

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

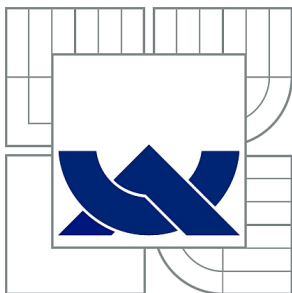
ZAŘÍZENÍ PRO MĚŘENÍ KONCENTRACE INTRACELULÁRNÍHO
VÁPNIKU V LABVIEW

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

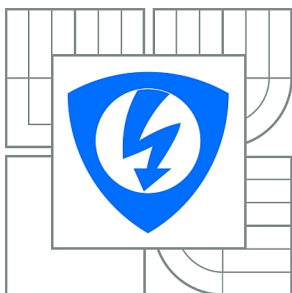
Bc. ELENA KORMANOVSKAYA

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH
TECHNOLOGIÍ

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

ZAŘÍZENÍ PRO MĚŘENÍ KONCENTRACE INTRACELULÁRNÍHO VÁPNIKU V LABVIEW

SYSTEM FOR MEASUREMENT OF CONCENTRATION OF INTRACELLULAR CALCIUM IN
LABVIEW

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ELENA KORMANOVSKAYA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. VRATISLAV ČMIEL

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ
TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta elektrotechniky
a komunikačních technologií

Ústav biomedicínského inženýrství

Diplomová práce

magisterský navazující studijní obor
Biomedicínské a ekologické inženýrství

Studentka: Bc. Elena Kormanovskaya

ID: 141945

Ročník: 2

Akademický rok: 2013/2014

NÁZEV TÉMATU:

Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Seznamte se s fluorescenčním mikroskopem a principem fluorescence. Seznamte se fluorescenčními metodami a barvivy pro měření koncentrace intracelulárního vápníku. V dané oblasti vytvořte literární rešerši. 2) Vyberte vhodnou metodu pro měření koncentrace intracelulárního vápníku u živočišných buněk. 3) Navrhněte postup měření koncentrace intracelulárního vápníku s pomocí fluorescenčního mikroskopu, kamery a vhodného barviva. 4) Navrhněte systém pro akvizici, zpracování a vyhodnocení fluorescenčních obrazů. 5) Realizujte navržený systém v LabVIEW. Proveďte měření alespoň dvou různých vzorků. 6) Proveďte diskusi nad vytvořeným systémem měření, uveďte možnosti a omezení systému.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] LAKOWICZ, J. R. Principles in Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed. Springer, 2006. ISBN-13: 978-0387312781

[2] RELF, G. CH. Image Acquisition and Processing with LabVIEW. CRC Press, 2003. ISBN-13: 978-0849314803

Termín zadání: 10.2.2014

Termín odevzdání: 23.5.2014

Vedoucí práce: Ing. Vratislav Čmiel

Konzultanti diplomové práce:

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

Předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá osvojením metod pro měření koncentrace intracelulárního vápníku, a takže odpovídajícím zařízením v prostředí LabVIEW. Práce se skládá ze dvou částí. V první teoretické části je představena teorie k principu fluorescence, fluorescenčním metodám a indikátorům pro měření koncentrace intracelulárního vápníku. Jsou navrženy postupy měření pomocí fluorescenčního mikroskopu, kamery a barviva pro měření. Představeno literární řešení problému. V druhé části je představen praktický postup řešení úlohy, jeho realizace, který zahrnuje blokové schémata měřicího zařízení v LabVIEW.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fluorescence, Fluorescenční mikroskop, Fluorescenční indikátory, koncentrace intracelulárního vápníku, Fluo-4, mikroskopický obraz, LabVIEW, Modul IMAQ, Andor Solis Spectroscopy software, iXon kamera

ABSTRACT

The master's thesis deals with the methods and system for measurement of concentration of intracellular calcium in LabVIEW. The thesis included theoretical and practical parts. The thesis covers the theory of fluorescence principles, fluorescence methods and indicators for measurement of concentration of intracellular calcium. The procedure of measurement by means of fluorescence microscope, camera and indicators is also mentioned. Literary solution is presented. Block diagram of system for measurement of concentration of intracellular calcium at a graphical programming environment LabVIEW is presented in practical part of master's thesis.

KEYWORDS

Fluorescence, Fluorescence microscope, Fluorescent indicators, concentration of intracellular calcium, Fluo-4, microscopic image, LabVIEW, Module IMAQ, Andor Solis Spectroscopy software, iXon camera

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

KORMANOVSKAYA, E. N. *Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2014. 48 s. Vedoucí semestrální práce Ing. Vratislav Čmiel.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou prací na téma Zařízení pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Vratislavu Čmielovi, za metodickou a odbornou pomoc a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce.

V Brně dne

.....

podpis autora

OBSAH

Úvod	9
1 Princip fluorescence	10
1.1 Základy fluorescence.....	11
1.2 Fluorescentní mikroskop.....	12
1.3 Fluorescenční barviva.....	15
1.4 Intracelulární vápník a metody fluorescenčního měření.....	18
2 Vlastní měření	22
2.1 Kardiomyocyty.....	22
2.1.1 Akční potenciál kardiomyocytů.....	22
2.1.2 Vápníkové transienty.....	23
2.2 Fluorescenční indikátor Fluo-4.....	23
2.3 Barvení buněk.....	28
2.4 Kalibrace.....	28
2.5 Snímání kamerou.....	30
Praktická část	32
3 Popis experimentů	32
3.1 Protokol experimentu.....	32
4 Realizace úlohy v prostředí LabVIEW, popis blokového schématu	33
4.1 Akvizice obrazových dat.....	33
4.1.1 Andor Solis Software Kit.....	33
4.2 Zpracování dat.....	38
4.3 Uložení a vyhodnocení výsledků.....	39
4.4 Uživatelské rozhraní.....	41
5 Diskuze o dosažených výsledcích	42
5.1 Možnosti a omezení navrženého řešení.....	42
Závěr	43
Literatura	44
Seznam symbolů, veličin a zkratk	47

ÚVOD

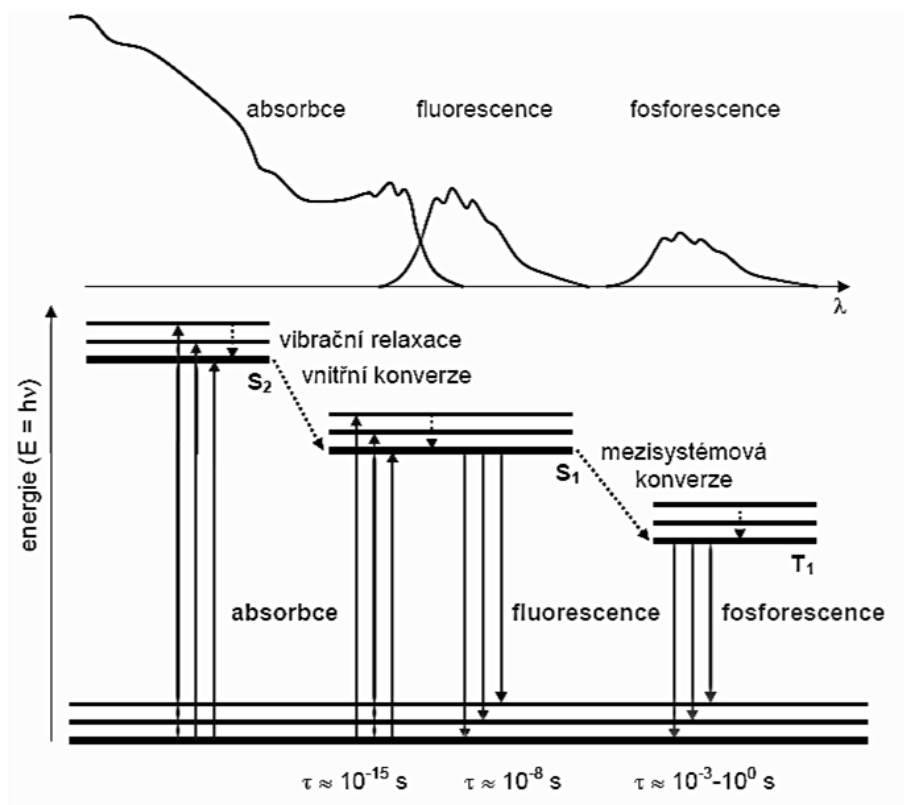
Všechny změny v lidském těle začínají v buňkách a jsou doprovázeny iontovými změnami. Rozvoj dovedností, které mohou změřit takovou iontovou aktivitu, pomáhá rozpoznat a definovat normální a abnormální buněčnou funkci.

Existuje několik způsobů měření změn koncentrací vnitrobuněčného Ca^{2+} . Nejméně invazivním způsobem měření je využití fluorescenční mikroskopie. V osnově tohoto principu leží schopnost některých molekul (fluoroforu) po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbovat energii tohoto záření a pak ji ztrácet emisí záření o delší vlnové délce. Přitom moderní mikroskopie umožňuje nejenom měření její koncentrace intracelulárních iontů, ale také vyhodnocení a analýzu jejich prostorové aktivity. V případě měření iontové aktivity Ca^{2+} se obvykle používá fluorescenční mikroskopie kvůli tomu, že fluorescenční indikátory (fluorofory jejichž spektrální vlastnosti jsou citlivé na určitou látku) mají vysokou sensitivitu k volným iontům Ca^{2+} v porovnání s jinými metodami a velikost změn ve vlastnostech indikátorů je zásadní. Intenzita fluorescence roste jak s růstem počtu iontů Ca^{2+} , tak s růstem její koncentrace. [10]

Cílem této diplomové práce je návrh a realizace systému pro měření koncentrace intracelulárního vápníku v LabVIEW. V diplomové práci se popisují jak základní principy fluorescence a fluorescenční mikroskopie, tak i postupy měření koncentrace intracelulárního vápníku pomocí fluorescenčního barviva u živočišných buněk (kardiomyocytů) a také systém akvizice mikroskopického obrazu, který se skládá z fluorescenčního mikroskopu, kamery a programového prostředí LabVIEW.

1 Princip fluorescence

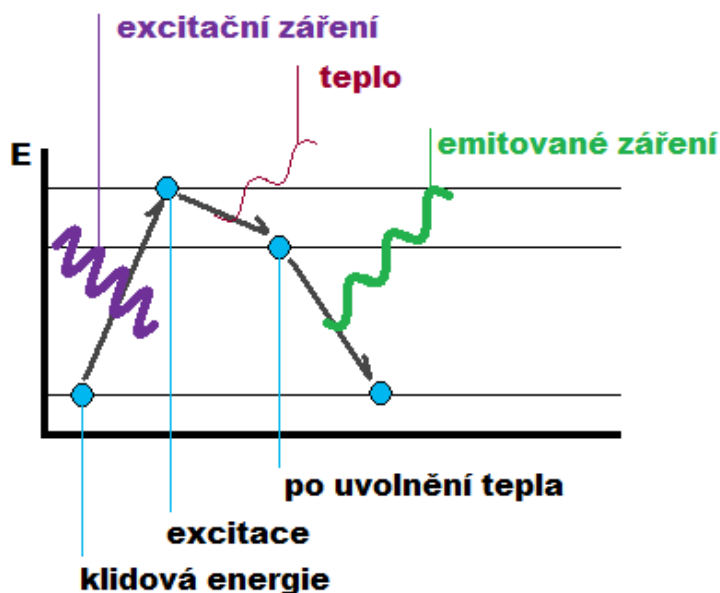
Fluorescence je jedním z druhu fotoluminiscenčního záření, které je charakterizováno vyzářováním energie. Jiným druhem luminiscenčního záření je fosforescence (obr. 1). Fluorescenční sloučeniny mají dvě charakteristická spektra: excitační spektrum (krátká vlnová délka a množství absorbovaného světla) a emisní spektrum (dlouhá vlnová délka a množství vyřazovaného světla). První teorie související s principem fluorescence vznikly na začátku 20. století. Například teorie luminiscenčních center (A. Jablonský), kvantový výtěžek (S. I. Vavilov), vyhasínání luminiscence (Gaviola), polarizace fluorescence (Weigert, F. Perrin) atd. Pojem fluorescence zavedl G. Stokes a tento název pochází od minerálu obsahujícího prvek fluor. Stokes zjistil, že po absorpci světla o nižší vlnové délce dochází k emisi světla o vyšší vlnové délce. Tento rozdíl má název Stokesův posun.



Obr. 1: Diagram Jablonského, převzato z [12]

1.1 Základy fluorescence

Fluorescence je schopnost určitých chemických sloučenin absorbovat krátkovlnnou světelnou energii a zároveň ji odrážet jako dlouhovlnnou ve viditelné části spektra, ale s nižší energií. Emitované záření je vyzářeno atomem, který energii pohltil. Schéma energetické hladiny elektronu při fluorescence viz obr. 2. Některé molekuly fluoreskují přirozeně a jiné fluoreskují pomocí fluorescenčních látek. Nejvíce používaná vlastnost fluorescence je absorpce v ultrafialové oblasti spektra.



Obr. 2: Energetické hladiny elektronu, převzato z [1]

Vyzářená energie je v případě excitace molekul vždy nižší než absorbovaná, protože dochází k rozptylu energie. Fluorescence začíná okamžitě a trvá méně než 10^{-7} - 10^{-5} s, nedochází při ní ke změně spinu, po vypnutí buzení prakticky ihned mizí. Intenzita emitovaného záření je lineárně závislá na koncentraci jen ve velmi malém oboru koncentrací, metoda je navíc citlivá na různé vlivy. Proto je při měření nutné sestavit kalibrační křivku. Vlnová délka emitovaného záření je charakteristická pro každou látku [3].

Každá látka má dva typy spekter - excitační a emisní spektrum. Přitom existují určitá pravidla, které charakterizují jejich vlastnosti. Rozdíl mezi maximem emisního a excitačního spektra definuje Stokesův posun. Stokesův posun vzniká kvůli tomu, že vyzařované fluorescenční světlo má delší vlnovou délku a méně energie, než absorbované světlo. Podle Kashovo-Vavilova pravidla tvar emisního spektra, kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu nezávisí na vlnové délce budícího záření a lze excitovat s jakoukoli délkou vlny z excitačního spektra. To znamená, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace. Jiná vlastnost excitačního a absorpčního spekter spočívá v tom, že jejich tvar u organických látek je podobný, jenom je zrcadlově obrácený (zrcadlové pravidlo).

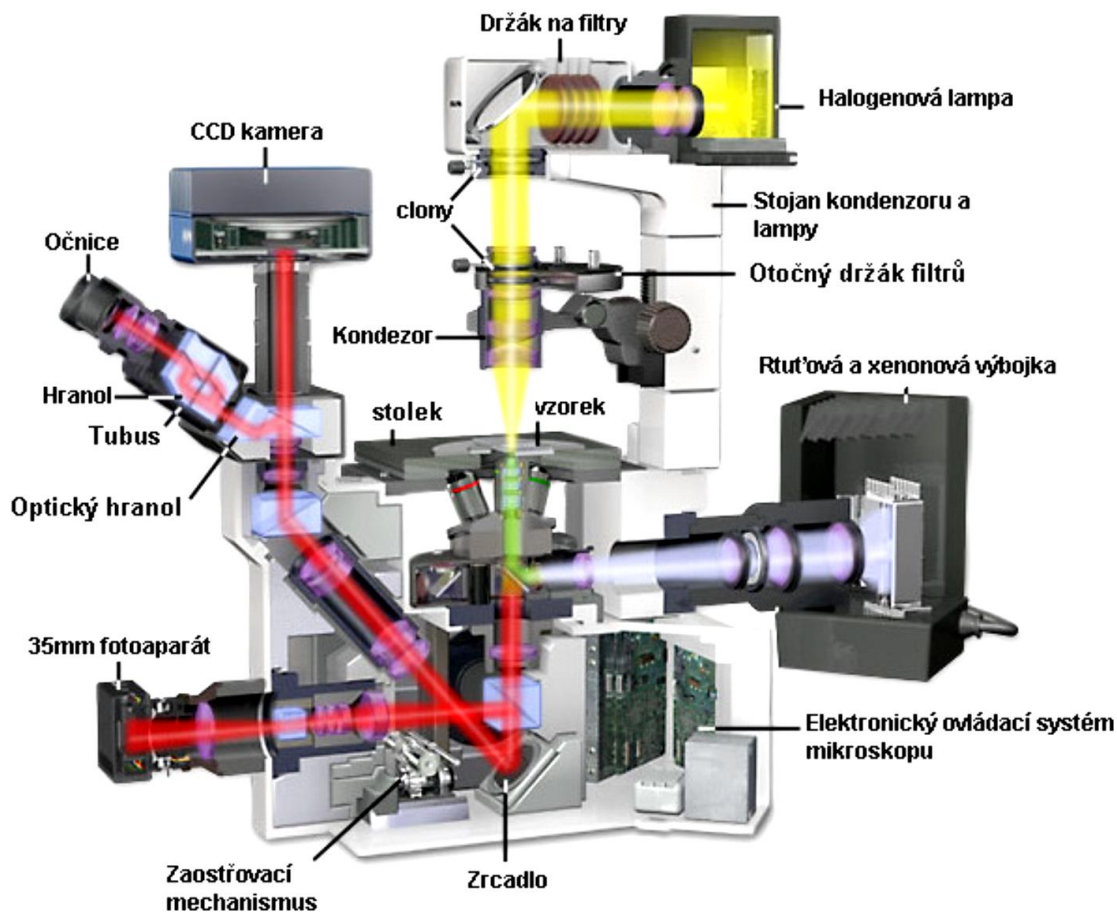
Fluorescenci můžeme používat i pro nefluorescenční materiály. Pokud vzorek nemá vhodné fluorescenční vlastnosti, přidává se k němu vnější fluorofor (takzvaná vnější fluorescence). Chemické sondy jsou fluorofory, jejichž emise v přítomnosti určité látky buď zvýší intenzitu, nebo vykazuje spektrální posuv. Chemické fluorescenční sondy jsou nejpoužívanějšími indikátory Ca^{2+} , protože poskytují poměrně silný signál při změně koncentrace Ca^{2+} . Fluorescenční sondy se nejčastěji třídí podle emisních spekter – sondy emitující v oblasti ultrafialového a modrého (Quin-2, Indo-1), zeleného (Fura-2, Calcium Green), žlutého a oranžového (Calcium Orange, Rhod-2), červeného a blízkého infračerveného (Calcium Crimson) záření [3].

Použití fluorescence má výhodu v tom, že můžeme pozorovat biochemické procesy v dynamice, i když trvají jenom nanosekundy. Přitom fluorescence má velkou sensitivitu, a to znamená, že poskytuje přesnější výsledky, například při monitorování molekulárních struktur, organizaci buněk a jejich funkci. Na druhou stranu taky dostáváme informace o prostředí zkoumané molekuly.

1.2 Fluorescentní mikroskop

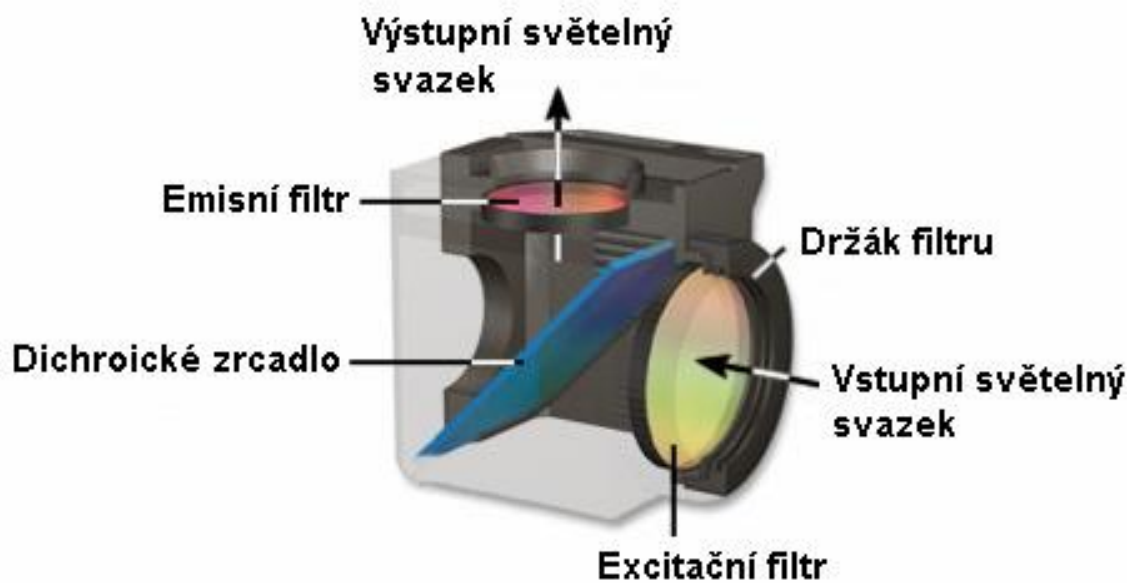
Existují čtyři typy přístrojů, které používá fluorescence jako základ pro měření. Jedná se o spektrofluorimetry, fluorescenční mikroskopy, fluorescenční skenery a průtokové cytometry. V našem případě pro pozorování fluorescence mikroskopických objektů použijeme fluorescentní mikroskop. Jeho princip spočívá v osvětlení vzorku světlem o vysoké frekvenci s takovou vlnovou délkou, která v něm následně vyvolá fluorescenci. Fluorescenční světlo, které má obvykle delší vlnovou délku než ozařující světlo, se zobrazuje přes objektiv mikroskopu. Ve fluorescentním mikroskopu se používají dva filtry. Excitační filtr, který zajišťuje, že osvětlení bude téměř monochromatické a bude mít požadovanou vlnovou délku, a emisní filtr, který zajišťuje nepřítomnost excitačního zdroje světla na cestě k detektoru. Obě tyto funkce může splnit dichroický filtr.

Pro měření se používá mikroskop Olympus IX-71 (obr. 3). Mikroskop má dva zdroje světla: halogenovou lampu a rtuťovou nebo xenonovou výbojku. Každý z těchto zdrojů světla má různé využití. Při klasické mikroskopii se pro osvětlení zkoumaného vzorku využívá halogenové lampy. Přitom jako zdroj excitačního světla slouží rtuťová a xenonová výbojka. Výsledný obraz vzorku se pak zpracovává různými způsoby. Výhoda fluorescenčního mikroskopu spočívá v tom, že obraz buď můžeme pozorovat přímo přes očníce, anebo sledovat upravený na počítači, protože sám signál je už zpracován přímo v mikroskopu. [5]



Obr. 3: Schéma fluorescenčního mikroskopu, převzato z [5]

Světla ve fluorescenčním mikroskopu nejdříve prochází optickým hranolem. Paprsek světla prochází excitačním filtrem, který vymezení excitační vlnové délky. Poté excitační paprsek dopadá na dichroické zrcadlo, odtud se odráží a přes čočky a excitační filtr dopadá na vzorek. Vzorek je světlem excitován a začne vyzařovat světlo jiné vlnové délky. Toto světlo zpětně prochází přes polopropustné dichroické zrcadlo a míří na emisní filtr. Emisní filtr vymezení námi požadované vlnové délky. Fluorescenční signál prochází přes čočky, zrcadlo a filtry do fotonásobiče, kde se fluorescenční signál transformuje na elektrický signál. [6]



Obr. 4: Schéma průchodu paprsku přes filtry, převzato z [6]



Obr. 5: Set filtry od firmy Thorlabs (excitační, emisní a dichroický filtry), převzato z [7]

1.3 Fluorescenční barviva

Pro měření změn koncentrace nitrobuněčných iontů se používá fluorescenční sonda (fluorofory). Její výhoda spočívá v tom, že je citlivá na danou látku a mění své spektrální vlastnosti po vazbě daného iontu. Takovými indikátory obvykle jsou deriváty látek pro vyvazování a následné vylučování některých iontů z organismu jako jsou Ca^{2+} , K^+ , Na^+ nebo Mg^{2+} .

Důležité kritéria při výběru indikátoru:

1. Forma indikátoru (sůl, acetoxymetyl ester, dextranový konjugát), která ovlivňuje způsob, jakým se dostává do buňky (mikroinjekce, elektroporace, infúze z patch-pipety, pasivní difúze) a nitrobuněčnou distribuci.

2. Způsob měření

Obvykle tyto indikátory buď

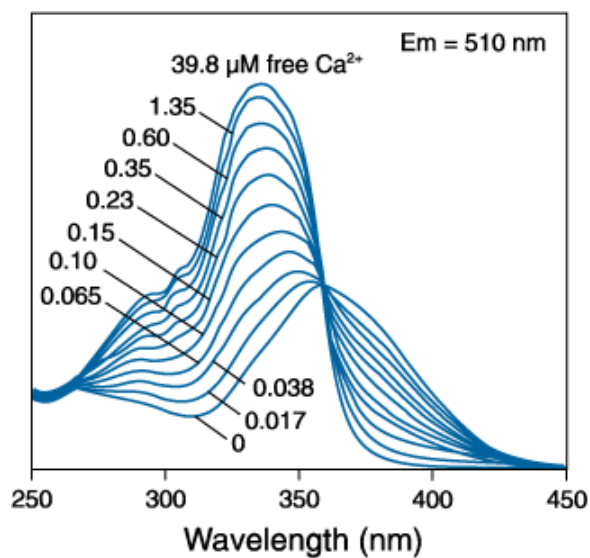
- vykazují spektrální posuv v závislosti na přítomnosti dané látky, jejíž koncentrace se potom určuje z poměru intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise,
- nebo se jedná o indikátory, které vykazují zvýšení intenzity fluorescence v přítomnosti dané látky, aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu [10].

Fura-2 je jeden z indikátorů vykazujících spektrální posuv v přítomnosti Ca^{2+} .

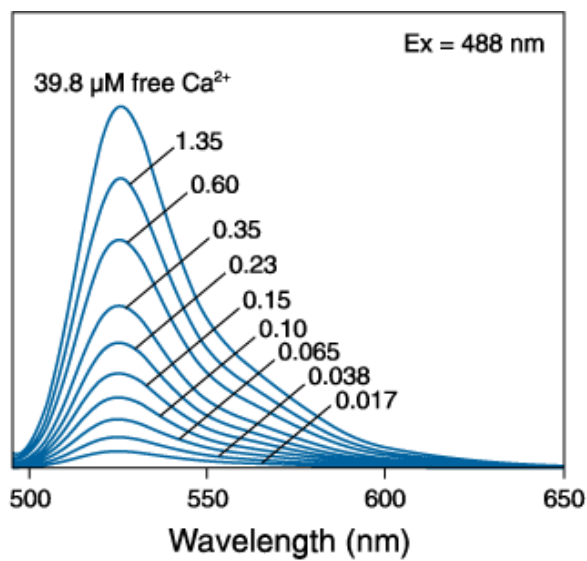
Calcium green vykazuje zvýšenou intenzitu fluorescence v přítomnosti Ca^{2+} , aniž by docházelo ke spektrálnímu posuvu.

3. Disociační konstanta musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu. Koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu a nespolehlivou kalibraci. Proto je důležitý výběr vhodné sondy podle očekávaného rozsahu měřených koncentrací.

Výběr vhodné sondy je také ovlivněn používanou optikou, typem světelného zdroje, filtry a dichroickým zrcadlem. To všechno má vliv na spektrální vlastnosti sondy. Při použití sondy Fura-2 je nutné používat fluoritové objektivy, nebo objektivy určené pro UV oblast. Jestli buzení probíhá ve viditelné oblasti, potom tato komplikace odpadá. Pro měření koncentrací volných vápenatých iontů se v současné době využívají nejčastěji poměrová sonda buzená v UV oblasti Fura-2 (obr. 14) a nepoměrová sonda buzená ve viditelné oblasti Fluo-3 (obr. 15).



Obr. 6: Spektrum excitace Fura-2, převzato z [11]



Obr. 7: Spektrum emise Fluo-3, převzato z [11]

V tabulce 1 jsou uvedeny vybrané fluorescenční indikátory Ca^{2+} , kde λ_F – vlnová délka pro volnou formu sondy, λ_B – vlnová délka pro vázanou formu sondy, Ex – měření

při uvedené vlnové délce excitace, Em – měření při vlnové délce emise a dvojice čísel oddělená lomítkem značí poměrné měření na dvou různých vlnových délkách [1].

Ca²⁺ indikátor	excitace $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	emise $\lambda_F(\lambda_B)$ (nm)	způsob měření	disociační konstanta (nmol/l)
Fura-2	362(335)	518(510)	Ex 340/380	145
Fura-5F			Ex 340/380	400
Fura-6F			Ex 340/380	5300
Fura-FF			Ex 340/380	5500
Indo-1	349(331)	482(398)	Em 405/485	230
Indo-5F			Em 405/485	470
Fluo-3	504	526	Em 525	390
Fluo-4	491	516	Em 520	345
Fluo-5F			Em 520	2300
Fluo-5N			Em 520	90000
Quin-2	356(336)	500(503)	Em 495	60
Rhod-2	550	581	Em 580	570
Rhod-FF			Em 580	19000
Rhod-5N			Em 580	320000
Oregon Green BAPTA-1	494	523	Em 520	170
Oregon Green BAPTA-2	494	523	Em 520	580
Oregon Green BAPTA-6F			Em 520	3000
Oregon Green BAPTA-5N	494	521	Em 520	20000
Calcium Green-1	506	534	Em 530	190
Calcium Green-2	506	536	Em 535	550
Calcium Green-5N	506	536	Em 530	14000

Tab. 1 Vybrané fluorescenční indikátory Ca²⁺, převzato z [12]

1.4 Intracelulární vápník a metody fluorescenčního měření

Vápník je universální intracelulární signalizační molekula (secondary messenger), která kontroluje řadu buněčných metabolických a vývojových cest. V organismu je obsaženo 1200 g, tj. asi 30 molů vápníku (1 kg = 24,95 molů), z toho se přibližně 99% nachází v kostech, zejména ve formě extracelulárních krystalů strukturou se blížících hydroxylapatitu/hydroxyapatitu $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Kvůli neustále remodelaci kosti se denně ukládá a uvolňuje více jak 700 mg vápníku. Je to pátý nejčastěji se vyskytující kation v těle. Vápník se nachází ve třech hlavních tělesných prostorách: v kostech, měkkých tkáních (1%) a extracelulární tekutině, přičemž prakticky všechn je v plazmě. [19] V plazmě existují tři frakce vápníku:

- 15 % vázáno na organické a anorganické anionty – sulfát, fosfát, laktát, citrát
- 40 % je vázáno na albumin
- 45 % cirkuluje jako fyziologicky aktivní ionizovaný vápník.

Přítom konstantní koncentrace vápníku v plazmě - 2.2 - 2.6 mmol/l. [18]

V buňce vápník plní četné fyziologické funkce, jako jsou podpora aktivity enzymů, regulace aktivity enzymů, membránový přenos, iniciace svalové kontrakce, neuromuskulární dráždivost, sekrece hormonů, metabolismus glykogenu a buněčné dělení a pohyb buněk. Nízká koncentrace vápníku v cytozolu je udržována transportními mechanismy v plazmatické, mitochondriální a mikrosomální membráně. Tyto procesy hrají důležitou roli v biologické aktivitě ionizovaného kalcia. Kalcium se také nachází i v extracelulárním prostoru, do kterého ho vytlačuje kalcium kalciová pumpa. Jako extracelulární iont má vápník důležitou roli ve výstavbě kostí, při srážení krve, udržování normální dráždivosti srdce, svalů a nervů, udržování selektivní propustnosti membrán a jejich stabilizace. [19] Proto, aby se zabránilo nevratným účinkům na zdraví člověka, je v první řadě nutné sledovat koncentraci intracelulárního vápníku.

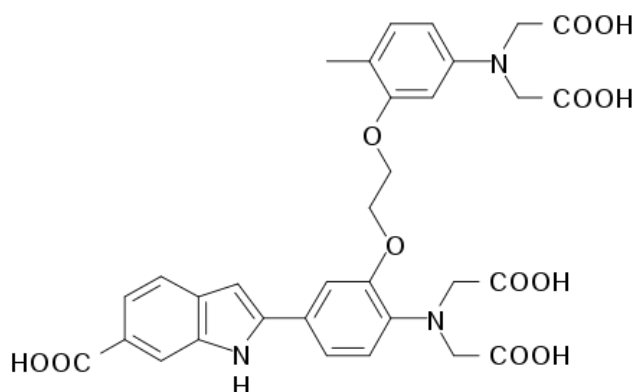
V dnešní době existuje několik generací fluorescenčních sond, které umožňují měření intracelulárního vápníku v cytosolu, mitochondriích a endoplazmatickém retikulu. Těto sondy mění svou intenzitu a také spektrálně charakteristiky v přítomnosti iontů Ca^{2+} .

Většina fluorescenčních sond, které se používají pro měření koncentrace kalcia, jsou nitrobuněčné, protože se dostávají do buněk mikroinjekcí nebo jako acetoxylmetylestery (AM estery), které jsou uvnitř buňky štěpeny nitrobuněčnými esterázami za vzniku negativně nabitých sond. Při fluorescenčním měření můžeme provést dva druhy analýzy: kvalitativní analýzu a kvantitativnou analýzu. Kvalitativní analýza hodnotí přítomnost dokazované látky

podle zbarvení, resp. tvaru fluorescenčního spektra. Kvantitativná analýza hodnotí podle intenzity záření na její množství.

Pro fluorescenční měření se nejčastěji používají indikátory dvou typů: poměrové (ratiometric) a nepoměrové (nonratiometric). U nepoměrových indikátorů se (Quin-2, Fluo-3, Fluo-4, Rhod-2 atd.) při změně koncentrace Ca^{2+} mění intenzita emisního a excitačního spektra indikátoru, přičemž délka vlny, na které se objevují maxima emisního a excitačního spektra, zůstává téměř stejná. Na rozdíl od nepoměrových indikátorů je u poměrových indikátorů (Fura-2, Indo-1, Fura Red™) poměr intenzit fluorescence v emisním nebo excitačním spektru závislý pouze na koncentraci volných Ca^{2+} . U nepoměrových indikátorů musíme přesně znát koncentraci sondy ve vzorku pro výpočet koncentrace Ca^{2+} . Poměrové indikátory při změně koncentrace Ca^{2+} ukazují nejen změny intenzit ve spektrech, ale i posun samotných spekter, mění se vlnová délka maxim spekter. Monitorování intenzit fluorescence u nepoměrových indikátorů se provádí na jedné vlnové délce, a proto nežádoucí změny v koncentraci Ca^{2+} mohou velmi ovlivnit výsledky, zvyšuje se pravděpodobnost chyby. Přitom měření intenzit u poměrových indikátorů se provádí na dvou různých vlnových délkách a poměr dvou měření kvantitativně souvisí s koncentrací Ca^{2+} . Pro excitaci vyžadují poměrové indikátory (Indo-1 a Fura-2) ultrafialový diapazon, přitom nepoměrové indikátory využívají viditelné excitační světlo. Poměrové indikátory sice mohou být kalibrované, které jsou více spolehlivé, ale v některých případech není možné používat ultrafialové světlo (protože to může vyvolat autofluorescenci, která může zničit vzorek), navíc přístrojové vybavení pro monitorování poměrových indikátorů je mnohem složitější, než u nepoměrových indikátorů.

Jedním z typických nejčastěji používaných nepoměrových indikátorů pro měření koncentrace intracelulárního vápníku je Indo-1 (Obr. 11). Indo-1 vždycky excituje na fixované vlnové délce a emise se zároveň monitoruje na dvou vlnových délkách, to znamená, že emise volných a vázaných iontů Ca^{2+} může být získána současně, a to zkracuje čas provádění experimentu. Kromě toho Indo-1 poskytuje lepší časové rozlišení obrazu.



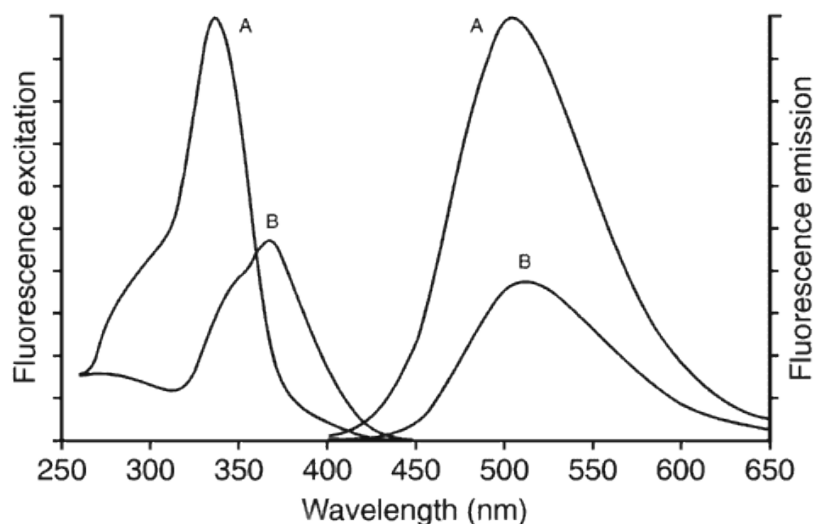
Obr. 8: Struktura fluoroforu Indo-1, převzato z [1]

Optické měření koncentrace volných iontů Ca^{2+} je založeno na změně optických vlastností molekul některých indikátorů po navázání vápenatého kationtu.

Pro měření koncentrace iontů se monitorují 3 typy spekter fluorescenčních indikátorů:

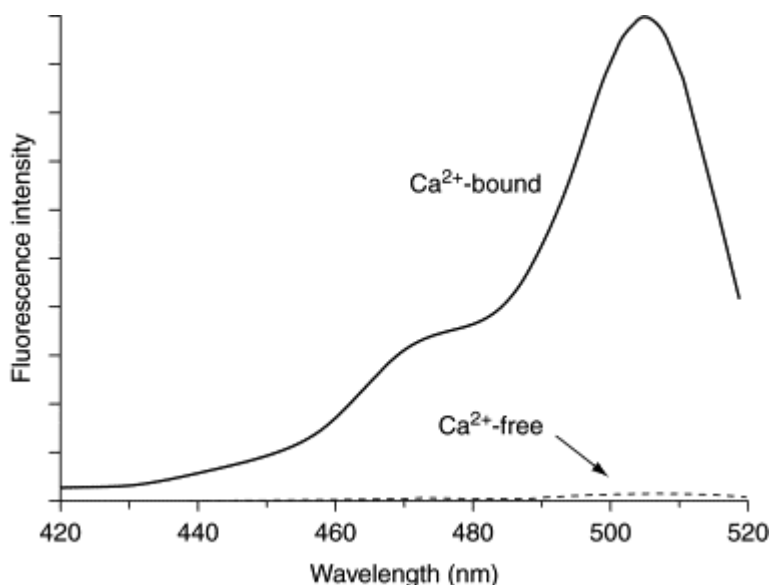
- Absorpční spektrum (závislost absorbance barviva na vlnové délce procházejícího světla)
- Emisní spektrum (závislost intenzity fluorescence na její vlnové délce při konstantní vlnové délce excitace).
- Excitační spektrum (závislost intenzity fluorescence na proměnné vlnové délce excitace snímané při jedné vlnové délce) [8]

Příklad změny excitačních a emisních spekter (viz obr. 12. a obr. 13.):



Obr. 9: Spektra sondy Fura-2, B - v nepřítomnosti vápníku, A – v přítomnosti saturující koncentrace vápníku. Vlevo jsou spektra excitační, vpravo jsou emisní, převzato z [8]

Volné formy iontu Ca^{2+} jsou téměř stokrát méně zářivé, než vázané formy iontu v přítomnosti indikátoru Fluo-3. Podobná vlastnost se objevuje i v přítomnosti indikátoru Fluo-4.



Obr. 10: Excitační spektrum Fluo-3 ($\lambda_{\text{emis}}=525\text{nm}$), převzato z [13]

Jednou z metod měření koncentrace vnitrobuněčného kalcia je měření intenzit fluorescence. Přitom se zobrazují, měří a porovnávají intenzity fluorescence na jedné vlnové délce emise ve vybrané oblasti indikátoru buzeného jednou vlnovou délkou. Výsledným signálem je potom poměr intenzit získaných při dvou vhodně vybraných vlnových délkách excitace nebo emise. Výhodou je jednoduchost a rychlost měření.

Jiným druhem metod jsou poměrové metody měření v excitaci nebo emisí.

Poměrová metoda v excitaci monitoruje změny excitačního spektra indikátoru po navázání vápníku. Vzorek je excitován střídavě dvěma vlnovými délkami: jednou, při které má maximum excitace forma obsazená vápníkem, a druhou, při které má maximum forma neobsazená vápníkem. Výsledný signál je přitom sledován na jedné vlnové délce. Fluorescence se pozoruje ve viditelné části spektra (okolo 510 nm), kde má maximum emise.[8]

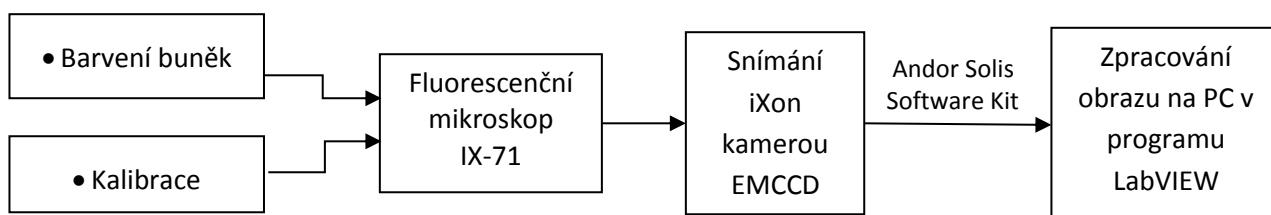
Poměrová metoda v emisí sleduje změny emisního spektra a snímá obraz zároveň na dvou vlnových délkách emise ze vzorku, který je buzen jednou vlnovou délkou. Výsledné obrazy se mohou snímat postupně (pomocí změn filtrů) anebo současně (pomocí dichroického zrcadla a filtrů) na dvě kamery nebo fotonásobiče.

Výsledný obraz vzorku je vytvořen a upraven počítačem u obou metod pomocí výpočtu poměru z intenzit fluorescence sejmutých na různých excitačních nebo emisních vlnových délkách. Při známé kalibrační křivce počítač zobrazuje výslednou mapu koncentrací

intracelulárního vápníku a její změny v čase. Především samotný poměr intenzit není příliš ovlivněn různou intenzitou obarvení vzorku nebo vybělováním (photobleaching) barviva [8].

2 Vlastní měření

Tato kapitola obsahuje jednotlivé kroky praktického výzkumu měření koncentrace intracelulárního vápníku fluorescenčním mikroskopem a zpracování získaných dat. Obrázek číslo 11 představuje blokové schéma výzkumu.



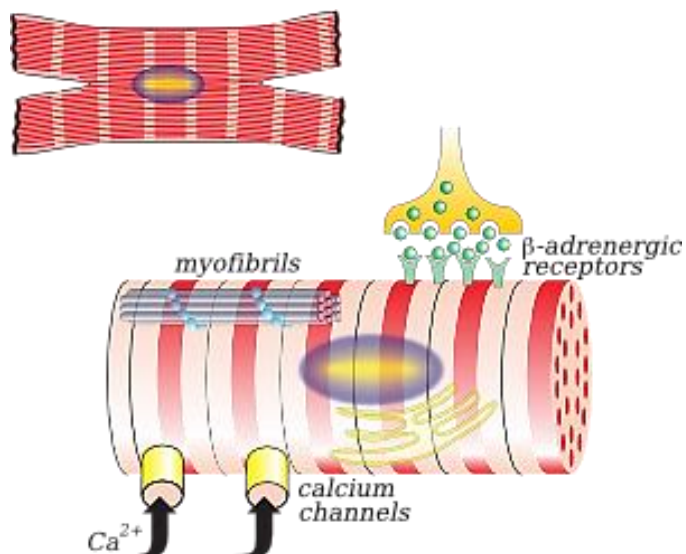
Obr. 11: Blokové schéma výzkumu

Dle zadání diplomové práce je potřeba vytvořit systém v programovacím prostředí LabVIEW pro měření koncentrace intracelulárního vápníku. Přitom je také potřeba vybrat druh živočišných buněk, které pak budou použity při experimentu, vhodné fluorescenční barvivo a vhodnou metodu pro měření koncentrace.

Experimentální část byla provedena na kardiomyocytech s využitím fluorescenčního barviva Fluo-4, které se používá pro nepoměrové měření. Fluo-4 excituje pomocí viditelného světla, což znamená, že pro realizaci experimentu bude stačit jenom samotný fluorescenční mikroskop a kamera. Dále jsou uvedeny popisy a charakteristiky jednotlivých komponentů systému.

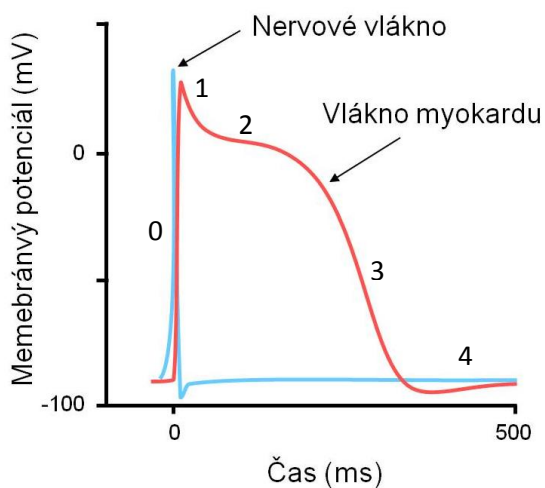
2.1 Kardiomyocyty

Kardiomyocyt je svalová buňka srdečního svalu – myokardu válcovitého tvaru na koncích rozvětvená s přibližným průměrem 10-20 nm a délkou 50-100 nm. Poměrně velká jádra kardiomyocytů jsou uložena uprostřed buňky. Je základní jednotkou pro šíření vzruchů srdeční svalovou tkání. Na obr. 12 je zobrazen kardiomyocyt a jeho struktura.



Obr. 12: Struktura kardiomyocytu, převzato z [23]

2.1.1 Akční potenciál kardiomyocytů



Obr. 13: Akční potenciál myokardu, převzato z [20]

Akční potenciál je depolarizace klidově polarizované membrány kardiomyocytů. V průběhu akčního potenciálu se v myokardu rozlišuje pět fází (viz. obr. 13).

Fáze 0 = rychlá depolarizace (otevření rychlých napěťově řízených Na kanálů).

Fáze 1 = rychlá repolarizace (uzavření rychlých napěťově řízených Na kanálů).

Fáze 2 = plató (pomalejší otevření napěťově řízených pomalých Ca kanálů).

Fáze 3 a 4 = pomalá repolarizace (zavření Ca kanálů a vyčerpání K iontů různými typy pump).

V klidovém stavu je patrný rozdíl mezi elektrickým nábojem uvnitř a vně kardiomyocytu (tzv. klidový membránový potenciál). Je to dáno polopropustností membrány kardiomyocytu (není propustná pro ionty sodíku, draslíku a vápníku) a aktivním vyčerpáváním iontů sodíku ven z buňky. Výsledkem je rozdíl koncentrací kladně nabitých iontů sodíku uvnitř a vně buňky a z toho vyplývající klidový membránový potenciál, který je okolo -70 mV. Jestliže se otevřou kanály pro sodík v membráně buňky, začnou sodíkové ionty proudit rychle dovnitř buňky a dochází tak k vyrovnání tohoto klidového rozdílu. Toto se označuje jako fáze 0 akčního potenciálu, tedy rychlá depolarizace. Rychlé kanály pro sodík, kterými se dostává dovnitř, jsou tzv. napěťově řízené. To znamená, že pokud je na membráně přítomen klidový membránový potenciál -70 mV, jsou zavřené. Pokud dojde k poklesu tohoto potenciálu o kritickou hodnotu, která je přibližně 15 mV, dojde k náhlému otevření všech těchto kanálů. Na vrcholu akčního potenciálu se rozdíl mezi nitrem a vnějškem buňky vyrovnají, či se dokonce na chvíli nitro buňky stane oproti vnějšku kladné (tedy dojde až k tzv. transpolarizaci). Kardiomyocyty jsou v srdci spojeny vodivými spoji (gap junctions). Pokud dojde ke vzniku akčního potenciálu na jednom kardiomyocytu, otevřou se vyvolanou změnou napětí rychlé sodíkové napěťově řízené kanály sousedních kardiomyocytů, čímž dojde k šíření akčního potenciálu celým srdečním svalem. Rychlost vedení vzruchu v pracovním myokardu je $0,3 - 0,5$ m/s, ovšem v některých částech převodního systému je rychlost až 4 m/s. Po depolarizaci, tedy vyrovnání rozdílu nábojů či na krátkou dobu až jejich obrácení, se tok sodíkových iontů zastaví. Nastává tím fáze 1 akčního potenciálu, tzv. rychlá repolarizace. V té dochází rychle (ale krátce) k poklesu membránového potenciálu (směrem ke klidovým hodnotám). V této době se však již otevírají pomalé kanály pro Na a Ca, které jsou taktéž napěťově řízené a kterými proudí Na a Ca ven z buňky. Tím se udržuje na membráně kardiomyocytu dosažená depolarizace (tedy vyrovnané napětí vně a uvnitř buňky) a tato fáze se označuje jako fáze plató. Pomalé kanály pro Na a Ca se následně uzavírají, Na je aktivně vyčerpáván ven z buňky a do buňky se naopak dostává K, čímž je dosaženo ve fázi 3 a 4 (fázích pomalé depolarizace) hodnoty klidového membránového potenciálu, která byla přítomna před vznikem akčního potenciálu.

V buňce pracovního myokardu je na membráně mezi dvěma akčními potenciály přítomen po celou dobu klidový membránový potenciál. Buňky převodního systému mají schopnost tzv. spontánní diastolické depolarizace a průběh akčního potenciálu u těchto buněk je jiný.

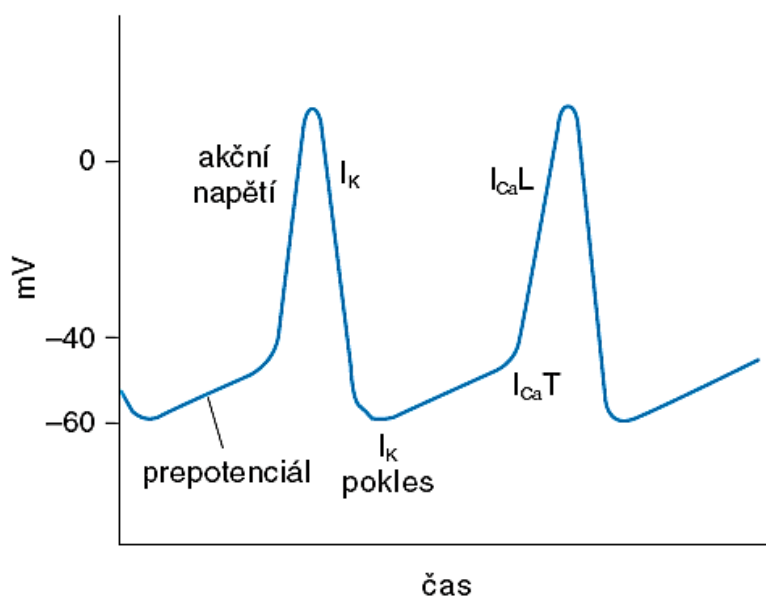
V klidové fázi dochází spontánně k postupnému klesání napětí na membráně, které když dosáhne prahové hodnoty, vyvolá vznik akčního potenciálu. To má velký význam, neboť spontánní depolarizací a frekvencí vzniku akčního potenciálu v těchto buňkách je dána frekvence stahů srdce. Fyziologicky probíhá spontánní diastolická depolarizace nejrychleji v buňkách SA uzlu, který se nazývají primární pacemaker. [22]

Ionty Ca^{2+} nejenom způsobují kontrakci uvnitř svalové buňky, ale také se stávají hlavními nositeli signálů. Vápenaté ionty regulují šíření impulsu akčního potenciálu v myokardu. Zvýšená koncentrace iontu Ca^{2+} způsobuje kontrakce buněk myokardu, snížena koncentrace iontu způsobila by trvalou relaxaci kardiomyocytů, proto dochází ke stálé výměně iontu Ca^{2+} mezi extracelulárním a intracelulárním buněčným prostředím. Regulace koncentraci intracelulárního vápníku je zajišťována třemi různými cestami: výměnou vápníkových iontů za sodíkové, vápníkovou pumpou, napěťově řízenými receptory několika druhy vápníkových kanálů. [23]

2.1.2 Vápníkové transienty

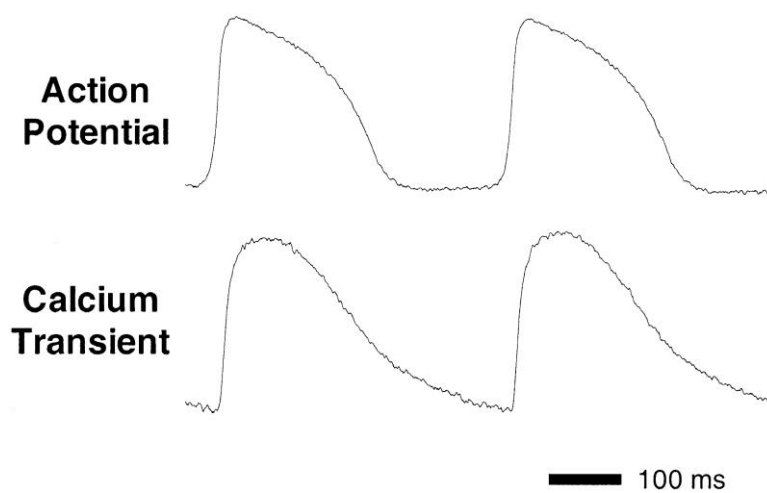
Měření koncentrace intracelulárního vápníku v praktické části diplomové práce bude zaměřeno na vyhodnocení vápníkových transientů. Proto je potřeba pochopit co jsou vápníkové transienty a jak souvisí s koncentrací vnitrobuněčného vápníku. Jak bylo zmíněno v předchozí podkapitole, průchod vápníkových iontů buněčnou membránou se řídí akčním potenciálem kardiomyocytů. Koloběh Ca^{2+} iontu mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím umožňují vápníkové kanály. Vápníkový kanál je druh iontových kanálů pro kationty vápníku. Na srdečních buňkách se nacházejí dva typy kanálů:

- kanály L-typu (long lasting channels), které se otevírají na dlouhou dobu, převážně se nacházejí ve svalech a jsou významné pro kontrakci
- kanály T-typu (transient channels), které se otevírají na krátkou dobu, jsou zodpovědné za tranzientní kalciové proudy, podílejí se také na vzniku akčních potenciálů v srdečních buňkách a neuronech. Klidové napětí buněk schopných spontánní depolarizace klesá po proběhnutí akčního potenciálu k prahové hodnotě, vzniká tzv. prepotenciál, který spustí další vzruch. Poté co začíná vznikat prepotenciál jsou otevřeny transientní vápníkové kanály. Na obr. 14 je zobrazen diagram membránového napětí. Symboly dílčích proudů jsou vyznačeny u příslušných fází akčního napětí. L – „long lasting“, T – „transient“. [22], [24]



Obr. 14: Diagram membránového napětí v pacemakerové tkáni, převzato z [22]

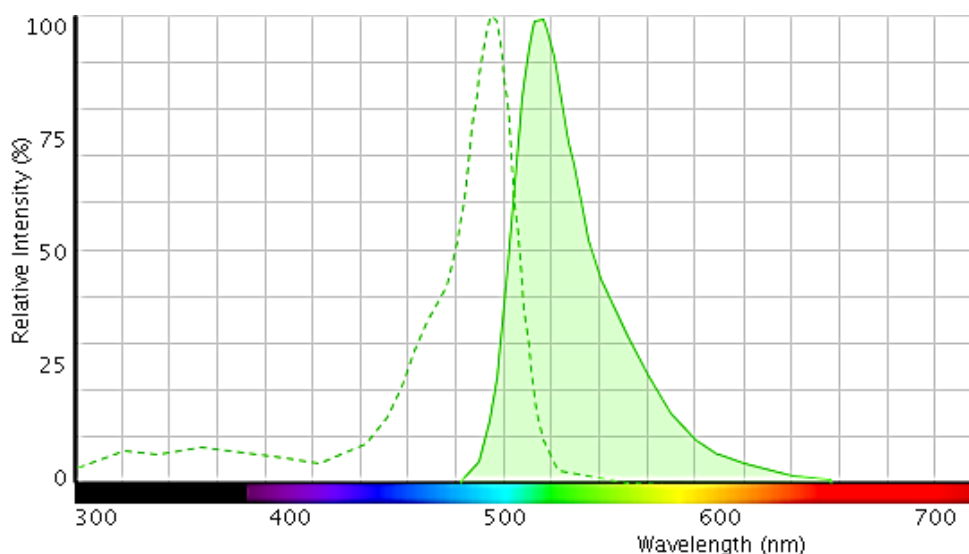
Na obr. 15 je zobrazen graf vápníkového transientu, získaného během měření pomocí fluorescenčního měření s využitím barviva Indo-1.



Obr. 15: Příklad synchronního měření akčního potenciálu a vápníkového transientu, převzato z [24]

2.2 Fluorescenční barvivo Fluo-4

V rámci experimentu budeme používat barvivo Fluo-4. Fluo-4 je zlepšený analog barviva Fluo-3. Fluo-4 vykazuje rychlý nárůst intenzity fluorescence při navázání na Ca^{2+} ionty. Stejně jako Fluo-3 se využívá Fluo-4 při nepoměrových měřeních koncentrace iontu. Fluo-4 excituje prostřednictvím viditelného světla, což eliminuje spektrální posun na rozdíl od indikátorů, které excitují pomocí ultrafialového světla a také zajišťuje menší míru autofluorescence. Při používání Fluo-4 fluorescenční signál je mnohem silnější a intenzivnější. Fluo-4 se obvykle používá jako AM – ester, protože rychleji proniká do buňky přes membránu a při nižší anebo stejné koncentraci poskytuje intenzivnější signál. Tato vlastnost umožňuje provádět méně invazivní experimenty. Nejvíce se využívá v laboratořích vybavených mikroskopem s argon-iontovým laserem, kde pak excituje při 488 nm. Fluo-4 poskytuje dobrou citlivost a nízkou kompartmentaci, což zajišťuje jeho široké využití v konfokální a fluorescenční mikroskopii. Na obr. 16 jsou uvedeny excitační a emisní spektra barviva Fluo-4. [21]



Obr. 16: Excitační (vlevo) a emisní (vpravo) spektra barviva Fluo-4, převzato z [21]

2.3 Barvení buněk

Typické fluorescenční indikátory pro měření koncentrace Ca^{2+} jsou polycarboxylátové aniony, které nemohou v obyčejném stavu procházet buněčnou membránou. U záporně nabitých forem indikátorů mohou být zavedeny do buňky mikroinjekcí. Ale nejvíce vhodným způsobem zavedení sondy do buňky je její umístění do roztoku acetoxymethylesteru (AM indikátoru). AM forma indikátoru nemá náboj (je neutrální) a je hydrofobní, a proto se může dostat dovnitř buňky. AM sonda pronikne do buňky, ve které se esterová vazba rozštěpí, a molekula tím získá záporný náboj. Pokud sonda postupně proniká dovnitř buňky, dochází

k jejímu štěpení a dojde k akumulování sondy uvnitř buňky. Přitom koncentrace indikátoru v buňce může významně překročit koncentraci mimo ni. A proto AM sonda musí být odstraněna, pokud nějaká její část už projde buněčnou membránou. Existuje několik faktorů, které mohou ovlivnit výsledek měření [8].

V některých případech je požadované monitorování změn koncentrace Ca^{2+} jenom v jedné části buňky, například v cytosolu. Ale to je těžké realizovat, protože AM formy indikátoru mohou procházet buněčnými membránami, a proto se některá část sondy může dostat i mimo požadovanou oblast. Druhý faktor, který může významně ovlivnit výsledky je teplota, ve které se provádí experiment. Štěpení AM sondy uvnitř buňky je závislé na teplotě, při nízkých teplotách je koncentrace indikátoru akumulovaného v cytosolu docela nízká. Proto se v praxi měření obvykle provádí při pokojové teplotě. Pro zpomalení procesu uniku indikátoru z buňky je vhodné použít snížení teploty, ve které se provádí experiment. Proto je důležité nastavit odpovídající teplotu a taky dobu barvení buněk tak, aby nedocházelo k výraznému barvení buněčných organel a aby se sonda v buňkách úplně rozštěpila. Pokud indikátor nebude úplně rozštěpen, jeho části mohou ovlivnit fluorescenční signál [13].

Koncentrace indikátoru neovlivňuje rovnou intenzitu snímaného signálu, ale může ovlivňovat koncentraci Ca^{2+} . Milimolární koncentrace sondy, které se aplikují přímo dovnitř buňky pomocí pipety, vedou k vyvázání významné části Ca^{2+} na sondu. Poté měřený signál odpovídá přírůstku množství Ca^{2+} v buňce, kvůli tomu, že veškerý nový vápník bude ihned vychytán indikátorem, a koncentrace nevázaných iontů se skoro nezmění [8].

2.4 Kalibrace

Nezpracovaný fluorescenční signál od fluorescenční sondy sice nese informativní data kvalitativního charakteru, ale musí být odkalibrován pro jeho další zpracování a získání výsledku. Proto snímáme signál ze vzorku, u kterého koncentrace iontu už známe, a podle toho hledáme odpovídající jednotlivé intenzity pro naměřené koncentraci Ca^{2+} .

Dva nejpoužívanější typy kalibrace:

In vitro

Kalibrace *in vitro* spočívá v tom, že se porovnávají poměry, které byly získané monitorováním roztoku indikátoru s různými, ale přesně známými koncentracemi, s poměry získanými z měřených buněk. Musíme však počítat s tím, že spektrum indikátoru, které se nachází uvnitř buňky, se může změnit kvůli výskytu proteinů.[8]

In vivo

Kalibrace *in vivo* spočívá ve využití vápníkových ionoforů – molekul, ovlivňujících propustnost buněčné membrány pro vápenaté ionty. Pro vápník to jsou calcimycin a ionomycin. [8]

Pro nepoměrové indikátory koncentrace volných iontu Ca^{2+} je daná:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \right) \quad (1)$$

F_{min} – intenzita fluorescenčního indikátoru, když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou volné

F_{max} – intenzita fluorescenčního indikátoru, když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou vázané

K_d – disociační konstanta

F – naměřena fluorescenční intenzita, pro kterou hledáme odpovídající koncentrace Ca^{2+}

Pro poměrové indikátory koncentrace volných iontu Ca^{2+} je daná:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{s_{f,2}}{s_{b,2}} \right) \quad (2)$$

$R = F_1/F_2$ (F_1 -intenzita fluorescence na vlnové délce λ_1 , F_2 - intenzita fluorescence na vlnové délce λ_2)

R_{min} – maximální veličina poměru R , když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou volné

R_{max} – maximální veličina poměru R , když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou vázané

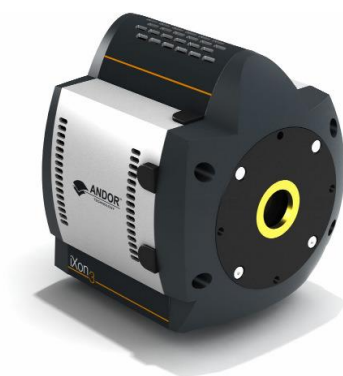
K_d – disociační konstanta

$s_{f,2}/s_{b,2}$ – poměr mezi neměřenou intenzitou fluorescence volných iontu Ca^{2+} i vázaných iontu Ca^{2+} , pokud obě měření byly provedeny na vlnové délce λ_2

Proces kalibrace se provádí skoro stejným způsobem u poměrových i nepoměrových indikátorů. Na začátku zvýšíme permeabilitu buňky pomocí ionomycina, pak musíme zajistit saturaci intracelulárního indikátoru (například pomocí ionoforu) a pak přidáváme digitonin pro zvýšení buněčné permeability a propuštění fluorescenčního indikátoru i měříme výslednou fluorescence [13].

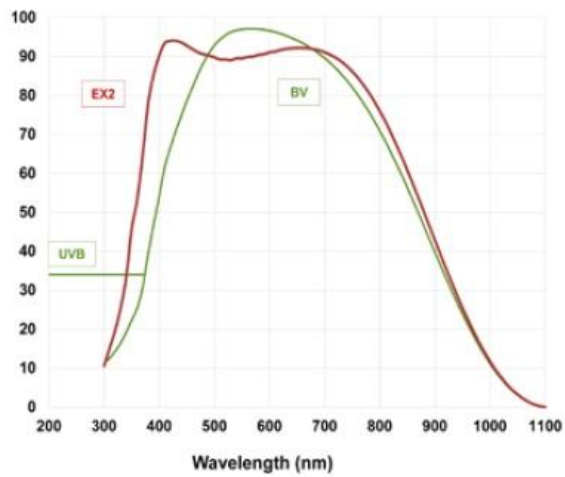
2.5 Snímání kamerou

Pro měření použijeme EMCCD kameru od firmy Andor. Tato kamera s rozlišením 128 x128 bodů. [9]

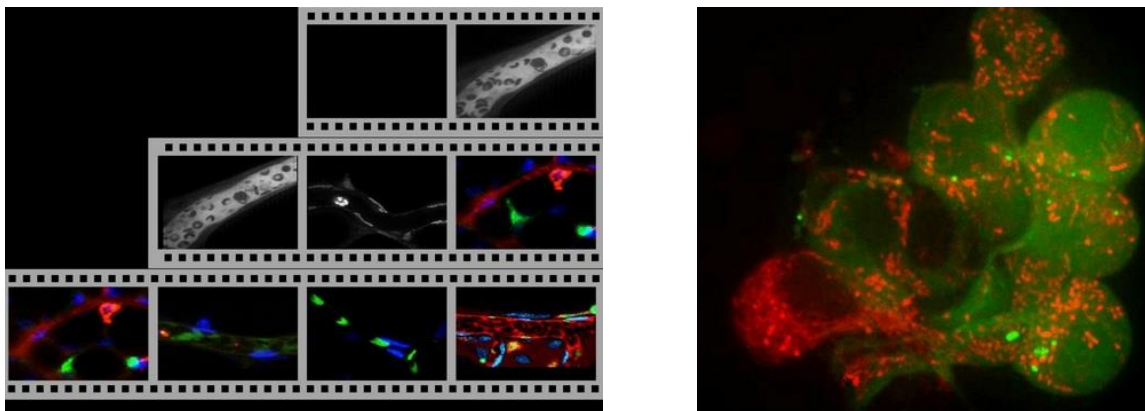


Obr. 17: EMCCD kamera, převzato z [9]

Obrázek číslo 18 představuje spektrum kamery s nejcitlivějšími vlnovými délkami v oblasti okolo 500nm.



Obr. 18: Spektrum kamery Ixon 3 - 888, převzato z [9]



Obr. 19: Ukázky obrázků, pořízených pomocí kamery Ixon 3: zobrazení procesu ve vývoji (zleva), využití fluorescenčních proteinů (zprava), převzato z [9]

3 Popis experimentů

3.1 Protokol experimentu

Protokol měření intracelulárního Ca^{2+} pomocí fluorescenčních indikátoru Fluo-4AM

Barvení

- 1) K 1 ml zásobního roztoku s živočišnými buňkami přidáme 4 μl fluorescenčního barviva Fluo-4 AM s roztokem bez barviva (Tyrode).
- 2) Promícháme roztok pro rovnoměrné nabarvení buněk.
- 3) Buňky se pak inkubují při pokojové teplotě v temném místě po dobu 15-25 minut.
- 4) Před měřením je potřeba promýt buňky roztokem bez barviva (Tyrode), abychom mohli odstranit zbytky fluorescenčního barviva.

Kalibrace

Pro nepoměrové indikátory koncentrace volných iontu Ca^{2+} je daná:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{F - F_{\min}}{F_{\max} - F} \right)$$

F_{\min} – intenzita fluorescenčního indikátoru, když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou volné

F_{\max} – intenzita fluorescenčního indikátoru, když všechny ionty Ca^{2+} v molekule jsou vázané

K_d – disociační konstanta

F – naměřena fluorescenční intenzita, pro kterou hledáme odpovídající koncentrace Ca^{2+} .

Změřená koncentrace fluorescenčního barviva se musí blížit hodnotě disociační konstanty, která je hlavním kalibračním parametrem. Pro Fluo-4 $K_d = 345 \text{ nM}$.

4 Realizace úlohy v prostředí LabVIEW, popis blokového schématu

Měření koncentrace intracelulárního vápníku je realizované v programovacím prostředí LabVIEW s využitím Andor Software Development Kit (SDK). SDK zahrnuje knihovny se základními nastavení kamery pro různé programovací jazyky: C++, C#, Delphi, VB6, VB.NET, LabVIEW a Matlab. Využití těchto knihoven umožňuje upravovat nastavení kamery v souvislosti s měnicími podmínky experimentu a garantuje rychlou odezvu kamery na nové parametry.

Samotné prostředí LabVIEW je vhodné jak pro vývoj technických programovacích aplikací pro řízení komplexních systémů, tak i pro systémy měření, analýzy a zpracování různých druhů dat a vizualizaci výsledků. Práce v programovacím prostředí LabVIEW je založena na vytváření virtuálních přístrojů (VI – virtual instrument). Každý projekt VI se skládá ze dvou částí. První část je blokový diagram (Block diagram), ve kterém se tvoří algoritmus programu z jednotlivých programovacích bloků, druhá část – čelní panel (Front panel) - pak představuje uživatelský interface navrženého zdrojového kódu. Na čelním panelu jsou k dispozici ovládací prvky, které pak umožňují testování programu.

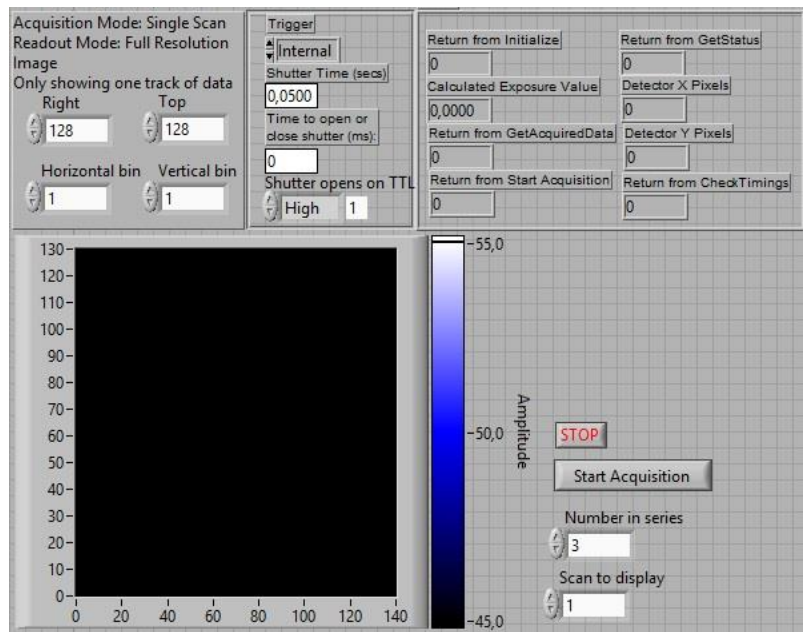
Hlavní výhodou využití programovacího prostředí LabVIEW je možnost rychlého navrhování složitých aplikací pomocí virtuálně nastavitelných přístrojů, provádění změn v konfiguraci, což za pomoci reálných součástí u skutečných nástrojů je často velmi nákladné nebo nemožné.

Knihovna Andor Software Development Kit pro programovací prostředí LabVIEW se skládá z několika virtuálních přístrojů, které umožňují měnit základní nastavení kamery, jako jsou způsob akvizice obrazu, trigger mode, režim spouště, nastavení chlazení atd. Jednotlivé bloky virtuálních přístrojů představují různé funkce pro ovládání kamery. Přitom není možné ručně měnit vnitřní parametry těchto bloků.

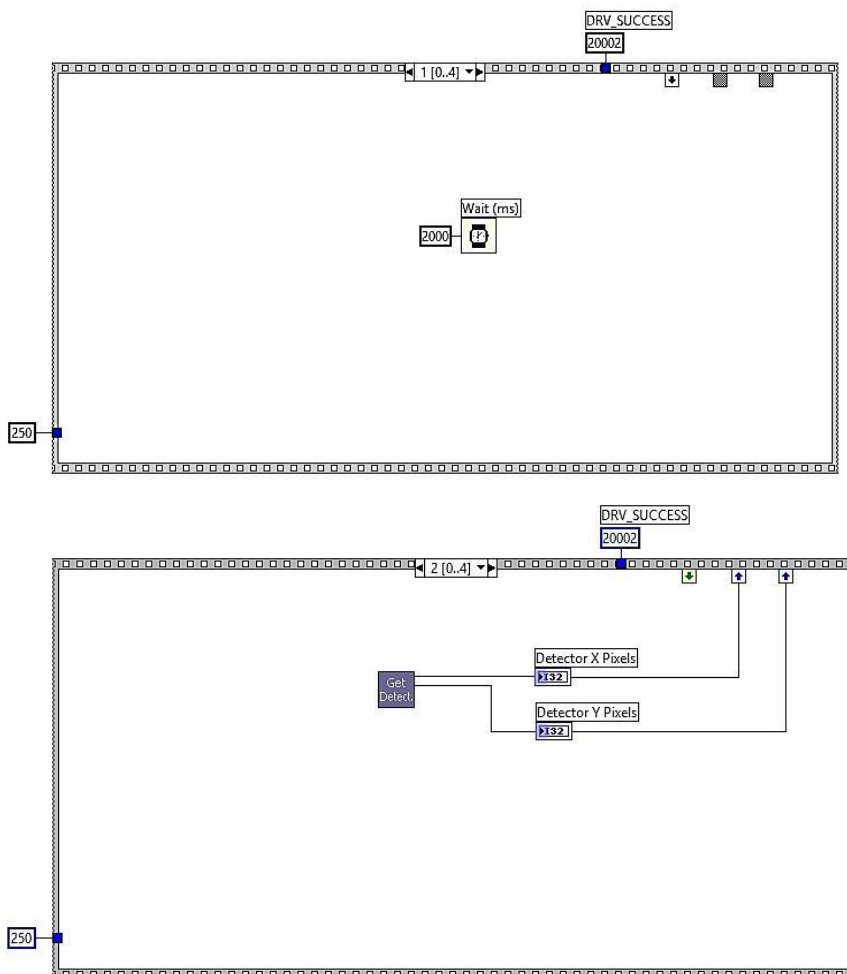
4.1. Akvizice obrazových dat

4.1.1 Andor Solis Software Kit

Základem měřicího systému je jeden z virtuálních přístrojů z knihovny SDK iXonKinetic.vi. Tento přístroj se bude hlavně používat pro inicializaci iXon kamery a její rychlejší komunikaci s prostředím LabVIEW. iXonKinetic.vi se skládá ze sekvence opakujících funkcí pro inicializaci a nastavení kamery viz obr. 20 a obr. 21.

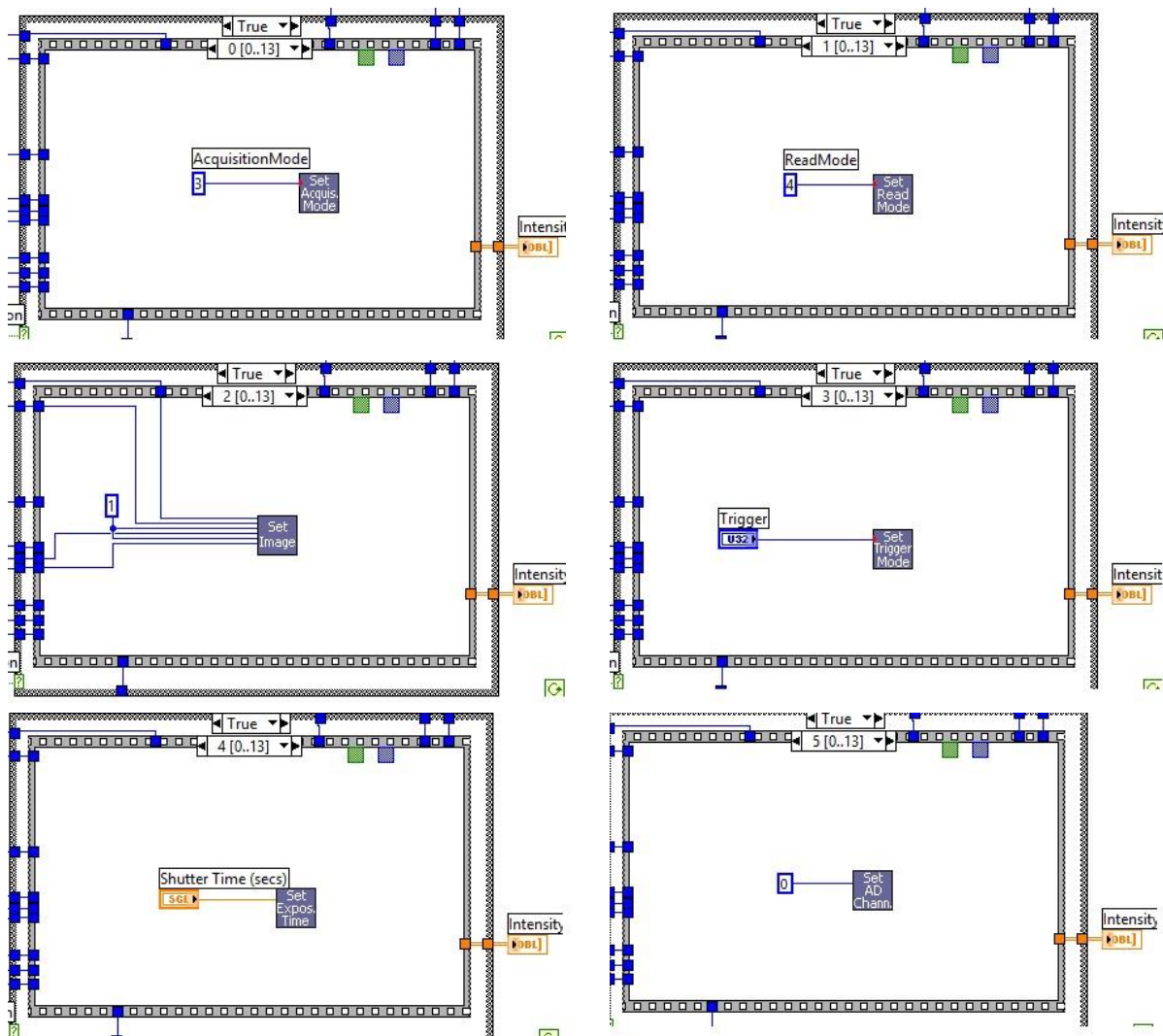


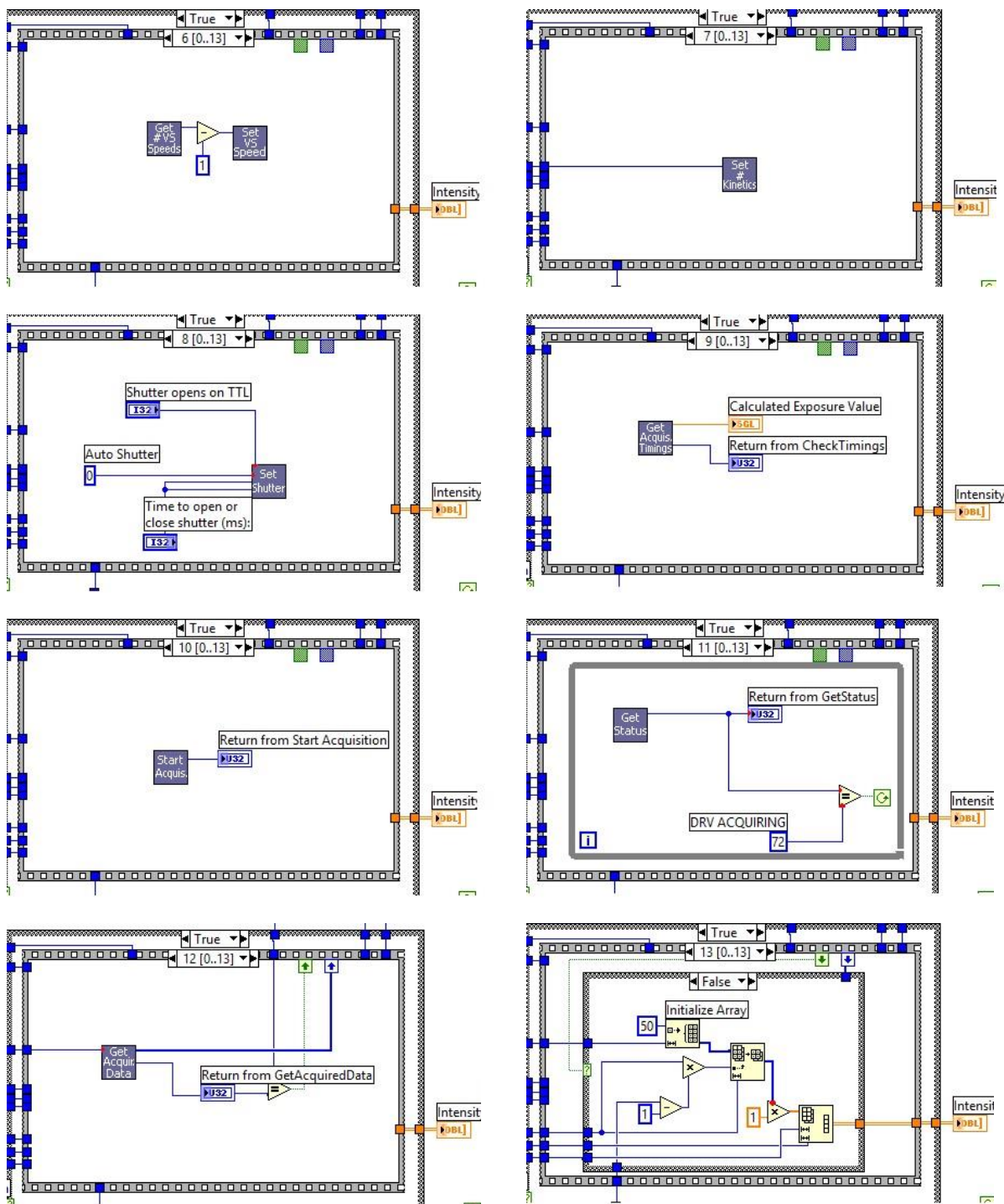
Obr. 20: Čelní panel iXonKinetic.vi



anebo pokud není zmáčknuté tlačítko *STOP*. Potom program se ukončí. Po celou dobu této sekvence program ověřuje, jestli nenastala chyba a jestli kamera reaguje na požadavky programu.

Důležitou součástí programu je ještě jedna sekvence, ve které se získávají data pro výsledné zobrazení intenzitního grafu. V této sekvenci se nastavuje režim akvizice obrazu podle manuálu SDK (Single scan, Accumulate, Kinteics atd.), režim načítání obrazu (Full Resolution Image), nastavuje se velikost obrázku podle velikosti detektoru, režim spouště a další nastavení kamery. V posledním cyklu sekvence se vizualizuje intenzitní graf pro vybraný řádek a sloupec načtených dat viz obr. 22.





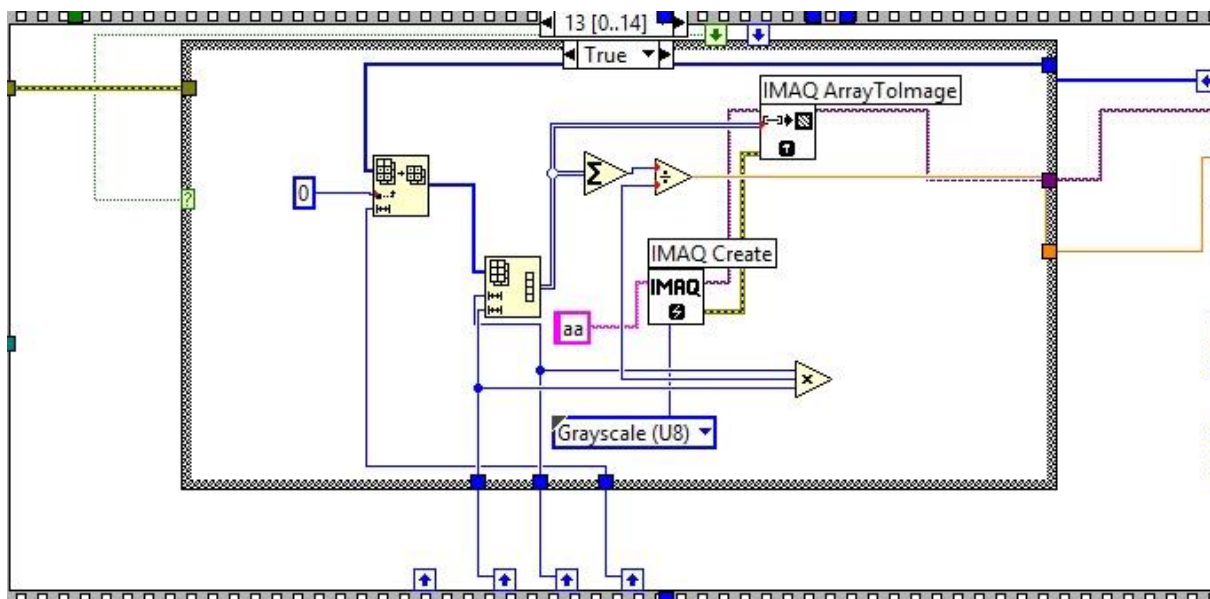
Obr. 22: Sekvence funkcí načtení dat VI iXonKinetic.vi (blokový diagram)

Uvedený program a jeho jednotlivé bloky posloužili osnovou pro návržení vlastního měřicího systému. Představené funkce jsou použité pro akvizici mikroskopického obrazu. Některé cykly ale byly upraveny. Například kvůli zrychlení běhu programu bylo vynecháno

nastavení triggeru, protože nemá zásadní vliv na funkčnost požadovaného programu. Taky byl upraven cyklus vizualizaci intenzitního grafu. Ve výsledném programu bylo potřeba vizualizovat místo grafu mikroskopicky obraz, v originálním programu ale obrazové data nejsou používány. Proto ve výsledném programu bylo potřeba převést matici indexu v obrazový formát.

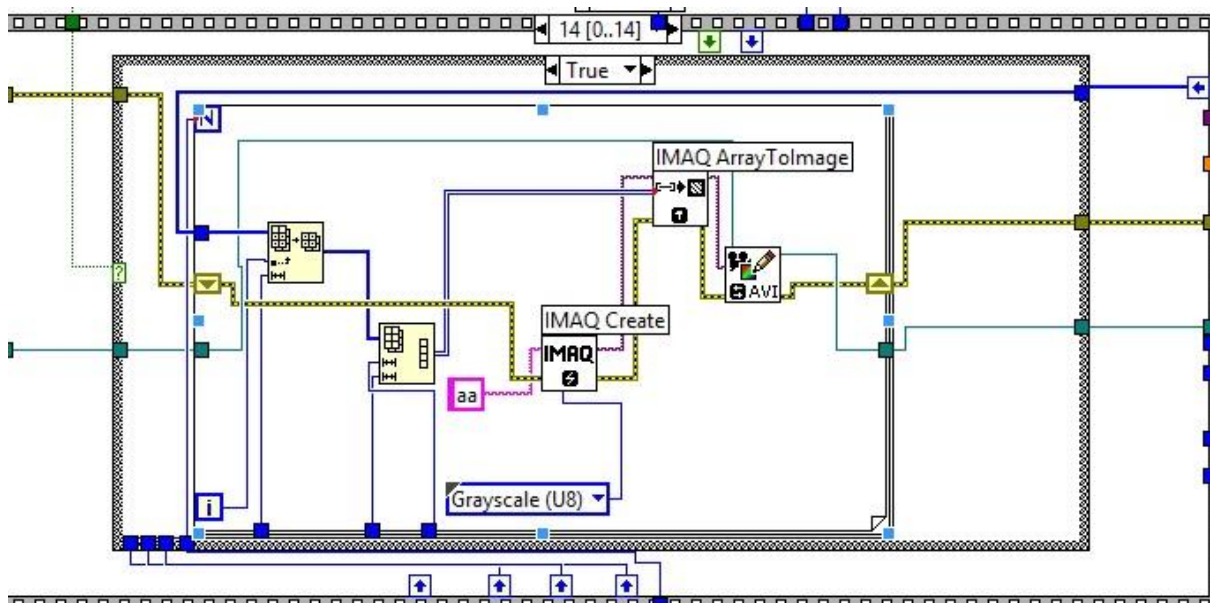
4.2 Zpracování dat

Po ověření nastavení kamery a načtení dat musíme těchto data tak, aby na výstupu byl mikroskopicky obraz. K tomu použijeme bloky *IMAQ Create* a *IMAQ ArrayToImage*. Upřesníme, že konečný obrázek musí být šedotónový, proto použijeme paletu *Grayscale*. Zpracování dat v tomto programu se provádí vícekrát, jelikož v originálním programu SDK knihovny jsou využity cykly s podmínkami (*Case Structures*), které na jednu stranu snižují počet vyskytujících chyb, ale na druhou stranu komplikují celkový algoritmus programu. Na obr. 23 je uveden blokové schémata převodu načtených dat



Obr. 23: Převod a zpracování načtených dat

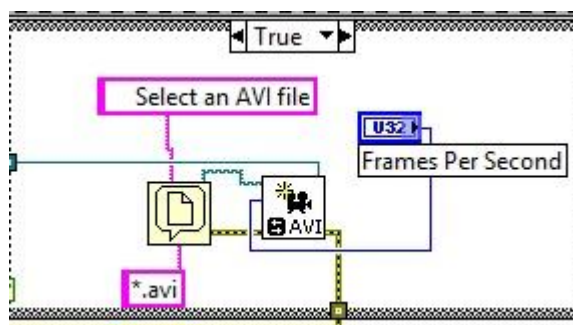
Na obr. 24 je zobrazen algoritmus ukládání obrazu do předem vytvořeného prázdného AVI souboru.



Obr. 24: Převod a zpracování načtených dat

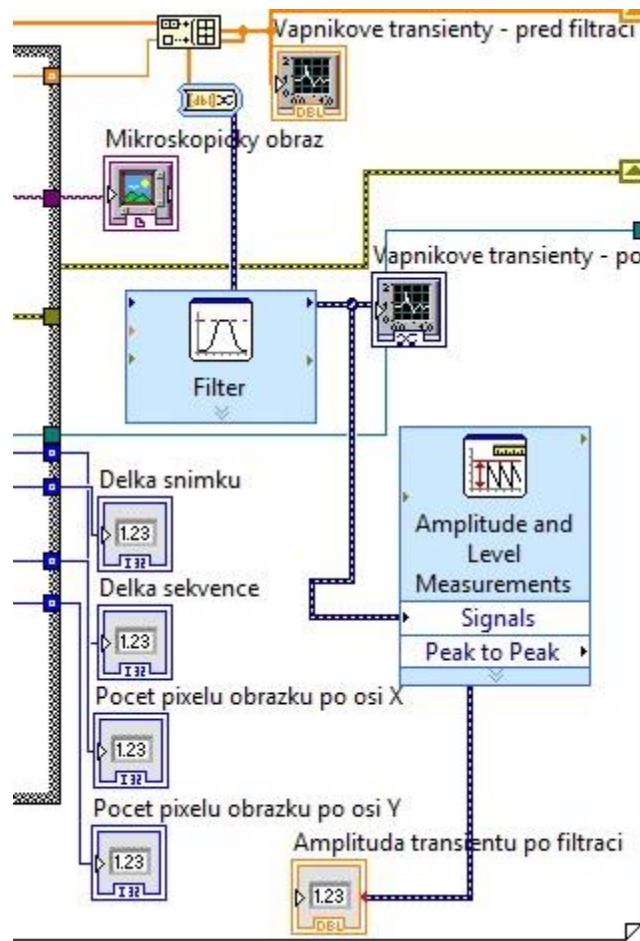
4.3 Uložení a vyhodnocení výsledků

Pro ukládání výsledků měření uživatel může zvolit ukládání obrazu do výstupního souboru ve formátu AVI. Pokud uživatel zvolí možnost ukládání na čelním panelu, objeví se dialogové okno, kde uživatel zvolí cílový adresář pro ukládání dat. Pokud uživatel nezvolí možnost ukládání dat, nebudou výsledky uloženy, ale pouze vizualizovány.



Obr. 25: Vytváření prázdného AVI souboru pro ukládání obrazu

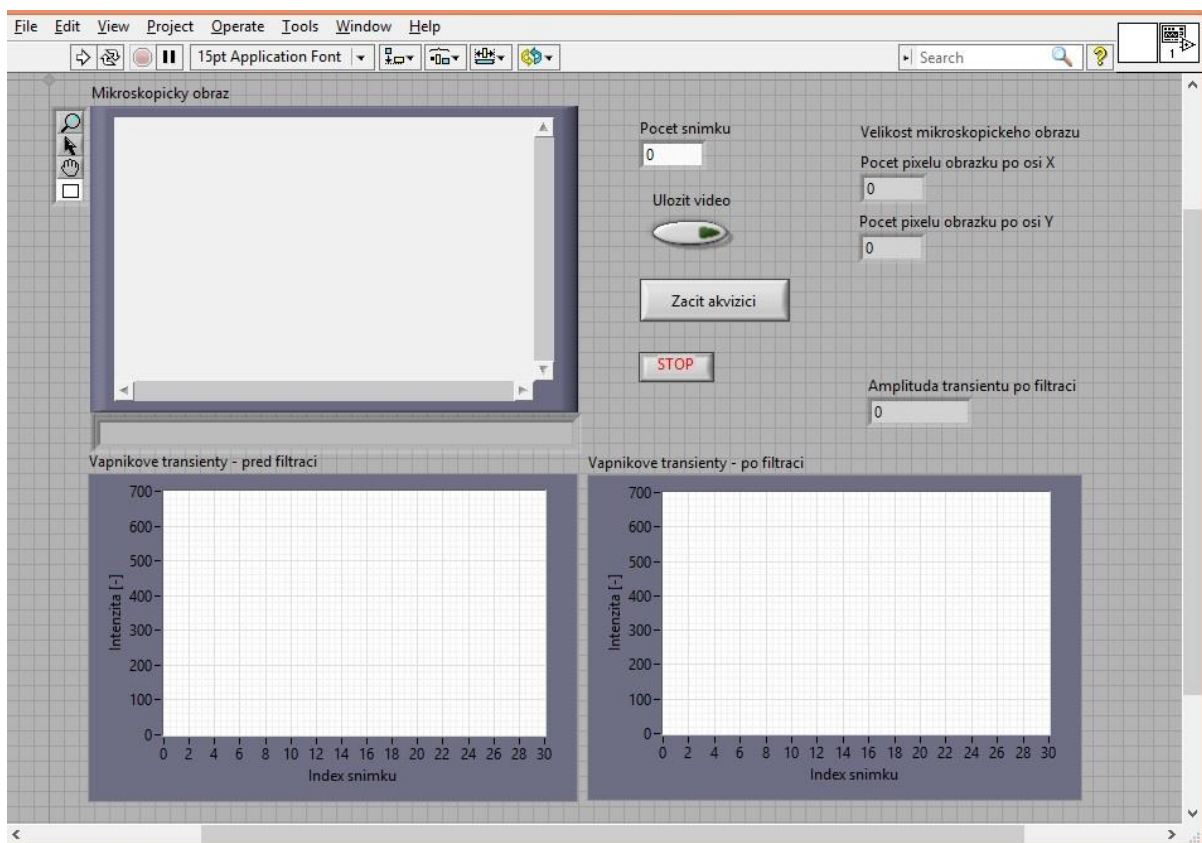
Obr. 26 demonstruje schéma zobrazení a vyhodnocení vstupních dat. Blok *Mikroskopický obraz* umožňuje on-line sledování záznamu z fluorescenčního mikroskopu. Vyhodnocení dat spočívá ve vizualizaci změn intenzity v obrazu. Výstupem programu jsou 2 grafy, které zobrazují změny intenzit (vápníkové transienty). První graf demonstruje data před filtrací, druhý graf po filtraci



Obr. 26: Blokové schéma zobrazení a vyhodnocení obrazových dat

4.4 Uživatelské rozhraní

Při spuštění programu se zobrazí uživatelské rozhraní, které umožní práci. Uživatel může nastavit počet snímků, které potřebuje pro zpracování, vytváření AVI souboru a vyhodnocení dat. Dále může nastavit možnost ukládání dat pomocí tlačítka *Uložit video*. Po spuštění programu může uživatel spustit akvizici tlačítkem *Začít akvizici*. Po krátké době se v okně *Mikroskopický obraz* začne zobrazovat sekvence snímků z fluorescenčního mikroskopu v on-line režimu. Zároveň se v dolní části uživatelského rozhraní začnou zobrazovat intenzitní grafy (vápníkové transienty) vlevo před filtrací a vpravo po filtraci filtrem (dolní propust, Butterworth). Nastavení filtru lze změnit v blokovém diagramu navrženého programu. Paralelně se zobrazením grafu dochází k výpočtu amplitudy grafů intenzit (měření peak-to-peak). Program běží, dokud není zpracován požadovaný počet snímků nebo není ukončen tlačítkem *STOP*. Obr. 27 představuje náhled uživatelského rozhraní programu.



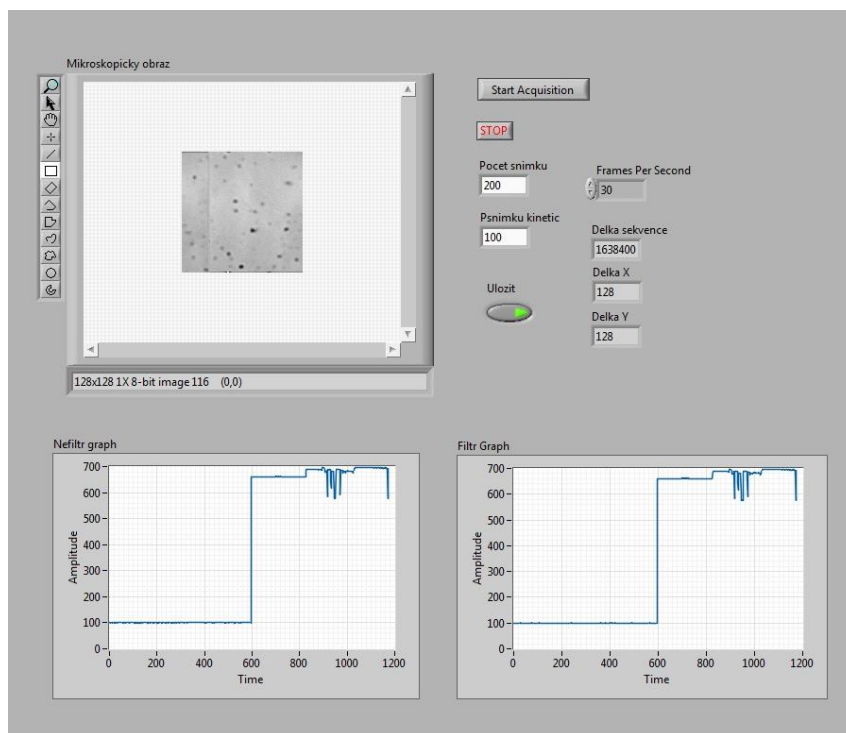
Obr. 27: Čelní panel navrženého programu

5 Diskuze o dosažených výsledcích

5.1 Možnosti a omezení navrženého řešení

Navržený program obsahuje základní prvky pro propojení kamery s fluorescenčním mikroskopem a programovacím prostředím LabVIEW. Program zobrazuje mikroskopický obraz a umožňuje jeho ukládání do AVI souboru. Dále je možné on-line sledování mikroskopického záznamu a vyhodnocení intenzity fluorescence při navázání fluorescenčního barviva na vápníkové ionty.

Stávající program lze rozšířit o výběr oblasti zájmu (ROI) v mikroskopickém obrazu a další bloky pro zlepšení morfologických vlastností získaného obrazu.



Obr. 28: Čelní panel programu v průběhu měření

ZÁVĚR

Měření koncentrace intracelulárního vápníku představuje velký prostor pro výzkum. Vytvoření neinvazivních metod měření koncentrace iontů vápníku našlo široké využití v oblasti medicíny. Regulace počtu iontů Ca^{2+} v živočišné buňce může snížit riziko výskytu epilepsie, diabetu a ischemických chorob srdce.

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat metody fluorescenčního měření koncentrace intracelulárního vápníku a také vytvořit odpovídající systém měření v programovacím prostředí LabVIEW. Práce obsahuje teoretický popis fluorescenční mikroskopie, metod měření a vyhodnocení koncentrace intracelulárního vápníku, porovnání vlastností různých fluorescenčních barviv, výhody jejich využití. Práce dále popisuje biologické minimum v oblasti akčních potenciálů živočišných buněk na příkladu kardiomyocytů.

Při zpracování diplomové práce jsem se hlouběji seznámila s programovacím prostředím LabVIEW a využitím knihoven Asdor SDK. Navržený program měření koncentrace intracelulárního vápníku obsahuje základní požadované prvky, chybí ale podrobnější zpracování výstupního obrazu (morfologické zpracování).

LITERATURA

- [1] LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publ., 2006, 954, ISBN-10: 0-387-31278-1.
- [2] RELF, G. CH. *Image Acquisition and Processing with LabVIEW*. CRC Press 2004, 244, ISBN 0-8493-1480-1
- [3] TAKAHASHI, A., CAMACHO, P., LECHLEITER, J. D., HERMAN, B. *Measurement of Intracellular Calcium, Physiological Reviews*, 1999, 79, 1090–1125
- [4] KRINKE, O , et al. Metody měření koncentrace Ca^{2+} iontů použitelné při studiu buněčné signalizace. *Chemické listy* [online]. April 2005, Vol.99, Issue 4, [cit. 2012-03-18]. Dostupné z WWW: <http://chemickelisty.cz/common/content-issue_4-volume_99-year_2005.html>. ISSN 1213-7103.
- [5] *Olympusmicro : Microscopy Resource Center* [online]. 2010 [cit. 2012-03-18]. Fluorescence Microscopy. Dostupné z WWW: <<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>>.
- [6] *Microscopyu : The source for microscopy education* [online]. 2010 [cit. 2012-03-18]. Fluorescence Microscopy. Dostupné z WWW: <<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>>.
- [7] *Thorlabs* [online]. 1999-2012 [cit. 2012-01-05]. Filters. Dostupné z WWW: <<http://www.thorlabs.de/>>.
- [8] *2.biomed.cas.czl : Vade-mecum add usum proprium dept. 331* [online]. únor 2001 [cit. 2012-01-05]. 15. Měření vnitrobuněčné koncentrace volných vápenatých iontů. Dostupné z WWW: <<http://www2.biomed.cas.cz/d331/vade/vapnik.html>>.
- [9] *Andor technology* [online]. 2011 [cit. 2011-04-20]. Dostupné z WWW: <www.andor.com>.
- [10] *psych.lf1.cuni.cz* [online]. únor 2001 [cit. 2012-01-05] Fluorofory v biomedicině Dostupné z WWW <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>>
- [11] *Invitrogen* [online]. 2010 [cit. 2011-01-05]. Fluo-3 Calcium Indicator. Dostupné z WWW: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/g-protein_coupled_html/cell-based-second-messenger-assays/Fluo-3-calcium-indicator.html>
- [12] FIŠAR, Z. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie. [online]. [cit. 2013-08-26]. Dostupné z WWW: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>>

- [13] JOSEPH, P.Y.K., GONG, Li, DARRYL, A. Auston *Methods in Cell Biology, Volume 99. Chapter 5- Practical Aspects of Measuring Intracellular Calcium Signals with Fluorescent Indicators*. Elsevier, 2010, str. 113-152, ISBN 978-0-12-374841-6
- [14] PLÁŠEK, J. Nové metody optické mikroskopie. [online]. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 41 (1996), No. 1, 1-24 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z WWW: <http://dml.cz/bitstream/handle/10338.dmlcz/139719/PokrokyMFA_41-1996-1_1.pdf>
- [15] *Světelná mikroskopie*. [online] 2011 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/7.%20Mikroskopie.pdf>>
- [16] SEHADOVÁ, H. Fluorescenční a konfokální mikroskopie. [online] 2011 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z WWW: <<http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>>
- [17] *Leica Microsystems* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Confocal mikroskope Leica TCS SP8 X. Dostupné z WWW: <<http://www.leica-microsystems.com/products/confocal-microscopes/leica-tcs-sp8-configurable-confocal/details/product/leica-tcs-sp8-x/>>
- [18] NOVOTNÁ, J. Minerály a stopové prvky. Vitamíny.. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál 2. Lékařské fakulty [online] 22.9.2009, poslední aktualizace 19.1.2014 [cit. 2014-05-06] Dostupné z WWW: <<http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=425>>.
- [19] BURTIS, Carl A, ASHWOOD, Edward R, TIETZ Norbert W. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999, 1917 p. ISBN 07-216-5610-2.
- [20] KONRÁDOVÁ, V., UHLÍK J., VAJNER L. Funkční histologie. 2. vyd. Jinočany: H, 2000, 291 s. ISBN 80-860-2280-3
- [21] The Molecular Probes® Handbook - 11th Edition [online]. Carlsbad, California: Invitrogen, September 14, 2010 [cit. 2014-02-05]. Chapter 19 Indicators for Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ and Other Metal Ions. Dostupné z WWW: <<http://www.invitrogen.com/content/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>>.
- [22] OSMANČÍK, P. EKG učebnice [online]. 2012 [cit. 2014-04-20]. ISBN 978-80-260-1763-9. Dostupné z WWW: <<http://www.ucebnice-ekg.cz/index.php/cz/1-1-0-0-cz-akcni-potencial/1-1-1-0-cz-akcni-potencial-kardiomyocytu.html>>
- [23] PHATAK, O. Cardiac Muscle Structure. In: [online]. [cit. 2014-05-22]. Dostupné z WWW: <<http://www.buzzle.com/articles/cardiac-muscle-structure.html>>
- [24] SINGAL, A., LAURITA, K. R.. Mapping action potentials and calcium transients simultaneously from the intact heart. In: [online]. American Journal of Physiology - Heart and

Circulatory Physiology, 2001, 280(5)H2053-H2060; [cit. 2014-04-23]. Dostupné z WWW:
<<http://ajpheart.physiology.org/content/280/5/H2053>>

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

SA uzel	Sinoatriální uzel
VI	Virtual Instrument (virtuální přístroj)
AVI	Audio Video Interleave

OBSAH PŘILOŽENÉHO CD

Program iXon_Labview_LV10. vi

Elena_Kormanovskaya_DP

Video kardiomyocyt_fluo4