy rakoviny.

Čtvrtá část popisuje fluorescenční mikroskopii, její princip a využití při analýze stopových prvků, mozkové tkáně a zobrazování při vývoji urogenitální tkáně. Taktéž popisuje využití při detekci různých onemocnění, jako je tuberkulóza.

Pátá část se věnuje fluorescenčním skenerům, jejich principu a technologii Microarray a jejímu využití u DNA čipů. Dále se věnuje skenerům pro kapilární detekci a využití fluorescenčních skenerů pro detekci *E. coli*.

V poslední části je popsána průtoková cytometrie jako technika k identifikaci a izolaci buněk, její využití v hematologii, k hodnocení neutrofilů, makrofágů, NK buněk a buněčného obsahu DNA. Dále je zde průtoková cytometrie popsána jako metoda sloužící k detekci *E. Coli* a k detekci specifických anti-HLA dárcovských protilátek a k detekci minimálního zbytku onemocnění chronické leukémie.

## 9 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] MADER, Pavel a Eva ČURDOVÁ. *Metody rozkladu biologických materiálu pro stanovení stopových prvků*. ISBN 1997\_04\_227-236.
- [2] KRAKOVSKÁ, Erika a Heinz-Martin KUSS. *Rozklady v analytické chemii: současný stav a trendy*. Vyd. 1. Košice: Viena, 2001. ISBN 80-88922-48-8.
- [3] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [4] *Měření fluorescence* [online]. [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: <http://www.mericitechnikamorava.cz/index.php?page=produkty&kategorie=...&technika=...&produkt=37>
- [5] *Fluorescence* [online]. [cit. 2020-07-01]. Dostupné z: [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS3/hypertext/JVAAH.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/JVAAH.htm)
- [6] *What is Fluorescence* [online]. 2017 [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <https://www.mcgill.ca/oss/article/you-asked/what-fluorescence>
- [7] Fluorescence. *Encyclopædia Britannica* [online]. 2017 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/phosphorescence>
- [8] HIBBS, Alan R. *Confocal microscopy for biologists*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004., s. 187-200 ISBN 0306485656.
- [9] USAI, Cesare a Alberto DIASPRO. Fluorescence: General Aspects. ROBERTS, Gordon C. K., ed. *Encyclopedia of Biophysics* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, s. 826-832 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6\_823. ISBN 978-3-642-16711-9. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16712-6\\_823](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16712-6_823)
- [10] Introduction to Fluorescence Microscopy. *Microscopyu* [online]. [cit. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [11] DÍAZ-GARCÍA, Marta Elena a Rosana BADÍA-LAÍÑO. Fluorescence: Overview ☆. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018., s. 309-319 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11182-5. ISBN 9780124095472. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472111825>
- [12] RENSHAW, Simon. Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. *The Immunoassay Handbook* [online]. Elsevier, 2013, s. 357-377 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00024-5. ISBN 9780080970370. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080970370000245>
- [13] EVANS, Katy, Zane AMENHOTEP, Derek DAWSON, Harry WATERS a John ARDERN. Hematology. *The Immunoassay Handbook* [online]. Elsevier, 2013, s. 795-815 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/B978-0-08-097037-0.00065-8. ISBN 9780080970370. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080970370000658>

- [14] Světlo a barva ve fotografii. *Fotoradce* [online]. [cit. 2020-05-30]. Dostupné z: <https://www.fotoradce.cz/svetlo-a-barva-ve-fotografii-blog>
- [15] *Definition of Biological Material* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.lawinsider.com/documents/41CDiO8kp1a>
- [16] KUMAR PATEL, Arvind a S.P.S. RAJPUT. A Review on Human Biological Material- Types, Uses, Storage and Disposal. *Materials Today: Proceedings* [online]. 2019, **18**, s. 5133-5140 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/j.matpr.2019.07.510. ISSN 22147853. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785319326999>
- [17] *Biological Materials Information* [online]. [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: [https://www.globalspec.com/learnmore/specialized\\_industrial\\_products/pharmaceutical\\_biotechnology/biotechnology/biological\\_materials](https://www.globalspec.com/learnmore/specialized_industrial_products/pharmaceutical_biotechnology/biotechnology/biological_materials)
- [18] VAUGHT, Jimmie B. a Marianne K. HENDERSON. *Biological sample collection, processing, storage and information management* [online]., s. 23-42 [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997855>
- [19] STEPP, Herbert, Ann JOHANSSON, Christian Stephan BETZ a Andreas LEUNIG. Fluorescence spectroscopy and fluorescence imaging for tissue diagnostics – principles and methods. *Head & Neck Oncology* [online]. 2009, **1**, s. 1 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1186/1758-3284-1-S1-O3. ISSN 1758-3284. Dostupné z: <https://headandneckoncology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-3284-1-S1-O3>
- [20] TOURSOUNIDIS, Iordanis, Tahwinder UPILE, Christian S BETZ, Priya SHAH a Colin HOPPER. Fluorescence spectroscopy in the detection of oral dysplasia. *Head & Neck Oncology* [online]. 2009, **1**, s.1 [cit. 2020-02-14]. DOI: 10.1186/1758-3284-1-S1-P3. ISSN 1758-3284. Dostupné z: <http://headandneckoncology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-3284-1-S1-P3>
- [21] BETZ, Christian Stephan, Thomas MAKRINIOTIS, Herbert STEPP, Waseem JERJES, Tahwinder UPILE, Colin HOPPER a Andreas LEUNIG. Diagnosis of head & neck malignancy using fluorescence spectroscopy and imaging. *Head & Neck Oncology* [online]. 2009, **1**, s.1 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1186/1758-3284-1-S1-O4. ISSN 1758-3284. Dostupné z: <https://headandneckoncology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1758-3284-1-S1-O4>
- [22] ROBESON, J.L. a R.D. TILTON. Effect of concentration quenching on fluorescence recovery after photobleaching measurements. *Biophysical Journal* [online]. 1995, **68**(5), s. 2145-2155 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80397-8. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349595803978>
- [23] LAWAETZ, Anders Juul, Rasmus BRO, Maja KAMSTRUP-NIELSEN, Ib Jarle CHRISTENSEN, Lars N. JøRGENSEN a Hans J. NIELSEN. Erratum to: Fluorescence spectroscopy as a potential metabonomic tool for early detection of colorectal cancer. *Metabolomics* [online]. 2012, **8**(1), s. 122-122 [cit. 2020-01-09]. DOI: 10.1007/s11306-011-0321-4. ISSN 1573-3882. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11306-011-0321-4>
- [24] *Schematic diagram of a custom built fluorescence spectroscopy setup for optical* [online]. [cit. 2020-06-06]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-a-custom-built-fluorescence-spectroscopy-setup-for-optical\\_fig8\\_293476901](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-a-custom-built-fluorescence-spectroscopy-setup-for-optical_fig8_293476901)

- [25] ORTNER, M-A E J. Time gated fluorescence spectroscopy in Barrett's oesophagus. *Gut* [online]. 52(1), s. 28-33 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1136/gut.52.1.28. ISSN 00175749. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.52.1.28>
- [26] MAJUMDER, ShovanK, Hemant KRISHNA, Sidramesh MUTTAGI, PradeepK GUPTA a Pankaj CHATURVEDI. Fluorescence spectroscopy for noninvasive early diagnosis of oral mucosal malignant and potentially malignant lesions. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* [online]. 2010, 6(4), s. 497-502 [cit. 2020-02-19]. DOI: 10.4103/0973-1482.77097. ISSN 0973-1482. Dostupné z: <http://www.cancerjournal.net/text.asp?2010/6/4/497/77097>
- [27] VISSER, A. J. W. G., S. P. LAPTENOK, N. V. VISSER, A. VAN HOEK, D. J. S. BIRCH, J.-C. BROCHON aj. W. BORST. Time-resolved FRET fluorescence spectroscopy of visible fluorescent protein pairs. *European Biophysics Journal* [online]. 2010, 39(2), s. 241-253 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1007/s00249-009-0528-8. ISSN 0175-7571. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00249-009-0528-8>
- [28] OIKONOMOU, Evangelos, Georgios LATSIOS, Georgia VOGIATZI a Dimitris TOUSOULIS. Atherosclerotic Plaque. *Coronary Artery Disease* [online]. Elsevier, 2018, s. 31-41 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/B978-0-12-811908-2.00003-9. ISBN 9780128119082. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128119082000039>
- [29] BILEN, Bukem, Belkis GOKBULUT, Ulku KAFA, Emre HEVES, Mehmet Naci INCI a Mehmet Burcin UNLU. Scanning Acoustic Microscopy and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy for Characterization of Atherosclerotic Plaques. *Scientific Reports* [online]. 2018, 8(1), s. 1-11 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1038/s41598-018-32788-2. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-32788-2>
- [30] *Fluorescenční mikroskop* [online]. [cit. 2020-06-06]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD\\_mikroskop](https://cs.wikipedia.org/wiki/Fluorescen%C4%8Dn%C3%AD_mikroskop)
- [31] PATERSON, D. Applications of Micron Resolution Chemical Imaging using Fast, Efficient X-ray Fluorescence Microscopy. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2018, 24(2), s. 500-501 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1017/S1431927618014733. ISSN 1431-9276. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927618014733/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927618014733/type/journal_article)
- [32] CHEN, S., T. DUCIC, Q. JIN, X. WU, N. ZALUZEC a B. LAI. Synchrotron-based X-ray Fluorescence Microscopy as a Complementary Tool to Light Microscopy/Electron Microscopy for Multi-scale and Multi-modality Analysis. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2018, 24(2), s. 88-89 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1017/S1431927618012825. ISSN 1431-9276. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927618012825/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S1431927618012825/type/journal_article)
- [33] JIN, Qiaoling, Stefan VOGT, Barry LAI et al. Ultraviolet Germicidal Irradiation and Its Effects on Elemental Distributions in Mouse Embryonic Fibroblast Cells in X-Ray Fluorescence Microanalysis. *PLOS ONE* [online]. 2015, 10(2), s.1-14 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1371/journal.pone.0117437. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117437>

- [34] JAMES, Simon A., Damian E. MYERS, Martin D. DE JONGE et al. Quantitative comparison of preparation methodologies for x-ray fluorescence microscopy of brain tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **401**(3), s. 853-864 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.1007/s00216-011-4978-3. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-4978-3>
- [35] ISAACSON, Dylan, Dylan MCCREEDY, Meredith CALVERT et al. Imaging the developing human external and internal urogenital organs with light sheet fluorescence microscopy. *Differentiation* [online]. 2020, **111**, s. 12-21 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1016/j.diff.2019.09.006. ISSN 03014681. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301468119300799>
- [36] HELD, Marie, Ilaria SANTERAMO, Bettina WILM, Patricia MURRAY, Raphaël LÉVY a Shree Ram SINGH. Ex vivo live cell tracking in kidney organoids using light sheet fluorescence microscopy. *PLOS ONE* [online]. 2018, **13**(7), s. 1-20 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0199918. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0199918>
- [37] OJHA, Anushka, Soumyabrata BANIK, Sindhoora Kaniyala MELANTHOTA a Nirmal MAZUMDER. Light emitting diode (LED) based fluorescence microscopy for tuberculosis detection: a review. *Lasers in Medical Science* [online]. [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1007/s10103-019-02947-6. ISSN 0268-8921. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-019-02947-6>
- [38] LYNG, Heidi, Azadeh BADIEE, Debbie H SVENDSRUD, Eivind HOVIG, Ola MYKLEBOST a Trond STOKKE. Profound influence of microarray scanner characteristics on gene expression ratios: analysis and procedure for correction. *BMC Genomics* [online]. 2004, **5**(1), s. 1-10 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1186/1471-2164-5-10. ISSN 14712164. Dostupné z: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-5-10>
- [39] PERRAUT, François, Alexandre LAGRANGE, Patrick POUTEAU et al. A new generation of scanners for DNA chips. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2002, **17**(9), s. 803-813 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/S0956-5663(02)00073-8. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566302000738>
- [40] MALLARD, Frédéric, Gilles MARCHAND, Frédéric GINOT a Raymond CAMPAGNOLO. Opto-electronic DNA chip: high performance chip reading with an all-electric interface. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2005, **20**(9), s. 1813-1820 [cit. 2020-05-15]. DOI: 10.1016/j.bios.2004.07.031. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566304003239>
- [41] LIU, Zhiyi, Suihua MA, Yanhong JI, Le LIU, Jihua GUO a Yonghong HE. Parallel scan hyperspectral fluorescence imaging system and biomedical application for microarrays. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2011, **277**, s. 1-10 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1088/1742-6596/277/1/012023. ISSN 1742-6596. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/277/1/012023>
- [42] LI, Guanbin, Shili WANG, Zaifang ZHU, Apeng CHEN a Shaorong LIU. Cam-based vibration-counter-balanced laser-induced fluorescence scanner for multiplexed capillary detection. *Talanta* [online]. 2019, **198**, s. 398-403 [cit. 2020-05-10]. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.128. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914019300992>



- [43] LU, Joann J., Qiaosheng PU, Shili WANG a Shaorong LIU. A cam-based laser-induced fluorescence scanner for capillary array electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2007, **590**(1), s. 98-103 [cit. 2020-05-11]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.03.034. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267007005399>
- [44] STENDER, Henrik, Kenneth OLIVEIRA, Susan RIGBY, Frederick BARGOOT a James COULL. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence in situ hybridization using an array scanner. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2001, **45**(1), s. 31-39 [cit. 2020-05-12]. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00218-4. ISSN 01677012. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701201002184>
- [45] *Flow cytometry principle - How the fluorescence activated cell sorting (FACS) work ?* [online]. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <https://www.shomusbiology.com/flow-cytometry-and-facs.html>
- [46] ADAN, Aysun, Günel ALIZADA, Yağmur KIRAZ, Yusuf BARAN a Ayten NALBANT. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* [online]. 2015, **37**(2), s. 163-176 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.3109/07388551.2015.1128876. ISSN 0738-8551. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1128876>
- [47] BROWN, Michael a Carl WITTEWER. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* [online]. 2000, **46**(8), s. 1221-1229 [cit. 2020-04-24]. DOI: 10.1093/clinchem/46.8.1221. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/46/8/1221/5641363>
- [48] KATSURAGI, Tohoru a Yoshiki TANI. Screening for microorganisms with specific characteristics by flow cytometry and single-cell sorting. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2000, **89**(3), s. 217-222 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)88822-2. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300888222>
- [49] RAIDAL, S.I., G.D. BAILEY a D.N. LOVE. The flow cytometric evaluation of phagocytosis by equine peripheral blood neutrophils and pulmonary alveolar macrophages. *The Veterinary Journal* [online]. 1998, **156**(2), s. 107-116 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1016/S1090-0233(05)80036-X. ISSN 10900233. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109002330580036X>
- [50] WILLIAMS, Anna J., Willie M. COOPER, Shawn RAMSARROOP, Pierre ALUSTA, Dan A. BUZATU a Jon G. WILKES. Rapid Flow Cytometry Detection of a Single Viable *Escherichia coli* O157: H7 Cell in Raw Spinach Using a Simplified Sample Preparation Technique. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8**, s. 1-8 [cit. 2020-04-28]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01493. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01493/full>
- [51] CERVELLI, C., F. PISANI, A. AURELI et al. For Anti-HLA-Specific Donor Antibodies Detection By Flow Cytometry Cytotoxic Crossmatches Comparison of Methods. *Transplantation Proceedings* [online]. 2013, **45**(7), s. 2761-2764 [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.07.023. ISSN 00411345. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134513006209>

- [52] SHI, Tian-Xiang, Myron J. TONG a Roger BOHMAN. The application of flow cytometry in the study of natural killer cell cytotoxicity. *Clinical Immunology and Immunopathology* [online]. 1987, **45**(3), s. 356-365 [cit. 2020-05-08]. DOI: 10.1016/0090-1229(87)90088-2. ISSN 00901229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0090122987900882>
- [53] SARTOR, M. M. a D. J. GOTTLIEB. A single tube 10-color flow cytometry assay optimizes detection of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* [online]. 2013, **84**(2), s. 96-103 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1002/cyto.b.21067. ISSN 15524949. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.b.21067>