

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



Zobrazování biochemických markerů na povrchu buňky

Bakalářská práce

Autor:	Veronika Talášková
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Studijní program:	B1407 – Chemie
Studijní obor:	Aplikovaná chemie
Forma studia:	Prezenční

Olomouc 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Václava Rance, Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v této práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Václavu Rancovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc během zpracovávání bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Katedře fyzikální chemie a Regionálnímu centru pokročilých technologií a materiálů za umožnění vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Bibliografické údaje

Autor:	Veronika Talášková
Název práce:	Zobrazování biochemických markerů na povrchu buňky
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2018

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou buněk za pomoci Ramanovy mikroskopie ve spojení s mikroskopií atomárních sil. Studium buněk a jejich povrchů je důležité pro pochopení buněčných mechanismů, které se odehrávají po vypuknutí onemocnění typu rakoviny. Mikroskopií atomárních sil byly zobrazeny povrchy buněk a jejich výškové profily a z těchto informací byly pozorovány rozdíly mezi zdravými a rakovinnými buňkami. Dále za pomoci Ramanovy spektroskopie byla naměřena spektra pro různá místa na zdravých buňkách. Z těchto spekter byly interpretovány typické pásy pro různé složky buňky, tzv. markery. Zřetelně byly pozorovány pásy pro proteiny a lipidy, o menší intenzitě také pro nukleové kyseliny. Tyto informace mohou být dále využity pro budoucí analýzu rakovinných buněk a pozorování změn v jejich struktuře.

Klíčová slova:	Ramanova spektroskopie, SERS, mikroskopie atomárních sil, markery, povrchy buněk
Počet stran:	43
Jazyk:	český

Bibliographical identification

Author:	Veronika Talášková
Title:	Imaging of biochemical markers on a cell surface
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	RNDr. Václav Ranc, Ph.D.
The year of presentation:	2018

Abstract

This bachelor thesis deals with cell analysis using the Raman and Atomic Force Microscopy. The study of cells and their surfaces is important for understanding cellular mechanisms that happen to appear after the disease such as cancer outbreak. The cell surfaces and their height profiles were measured by Atomic Force Microscope and differences between healthy and cancer cells were observed from this data. The Raman spectra on various places of a healthy cell were measured next. Typical bands which stand for different components of the cell were interpreted, the so-called markers. The bands of proteins and lipids were observed clearly, for nucleic acids with small intensity. This kind of information can be used later for further analysis of cancer cells and to observe changes in the structure between healthy and cancer cells.

Keywords:	Raman spectroscopy, SERS, atomic force microscopy, markers, cell surfaces
Number of pages:	43
Language:	Czech

Obsah

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Ramanova spektroskopie	9
2.1.1	Obecný princip	9
2.1.2	Instrumentace.....	10
2.1.3	Ramanské mapování a zobrazování	13
2.1.4	Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie.....	13
2.1.5	Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie.....	14
2.2	Mikroskopie atomárních sil	16
2.2.1	Princip metody.....	16
2.2.2	Režimy měření.....	18
2.2.3	Artefakty	19
2.3	Zobrazování buněk a jejich povrchů.....	20
2.3.1	Popis stavby buňky	20
2.3.2	Role SERS a AFM v analýze povrchu buňky	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Přístroje a software	26
3.2	Příprava buněk	26
3.3	Měření buněk	27
3.4	Výsledky a diskuze	27
3.4.1	Zobrazení buněk	27
3.4.2	Detekce markerů.....	30
4	ZÁVĚR.....	38
5	SUMMARY	39
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	40

1 ÚVOD

Buňka je nejmenší biologickou jednotkou všech živých organismů a k jejímu objevení došlo v 17. století paralelně s objevem světelného mikroskopu, díky kterému byly buňky pozorovány. O tři století později se pak začaly buňky zkoumat dalšími technikami. V začátcích se velice často pro jejich analýzu užíval elektronový mikroskop, při této analýze se ovšem daly pozorovat pouze buňky fixované. Ačkoliv bylo možné tímto způsobem získat data o struktuře buňky, její probíhající procesy se již takto analyzovat nedaly. Díky vývoji nových technologií a přístrojů bylo možné postupem času buňky pozorovat důkladnějšími metodami. Živé buňky se pořádně začaly pozorovat až ke konci 20. století, kdy se projevil dobrý potenciál hned několika technik. Pro tuto práci byly vybrány dvě – Ramanova spektroskopie a mikroskopie atomárních sil.¹

Zejména Ramanova spektroskopie (RS) je v tomto ohledu velice silný nástroj. Tato technika se řadí mezi molekulové spektroskopie a je tedy vhodná pro analýzu chemické struktury. Biologické molekuly ovšem v RS spektru vykazují slabý signál. Intenzivnější signál poskytují v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS). Výhodou je, že není třeba vzorky nějakým způsobem upravovat nebo značit. Kromě toho RS dokáže vzorky změřit i ve vodném prostředí (např. buňky v jejich fyziologickém roztoku) a za správného užívání je to nedestruktivní technika. Navzdory tomu RS oplývá několika nevýhodami. Zmíněný slabý signál biologických molekul může komplikovat také překrývání jednotlivých pásů nebo fluorescence.^{1,2}

Nedestruktivní technikou je také mikroskopie atomárních sil (AFM). Touto technikou je možné podobně jako u RS pozorovat biologické materiály v jejich přirozeném prostředí. AFM se řadí mezi metody souhrnně zvané mikroskopie s rastrovací sondou a jejich princip je založen na blízkém kontaktu sondy se vzorkem. Na základě toho je AFM schopné zobrazit topografie povrchů až na úroveň desítek nanometrů. Nevýhodou u AFM jsou artefakty neboli chyby měření, které nejčastěji vznikají kontaminací sondy z důvodu velice blízkého kontaktu se vzorkem. Zajímavostí je, že kromě toho, že AFM umožňuje buňky detailně zobrazovat, poskytuje také příležitost s těmito biologickými materiály manipulovat.^{3,4}

Analýza buněk našla své uplatnění především v medicíně, kde je pro výzkum nemocí klíčové pochopit buněčnou dynamiku. Především onemocnění typu rakoviny pozměňuje

strukturu buněk a jejich chování. Dnešní metody používané pro diagnostiku nemoci jsou omezovány převážně nedostačující citlivostí a onemocnění rakovinou se u člověka většinou odhalí až v pokročilejší fázi. Proto je nutné vyvinout novou techniku či způsob, jak odhalit počínající onemocnění včas. Následně by se mohlo předejít vyčerpávající léčbě a také léčbou způsobeným vedlejším účinkům. V této problematice by Ramanova spektroskopie mohla přispět k objasnění buněčných mechanismů, které se odehrávají po vypuknutí nemoci.⁵

Aktuálně je střed pozornosti u analýz buněk za pomoci RS zaměřen na hledání tzv. spektrálních markerů. Pojem marker zde označuje jeden až několik pásů, které se nacházejí ve spektru a potvrzují přítomnost určité molekuly. Pro získání tohoto typu informací je u buněk nutná stabilita, proto je třeba buňky před měřením zafixovat a vysušit. Vzhledem k typickým vibračním vazeb molekul v buňce je možné detekovat např. aminokyseliny, resp. proteiny, lipidy a nukleové kyseliny známé jako DNA a RNA.¹

Cílem této bakalářské práce je zaprvé zobrazit povrchy buněk zdravých a nemocných za pomoci AFM a porovnat je mezi sebou. Je všeobecně známo, že nemocné buňky mění svoje vlastnosti, a tento fakt by měl být upozorován. Druhým cílem této práce je naměřit spektra na různých místech zdravé buňky za využití RS a tato spektra za pomoci literatury interpretovat. Do dnešní doby již bylo objeveno několik markerů, které budou v naměřených datech hledány, a neznámé pásy budou diskutovány.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda, která k analýze vzorků využívá neelastického rozptylu, jinak zvaném také Ramanův jev. První zmínky o neelastickém rozptylu se objevily v roce 1923, ovšem první experimenty byly provedeny až o 5 let později. V původním pokusu C. V. Raman spolu s K. S. Krishnanem pozorovaly objekty za pomoci slunečního záření zaměřeného skrze optickou čočku. Za sledovaným objektem byla poté umístěna druhá čočka, která zachycovala záření s odlišnou vlnovou délkou, než byla původní (zachycovala tedy neelasticky rozptýlené záření) a za pomoci soustavy optických filtrů bylo nakonec možné toto záření potvrdit. Po C. V. Ramanovi byly následně technika i jev pojmenovány a v roce 1930 získal Nobelovu cenu za fyziku.^{1,6}

2.1.1 Obecný princip

Neelastický rozptyl vzniká díky interakci záření působícího na molekulu s jejími vibračními stavy. Z kvantové mechaniky je známo, že molekula vždy vibruje a pro popis tohoto děje se používá předloha harmonického oscilátoru, ve které jsou vzdálenosti vibračních hladin od sebe totožné. To neplatí o reálných vibracích, které přesněji popisuje anharmonický oscilátor. V anharmonickém modelu se vzdálenosti vibračních hladin od sebe zkracují. Energie pro základní vibrační stav je vyjádřena rovnicí č. 1:

$$E = \frac{1}{2} h\nu \quad (1)$$

kde h označuje Planckovu konstantu a ν značí frekvenci záření. Každá molekula má určitý počet vibračních módů. Pro lineární molekuly platí vztah $3N - 5$ a pro nelineární molekuly platí vztah $3N - 6$, kde N je číslo, které označuje počet atomů v molekule. Kromě toho, že molekula vibruje, je prokázáno, že také rotuje. Pro rotační pohyb molekul se používá předloha tuhého rotoru, molekula tedy rotuje jako tuhé těleso. Energie základní rotační hladiny se rovná 0 J . Jak pro vibrační, tak pro rotační děj platí výběrová pravidla. Tato pravidla říkají, že je dovolen přechod mezi jednotlivými hladinami jen v případě, kdy jsou splněny podmínky uvedené v rovnicích číslo 2 a 3:

$$\Delta n = \pm 1 \quad (2)$$

$$\Delta J = \pm 1 \quad (3)$$

kde n značí vibrační kvantové číslo, J značí rotační kvantové číslo. Právě intenzita těchto přechodů se měří buď infračervenou (IČ) anebo Ramanovou spektroskopií. V případě infračervené spektroskopie se měří změna dipólového momentu vazby a v případě Ramanovy spektroskopie se zaznamenává změna polarizovatelnosti vazby. Tyto dvě metody si jsou navzájem doplňkové. Například signál, který je slabý v IČ spektroskopii, může být naopak silný v Ramanově spektroskopii.⁶⁻⁹

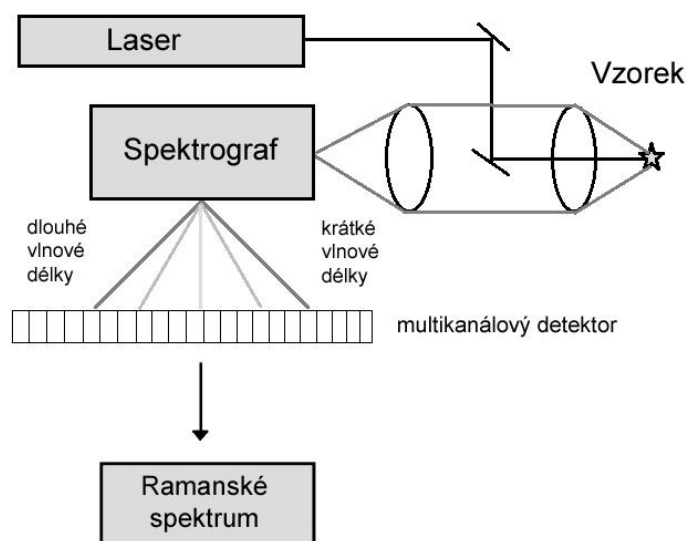
Většina molekul se při pokojové teplotě vyskytuje na vibrační hladině, na které využívá co nejméně energie. Při interakci elektronů molekuly s fotony monochromatického záření dochází ke dvěma typům rozptylu. Nejčastěji je záření rozptýleno Rayleighovým (elastickým) rozptylem, při kterém nedochází k žádné změně energie a vybuzené elektrony se ihned vrátí do výchozího energetického stavu. Rozptýlené záření má v tomto případě stejnou vlnovou délku jako původní. Méně často a méně intenzivněji dochází k Ramanově (neelastickému) rozptýlu, kdy je molekula v základním vibračním stavu a fotony je vyexcitována do vyššího stavu. Rozptýlené záření má pak odlišnou vlnovou délku. V momentě, kdy molekula získává energii, se jedná o Stokesův rozptyl. V případě, kdy se již molekula nachází v excitovaném stavu a svou energii předá fotonu, se kterým interaguje, se dostává do základního stavu a tomuto rozptýlu se říká anti-Stokesův. Ramanská spektra tvoří převážně Stokesův rozptyl vzhledem k tomu, že anti-Stokesův rozptyl je velice slabý.^{1,6,8}

2.1.2 Instrumentace

K měření vzorků a získávání jejich Ramanských spekter se používají dvě hlavní kategorie spektrometrů. Prvním z nich jsou disperzní spektrometry a druhým jsou spektrometry s Fourierovou transformací (FT). Oba tyto spektrometry mají jako hlavní části zdroj excitujícího záření, kterým je laser, dále komoru pro vzorky a sběrnou optiku. Pro disperzní spektrometry je to dále disperzní prvek a detektor, pro FT-spektrometry interferometr a detektor. Disperzní systém odděluje vlnové délky prostorově a skenují se jedním či mnoha paralelními detektory. Nedisperzní systémy neoddělují vlnové délky prostorově, ale obvykle jsou modulovány tak, aby každá vlnová délka měla svou charakteristickou modulaci frekvence. Spektrometry při sběru Ramanských spekter mohou být uspořádány ve dvou geometrických sestavách. Buď dochází ke sběru neelastického rozptylu pod úhlem 90° , anebo pod úhlem 180° . Častou součástí dnešních spektrometrů jsou také mikroskopy.^{6,8,10,11}

Jak již bylo zmíněno, jako zdroj monochromatického záření se používají lasery. Vhodný výběr laseru s určitou vlnovou délkou je jedním z nejdůležitějších rozhodnutí, protože má největší vliv na podobu výsledného spektra. Pro Ramanovu spektroskopii se využívají různé typy laserů a pokrývají tak viditelnou (VIS) oblast, blízkou červenou (NIR) oblast a také i ultrafialovou (UV) oblast, nejčastěji se však využívá záření z oblasti VIS až NIR. Problémem při použití vlnových délek v rozmezí zhruba 500–700 nm může být vznik fluorescence, protože v této oblasti může nastat více elektronických přechodů. Jedním z řešení pro odstranění fluorescence je např. použití laseru s delší vlnovou délkou (z oblasti NIR), nevýhoda pak spočívá v nižší intenzitě rozptylu záření. Z technologické stránky se lasery s vlnovou délkou menší než 900 nm častěji používají u disperzních spektrometrů, FT-spektrometry obvykle využívají lasery s vlnovou délkou vyšší jak 1 064 nm. Toto rozdělení je také kontrolováno s ohledem na poměr signál:šum (SNR – signal/noise ratio). Dnes se používají zejména lasery v kontinuální vlně (CW – continuous wave) na rozdíl od pulsních laserů, které byly používány dříve a dnes jsou pro analytické účely nedostačující. Nejpoužívanějšími lasery dnes jsou například lasery helium – neon o vlnové délce 632,8 nm, lasery iontů Ar^+ a Kr^+ o různých vlnových délkách ve VIS oblasti a laser Nd:YAG o vlnové délce 1 064 nm.^{6,8,11}

Vzorky se nejčastěji měří v uzavřené komoře, která bývá často uzpůsobena pro potřeby měření vzorků např. v různých ampulích či kyvetách. Se vzorky umístěnými v této komoře se dá manuálně pohybovat díky polohovacímu zařízení. Aby se dal efektivně zaznamenat Ramanský rozptyl, musí se nejdříve odstranit Rayleighův rozptyl, dále také záření pocházející ze zrcadlového odrazu na vzorku a další nechtěná záření. Tato záření jsou mnohem silnější než Ramanský rozptyl a mohou zaznamenané spektrum negativně ovlivňovat. K rozlišení těchto záření slouží soustava optických filtrů. Po filtraci nechtěných záření pokračuje signál do detektoru, v případě disperzního systému je to nejčastěji užívaný multikanálový detektor Charge-Coupled Device (CCD). Jedná se o malý kousek křemíkové plochy, která je rozdělena do mřížky na stejné části. Data naměřená na jednotlivých polích mřížky se postupně převádějí do počítače, a tak je možné od sebe odlišit jednotlivé frekvence a utvořit spektrum. V případě nedisperzního systému se používá interferometr a jednobaný detektor. Záznam z interferometru (interferogram) se potom převádí Fourierovou transformací na spektrum.^{6,10,11}



Obrázek č. 1 – Schéma disperzního Ramanova spektrometru, který využívá multikanálový detektor CCD.

Podoba vzniklých spekter je ovlivněna jak instrumentací Ramanova spektrometru, tak následným zpracováním získaných dat po jejich sběru. Spektrum tvoří souřadnice x – Ramanův posun (Raman shift), kde se jedná o rozdíl frekvencí prvotního záření a rozptýleného záření. Tyto posuny jsou vyjádřeny ve vlnočtech (jednotka cm^{-1} , reciproký centimetr) a uvádějí se nejčastěji v rozsahu $50\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$. Spektrum pak tvoří souřadnice y , kde se jedná o intenzitu prošlého záření. Ve spektru lze vidět Stokesovy pásy (jak bylo vysvětleno v kapitole 2.1.1) a podle poloh těchto pásů lze určit, o jakou vibraci molekul se jedná. K tomuto účelu slouží kombinované tabulky vibračních frekvencí, které se používají pro vyhodnocování i IČ spekter. V oblasti $4\,000\text{--}1\,500\text{ cm}^{-1}$ je možné detekovat a určit různé funkční skupiny. Oblast $1\,500\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ se nazývá oblast otisku palce (finger print region), která slouží k identifikaci různých molekul.^{6,8,12}

Pásy vyskytující se ve spektru je možné softwarově dále upravovat. Jedna z nejužitečnějších úprav je normalizace škály, po které je možné srovnávat spektra s různou intenzitou, protože jsou normalizovány na jednotný rozsah. Softwarově lze také odstranit nežádoucí fluorescenci, tato úprava ovšem může vést ke špatnému vyhodnocení např. čistoty vzorku. Spektrum lze také vyhladit za pomoci funkce vyhlazení a bývá tak učiněno nejčastěji za pomoci Savitzky-Golay algoritmu. Tato funkce může být nápomocná například v případě, pokud má spektrum nízký poměr signál:šum. Při správném užití funkce může být šum

zredukován. Ovšem při nesprávném užití (u velmi silného vyhlazení) může dojít i ke ztrátě pásů.^{6,13}

2.1.3 Ramanské mapování a zobrazování

Brzy bylo zpozorováno, že je-li Ramanův spektrometr sestaven v takové geometrické sestavě, aby docházelo ke sběru dat pod úhlem 180° , může být velice výhodně spojen s optickým mikroskopem. Díky tomu následně mohly být pozorovány velmi malé oblasti vzorku a na stejném místě také mohlo být ihned změřeno spektrum.¹¹

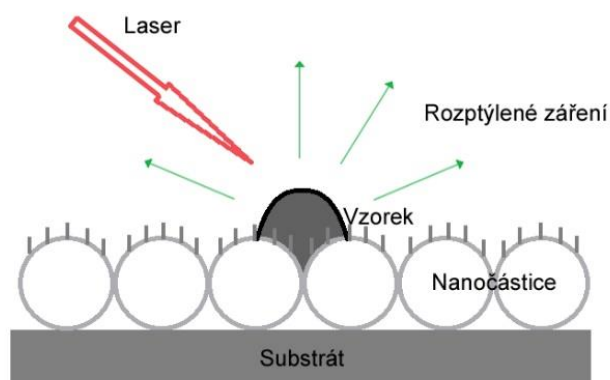
V případě, kdy je Ramanův spektrometr spojen s mikroskopem, se také otevírá možnost zmapovat a následně zobrazit povrch zkoumaného objektu. Mikroskopy jsou zde potřeba k zaostření a přesnému vymezení plochy na objektu, kterou si uživatel přeje zobrazit. Také je softwarově možné nastavit, v jakém rozlišení má následující mapa vzniknout. Samotné mapování pak probíhá tak, že se změří Ramanské spektrum v každém bodě požadované plochy. Množství těchto bodů je určeno právě v závislosti na volbě rozlišení. Díky polohovacímu zařízení je spektrometr sám schopen hýbat se vzorkem a měřit jednotlivé body na různých místech. Jakmile spektrometr dokončí měření, jsou všechna spektra spojena do jedné mapy. Tato mapa poté bývá počítačově vyhodnocena do barevného obrázku, jehož barvy a odstíny se odvíjejí od intenzit naměřených Ramanských spekter. Často užívaná je metoda univanační, kde uživatel může zvolit pás, který ho nejvíce zajímá, a dále pozorovat měnící se intenzitu tohoto pásu napříč celou mapou.^{1,6,8}

2.1.4 Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (zkráceně SERS z anglického Surface-Enhanced Raman Scattering) je technika, která využívá principu Ramanovy spektroskopie, a je zaměřená především na analýzu látek o nízké koncentraci. První zmínky o SERS se datují k roku 1974. Fleischmann s kolegy pozoroval molekuly pyridinu naadsorbované na hrubý povrch stříbrné elektrody ve vodném roztoku a všiml si, že spektrum pyridinu je daleko intenzivnější. Ačkoliv jeho původním záměrem byla výroba specifické sondy k pozorování elektrochemických dějů *in situ*, ve skutečnosti objevil SERS, i když si toho nebyl vědom. K objevu a vysvětlení této techniky došlo až o 3 roky později. Na začátku 80. let se pak SERS stal populární technikou napříč chemiky, fyziky a technickými inženýry.^{6,14,15}

U SERS dochází ke zintenzivnění signálu za pomoci kovových nanočástic (například stříbro, zlato, měď nebo lithium). Molekuly zkoumaného vzorku se naadsorbují na povrch

těchto nanočástic, které mohou být ve formě například elektrody či koloidu. Princip SERS lze vidět na obrázku č. 2. Ke zlepšení signálu přispívají dohromady dva mechanismy. Prvním z nich je elektromagnetický mechanismus, kde rezonanční excitace povrchových plasmonů, které se nacházejí v kovu, umožňuje zesílení signálu jak dopadajícího, tak rozptýleného záření. Druhý mechanismus je chemický, který díky silné interakci molekuly s povrchem zvyšuje polarizovatelnost molekuly. Bylo prokázáno, že elektromagnetický mechanismus poskytuje větší zintenzivnění signálu než chemický.^{6,14,16}



Obrázek č. 2 – Princip SERS. Naadsorbování vzorku na povrch nanočástic způsobí zesílení signálu.

Před samotným měřením je tedy nutné vzít v úvahu, který substrát je pro analýzu nejvhodnější. Bylo zjištěno, že pouze zdrsňené povrchy elektrod či nanočástic poskytují zvýšení intenzity signálu. Ačkoliv jsou takto připravené elektrody stabilní, tak pro analýzu biomateriálů poskytují slabší zintenzivnění než nanočástice. Možnou nevýhodou nanočástic spočívá v jejich nestabilitě a tím pádem k nereprodukovatelnosti naměřených výsledků. Po provedeném měření pak dochází k interpretaci SERS spekter, která se mohou lišit od Ramanských. Mohou nastat případy, kdy se v SERS spektru objeví pásy tam, kde v Ramanském spektru nebyly, a naopak pásy, které byly silné v Ramanském spektru, se v SERS spektru nemusí objevit vůbec. Tento jev je založen na chemických reakcích, které se dějí mezi substrátem a zkoumaným vzorkem a které mohou intenzitu záření ovlivňovat.^{6,14,16}

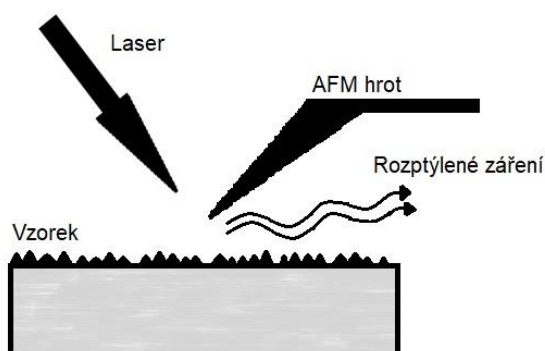
2.1.5 Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie

Hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (zkráceně TERS z anglického Tip-Enhanced Raman Spectroscopy) je technika využívající kombinace Ramanovy spektroskopie a mikroskopie atomárních sil (nebo rastrovací tunelovací mikroskopie). Ramanova spektroskopie na základě Ramanských spekter poskytuje chemickou informaci o vzorku, ovšem v případě zobrazování

povrchů se dostává v rámci prostorového rozlišení pouze na úroveň mikrometrů. Toto omezení je způsobeno šířkou světelného svazku. U použití mikroskopie atomárních sil je možné se při zobrazování povrchů dostat až na úroveň atomů, obvykle ale nedochází k dodání jednoznačných informací o chemickém složení vzorku. AFM se taktéž vyznačuje vlastností poskytnout 3D výškový profil zkoumaného vzorku. Výhodou spojení těchto dvou metod je tedy paralelní znalost chemického charakteru vzorku s jeho prostorovým rozlišením.^{17,18}

Teoretické pojetí metody TERS je založeno na studiích povrchových plasmonů, které říkají, že elektrické pole může být zesíleno za přítomnosti kovových nanočástic. Ve výsledku potom signál molekul nacházejících se v blízkosti těchto nanočástic roste přibližně se čtvrtou mocninou faktoru zvýšení intenzity elektrického pole. Dalším mechanismem pro zesílení intenzity pole je efekt hromosvodu. V momentě, kdy je polarizace dopadajícího záření rovnoběžná s osou hrotu, dochází k zesílení elektrického pole, a to je následně koncentrováno na špičce vrcholu. Oba zesilovací mechanismy mohou účinkovat vzájemně v závislosti na excitačních podmínkách a vhodně zvoleném hrotu.¹⁸

V případě TERS je realizováno několik experimentálních sestav spektrometrů. Všechny obsahují kovový hrot typický pro AFM a dále se liší podle optického uspořádání pro ozáření tohoto hrotu. K ozáření hrotu může být využito například inverzního mikroskopu, dále lze hrot ozářit bočně za pomoci objektivu pracujícím na dlouhou vzdálenost, nebo je také možné využít ozáření parabolickým zrcadlem. Dalším parametrem je určení materiálu ozařované části hrotu, který je klíčový pro získání silného signálu. Nejčastěji užívanými prvky jsou stříbro a zlato. Nevýhodou užití stříbra oproti zlatu je jeho poměrně rychlá degradace v důsledku oxidace při okolních podmínkách.¹⁸



Obrázek č. 3 – Schéma TERS mechanismu. Hrot se nachází v blízkosti vzorku a je ozářen laserem. V místech pod hrotem dochází k zesílení elektromagnetického pole a taktéž k vyzáření rozptýleného záření.

TERS dokáže zobrazovat povrchy až na úroveň desítek nanometrů a díky tomu je využíváno zejména v oblastech nanostruktur (např. zkoumání nanotrubiček a nanovláken) a biologických materiálů. Ve sféře biologických materiálů je tato metoda zatím jediná, která je schopná poskytnout chemickou analýzu na úrovni nanometrů, aniž by bylo využito značení molekul. Navíc je tato metoda schopná pracovat i se vzorkem v kapalném prostředí, což umožňuje analýzu živých organismů vyskytujících se v jejich přirozeném prostředí.^{17,18}

2.2 Mikroskopie atomárních sil

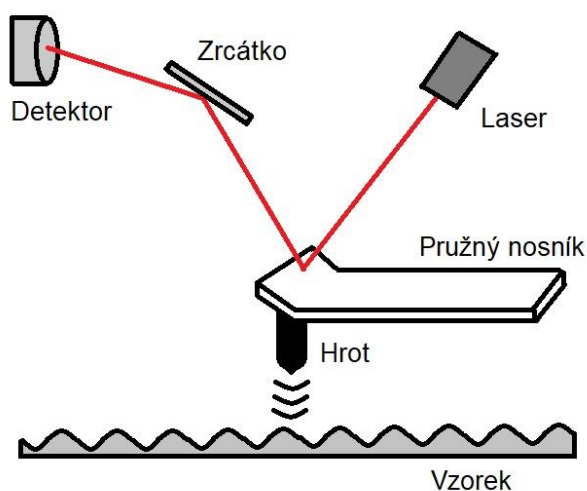
Mikroskopie atomárních sil (zkráceně AFM z anglického Atomic Force Microscopy) patří mezi skupinu metod, které se souhrnně nazývají mikroskopie s rastrovací sondou (zkráceně SPM z anglického Scanning Probe Microscopy). Tato skupina metod se specializuje na studium různých povrchů a jejich vlastností, a to díky velice blízkému kontaktu měřící sondy se vzorkem. SPM našly uplatnění nejen ve fyzice (např. studium práškových nanočástic), ale také v biologii při studiu povrchu živých buněk.^{19,20}

Již první návrh o sestavení mikroskopu založeném na principu přiblížení hrotu ke vzorku byl popsán v roce 1928 E. H. Syngem. Navrhl optické zobrazování ostrým skleněným hrotem, který byl umístěn v takové poloze, aby se světelné záření před průchodem vzorkem postranně nerozšířilo. Tím by následně došlo k odstranění závislosti na vlnové délce světla. Vzhledem k nemožnosti konstrukce tohoto přístroje se od návrhu upustilo až do roku 1972, kdy Russell Young zkonstruoval Topografiner. Tento přístroj pracuje v emisním režimu, a pro zlepšení jeho rozlišení bylo Youngem navrženo použití tunelového jevu. Roku 1981 proběhl úspěšný pokus uskutečněný vědci Gerd Binnigem a Heinrich Rohrerem a namísto pozorování emise bylo pozorováno tunelování mezi hrotem a vzorkem. Jejich přístroj pracoval ve vakuu a problém okolních vibrací vyřešili za pomoci magnetické levitace. Při tomto tlumení vibrací je využíváno magnetického polštáře, na kterém je přístroj udržován. Po necelých čtyřech letech experimentů se jim podařilo objevit rastrovací tunelovací mikroskopii, a za tento objev o rok později získali Nobelovu cenu za fyziku. Tento úspěch dal za vznik dalším technikám využívající rastrovací sondu, jednou z nejúspěšnějších se pak stal AFM.^{19–22}

2.2.1 Princip metody

Samotný povrch zkoumaného objektu sleduje hrot, který je umístěn na konci pružného nosníku. Tento hrot se pak dostává s objektem do těsné blízkosti. Tento princip lze vidět na obrázku č. 4. Následně při monitorování povrchu vzorku sonda generuje signál zpětné vazby. Z tohoto

signálu se zaznamenávají výchylky náklonu povrchu vzorku, a aby se tyto výchylky minimalizovaly, dochází podle potřeby k posunu vzorku nahoru a dolů. Samotné skenování vzorku probíhá řádkově za pomoci mechanického skenovacího systému, který bývá většinou piezoelektrický. K přepočítání naměřených dat na obrázek je pak potřeba zobrazovacího systému, kterým je počítač. Vzhledem k tomu, že je AFM velice citlivý přístroj, je třeba zajistit, aby vibrace z okolí (například z budovy) neovlivňovaly samotné měření. Za pomoci snímání Coulombových sil je také možné díky AFM nedestruktivně naměřit rozložení elektrického náboje na povrchu.^{19,20,23}



Obrázek č. 4 – Princip AFM

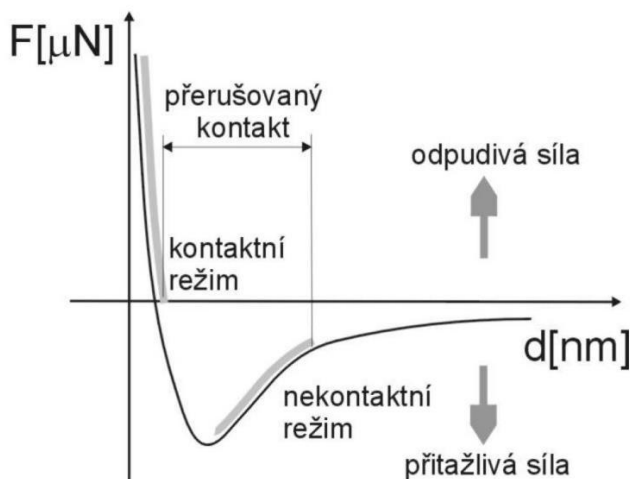
Tři nejdůležitější prvky AFM jsou piezoelektrické skenery, snímače sil a kontrola zpětné vazby. Piezoelektrické materiály jsou elektromechanickými převodníky, které převádějí elektrický potenciál na mechanický pohyb. Tyto materiály se vyskytují přirozeně např. ve formě krystalické, amorfni či dokonce polymerní. Pro účely AFM bývá však využito synteticky vytvořených keramických materiálů. Piezoelektrika pak slouží k pohybu hrotu nad povrchem vzorku. Síla vznikající mezi hrotem a vzorkem se měří snímači sil. Jakmile se hrot dostane do blízkého kontaktu se vzorkem, výstupní napětí ze snímače se zvýší. Tyto informace využívá dále kontrola zpětné vazby k nastavení konstantní vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem. Dojde-li například ke zvýšení síly, což může být způsobeno výskytu částice na povrchu vzorku, kontrola zpětné vazby způsobí, že se hrot s nosníkem oddálí od povrchu. V případě, kdy dojde k poklesu síly, se hrot ke vzorku přiblíží.²²

2.2.2 Režimy měření

Měření atomárních sil má tři základní režimy. Nejstarším z nich je kontaktní mód a stal se základem pro objevování dalších módů. V tomto režimu je hrot se vzorkem v neustálém kontaktu, respektive působí na sebe skrze odpuzivé síly. Tyto síly pak tlačí na nosník, aby došlo k jeho ohnutí od povrchu. Nosič má specifickou tuhost, a pokud je jeho tuhost menší než tuhost, která drží pohromadě atomy vzorku, tak dojde k jeho ohnutí. V kontaktním režimu lze měřit s konstantní výškou, kdy se poloha nosníku udržuje na konstantní hodnotě a měří se pouze jeho ohnutí v důsledku změny síly. Nebo lze také měřit s konstantní silou, kdy je nosník udržován ve stálém ohnutí. Zřídka se používá metoda kombinovaná. Nevýhodou u kontaktního módu je skutečnost, že může dojít k pozměnění či poničení jak hrotu, tak zkoumaného vzorku, a to v důsledku jejich velice blízkého kontaktu.^{22,23}

Tomuto riziku se dá vyhnout měřením v bezkontaktním módu. Dochází k zvětšení vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem do rozmezí 1–10 nm, a v tomto rozsahu na sebe působí skrze přitažlivé síly (magnetické, elektrostatické nebo van der Waalsovy), které na rozdíl od kontaktního módu ohýbají nosník směrem ke vzorku. Tato metoda je méně citlivá a vzniká šum způsobený právě zvětšenou vzdáleností mezi hrotem a vzorkem. Pro odstranění šumu se používá oscilační metoda. Nosič se v této metodě rozkmitává blízko své rezonanční frekvenci, ovšem s takovou amplitudou, aby nedošlo ke kontaktu se vzorkem. Následně se zaznamenává změna rezonanční frekvence v důsledku přibližování a oddalování hrotu ke vzorku.^{19,20,22}

Mód, který je kombinací dvou výše zmíněných, se nazývá poklepový, nebo také semikontaktní. Podobně jako v oscilační metodě v bezkontaktním módu dochází k rozkmitu nosníku. V tomto případě ale s upravenou amplitudou, aby se hrot při kmitání dostal i do oblasti odpuzivých sil. Vzhledem k tomu, že se hrot periodicky dostává do kontaktu se vzorkem, může dojít ke kontaminaci vzorku. Toto riziko je ovšem menší než u kontaktního režimu. Poklepový mód také přináší větší rozlišení než režimy zmíněné výše.^{20,22}



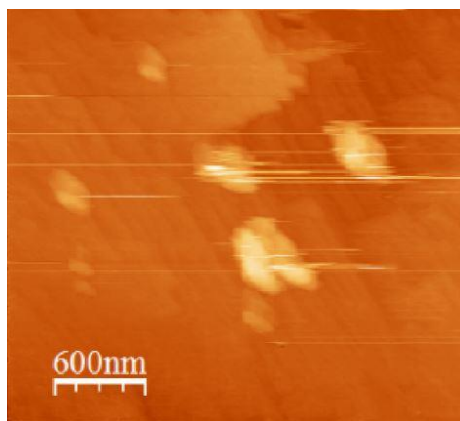
Obrázek č. 5 – Grafické znázornění měřících módů u AFM ²³

2.2.3 Artefakty

Každé měření a měřicí techniky jsou náchylné k chybám v obraze, které se nazývají artefakty. Některých artefaktů může být snadné si povšimnout, jiné je náročnější odhalit bez důkladné analýzy. Některým artefaktům se dá také snadno vyhnout, pokud uživatel ví, na co se zaměřit a co může být původcem chyby. Některým artefaktům se ovšem vyhnout nedá, a pokud uživatel ví, jak je rozpoznat, může se díky tomu vyhnout špatné interpretaci, což je velmi důležité. ²²

Nejčastější chyby měření jsou způsobeny sondou, která se používá ke skenování vzorku. Pro danou analýzu může být např. vybrána špatná sonda nebo je hrot již opotřebován. V druhém případě uživatel musí vědět na co se zaměřit, aby rozpoznal, kdy je nutné sondu vyměnit. Nejčastějšími jevy při špatné sondě, které nastávají, jsou např. když se objekt na povrchu jeví příliš velkým anebo malým, objevují se zvláštně tvarované objekty nebo se zobrazují opakující vzory na obrázku. Pro kontrolu použitelnosti sondy se používá vzorek, u kterého si je uživatel jistý topografií povrchu. Jakmile se tedy naměřená topografie kontrolního vzorku liší s jeho pravou topografií, je zjevné, že je třeba hrot vyměnit. ²²

Další častá chyba v měření spočívá v kontaminaci sondy. Skenováním některých vzorků (např. biologické či jiné měkké materiály) dochází k rychlejší kontaminaci než u jiných, a poté nastává degradace obrazu. Méně často dochází k rozbití sondy, ale stává se tak převážně v momentě, kdy se sonda náhodně dotkne oblasti vzorku, který je mimo kontrolu zpětné vazby. V důsledku těchto chyb dochází na obrázku k zobrazování objektů s podivnými tvary či k opakujícím se vzorům. Kontaminaci lze obvykle zpozorovat zaostřením mikroskopu na hrot. ²²



Obrázek č. 6 – Obrázek zkoumaných krystalků fluoridu lithného. Artefakt je způsoben kontaminací sondy. ²⁴

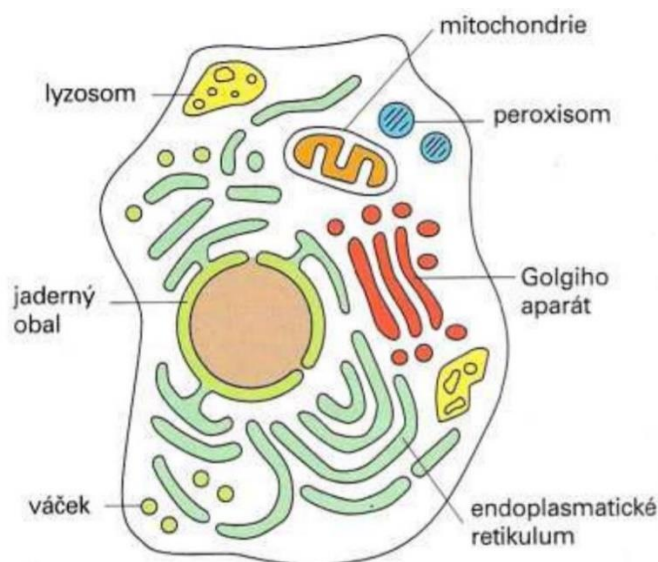
2.3 Zobrazování buněk a jejich povrchů

Úplně první pozorování buněk provedl v 1665 Robert Hooke. Za pomoci světelného mikroskopu pozoroval kus korku a na něm spatřil buněčné stěny, které zůstaly po odumření živých buněk, které se nacházely uvnitř. Mikroskop byl následující roky vzácný nástroj, avšak v 19. století se světelný mikroskop začal široce používat i k pozorování živých buněk. Pozorovat, a hlavně rozlišit, vnitřní strukturu buňky je těžké, protože její části jsou bezbarvé i průhledné. Části buňky se tedy po obarvení fluorescenčním barvivem začaly pozorovat fluorescenčním mikroskopem. Tento mikroskop se od světelného liší tím, že vstupující světlo prochází dvěma filtry. První filtr propouští pouze světlo o takové vlnové délce, které excituje fluorescenční barviva. Druhý filtr potom propouští pouze světlo vzniklé fluorescencí barviva. Pro získání detailnějšího obrazu buněk je již nelze pozorovat jako živé a pro větší rozlišení se začalo využívat elektronových mikroskopů. Jedním z těchto mikroskopů je transmisní elektronový mikroskop (TEM), který namísto světelného paprsku využívá proudy elektronů a namísto optických čoček využívá magnetických vinutí. Druhý z těchto mikroskopů je rastrovací elektronový mikroskop (SEM) a používá se pro znázorňování povrchů buněk a k tvorbě jejich 3D obrazů. Dnes se používá více technik pro zobrazování živých i fixovaných buněk a jejich povrchů. Dvě vybrané techniky, SERS a AFM, budou detailněji probrány v rámci této problematiky v kapitole 2.3.2. ^{1,25,26}

2.3.1 Popis stavby buňky

Buňka je základní stavební a funkční jednotka všech živých organismů a tyto organismy podle stavby jejich buněk dělíme na dva druhy – prokaryota a eukaryota. Každá buňka má svůj vlastní

genetický a metabolický systém, který dovoluje vytvářet a dále zpracovávat energii. Jak prokaryotní, tak eukaryotní buňky jsou ohraničené cytoplazmatickou membránou, která propouští pouze specifické látky a jinak buňku od okolí izoluje. Buňky prokaryot na rozdíl od eukaryot neobsahují jádro, proto je jejich genetická informace v podobě jedné molekuly DNA (deoxyribonukleová kyselina) volně umístěna v buňce. Většina prokaryot žije jako jednobuněčný organismus, někdy ovšem tvoří vícebuněčná uskupení. Eukaryotní buňky tvoří strukturu daleko složitějších organismů jako jsou rostliny, houby a živočichové. Vzhledem k tomu, že se tato bakalářská práce zabývá analýzou lidských buněk, bude zbytek kapitoly pojednávat pouze o popisu stavby živočišné buňky. Nákres této buňky představuje obrázek č. 7.^{26,27}



Obrázek č. 7 – Zjednodušený obrázek, který popisuje stavbu eukaryotické buňky.²⁶

Již zmiňované jádro je jednou z nejdůležitějších a největších organel eukaryotické buňky a je ohraničené dvojitou jadernou membránou s póry pro kontakt s okolím. Vnitřní prostor jádra je vyplněn polotekutou hmotou zvanou karyoplazma. Každá jedna molekula DNA, která je uložena v jádře, se nazývá chromozom. Ke tvorbě chromozomů dochází v jadérkách, které v buňce může být jedno, anebo několik. Další klíčovou složkou buňky jsou mitochondrie. Obsahují svou vlastní DNA a množí se dělením. Podobně jako jádro jsou tvořeny dvěma membránami s tím rozdílem, že vnitřní membrána je zprohýbaná. Je vyplněna hmotou zvanou matrix a vnitřní záhyby membrány směřující dovnitř mitochondrie se nazývají kristy. Na kristách probíhá buněčné dýchání, které je hlavním zdrojem energie ATP (adenosintrifosfát) pro všechny eukaryotické buňky. Oproti mitochondriím a jádru jsou další organely vyskytující

se v jádře ohraničené pouze jedinou membránou. Každá organela má svou vlastní funkci, u které většinou bývá nutný přesun různých surovin a produktů z jiných organel.^{25–27}

Na obal jádra navazují membrány endoplazmatického retikula (ER), které tvoří síť kanálků a váčků. Je místem vzniku látek a jejich transportu po buňce i z buňky ven díky tomu, že je spojeno s cytoplazmatickou membránou. Drsné ER má na některých svých membránách připojené ribozomy a syntetizují se zde bílkoviny. Hladké ER ribozomy neobsahuje a dochází zde k syntéze glykolipidů. Ribozomy se mohou vyskytovat buď připojené na ER, anebo volně. Obsahují ribozomovou RNA (ribonukleová kyselina) a slouží k tvorbě bílkovin. Na ER navazuje Golgiho aparát, který tvoří soustava dutinek ohraničených membránou. V těchto dutinkách probíhají biochemické reakce látek pocházejících z ER a produkty těchto reakcí směřují z buněk ven. V živočišných buňkách se nachází také lysozomy, které obsahují trávicí enzymy a probíhá v nich vnitrobuněčné trávení. Malé váčky s názvem peroxisomy chrání buňky při odbourávání nebezpečného peroxidu vodíku.^{25–27}

Všechny tyto organely se v buňce nacházejí v cytosolu, který připomíná gelovou hmotu. Tuto hmotu tvoří spousta malých i velkých molekul nacházející se blízko sobě. V cytosolu probíhá spousta chemických reakcí a dochází zde také k syntéze bílkovin. Strukturu buňce udává cytoskeletární systém (cytoskelet), což je síť bílkovinných vláken (mikrofilament) a trubiček (mikrotubulů). Buňku zpevňuje a umožňuje pohyb struktur uvnitř buňky. V buňce probíhá neustálá výměna látek, především mezi ER, Golgiho aparátem, lysozomy a vnějším prostředím buňky.^{26,27}

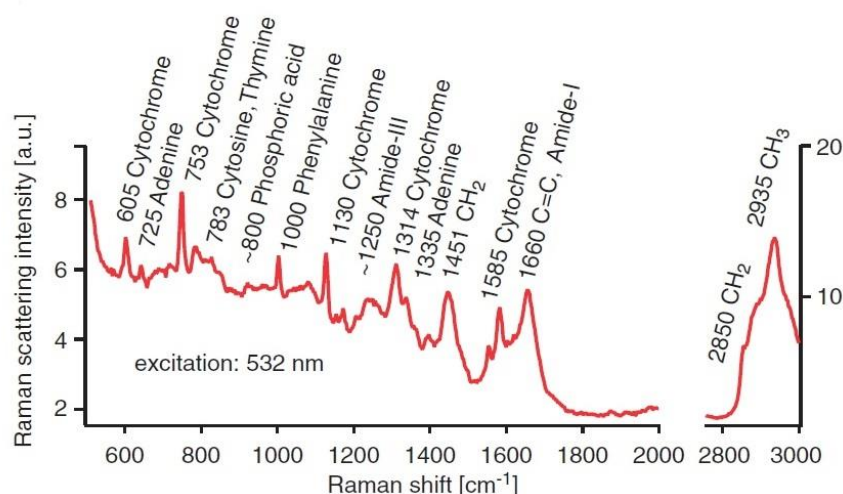
2.3.2 Role SERS a AFM v analýze povrchu buňky

Díky prvnímu konfokálnímu mikroskopu, který byl popsán v roce 1990, bylo možné následně zobrazit a studovat jednotlivé buňky ve vysokém prostorovém rozlišení. Konfokální mikroskop má v porovnání s optickým mikroskopem další clonu, která se nazývá konfokální otvor, a má za efekt snížení hloubky ostrosti. Ve chvíli, kdy došlo ke spojení konfokálního mikroskopu s Ramanovou spektroskopií, začala nabírat analýza buněk nový směr. Od roku 1990 vzniklo mnoho studií zabývajících se mapováním buněk právě za pomoci Ramanovy spektroskopie. Přibližně od toho samého roku se začal projevovat velký potenciál využití v biologii také u AFM. Společně jsou to nedestruktivní techniky, což znamená, že v případě vhodného zacházení nedochází k poničení analyzovaného vzorku. Další z jejich předností je možnost pozorování žijících buněk v jejich fyziologických podmínkách. Buňky se často uchovávají

v tekutině, která má určitou teplotu a obsahuje životně důležité soli. V tomto případě je možné pozorovat jak samotné povrchy buněk, tak především jejich chování a probíhající procesy s časem. Pro získání detailnějšího rozlišení jejich povrchů již nelze buňky pozorovat živé a dochází k jejich přenosu na substrát, vysušení a fixaci. Zda je vhodné pozorovat buňky živé či fixované záleží na typu informací, které je žádáno získat. Spojením obou těchto technik, SERS a AFM, se získává hrotem zesílená Ramanova spektroskopie (TERS), která již byla popsána v kapitole 2.1.5. Oproti jiným technikám je zde možné identifikovat sloučeniny na základě jejich spektroskopického otisku prstu a zároveň poskytnout prostorové rozlišení vzorku až na rozměr desítek nanometrů. Takového rozlišení je možné dosáhnout díky SERS-aktivní kovové funkci, která je umístěna na vrcholu AFM hrotu. TERS ovšem není předmětem experimentální části této bakalářské práce, proto nebude nadále diskutován.^{1–3,18,22,28,29}

Interpretace spekter buněk v případě Ramanovy spektroskopie je o něco složitější, protože tato spektra mohou být velice komplexní, a tím pádem může docházet k překryvům pásů v důsledku složitých struktur. Specifické molekuly a s tím spojené organely v buňce je možné určit právě za pomoci těchto pásů. V několika studiích byly požadované molekuly tzv. označené, aby bylo možné tyto malé molekuly lépe studovat. Označování molekul v Ramanově spektroskopii je v angličtině známo jako Raman Tags a bývá obvykle provedeno funkčními skupinami jako jsou například alkyny či azidy. Je to z toho důvodu, že tyto skupiny produkují signál v oblasti mezi 1 800 a 2 800 cm^{-1} , kde naopak biologické materiály signál neprodukují, proto jsou označené molekuly ve spektru lépe čitelné.^{2,16,30}

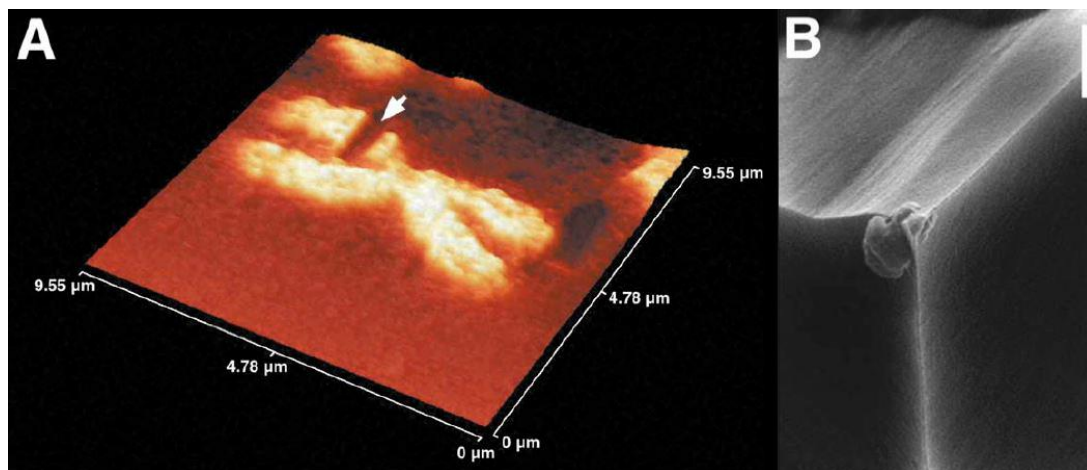
Zobrazování buněk se ovšem dá provádět i bez označování. Při použití laseru vyzařující vlnovou délku 532 nm je na základě literatury známo z Ramanova spektra několik typických pásů, které slouží k identifikaci různých organel v buňce, jinak řečeno plní funkci markerů. Jedním z nich je pás na 750 cm^{-1} , který je přiřazen vibračnímu módu pyrrolu. Pyrrol se nachází ve struktuře cytochromu c, který hraje výraznou roli při produkci ATP. Produkce ATP probíhá v mitochondriích, proto je zjevné, že se bude jednat právě o mitochondrie. Pás na 1 689 cm^{-1} je typický pro funkční skupinu $\text{C}=\text{O}$, která je součástí peptidové vazby. Peptidové vazby tvoří bílkoviny, bude se tedy jednat o bílkovinnou složku buňky. Další známý pás se nachází v oblasti 2 855 cm^{-1} , který je přiřazen symetrické vibraci skupiny CH_2 . Tato skupina je bohatě zastoupena ve fosfolipidech, které tvoří buněčnou membránu.^{1,2,5,30}



Obrázek č. 8 – Ukázka Ramanova spektra na buňce naměřeného při 532 nm a následného vyhodnocení jednotlivých pásů. Lze pozorovat zmíněný pás na 750 cm^{-1} pro pyrrol, dále typický pás na 1 000 cm^{-1} pro fenylalanin, nebo také pás na 1 660 cm^{-1} typický pro amid I. ³⁰

V případě měření za pomoci AFM je nejprve třeba rozhodnout, zda se zkoumané buňky budou analyzovat dotykovým či bezdotykovým módem. Nejčastěji je volen bezdotykový mód (konkrétněji semikontaktní), kde je riziko poničení vzorku malé. Kontaktním módem se riskuje poničení vzorku, navzdory tomu existují studie věnující se analýze buněk kontaktním módem například za využití malých sil (20–50 pN, což je o dva řády níže, než se obvykle používá pro zobrazování buněk). ^{28,31}

Měří-li se vysušené a fixované buňky, je získán obrázek s daleko větším rozlišením než v případě měření živých buněk. Většina studií vypracována na živých buňkách se soustředí zejména na analýzu interakcí mezi hrotem a vzorkem než na samotné zobrazování povrchů. Interakce mezi hrotem a vzorkem se popisují křivkami, které určují poměr vzdálenosti ku síle. Tyto získané křivky pak mohou být dále využity ke zkoumání různých fyzikálních vlastností. V případě AFM je možné vzorky nejen zobrazovat, ale také s nimi manipulovat. Díky tomu může docházet k modifikaci biologických materiálů od celých buněk po úroveň samotných molekul. První taková manipulace byla provedena v roce 1992 na genetickém materiálu. Konkrétněji bylo provedeno vyjmutí genetické části chromozomu. Tato část pak byla zachycena na hrotu, kterým byla tato činnost provedena. ^{3,22,28}



Obrázek č. 9 – (A) Ukázka zobrazování topografie povrchu a manipulace s chromozomem. Šipka ukazuje místo na chromozomu, kde došlo k vyjmutí genetické části. (B) Zachycená genetická část na hrotu. ³

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a software

Měření experimentální části této práce bylo provedeno v laboratoři Regionálního centra pokročilých technologií a materiálů v Olomouci. K získání výsledků bylo využito dvou přístrojů. Prvním z nich byl DXR Raman Microscope (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), který byl použit k získání Ramanských spekter. K jeho ovládání slouží software Omnic (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), ve kterém následně byla naměřená data zpracována. Spektrometr bylo nutné před každým měřením zkalibrovat na vzorek polystyrenu. Po zaostření na tento vzorek byla kalibrace softwarem Omnic provedena automaticky. Druhý z přístrojů byl NTEGRA Spectra (NT-MDT, Rusko), který se skládá z optického mikroskopu, mikroskopu atomárních sil a Ramanova spektrometru. U tohoto přístroje byla využita mikroskopie atomárních sil pro měření topografie povrchu a Ramanův spektrometr pro mapování povrchu. K ovládání tohoto přístroje slouží software Nova Px (NT-MDT, Rusko), zpracování výsledků bylo provedeno za pomoci software Gwyddion (volně dostupný na gwyddion.net). Veškeré grafy byly dále zpracovány do své finální podoby softwarem Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

3.2 Příprava buněk

K měření byly použity jednojaderné lidské buňky, které byly izolovány z krve metodou osmotické lýzy za využití hypotonického tlumivého roztoku. Tento tlumivý roztok obsahoval 1,55-M NH_4Cl , 0,1-M NH_4HCO_3 a 1-mM kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Pro porovnání topografie povrchu byly změřeny buňky zdravé i buňky rakoviny prsu pocházející z buněčné linie BT 549. Tato linie byla zakoupena z laboratoří Charler River (Wilmington, MA, USA) a udržována v roztoku DMEM/RPMI 1640. V tomto roztoku bylo obsaženo $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy, $100 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ penicillinu, $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptomycinu a 10% plodového telecího séra. Jednojaderné buňky i buňky BT 549 byly připraveny do směsi se solným roztokem tlumeným fosfátem o poměru 1:1. Následně byly tyto roztoky vloženy do centrifugační komory a centrifuga byla spuštěna na 500 otáček za minutu po dobu 5 minut. Výsledný cytospin nacházející se na sklíčku byl poté vysušen. Připravené cytospiny na sklíčku měly rozměry $1 \times 1 \text{ mm}$ a obsahovaly 40 000 buněk.

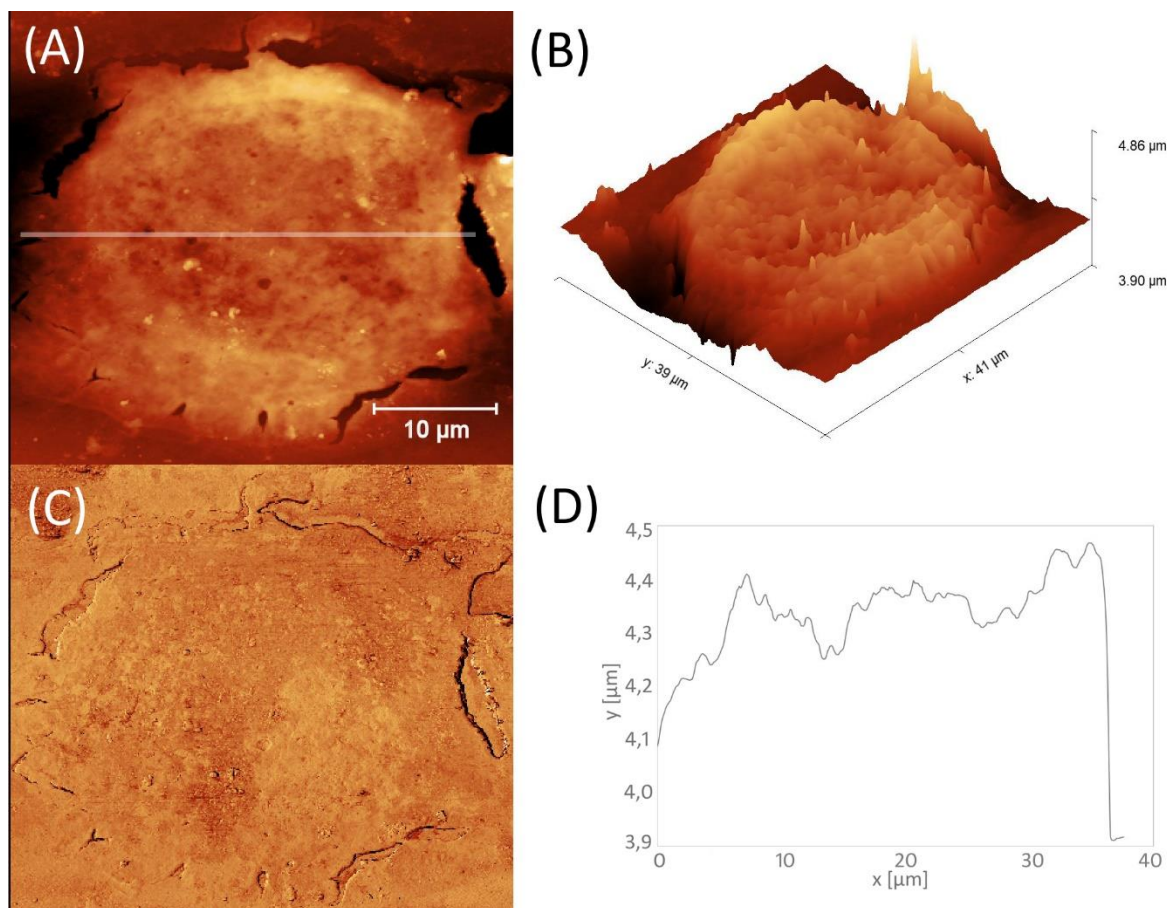
3.3 Měření buněk

Pro měření buněk byly jako substrát vybrány nanočástice stříbra pro jejich vlastnost zesílení intenzity signálu vzorku. Jednalo se o substrát SERStrate – silver od společnosti Silmeco (Dánsko). Tyto nanočástice byly dále umístěny na povrch slídy. Po přenesení vzorku buněk na tento substrát byl vzorek vysušen na vzduchu, a poté umístěn buďto do komory mikroskopu atomárních sil, nebo do komory Ramanova spektrometru. V případě AFM probíhalo měření v semikontaktním módu. V případě Ramanského mapování byl použit laser o excitaci 532 nm s časem expozice 1 s a výkon laseru byl 5 mW. V případě měření Ramanských spekter byl použit laser o excitaci 633 nm s časem expozice 3 s a výkon laseru byl 6 mW. Počet snímků, ze kterých vzniklo jedno spektrum, bylo 500.

3.4 Výsledky a diskuze

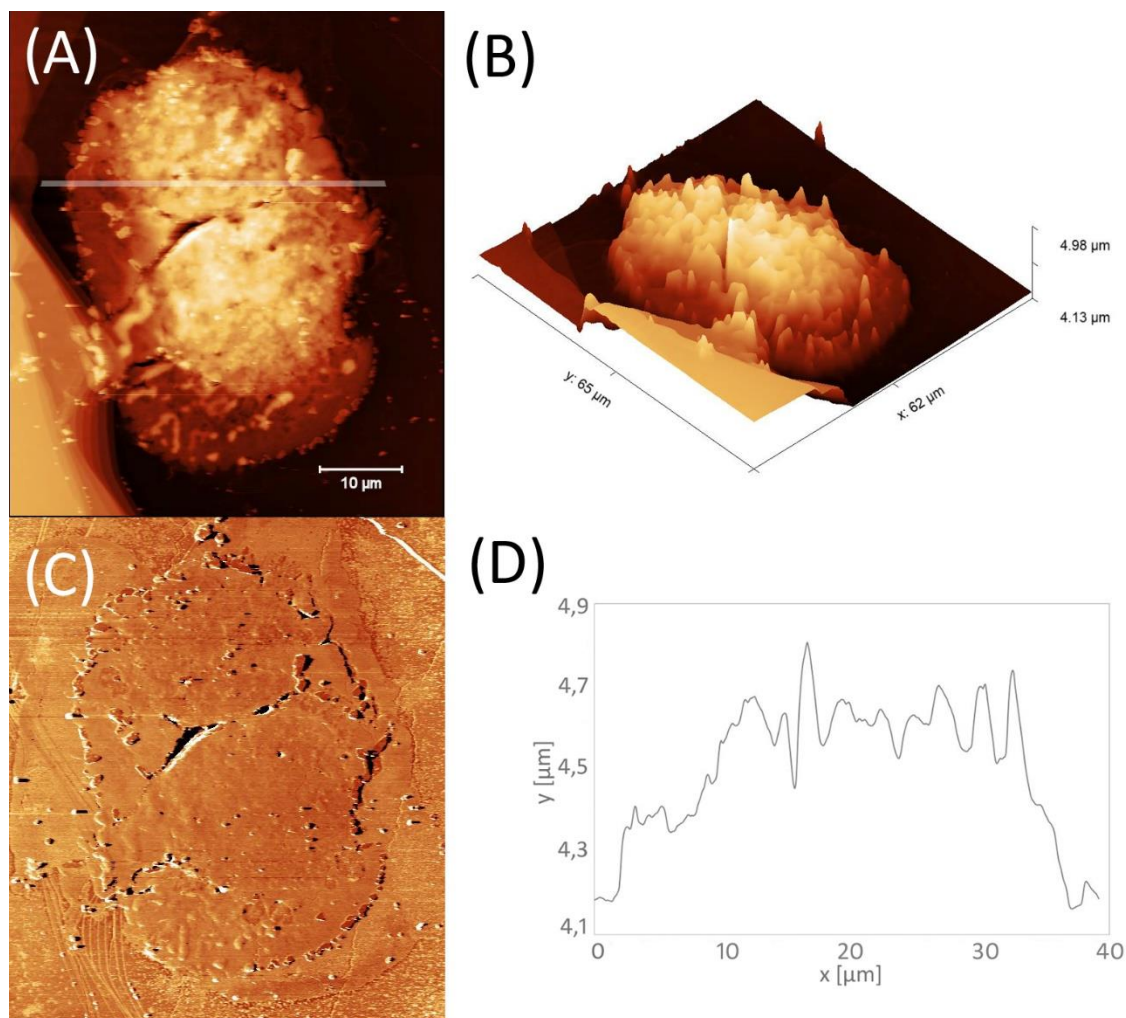
3.4.1 Zobrazení buněk

Nejprve byly za pomoci AFM zobrazeny topografie povrchů buněk zdravých a buněk rakoviny prsu. Na obrázku č. 10 se nachází obraz zdravé buňky, na obrázku č. 11 obraz dvou buněk rakoviny prsu vedle sebe. V obou případech jsou buňky ze všech stran obklopené usušenou vrstvou fyziologického roztoku, ve kterém se nacházely. Taktéž je vzhledem k různě barevné intenzitě patrné, že jsou povrchy buněk velmi různorodé. Na obrázcích B je možné vidět 3D topografie povrchů, které zlepšují viditelnost této variability v prostoru. Na obrázcích C, které označují naměřené fáze povrchů, lze vidět kromě různorodosti povrchu také i jasné ohraničení mezi zbytky fyziologického roztoku a substrátem. V případě dvou nemocných buněk lze jemně vidět jejich hranice v místech, kde se dotýkají. Obrázek D představuje graf znázorňující výškový profil buňky podél linie, která je vyznačená v obrázku A.



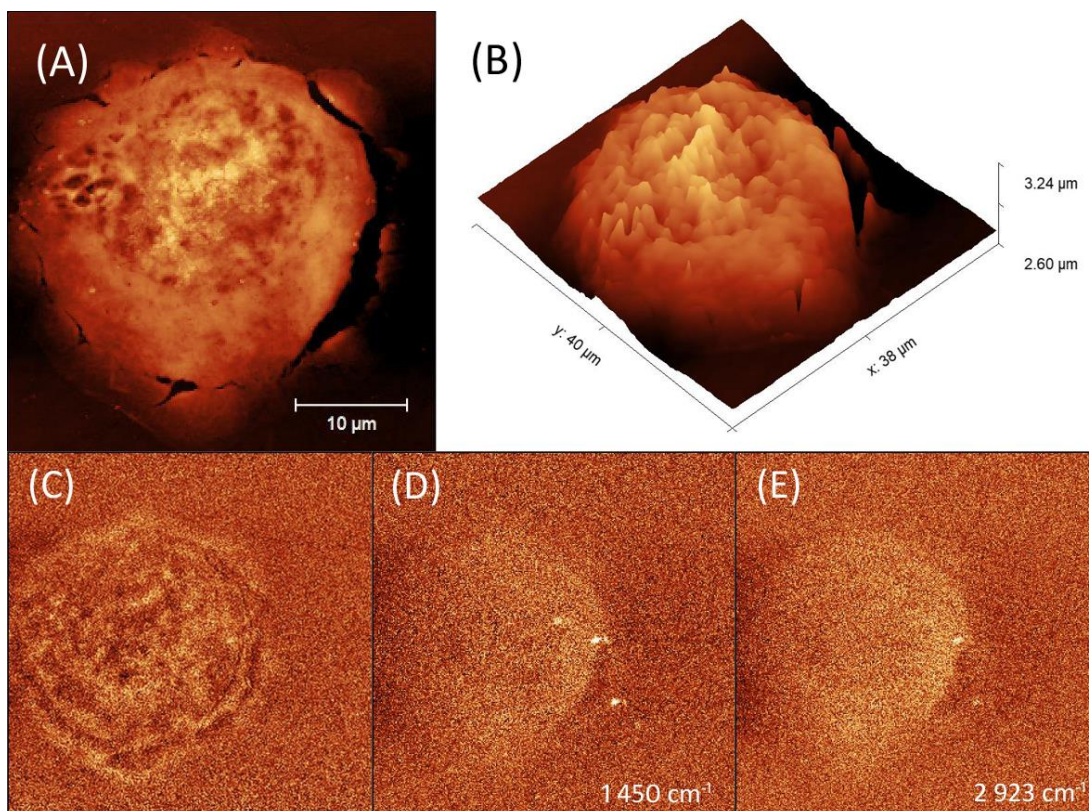
Obrázek č. 10 – Zobrazení zdravé jednojaderné lidské buňky za využití AFM. (A) Topografie povrchu buňky. (B) 3D topografie. (C) Zobrazení fáze. (D) Výškový profil, který prochází vyznačenou čarou v obrázku A.

Oba dva druhy buněk vykazují oválný typ tvaru, ovšem nemocné buňky jsou v porovnání se zdravou zhruba o třetinu menší. Naměřené nemocné buňky mají na šířku průměrně kolem 20 μm , zatímco zdravá buňka měří kolem 30 μm . Při pohledu na obě buňky lze zpozorovat rozdíl především v jejich površích. Zdravá buňka vykazuje po jejích stranách mírné zvýšení výškového profilu, zatímco uprostřed je profil nižší. Graf vyznačené linie nevykazuje žádné skoky nebo jiné nerovnosti povrchu, průměrná výška zdravé buňky činí 0,2–0,3 μm . Výška buňky zůstává víceméně konstantní v porovnání s buňkou rakoviny prsu, která projevuje odlišné vlastnosti. Její výškový profil je uprostřed nejvyšší a po stranách se snižuje. Velkou nerovnost jejího povrchu také projevuje graf vyznačené linie, nerovnost lze vidět i na obrázku fáze. Průměrná výška nemocných buněk je 0,4 μm . Rakovinné buňky mají oproti zdravým buňkám pozměněnou strukturu a největší změnou prochází jádro, které se zvětšuje.²⁵ Silnou nerovnost povrchu a větší výšku nemocných buněk může způsobovat právě deformovanost jádra.



Obrázek č. 11 – Zobrazení buněk rakoviny prsu za využití AFM. (A) Topografie povrchu buněk. (B) 3D topografie. (C) Zobrazení fáze. (D) Výškový profil, který prochází vyznačenou čarou v obrázku A.

Pro zobrazení Ramanské mapy byla vybrána zdravá buňka a na obrázku č. 12 lze vidět naměřená data. Obrázek A představuje topografii povrchu, obrázek B zobrazuje 3D topografii povrchu. Na obrázku C je možné vidět mapu buňky sestavenou z Ramanských spekter. Obrázek D je vytvořen ze spekter, které vykazovaly signál při $1\,450\text{ cm}^{-1}$, obrázek E při signálu $2\,923\text{ cm}^{-1}$. Hodnota kolem $2\,930\text{ cm}^{-1}$ představuje vibrační pás pro vazbu C–H, zde typický pro lipidy. Hodnoty kolem $1\,450\text{ cm}^{-1}$ představují vibrační pás též pro vazbu C–H, o této frekvenci je ale typická pro aminokyseliny. Při porovnání obrázku D a E lze vidět, že intenzita spekter o frekvenci $2\,923\text{ cm}^{-1}$ převažuje. Buňka tedy bude obsahovat více lipidů (součást fosfolipidové membrány), které jsou patrné spíše na okraji buňky, a dále aminokyseliny a enzymy.^{30,32}

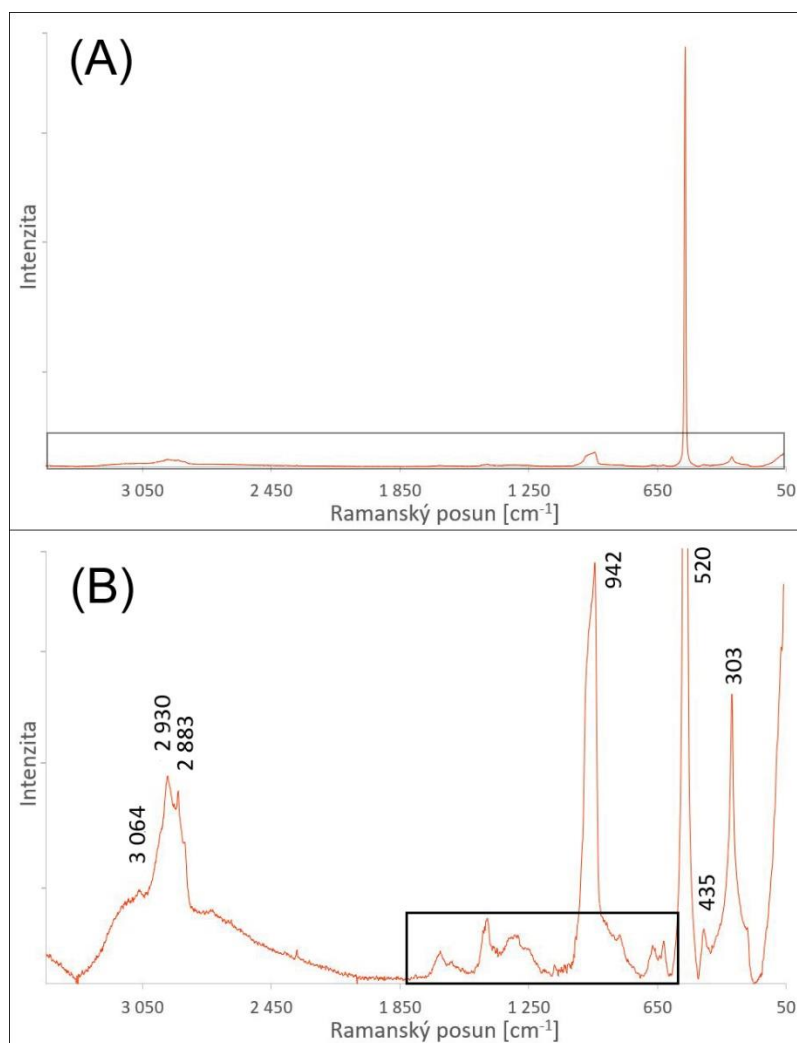


Obrázek č. 12 – Zobrazení zdravé jednojaderné buňky za využití AFM a následně Ramanovy spektroskopie pro získání mapy. (A) Topografie povrchu buňky. (B) 3D topografie. (C) Mapa buňky z Ramanských spekter. (D) Ramanská mapa pro pás $1\,450\text{ cm}^{-1}$. (E) Ramanská mapa pro pás $2\,923\text{ cm}^{-1}$.

3.4.2 Detekce markerů

Dále byly měřeny pro účely detekce markerů pouze zdravé buňky za pomoci Ramanovy spektrometrie. U všech naměřených spekter byly dále provedeny úpravy v software Omnic (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Tyto úpravy zahrnovali korekci na fluorescenci za využití kubického polynomu a korekci na základní linii. Na obrázku č. 13 A lze vidět celé spektrum naměřené na buňce v rozsahu $65\text{--}3\,600\text{ cm}^{-1}$. Je zde obdélníkem vyznačena oblast, která je na obrázku B přiblížena. Nejintenzivnější pás o frekvenci 520 cm^{-1} a jemu náležící harmonický pás o frekvenci 942 cm^{-1} náleží slídě, tedy podkladu pro nanočástice stříbra. Ačkoliv bylo zaostřeno a zaměřeno na buňku, slída přesto produkuje velmi silný signál. Slída taktéž náleží pásy o frekvencích 303 a 435 cm^{-1} . Toto tvrzení je založené na faktu, že se tyto pásy objevují jak ve spektrech pro pozadí, tak ve spektrech pro buňku, a kromě slídy zde již není žádná jiná látka, která by mohla produkovat tak silný signál.

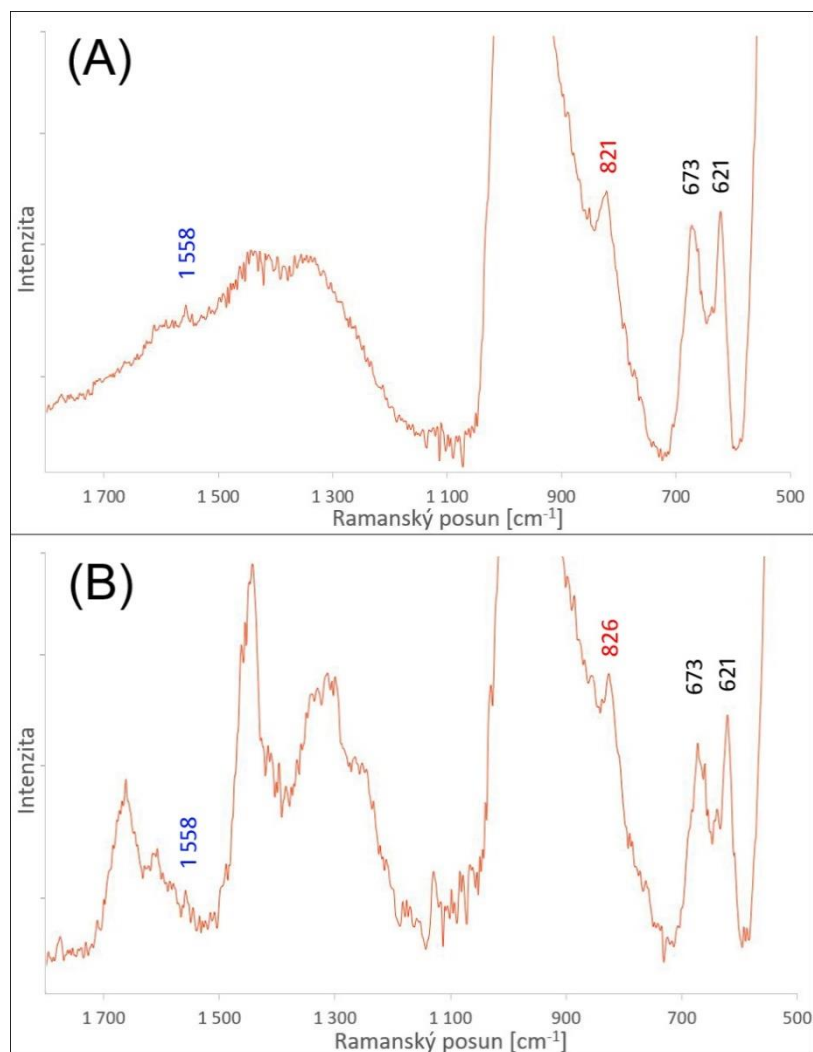
Pásky o frekvenci $2\,883$ a $2\,930\text{ cm}^{-1}$, které lze vidět na obrázku č. 13 B, představují vibrace molekul skládajících se z vazeb C–H (např. C-CH₃, CH₂). Tyto molekuly se vyskytují v buňkách a jsou součástí např. proteinových složek a fosfolipidů. Pás o frekvenci $3\,064\text{ cm}^{-1}$ dále představuje vibraci dvojných vazeb mezi uhlíky (např. CH=CH, =CH₂, C–H nacházející se v aromatické sloučenině). Tyto molekuly se v buňkách nacházejí též (např. v aromatických aminokyselinách, nenasycených mastných kyselinách). Tyto pásy potvrzující výskyt buňky se objevují ve všech dalších spektrech, byly z nich proto vynechány a pozornost byla věnována oblasti o rozsahu $500\text{--}1\,800\text{ cm}^{-1}$, která je vyznačena na obrázku č. 13 B.^{6,26}



Obrázek č. 13 – (A) Celé spektrum naměřené na buňce. (B) Přiblížené spektrum vyznačené na obrázku A. Obdélník vyznačený na obrázku B představuje rozsah, ve kterém byly hledány markery.

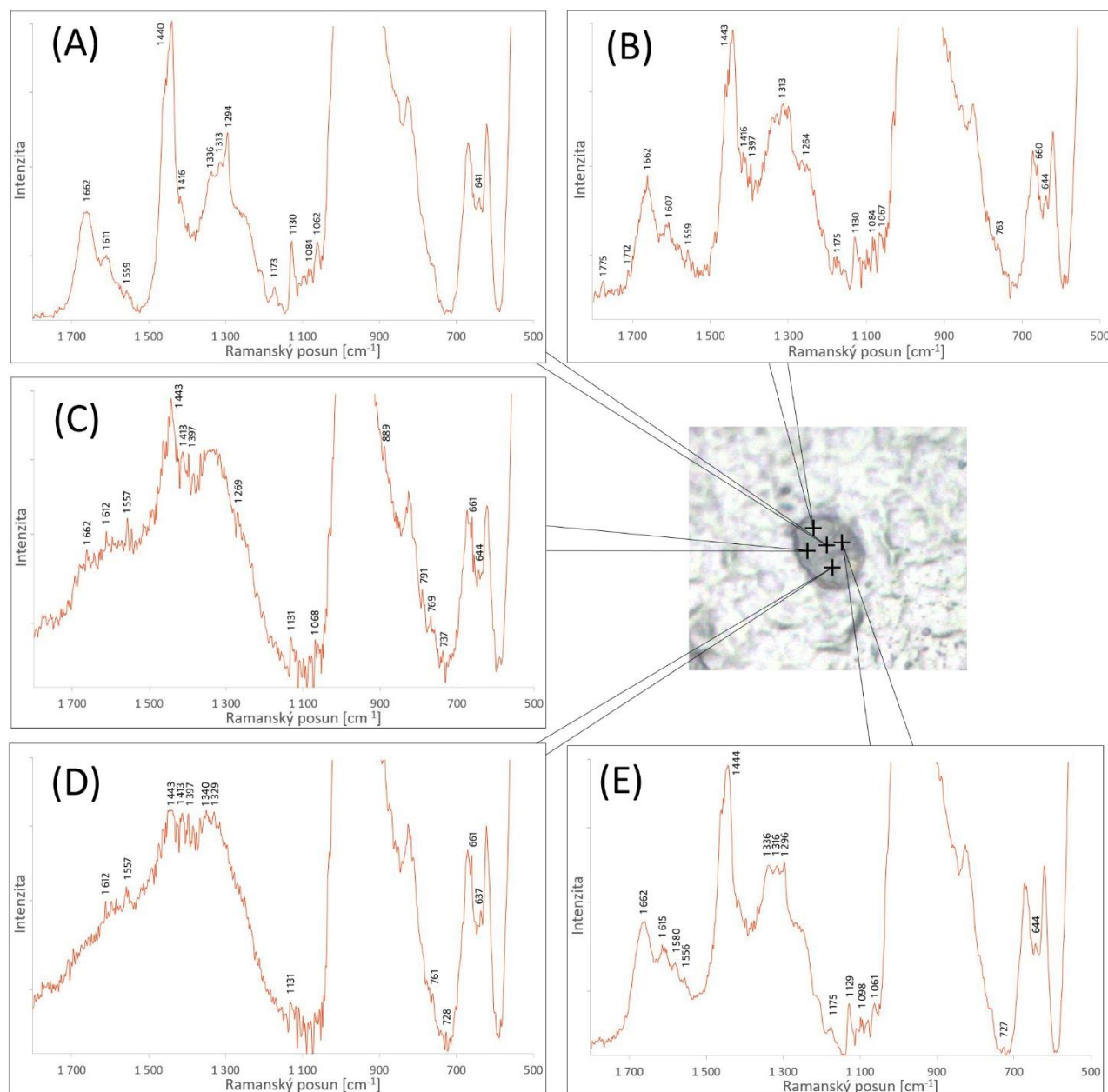
Na obrázku č. 14 již lze vidět spektra v oblasti, které je věnována pozornost. Obrázek A reprezentuje pozadí naměřené mimo buňku, obrázek B představuje signál naměřený z buňky. Z obou spekter je patrné, že pásy o frekvenci 621 a 673 cm^{-1} opět náleží slídě. Zajímavostí je pás 821 cm^{-1} na obrázku A a pás 826 cm^{-1} na obrázku B, kde se ale bude jednat o vibraci totožné vazby jen s posunem, a opět jsou tyto pásy přiřazeny slídě.

Vzhledem k tomu, že buňky byly manuálně přeneseny na nový substrát, mohlo během přenosu dojít k jejich poničení. Kromě toho, že se tímto způsobem zredukuje počet buněk vhodných na analýzu, dochází v okolí celých buněk k zanesení substrátu vnitřnostmi poničených buněk. Ramanova spektroskopie je v tomto ohledu citlivá metoda, proto je možné, jako na obrázku č. 14, spatřit ve spektru pozadí pás patřící proteinu. Jedná se o modře vyznačený pás o frekvenci $1\,558\text{ cm}^{-1}$, který odpovídá typické vibraci pro amid II. Je tedy možné, že se v této oblasti nacházel zbytek jiné poničené buňky, a proto byl tento signál zachycen. O daleko nižších intenzitách lze ve spektru pozadí najít několik dalších takových pásů, jejichž původ vychází pravděpodobně z média, ve kterém byly buňky uchovávány. Počet takových pásů je ale malý a signál minimální.³³



Obrázek č. 14 – (A) Spektrum naměřené mimo buňku. (B) Spektrum naměřené na buňce.

Na obrázku č. 15 se nachází snímek buňky z optického mikroskopu a pět spekter změřených na různých místech této buňky. Tato spektra se od sebe liší nejen jednotlivými pásy, ale také jejich intenzitou. Nejvýraznější pásy byly v obrázku pro snadnou orientaci popsány, pásy charakteristické pro pozadí již byly vynechány.



Obrázek č. 15 – Spektra naměřená na různých místech buňky.

Z několika předchozích studií je již několik pásů identifikováno a lze je nalézt v tabulce č. 1. S jistotou bylo možné rozpoznat pás o frekvenci kolem 1442 cm^{-1} , při které vibruje vazba C–H, v této oblasti typicky pro proteiny. Tento pás vykazuje vysokou intenzitu ve všech spektrech s výjimkou spektra D. Spektra v jeho okolí byla téměř totožná, lze proto říci, že spektrum D reprezentuje signál vycházející z dolní poloviny buňky. Tento signál byl v porovnání s horní polovinou buňky o dost slabší a je tedy možné, že se v této části buňky nevyskytují organely, které by poskytovaly dostatečně silný signál. Dalším pásem, který bylo

možné najít ve všech spektrech opět s výjimkou D, byl $1\,662\text{ cm}^{-1}$ typický pro amid I (protein). Z těchto údajů by se dalo říci, že se v okolí spektra D nevyskytuje tolik proteinů, aby daly za vznik tak silnému signálu jako v jiných spektrech. Pás v rozmezí $1\,556\text{--}1\,559$ byl přiřazen amidu II, který také představuje proteiny. Tento pás bylo možné objevit ve všech spektrech, ačkoliv vykazuje malou intenzitu. Pásky pro amid III byly zřetelně nalezeny pouze ve spektru B o frekvenci $1\,264\text{ cm}^{-1}$ a ve spektru C o frekvenci $1\,269\text{ cm}^{-1}$. Typický pás pro fenylalanin o frekvenci $1\,004\text{ cm}^{-1}$ z důvodu silného signálu slídy nebylo možné zpozorovat. Pás o frekvenci 644 cm^{-1} je přiřazen aminokyselině tyrosin a pás 761 cm^{-1} aminokyselině tryptofan. S poměrně vysokou intenzitou byl nalezen pás kolem $1\,130\text{ cm}^{-1}$, kde vibruje vazba C–N v sekundárním aminu. Tento pás může reprezentovat např. peptidovou vazbu v proteinech.^{32–35}

Podle literatury³⁰ je přiřazen pás $1\,130\text{ cm}^{-1}$ cytochromu, což je protein. Z této literatury byl v teoretické části ocitován obrázek č. 8, kde jsou cytochromu přiřazeny ještě pásy 605 , 753 , $1\,314$ a $1\,585\text{ cm}^{-1}$. Citované spektrum bylo naměřeno v cytosolu za využití laseru o vlnové délce 532 nm . Zde intenzivní pás o frekvenci 750 cm^{-1} představuje vibraci pyrrolu ve struktuře cytochromu c. Cytochrom c vykazuje rezonanční absorpci při vlnové délce 530 nm a vzhledem k tomu, že bylo při tomto měření využito laseru o stejné vlnové délce, došlo k silnému Ramanskému rozptylu. Tento silný signál ale nelze pozorovat při využití laseru o vlnové délce 632 nm a v naměřených datech se nenachází ani při nízké intenzitě. Nejbližší by tomu mohla odpovídat spektra B a D s pásy o frekvenci 761 a 763 cm^{-1} , ovšem zde se bude jednat spíše o typickou vibraci pro aminokyselinu tryptofan. Cytochrom c se tedy v naměřených spektrech nenachází.^{30,35}

Tabulka č. 1 – Tabulka nejznámějších markerů

Frekvence [cm^{-1}]	Sloučenina
750	Pyrrol (cytochrom c)
788	PO_2^- (DNA i RNA)
813	PO_2^- (RNA)
1 004	Fenylalanin
1 264–1 269	Amid III
1 442	Proteiny (C–H)
1 556–1 559	Amid II
1 662	Amid I

Typickým známým markerem pro nukleotidy (resp. nukleové kyseliny) je pás o frekvenci 788 cm^{-1} . O této frekvenci vibruje vazba PO_2^- , která se vyskytuje v RNA a DNA. Tento pás bylo možné nalézt pouze ve spektru C (791 cm^{-1}). V tom samém spektru je také možné vidět pás 737 cm^{-1} , kde typicky vibruje adenin. Adenin bývá v literatuře^{35,36} často spojován s vibrací na 729 cm^{-1} (spektrum D a E), ale vzhledem k faktu, že v těchto spektrech není možné najít již zmíněný marker pro nukleotidy, tak by se nemělo jednat o adenin. Nukleové kyseliny by také podle literatury^{35,37} měly vykazovat signál v oblasti $1\,060\text{--}1\,095\text{ cm}^{-1}$. Kromě spektra D se v každém spektru objevuje pás kolem $1\,065\text{ cm}^{-1}$, dále různě o menší intenzitě i $1\,084$ a $1\,098\text{ cm}^{-1}$. Známý marker pro výskyt RNA o frekvenci 813 cm^{-1} nebyl nalezen v jediném spektru.^{35–37}

Za pásem $1\,443\text{ cm}^{-1}$ lze dále spatřit pásy o frekvenci $1\,450$ a $1\,464\text{ cm}^{-1}$, které stále patří různě deformovaným C–H vazbám. Kromě toho, že patří proteinům, mohou také patřit lipidům a sacharidům. Mastné kyseliny lze podle literatury³⁸ spatřit na $1\,296\text{ cm}^{-1}$ (spektrum A, E, mírně i v B) a také na $1\,062\text{ cm}^{-1}$, který je společný i pro nukleové kyseliny. Tento pás lze nejlépe vidět ve spektrech A a E a vzhledem k tomu, že se v těchto spektrech nenachází typický marker pro nukleové kyseliny, měl by tento pás náležet lipidům. Ve spektru B se jako v jediném vyskytují pásy o frekvenci $1\,712$ a $1\,775\text{ cm}^{-1}$, které by mohly být přiřazeny karboxylu, který se nachází jak v lipidech, tak v proteinech.^{34,38}

Ačkoliv většina nejvýraznějších pásů již byla přiřazena, stále je možné ve spektrech najít pásy, u kterých je ještě třeba rozhodnout, jaké sloučeniny představují. Pro přehlednost byly pásy a jejich frekvence s přiřazenými sloučeninami uvedeny v tabulce č. 2. Většinou se jedná o vibrace proteinů a lipidů, čímž se jejich přítomnost ve spektru potvrzuje.

Ve výsledku je ve spektru A nejvíce výrazných pásů pro proteiny, v menší míře i pro lipidy. Ve spektru B jsou pásy pro proteiny méně intenzivní, několik nových pásů by ale mohlo dohromady představovat přítomnost blízké fosfolipidové membrány. Ve spektru C jsou proteiny opět viditelné méně, v tomto spektru lze ale vidět typický marker pro DNA, proto se dá uvažovat, že se blízko tomuto místu buňky nachází jádro. Ve spektru D je daleko méně intenzivních pásů než v ostatních spektrech, pravděpodobně se zde nenachází žádná organela. Ve spektru E jsou dobře viditelné pásy pro proteiny, mírně také i pásy pro nukleové kyseliny ($1\,098$ a dosud nezmíněný $1\,580\text{ cm}^{-1}$, který by měl představovat vibraci adeninu a guaninu).³⁵

Tabulka č. 2 – Méně výraznější pásy a jejich přiřazené sloučeniny za využití literatury ^{34,35,38}

Frekvence [cm⁻¹]	Sloučenina
889	Vinyliden (C=CH ₂)
1 313–1 340	Methin (=CH-); proteiny i lipidy
1 397–1 413	Karboxylát (-COO ⁻); aminokyseliny, lipidy
1 607–1 617	Aromatické C=C; aminokyseliny
1 175	Tyrosin (vibrace C-H)

4 ZÁVĚR

Jedním z cílů této práce bylo za pomoci mikroskopie atomárních sil zobrazit povrchy zdravých a rakovinných buněk a porovnat je mezi sebou. Z naměřených dat bylo zjištěno, že se liší především velikostí, výškou a strukturou povrchů. Zatímco zdravá buňka vykazuje zvýšení výškového profilu spíše na okrajích, nemocná buňka má nejvyšší profil uprostřed. Povrch zdravé buňky je držen v konstantní linii oproti nemocným buňkám, kde je povrch velice nerovný.

Druhým cílem bylo za pomoci Ramanovy mikroskopie změřit spektra na různých místech buňky a tato spektra interpretovat. Vzhledem k tomu, že je dnes téma hledání markerů v Ramanských spektrech aktuální, existují a stále vychází nové studie zaměřené na tuto problematiku. Díky tomu je možné již objevené markery aplikovat na naměřené výsledky a o dalších diskutovat. Ve spektrech měřené buňky byly jednoznačně nalezeny markery pro proteiny, lipidy a v menší míře také pro nukleové kyseliny. Nebyl nalezen typický marker pro RNA, která se účastní syntézy proteinů.²⁶

Komplikací pro detekci markerů představoval povrch slídy, na kterém byl substrát nanočástic přítomen, a pro další měření bude třeba tento intenzivní signál eliminovat. Měření je také třeba zopakovat k potvrzení přítomnosti méně intenzivních markerů, anebo je vyvrátit. Dalším krokem bude tato měření aplikovat na nemocné buňky a porovnat výskyt pásů mezi sebou. Ze zmizelých či nově objevených pásů by dále mělo být možné vytvořit hypotézu, jak se mění buněčná dynamika po vypuknutí nemoci.

5 SUMMARY

One of the aims of this thesis was to image surfaces of healthy and cancer cells and make a comparison between them. From the measured data, it was found that the main differences are their size, height, and structure of the surfaces. The healthy cell shows an increase of height profile more on the edges; the cancer cell displays the highest profile in the center of the cell. The surface of the healthy cell is held in a constant line as opposed to cancer cells which surface is very rough.

The second aim was to measure spectra on various places of a healthy cell using the Raman microscope and to interpret these spectra. Today the topic of markers is relevant and because of this many works have been published about this issue. Thanks to this it is possible to apply markers which were already discovered and to discuss the other ones. Proteins, lipids and nucleic acids, albeit with less intensity, were observed in measured spectra. There was not found a common marker for RNA which takes part in protein synthesis.²⁶

The substrate of nanoparticles, on which cells were situated, was placed on the surface of mica. Its strong signal was a complication in markers detection. For further analysis, it is needed to eliminate this strong signal of mica or to find a more suitable SERS active substrate. It is also necessary to repeat the measurement to confirm or disprove these markers with small intensities. The next step would be to apply this measurement on the cancer cells and compare the spectra with each other. It should be possible to create a hypothesis about the cellular dynamics after the disease outbreak from the disappeared or newly discovered bands in the spectra.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Smith, R., Wright, K. L. & Ashton, L. Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies. *Analyst* **141**, 3590–3600 (2016).
2. Li, Y. *et al.* Organelle specific imaging in live cells and immuno-labeling using resonance Raman probe. *Biomaterials* **53**, 25–31 (2015).
3. Fotiadis, D., Scheuring, S., Müller, S. A., Engel, A. & Müller, D. J. Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron* **33**, 385–397 (2002).
4. Muller, D. J., Frank, A., Boldt, G. & Engel, A. Imaging Purple Membranes in Aqueous Solutions at Sub-Nanometer Resolution by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **68**, 0–5 (1995).
5. Abramczyk, H. & Brozek-Pluska, B. New look inside human breast ducts with Raman imaging. Raman candidates as diagnostic markers for breast cancer prognosis: Mammaglobin, palmitic acid and sphingomyelin. *Anal. Chim. Acta* **909**, 91–100 (2016).
6. Smith, E. & Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. 1. vydání. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2005. 210 s.
7. Engel, T. *Quantum Chemistry and Spectroscopy*. 3. vydání. United States of America: Pearson Education, Inc., 2013. 507 s.
8. Chalmers, J. M., Edwards, H. G. M. & Hargreaves, M. D. *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. 1. vydání. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2012. 618 s.
9. Otyepka, M. *Struktura atomů a molekul*. 2. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2010. 84 s.
10. Schrader, M. *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Application*. 1. vydání. New York: VCH Publishers, Inc., 1995. 787 s.
11. McCreery, R. L. *Raman Spectroscopy For Chemical Analysis*. 1. vydání. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000. 420 s.
12. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. 2. vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s.

13. Thermo Fisher Scientific, Inc. OMNIC for Dispersive Raman, Help. ver. 8.2.0.403. United States of America, 2010.
14. Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A., Ringe, E. & Duyne, R. P. Van. SERS : Materials, applications, and the future. *Mater. Today* **15**, 16–25 (2012).
15. Campion, A., Kambhampati, P., Campion, A. & Harris, C. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.* **27**, 241–250 (1998).
16. Chem, J. M., Xie, W., Qiu, P. & Mao, C. Bio-imaging, detection and analysis by using nanostructures as SERS substrates. *J. Mater. Chem.* **21**, 5190–5202 (2011).
17. Schmid, T., Opilik, L., Blum, C. & Zenobi, R. Nanoscale Chemical Imaging Using Tip-Enhanced Raman Spectroscopy: A Critical Review. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 5940–5954 (2013).
18. Yeo, B., Stadler, J., Schmid, T., Zenobi, R. & Zhang, W. Tip-enhanced Raman Spectroscopy - Its status, challenges and future directions. *Chem. Phys. Lett.* **472**, 1–13 (2009).
19. Rugar, D. & Hansma, P. Atomic Force Microscopy. *Phys. Today* **43**, 23–30 (1990).
20. Kubínek, R., Vůjtek, M. & Mašláň, M. *Mikroskopie skenující sondou*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2003. 145 s.
21. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy - from Birth to Adolescence. *Rev. Mod. Phys.* **59**, 615–625 (1987).
22. Eaton, P. & West, P. *Atomic Force Microscopy*. 1. vydání. New York: Oxford University Press, 2010. 248 s.
23. Kubínek, R., Vůjtek, M. & Holubová, R. Mikroskopie atomárních sil. *MFMI* **10**, 536–547 (2001).
24. Gołek, F., Mazur, P., Ryszka, Z. & Zuber, S. Applied Surface Science AFM image artifacts. *Appl. Surf. Sci.* **304**, 11–19 (2014).
25. Alberts, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. 6. vydání. New York: Garland Science, 2014. 1 465 s.

26. Alberts, B. *et al.* *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2004. 630 s.
27. Benešová, M., Hamplová, H., Knotová, K. *et al.* *Odmaturuj z biologie*. 2. vydání. Brno: DIDAKTIS spol. s r. o., 2013. 256 s.
28. Shaoyang, L. & Yifen, W. Application of AFM in Microbiology: A Review. *Scanning Wiley Period. Inc.* **32**, 61–73 (2010).
29. Stockle, R. M., Suh, Y. D., Deckert, V. & Zenobi, R. Nanoscale chemical analysis by tip-enhanced Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **318**, 131–136 (2000).
30. Palonpon, A. F., Sodeoka, M. & Fujita, K. Molecular imaging of live cells by Raman microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 708–715 (2013).
31. Grmellec, C. Le, Lesniewska, E. & Finot, E. Imaging of the Surface of Living Cells by Low-Force Contact-Mode Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **75**, 695–703 (1998).
32. Uzunbajakava, N. *et al.* Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells. *Biophys. J.* **84**, 3968–3981 (2003).
33. Ranc, V., Srovnal, J., Kvítek, L. & Hajduch, M. Discrimination of circulating tumor cells of breast cancer and colorectal cancer from normal human mononuclear cells using Raman spectroscopy. *Analyst* **138**, 5983–5988 (2013).
34. Meyers, R. A., Coates, J. *Encyclopedia of Analytical Chemistry - Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. 1. vydání: Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2000. 10 815–10 837 s.
35. Notingher, I. *et al.* In Situ Spectral Monitoring of mRNA Translation in Embryonic Stem Cells during Differentiation in Vitro. *Anal. Chem.* **76**, 3185–3193 (2004).
36. Ghita, A., Pascut, F. C., Mather, M., Sottile, V. & Notingher, I. Cytoplasmic RNA in Undifferentiated Neural Stem Cells: A Potential Label-Free Raman Spectral Marker for Assessing the Undifferentiated Status. *Anal. Chem.* **84**, 3155–3162 (2012).
37. Liang, L. *et al.* In Situ Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy Exploring Molecular Changes of Drug-Treated Cancer Cell Nucleus. *Anal. Chem.* **87**, 2504–2510 (2015).

38. Gelder, J. De *et al.* Methods for extracting biochemical information from bacterial Raman spectra: Focus on a group of structurally similar biomolecules — Fatty acids. *Anal. Chim. Acta* **3**, 167–175 (2007).