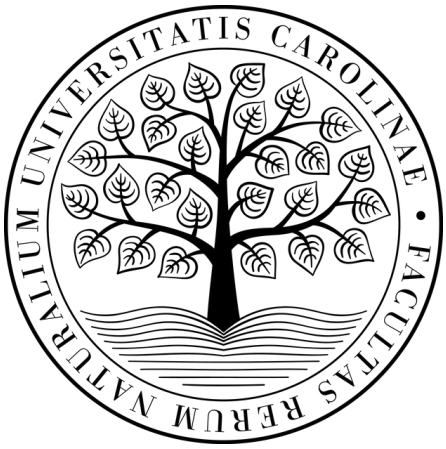
Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Juříková

Analýza plicních vzorků infikovaných *Aspergillus fumigatus* a *Pseudomonas aeruginosa* metodami rastrovací elektronové mikroskopie

Analysis of pulmonary samples infected with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* using scanning electron microscopy

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Oldřich Benada, CSc.

Konzultant: prof. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.

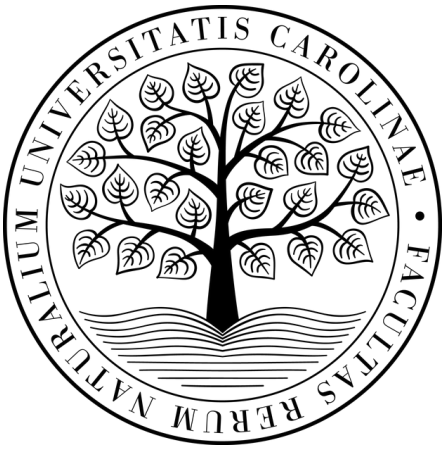
Praha 2018

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Biology

Branch of study: Microbiology



Bc. Tereza Juříková

Analysis of pulmonary samples infected with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* using scanning electron microscopy

Analýza plicních vzorků infikovaných *Aspergillus fumigatus* a *Pseudomonas aeruginosa* metodami rastrovací elektronové mikroskopie

DIPLOMA THESIS

Supervisor: RNDr. Oldřich Benada, CSc.

Adviser: prof. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.

Prague 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.4.2018 Podpis autorky

Chtěla bych srdečně poděkovat svému školiteli RNDr. Oldřichu Benadovi, CSc. za jeho velmi milý přístup, ochotu a cenné rady při vypracovávání diplomové práce i uvedení do elektronové mikroskopie.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře charakterizace molekulární struktury (MBÚ AV ČR,v.v.i.) za vytvoření příjemných pracovních podmínek. Srdečné poděkování patří Mgr. Dominice Luptákové, Ph.D. za její obětavou pomoc při experimentech, konzultace i motivaci do další práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Olze Kofroňové, CSc., RNDr. Zdeňku Žižkovi, CSc. a Zuzaně Večerkové za jejich milou pomoc nejen při přípravě vzorků. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Antonu Škríbovi, Ph.D. a Ing. Jiřímu Novákovi, Ph.D. za spolupráci a poskytnutí dat.

Na závěr bych chtěla srdečně poděkovat své rodině za jejich nesmírnou podporu, obětavost a trpělivost po dobu mého studia. Poděkování patří i mým přátelům, jmenovitě Daliborovi, Karolíně a Zlatě za jejich pomoc při psaní této práce a podporu.

Práce byla podporována projektem GAČR „Multimodální zobrazování“ č. 16-20229S.

Abstrakt

Infekční onemocnění představují i přes významný pokrok v medicíně ohrožení života, k čemuž přispívá nárůst multirezistentních kmenů mikroorganismů či pozdní odhalení původce onemocnění. Oportunně patogenní houba *Aspergillus fumigatus* vyvolává onemocnění dýchací soustavy, která nazýváme aspergilózy. Invazivní plicní aspergilóza se rozvíjí u imunokompromitovaných pacientů po vdechnutí všudypřítomných spor *A. fumigatus* a ročně na ni umírá 450 000 pacientů. V infikované tkáni se tvoří biofilm, který částečně chrání *A. fumigatus* před antimikrobiálními látkami. Pozdě zahájená terapie proto nemusí být dostatečně účinná. Infekce imunokompromitovaných pacientů a tvorba biofilmů je charakteristická i pro gram negativní bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, která je díky produkci mnoha virulenčních faktorů a multirezistenci k antibiotikům obávaným oportunním patogenem.

Rastrovací elektronová mikroskopie (SEM) poskytuje detailní informace o morfologii mikroorganismů s rozlišením desítek nanometrů, což umožňuje pozorovat mikroorganismy v infikované tkáni i její patologické změny. Hmotnostní spektrometrie umožňuje sledovat přítomnost a průběh infekce na základě detekce charakteristických molekul produkovaných mikroorganismy.

Cílem této práce bylo optimalizovat přípravu vzorků plicní tkáně infikované *A. fumigatus* nebo *P. aeruginosa* pro společnou analýzu s využitím SEM včetně prvkové mikroanalýzy, světelné mikroskopie a zobrazovací hmotnostní spektrometrie s využitím laserové desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI-MSI). Kritériem bylo optimální zachování struktury plicní tkáně spolu se zachováním detekčních limitů analyzovaných mikrobiálních sideroforů. Výsledkem této optimalizace byla korelace výsledků získaných analýzami v SEM a MALDI-MSI na následných řezech plicní tkáně infikované *P. aeruginosa*. Korelací optických a elektronmikroskopických snímků jsme detailně identifikovali patologické změny v plicích infikovaných *A. fumigatus*. Poznatky získané ostatními pokusy mohou vést k dalším optimalizacím přípravy vzorků infikované tkáně tak, aby korelací výsledků SEM a MALDI-MSI analýz bylo možné identifikovat změny v infikované tkáni pouze v jednom tkáňovém řezu.

Klíčová slova: *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, rastrovací elektronová mikroskopie, prvková mikroanalýza, MALDI-MSI, korelativní mikroskopie

Abstract

Despite the significant progress in medicine, infectious diseases are life-threatening thanks to an increasing number of multiresistant strains of microorganisms and late detection of pathological agents. An opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus* cause respiratory system diseases called aspergillosis. The invasive pulmonary aspergillosis affects immunocompromised patients after inhalation of ubiquitous conidia of *A. fumigatus* and results in 450,000 deaths per year. The biofilm formation in the infected tissue protects *A. fumigatus* against antimicrobial drugs. Late therapy may not be effective. Infection of immunocompromised patients and biofilm formation is characteristic also for gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, which is due to the production of many factors of virulence and multiresistance a dreaded opportunistic pathogen.

Scanning electron microscopy (SEM) provides detail information about morphology of microorganisms with the resolution in range of tens of nanometers that allows to observe microorganisms in the infected tissue and its pathological changes. Mass spectrometry allows to detect infection and its course based on identification of characteristic microbial molecules.

The aim of this study was to optimize sample preparation of tissues infected with *A. fumigatus* or *P. aeruginosa* for analysis using SEM including elemental microanalysis, light microscopy and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging (MALDI-MSI). The criterion was an optimal tissue structure preservation with preservation of detection limits of analyzed microbial siderophores. The result of this optimization was the correlation of results from SEM and MALDI-MSI on the consecutive slices of pulmonary tissue infected with *P. aeruginosa*. The correlation of light and electron microscopy contributed to detail identification of pathological changes in lungs infected with *A. fumigatus*. The results of other experiments can lead to further optimization of sample preparation of infected tissues so that correlation of results from SEM and MALDI-MSI analysis may identify changes in the infected tissue in one tissue slice only.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas aeruginosa*, scanning electron microscopy, elemental microanalysis, MALDI-MSI, correlative microscopy

Obsah

Seznam použitých zkratek **4**

1 Úvod **7**

2 Cíle práce **9**

3 Literární přehled **11**
3.1 *Aspergillus fumigatus* . . . 11
3.1.1 Úvod . . . 11
3.1.2 Morfologie a stavba buněčné stěny . . . 11
3.1.3 Tvorba biofilmu . . . 12
3.1.4 Získávání železa v tkáních . . . 13
3.1.5 Rozmnožování . . . 13
3.1.6 Invazivní plicní aspergilóza . . . 14
3.2 *Pseudomonas aeruginosa* . . . 19
3.2.1 Úvod . . . 19
3.2.2 Virulenční faktory . . . 19
3.2.3 Získávání železa v tkáních . . . 20
3.2.4 Onemocnění . . . 22
3.2.5 Diagnostika . . . 23
3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie . . . 25
3.3.1 Úvod . . . 25
3.3.2 Princip SEM . . . 26
3.3.3 Příprava biologických vzorků pro SEM . . . 29
3.4 EDS prvková mikroanalýza . . . 33
3.4.1 Úvod . . . 33
3.4.2 Rentgenové záření a elektronový paprsek . . . 33
3.4.3 EDS detekce . . . 33
3.5 Zobrazovací hmotnostní spektrometrie a multimodální zobrazování . . . 37
3.5.1 MALDI-MSI . . . 37
3.5.2 Multimodální zobrazování . . . 38

4 Materiál a metody **41**
4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení . . . 41
4.1.1 Seznam použitých chemikálií . . . 41
4.1.2 Roztoky a pufry . . . 41
4.1.3 Pomůcky pro mikroskopii . . . 42
4.1.4 Přístrojové vybavení . . . 42
4.1.5 Biologický materiál . . . 43

4.2 Metody a pracovní postupy 43
4.2.1 Zpracování tkání 43
4.2.2 Příprava řezů v kryostatu 44
4.2.3 Pozorování nativních preparátů 45
4.2.4 Histologické barvení 45
4.2.5 Barvení pro průkaz hub 46
4.2.6 Příprava vzorků pro rastrovací elektronovou mikroskopii . 47
4.2.7 Skenování vzorků 49
4.2.8 Korelace elektronmikroskopických a optických snímků 49

5 Výsledky **51**
5.1 Struktura plicní tkáně v SEM 52
5.2 Porovnání zachování struktur v řezech fixované a nefixované plicní tkáně 57
5.3 Porovnání metod zpracování řezů plicní tkáně pro SEM 64
5.4 Fixace hluboce zmrazené tkáně 74
5.5 Sval myši infikovaný *P. aeruginosa* 83
5.6 Plíce potkana infikované *P. aeruginosa* 92
5.7 Plíce potkana infikované *A. fumigatus* 99
5.8 EDS prvková mikroanalýza 111

6 Diskuze **125**

7 Souhrn **129**

Seznam použité literatury **131**

8 Přílohy **137**
8.1 Poster autorky 138

Seznam použitých zkratek

ABPA	alveolar bronchopneumonal aspergillosis	alveolární bronchopulmonární aspergilóza
APC	antigen-presenting cell	antigen-prezentující buňka
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
BAL	bronchoalveolar lavage	bronchoalveolární laváž
BSE	backscattered electrons	zpětně odražené elektrony
CASI	continuos accumulation of selected ions	kontinuální akumulace vybraných iontů
CF	cystic fibrosis	cystická fibróza
CFU	colony forming units	jednotky tvořící kolonie
CLR	C-type lectin receptors	C-lektinové receptory
CRT	cathode ray tube	katodová trubice
CT	computed tomography	výpočetní tomografie
CPD	critical point drying	sušení metodou kritického bodu
DESI	desorption electrospray ionization	desorpční elektrosprejová ionizace
ECM	extracellular matrix	extracelulární matrix
EDS	energy-dispersive X-ray spectroscopy	energiově disperzní spektroskopie
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay	enzymová imunoanalýza na pevné fázi
ESI	electrospray	elektrosprej
FT-ICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GA	glutaraldehyde	glutaraldehyd
GAG	galactosaminogalactan	galaktosaminogalaktan
GTP	guanosine triphosphate	guanosintrifosfát
i.p.	intraperitoneal	intraperitoneální (podání léku)
IPA	invasive pulmonary aspergillosis	invazivní plicní aspergilóza

i.m.	intramuscular	intramuskulární (podání léku)
ITO	indium tin oxide	cínem deponovaný oxid inditý
LA-ICP-MS	laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry	laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
LPS	lipopolysaccharide	lipopolysacharid
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice
MSI	mass spectrometry imaging	zobrazovací hmotnostní spektrometrie
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotid-fosfát
NLR	NOD-like receptors	NOD-like receptory
PAMPs	pathogen associated molecular patterns	molekulární vzory asociované s patogeny
PAS	periodic acid Schiff	PAS reakce
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PRR	pathogen recognition receptors	receptory rozpoznávající patogeny
ROS	reactive oxygen species	reaktivní formy kyslíku
rtg záření	X-radiation	rentgenové záření
SE	secondary electrons	sekundární elektrony
SEM	scanning electron microscopy	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmission electron microscopy	transmisní elektronová mikroskopie
TOF analyzátor	time-of-flight analyzer	analyzátor doby letu
TLR	Toll-like receptor	Toll-like receptor
UV záření	ultraviolet radiation	ultrafialové záření
WDS	wavelength dispersive spectroscopy	vlnově disperzní spektroskopie

1. Úvod

Infekční onemocnění stále představují v rozvinutých zemích světa ohrožení života, a to i přes nesmírný pokrok v oblasti medicíny a intenzivní výzkum. Velkým rizikem je přítomnost multirezistentních kmenů mikroorganismů a pozdní odhalení původců nemoci. Jedním z onemocnění, které doposud nejsme schopni včas diagnostikovat, je invazivní plicní aspergilóza způsobená houbou *Aspergillus fumigatus*. Společně se zvyšujícím se počtem imunokompromitovaných pacientů, které postihuje, roste i její incidence a ročně na ni umírá 450 000 pacientů (Poeta, 2016). *A. fumigatus* tvoří v postižené tkáni biofilm, díky kterému je odolný vůči mnoha antimykotikům. Prorůstá plicní parenchym a za určitých podmínek se může šířit do krevního řečiště a následně i do dalších orgánů (Filler & Sheppard, 2006). Pozdě zahájená terapie proto není dostatečně účinná.

Společně s *A. fumigatus* často infikuje plíce, zejména u pacientů s cystickou fibrózou, gram negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Vzhledem k antifungálním účinkům *P. aeruginosa* dochází v postižené tkáni k inhibici biofilmů *A. fumigatus* (Ferreira *et al.*, 2015). Díky produkci mnoha virulenčních faktorů a multirezistenci k antibiotikům je *P. aeruginosa* obdobně jako *A. fumigatus* častou příčinou úmrtí imunokompromitovaných pacientů (Kaur & Singh, 2014)

Tyto mikroorganismy můžeme pozorovat pomocí světelného mikroskopu, díky jeho omezené rozlišovací schopnosti ovšem nezískáme dostatek informací o morfologii mikroorganismů. Rastrovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy, SEM) oproti světelné mikroskopii umožňuje nahlédnout na povrch infikované tkáně s rozlišením desítek nanometrů, díky čemuž můžeme pozorovat patogeny v postižené tkáni a jimi vyvolané patofyziologické změny. Detekce charakteristického rentgenového záření pomocí EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy) detektoru v SEM zároveň může poskytnout informace o prvkovém složení vzorku.

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry imaging, MSI) umožňuje rychlou analýzu biomolekul mikrobiálního původu ve tkáních. Řada těchto molekul je specifická pro daný mikrobiální druh, díky čemuž mohou tyto biomolekuly sloužit jako biomarkery. Rozlišení u těchto metod se však pohybuje v rozsahu desítek mikrometrů.

Jednotlivé využití výše zmíněných metod poskytuje s určitými klady i zápory důležité informace o infikovaných tkáních. Spojíme-li však data získaná pomocí SEM, MSI a dalších metod pomocí moderních softwarů, získáme komplexní informace o průběhu a lokalizaci infekce ve tkáních. Tento způsob multimodálního zobrazování přináší nový pohled na tkáně či orgánové soustavy pomocí nejmodernějších zobrazovacích a analytických metod.

Tato práce navazuje na výsledky Laboratoře charakterizace molekulární struktury (MBÚ AV ČR, v.v.i.), která se věnuje multimodálnímu zobrazování invazivní plicní aspergilózy v potkaním modelu (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b).

2. Cíle práce

Diplomová práce je součástí projektu „Multimodální zobrazování“ Laboratoře charakterizace molekulární struktury. Projekt si klade za cíl vyvíjet techniky včasné a neinvazivní diagnostiky pro infekce způsobené vláknitými houbami nebo některými gramnegativními bakteriemi. Využívány jsou nejmodernější analytické a zobrazovací metody – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem, laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (MALDI), pozitronová emisní tomografie, optická a elektronová mikroskopie včetně prvkové mikroanalýzy (EDS).

Pro tuto práci byly stanoveny následující úkoly:

- příprava vzorků tkání pro rastrovací elektronový mikroskop,
- optimalizace přípravy histologických vzorků pro analýzy v rastrovacím elektronovém mikroskopu s ohledem na multimodální zobrazování (SEM, MALDI-MSI, EDS),
- mikroskopie a analýza prvkového složení vzorku na optimalizovaných vzorcích ve vysokorezolučním elektronovém mikroskopu FEI Nova NanoSEM 450 s analytickým systémem EDAX TEAM,
- korelace optických a elektronmikroskopických snímků.

3. Literární přehled

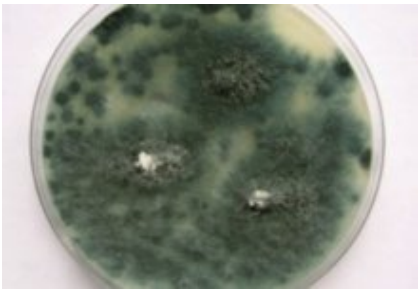
3.1 *Aspergillus fumigatus*

3.1.1 Úvod

Rod *Aspergillus*, česky kropidlák, řadíme mezi vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*). Obsahuje více než 200 druhů, z nichž asi 40 vyvolává mykotické infekce u člověka. Jedná se o ubikvitérní mikroorganismy se saprofytickým způsobem výživy. Přirozeně se vyskytují v půdě, v rozkládající se organické hmotě a ve vlhkém prostředí. Mají důležitou úlohu v koloběhu uhlíku a dusíku. Jejich těla jsou tvořena vláknitým myceliem, jehož hyfy dosahují délky až stovek μm. Mycelium má dvě části. Vegetativní část prorůstá substrát a přijímá živiny. Vlákna vzdušného mycelia se na koncích rozšiřují v konidiofory, na kterých se tvoří asexuální spory (konidie) sloužící k reprodukci. Tvar i uspořádání konidioforu jsou druhově specifické, stejně jako barva kolonií (obr. 3.1).

Říše	*Fungi*
Kmen	*Ascomycota*
Třída	*Eurotiomycetes*
Řád	*Eurotiales*
Čeleď	*Trichocomaceae*
Rod	*Aspergillus*
Druh	*Aspergillus fumigatus*

Tabulka 3.1: Taxonomické zařazení druhu *A. fumigatus*, převzato z Index Fungorum Partnership (2018).



Obrázek 3.1: Kolonie *A. fumigatus*, převzato z Bartáková *et al.* (2007).

Mnoho druhů rodu *Aspergillus* vyvolává onemocnění u člověka i jiných savců. Riziko představují druhy vyvolávající mykotoxikózy, např. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus parasiticus*. Mykotoxiny mohou kontaminovat uskladněné potraviny a krmiva, jejich přítomnost je proto přísně kontrolována z důvodu jejich kancerogenních, teratogenních a dalších účinků (Bennett & Klich, 2003).

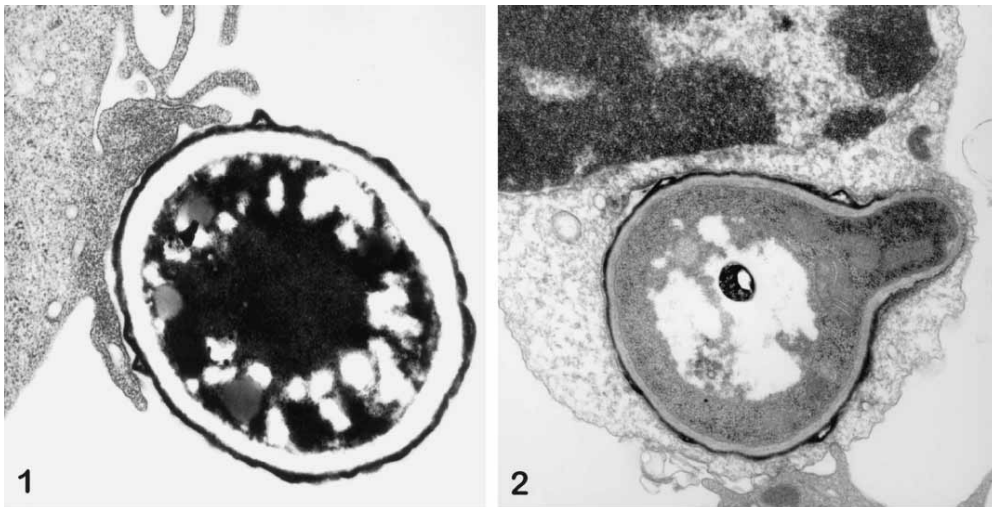
V posledních 30 letech významně stoupá incidence infekčních onemocnění respiračního systému, která nazýváme aspergilózy (Poeta, 2016). Hlavním původcem je druh *Aspergillus fumigatus*, který je po kvasince *Candida albicans* druhým nejčastějším fungálním patogenem člověka (Kaur & Singh, 2014). Některé druhy vedou minoritně ke vzniku onychomykóz (infekce nehtového aparátu) a otomykóz (infekce zevního zvukovodu) (Bongomin *et al.*, 2017).

3.1.2 Morfologie a stavba buněčné stěny

A. fumigatus se vyskytuje ve dvou morfotypech. Spory o velikosti 2–3 μm se abioticky šíří a za vhodných podmínek klíčí. Rostoucí hyfy tvoří mycelia, případně biofilm. Průměr vláken se pohybuje v rozmezí 3–6 μm. Během morfogeneze

se mění stavba buněčné stěny (obr. 3.2), která je složena převážně z polysacharidů. Její kostru tvoří větvený β-1,3-glukan, ke kterému se kovalentně váže chitin, galaktomannan a β-1,4-glukan. Tato kostra je obklopena amorfní hmotou z β-1,3-glukanu a galaktosaminogalaktanu (GAG). Součástí buněčné stěny jsou také glykosylfosfatidylinositol - vazebné proteiny (van de Veerdonk *et al.*, 2017).

Spory *A. fumigatus* se lépe šíří vzduchem než spory jiných druhů rodu *Aspergillus* díky jejich vyšší hydrofobicitě (Kwon-Chung & Sugui, 2013). Ta je dána vnější rodletovou vrstvou, která pokrývá melaninový obal spory. Tyto vrstvy chrání spory před dehydratací, UV zářením a imunitním systémem hostitele. Pod melaninovým obalem se nachází polysacharidová vrstva. Klíčení spor začíná bobtnáním, během kterého je degradována rodletová vrstva, zvyšuje se osmotický tlak uvnitř buňky, mění se integrita buněčné stěny glykosyl hydrolázami a syntetizují se nové polysacharidy. Z celistvé melaninové vrstvy zůstávají na klíčící spoře pouze malé shluky melaninu na povrchu buněčné stěny. Jakmile spora nabobtná do dvojnásobné velikosti, začíná polarizovaný růst. β-1,3-glukan se dostává na povrch klíčících spor a zajišťuje jejich slepování. Rostoucí hyfy se dichotomicky větví a tvoří mycelia. Důležitou složkou buněčné stěny se stává GAG, který zajišťuje vzájemné spojování hyf (van de Veerdonk *et al.*, 2017; Latgé *et al.*, 2017).



Obrázek 3.2: Interakce spory *A. fumigatus* s makrofágem. Spora (1) je částečně obklopena panožkami makrofágu. Po pohlcení makrofágem spora klíčí (2). Během klíčení dochází ke změnám stavby buněčné stěny. Převzato z Latgé *et al.* (2005).

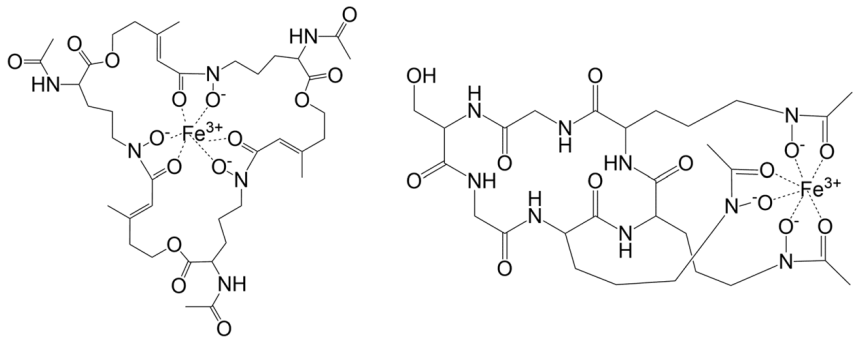
3.1.3 Tvorba biofilmu

Významným faktorem virulence je produkce extracelulární matrix (ECM) a tvorba biofilmu, která přináší mikroorganismům mnoho výhod. Biofilm buňkám zajišťuje ochranu před imunitním systémem hostitele a před antimikrobiálními látkami, které nejsou schopné biofilmem účinně difundovat, což je jednou z příčin rezistence k těmto látkám. Pomocí ECM jsou hyfy udržovány spojené a adherují k povrchu (Sheppard & Howell, 2016). ECM *A. fumigatus* obsahuje GAG, galaktomanan, α-1,3-glukan, monosacharidy, polyoly, melanin a proteiny (Kaur & Singh, 2014). Množství ECM se zvyšuje s maturací biofilmu a jeho hloubka dosahuje 10 – 200 μm. Tvorba biofilmu je pomalejší než u *C. albicans*,

u které je zkoumán nejčastěji z fungálních patogenů (Kaur & Singh, 2014). Po zachycení spor k substrátu nastává lag fáze dlouhá přibližně 10 h, během které spory adherují a klíčí. Během dalších 6 hodin vzniká monovrstva tvořená hyfami, následně se tvoří složitější struktury. Maturovaný biofilm můžeme pozorovat 48 – 72 h od adheze spor k substrátu. Součástí biofilmu je mnoho dalších molekul, např. degradační enzymy, mykotoxiny nebo extracelulární DNA, která přispívá k zachování struktury biofilmu (Kaur & Singh, 2014).

3.1.4 Získávání železa v tkáních

V infikovaných tkáních dochází ke kompetici o železo mezi mikroorganismem a hostitelem. Železo je nezbytným mikronutrientem, funguje např. jako kofaktor enzymů využívaných v dýchacím řetězci, při syntéze nukleotidů, replikaci DNA a dalších základních buněčných dějích. V živých organismech se vyskytuje v oxidačních stavech Fe^{II+} a Fe^{III+}. Homeostáza železa je v buňce přísně kontrolovaná a většina atomů je vázaná v hemu, ferritinu, transferrinu či laktoferrinu. *A. fumigatus* obdobně jako jiné patogenní mikroorganismy syntetizuje siderofory, látky chelatující železo s vysokou afinitou. Z tkáně je železo získáváno pomocí dvou extracelulárních sideroforů fusarininu C a triacetylfusarininu C (obr. 3.3), intracelulární siderofor ferricrocin (obr. 3.3) zajišťuje uchovávání železa v hyfách, hydroxyferricrocin pak ve sporách (Schalk & Cunrath, 2016; van de Veerdonk *et al.*, 2017). Tyto molekuly jsou charakteristické pro *A. fumigatus* a je možné je detekovat v moči a séru pacientů s invazivní plicní aspergilózou (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b).



Obrázek 3.3: Molekula triacetylfusarininu C (vlevo) a ferricrocinu (vpravo) s navázaným atomem železa, převzato z Luptáková *et al.* (2017b).

3.1.5 Rozmnožování

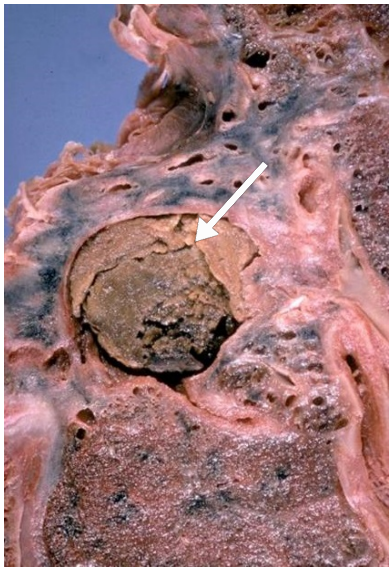
A. fumigatus se rozmnožuje nepohlavně pomocí spor (konidií), byl však zaznamenán laboratorní případ tvorby pohlavních askospor (O'Gorman *et al.*, 2009). Nicméně podmínky pro vznik askospor i jejich klíčení jsou značně nefyziologické (vznik při kultivaci po dobu 3 – 6 měsíců ve tmě při nízké aeraci a teplotě 30 °C, klíčení při teplotě 65 °C). V přírodě by k pohlavnímu rozmnožování mohlo dojít např. během fermentačních procesů při kompostování, k vývoji onemocnění u člověka by však klíčení askospor vzhledem k vysokým teplotním požadavkům nemohlo vést (van de Veerdonk *et al.*, 2017).

3.1.6 Invazivní plicní aspergilóza

Onemocnění vyvolávaná druhem *A. fumigatus* můžeme rozdělit do tří skupin, všechna postihují primárně respirační systém. K infekci dochází po inhalaci všudypřítomných spor, které díky své velikosti účinně prostupují dýchacími cestami až do alveol. Zda a jaké onemocnění u člověka vznikne, závisí na imunitním systému jedince a virulenci daného druhu.

Do první skupiny alergických onemocnění řadíme alergickou bronchopulmonární aspergilózu (ABPA), která je způsobená hypersenzitivitou k aspergilovým antigenům při kolonizaci dolních dýchacích cest. Hyfy rostou saprofyticky v lumen bronchů a vyvolávají zánět. ABPA postihuje především pacienty s cystickou fibrózou a astmatiky.

Druhou skupinu představují chronické plicní aspergilózy, mezi které řadíme tvorbu aspergilomu (obr. 3.4). Plicní aspergilom vzniká u pacientů s plicními kavitami vzniklými například plicní tuberkulózou. Jedná se o kulovitý útvar tvořený shlukem hyf, zbytků tkání, fibrinu a zánětlivých buněk. Stejně jako u ABPA nedochází k diseminaci infekce (Paulussen *et al.*, 2016).



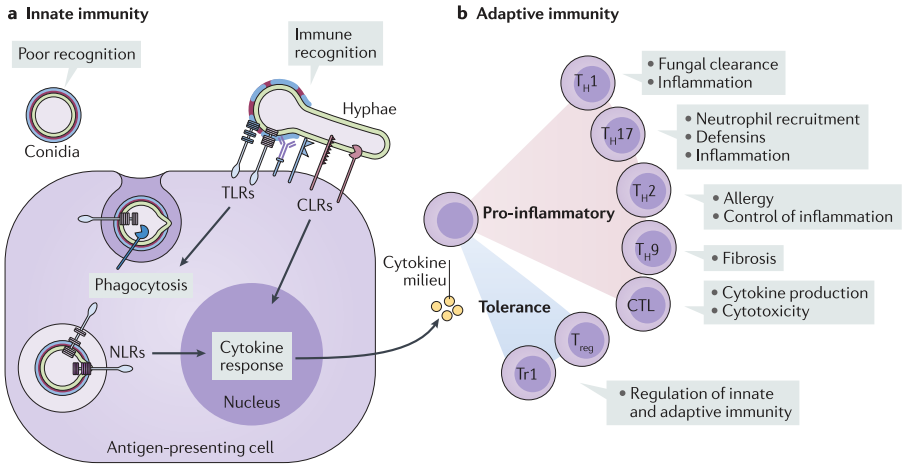
Obrázek 3.4: Plicní aspergilom, převzato z O'Rourke *et al.* (2018).

Do třetí skupiny patří invazivní plicní aspergilóza (IPA), která postihuje imunokompromitované jedince, jejichž počet se stále zvyšuje. Nejčastěji jsou napadáni onkologičtí pacienti, pacienti po transplantacích nebo kortikoidní léčbě. Ročně tomuto onemocnění podlehne 450 000 lidí. Hlavním původcem je *A. fumigatus*, dalšími jsou druhy *A. flavus* a *A. niger* (10 % diagnostikovaných onemocnění) (Paulussen *et al.*, 2016; Poeta, 2016; van de Veerdonk *et al.*, 2017). Klinické příznaky nejsou specifické, patří mezi ně kašel, bolest na hrudi, dušnost a hemoptýza (Bartáková *et al.*, 2007).

Rozpoznání patogenu hostitelským imunitním systémem

Denně člověk vdechuje stovky spor *A. fumigatus*. U zdravých jedinců dochází k jejich mechanickému odstraňování pomocí řasinkového epitelu dýchacích

cest a imunitního systému. Alveolární makrofágy jsou jedinými buňkami, které prochází lumen alveol, a jako první se podílí na odstranění spor fagocytózou. Nicméně tento proces není dostatečně rychlý a mnoho spor adheruje k plicním epitelovým buňkám a začne klíčit (Paulussen *et al.*, 2016). Během klíčení se degraduje povrchová rodletová vrstva, která chrání spory před imunitním systémem. Jedním z polysacharidů, který se dostává na povrch vznikajícího houbového vlákna, je β-1,3-glukan, který funguje jako tzv. molekulární vzor asociovaný s patogeny (pathogen associated molecular pattern, PAMP), evolučně konzervovaná struktura, kterou rozpoznávají fagocyty pomocí receptorů rozpoznávající patogeny (pathogen recognition receptors, PRR). Aktivuje se imunitní odpověď, produkuje se řada pro- i protizánětlivých cytokinů (obr. 3.5). Do zasažené tkáně jsou chemotakticky přitahovány fagocytující neutrofily, které mají stěžejní roli v obraně proti *A. fumigatus*. Pacienti s neutropenií (nízkou hladinou neutrofilů), která často vzniká v důsledku protinádorové léčby, jsou proto nejnáchylnější k rozvoji IPA. K odstranění spor přispívají fagocytózou také některé monocyty a dendritické buňky. Dendritické buňky jsou hlavními antigen-prezentujícími buňkami (antigen-presenting cells, APC) a jsou spojujícím článkem mezi vrozenou a specifickou imunitou. Spouští expresi řady transkripčních faktorů a diferenciaci CD_4^+ T buněk na pomocné T buňky (T-helper) T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{H9}, což vede k aktivaci specifických antifungálních efektorových mechanismů. Dendritické buňky dále aktivují cytotoxické T-lymfocyty. (Latgé *et al.*, 2017; van de Veerdonk *et al.*, 2017).



Obrázek 3.5: Aktivace imunitní odpovědi v průběhu infekce *A. fumigatus*. Receptory TLR (Toll-like receptors), NLR (NOD-like receptors) a CLR (C-type lectin receptors) jsou PRR, které rozpoznávají charakteristické molekuly buněčné stěny hyf jako β-1,3-glukan, galaktomanan a chitin. Po rozpoznání těchto struktur jsou aktivovány pro- a protizánětlivé cytokiny a mechanismy vrozené a následně i specifické imunity. Dendritické buňky spouští diferenciaci pomocných T buněk, které poté aktivují specifické antifungální efektorové mechanismy. Převzato z van de Veerdonk *et al.* (2017).

Jedním z mechanismů, který imunitní systém využívá k likvidaci mikroorganismů, je oxidační vzplanutí. Účastní se ho membránový enzym NADPH oxidáza, který v přítomnosti kyslíku katalyzuje vznik ROS (reactive oxygen species, např. superoxidový radikál, hydroxylový radikál) ve fagocytech. Tyto mo-

lekuly jsou vysoce reaktivní a porušují strukturu stavebních molekul, enzymů i DNA mikroorganismu. Pacienti s poruchou NADPH oxidázy jsou proto velmi náchylní k rozvoji IPA. Buňky specifické imunitní odpovědi (T helper a cytotoxické T-lymfocyty) přispívají jak v boji proti rozšíření infekce, tak k rozvoji zánětu a poškození tkáně (van de Veerdonk *et al.*, 2017).

Obrana *A. fumigatus* proti hostitelskému imunitnímu systému

Existuje několik způsobů, kterými se snaží *A. fumigatus* bránit před hostitelským imunitním systémem a které zvyšují jeho virulenci. Prvním z nich je zmíněné maskování spor pomocí povrchové rodletové vrstvy. Melanin zabraňuje acidifikaci fagozomů a inhibuje NADPH oxidázu. Později produkovaný GAG může navodit apoptózu neutrofilů a inhibovat jejich chemotaxi do místa zánětu (van de Veerdonk *et al.*, 2017). Imunosupresivní účinky má také mykotoxin gliotoxin, který je možné detekovat v séru pacientů s IPA (Kaur & Singh, 2014). Narušuje fosfatidylinositolovou signalizační dráhu, čímž je ovlivněná tvorba fagozomů a snížená schopnost fagocytózy makrofágů (Schlam *et al.*, 2016). Dalším účinkem gliotoxinu je inaktivace NADPH oxidázy (Tsunawaki *et al.*, 2004). Mykotoxin fumagillin obdobně jako gliotoxin inaktivuje NADPH oxidázu a inhibuje neutrofily (Fallon *et al.*, 2010).

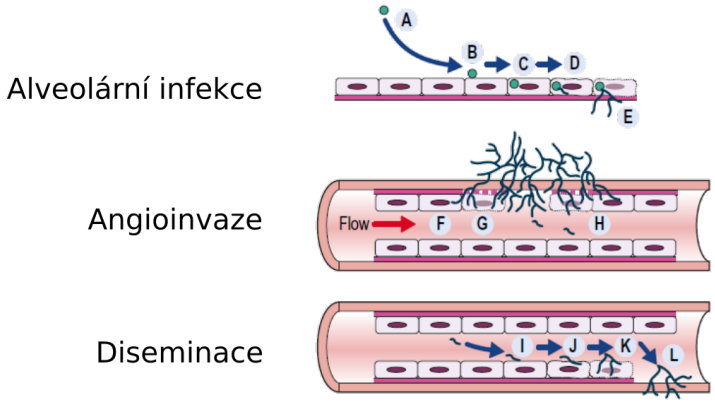
Rozvoj onemocnění

Ačkoliv se *A. fumigatus* umí částečně bránit imunitnímu systému, u zdravých jedinců nedochází k rozvoji IPA vzhledem k množství buněk a mechanismů účastnících se obrany proti infekci. U imunokompromitovaných pacientů však tato aktivita není dostatečná, spory se proto zachycují na epiteliálních buňkách a jsou endocytovány do buněk, kde začínají klíčit (obr. 3.6). Prodlužují se v dlouhá vlákna, která invazivně prorůstají plicní epitel. Následně dochází k angioinvazi (pronikání do cév), cévní stěny jsou poškozeny, vzniká hemoragie a tvoří se tromby. Tento proces je klíčový pro průběh onemocnění, jelikož vede k nekróze tkáně v místě infekce a znemožňuje přístup leukocytů a antimikrobiálních látek. U pacientů s těžkým imunodeficitem může dojít k diseminaci v krevním řečišti a invazi do dalších orgánů včetně centrálního nervového systému (Filler & Sheppard, 2006).

Mortalita se pohybuje mezi 40—90% a odvíjí se od základní diagnózy pacienta, lokalizace infekce, rychlosti určení diagnózy. V současnosti se při léčbě aspergilózy aplikují echinokandiny, amfotericin B (polyen) a triazoly. Lékem první volby bývají triazoly, nicméně v posledních letech se zvyšuje počet multirezistentních kmenů. Hlavní roli v rezistenci hraje zřejmě produkce ECM, účinná antimykotika by proto měla být schopna prostupovat biofilmem (Kaur & Singh, 2014; van de Veerdonk *et al.*, 2017).

Diagnostika

Pro průkaz *A. fumigatus* a potvrzení diagnózy IPA jsou v klinické praxi využívány jak klasické kultivační metody, tak nekultivační moderní diagnostické metody. Zobrazovací metody (CT, RTG) mají v počátečních stádiích nemoci spíše prediktivní charakter, nicméně morfologie CT nálezu je v následných fázích IPA velmi charakteristická. U rizikových pacientů se proto CT vyšetření pravidelně



Obrázek 3.6: Model interakce *A. fumigatus* s plicními epiteliálními buňkami a buňkami cévního endotelu, upraveno podle Filler & Sheppard (2006).

provádí. Nejčastěji testovaným materiálem je sputum, krev, sérum či tekutina získaná bronchoalveolární laváží (BAL). Stejně jako další (semi)invazivní odběry (biopsie plic, plicní resekce) se BAL provádí s ohledem na stav pacienta. Získaný materiál je použit k PCR, sérologickému, histologickému, cytologickému a kultivačnímu vyšetření. K histopatologickému stanovení přítomnosti hub jsou standardně využívány Grocott-Gomori stříbření, PAS (periodic acid Schiff) reakce nebo barvení hematoxylinem-eosinem. Pouze na základě morfologie hyf však nemůžeme přesně určit daný druh kvůli podobnosti s dalšími fungálními patogeny. Ke kultivaci *A. fumigatus* se nejčastěji využívá Sabouraudovo médium. Výhodou kultivace je vysoká specifita, senzitivita se však pohybuje kolem 50% a je časově náročná (24–48 h) (Bartáková *et al.*, 2007).

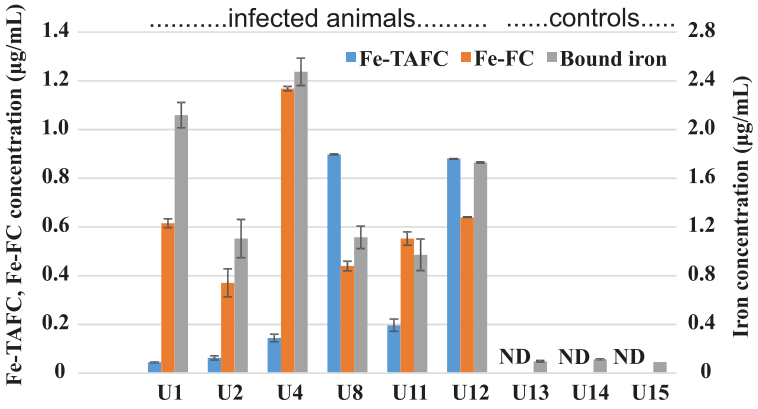
Větší pozornost je věnována nekultivačním diagnostickým metodám, jejichž hlavní předností je rychlost diagnózy. Ty ovšem mohou poskytovat i falešně pozitivní výsledky, například při již probíhající antimykotické nebo antibiotické léčbě. Nejčastěji se využívá detekce galaktomananu pomocí imunochemických metod (latexová aglutinace, ELISA). Problém představuje kolísající senzitivita a falešná pozitivita výsledků dosahující až 20%. Důvodem může být všudypřítomnost spor a možná kontaminace, průnik antigenu z gastrointestinálního traktu nebo reakce s cirkulujícími antigeny. Výsledky se liší také v závislosti na zkoumaném materiálu. Zatímco v tekutině získané pomocí BAL je galaktomanan prokázán, testování séra může mít negativní výsledek. Charakteristickým fungálním markerem je také β-1,3-glukan, jehož detekce je rovněž spojena s falešně pozitivními výsledky, další nevýhodou je poměrně vysoká cena metody. β-1,3-glukan je navíc produkován i dalšími fungálními patogeny, jeho průkaz proto není specifický jen pro IPA (Bartáková *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2010; Luptáková *et al.*, 2017b).

Izolace DNA se provádí z krve, séra nebo tekutiny získané pomocí BAL. Následná amplifikace pomocí PCR je rovněž citlivá ke kontaminaci. Spolu s komerčně dostupnými sadami pro real time PCR však přináší výsledky se srovnatelnou specifitou a senzitivitou jako detekce β-1,3-glukanu (Bartáková *et al.*, 2007; Torelli *et al.*, 2011).

Využití výše uvedených metod umožňuje diagnostikovat IPA, nicméně často chybí jejich optimalizace a výsledky některých vyšetření je nutné doplnit dalšími technikami. Pro diagnostiku invazivních mykóz je však důležitá rychlost

a spolehlivost dané metody.

V potkaním modelu IPA byl navržen způsob rychlé neinvazivní diagnostiky *A. fumigatus* na základě detekce sideroforů pomocí metod hmotnostní spektrometrie (MALDI-FTICR-MS, ESI-FTICR-MS, LA-ICP-MS, viz podkapitola 3.5). Siderofory ferricrocin a triacetylfusarinin C byly detekovány v moči, séru i plicích potkana (obr. 3.7), a to již v koncentraci setin nmol/ml . Díky vysoké specifitě a senzitivitě by tyto metody hmotnostní spektrometrie mohly být v budoucnu použity v diagnostice IPA u člověka (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b).



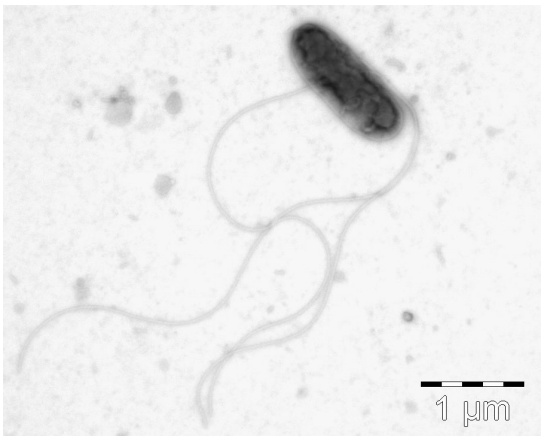
Obrázek 3.7: Množství triacetylfusarininu C, ferricrocinu a vázaného železa naměřené pomocí ESI-CASI-FTICR MS a LA-ICP-MS v moči potkanů infikovaných *A. fumigatus*, převzato z Luptáková *et al.* (2017b).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.1 Úvod

Pseudomonas aeruginosa je gram negativní tyčinkovitá bakterie (obr. 3.8), která se pro svou multirezistenci k antibiotikům stává velmi obávaným oportunním patogenem. Vyskytuje se ubikvitérně v půdě a ve vodě. Ve vodném prostředí často vytváří biofilmy na různých površích, stejně jako v nemocničním prostředí, kde kontaminuje zdravotnické pomůcky. Právě nosokomiální infekce jsou velmi rozšířené a postihují zejména imunokompromitované pacienty. Nejčastěji jsou postiženi pacienti s cystickou fibrózou, chronickou obstrukční plicní nemocí a popáleninami (Gellatly & Hancock, 2013).

P. aeruginosa patří mezi nefermentující proteobakterie (*Gammaproteobacteria*). Délka tyčinky je 1–3 μm, šířka 0,5–1 μm. K pohybu využívá jeden či více polárních bičíků, na povrchu buněčné stěny může mít slizový obal. Tvoří pili typu 4, které slouží k adhezi k buňkám hostitele. Z hlediska tolerance ke kyslíku jsou pseudomonády aerobní až mikroaerofilní a rostou na většině běžných kultivačních půd. Na krevním agaru vykazují výraznou β-hemolýzu, kolonie jsou perleťové až kovově lesklé s pravidelnými okraji. *P. aeruginosa* produkuje řadu pigmentů, např. žlutozelený fluoreskující pyoverdin, modrozelený pyocyanin, červenohnědý pyorubin. Kultury jsou charakteristické jasmínovou vůní.



Obrázek 3.8: *Pseudomonas aeruginosa*, snímek z transmisního elektronového mikroskopu, autor Oldřich Benada.

3.2.2 Virulenční faktory

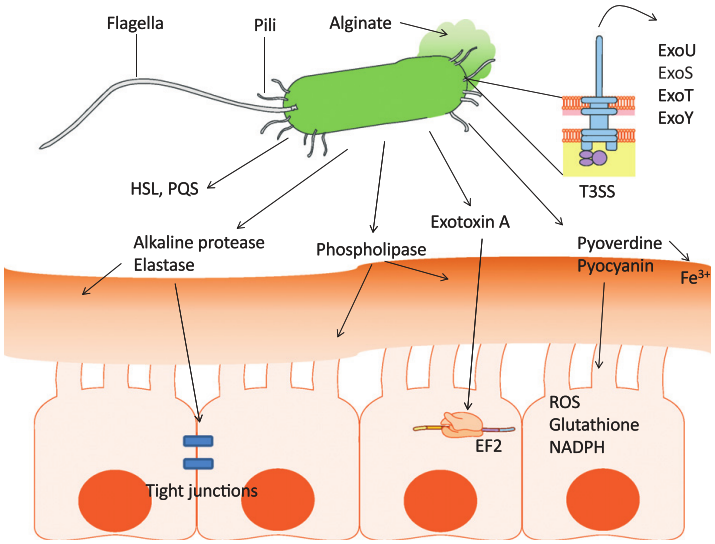
P. aeruginosa disponuje celou řadou virulenčních faktorů (obr. 3.9). Jedním z hlavních je lipopolysacharid (LPS), charakteristická složka vnější membrány gramnegativních bakterií. Nachází se v její vnější polovrstvě a přispívá k její stabilitě vazbou kovových iontů. LPS má funkci endotoxinu a skládá se z lipidu A, polysacharidového core a O-antigenu. Lipid A kotví LPS ve vnější membráně a je rozpoznáván imunitním systémem. Přes polysacharidové core je připojen O-antigen, který je velmi variabilní a určuje antigenní specifitu. LPS, stejně jako bakteriální bičíky a pili, aktivuje Toll-like receptory (TLR, rozpoznávají PAMPs), čímž dochází k indukci imunitní odpovědi. Bičíky a pili kromě pohybu fungují jako

hlavní adheziny. Pomocí pilů dochází také k agregaci bakteriálních buněk a tvorbě mikrokolonií v místech infekce (Gellatly & Hancock, 2013).

Slizový obal pseudomonád je tvořen polysacharidem alginátem. Skládá se z monomerů manurátu a guluronátu, které se vzájemně spojují β-1,4 glykosidickými vazbami. Alginát je hlavní složkou biofilmu mukoidních kmenů bakterií, které jsou typické pro infekce pacientů s cystickou fibrózou. Pro vývoj biofilmu však není přítomnost alginátu nezbytná, u nemukoidních kmenů nebo kmenů neschopných syntézy alginátu tvoří biofilm Pel a Psl polysacharidy (Ryder *et al.*, 2007).

Schopnost přímo injikovat efektorové proteiny do cytosolu hostitelských buněk umožňuje *P. aeruginosa* i některým dalším gramnegativním bakteriím sekreční systém typu 3. U *P. aeruginosa* jsou známy 4 efektorové proteiny: ExoS, ExoT, ExoU, ExoY. Vyskytují se v různém zastoupení, ExoU nebo ExoS jsou však exprimovány téměř u všech kmenů a mají hlavní podíl na virulenci bakterií (Shaver & Hauser, 2004). ExoU se uplatňuje během akutního onemocnění díky cytotoxické fosfolipázové doméně. ExoS má dvě funkce. ADP-ribosyl transférazová aktivita (C-konec proteinu) je spojená s cytotoxicitou a perzistencí bakterií v plicích. N-konec proteinu má GTPázovou aktivitu a způsobuje porušení aktinových vláken a následnou reorganizaci cytoskeletu v buňkách hostitele (Pederson *et al.*, 1999; Shaver & Hauser, 2004).

K poškození tkání přispívá řada extracelulárně produkovaných enzymů. *P. aeruginosa* exprimuje elastázy LasA a LasB, které hydrolyzují elastin a kolagen v tkáni hostitele. LasB spolu s dalšími proteázami ničí některé složky hostitelského imunitního systému (Gellatly & Hancock, 2013; Smith *et al.*, 2015).

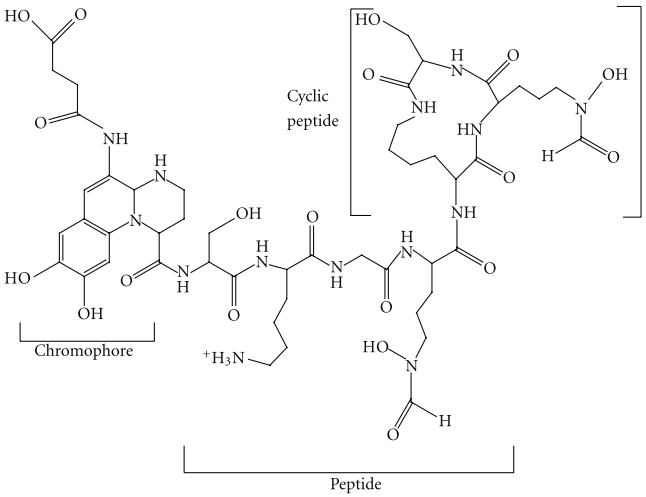


Obrázek 3.9: Virulenční faktory *P. aeruginosa*, převzato z Gellatly & Hancock (2013).

3.2.3 Získávání železa v tkáních

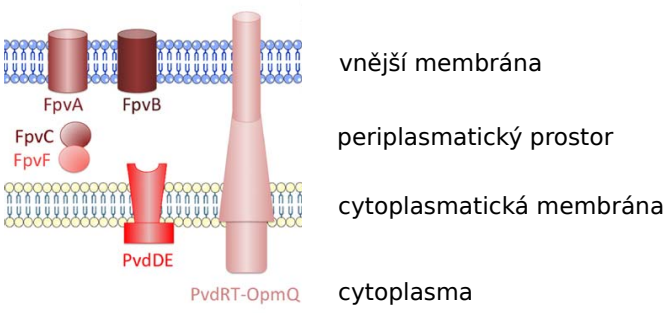
P. aeruginosa syntetizuje 3 siderofory - pyoverdin, pyochelin a nikotianamin (Schalk & Cunrath, 2016). Nejlépe prostudovaný je pyoverdin, který také významně přispívá k virulenci bakterií (Meyer *et al.*, 1996). Core molekuly py-

overdinu tvoří dihydroxychinolinový chromofor, ke kterému se váže variabilní peptidický řetězec a postranní řetězec tvořený obvykle aminem dikarboxylové kyseliny (obr. 3.10). Každý kmen *P. aeruginosa* produkuje alespoň jeden typ pyoverdinu z tří možných variant, které se vzájemně liší peptidickým řetězcem. K syntéze pyoverdinu je potřeba 12 různých proteinů, z nichž jsou 4 syntetázy sloužící k neribozomální syntéze peptidů. Ty jsou využívány pro syntézu chromoforu a peptidického řetězce, jehož variabilita je dána právě různými substráty syntetáz (Schalk & Guillon, 2013).



Obrázek 3.10: Molekula pyoverdinu PVDI, převzato z Peek *et al.* (2012).

Nově vytvořené molekuly pyoverdinu jsou, na rozdíl od molekul pyochelinu, uchovávány v periplasmatickém prostoru, kde mohou zajišťovat také homeostázu kovů. Odtud jsou sekretovány pomocí PvdRT-OpmQ efluxního systému. Vazbu Fe^{III+} zprostředkovává katecholová skupina chromoforu a část peptidického řetězce. Transport pyoverdinu s navázaným železem zpět přes vnější bakteriální membránu je poháněn protonmotivní sílou a zajišťují ho transportní proteiny FpvA a FpvB (obr. 3.11), které prochází přes membránový komplex TonB. Fe^{III+} se uvolňuje v periplasmatickém prostoru pomocí proteinů FpvC a FpvF a následně se redukuje na Fe^{II+}, který je dál do cytoplasmy transportován pomocí FpvDE transportéru (Schalk & Guillon, 2013; Schalk & Cunrath, 2016).



Obrázek 3.11: Transportní systém pyoverdinu přes bakteriální membrány, převzato z Schalk & Cunrath (2016).

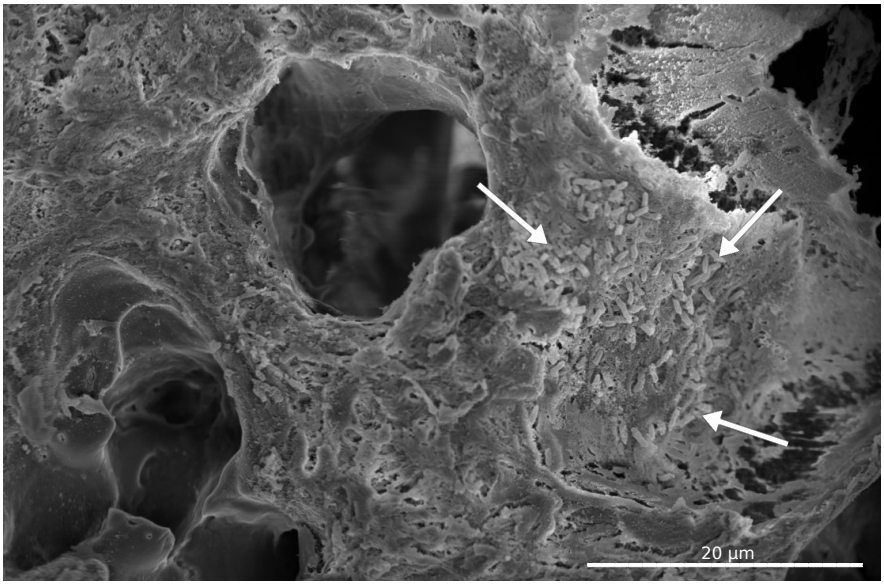
Pyochelin je siderofor fenolátového typu a má nižší afinitu k železu než pyoverdin. Jaký siderofor se bude syntetizovat, závisí na množství dostupného železa. Během růstu bakterie je syntetizován jako první pyochelin. Jakmile se extracelulární koncentrace železa sníží, bakterie začne tvořit pyoverdin (Schalk & Cunrath, 2016). Hostitel se snaží bakteriím zamezit v přístupu k železu, v buňkách proto mohou být syntetizovány molekuly, které vyvazují bakteriální siderofory, nebo dochází ke zvýšení produkce transferrinu v místech zánětu. Kromě syntézy sideroforů využívá *P. aeruginosa* další strategie získávání železa, vychytává přímo hem nebo železo ve formě Fe^{II+}. To je možné pouze v mikroaerofilních podmínkách, kdy nedochází k oxidaci na trojmocné železo, a při vysoké koncentraci železa. Železnatý kation je přes cytoplasmatickou membránu transportován pomocí FeoABC přenašeče, možný je také průchod poriny (Schalk & Cunrath, 2016).

3.2.4 Onemocnění

P. aeruginosa způsobuje obvykle infekce měkkých tkáních. Onemocnění můžeme rozdělit na akutní a chronická, přičemž se průběh obou forem značně liší, stejně jako fenotyp bakterií. Akutní onemocnění se rozvíjí u imunokompromitovaných pacientů (např. s neutropenií, po transplantacích), v důsledku užívání širokospektrých antibiotik a přítomnosti multirezistentních kmenů bakterií. Během akutního onemocnění se infekce může šířit z místa zánětu a stát se systémovou (Gellatly & Hancock, 2013). *P. aeruginosa* je jedním z nejčastějších původců pneumonie u pacientů s umělou plicní ventilací, u nichž se v případě infekce pohybuje mortalita kolem 70 %. Bakterie se vyskytují v planktonické formě, jsou pohyblivé a využívají sekreční systém typu 3. Podstatně více uplatňují virulenční faktory než při vzniku chronického onemocnění, během kterého jsou často úplně nefunkční. Pro chronická onemocnění je charakteristická sesilní forma bakterií a tvorba biofilmu (obr. 3.12). Hlavní výhodou, kterou bakteriím přináší, je ochrana před antibiotiky, která nejsou schopná biofilmem účinně prostupovat. Bakterie ztrácí pili a bičíky a převládá sekrece typu 6. Bakterie nejsou účinně odstraňovány imunitním systémem a mohou ve tkáních perzistovat i mnoho let, aniž by hostitele přímo ohrožovaly na životě (Gellatly & Hancock, 2013; Crousilles *et al.*, 2015).

Chronické plicní infekce jsou typické pro pacienty s cystickou fibrózou (CF). Tito pacienti jsou velmi náchylní ke vzniku infekce v důsledku ztráty baktericidních vlastností periciliární tekutiny. Kolonizace mikroorganismy stimuluje buňky sliznice k další tvorbě hlenu, což vede ke zhoršení celkového stavu pacienta obstrukcí dýchacích cest. Kromě *P. aeruginosa* kolonizují dýchací cesty fibrotických pacientů bakterie rodů *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* a další za vzniku komplexních polymikrobiálních biofilmů. V těchto společenstvech dochází k četným interakcím mikroorganismů, které se mohou projevit změnami produkce virulenčních faktorů a indukce imunitní odpovědi. Tyto biofilmy je tak velmi těžké odstranit. V různých fázích onemocnění a během ontogeneze se v závislosti na celkovém stavu pacienta zastoupení mikroorganismů mění (Caverly *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015).

Spolu s *P. aeruginosa* kolonizuje dýchací cesty pacientů zejména s CF *A. fumigatus*. V porovnání s pacienty s těžkým imunodeficitem se u nich prokázala nižší úmrtnost, která je přikládána antifungálním účinkům *P. aeruginosa*. Pseudomonády zamezují klíčení spor a tvorbě biofilmu *A. fumigatus* působením



Obrázek 3.12: Biofilm vytvořený *P. aeruginosa* v plicích potkana (snímek SEM, bakterie označeny šipkami).

extracelulárně produkovaných malých molekul, například homoserin laktonu a pyocyaninu (Mowat *et al.*, 2010). Dalším mechanismem by mohla být indukce apoptózy v již vytvořených biofilmech *A. fumigatus* zvýšením produkce ROS, aktivací metakaspáz (ortologní enzymy k lidským kaspázám) či snížením mitochondriálního membránového potenciálu (Shirazi *et al.*, 2016). Míra antifungálního působení bakterií se odvíjí od jejich původu a fenotypu. *In vitro* experimenty ukázaly, že nemukoidní kmeny izolované z pacientů s CF mají silnější inhibiční účinky než mukoidní kmeny či kmeny izolované z jiných pacientů. Bakterie tvořící biofilm pak vykazují silnější inhibici než bakterie žijící planktonicky (Ferreira *et al.*, 2015). Ve společných kulturách bylo také detekováno větší množství elastázy produkované pseudomonádou (Smith *et al.*, 2015).

3.2.5 Diagnostika

Pro diagnostiku infekcí způsobených *P. aeruginosa* je stejně jako u *A. fumigatus* vyžadována vysoká senzitivita a rychlost použitých metod. Využívány jsou rovněž klasické kultivační i nekultivační diagnostické metody. U plicních infekcí je testovaným materiálem nejčastěji sputum a tekutina získaná pomocí BAL (Burns & Rolain, 2014).

Na základě Gramova barvení nejsme schopní rozeznat *P. aeruginosa* od jiných tyčinkovitých gramnegativních bakterií. Ke kultivaci se používají jak klasická kultivační média (krevní agar, Endonův agar, MacConkey agar), tak média pro selektivní kultivaci či zvýšení produkce pigmentů (cetrimidový agar, Pseudomonas agar F, Pseudomonas agar P). Charakteristický vzhled kolonií a vůně kultury spolu s pozitivními výsledky oxidázového i katalázového testu mohou být spolehlivými průkazy pro identifikaci bakterie (Deschaght *et al.*, 2009; Burns & Rolain, 2014).

Využití molekulárních metod detekce bakteriální DNA pomocí PCR a real time PCR vykazuje srovnatelnou či vyšší senzitivitu než kultivační metody. Vý-

sledky závisí na zkoumaném materiálu, optimalizaci jeho odběru a protokolů pro tyto metody (Deschaght *et al.*, 2009, 2011; McCulloch *et al.*, 2011). Obdobně je tomu při využití metody ELISA. V závislosti na konkrétní protilátce a u čerstvě kolonizovaných pacientů, zejména u malých dětí, poskytuje ELISA častěji falešně negativní výsledky (Tramper-Stranders *et al.*, 2016; Ratjen *et al.*, 2007).

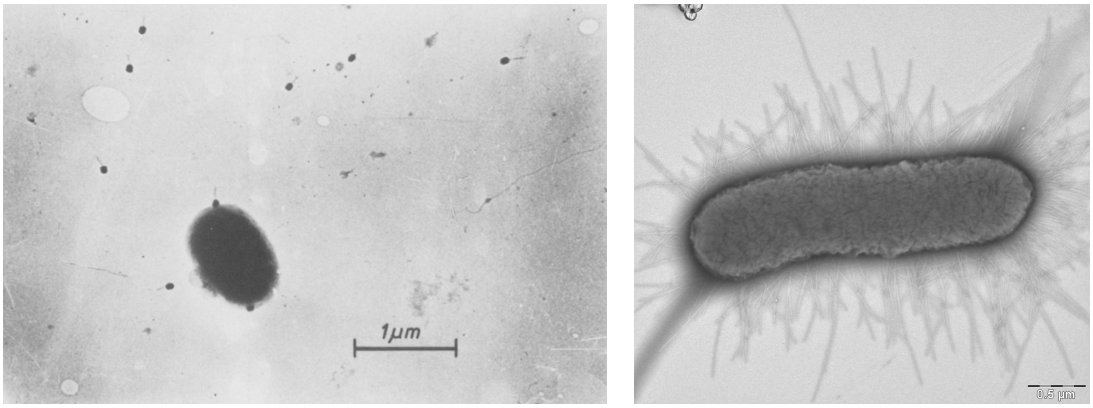
V současnosti se zdá nejvýhodnější využití hmotnostní spektrometrie ve spojení s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI, princip metody ionizace je popsán v podkapitole 3.5) v kombinaci s analyzátorem doby letu (time-of-flight, TOF). Poprvé byla metoda MALDI-TOF použita k průkazu bakterií již v roce 1996 (Holland *et al.*, 1996). Stále častěji se stává součástí mikrobiologických laboratoří, kde se využívá k diagnostice mikroorganismů na základě jejich charakteristického proteinového složení. Mezi ostatními metodami vyniká svou rychlostí, specifitou a celkově nižšími finančními náklady (Ge *et al.*, 2016; Angeletti, 2017).

3.3 Rastrovací elektronová mikroskopie

3.3.1 Úvod

Elektronová mikroskopie je metoda, při níž se svazkem elektronů o velmi vysoké energii zkoumají velice malé objekty. Její počátky datujeme do 30. let 20. století. Konstrukce prvního elektronového mikroskopu (Ruska, 1987) umožnila zkoumání objektů, které do té doby nebylo možné pozorovat světelným mikroskopem, a řadíme ji k nejvýznamnějším objevům 20. století. Předcházela jí řada důležitých poznatků částicové fyziky, počínaje objevem elektronu v roce 1897 J. J. Thomsonem. Později popsal Hans Busch vychylování elektronových paprsků v magnetickém poli solenoidů obdobně, jako je tomu ve světelném mikroskopu při průchodu světla skleněnou čočkou. V roce 1924 Luis de Broglie navrhl, že rychle letící částice mohou mít nejen korpuskulární, ale i vlnový charakter, což bylo potvrzeno elektronovou difrakcí v roce 1927. Od tohoto objevu uplynulo jen pár let ke konstrukci prvního transmisního elektronového mikroskopu (transmission electron microscope, TEM) Ernstem Ruskou a Maxem Knollem v Berlíně roku 1931. O půl století později v roce 1986 byl Ernst Ruska oceněn Nobelovou cenou za fyziku za zásadní práci v elektronové optice a za návrh prvního elektronového mikroskopu (Robinson, 1986; Pietzsch, 2014).

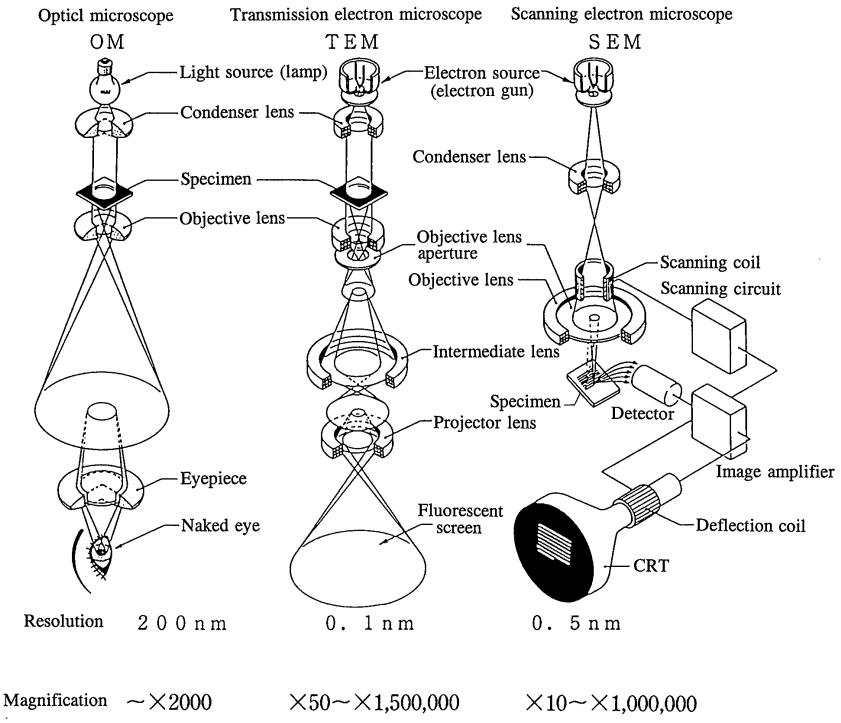
K pozorování povrchů vzorků a vývoji rastrovacího elektronového mikroskopu přispěli H. Mall, M. Knoll či M. von Ardenne. První konstrukci pak představil v roce 1942 V. Zworykin. První komerčně využívaný SEM představila společnost Cambridge Instrument Company v roce 1965, kterou následovala japonská společnost JEOL a další (McMullan, 1995). Od dnešních přístrojů se první elektronové mikroskopy na první pohled lišily velikostí a rozlišením (obr. 3.13). To se u prvních komerčně dostupných elektronových mikroskopů pohybovalo kolem 10 nm, zatímco u dnešních přístrojů dosahuje desetin nanometrů. Pomocí TEM tak můžeme pozorovat např. jednotlivé makromolekuly v buňce, SEM přináší informaci o povrchu nejrůznějších vzorků a kromě biologie nachází uplatnění ve výzkumu materiálů či kriminalistice (Robinson, 1986; McMullan, 1995).



Obrázek 3.13: Jeden z prvních snímků pořízených pomocí TEM E. Ruskou (vlevo) (Ruska, 1987), vpravo snímek *E. coli* (kmen C600) pořízen moderním transmismisním elektronovým mikroskopem Philips CM100, autor Oldřich Benada.

Rozlišovací schopnost mikroskopů

Rozlišovací schopnost optických přístrojů je definována jako nejmenší vzdálenost mezi dvěma body, při které je dokážeme rozeznat jako oddělené. Lidské oko je schopné rozlišit ze vzdálenosti 25 cm dva body vzdálené přibližně 0,2 mm. Světelný mikroskop využívá k zobrazení světelný paprsek procházející soustavou skleněných čoček. Vlnová délka viditelné části spektra je přibližně 390–760 nm. Díky Abbého difrakčnímu limitu nemůžeme u světelného mikroskopu dosáhnout vyššího rozlišení, než je zhruba polovina vlnové délky použitého světla, tedy přibližně 200 nm. S využitím elektronů, jejichž vlnová délka se pohybuje v řádech desetin nm v závislosti na urychlovacím napětí, můžeme teoreticky dosáhnout až atomárního rozlišení. Díky vadám elektromagnetických čoček, které jsou obdobné jako vady skleněných čoček, je však reálné rozlišení v řádech desetin nanometrů (Goldstein *et al.*, 2003; Pietzsch, 2014).



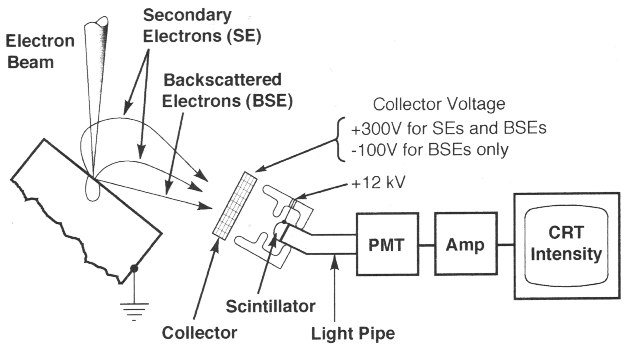
Obrázek 3.14: Rozdíly v konstrukci světelného mikroskopu, TEM a SEM. V TEM jsou detekovány elektrony, které prochází vzorkem. Proto se používá vyšší urychlovací napětí a vzorky musí být velmi tenké (desítky nm). Naopak v SEM se detekují elektrony emitované z povrchu vzorku. V dolní části tubusu proto není potřeba soustava čoček jako u TEM a tloušťka vzorků pro SEM může být i desítky milimetrů. Převzato z JEOL Co. Ltd. (2004).

3.3.2 Princip SEM

Konstrukce mikroskopu a tvorba obrazu

Základními komponenty mikroskopu jsou zdroj elektronů, soustava elektromagnetických čoček, detektor, zobrazovací a záznamové zařízení (obr. 3.14). V tubusu je pomocí několika vakuových pump udržováno vakuum z důvodu zamezení kontaminace a možným srážkám elektronů paprsku s molekulami vzduchu.

V horní části tubusu se nachází elektronová tryska, která slouží jako zdroj elektronů. Elektrony z ní mohou být emitovány různými způsoby, např. termoemisí, kdy dochází k uvolňování elektronů při zahřívání katody. Ta je u starších přístrojů obvykle vyrobena z wolframu či hexaboridu lanthanu. Moderní mikroskopy využívají k emisi elektronů studené nebo Schottkyho zdroje. Vzniklý elektronový paprsek je urychlován energií až 30 keV. Při průchodu soustavou elektromagnetických čoček a clon dochází k jeho fokusaci a ke zmenšení jeho příčného průřezu. Před dopadem na povrch vzorku je paprsek vychylován pomocí cívek. Následně se paprsek pohybuje v řádcích a bod po bodu rastruje přesně definovanou plochu povrchu vzorku. Po dopadu elektronového paprsku na povrch vzorku dochází k řadě elastických i neelastických interakcí elektronů paprsku s atomy vzorku, z nichž je nejvýznamnější vznik sekundárních a odražených elektronů. Tyto signály jsou detekovány pomocí detektorů, zesíleny a zobrazeny na obrazovce pomocí synchronního paprsku (obr. 3.15) (Goldstein *et al.*, 2003).

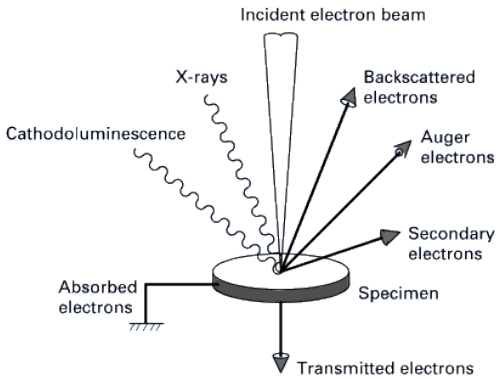


Obrázek 3.15: Standardní Everhart-Thornley detektor. Signál sekundárních nebo odražených elektronů vzniklý skenováním paprsku je pomocí kladného napětí směrován na kolektor. Ve scintilátoru se uvolní záblesk světla, jehož intenzita je přímo úměrná energii elektronů. Světlo je vedeno světlovodem do fotonásobiče, kde dojde k převedení signálu na elektrický a k jeho mnohonásobnému zesílení. K zobrazení se využívá CRT obrazovka. Převzato z Goldstein *et al.* (2003).

Kromě správné fokusace, upravení jasu, kontrastu a korekce osového astigmatismu pomocí stigmátorů můžeme ovlivnit kvalitu výsledného obrazu nastavením některých parametrů přístroje. Mezi ty patří urychlovací napětí, proud a velikost paprsku. Na rozlišení a hloubku ostrosti má vliv rovněž správné nastavení pracovní vzdálenosti a objektivové clony. Nastavením pomalejší rychlosti rastrování snížíme šum ve výsledném obrazu.

Interakce elektronového paprsku se vzorkem

Po dopadu primárních elektronů paprsku na povrch vzorku může vzorek elektrony absorbovat, emitovat, odrážet či propouštět, dále dochází k emisi elektromagnetického záření (obr. 3.16).



Obrázek 3.16: Při interakci elektronového paprsku se vzorkem může dojít k odražení, emisi, průchodu či absorpci elektronů. Dále vzniká rentgenové záření, katodoluminiscence či Augerovy elektrony. Převzato z JEOL (2009).

Tyto signály jsou detekovány pomocí různých detektorů a poskytují o vzorku různé informace. K zobrazení topologie povrchu vzorku jsou využívány sekundární elektrony, odražené elektrony nesou informaci o chemickém složení vzorku. Detekcí charakteristického rentgenového záření získáme informace o prvkovém složení vzorku (3.4).

Nejvyššího rozlišení by bylo možné dosáhnout, pokud by elektronový paprsek interagoval pouze s první vrstvou atomů vzorků. Nicméně k interakcím dochází do hloubky i několika mikrometrů. Interakční objem se odvíjí od energie elektronů, která je dána použitým urychlovacím napětím, od atomového čísla prvků přítomných ve vzorku a od sklonu vzorku vzhledem k paprsku (Goldstein *et al.*, 2003).

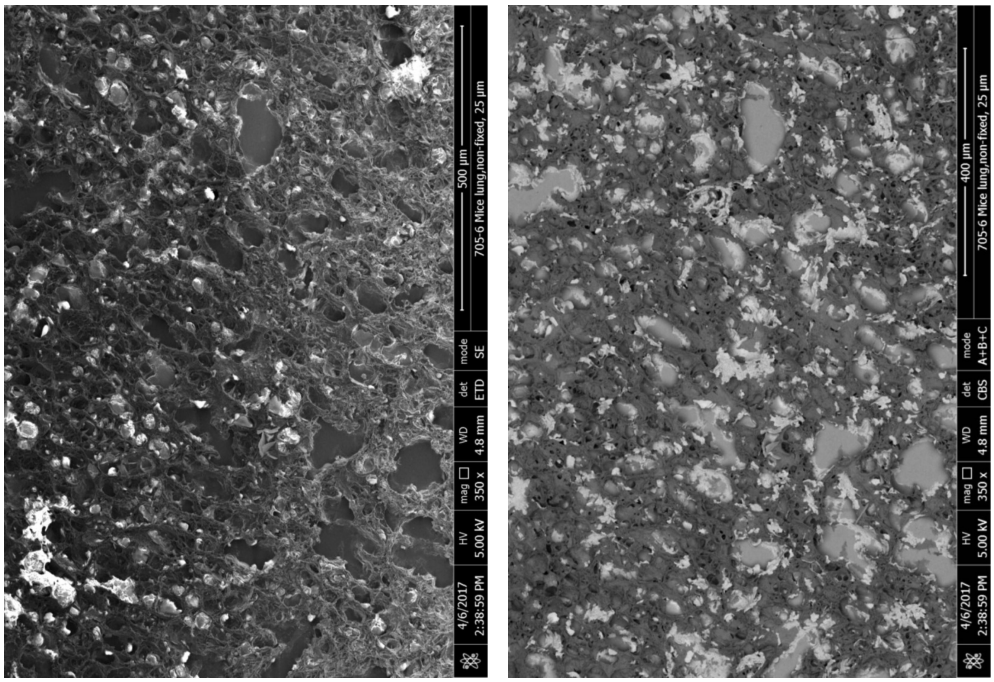
Zobrazení pomocí odražených elektronů

Při elastických interakcích se elektrony mohou rozptýlit do různých úhlů bez energetických ztrát. Velká část těchto elektronů se rozptyluje na povrchu vzorku pod úhlem menším než 90°. Některé elektrony se však odráží pod úhlem větším než 90° a s pouze malými ztrátami energie. Těmto elektronům říkáme zpětně odražené elektrony (backscattered electrons, BSE). Díky vysoké kinetické energii poskytují signál z větší hloubky vzorku. Pravděpodobnost elastických interakcí se zvyšuje s atomovým číslem prvků ve vzorku (s jejich druhou mocninou), jelikož atomová jádra těžších prvků mají silnější pozitivní náboj. Místa vzorku obsahující těžší prvky se proto jeví světlejší, jelikož signál BSE je zde větší (obr. 3.17) (Goldstein *et al.*, 2003; Egerton, 2005).

Zobrazení pomocí sekundárních elektronů

Během neelastických interakcí elektronů paprsku s valenčními elektrony atomů vzorku jsou z jeho obalu vyráženy elektrony, které detekujeme jako sekundární elektrony (secondary electrons, SE). Mají podstatně menší kinetickou energii než BSE (u většiny SE méně než 10 eV) a jsou generovány těsně pod povrchem vzorku. Výtěžek emise SE rovněž ovlivňuje úhel dopadu primárních elektronů. SE tak poskytují u členitého povrchu topografický kontrast, díky čemuž vytváří společně

s vysokou hloubkou ostrosti mikroskopu zdánlivý 3D efekt snímků (Goldstein *et al.*, 2003; Egerton, 2005).



Obrázek 3.17: Porovnání zobrazení pomocí SE (vlevo) a BSE (vpravo). Na snímku vpravo můžeme rozlišit krystaly pufru, které jsou zachyceny na řezu plicní tkáně. S využitím SE nelze tyto krystaly odlišit od plicních alveol. Krystaly kakodylátového pufru obsahují arsen, díky čemuž se jeví světleji než okolní tkáň.

3.3.3 Příprava biologických vzorků pro SEM

Standardní příprava biologických vzorků pro SEM probíhá v těchto krocích:

- fixace
- promytí pufrem
- postfixace
- promytí pufrem
- odvodnění
- sušení metodou kritického bodu
- pokovení

Existuje mnoho modifikací postupu v závislosti na povaze biologického vzorku a prováděných analýzách. V následujícím textu je popsán postup, který byl použit pro přípravu vzorků živočišných tkání pro SEM.

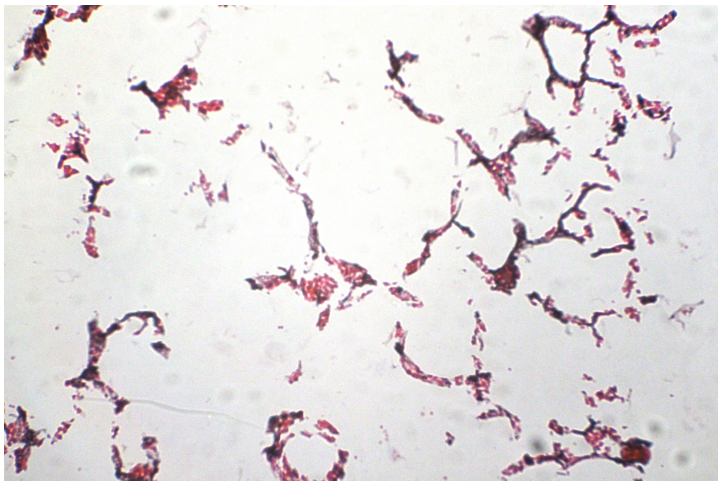
Fixace

Fixace je zásadním krokem přípravy vzorků. Zastavuje metabolické procesy uvnitř buněk a stabilizuje strukturu tkání. Nejčastěji se používá chemická fixace. Volba vhodného fixačního roztoku a provedení fixace závisí na typu tkáně, její velikosti, obsahu vody, pH, fyziologickém stavu a dalších faktorech. Obvykle se používá fixace pufrovanými roztoky glutaraldehydu a formaldehydu. Fixační účinek aldehydů spočívá v tvorbě příčných můstků mezi proteiny, částečně dochází k zachování jejich enzymatických aktivit, čehož se využívá např. v histochemii.

Živočišné tkáně mohou být fixovány imerzně, tj. po odebrání ze zvířete se ihned ponoří do fixačního roztoku. Objem roztoku by měl být zhruba stokrát větší než je objem fixované tkáně. Rychlost průniku chemikálií do tkáně se pohybuje kolem 1–5 μm/s. Doba fixace se odvíjí od velikosti tkáně. Je potřeba zajistit, aby byly velké vzorky fixovány dostatečně dlouho, aby došlo k fixaci buněk i uprostřed tkáně (obr. 3.18.

Dalším způsobem je perfúzní fixace, kdy se v celkové anestezii před usmrcením zvířete vpraví fixační roztok do krevního řečiště. Tím je zajištěno, že v tkáních nedojde k poškození struktur, které může nastat při imerzní fixaci u citlivých tkání, pokud není tkáň vložena do fixačního roztoku okamžitě, nebo v něm není ponořená rovnoměrně či celá. Imerzní fixace se však díky snadnějšímu provedení používána častěji, u vzorků získaných biopsií je to jediný možný způsob chemické fixace (Wisse *et al.*, 2010).

Kryofixace je fyzikální metoda, během které dojde k rychlému a hlubokému zamrazení tkáně např. ponořením do kapalného dusíku nebo pentanu. Tento způsob je vhodný pro vzorky, které se využívají i k dalším analýzám a použití fixačních roztoků by tato měření omezilo (např. MSI). Problém představuje vznik krystalů vody při zamrazení tkáně. Tyto krystaly mohou porušit strukturu tkáně, proto se jejich vzniku předchází použitím kryoprotektivních médií, kterými se tkáně prosycují před zamrazením. Využívají se roztoky glycerolu, sacharózy či dimethylsulfoxidu, které při zamrznutí nevytvoří velké krystaly (Goldstein *et al.*, 2003).



Obrázek 3.18: Ukázka řezu špatně fixované plicní tkáně. Plicní lalok nebyl dostatečně ponořen do fixačního roztoku. Ve tkáni proto nejsou zachované celistvé struktury. Barveno hematoxylinem a eosinem.

Promytí pufrem

Po fixaci je potřeba fixační roztok ze vzorků vymýt, aby následně nedošlo k reakci fixačního a postfixačního činidla. K tomu se používají stejné pufry, které byly použity pro přípravu fixačních roztoků. Osmolarita pufrů by měla odpovídat osmotickým hodnotám tkáně. Nejpoužívanějšími pufry jsou kakododylátový a fosfátový pufr o pH 6,8-–7,2.

Postfixace

K postifixaci vzorků se nejčastěji používá oxid osmičelý jako 1% pufrovaný i nepufrovaný roztok. Vzorky se fixují v roztoku nebo jeho parách. Oxid osmičelý zvýrazňuje buněčné membrány fixací lipidů, které nebyly fixovány pomocí aldehydů. Díky svému vysokému atomovému číslu zvyšuje množství interakcí elektronového paprsku se vzorkem a tím i kontrast obrazu. Oxid osmičelý má silné oxidační účinky. Redukuje se na osmiovou čerň, která způsobuje charakteristické černé zbarvení postfixovaných vzorků (Hanker *et al.*, 1967). Díky těmto účinkům však může porušovat strukturu některých molekul a tím přispět k nežádoucímu poškození tkání (Zhang *et al.*, 2017). Další nevýhodou použití osmia je jeho toxicita.

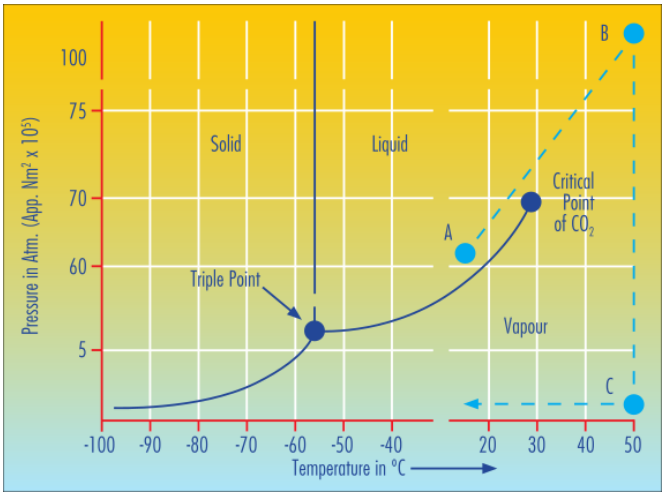
Po postfixaci je opět potřeba odstranit použitý roztok propláchnutím, aby nedošlo k nežádoucím reakcím během dalších kroků přípravy vzorku.

Odvodnění

Vzhledem k tomu, že SEM pracuje za vysokého vakua, musí být vzorky zcela zbaveny vody. Stejně jako u některých vzorků pro světelnou mikroskopii se používá odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou. Vzorky se postupně umístí do roztoků ethanolu o zvyšující se koncentraci (25%, 50%, 75%, 90%, 96%, 100%), methanolu či acetonu. Během odvodňování vzorky nesmí oschnout, jelikož by mohlo dojít k jejich poškození působením povrchového napětí. Alkohol nahradí vodu ve vzorcích.

Sušení metodou kritického bodu

Pro odstranění veškeré kapaliny ze vzorků se používá metoda kritického bodu (critical point drying, CPD). Na rozdíl od sušení vzorků na vzduchu nedochází k poškození jejich struktur působením sil povrchového napětí, může však dojít např. k jejich kompresi. Principem je obejití kritického bodu (fázový diagram, obr. 3.19), pro který je charakteristická teplota T_K a tlak p_K. V tomto bodě mizí rozdíl mezi kapalnou a plynnou fází látek, povrchové napětí mezi oběma fázemi je nulové. K sušení se používá oxid uhličitý, který nahradí ethanol ve vzorku a jehož kritický bod nastává při $T_K = 31$ °C a $p_K = 7{,}3$ MPa. K tomuto procesu se používají speciální přístroje „Critical point dryers“. Tlaková komůrka přístroje, do které se vkládají vzorky s ethanolem, se pomalu a opakovaně napouští kapalným oxidem uhličitým, který nahradí ethanol ve vzorcích. Se zvyšováním teploty roste tlak v komůrce a dosahuje se kritického bodu. Vzniklý plynný oxid uhličitý se pomalu vypouští a po dosažení atmosférického tlaku v komůrce se z ní mohou vyjmout vysušené vzorky (Goldstein *et al.*, 2003).



Obrázek 3.19: Fázový diagram závislosti tlaku p na teplotě T. Jednotlivé křivky představují rozhraní mezi pevnou, kapalnou a plynnou fází látek. Trojný bod určuje stav, při kterém mohou existovat všechna skupenství současně. Kritický bod zakončuje křivku vypařování. Zaznačen je kritický bod pro oxid uhličitý a jeho obejití, kterého se dosáhne zvýšením teploty a tlaku. Převzato z Quorum Technologies Ltd (2015).

Pokovení

Povrch biologických vzorků obvykle není vodivý, což při interakci s elektronovým paprskem vede k nabíjení povrchu vzorku primárními elektrony. Tomuto problému se předchází nanesením tenké vrstvy kovu na povrch vzorku. Nejpoužívanějšími kovy jsou zlato, slitina zlata a palladia a platina. Tloušťka nanášené vrstvy se pohybuje v jednotkách až desítkách nanometrů v závislosti na použitém kovu a vzorku. Pokovení odvádí negativní náboj, chrání vzorky před tepelným poškozením a zvyšuje emisi sekundárních elektronů.

K pokovení slouží speciální přístroje „Sputter coaters“. Vybraný kov se může na vzorek nanášet různými způsoby. Při naprašování kovu se pracovní komora přístroje napouští za vakua inertním plynem, obvykle argonem. Účinkem elektrického napětí vzniká doutnavý výboj, během kterého dojde k ionizaci plynu. Argonové ionty vyráží částice kovu, které se rozptylují díky kolizím s dalšími molekulami plynu. Rozprašovaný kov tak vytvoří rovnoměrnou vrstvu na povrchu vzorku (Goldstein *et al.*, 2003).

3.4 EDS prvková mikroanalýza

3.4.1 Úvod

Prvková mikroanalýza je metoda umožňující analyzovat prvkové složení vzorku na základě detekce charakteristického rentgenového záření. Elektronové mikroskopy mohou být vybaveny detektory, pomocí kterých je měřena energie (energy dispersive spectroscopy, EDS) nebo vlnová délka (wavelenght dispersive spectroscopy, WDS) rentgenového záření vzniklého interakcí elektronového paprsku se vzorkem. Pomocí moderních detektorů je možné analyzovat všechny prvky periodické tabulky kromě vodíku a helia z přesně lokalizovaných míst vzorku (Goldstein *et al.*, 2003). Mikroskop FEI Nova NanoSEM 450 je vybaven EDAX Octane Plus SDD detektorem pro EDS mikroanalýzu, princip WDS detekce nebude dále diskutován.

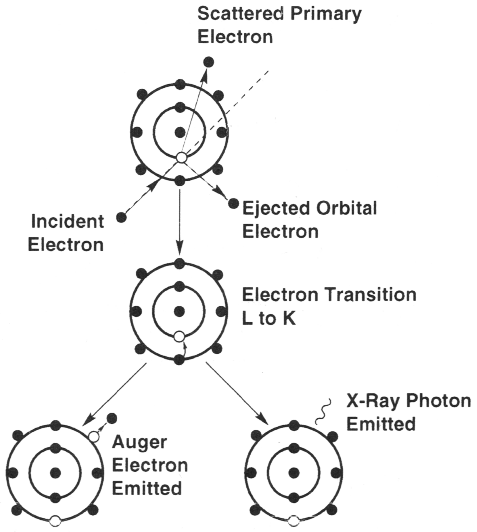
3.4.2 Rentgenové záření a elektronový paprsek

Rentgenové (rtg) záření je elektromagnetické záření s ionizujícími účinky o vlnové délce 0,01–10 nm. Při interakci elektronového paprsku se vzorkem (obr. 3.16) dochází k emisi brzdného i charakteristického rtg záření, jehož energie se u běžných elektronových mikroskopů pohybuje mezi 0,1–20 keV. Při elektrostatické interakci primárního elektronu s atomovým jádrem dochází k jejich zpomalení. Energie, kterou ztratil daný elektron, je vyzářena ve formě brzdného záření „Bremsstrahlung“.

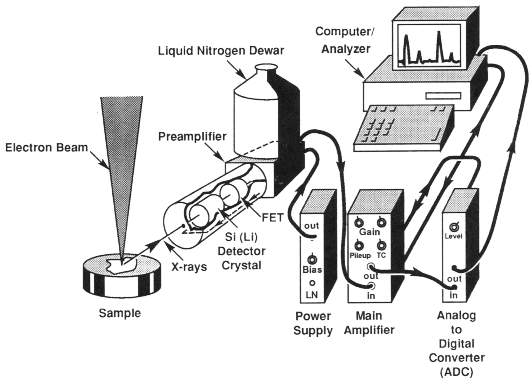
Charakteristické rtg záření je vzorkem emitováno v případě, že primární elektron vyrazí elektron z elektronového obalu atomu vzorku. Podle Bohrova modelu atomu je tento obal tvořen jednotlivými energetickými hladinami, přičemž každá z těchto hladin je charakterizována energií v eV a označena písmeny K, L, M, N. Se zvětšující se vzdáleností od jádra atomu se zvyšuje energie hladin. Po vyražení elektronu z obalu v něm vzniká volné místo, což naruší rovnovážný stav atomu. Následně je toto místo obsazeno elektronem z vyšší energetické hladiny. Rozdíl energií těchto hladin může být vyzářen jako kvantum rtg záření. Energie emitovaného záření je charakteristická pro jednotlivé přeskoky mezi energetickými hladinami. Kromě vyzáření ve formě rtg záření může být energie předána elektronu ve vnější vrstvě obalu, který je následně emitován jako Augerův elektron (obr. 3.20). Energie potřebná pro vyražení elektronů z jednotlivých vrstev se nazývá kritická excitační energie a je rovněž charakteristická pro každou vrstvu všech prvků. Její hodnota se zvyšuje s atomovým číslem prvku (Goldstein *et al.*, 2003).

3.4.3 EDS detekce

Základním detektorem EDS je Si(Li) detektor. Jedná se o pevnolátkový detektor, který je založen na polovodičovém prvku. Schematické znázornění a popis je v obr. 3.21.



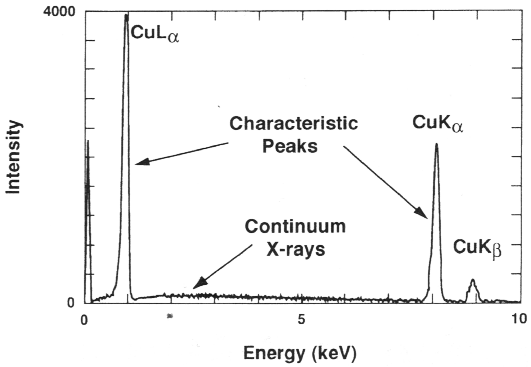
Obrázek 3.20: Interakce elektronového paprsku s elektrony atomového obalu a vznik charakteristického rtg záření a Augerových elektronů. Převzato z Goldstein *et al.* (2003).



Obrázek 3.21: Schematické znázornění EDS detektoru. Emitované rtg záření je detekováno polovodičovým křemíkovým detektorem Si(Li). Absorpcí jednotlivých fotonů záření vznikají páry elektron - díra. Ty migrují v elektrickém poli a vytváří pulzy - signál, který se následně zesílí a vede do analyzátoru. Velikost každého pulzu odpovídá energii fotonu záření. Převzato z Goldstein *et al.* (2003).

Naměřené píky odpovídají energiím jednotlivých prvků. Výška jednotlivých píků neodpovídá přímo koncentraci prvků, nicméně píky majoritně zastoupených prvků jsou výrazně vyšší než píky minoritních a stopových prvků. Pozadí tvoří spojité spektrum brzdného záření (obr. 3.22). Intenzita spojitého záření se zvyšuje se zvyšující se energií a proudem paprsku a také s atomovým číslem vzorku díky většímu náboji atomového jádra. Spojité záření tak přináší informaci o průměrném atomovém čísle vzorku a zároveň určuje minimální množství prvku potřebné k jeho detekci. Pokud neproběhne správná korekce, může spojité zářenívést ke špatné interpretaci výsledků (Goldstein *et al.*, 2003).

Vzniklé emisní spektrum může být zatíženo mnoha artefakty. Mohou vznikat tzv. únikové píky v případě, že není veškerá energie záření použitá k tvorbě párů elektron - díra. V detektoru tak vzniká signál křemíku, který snižuje měřenou



Obrázek 3.22: Ukázka rtg spektra mědi. Zobrazené píky charakteristického záření jsou označeny značkou prvku a konkrétním přechodem elektronu, tzn. pík CuK_α zobrazuje intenzitu kvanta energie uvolněné při přechodu elektronu z vrstvy L do vrstvy K, pík CuK_β přechod z vrstvy M do K apod. Pozadí tvoří spojité záření. Převzato z Goldstein *et al.* (2003).

energii prvku. Dále může dojít k překryvu píku s podobnou energií. Spektra tak nemusí být správně vyhodnocena.

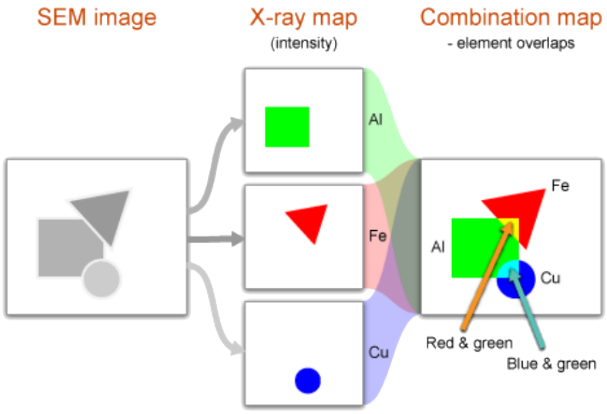
Při EDS mikroanalýze se pracuje s vyšším urychlovacím napětím než při zobrazování pomocí BSE/SE. Důvodem je, že elektronový paprsek musí mít energii dostatečnou pro vyrážení elektronů z obalu atomu. Při zvýšení urychlovacího napětí však zároveň dochází i k větší absorpci záření. Ta může nastat v případě, má-li energie vzniklého záření stejnou hodnotu, jako je kritická excitační energie pro některý jiný prvek ve vzorku.

Lepšího rozlišení píků se dosáhne delší dobou zpracování signálu. Ta ovšem vede i k prodloužení mrtvé doby („dead time“) detektoru, během které se nestihne registrovat nově příchozí signál kvůli zpracovávání předchozího signálu. Mrtvá doba detektoru může být příčinou vzniku systematických chyb, např. posuvu píků (MyScope, 2016).

Mapování prvků

Kromě naměřených spekter z vybraných bodů vzorku je možné vytvořit mapy distribuce prvků přítomných ve vzorku. Vznikají rastrováním plochy a detekcí charakteristického záření prvků ve vzorku stejně jako obraz získaný detekcí SE nebo BSE. Jednotlivá spektra záření se zaznamenávají jako jednotlivé pixely do mapy. Je možné zaznamenat pouze vybrané prvky i všechny prvky přítomné ve vzorku. Jednotlivé mapy prvků je možné kombinovat, jejich překryvem s SE/BSE snímkem pak získáme barevný snímek s plošnou distribucí prvků vzorku (obr. 3.23).

Problémem mapování je, že signál rtg záření je mnohonásobně slabší než signál BSE. Je tedy potřeba docílit co nejvyššího počtu pulzů volbou vyššího urychlovacího napětí a delší doby detekce. Tvorba mapy tak může trvat několik hodin. S delší dobou detekce se však zvyšuje i mrtvá doba detektoru a může kolísat stabilita paprsku. Mapování tak může rovněž být zatíženo tvorbou artefaktů (MyScope, 2016).



Obrázek 3.23: Schéma vytváření map a jejich kombinace, převzato z MyScope (2016).

Příprava vzorků pro EDS

Příprava biologických vzorků pro prvkovou mikroanalýzu probíhá obdobně jako příprava vzorků pro SEM. Je potřeba se vyvarovat fixace těžkými prvky, vhodnější jsou organické fixační roztoky (glutaraldehyd, formaldehyd). Rozdílné může být zajištění vodivosti povrchu. Je nutné zvolit takový prvek, který nebude stínit spektra detekovaných prvků. Vrstva uhlíku o tloušťce 10–20 nm zajistí dostatečnou vodivost vzorků a je vhodná pro detekci kovů v biologických vzorcích. Odpařování uhlíků se provádí za vysokého vakua ve speciálních přístrojích. Některé přístroje typu „Sputter coaters“ mohou být vybaveny hlavami pro odpařování uhlíku (Goldstein *et al.*, 2003).

3.5 Zobrazovací hmotnostní spektrometrie a multimodální zobrazování

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k určení hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů ve vzorku. Výhodou je vysoká citlivost metody a možnost kvalitativního i kvantitativního stanovení analytů. Principem je převedení molekul na ionty v plynné fázi, jejich rozdělení podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) za vysokého vakua v hmotnostním analyzátoru a následná detekce iontů. Ionizace molekul může být navozena mnoha způsoby, např. sprejem, desorpcí, chemicky, pomocí proudu elektronů nebo fotonů (Pól *et al.*, 2010).

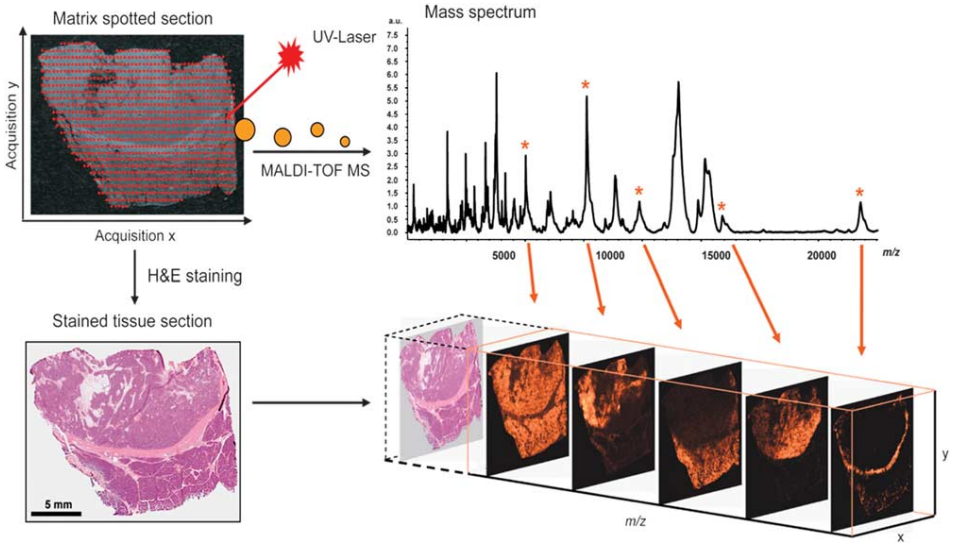
Široké uplatnění v biologii má zejména zobrazovací hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry imaging, MSI). Jedná se o techniku, pomocí které můžeme zobrazit prostorovou distribuci biomolekul ve tkáních. Využívá se k zobrazení lipidů, peptidů, proteinů, metabolitů či kovových iontů. Tyto látky mohou být specifické pro danou tkáň či mikroorganismus a mohou sloužit jako indikátory fyziologických i patologických biologických procesů.

Během měření dochází ke kombinaci analýzy molekul z povrchu s jejich prostorovou informací. Výsledné hmotnostní spektrum je díky tomu dvourozměrné, čímž dochází k vytvoření 2D mapy distribuce pozorovaných molekul. Nejčastěji je k tomu využíván režim skenování („scanning probe“). Ionizační paprsek zasáhne přesně určenou oblast na povrchu vzorku, dojde k desorpci, rozdělení iontů na základě poměru m/z a jejich detekci. Výsledkem je zaznamenané spektrum. Poté se vzorek přesune o předem definovanou vzdálenost do další oblasti a proces se opakuje. Výsledný snímek je sestaven ze všech naměřených spekter předem definované oblasti. Jednotlivé pixely snímku představují jednotlivá naměřená spektra (Pól *et al.*, 2010).

Hlavní techniky desorpční ionizace využívané v MSI jsou MALDI, hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (secondary ion mass spectrometry, SIMS), desorpční elektrosprejová ionizace (desorption electrospray ionization, DESI) nebo laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, LA-ICP-MS). Nejvyužívanější hmotnostní analyzátor je analyzátor doby letu, do popředí se dostávají analyzátory s vysokým rozlišením jako iontová cyklotronová rezonance s Furierovou transformací (FT-ICR) či Orbitrap (Pól *et al.*, 2010; Aichler & Walch, 2015; Havliš *et al.*, 2016). V dalším textu bude stručně popsán princip MALDI-MSI. Tato metoda byla jednou z použitých metod v projektu Multimodálního zobrazování a příprava vzorků probíhala paralelně s přípravou vzorků pro SEM.

3.5.1 MALDI-MSI

Metoda je založená na desorpční ionizaci molekul v přítomnosti matrice schopné absorpce energie laseru. Nejčastěji se jako matrice využívají deriváty kyseliny skořicové a benzoové. Matrice je rovnoměrně nanášena na povrch vzorků pomocí automatických přístrojů, během čehož dochází ke ko-krystalizaci matrice s molekulami vzorku. Po ozáření laserem v hmotnostním spektrometru dojde nejdříve k ionizaci molekul matrice, následně jsou ionizovány molekuly vzorku přenosem protonu z matrice. Proud iontů je urychlen a nasměrován do hmotnostního analy-



Obrázek 3.24: Princip MALDI-MSI. Převzato z Aichler & Walch (2015).

zátoru. Přístroj měří jednotlivá hmotnostní spektra v definovaném rozsahu hodnot m/z skenováním vybrané oblasti vzorku. Po vyhodnocení dat získáme 2D mapu distribuce měřených molekul. Výsledná kvalita zobrazení závisí na rozlišovací schopnosti použitého analyzátoru a citlivosti detekce, dále na parametrech použitého laseru (velikost laserového spotu) či zvolené matrici a jejím nanesením (Pól *et al.*, 2010; Aichler & Walch, 2015).

Tkáňové vzorky pro MALDI-MSI je možné připravit z tkání fixovaných ve formalinu zalitých parafinem nebo z hluboce zmrazených tkání. Ze zmrazené tkáně se v kryostatu připraví řezy o tloušťce 10–20 μm, které se umístí na ITO sklíčko s vodivou povrchovou úpravu. Takto připravené vzorky mohou být dále zpracovány pro měření nebo se promývají v sérii rozpouštědel, aby byly zbaveny nežádoucích molekul (např. odstranění lipidů promytím v sérii alkoholů pro analýzu peptidů či proteinů). Poté se vzorky vysuší a následně je na ně nanesena matrice. Tento krok je v přípravě vzorků velmi důležitý, jelikož velikost krystalů, homogenita pokrytí vzorků matricí a efektivní extrakce požadovaných molekul vzorku ovlivňuje prostorovou distribuci molekul (Pól *et al.*, 2010).

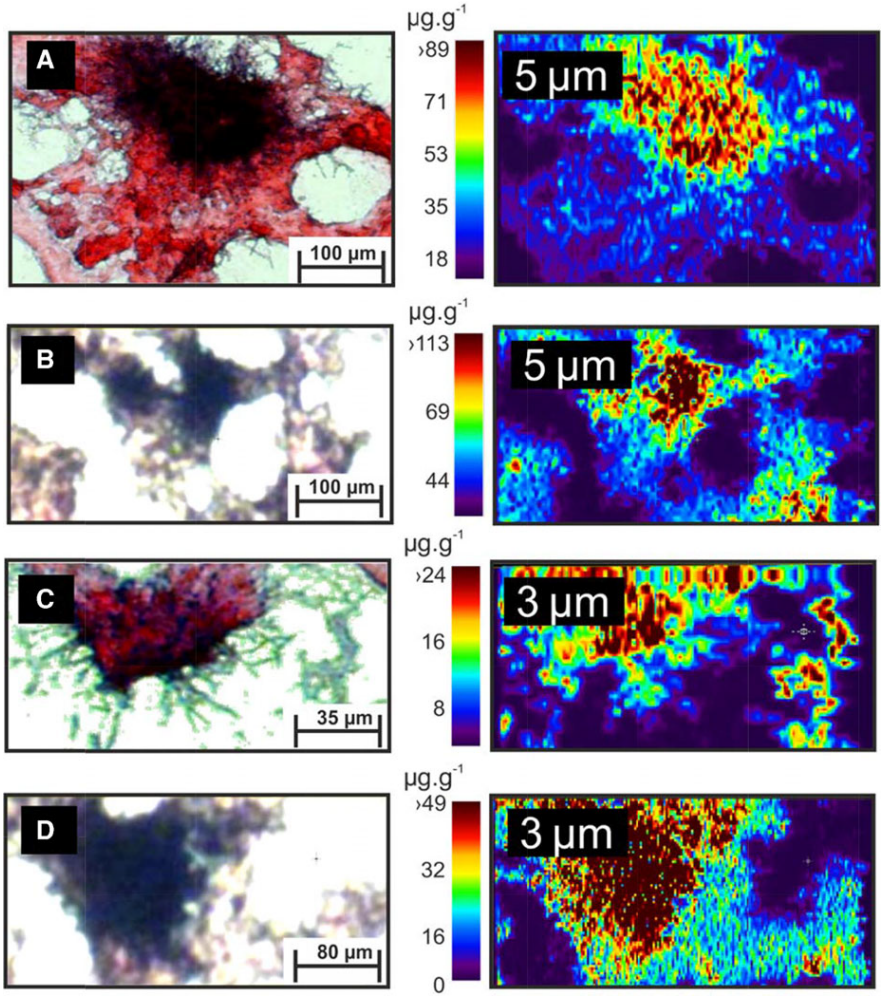
Velkou výhodou MALDI-MSI je možná korelace dat s histologickými, fluorescenčními či elektronmikroskopickými snímky (obr. 3.24). Díky tomu je široce využívanou technikou pro analýzu např. při studiu nádorových onemocnění (Schöne *et al.*, 2016) či infekčních onemocnění (Luptáková *et al.*, 2017b).

3.5.2 Multimodální zobrazování

Multimodální zobrazování je moderní přístup založený na současném využití dvou či více zobrazovacích či analytických metod. Jsou-li tyto metody použity samostatně, jejich výsledky mohou být ovlivněny detekčními limity a rozlišením metod nebo přípravou vzorků (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017a). S využitím více modalit získáme soubor dat, jejichž analýzou můžeme detailněji charakterizovat tkáně či orgánové soustavy a v nich probíhající patofyziolo-

gické procesy. Multimodální zobrazování se využívá např. ke studiu centrálního nervového systému (Pail *et al.*, 2014; Neuschmelting *et al.*, 2016) či infekčních onemocnění (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b).

Ke studiu invazivní plicní aspergilózy v potkaním modelu se kromě MALDI-MSI a SEM dále používají metody LA-ICP-MS (obr. 3.25), ESI-FTICR-MS, pozitronová emisní tomografie či výpočetní tomografie (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017a). Ke korelaci dat byl v naší laboratoři vyvinut analytický software CycloBranch (Novák *et al.*, 2017). Problém představuje odběr a zpracování biologického materiálu s ohledem na více prováděných analýz. Příprava vzorků pro MALDI-MSI a SEM probíhá paralelně, nicméně pro obě metody je vhodný jiný postup zpracování tkání. Roztok glutaraldehydu běžně využívaný k fixaci tkání pro elektronovou mikroskopii (3.3.3) může během MALDI-MSI interferovat s analyzovanými molekulami. Pro MALDI-MSI se preferuje kryofixace nebo fixace formalinem a zalití parafinem (Pól *et al.*, 2010). MALDI-MSI navíc nezanedbatelně poškozuje povrch vzorku (Krasny *et al.*, 2015).



Obrázek 3.25: LA-ICP-MSI distribuce stříbra v řezech plicní tkáně infikované *A. fumigatus*, velikost spotu 3 nebo 5 μm. Převzato z Pluhacek *et al.* (2016).

4. Materiál a metody

4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Seznam použitých chemikálií

Argon (5.3), Linde Gas, ČR
Deionizovaná voda (vodivost $< 0{,}2$ μS/cm, organický uhlík < 50 p.p.b)
Dihydrogenfosforečnan draselný, Amresco, USA
Dusík (5.6), Linde Gas, ČR
Eosin Y (0,5% alkoholový roztok), Bamed s.r.o., ČR
Ethanol (96% roztok, 100% roztok), VWR Chemicals, ČR
Glutaraldehyd (25% roztok ve vodě), SERVA, Německo
Hematoxylin, Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný, VWR Chemicals, ČR
Chlorid draselný, Lachema, ČR
Chlorid sodný, Lachema, ČR
Kakodylan sodný, Alfa Aesar, Německo
Kapalný dusík, Linde, ČR
Kyselina chlorovodíková, Lachema, ČR
Oxid osmičelý (75% Os), Degussa, Německo
Oxid uhličitý (potravinářský E290), Linde Gas, ČR
poly-L-lysin, Sigma-Aldrich, USA
Sacharóza, LACHEM s.r.o, ČR
Souprava pro barvení stříbrem (Silver stain kit), činidla: roztok kyseliny jodisté, roztok boraxu, methenamin stříbra, roztok chloridu zlatitého, roztok thiosulfátu sodného; Sigma-Aldrich, USA
Xylen (99% roztok), Bamed s.r.o., ČR

4.1.2 Roztoky a pufry

Pufrovaný 3% fixační roztok glutaraldehydu

0,1 M kakodylátový pufr	22 ml
25% roztok glutaraldehydu	3 ml

Pufrovaný 4% fixační roztok glutaraldehydu

fosfátový pufr	21 ml
25% roztok glutaraldehydu	4 ml

Fosfátový pufr: pH = 7,4

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,8 mM

Kakodylátový pufr pH: 7,4
pro přípravu fixačních roztoků: 0,1 M
pro proplachování tkání: 0,05 M

$Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3\,H_2O$	0,2 M
HCl	0,2 M

Kyselý alkohol (70% ethanol okyselený HCl)

HCl	1 ml
70% ethanol	400 ml

30% roztok sacharózy (w/v)

sacharóza	30 g
H_2O	70 ml

4.1.3 Pomůcky pro mikroskopii

DPX Mountant, montážní medium, Sigma-Aldrich, USA
Elektricky vodivý stříbrný lak (Silberleitlack), Ferro GmbH, Německo
Elektricky vodivá uhlíková pasta (Wire Glue), Anders Products, USA
ITO (Indium Tin Oxide) sklíčka, Bruker Daltonics, Německo
Imerzní olej, Sigma-Aldrich, USA
Krycí sklíčka (24 x 60 mm), Corning, USA
Kulatá krycí sklíčka (⌀ 12 mm), Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Německo
Terčíky na vzorky pro elektronovou mikroskopii (Aluminium Specimen Stubs, (⌀ 12 mm)), Agar Scientific, UK
Měděné sítky
Terčíky na vzorky pro elektronovou mikroskopii (⌀ 2 cm)
Podložní sklíčka, Bamed s.r.o., ČR
Podložní sklíčka StarFrost, Knittel Glass, Německo
Uhlíkové disky (⌀ 12 mm, Ultra Smooth Carbon Discs), SPI Supplies, USA

4.1.4 Přístrojové vybavení

Binolupa SMXX Citoplast, Carl Zeiss Jena, Německo
Digitální váhy L610D, Sartorius laboratory, Německo
Exsikátor
Kryostat Leica CM1950, Leica Biosystems, Německo
Mrazící box (-80 °C), Thermo Fisher Scientific, USA
Naprašovačka kovů pro SEM Quorum Q150T ES, Quorum, UK
Přístroj pro sušení metodou kritického bodu (Critical point dryer) Quorum K850, Quorum, UK
Rastrovací elektronový mikroskop FEI Nova NanoSEM 450, FEI Brno, ČR
Skener DiMAGE Scan Multi PRO, Minolta, Japonsko
Světelný mikroskop DN45, Lambda s.r.o., ČR s připojenou kamerou Canon EOS 700D

4.1.5 Biologický materiál

Pilotní pokusy

Myš domácí, inbrední kmen BALB/c

Model experimentální aspergilózy

Samice LEWIS potkana

Kmen *Aspergillus fumigatus* 1059 CCF (Sbírka kultur hub, Přírodovědecká fakulta UK, Praha, ČR)

V průběhu celého experimentu byla zvířatům preventivně podávána antibiotika 2 mM ciprofloxacin (Ciprofloxacin Kabi, Fresenius Kabi, ČR) a 0.1 mM polymyxin E (Colomycin, Forest Laboratories, UK), aby nedošlo k rozvoji superinfekce.

Pět dní před aplikací spor *A. fumigatus* byla zvířatům snižována imunitní odpověd podáním léku cyklofosfamid (Endoxan, Baxter, ČR, i.p., 75 mg/kg) a teikoplanin (Targocid, Sanof, ČR, i.m., 35 mg/kg). Den před aplikací spor byly zvířatům tyto látky podány znovu, dávka teikoplaninu byla snížena na 25 mg/kg. V den aplikace spor byl podán teikoplanin ve snížené dávce. Kontrolní zvířata dostala stejná léčiva.

Zvířatům bylo intratracheálně aplikováno 100 μl suspenze spor *A. fumigatus* o koncentraci 10^4 CFU/ml (nízká dávka) nebo 10^8 CFU/ml (vysoká dávka).

Experiment byl ukončen po třech dnech od aplikace spor. Ze zvířat byly odebrány tkáně a jiný materiál s ohledem na následné analýzy.

Zvířecí model experimentální aspergilózy byl proveden v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a s povolením Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT-21235/2013-12) a Odborné komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

Model pro infekce vyvolané *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, klinický izolát

Pro pokusy byly využity dva modely:

- Laboratorní myš, intramuskulární podání 50 μl suspenze kultury *P. aeruginosa*, lýtkový sval odebrán po 24 hodinách
- Samice LEWIS potkana, intratracheální podání 0,15 ml suspenze kultury *P. aeruginosa*, po 4 hodinách odebrány tkáně a jiný materiál

4.2 Metody a pracovní postupy

4.2.1 Zpracování tkání

Tkáně byly ihned po odebrání ze zvířete zpracovány dvěma způsoby:

- imerzní fixace 3–4% roztokem glutaraldehydu,
- zmrazení v kapalném dusíku.

Fixace v roztoku glutaraldehydu trvala 24–48 h, následně jsme tkáně propláchli v příslušném pufru třikrát 30 min a poté zmrazili v kapalném dusíku. Zmrazená tkáň byla uchovávána při - 80 °C.

U pokusu 5.7 jsme rozdělili plíce potkana fixované 4% roztokem glutaraldehydu na jednotlivé laloky a propláchli v pufru. Vybrané laloky jsme umístili na 96 h do 30% roztoku sacharózy, který slouží jako kryoprotektivní médium. Poté jsme laloky zmrazili v tekutém dusíku. Vliv použití kryoprotektivního média na zachování struktury tkáně je komentován v diskuzi.

U pokusu 5.4 jsme vyzkoušeli fixaci tkáně po předešlém zmrazení. Částečně rozmrazenou tkáň jsme vložili do 4% roztoku glutaraldehydu na 48 h a následně do 30% roztoku sacharózy na 72 h. Poté jsme laloky zmrazili v tekutém dusíku. Vliv této fixace na zachování tkáně je komentován v závěru pokusu.

Při práci s infekčním materiálem byla dodržena předepsaná ochranná opatření.

4.2.2 Příprava řezů v kryostatu

Hluboce zmrazené tkáně jsme před začátkem krájení v kryostatu temperovali na požadovanou teplotu po dobu 40 min. Stejně dlouho se temperují také všechny požadované pomůcky pro krájení. Tkáň se ukotví na terčík v kryostatu namrazením do malého objemu vody a následně se krájí na požadovanou tloušťku řezu. Nastavení teploty v kryostatu se liší u jednotlivých tkání a způsobů fixace. Plíce myši/potkana jsme krájeli při teplotách:

- - 13 °C pro zmrazenou tkáň,
- - 20 °C pro fixovanou tkáň,
- - 26 °C pro tkáně prosycené roztokem sacharózy.

Připravené řezy jsme umístili podle dalšího zpracování na:

1. mikroskopická podložní sklíčka pro pilotní pokusy,
2. StarFrost sklíčka s povrchovou úpravou s pozitivním nábojem pro histologické barvení,
3. ITO sklíčka na MALDI a prvkovou mikroanalýzu pomocí SEM,
4. hladinu zmraženého fixačního roztoku glutaraldehydu v 6-jamkové destičce.

StarFrost sklíčka vykazují silné adherentní vlastnosti k řezům, čímž je zamezeno možné deformaci či odplavení vzorků během histologického barvení. ITO sklíčka mají na povrchu vodivou vrstvu, jejich použití je proto výhodné pro SEM. Na jedno sklíčko jsme vždy umístili 2–4 následné řezy tkáně.

Lepení řezů na sklíčka jsme prováděli jedním se dvou způsobů:

- řezy jsme natavili teplem přiložením prstu na spodní stranu sklíčka, čímž se řezy přilepily,
- řezy jsme přilepili pouze přiložením ke sklíčku.

V případech 1–3 jsme umístili sklíčka do exsikátoru, kde se sušila po dobu 45 min. 6-jamkovou destičku jsme umístili do lednice, aby došlo k pozvolnému rozmrazení roztoku glutaraldehydu a následně jsme vzorky zpracovali dle postupu pro rastrovací elektronovou mikroskopii.

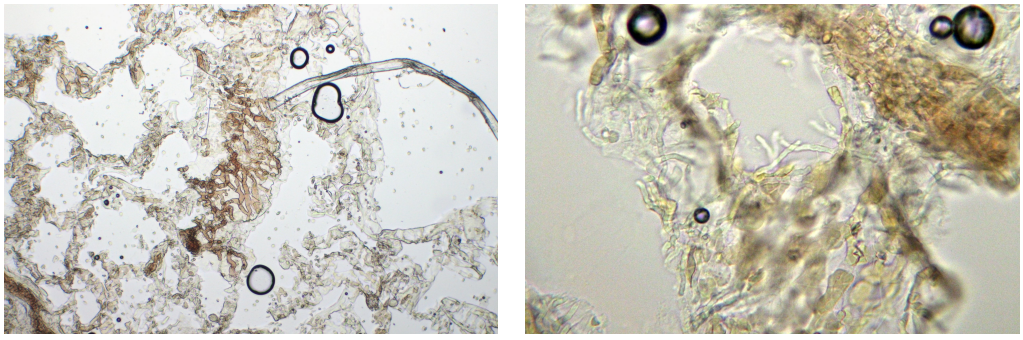
Vzhledem k tomu, že jsme pro jednotlivé pokusy používali různý biologický materiál a vzorky jsme zpracovávali odlišnými způsoby s ohledem na prováděnou analýzu, je v kapitole „Výsledky“ pro každý pokus uveden stručný popis přípravy vzorků.



Obrázek 4.1: Tkáň infikovaná *A. fumigatus* upevněná v terčíku v držáku vzorků v kryostatu (vlevo). ITO skla s přilepenými řezy infekční (červené) a kontrolní (bílé) tkáně (vpravo). Červené zbarvení infikované tkáně je způsobeno masivní hemoragií.

4.2.3 Pozorování nativních preparátů

Pro ověření přítomnosti hub v infikované tkáni jsme v kryostatu umístili řezy na podložní sklíčko, nechali zaschnout, přidali kapku vody a přikryli krycím sklíčkem. Přítomnost houbových vláken jsme vyhodnotili pomocí světelného mikroskopu. V případě pozitivního nálezu jsme z dané tkáně připravili vzorky pro elektronovou mikroskopii.



Obrázek 4.2: Nativní preparáty plic potkana obsahující houbová vlákna.

4.2.4 Histologické barvení

K obarvení buněčných struktur v infikované tkáni jsme použili kombinaci hematoxylinu a eosinu. V jednom preparátu se tak obarví acidofilní i bazofilní struktury. Hematoxylin je bazické barvivo, které barví jádra buněk modře. Eosin barví acidofilní struktury odstíny růžové a červené barvy.

Postup:

1. Zavodnění řezů sestupnou řadou roztoků ethanolu: sklíčka s řezy vložíme do: 100% ethanolu na třikrát 3 min, 95% ethanolu na 3 min, 80% ethanolu na 3 min a nakonec do deionizované vody na 5 min.

2. Barvení hematoxylinem: ze sklíček opatrně odsajeme přebytečnou vodu a vložíme je do roztoku hematoxylinu na 3 min. Poté je opláchneme v deionizované vodě a po dobu 5 min proplachujeme v pitné vodě. Následně sklíčka rychle ponoříme 8-12 krát do kyselého alkoholu. Opláchneme v pitné vodě dvakrát 1 min a v deionizované vodě jedenkrát 2 min.

3. Barvení eosinem a dehydratace: ze sklíček opatrně odsajeme přebytečnou vodu a vložíme je do roztoku eosinu na 30 s. Poté sklíčka promyjeme třikrát 5 min v 95% ethanolu a následně třikrát 5 min ve 100% ethanolu. Nakonec řezy projasníme třikrát 15 min ve xylenu, zakápneme montážním médiem a vytvoříme trvalé preparáty.

4.2.5 Barvení pro průkaz hub

Pro průkaz hub ve tkáni jsme použili soupravu pro barvení stříbrem - modifikované Grocott-Gomori stříbření. Při barvení jsou polysacharidy buněčné stěny hub oxidovány na aldehydy pomocí kyseliny jodisté. V zásaditém pH aldehydová skupina redukuje ionty stříbra na kovové stříbro. Reakcí se solemi zlata vzniká stabilnější zlatý komplex, nadbytečné zlato je vymyto thiosíranem. Buněčná stěna hub je obarvena tmavě hnědě až černě. Jako kontrastní barvení jsme použili barvení eosinem.

Postup:

1. Všechna činidla temperujeme na pokojovou teplotu.

2. Příprava pracovního roztoku methenaminu stříbra - methenamin stříbra smícháme s 8 ml roztoku boraxu a 100 ml deionizované vody. Připravený roztok umístíme do vodní lázně o teplotě 62 °C.

3. Sklíčka s řezy tkáně infikované *A. fumigatus* po vysušení v exsikátoru vložíme na 5 min do roztoku kyseliny jodisté.

4. Po vyjmutí promyjeme sklíčka v šesti lázních deionizované vody.

5. Sklíčka vložíme do předehřátého pracovního roztoku methenaminu stříbra, po 20 minutách zkontrolujeme obarvení pod mikroskopem. Po dosažení požadované barevné intenzity (cca 25 min) vyjmeme sklíčka z roztoku. Po celou dobu barvení udržujeme teplotu lázně.

6. Sklíčka promyjeme šestkrát v deionizované vodě o pokojové teplotě.

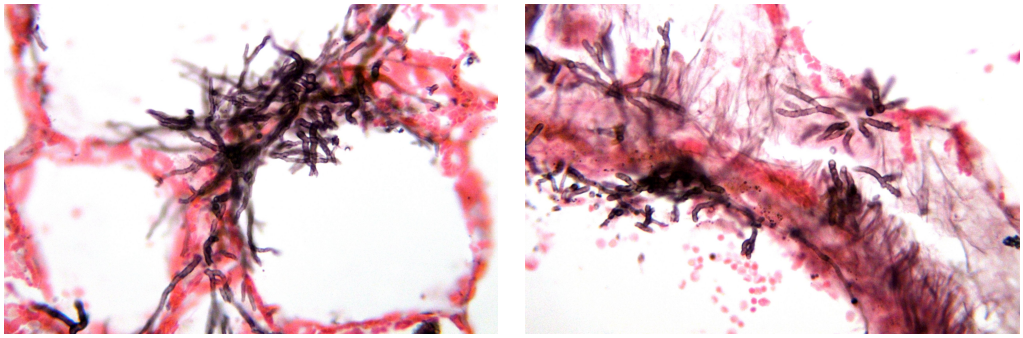
7. Tónujeme řezy v roztoku chloridu zlatitého po dobu 30 s.

8. Promyjeme sklíčka šestkrát v deionizované vodě o pokojové teplotě.

9. Vložíme sklíčka do roztoku thiosulfátu sodného na 2 min.

10. Promyjeme sklíčka pod tekoucí pitnou vodou.

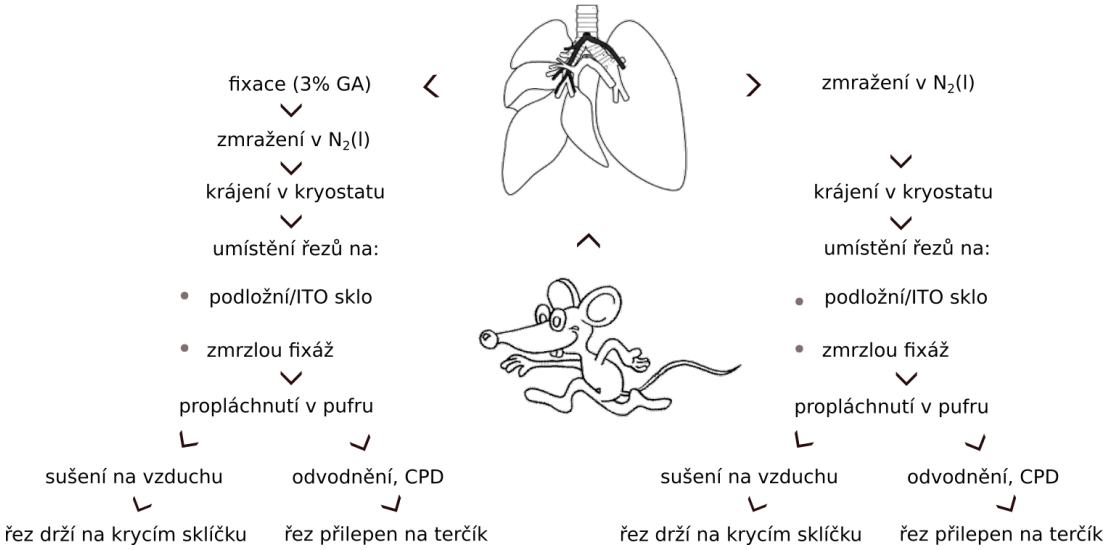
11. Kontrastně obarvíme pomocí eosinu: vložíme sklíčka do roztoku eosinu na 30 s.
12. Promyjeme v 95% ethanolu po dobu třikrát 5 min.
13. Promyjeme v 100% ethanolu po dobu třikrát 5 min.
14. Pro pozorování ve světelném mikroskopu projasníme třikrát 15 min ve xylenu, zakápneme montážním médiem a vytvoříme trvalé preparáty.
15. Pro pozorování v rastrovacím elektronovém mikroskopu vyjmeme z ethanolu, vysušíme v exsikátoru, oskenujeme a pouhlíkujeme.



Obrázek 4.3: Stříbrem obarvená houbová vlákna prorůstající plicní alveoly (vlevo) a stěnu bronchu (vpravo).

4.2.6 Příprava vzorků pro rastrovací elektronovou mikroskopii

Možnosti přípravy vzorků tkání pro elektronovou mikroskopii shrnuje schéma:



Řezy umístěné na podložní sklíčka během pilotních pokusů

Po vysušení v exsikátoru jsme tato sklíčka oskenovali pomocí skeneru s vysokým rozlišením. Následně jsme sklíčka rozlámali, abychom dostali jednotlivé řezy. Ty jsme přilepili na terčíky pro vzorky pro SEM pomocí uhlíkových disků a pokovili 3 nm platiny.

Řezy umístěné na ITO sklíčka

Sklíčka, která byla připravena pro prvkovou mikroanalýzu, byla nabarvena stříbrem pro průkaz hub. Po vysušení v exsikátoru a oskenování jsme sklíčka přilepili na terčíky pomocí uhlíkových disků a elektricky vodivým lakem jsme z terčíku na povrch sklíčka vytvořili vodivé svody a nechali sušit 24 h na vzduchu. Poté jsme sklíčka pokryli 10 nm vrstvou uhlíku.

Sklíčka, na kterých probíhala zároveň MALDI analýza, jsme po vysušení v exsikátoru a oskenování přilepili na terčíky, vytvořili vodivé svody a nechali sušit 24 h na vzduchu. Následně jsme sklíčka pokryli 10 nm vrstvou uhlíku, ale pouze z jedné poloviny. Tuto část sklíčka jsme použili pro SEM, na druhé polovině proběhla MALDI analýza.

V pokusu 5.6 jsme umístili ITO sklíčko s řezy nefixované tkáně do Petriho misky do par 25% roztoku glutaraldehydu na 72 h. Výsledek fixace je komentován v závěru pokusu.

Sklíčka StarFrost, na která byly umístěny řezy určené pro histologické barvení, byla pozorována pouze pod světelným mikroskopem.

Řezy umístěné na hladinu zmraženého fixačního roztoku

Po pomalém rozmrazení fixačního roztoku při 4 °C a temperaci na pokojovou teplotu jsme tyto řezy propláchli pufrem třikrát 20 min. Poté jsme řezy nabrali na kulatá krycí sklíčka pro SEM nebo na nalámaná klasická krycí sklíčka o vhodné velikosti (v případě řezů plic potkana, které přesahovaly velikost kulatých sklíček). Tato sklíčka jsme:

- nechali uschnout na vzduchu,
- vložili do měděných sítěk. Následně jsme řezy odvodnili vzestupnou alkoholovou řadou, tj. 25%, 50%, 75%, 90%, 96% a 100% ethanolem. Poté jsme řezy vysušili metodou kritického bodu.

Řezy sušené na vzduchu držely na sklíčkách, která jsme po oskenování přilepili na terčíky. Řezy v měděných síťkách po vysušení metodou kritického bodu na sklíčkách nedržely, po oskenování jsme je proto přilepili přímo na uhlíkové disky na terčících. Poté jsme vzorky pokryli 3 nm vrstvou platiny nebo 10 nm vrstvou uhlíku.

U pokusu 5.3 jsme kulatá krycí sklíčka pokryli vrstvou poly-L-lysinu, který zajišťuje adhezi řezu ke sklíčku. Ukázalo se, že řezy sušené na vzduchu na sklíčkách drží i bez této vrstvy. Zároveň byly některé z těchto řezů postfixovány v parách oxidu osmičelého po dobu 2 h. Vliv postfixace na strukturu tkáně je popsán v závěru pokusu.

Obecný popis přípravy vzorků pro SEM je uveden v kapitole 3.3.3, kde je popsána metoda sušení kritickým bodem a pokovování vzorků. K sušení kritickým bodem jsme použili přístroj Quorum K850 a pro pokovení vzorků přístroj Quorum Q150T ES.

Pozorování celých plicních laloků

Kromě řezů tkáně jsme pro mikroskopii připravili celé plicní laloky (pokus 5.1) podle standardního postupu přípravy biologických vzorků 3.3.3). Vybrané

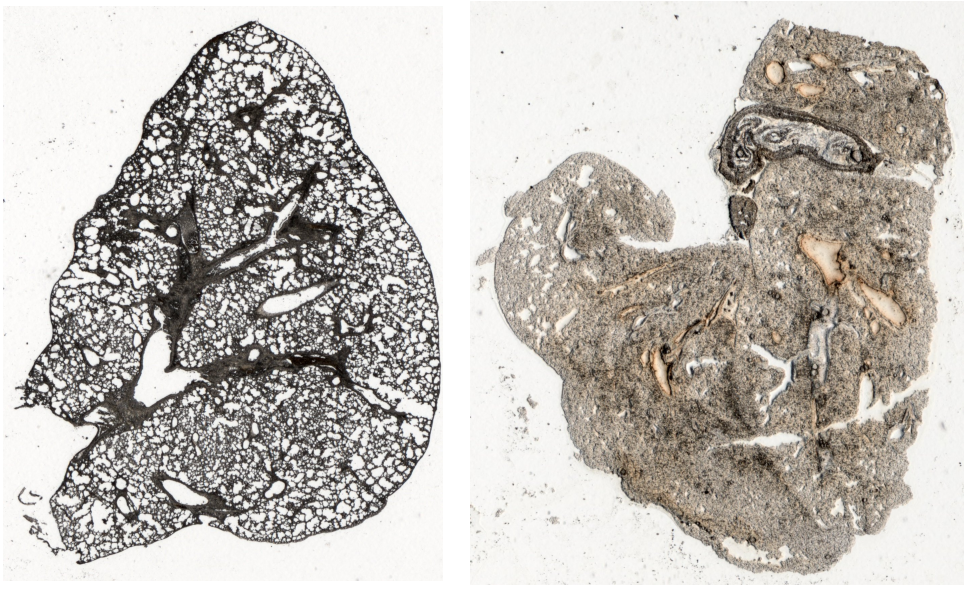
laloky jsme:

- po propláchnutí v pufru seřízli žiletkou při pokojové teplotě,
- po odvodnění alkoholovou řadou rozlomili metodou „freeze crashing“ (FC), lalok se umístí do kapalného dusíku a pomocí pinzety se rozlomí,
- pozorovali bez lámání či seříznutí.

Po vysušení metodou kritického bodu jsme přilepili laloky na terčíky elektricky vodivým stříbrným lakem a pokovili 3 nm platiny.

4.2.7 Skenování vzorků

Všechny řezy jsme oskenovali pomocí skeneru DiMAGE Scan Multi Pro s rozlišením 4800 DPI. Výhodou tohoto přístroje je možnost skenování velké plochy s vysokým rozlišením. Takto získané snímky jsme korelovali s výsledky dalších analýz, tj. s daty získanými z MALDI nebo s elektronmikroskopickými snímky. Zároveň tyto snímky poskytují dostatečnou informaci o stavu tkáně (obr. 4.4).



Obrázek 4.4: Snímky ze skeneru DiMAGE Scan Multi Pro. Mezi řezy fixované (vpravo) a nefixované (vlevo) tkáně je na první pohled viditelný rozdíl. U fixované tkáně můžeme pozorovat jednotlivé alveoly, u nefixované jsou viditelné pouze velké struktury.

4.2.8 Korelace elektronmikroskopických a optických snímků

Ke korelaci dat jsme použili program FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). Pomocí pluginu TurboReg jsme registrovali elektronmikroskopické a optické snímky (Keene *et al.*, 2014).

Postup:

1. Otevři FIJI a obrázky, které mají být korelovány.

2. Oba obrázky musí být 8-bitové a ve stupních šedi. Pokud tomu tak není, nastav pomocí Image/Type/8-bit.

3. Oba obrázky musí být stejně orientované. Není-li tomu tak, použij Image/Transform/Flip or Rotate.

4. V případě potřeby uprav kontrast a jas pomocí Image/Adjust/Brightness/ Contrast.

5. Otevři plugin TurboReg - Plugins/Registration/TurboReg.

6. Nastav elektronmikroskopický snímek jako „Target image“ a snímek ze skeneru jako „Source image“.

7. Označ pole „Bilinear“, „Save on exit“ a „Acurate“.

8. V obou snímcích jsou 4 barevné křížky - zelený nahoře vlevo, růžový nahoře vpravo, žlutý vlevo dole a modrý vpravo dole. Umísti křížky stejné barvy na odpovídající místo v obou snímcích. Pro lepší orientaci ve snímcích můžeš snímky zvětšit.

9. Označ pole „Manual“, můžeš uložit „Landmarks“. Otevře se nový obrázek „Registered“.

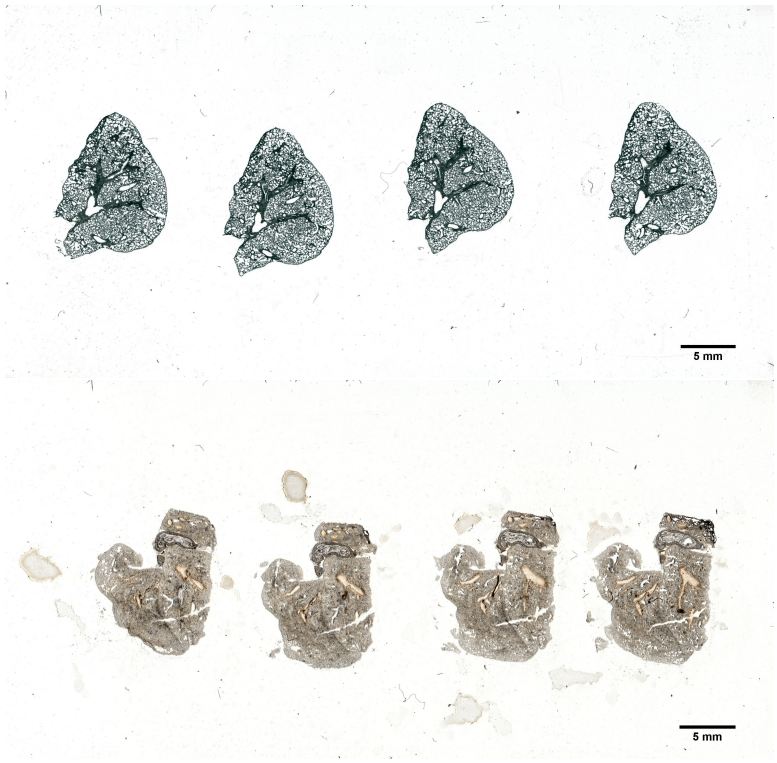
10. Nastav bitovou hloubku obrázku na 8 bit.

11. Použij „Overlay“ - Image/Overlay/Add Image. Nastav přeložení elektronmikroskopického snímku, průhlednost a označ „OK“. Vytvoří se výsledný korelovaný obraz, který je možné uložit v libovolném formátu.

5. Výsledky

Na základě výsledků získaných v laboratoři v rámci projektu „Multimodální zobrazování“ (Pluhacek *et al.*, 2016) jsme se rozhodli optimalizovat přípravu tkání pro společnou analýzu v SEM a MALDI-MSI. V běžně užívaném postupu přípravy vzorků pro MALDI-MSI se používá nefixovaná tkáň. Naopak pro přípravu vzorků pro SEM je zpravidla nutné užívat fixaci biologického materiálu. Tyto dva zdánlivě nekompatibilní přístupy jsme se pokusili optimalizovat tak, abychom pomocí MALDI-MSI a SEM byli schopni analyzovat stejný materiál. Kritériem bylo optimální zachování struktury plicní tkáně spolu se zachováním detekčních limitů analyzovaných mikrobiálních sideroforů.

V pokusech 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 jsme vyzkoušeli různé způsoby fixace a zpracování tkání s ohledem na obě analýzy. Optimalizace přípravy vzorků by měla vést k zobrazení mikroorganismů ve tkáních pomocí SEM a k současné detekci mikrobiálních sideroforů pomocí MALDI-MSI na jednom řezu, případně na následných řezech infikované tkáně (pokusy 5.5, 5.6, 5.7). Výsledky pokusu 5.8 by měly vést k optimalizaci přípravy histologických vzorků pro EDS prvkovou mikroanalýzu v SEM.



Obrázek 5.1: Následné řezy fixovanou (nahoře) a nefixovanou plicní tkání (dole). Zatímco ve fixované tkáni pozorujeme jednotlivé alveoly, v nefixované tkáni nemůžeme takto malé struktury rozlišit. Snímky ze skeneru.

5.1 Struktura plicní tkáně v SEM

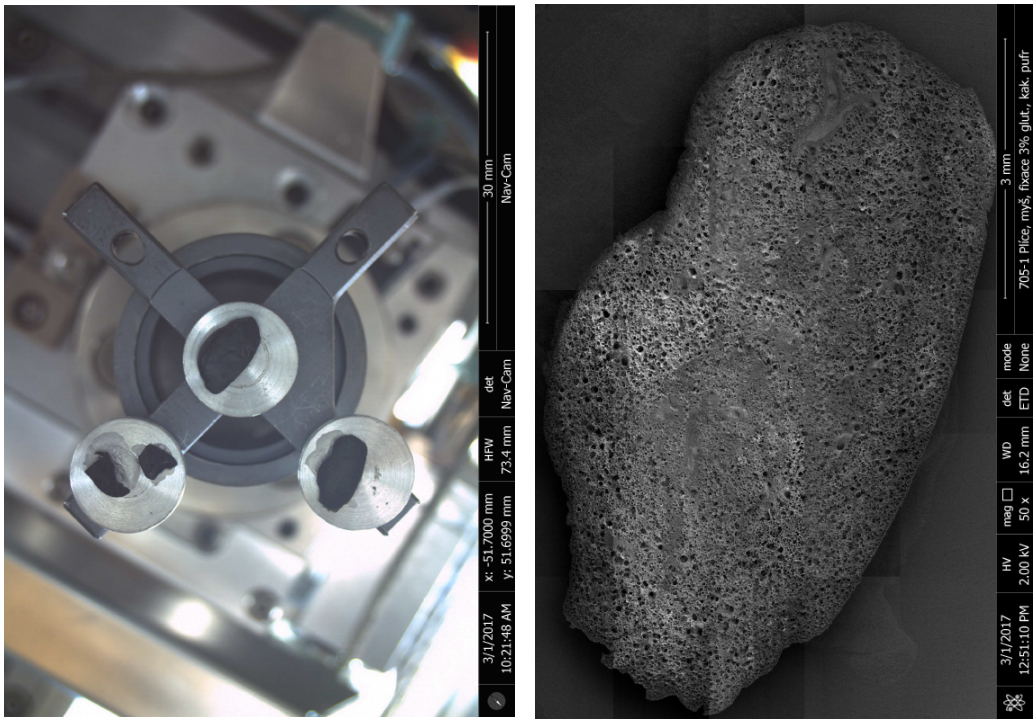
Cíle pokusu:

- ověřit možnost imerzní fixace celých plicních laloků a její vliv na zachování struktury plicní tkáně,
- porovnání klasické metody seříznutí žiletkou při pokojové teplotě s metodou „freeze crashing“ a vliv těchto metod na zachování struktury plicní tkáně,
- vyhodnocení pozorování struktury plicní tkáně pomocí SEM.

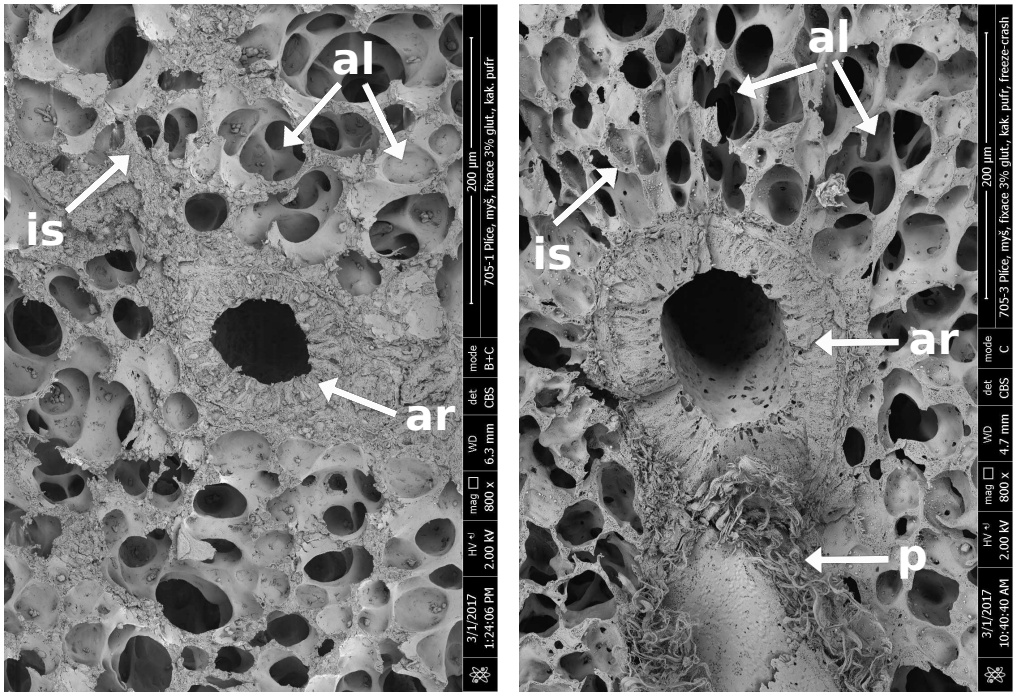
Příprava vzorků

Celé plicní laloky myši jsme imerzně fixovali v 3% roztoku glutaraldehydu (GA) a dále zpracovali dle standardního postupu přípravy vzorků pro SEM (3.3.3). Vybrané plicní laloky jsme seřízli žiletkou nebo rozlomili metodou „freeze crashing“ (FC). Jeden lalok jsme pozorovali bez seříznutí či lámání. Po vysušení metodou CPD jsme vzorky přilepili na terčíky elektricky vodivým stříbrným lakem a pokryli 3 nm platiny.

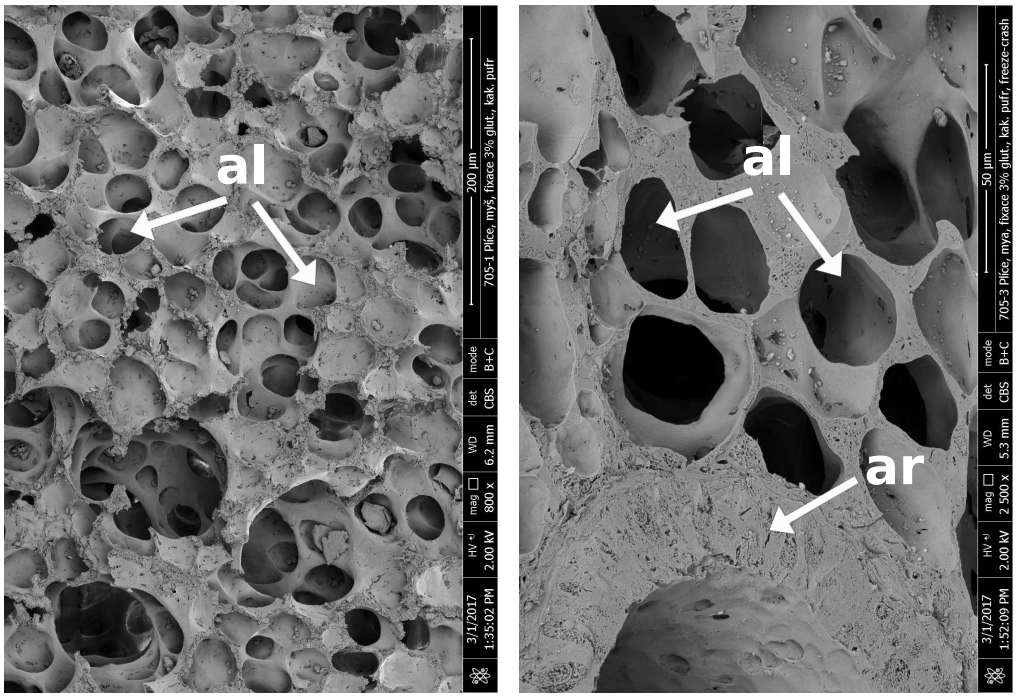
Výsledky



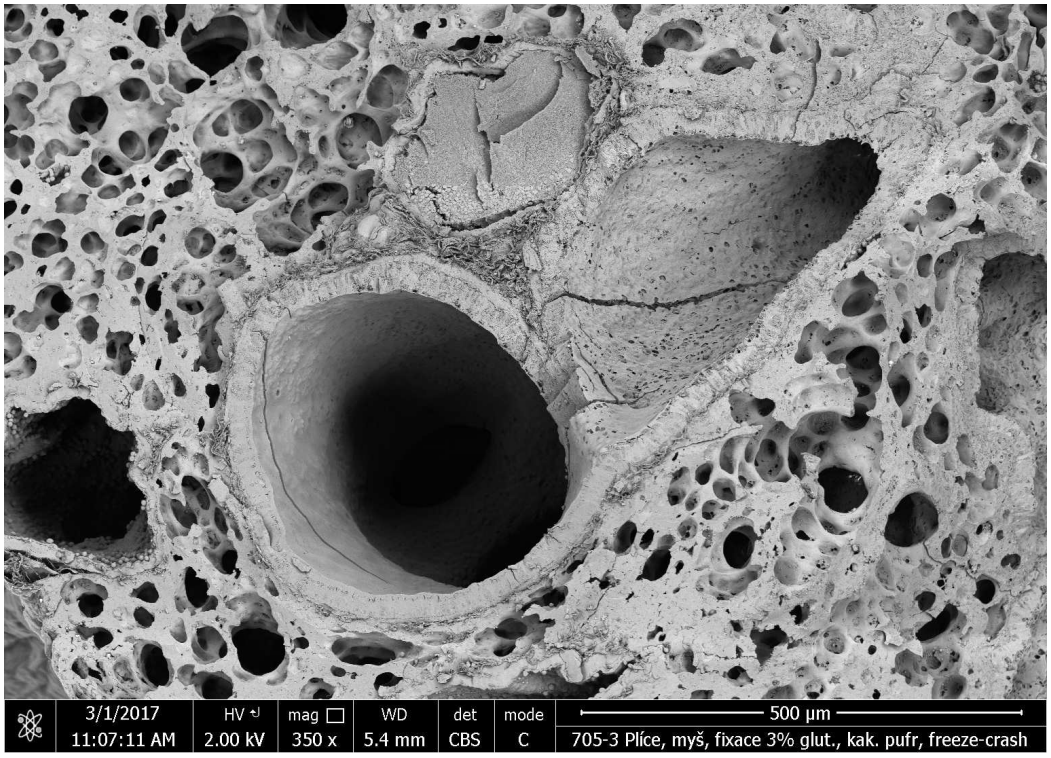
Obrázek 5.2: Umístění vzorků v komoře SEM (vlevo) a SEM snímek povrchu plicního laloku seříznutého žiletkou (vpravo, primární zvětšení 50x, zobrazeno v SE).



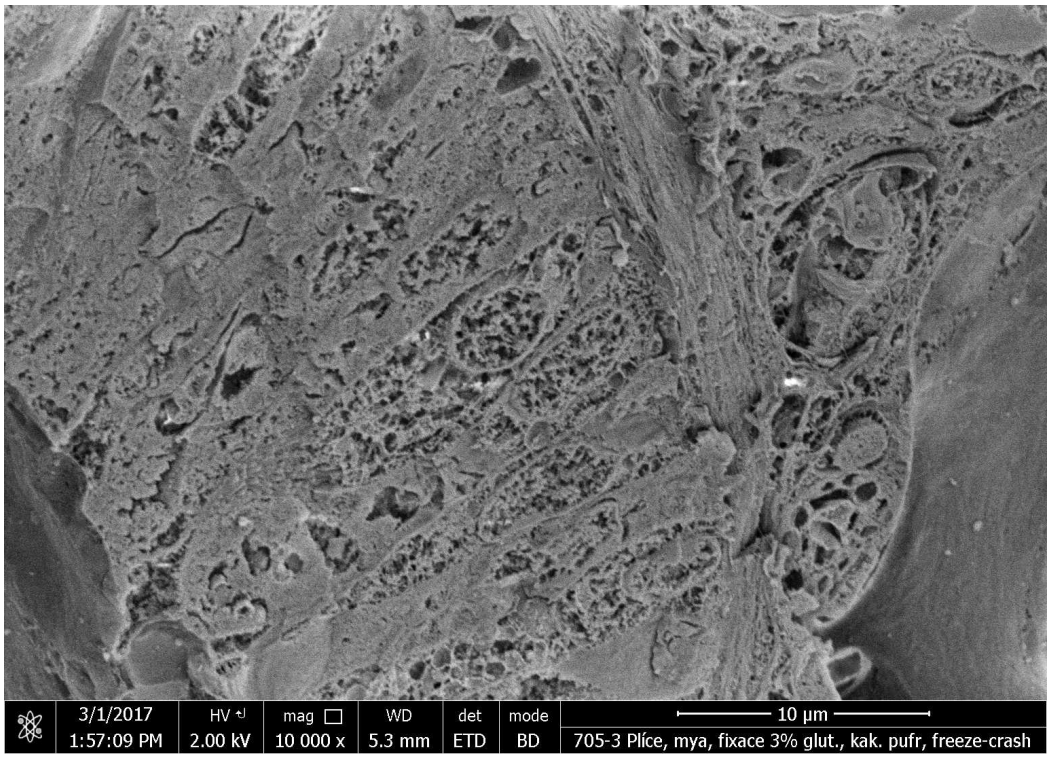
Obrázek 5.3: Detail laloku seříznutého žiletkou (vlevo) a lalok rozlomený metodou FC (vpravo). Šipkami označeny alveoly (al), artérie (ar), intraalveolární septa (is), pojivová vlákna (p). Intraalveolární septa laloku seříznutého žiletkou jsou zachována hůř než u laloku rozlomeného metodou FC. Primární zvětšení 800x, zobrazeno v BSE.



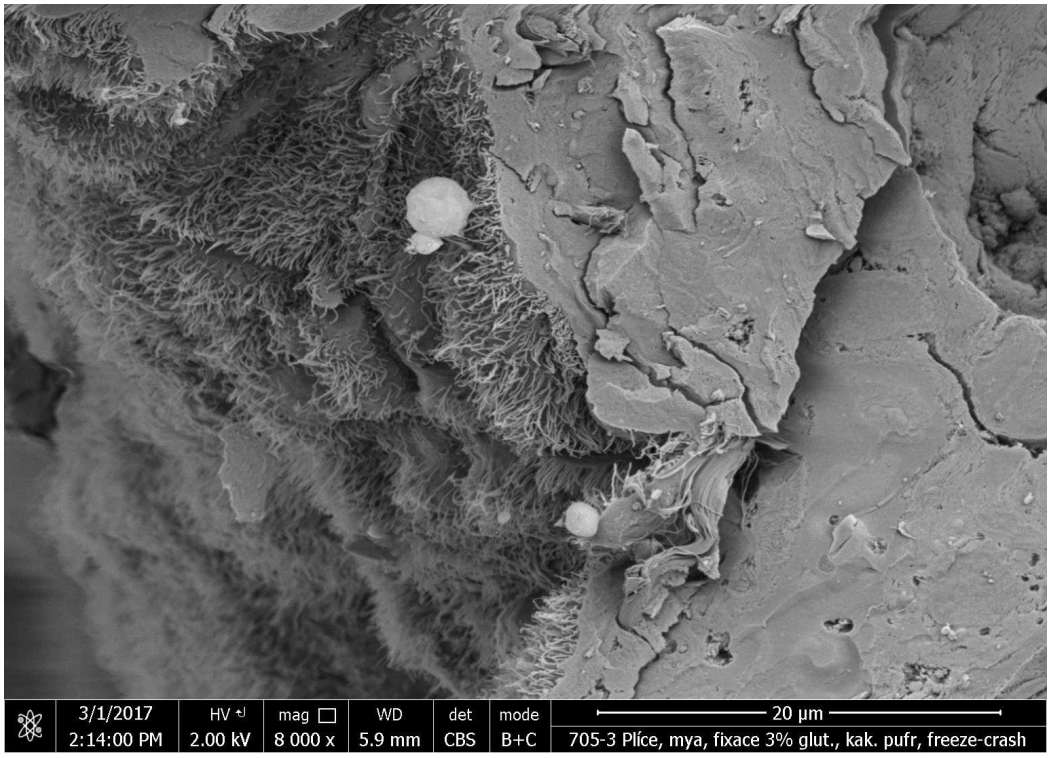
Obrázek 5.4: Detail laloku seříznutého žiletkou (vlevo) a lalok rozlomený metodou FC (vpravo). Viditelné alveoly (al), na snímku vpravo stěna artérie (ar). Primární zvětšení 2 500x, zobrazeno v BSE.



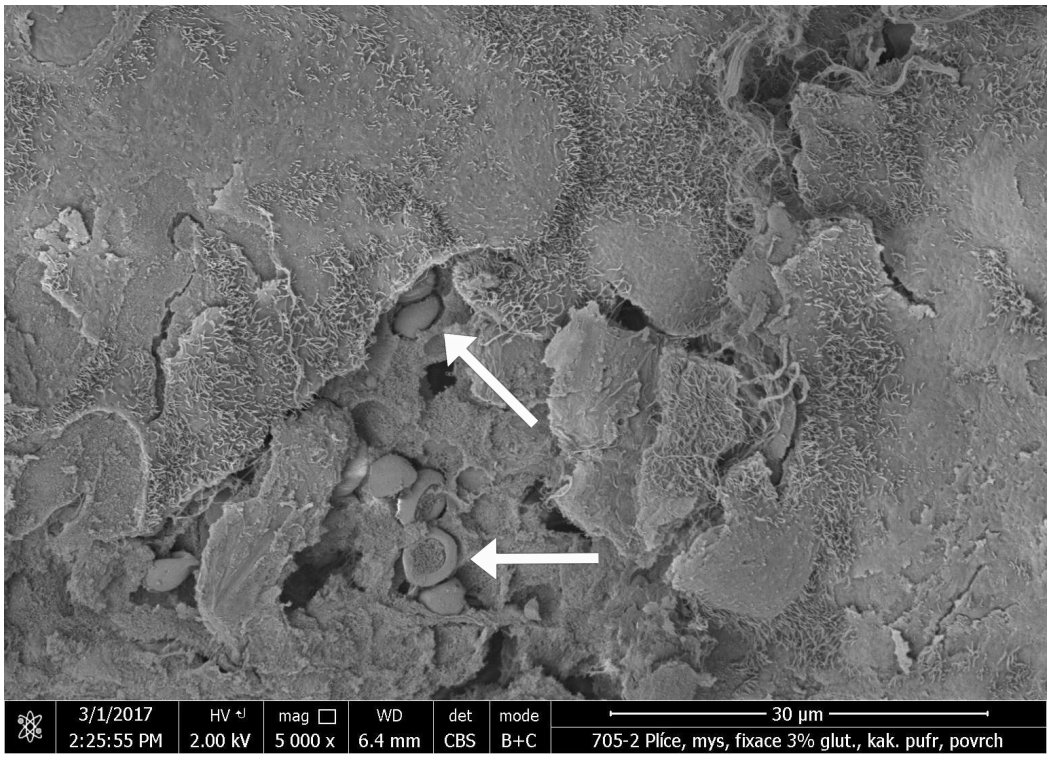
Obrázek 5.5: Řez vénami, lalok rozlomený metodou FC. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.6: Detail stěny artérie, lalok rozlomený metodou FC. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.7: Řasinkový epitel, lalok rozlomený metodou FC. Primární zvětšení 8 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.8: Povrch plicního laloku, který pokrývá viscerální pleura. Šipkami označeny erytrocyty. Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.

Závěr

1. Imerzní fixace 3% roztokem GA je vhodná pro zachování struktury plicních laloků myši. Zpracování takto fixovaných laloků běžným postupem pro přípravu biologických vzorků pro SEM vedlo k získání vzorků, ve kterých jsme pozorovali jednotlivé plicní alveoly, stěny cév, řasinkový epitel či erytrocyty. Tento způsob fixace a zpracování vzorků je vhodný pro zachování a zobrazení plicní tkáně v SEM.

2. Porovnali jsme standardní metodu seříznutí žiletkou s metodou FC. V laloku seříznutém žiletkou jsou viditelné mírné kompresní artefakty. V laloku rozlomeném metodou FC jsme pozorovali více strukturních detailů.

3. Ověřili jsme charakteristickou morfologii jednotlivých struktur plicní tkáně v SEM. Na základě této morfologie bylo vyhodnocováno zachování struktur plicní tkáně v dalších pokusech.

5.2 Porovnání zachování struktur v řezech fixované a nefixované plicní tkáně

Cíle pokusu:

- porovnání zachování struktury v řezech fixované a nefixované plicní tkáně,
- porovnání metod lepení řezů na sklíčka:

  natavením teplem pomocí prstu,

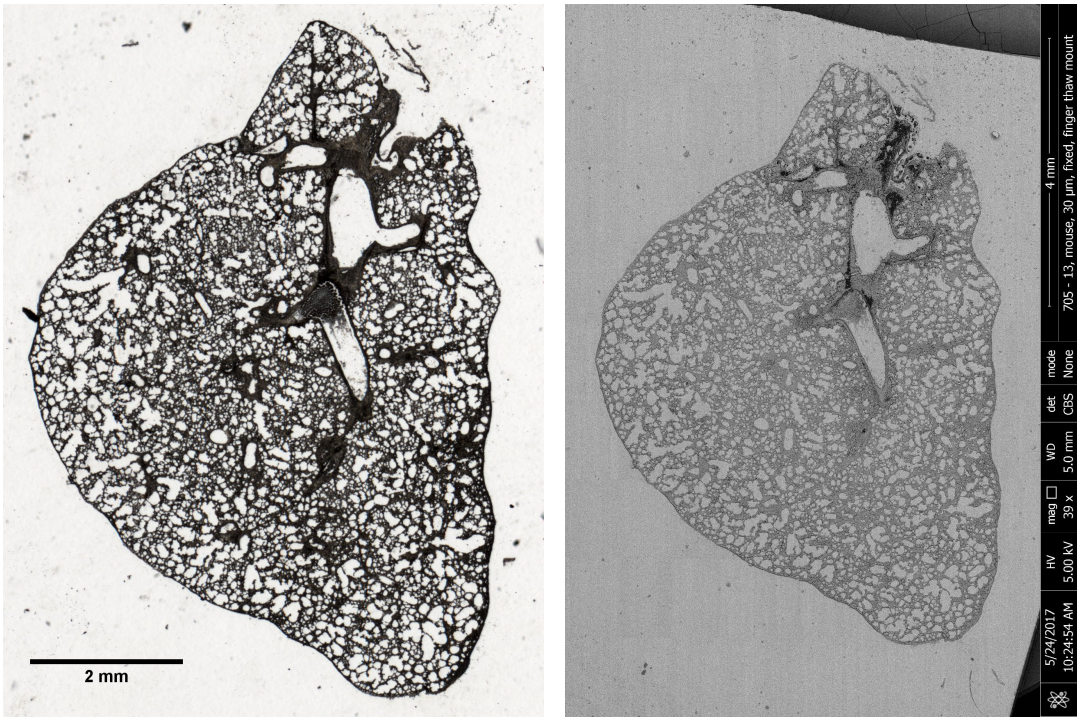
  pouze přiložením ke sklíčku.

Příprava vzorků

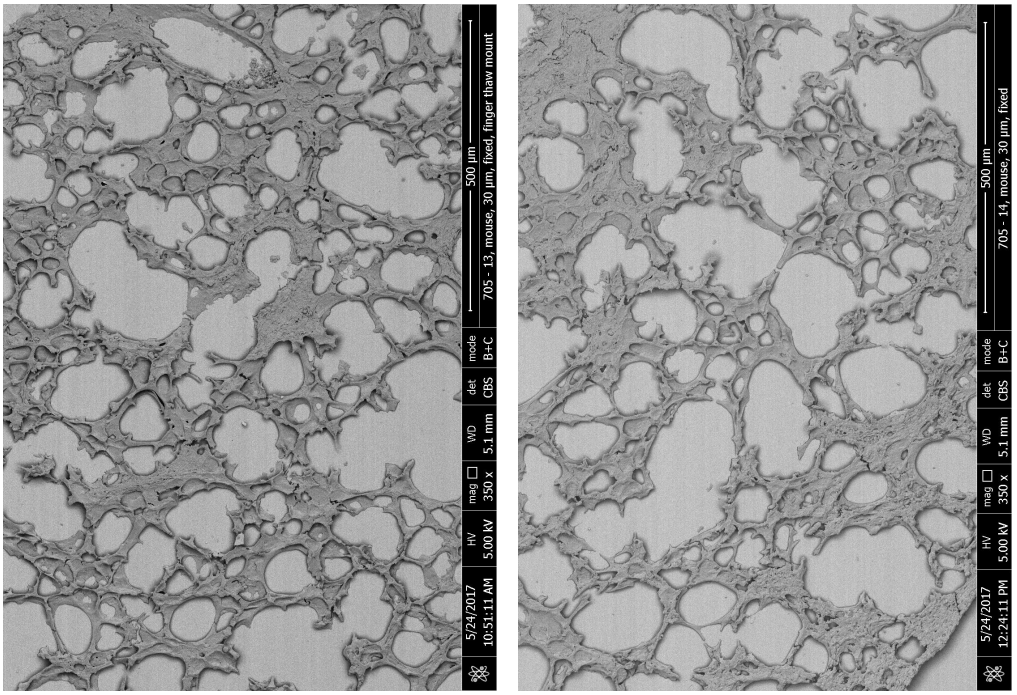
V kryostatu jsme připravili řezy o tloušťce 30 μm z hluboce zamrazené plicní tkáně a z tkáně fixované 3% roztokem GA. Tyto řezy jsme přilepili na podložní sklíčka natavením teplem pomocí prstu nebo pouze přiložením ke sklíčku. Po vysušení v exsikátoru jsme vzorky pokovili 3 nm platiny.

Výsledky

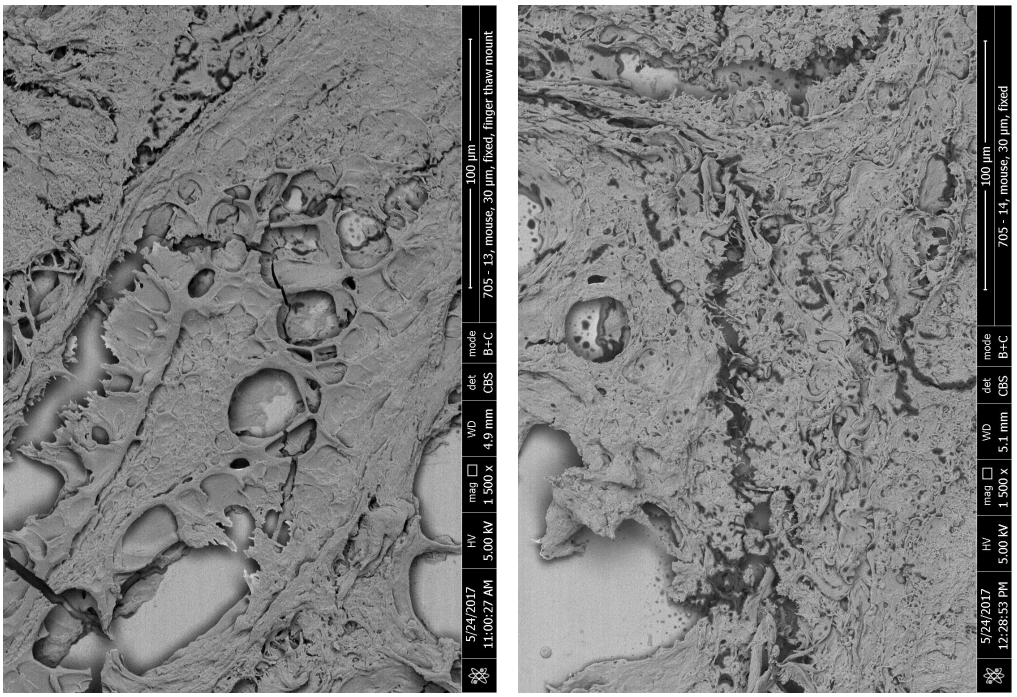
Fixovaná tkáň



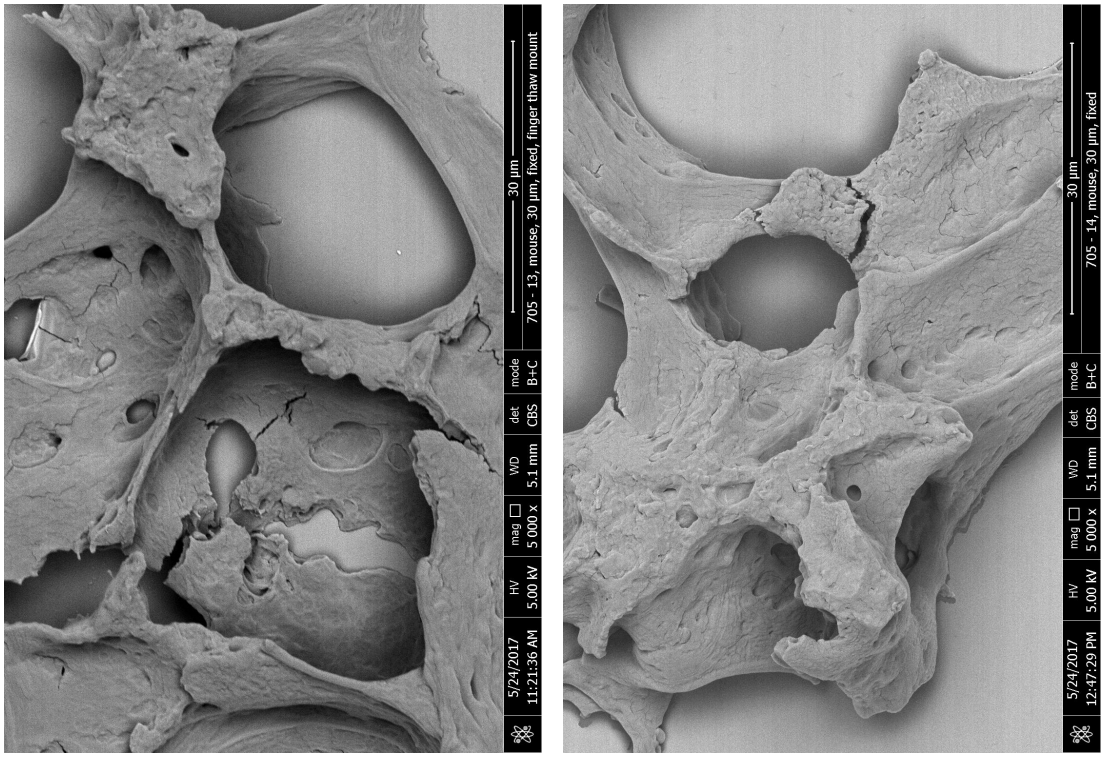
Obrázek 5.9: Snímek ze skeneru (vlevo) a SEM navigační obraz (vpravo, primární zvětšení 39x, zobrazeno v BSE) řezu fixované plicní tkáně přilepeného natavením pomocí prstu.



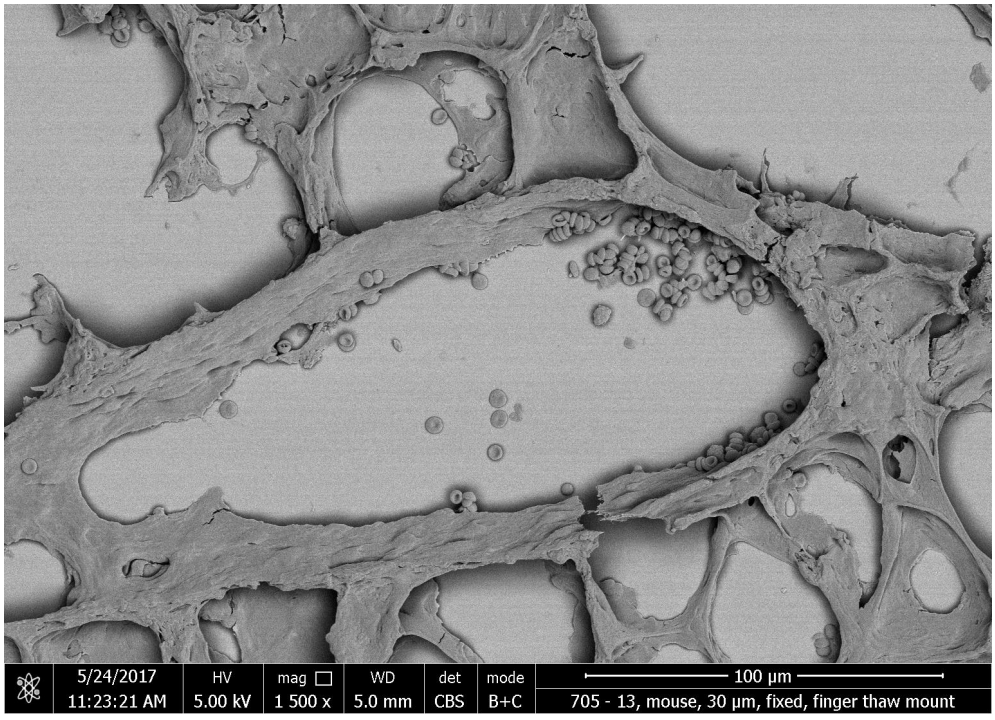
Obrázek 5.10: Porovnání vlivu lepících technik řezů na zachování struktury tkáně. Řez lepený natavením pomocí prstu (vlevo) a řez lepený pouze přiložením na sklíčko (vpravo). U obou řezů je struktura plicního parenchymu zachována obdobně. Mírné popraskání povrchu vzniklo pravděpodobně během sušení v exsikátoru. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



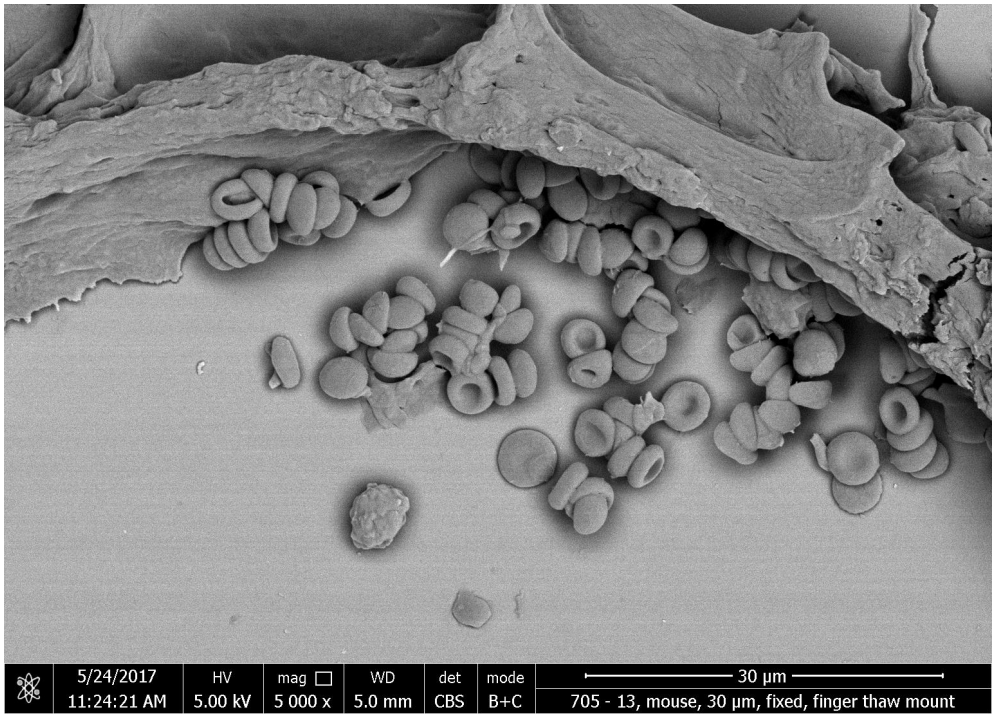
Obrázek 5.11: Detail pojivové tkáně. Řez lepený natavením pomocí prstu (vlevo) a řez lepený pouze přiložením na sklíčko (vpravo). Ani při větším zvětšení nepozorujeme rozdíl v zachování struktur. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.



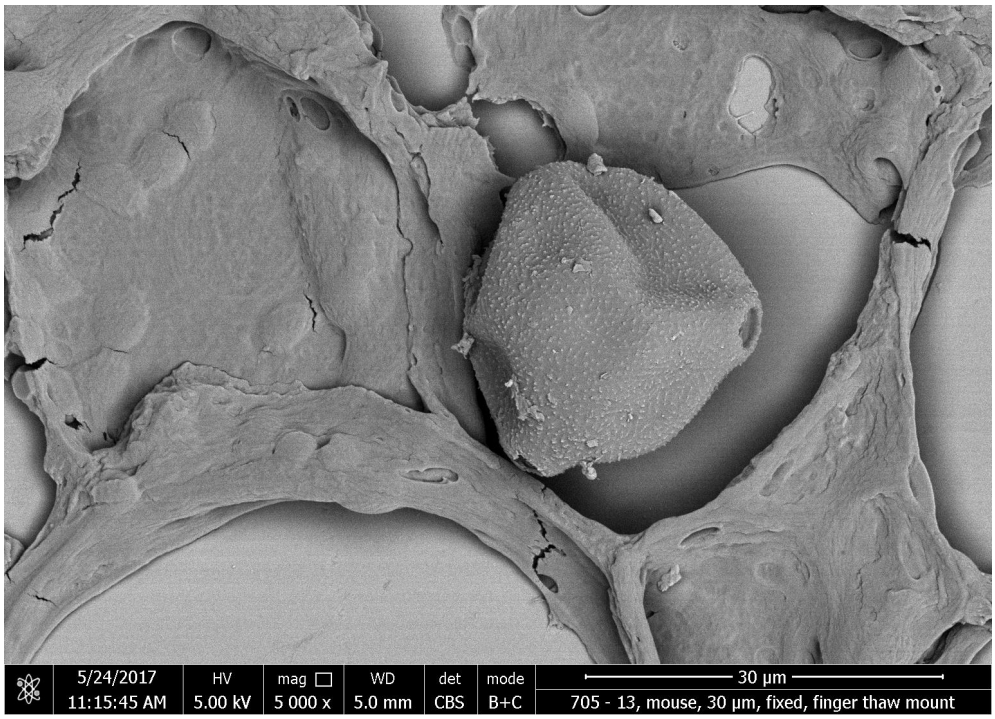
Obrázek 5.12: Detail plicních alveol. Řez lepený natavením pomocí prstu (vlevo) a řez lepený pouze přiložením na sklíčko (vpravo). Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.13: Detail řezu vénou. Fixovaná tkáň, řez lepen natavením pomocí prstu. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.

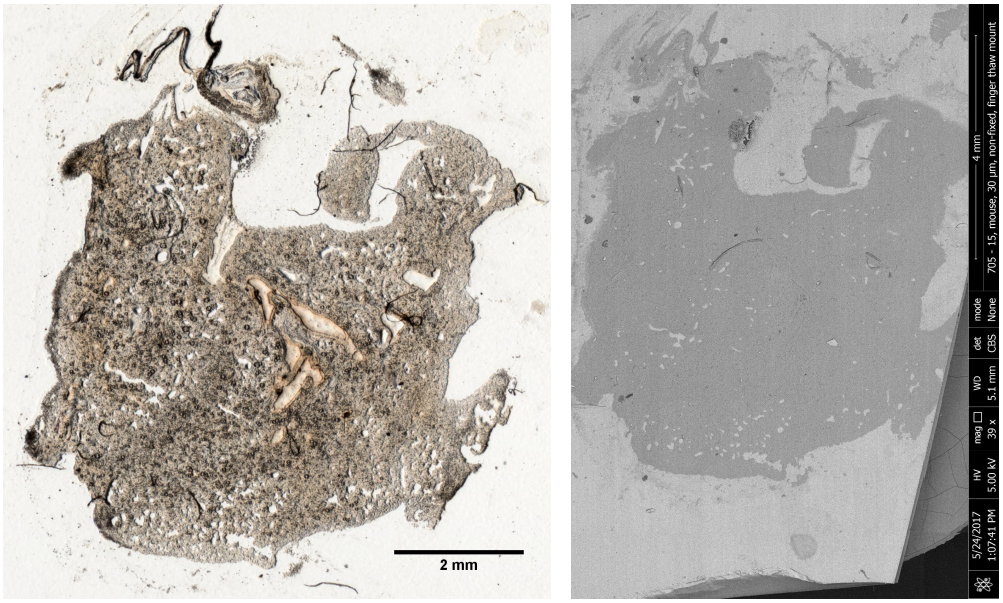


Obrázek 5.14: Detail erytrocytů. Fixovaná tkáň, řez lepen natavením pomocí prstu. Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.

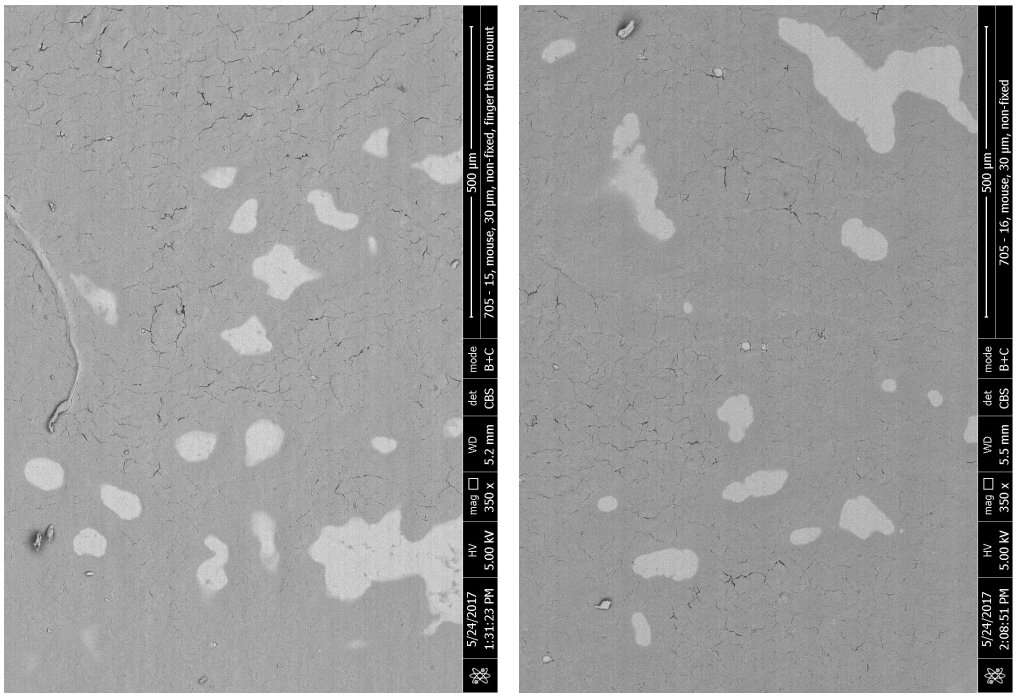


Obrázek 5.15: Pylové zrno v alveole. Fixovaná tkáň, řez lepen natavením pomocí prstu. Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.

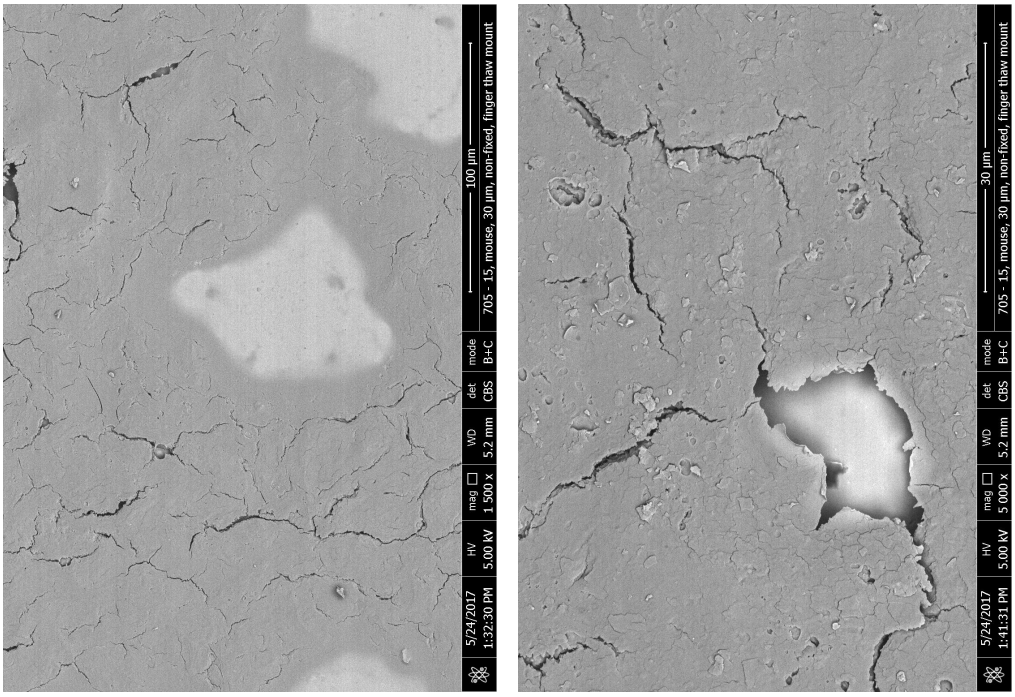
Nefixovaná tkáň



Obrázek 5.16: Snímek ze skeneru (vlevo) a SEM navigační obraz (vpravo, primární zvětšení 39x, zobrazeno v BSE) řezu nefixované plicní tkáně přilepeného natavením pomocí prstu. Na první pohled nelze na SEM snímku rozlišit jakékoliv struktury tkáně.

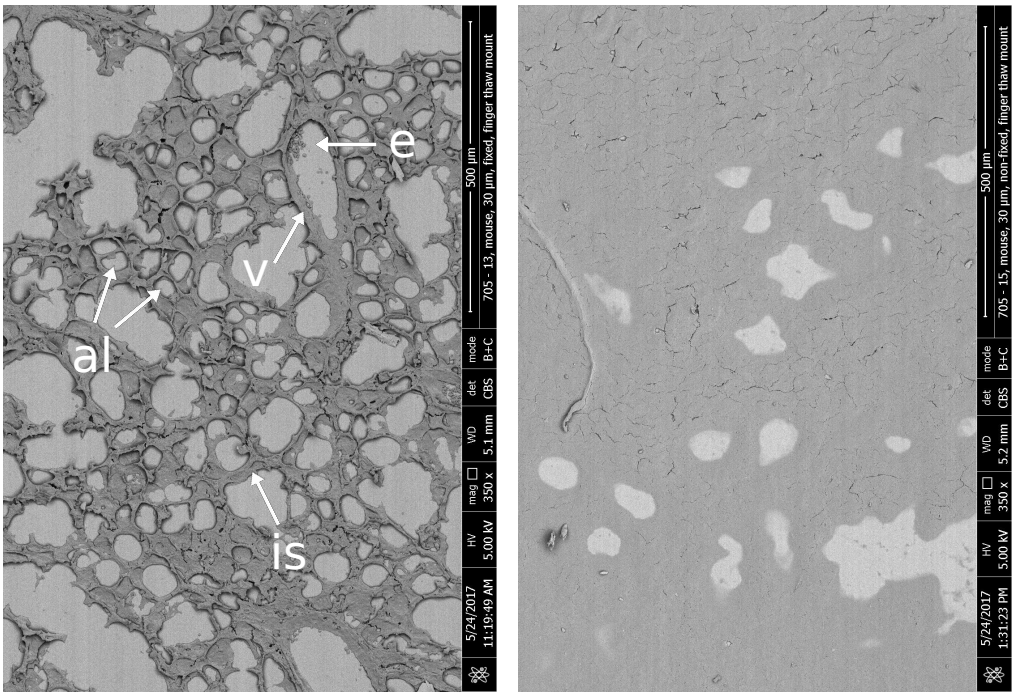


Obrázek 5.17: Porovnání vlivu lepících technik řezů na zachování struktury tkáně. Řez lepený natavením pomocí prstu (vlevo) a řez lepený pouze přiložením na sklíčko (vpravo). V nefixované tkáni není možné odlišit jakékoliv struktury, rozdílné techniky lepení řezů nemají na zachování struktury tkáně vliv. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.18: Detail nefixované tkáně. Primární zvětšení 1 500x (vlevo), 5 000x (vpravo). Zobrazeno v BSE.

Porovnání fixované a nefixované tkáně



Obrázek 5.19: Fixovaná tkáň (vlevo) a nefixovaná tkáň (vpravo). Zatímco v řezu fixované tkáně můžeme rozlišit jednotlivé alveoly (al), vénu (v), intraalveolární septa (is) či erytrocyty (e), v nefixované tkáni nepozorujeme žádné struktury. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.

Závěr

1. Řezy plicní tkáně fixované roztokem GA mají velmi dobře zachovanou strukturu. Pozorovali jsme v nich jednotlivé alveoly, pojivová vlákna či erytrocyty obdobně jako v pokusu 5.1. Mírné popraskání části intraalveolárních sept mohlo být způsobeno sušením v exsikátoru. Naopak v nefixované plicní tkáni není možné odlišit jakékoliv struktury. Při krájení nefixované tkáně v kryostatu dochází k porušení buněčných membrán a k uvolnění buněčného obsahu. Během sušení v exsikátoru tento buněčný obsah zaschne na povrchu řezu a zakryje jednotlivé struktury tkáně. Hluboce zamrazená tkáň bez jakékoliv fixace proto není vhodná ke zobrazení struktury tkáně pomocí SEM. K přípravě vzorků pro MALDI-MSI je však tato tkáň běžně užívána. Možné způsoby zpracování řezů nefixované tkáně tak, aby v nich bylo možné rozlišit jednotlivé struktury, jsou popsány v následujících pokusech.

2. Při lepení řezů na sklíčka natavením teplem pomocí prstu může dojít k delokalizaci analytů, které jsou detekovány pomocí MALDI-MSI. Vliv na zachování mikrostruktury tkáně v SEM jsme však u jednotlivých lepících technik nepozorovali.

5.3 Porovnání metod zpracování řezů plicní tkáně pro SEM

Cíle pokusu:

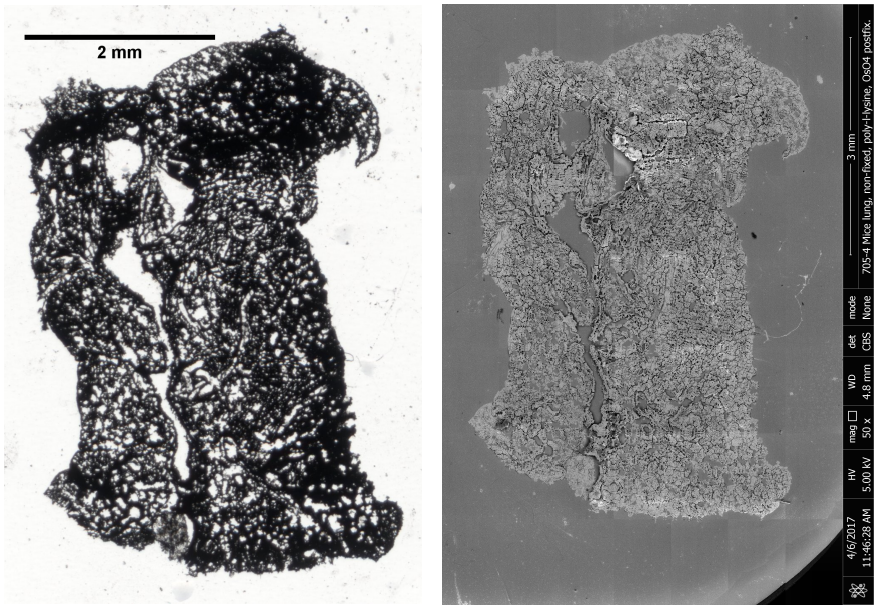
- zachovat struktury nefixované tkáně pro zobrazení v SEM,
- vliv postfixace OsO_4 na strukturu tkáně,
- porovnání tloušťky řezů.

Příprava vzorků

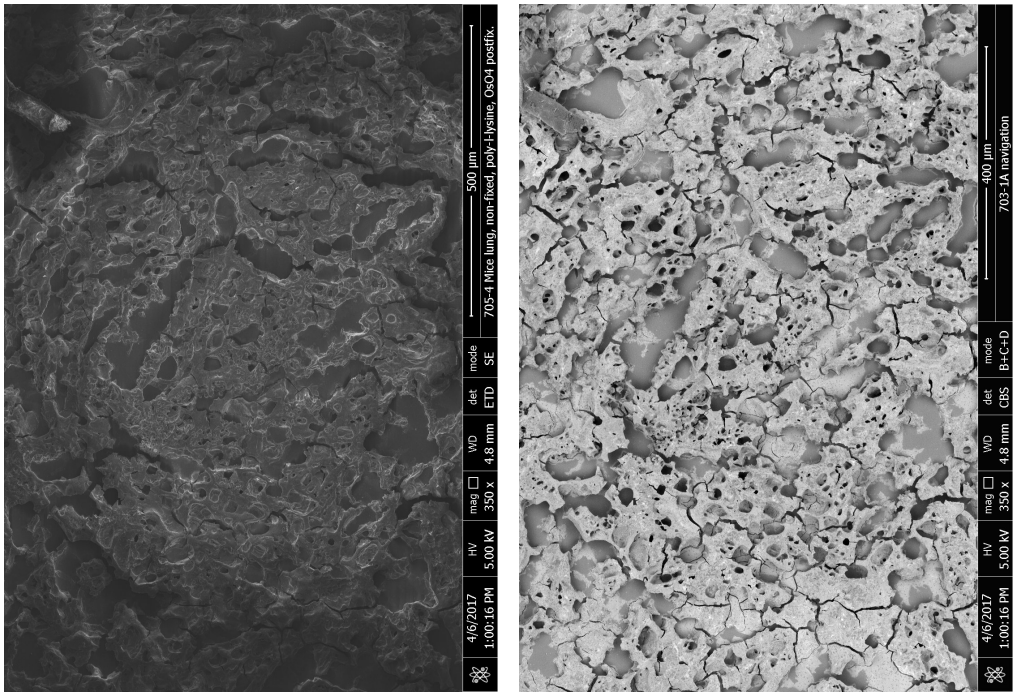
V kryostatu jsme připravili řezy o tloušťkách 15–40 μm a 100 μm z hluboce zamrazené plicní tkáně a z tkáně fixované 3% roztokem GA. Tyto řezy jsme umístili na hladinu zmraženého roztoku GA v 6-ti jamkové destičce. Po pomalém rozmrazení roztoku jsme nabrali řezy na kulatá krycí sklíčka a propláchli pufrem. Část z nich jsme nechali sušit na vzduchu a část jsme odvodnili a sušili metodou CPD. Několik řezů sušených na vzduchu jsme umístili do par osmia. Po přilepení jsme řezy pouhlíkovali 10 nm vrstvou uhlíku.

Výsledky

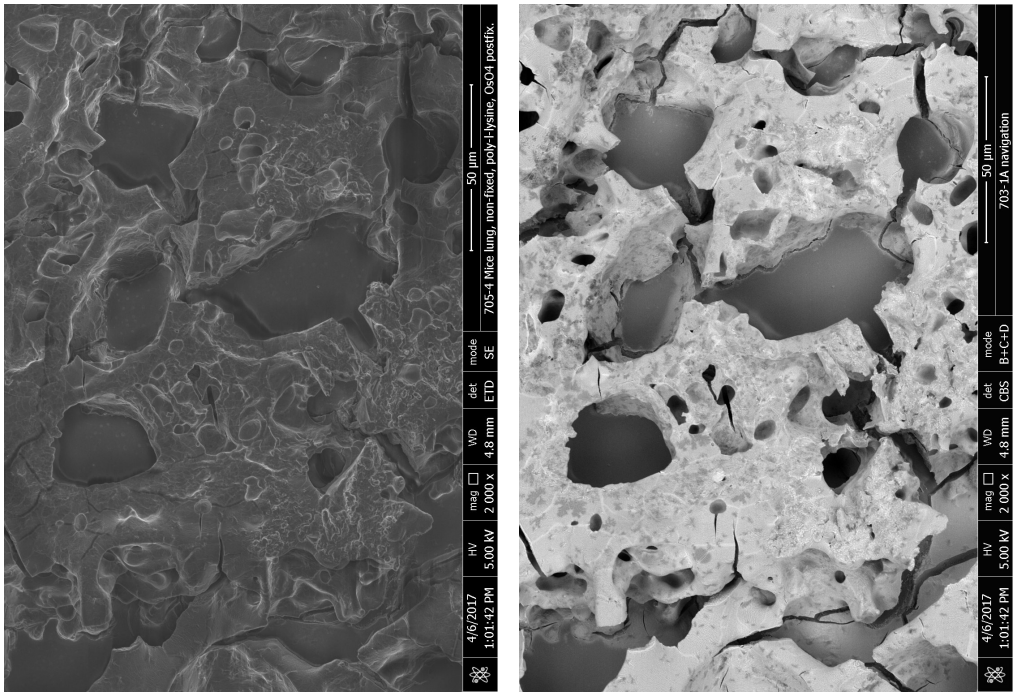
Řezy postfixované osmiem o tloušťce 25 μm



Obrázek 5.20: Snímek ze skeneru (vlevo) a SEM navigační obraz (vpravo, primární zvětšení 50x, zobrazeno v BSE) řezu nefixované tkáně postfixované osmiem. Na snímku ze skeneru je patrné černé zbarvení řezu osmiovou černí.

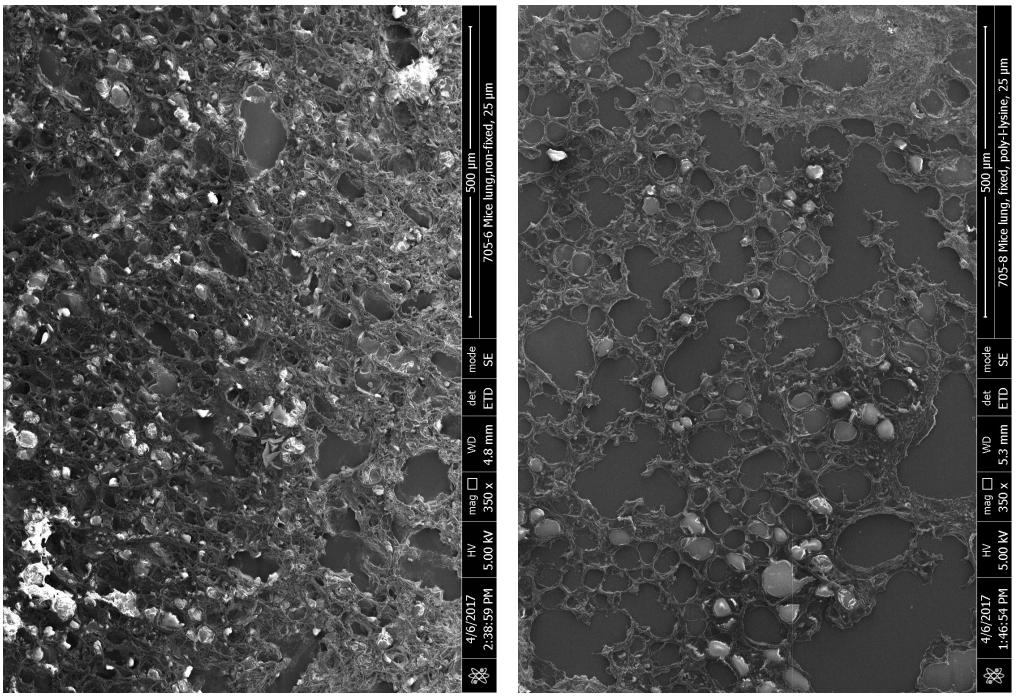


Obrázek 5.21: Řez nefixované tkáně postfixovaný v osmiu. Na zobrazení v SE (vlevo) jsou viditelné plicní alveoly, v porovnání se zobrazením v BSE (vpravo) poskytuje méně detailů. Na pravém snímku je viditelné popraskání povrchu vzorku způsobené postfixací osmiem a sušením na vzduchu. Primární zvětšení 350x.

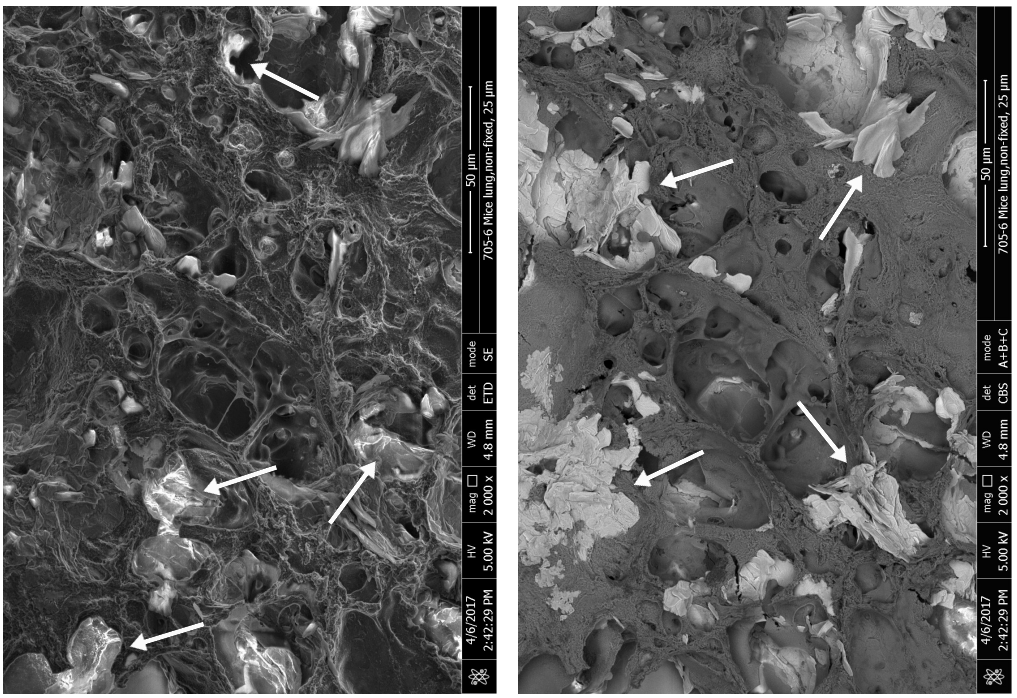


Obrázek 5.22: Detail nefixované tkáně postfixované v osmiu. Zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Na obou snímcích jsou dobře rozeznatelné plicní alveoly. Primární zvětšení 2 000x.

Porovnání fixované a nefixované tkáně - řezy sušené na vzduchu, tloušťka 25 μm

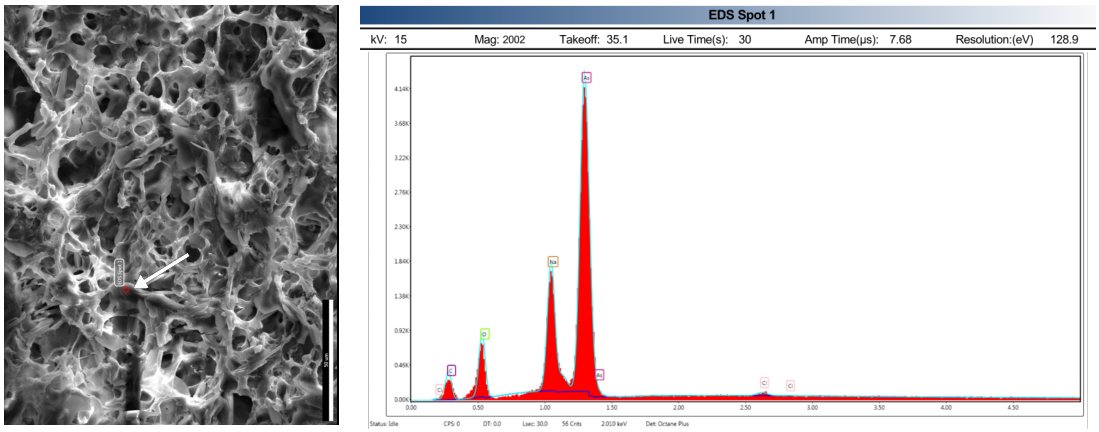


Obrázek 5.23: Porovnání nefixované (vlevo) a fixované tkáně (vpravo). Díky umístění řezů na hladinu fixačního roztoku došlo k zachování struktury i u nefixované tkáně. Jednotlivé alveoly jsou rozeznatelné obdobně jako u řezu fixované tkáně. Řez nefixované tkáně částečně zakrývají krystaly pufru. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v SE.



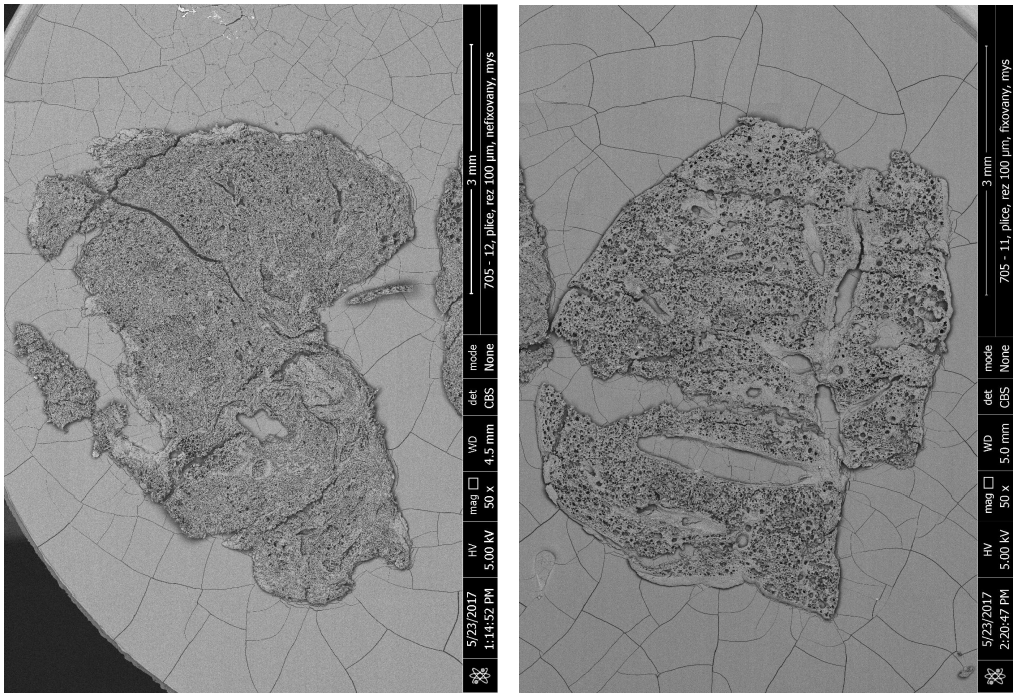
Obrázek 5.24: Detail řezu nefixované tkáně. Porovnání zobrazení v SE (vlevo) a BSE (vpravo). Na snímku v SE není zcela možné odlišit krystaly kakodylátového pufru, který jsme použili k propláchnutí vzorků. Dochází rovněž k nabíjení povrchu (označeno šipkami). Na snímku v BSE jsou zřetelné krystaly (označeny šipkami) i jednotlivé alveoly. Primární zvětšení 2 000x.

Původ krystalů

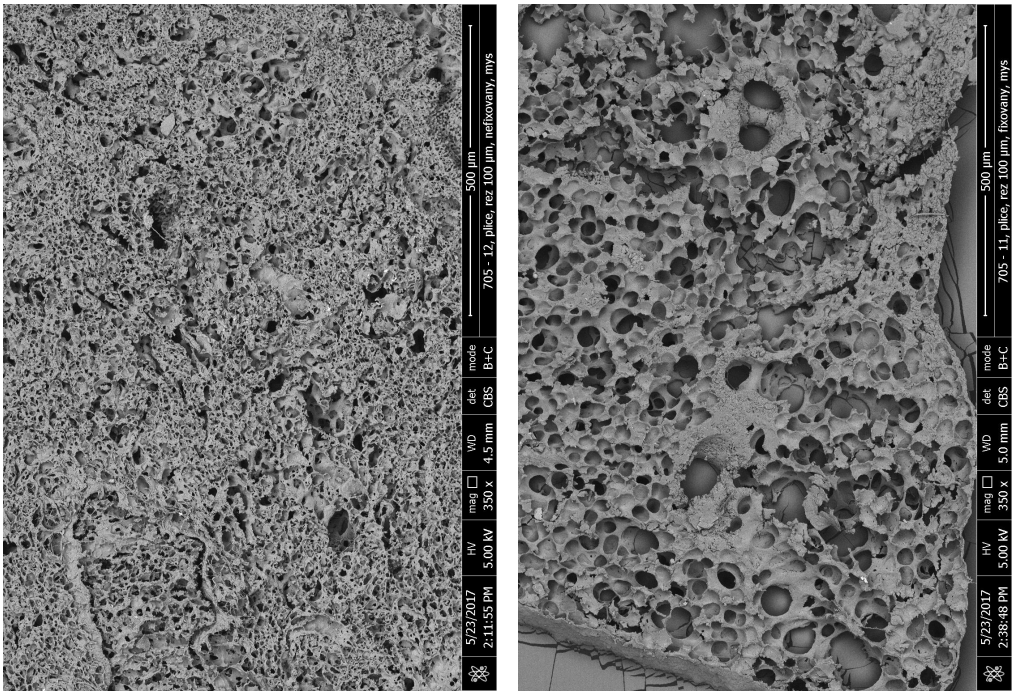


Obrázek 5.25: EDS spektrum naměřené z oblasti krystalu (označeno šipkou). Nejvyšší pík představuje arsen, který je složkou kakodylátového pufru. Ke vzniku krystalů pufru mohlo dojít nedostatečnou temperací roztoku před proplachováním vzorků.

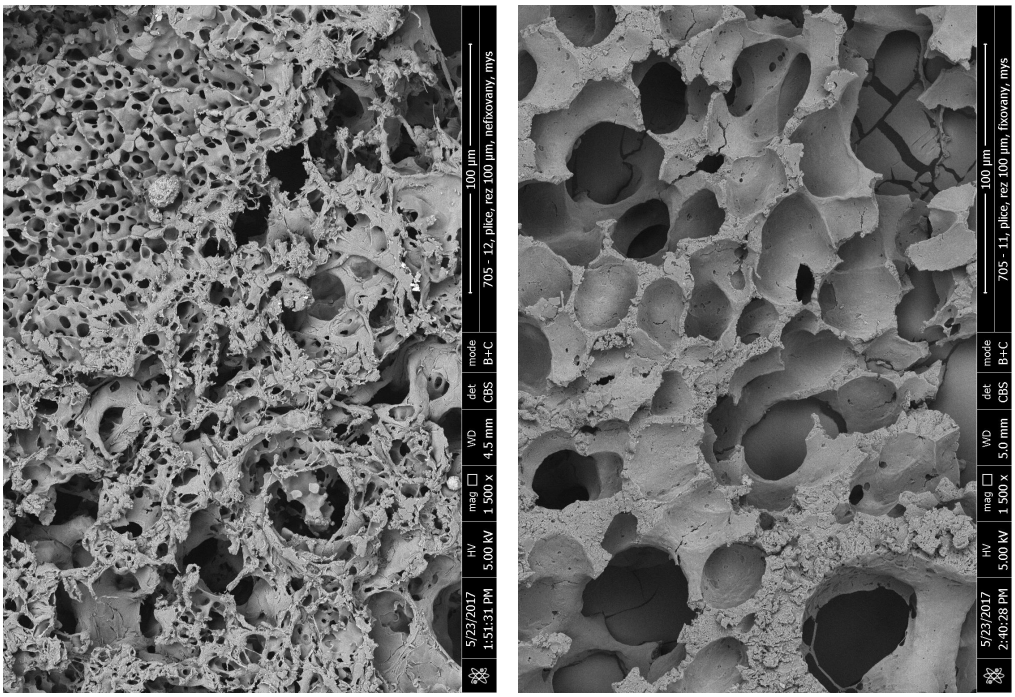
Porovnání fixované a nefixované tkáně - řezy sušené metodou CPD, tloušťka 100 μm



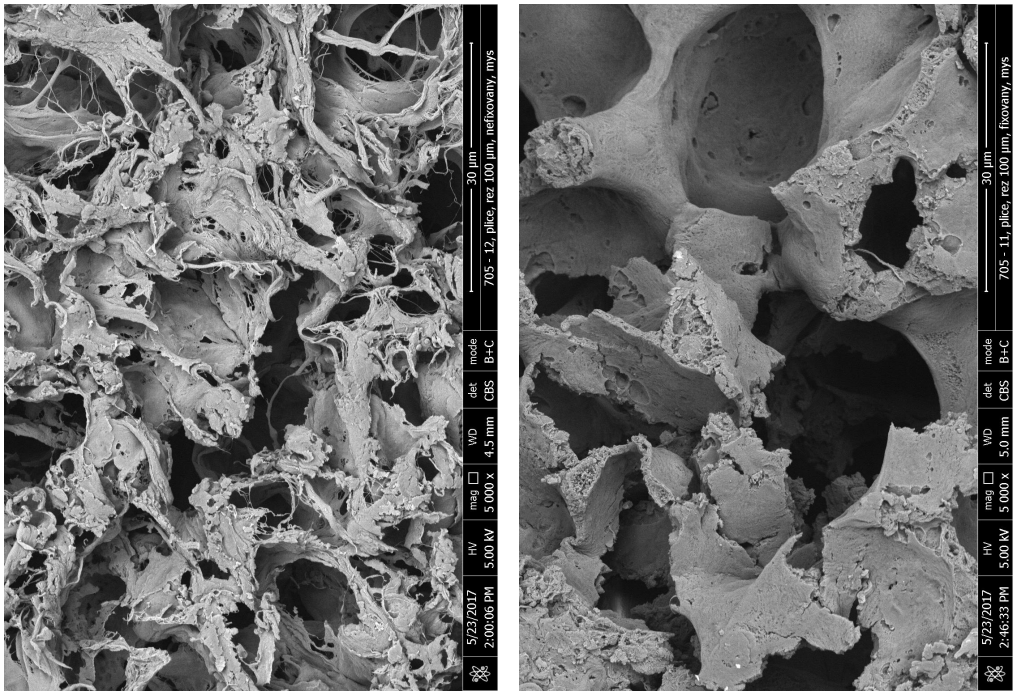
Obrázek 5.26: Navigační obraz řezu nefixované (vlevo) a fixované tkáně (vpravo). Na první pohled jsou ve fixované tkáni lépe viditelné jednotlivé alveoly. Primární zvětšení 50x, zobrazeno v BSE.



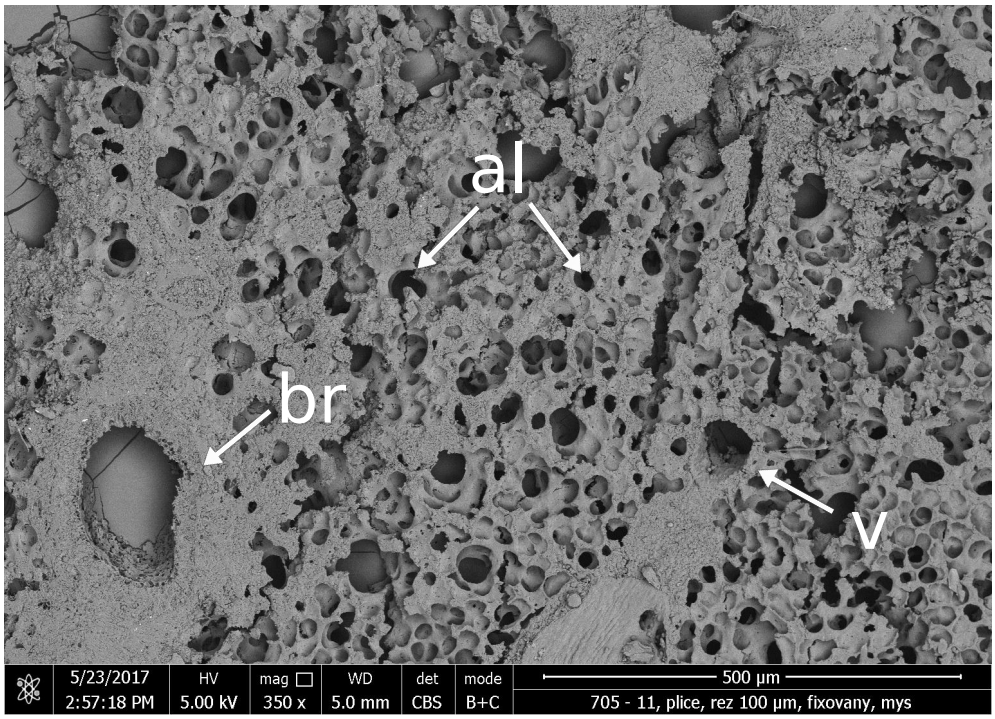
Obrázek 5.27: Nefixovaná (vlevo) a fixovaná tkáň (vpravo). Ačkoliv je v nefixované tkáni možné rozlišit jednotlivé alveoly, její struktura je ve srovnání s fixovanou tkání mírně poškozená. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



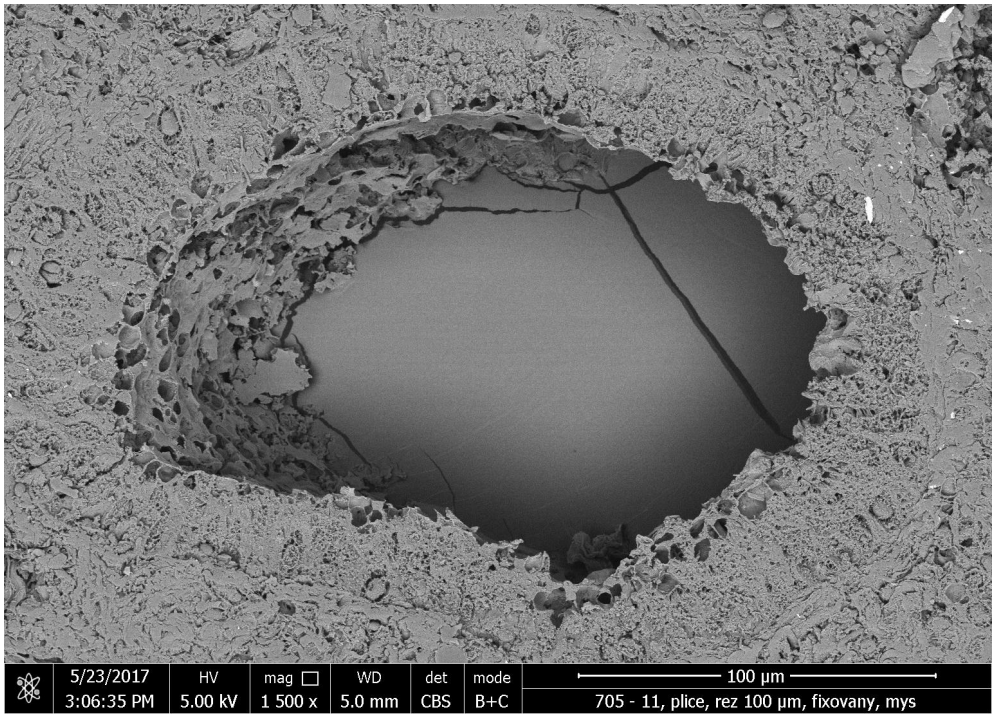
Obrázek 5.28: Nefixovaná (vlevo) a fixovaná tkáň (vpravo). V nefixované tkáni došlo k mírnému rozvolnění pojiva, mnoho intraalveolárních sept nelze rozlišit. Alveoly hlouběji v tkáni jsou lépe zachované. Ve fixované tkáni je většina struktur dobře zachována. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.



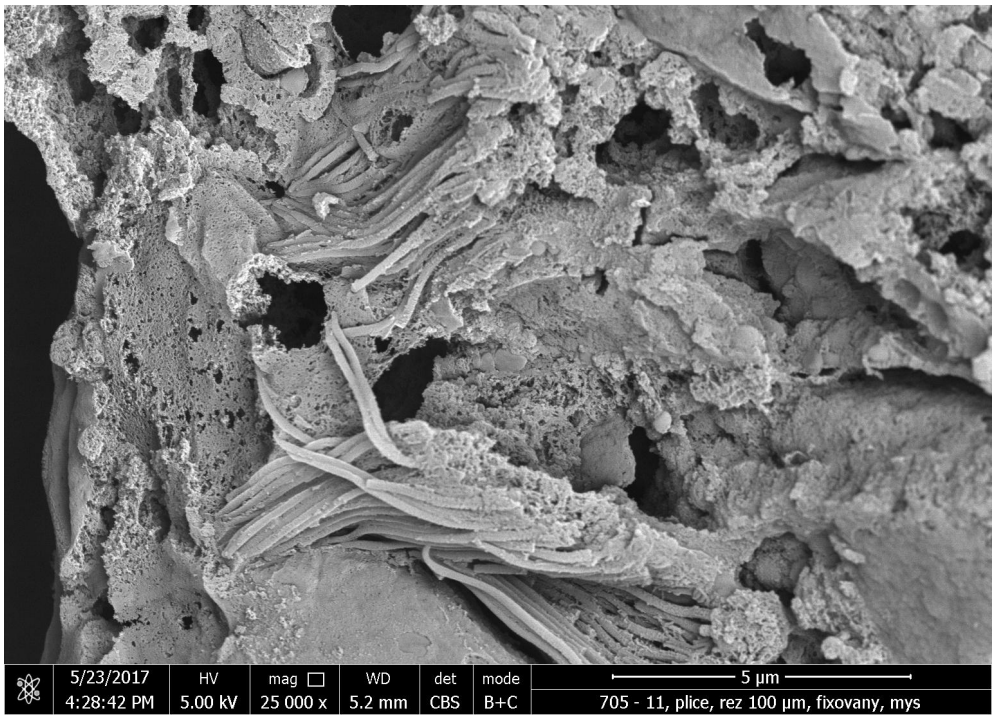
Obrázek 5.29: Detail nefixované (vlevo) a fixované tkáně (vpravo). V nefixované tkáni se pojivo rozvolňuje v jednotlivá kolagenní vlákna. Ve fixované tkáni jsou některá intraalveolární septa popraskaná. Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.



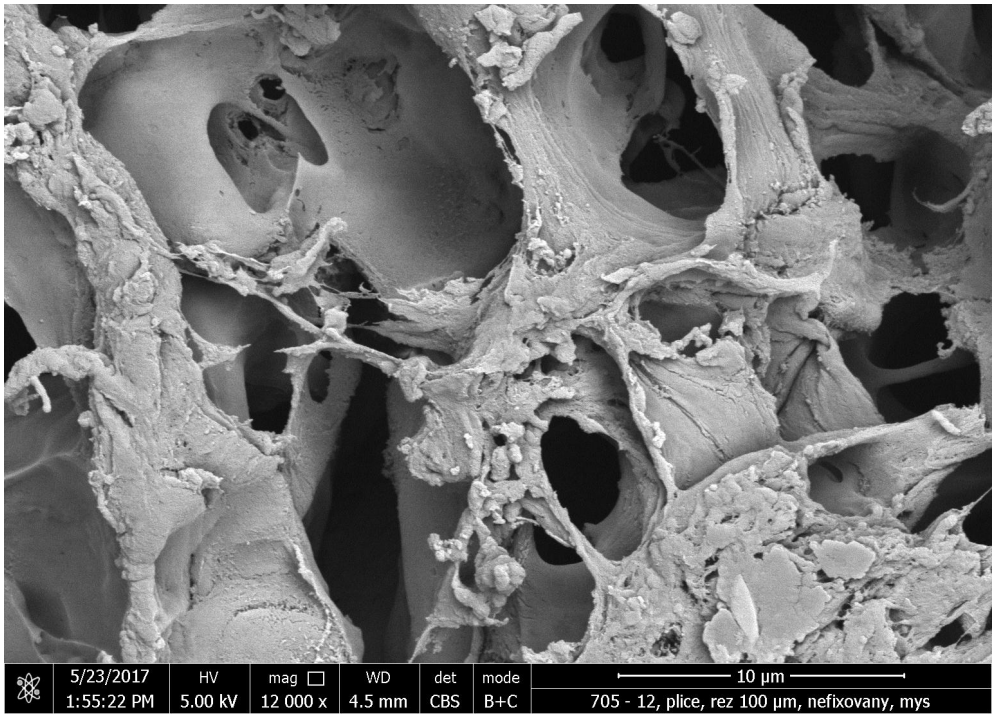
Obrázek 5.30: Fixovaná tkáň, řez bronchiolem (br) a vénou (v). Struktura většiny alveol (al) je dobře zachovaná. Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



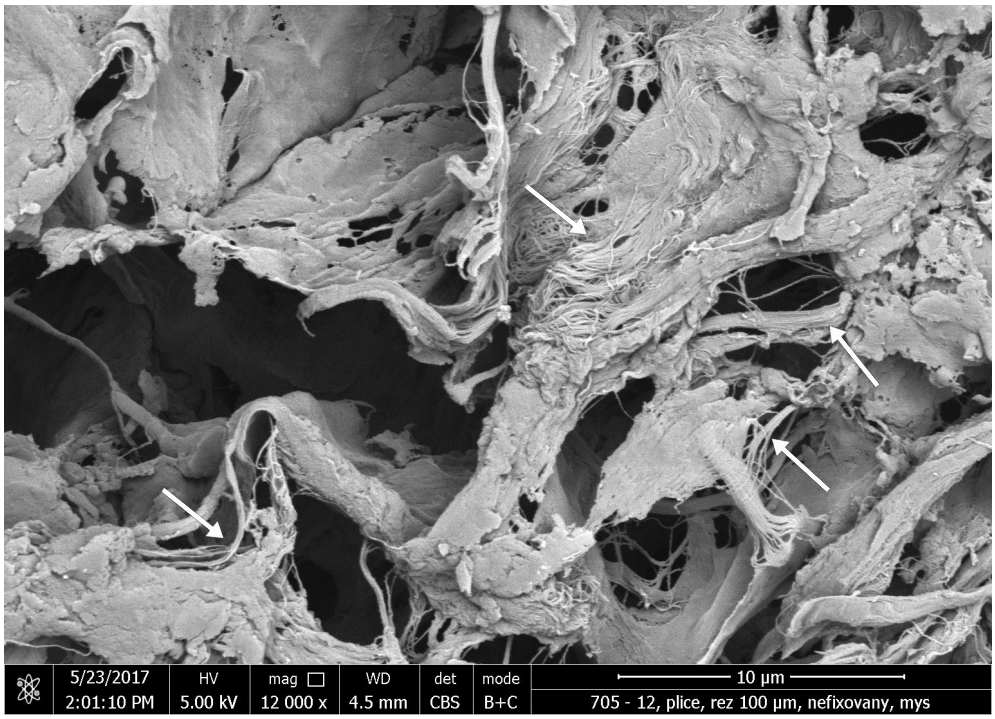
Obrázek 5.31: Fixovaná tkáň, detail řezu bronchiolem. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.32: Fixovaná tkáň, detail části řasinkového epitelu. Primární zvětšení 25 000x, zobrazeno v BSE.

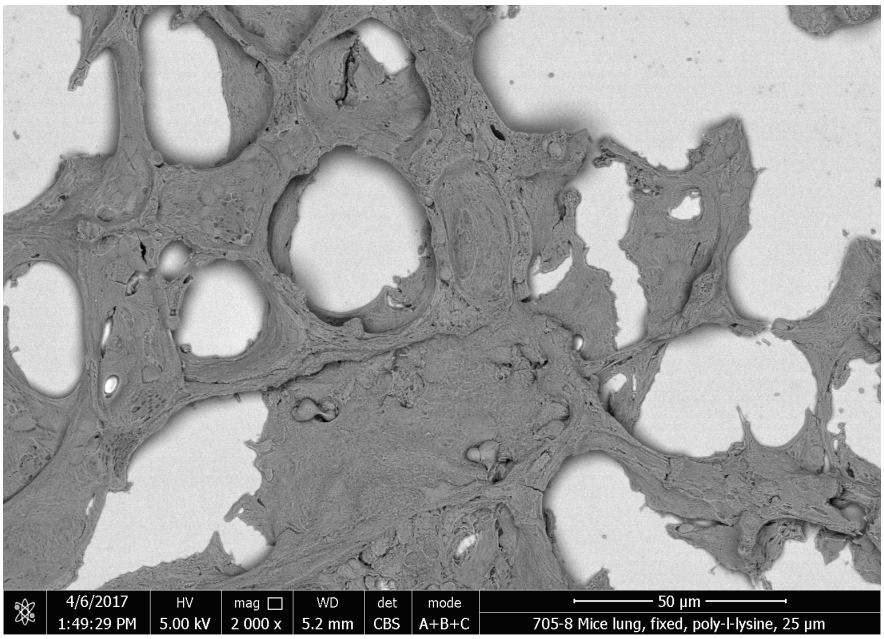


Obrázek 5.33: Nefixovaná tkáň, detail poškozených intraalveolárních sept. Primární zvětšení 12 000x, zobrazeno v BSE.

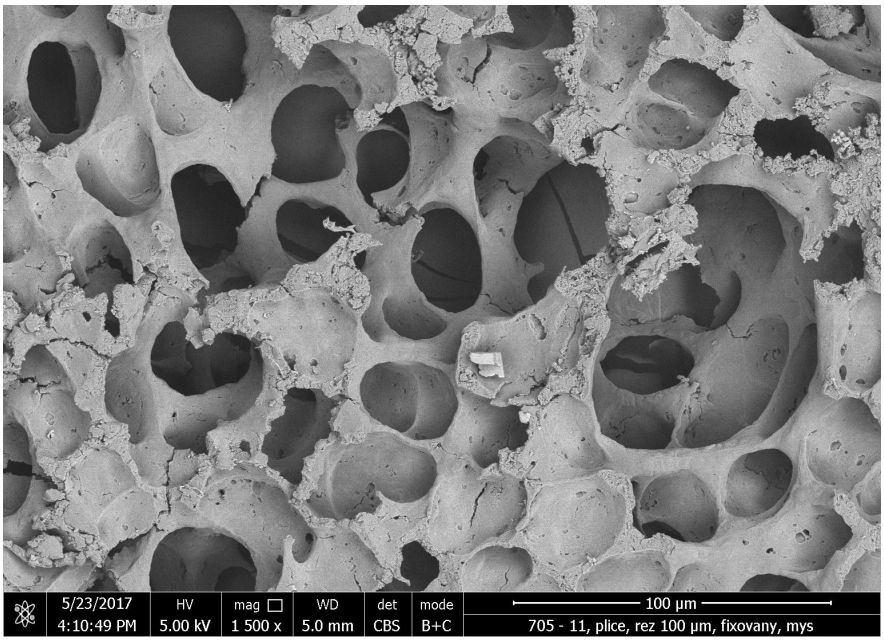


Obrázek 5.34: Nefixovaná tkáň, detail rozvolněného pojiva, pozorujeme kolagenní vlákna. Primární zvětšení 12 000x, zobrazeno v BSE.

Porovnání tloušťky řezů



Obrázek 5.35: Řez fixované tkáně o tloušťce 25 μm. Řez o této tloušťce zachycuje menší objem tkáně. Některá intraalveolární septa jsou popraskaná. Primární zvětšení 2 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.36: Řez fixované tkáně o tloušťce 100 μm. Řez zachycuje větší objem tkáně, pozorujeme proto více alveol. Struktury umístěně hlouběji v řezu jsou méně poškozené než struktury na povrchu. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.

Závěr

1. Umístěním řezů hluboce zamrazené plicní tkáně na hladinu zmraženého fixačního roztoku při jeho pomalém tání při 4 °C dojde k fixaci tkáně a její základní struktura zůstane z větší části zachována. V porovnání s primárně fixovanou tkání pozorujeme částečné poškození intraalveolárních sept i pojiva, které se rozvolňuje na jednotlivé svazky kolagenních vláken. Poškození mohlo vzniknout během krájení tkáně v kryostatu a při následné časové prodlevě mezi umístěním řezu na hladinu zmraženého fixačního roztoku a prostoupením tohoto roztoku celým řezem. Tomu napovídá i fakt, že struktura alveol ve větší hloubce řezu je zachována lépe. Vliv krájení pozorujeme i u fixované tkáně, jejíž povrchové struktury jsou rovněž mírně poškozené. V porovnání se zobrazením zcela nefixované tkáně v pokusu 5.2 můžeme v řezech umístěných na hladinu zmraženého fixačního roztoku pozorovat charakteristické struktury tkáně. Tento způsob zpracování vzorků umožňuje využití nefixované tkáně, která je vhodná pro přípravu vzorků pro MALDI-MSI, i pro přípravu vzorků pro SEM.

2. Během postfixace řezů tkáně v parách osmia došlo k jejich zkřehnutí a následně k popraskání povrchu. Pro přípravu vzorků tkání jsme proto postfixaci dále nepoužívali.

3. Řezy o větší tloušťce zachycují větší objem tkáně. Jestliže vlivem přípravy vzorků dojde k mírnému poškození jejich povrchu, například k popraskání vlivem sušení na vzduchu, můžeme v řezech o větší tloušťce pozorovat struktury hlouběji pod povrchem, které nejsou těmito artefakty ovlivněny. Řezy o tloušťce 25 μm jsou navíc náchylnější k poškození díky obtížnější manipulaci při zpracování vzorků.

5.4 Fixace hluboce zmrazené tkáně

Cíle pokusu:

- ověřit možnost zachování struktury dlouhodobě skladované hluboce zamrazené tkáně,
- porovnání technik sušení vzorků:

  sušení v exsikátoru,

  sušení na vzduchu,

  sušení metodou kritického bodu (CPD).

Příprava vzorků

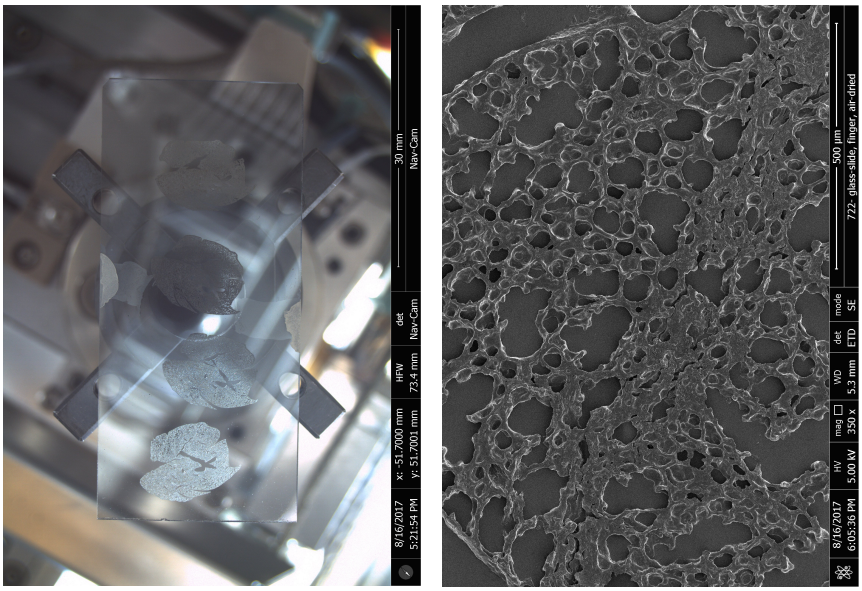
Z hluboce zamrazené tkáně, která byla po rozmrazení fixována 4% roztokem GA a prosycena 30% roztokem sacharózy, jsme po opětovném zamrazení připravili řezy o tloušťkách:

- 30 μm a 100 μm, které jsme umístili na povrch zmraženého pufru v 6-ti jamkové destičce
- 30 μm, které jsme umístili na podložní sklíčko

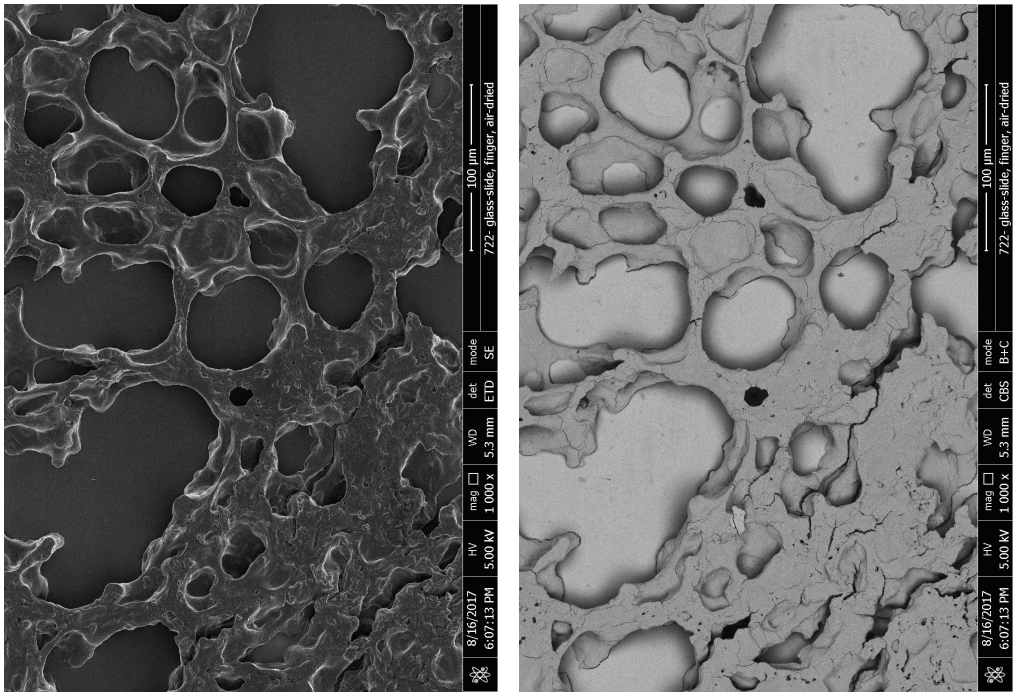
Řezy umístěné na povrch zmraženého pufru jsme po pomalém rozmrazení nabrali na sklíčka a sušili na vzduchu nebo odvodnili a sušili metodou CPD. Podložní sklíčka jsme vysušili v exsikátoru a spolu s ostatními vzorky pokovili 3 nm platiny.

Výsledky

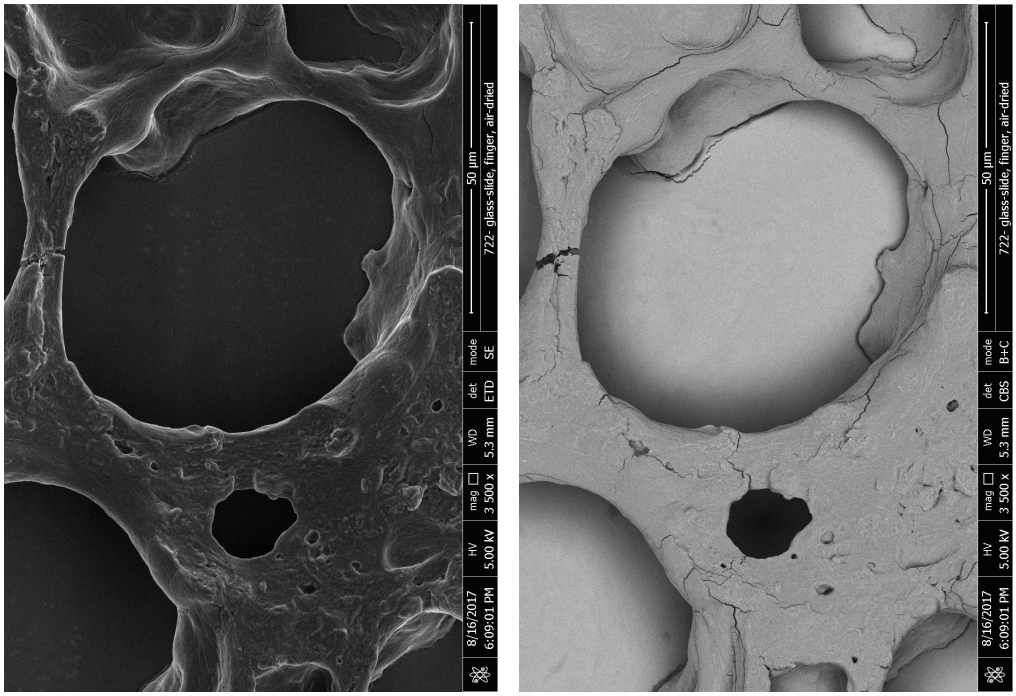
Řezy na podložním sklíčku, tloušťka 30 μm



Obrázek 5.37: Umístění sklíčka s řezy tkáně v komoře SEM (vlevo) a zobrazení řezu v SE (vpravo). Ve tkáni jsou dobře zachované plicní alveoly, povrch vzorku není popraskaný. Primární zvětšení 350x.

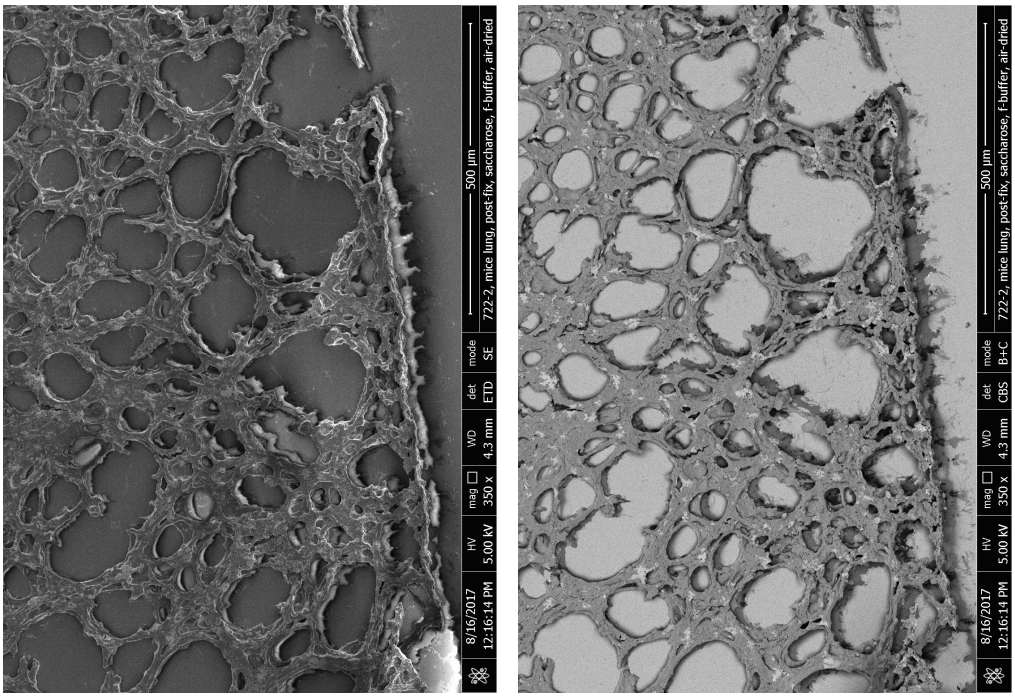


Obrázek 5.38: Zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). V obou zobrazovacích módech jsou viditelné plicní alveoly, dobře zachována jsou i intraalveolární septa. Primární zvětšení 1 000x.

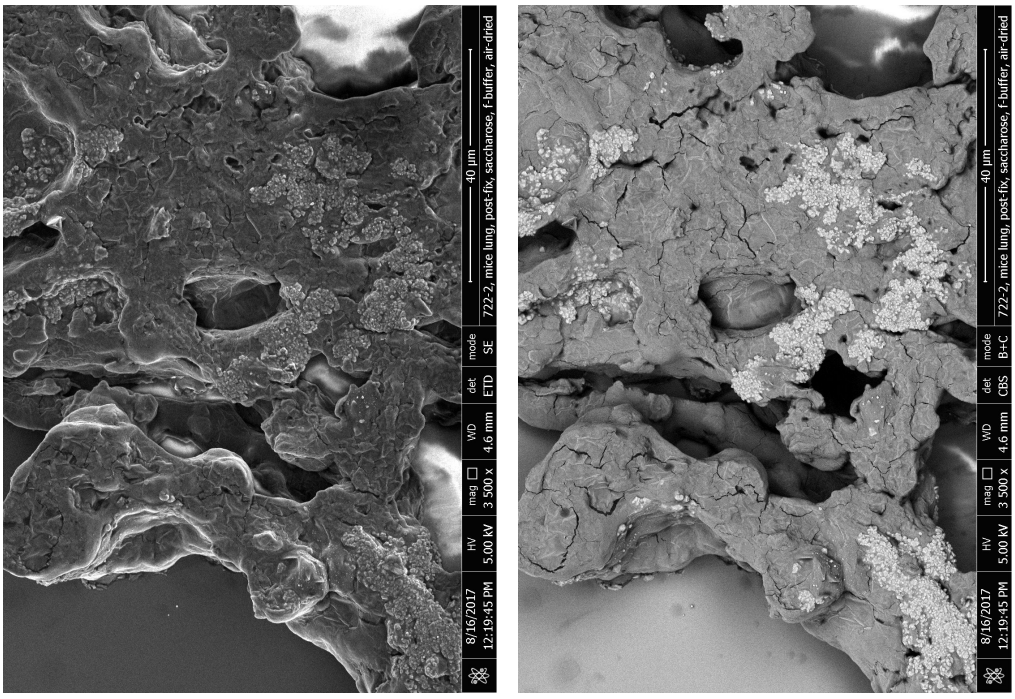


Obrázek 5.39: Detail alveoly, zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Primární zvětšení 3 500x.

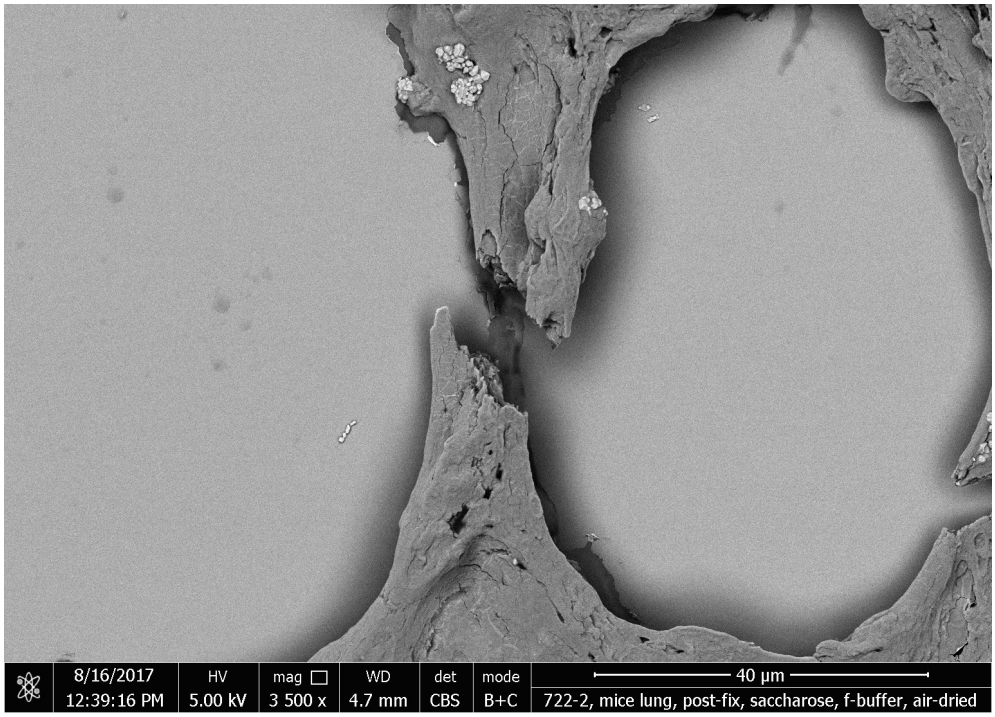
Řezy sušené na vzduchu



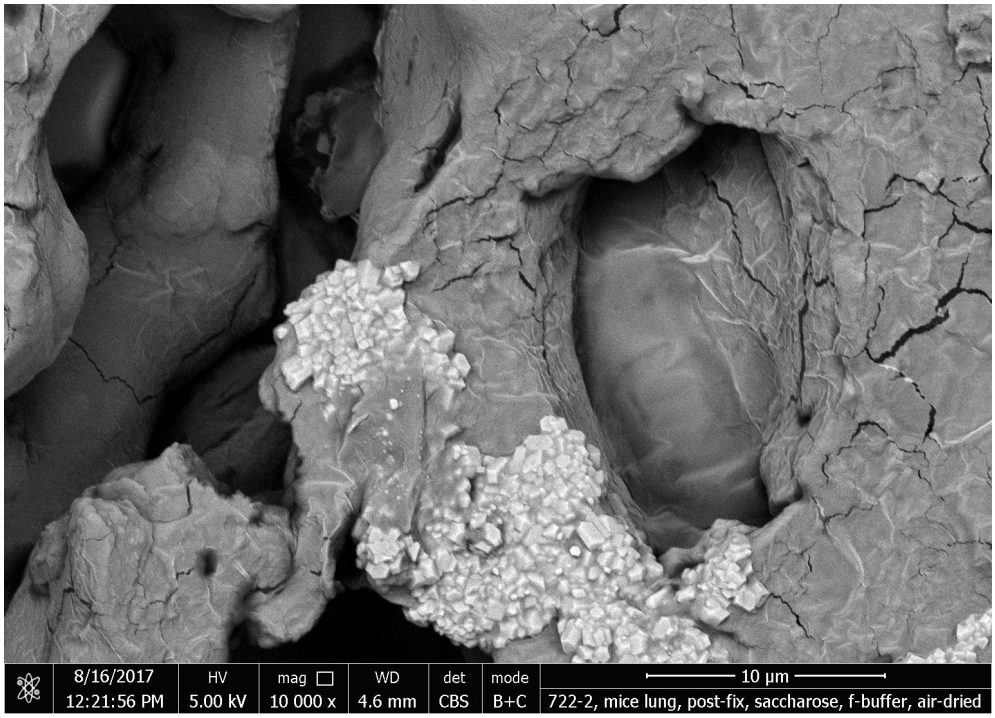
Obrázek 5.40: Řez o tloušťce 30 μm sušený na vzduchu, zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Struktura plicní tkáně je dobře zachovaná. Na pravém snímku jsou viditelné krystaly sacharózy, které mohly vzniknout při opětovném zamrazení tkáně. Primární zvětšení 350x.



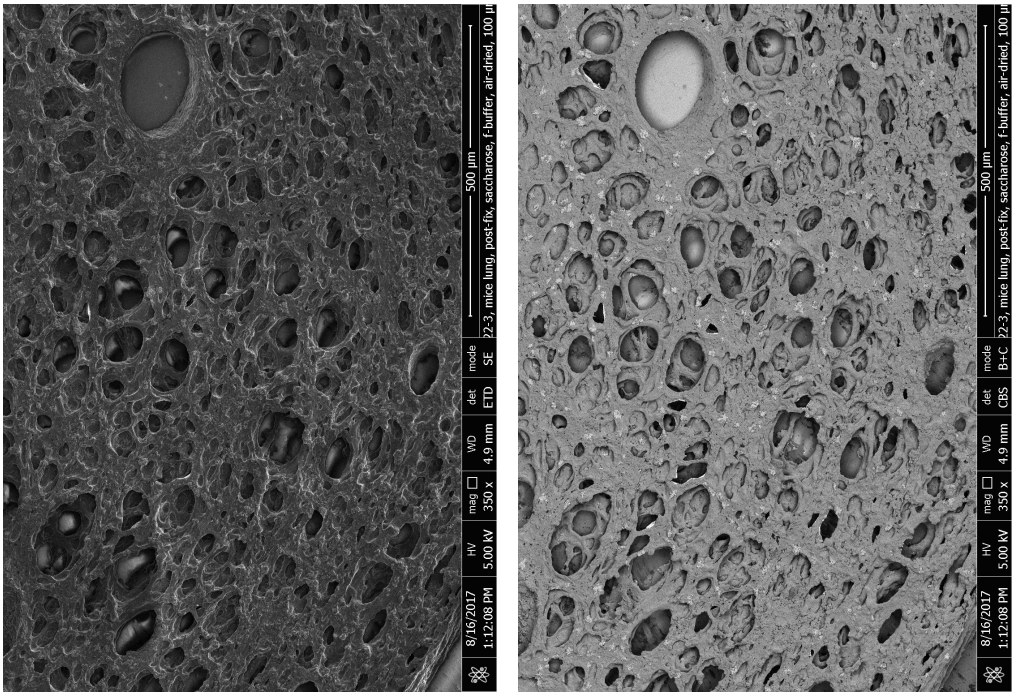
Obrázek 5.41: Detail řezu o tloušťce 30 μm sušeného na vzduchu, zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Krystaly sacharózy jsou rozeznatelné i na snímku v SE. Viditelné je mírné popraskání povrchu. Primární zvětšení 3 500x.



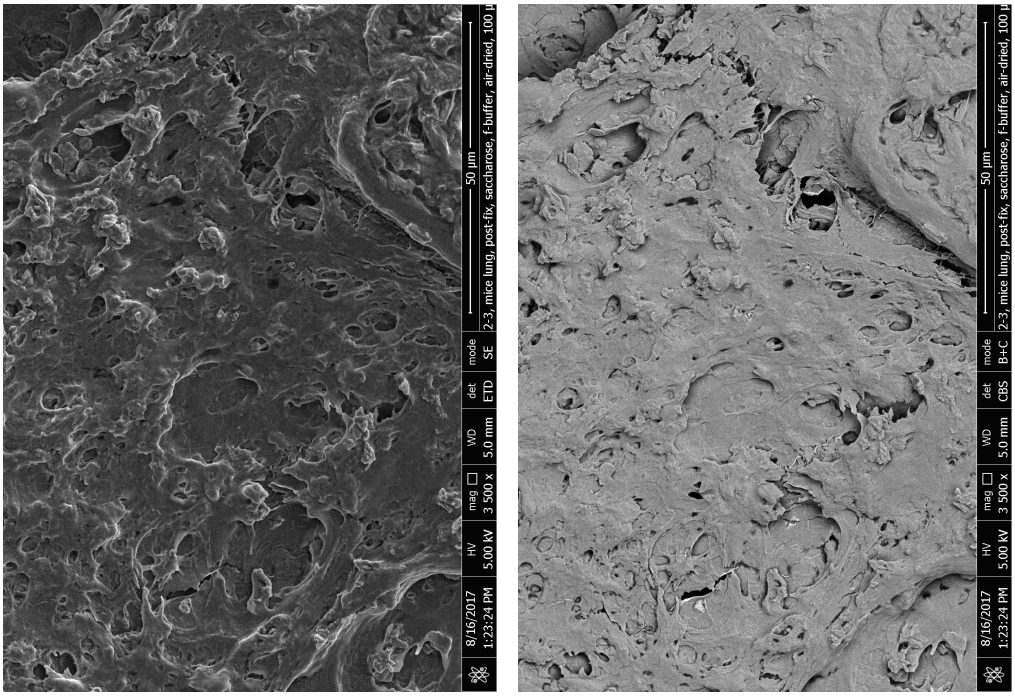
Obrázek 5.42: Detail alveoly a poškozeného intraalveolárního septa s krystaly sacharózy. Primární zvětšení 3 500x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.43: Detail krystalů sacharózy. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v BSE.

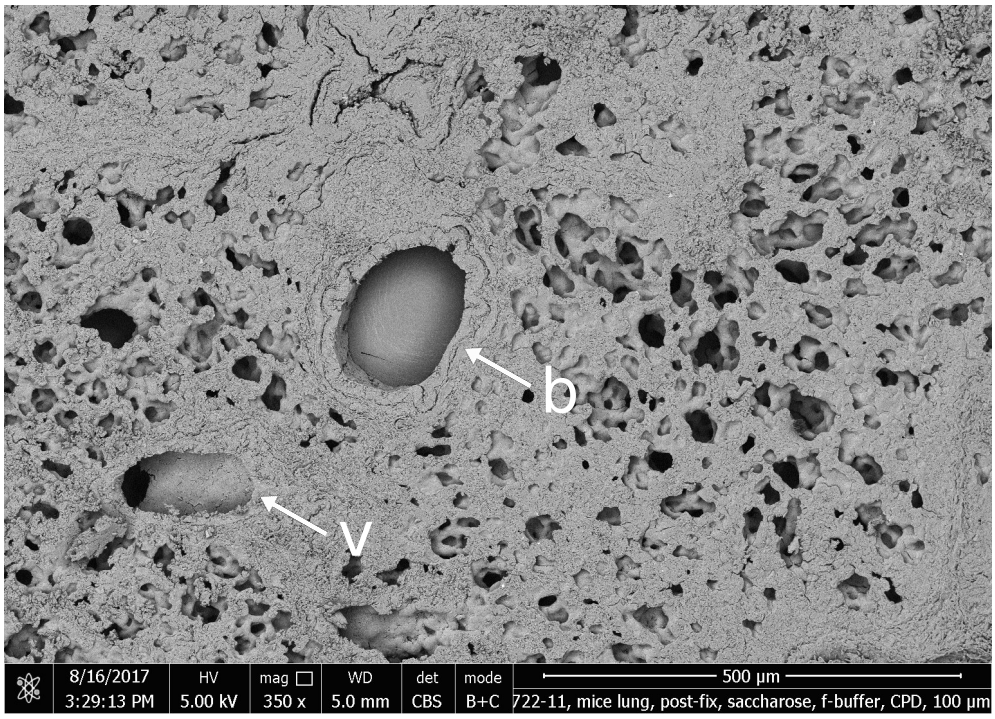


Obrázek 5.44: Řez o tloušťce 100 μm sušený na vzduchu, zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). V obou zobrazovacích módech jsou dobře viditelné alveoly, na pravém snímku jsou viditelné krystaly sacharózy. Primární zvětšení 350x.

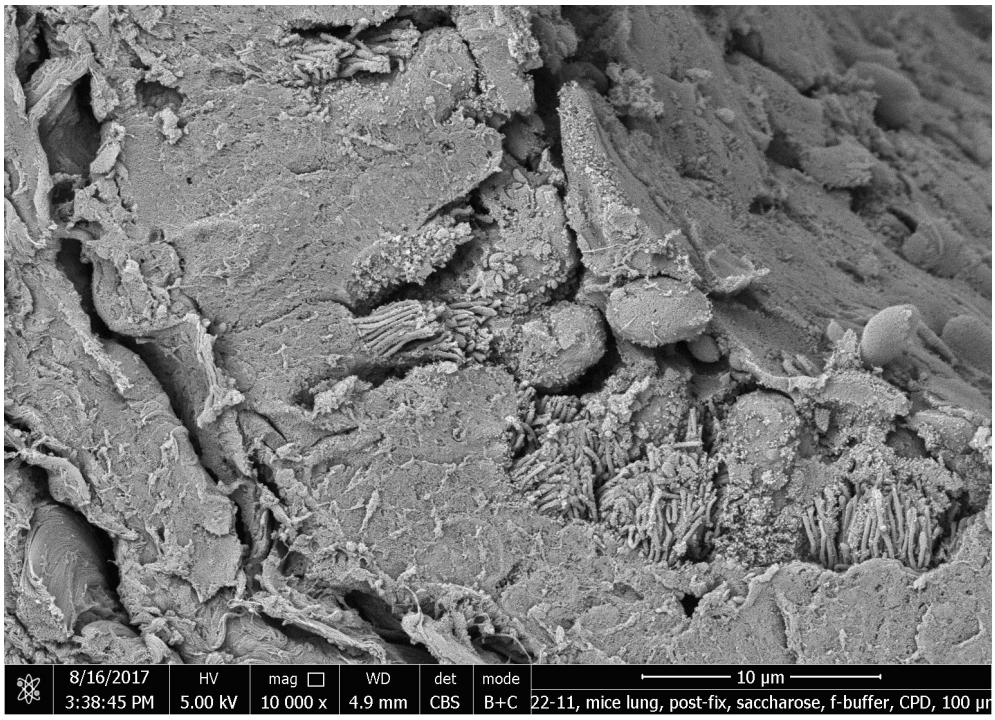


Obrázek 5.45: Řez o tloušťce 100 μm sušený na vzduchu, zobrazení v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Při větším zvětšení je struktura řezů o větší tloušťce hůře rozpoznatelná, část pojivové tkáně je popraskaná. Primární zvětšení 3 500x.

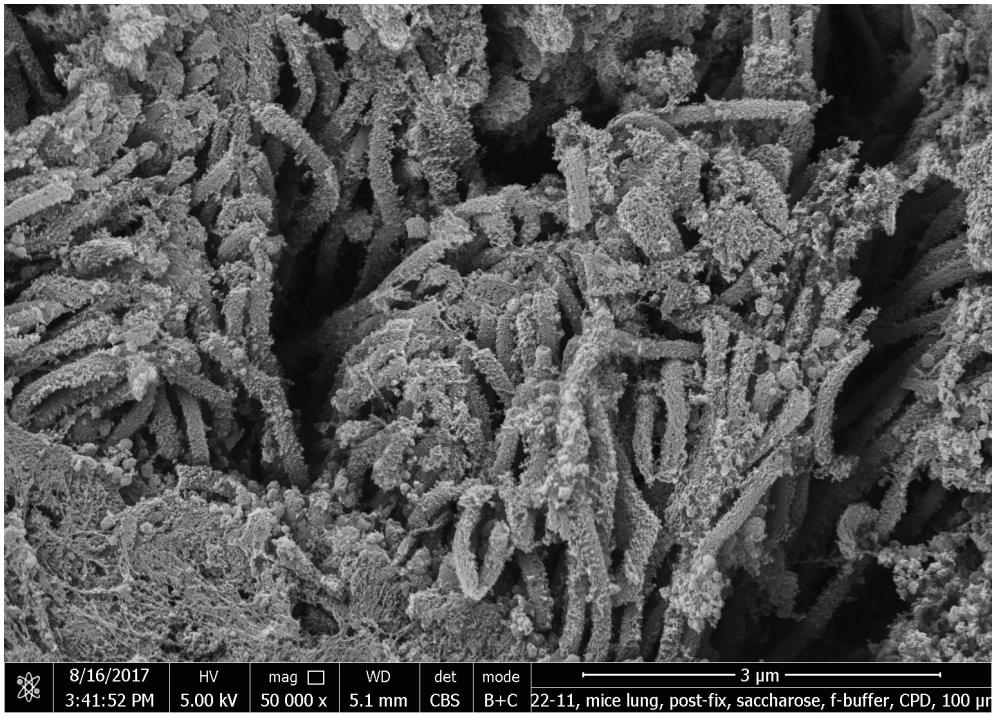
Řezy o tloušťce 100 μm sušené metodou CPD



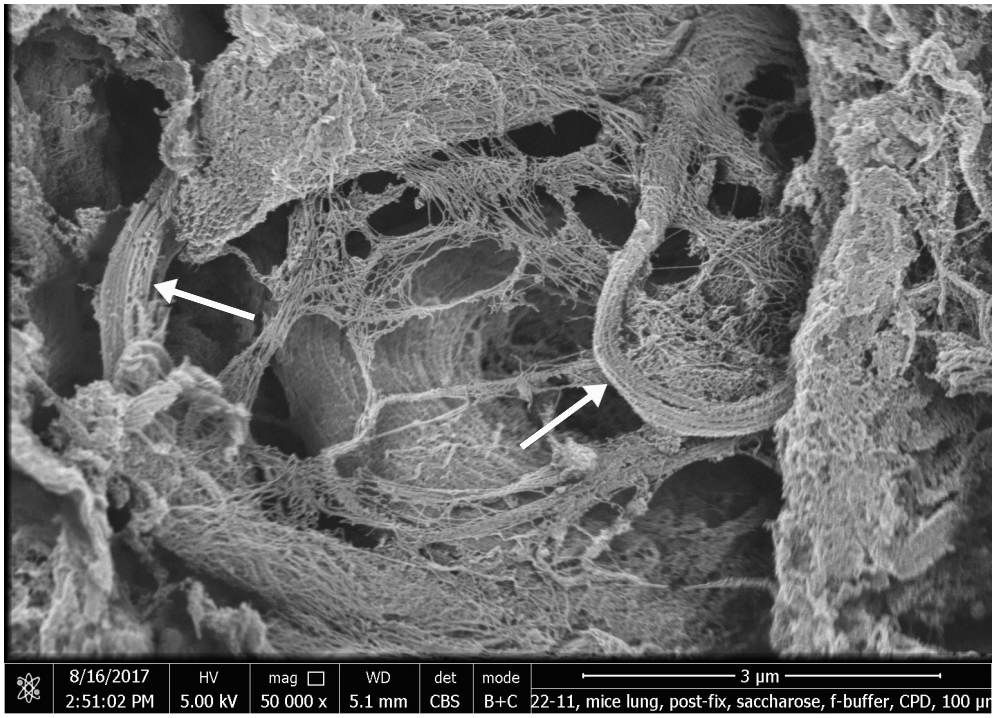
Obrázek 5.46: Řez o tloušťce 100 μm sušený metodou CPD. Struktura tkáně je velmi dobře zachovaná, pozorujeme bronchiolus (b) a vénu (v). Primární zvětšení 350x, zobrazeno v BSE.



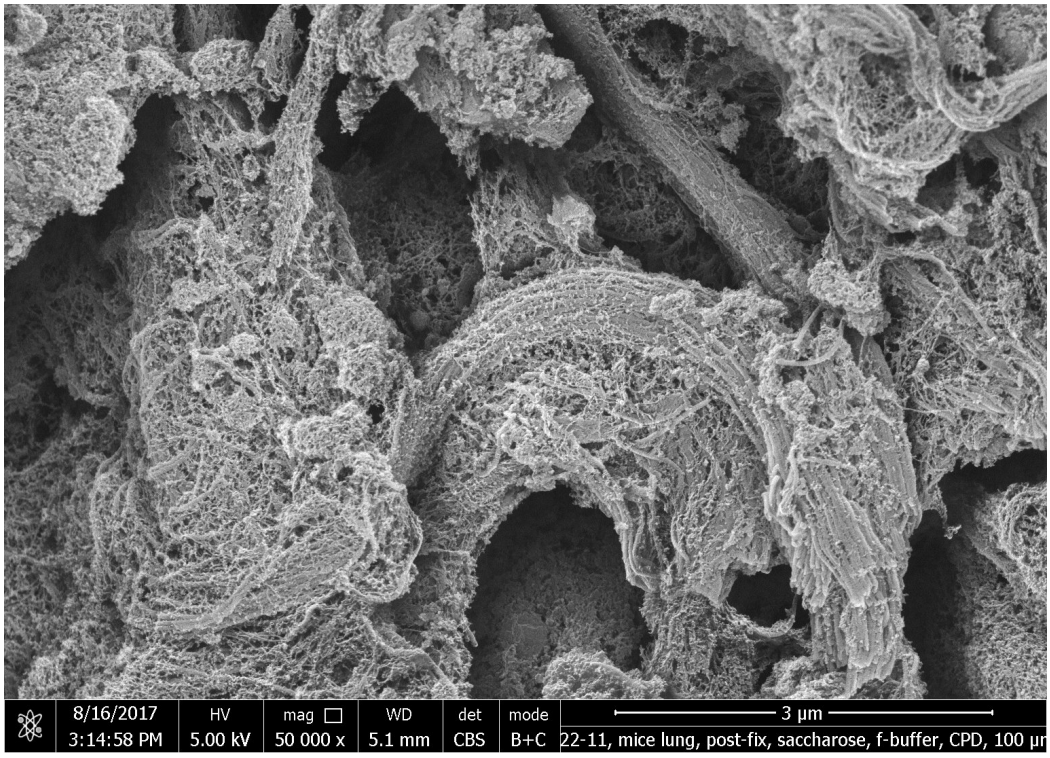
Obrázek 5.47: Detail části řasinkového epitelu. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v BSE.



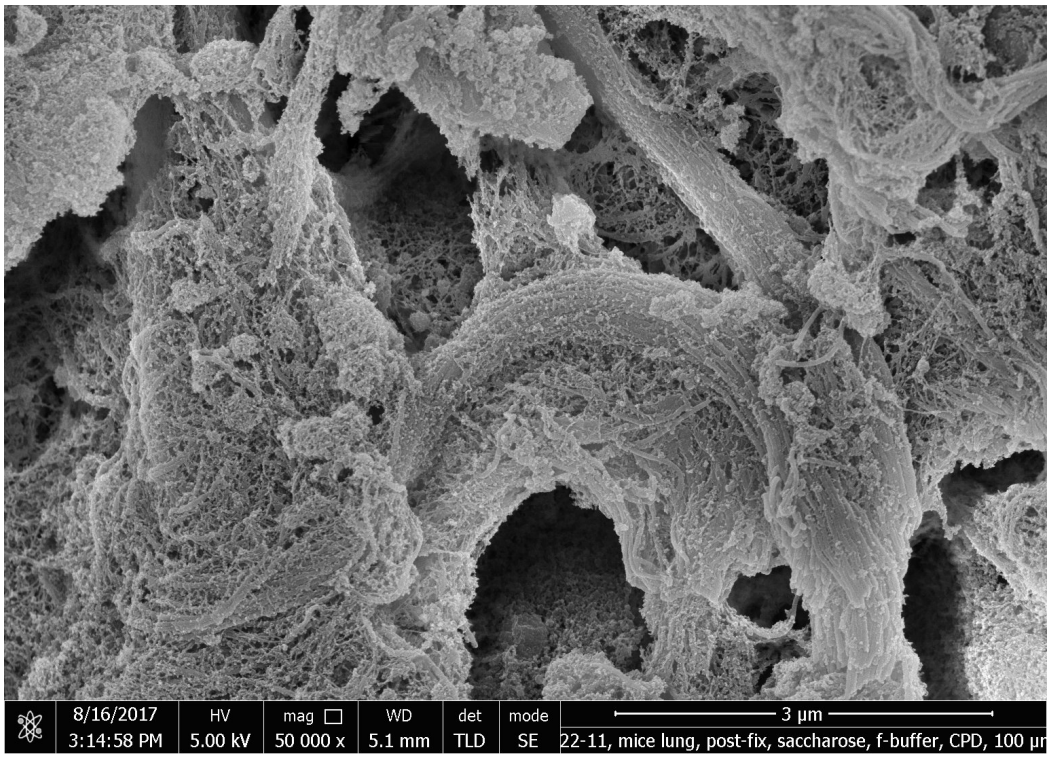
Obrázek 5.48: Detail řasinek. Primární zvětšení 50 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.49: Detail pojiva, dobře viditelné jsou svazky kolagenních vláken (označeny šipkami). Primární zvětšení 50 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.50: Detail svazku kolagenních vláken, primární zvětšení 50 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.51: Detail svazku kolagenních vláken, primární zvětšení 50 000x, zobrazeno v SE detektorem TLD.

Závěr

1. Dlouhodobě skladovanou hluboce zamrazenou tkáň lze po rozmrazení fixovat roztokem GA. Tato fixace je dostatečná k zobrazení charakteristických struktur tkáně. Zřejmě však dochází k jejímu mírnému poškození, jelikož jsme na snímcích s vysokým rozlišením pozorovali individuální kolagenní vlákna v rozvolněné pojivové tkáni. Tento způsob fixace je snadno proveditelný a zdá se proto vhodný pro přípravu vzorků pro SEM ze tkání, které jsou dlouhodobě uchovávány hluboce zamrazené.

2. Sušení vzorků standardní metodou CPD umožnilo zobrazit řadu strukturních detailů bez kompresních artefaktů. Během sušení vzorků na vzduchu dochází vlivem sil povrchového napětí k mírnému popraskání povrchu. U řezů umístěných na sklíčkách, která se sušila v exsikátoru, je popraskání povrchu méně patrné.

5.5 Sval myši infikovaný *P. aeruginosa*

Cíle pokusu:

- ověřit přítomnost bakterií *Pseudomonas aeruginosa* ve svalu myši, ve kterém byl pomocí MALDI-MSI detekován pyoverdin,
- vyzkoušet MALDI-MSI i SEM na jednom preparátu,
- ověřit možnost korelace snímků.

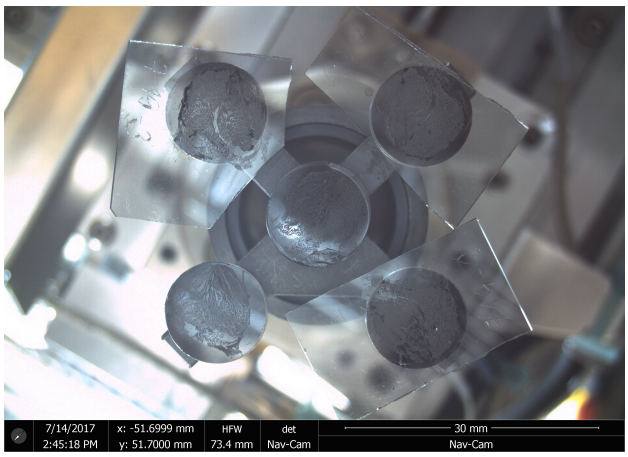
Příprava vzorků

Z nefixovaného svalu infikovaného *P. aeruginosa* jsme připravili řezy o tloušťce 10 μm a umístili je na:

- ITO sklo pro MALDI-MSI,
- ITO sklo pro společnou analýzu v SEM a MALDI-MSI,
- ITO sklo pro SEM,
- povrch zmraženého fixačního roztoku.

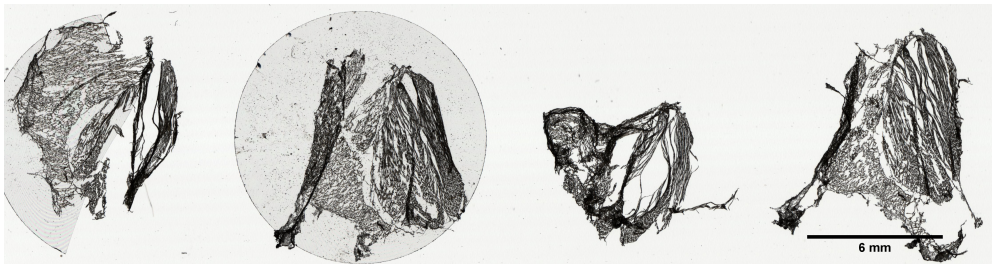
Po vysušení jsme sklíčka pouhlíkovali a následně pokryli 3 nm platiny, sklíčko pro společnou analýzu pouze z jedné poloviny. Po mikroskopii se na toto sklíčko nanesla matrice a bylo analyzováno pomocí MALDI-MSI. Řezy umístěné na fixační roztok jsme zpracovali stejně jako v předchozích pokusech, část z nich jsme sušili na vzduchu a část metodou CPD. Poté jsme tyto řezy rovněž pouhlíkovali a poplatinovali.

Výsledky

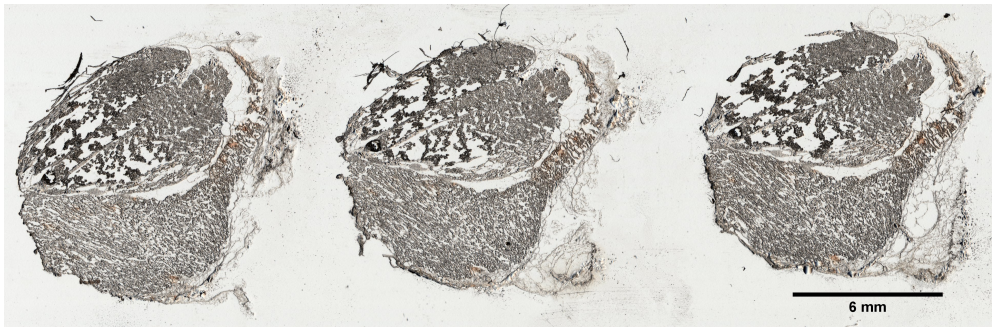


Obrázek 5.52: Umístění vzorků v komoře SEM. ITO sklo jsme nalámali podle jednotlivých řezů na menší části pro zajištění lepší vodivosti vzorků.

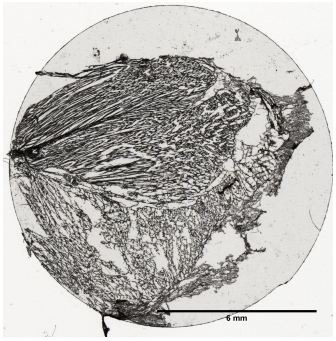
Řezy sušené metodou CPD



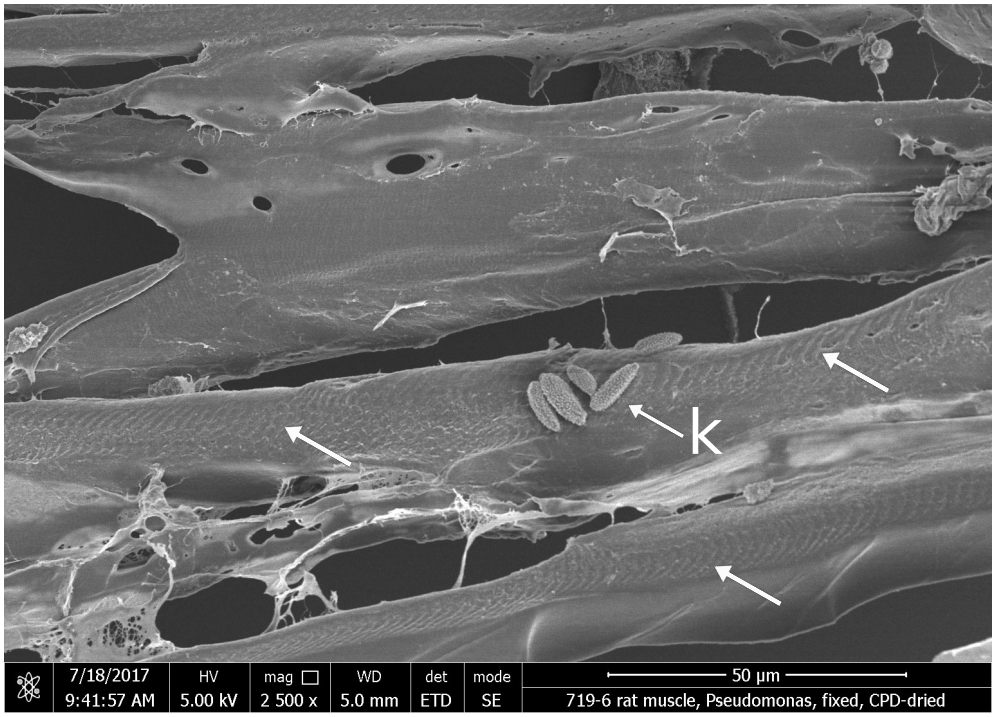
Obrázek 5.53: Řezy umístěné na povrch zmraženého fixačního roztoku, sušené metodou CPD. Během sušení došlo k výraznému poškození řezů. Zkroucení a komprese mohly být způsobeny tím, že byl sval krájen podélně. Jednotlivá vlákna se tak snáze rozvolňovala. Dále k poškození mohla přispět velmi malá tloušťka řezů (10 μm). Snímek ze skeneru.



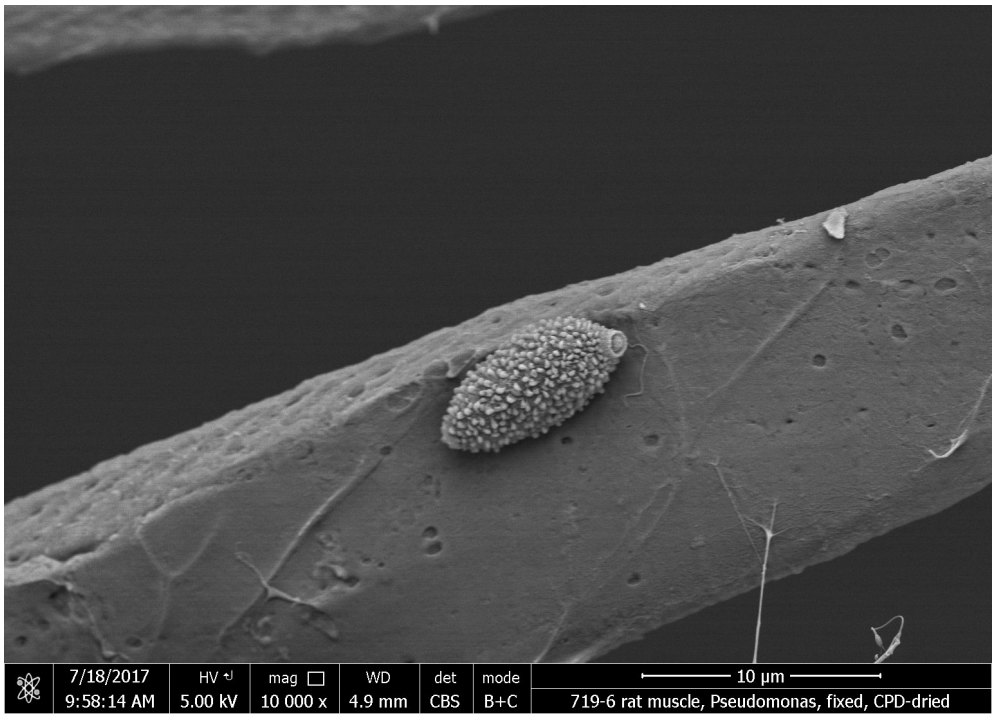
Obrázek 5.54: Řezy umístěné na sklíčku sušené v exsikátoru. Při sušení nedošlo k viditelnému poškození řezů. Snímek ze skeneru.



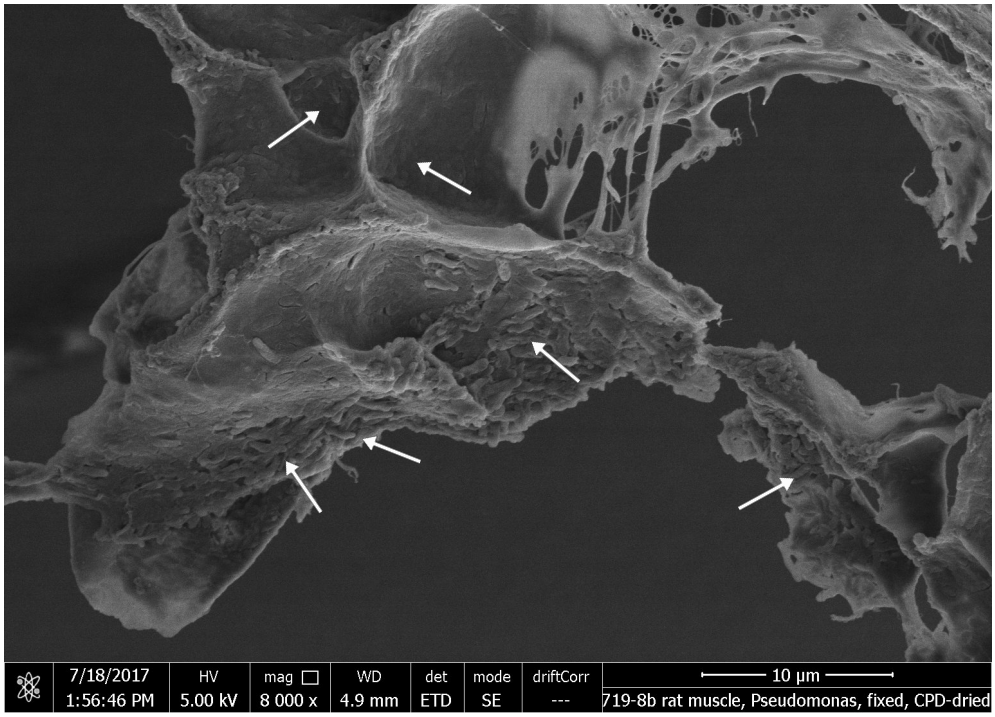
Obrázek 5.55: Řez umístěný na povrch zmraženého fixačního roztoku, sušený na vzduchu. V porovnání s řezy sušenými metodou CPD nedošlo k deformaci tvaru řezu a viditelnému poškození struktury. Oproti řezům sušeným v exsikátoru však došlo během promývání v pufru a nabírání na sklíčko k mírnému rozvolnění svalových vláken. Řezy sušené na vzduchu na rozdíl od řezů sušených metodou CPD na sklíčkách drží, manipulace s nimi je proto jednodušší a snižuje se riziko poškození opakovaným přenášením řezů. Snímek ze skeneru.



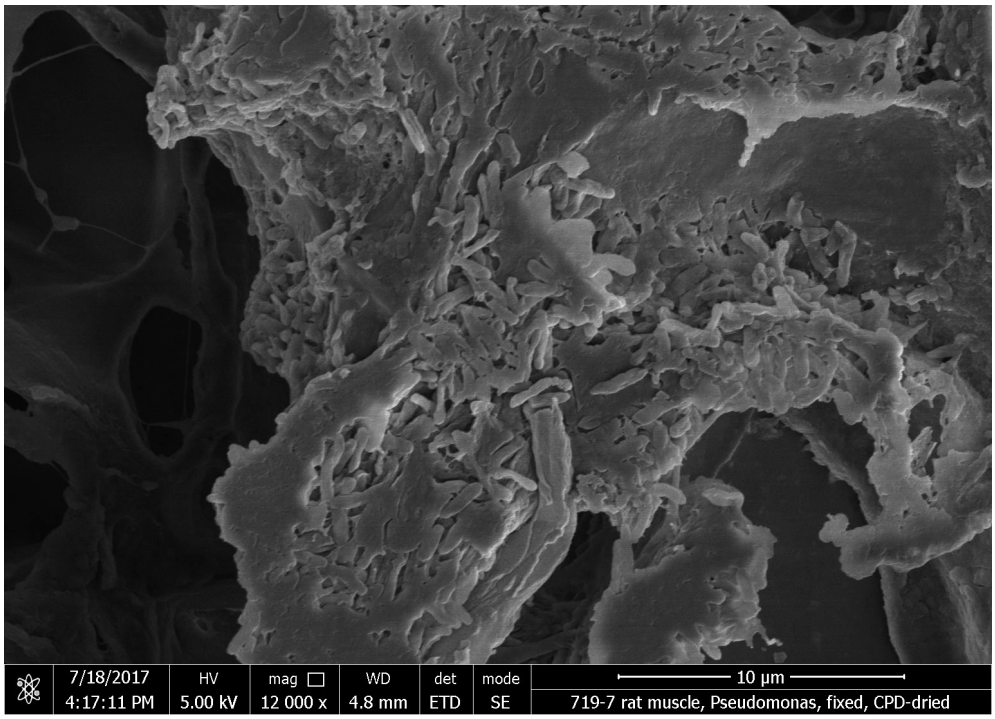
Obrázek 5.56: Svalová vlákna s viditelným příčným pruhováním (označeno šipkami). Dále pozorujeme neznámé konidie (k), které kontaminovaly vzorek. Primární zvětšení 2 500x, zobrazeno v SE.



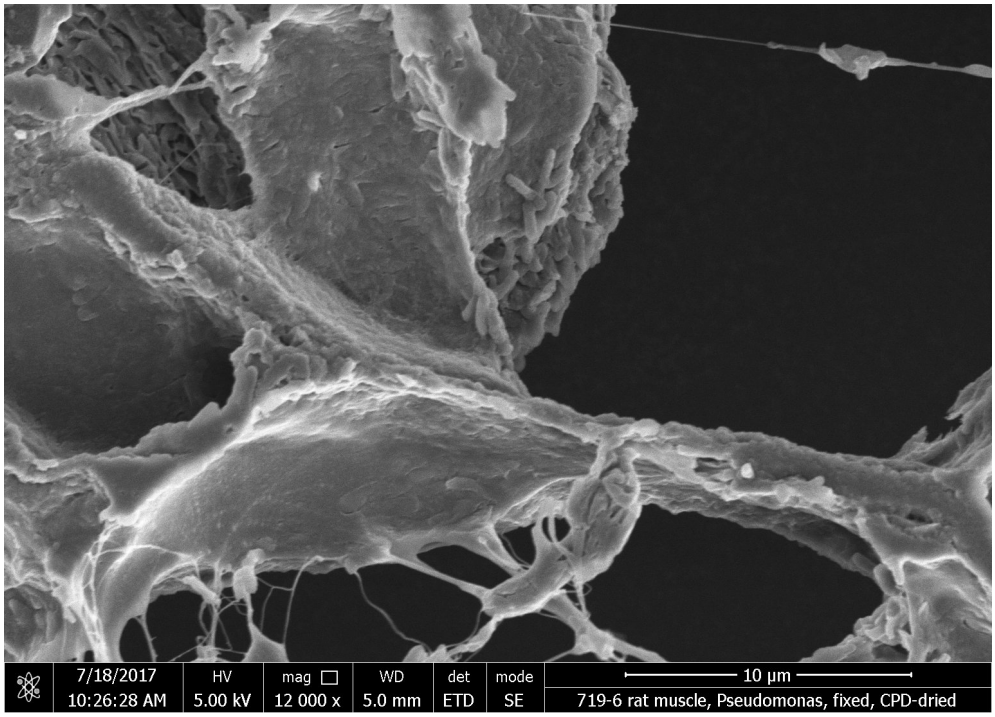
Obrázek 5.57: Detail konidie na svalovém vláknu. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v BSE.



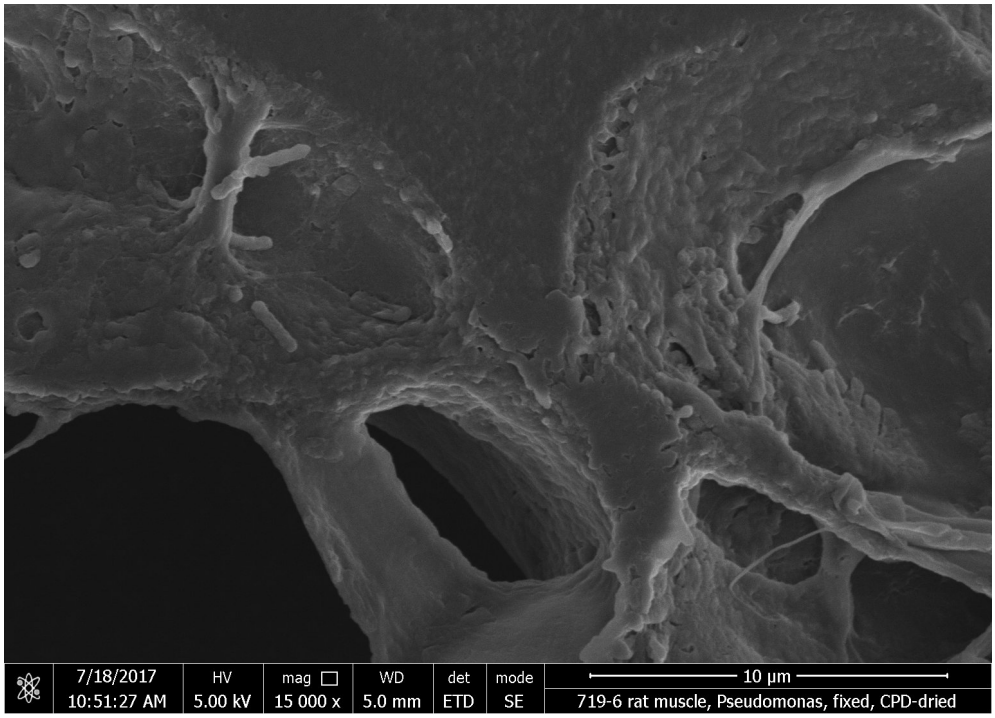
Obrázek 5.58: Detail svalu. Při větším zvětšení není možné rozeznat jednotlivé struktury svalu. Bakterie *P. aeruginosa* (označeny šipkami) vytváří ve tkáni biofilm. Primární zvětšení 8 000x, zobrazeno v SE.



Obrázek 5.59: Detail svalu. Bakterie *P. aeruginosa* pokrývají celé struktury svalové tkáně. Primární zvětšení 12 000x, zobrazeno v SE.

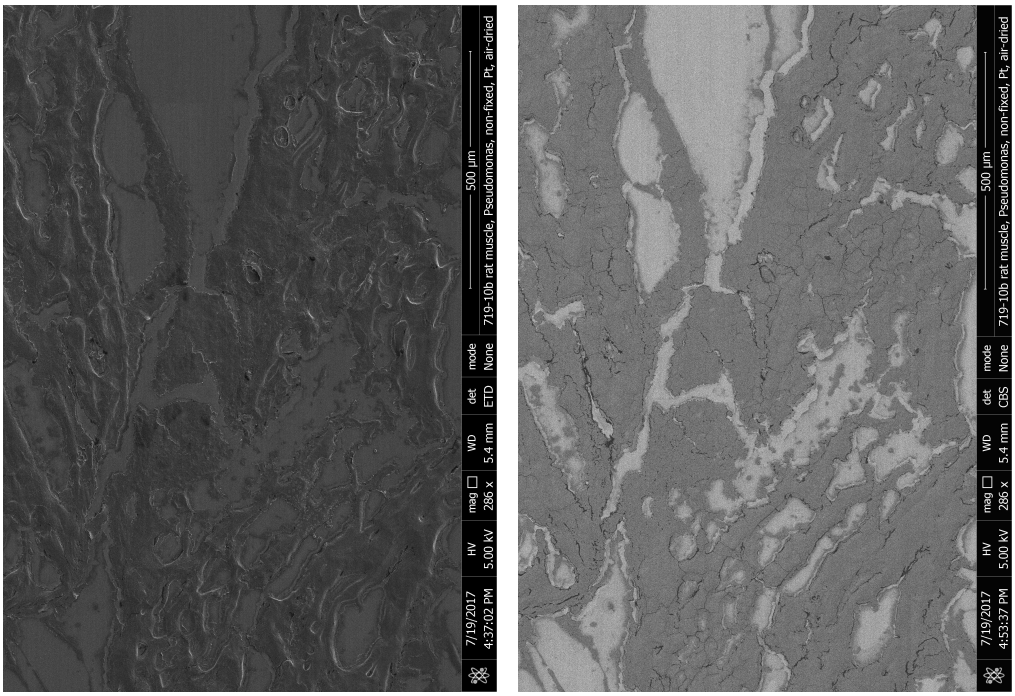


Obrázek 5.60: Detail svalu. Pozorujeme rozvolnění struktur a jejich pokrytí bakteriálním biofilmem. Primární zvětšení 12 000x, zobrazeno v SE.

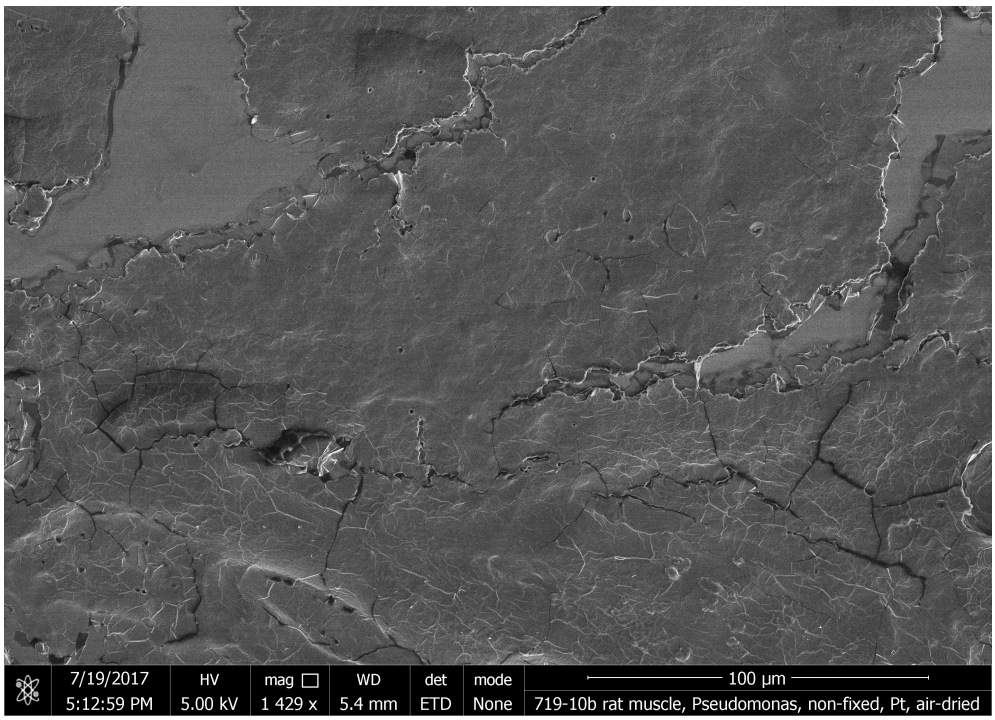


Obrázek 5.61: Detail svalu s bakteriálním biofilmem. Primární zvětšení 15 000x, zobrazeno v SE.

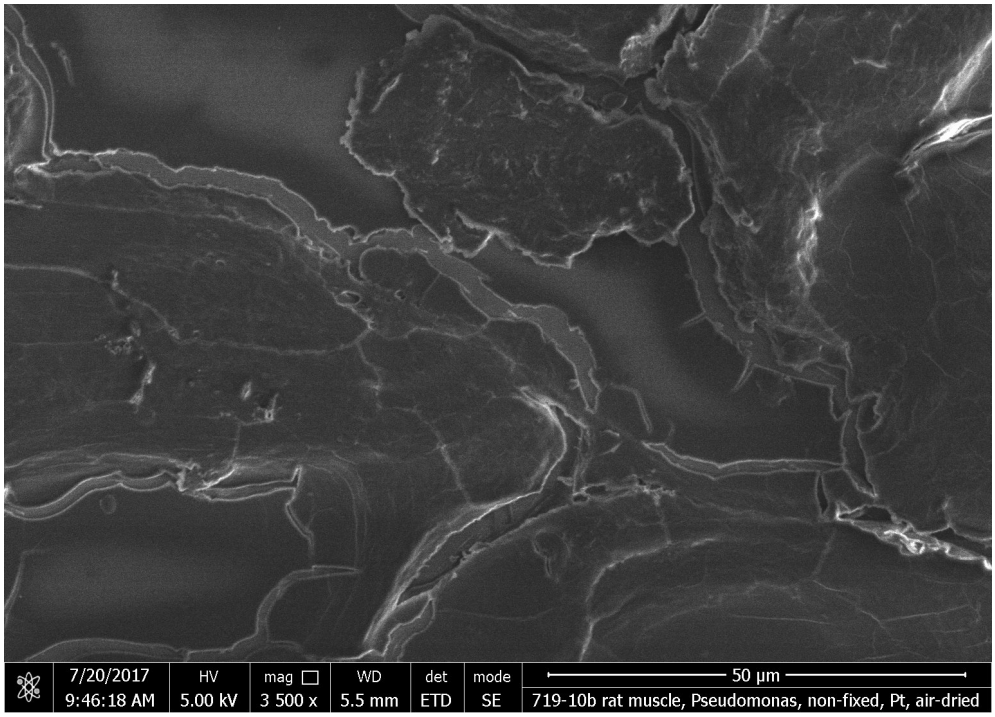
Řezy umístěné na ITO sklo pro společnou analýzu MALDI-MSI a SEM



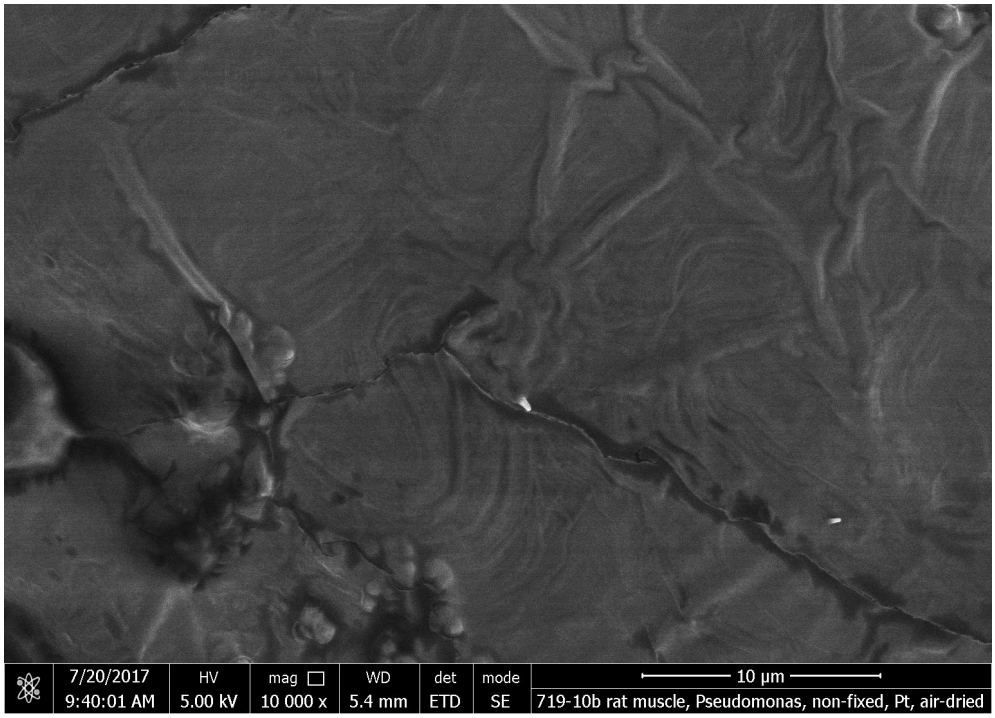
Obrázek 5.62: Zobrazení nefixované tkáně v SE (vlevo) a v BSE (vpravo). Ani v jednom zobrazovacím módu není možné rozlišit strukturu tkáně. Primární zvětšení 286x.



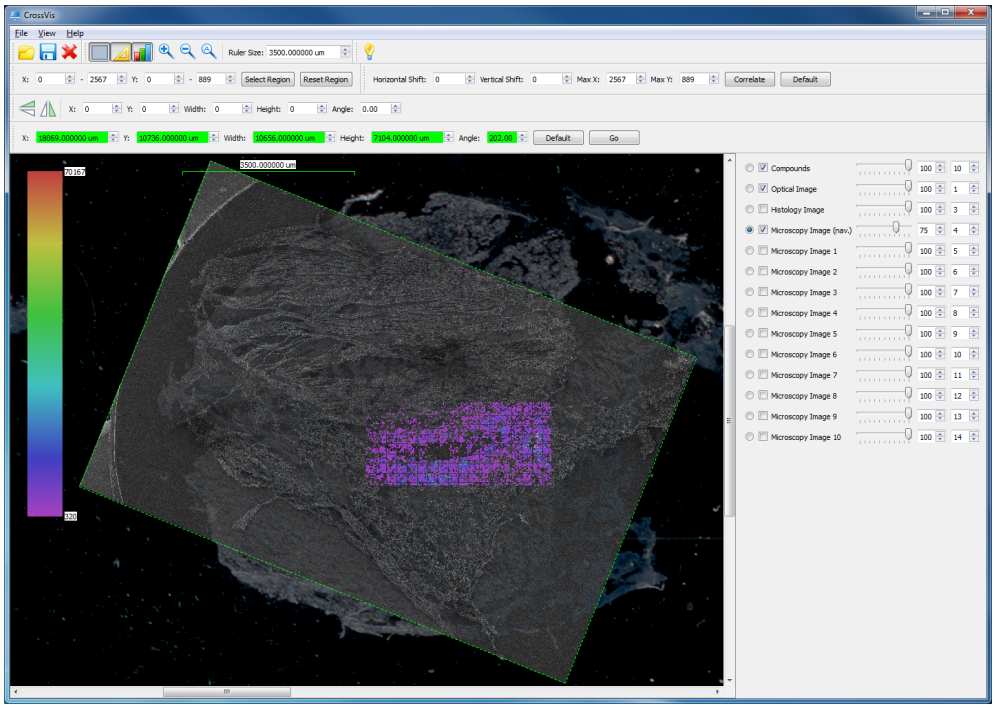
Obrázek 5.63: Nefixovaná tkáň, struktury svalu není možné rozeznat. Primární zvětšení 1 429x, zobrazeno v BSE.



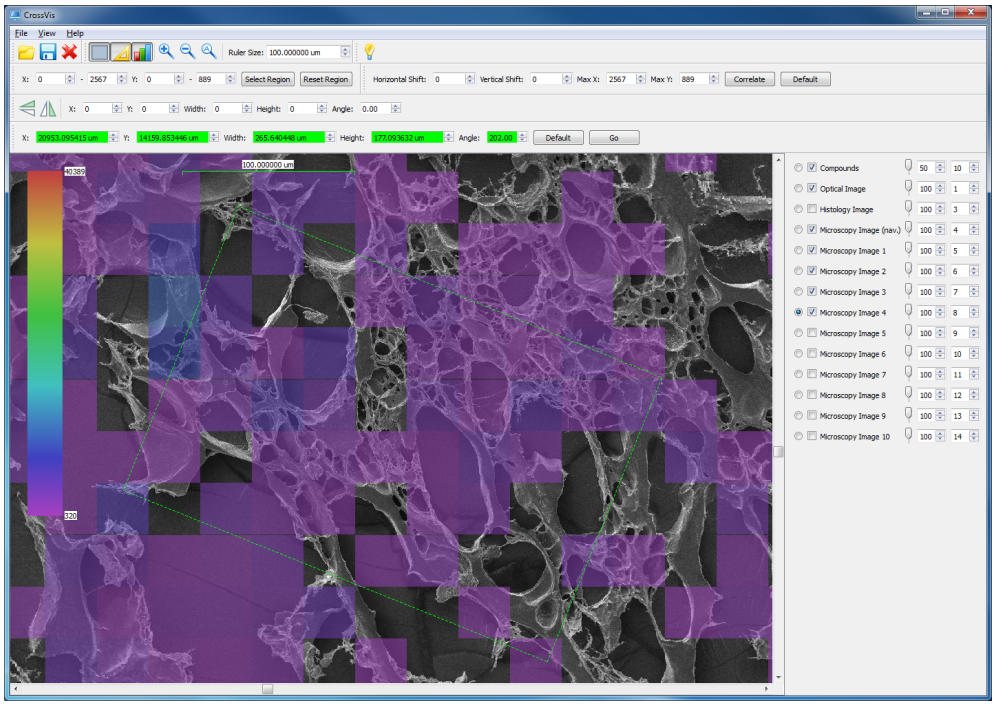
Obrázek 5.64: Detail svalu. Nefixovaná tkáň, nepozorujeme žádné struktury svalu. Primární zvětšení 3 500x, zobrazeno v SE.



Obrázek 5.65: Detail svalu. Nefixovaná tkáň, nepozorujeme žádné struktury svalu ani bakterie. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v SE.



Obrázek 5.66: Korelace snímků v analytickém softwaru CycloBranch. Na optický snímek ze skeneru a SEM navigační snímek je možné registrovat snímek MALDI-MSI, ve kterém jednotlivé pixely představují jednotlivá naměřená spektra pyoverdinu.



Obrázek 5.67: Korelace snímků při primárním zvětšení 1560x.

Závěr

1. Ověřili jsme přítomnost bakterií *P. aeruginosa* ve svalu myši, ve kterém byl pomocí MALDI-MSI detekován pyoverdin. Pozorování bakterií v nefixované tkáni bylo možné pouze v případě, že jsme její řezy umístili na hladinu zmraženého fixačního roztoku a vysušili je metodou CPD. Ačkoliv takto vysušené řezy byly značně deformovány, bylo v nich možné pozorovat bakterie při zvětšení až 15 000x.

2. Řezy, které jsme umístili na ITO sklíčka, neposkytly žádnou informaci o struktuře tkáně obdobně jako v pokusu 5.2. Zobrazení bakterií pomocí SEM proto nemohlo proběhnout na stejném sklíčku jako měření MALDI-MSI. Ke korelaci snímků byl proto použit SEM snímek řezu umístěného na zmražený fixační roztok a snímek distribuce pyoverdinu z následného řezu.

3. Ověřili jsme možnost korelovat snímky paralelních řezů infikované tkáně pomocí analytického softwaru CycloBranch. Na optický snímek řezu ze skeneru a na SEM navigační obraz byl registrován snímek distribuce pyoverdinu získaný pomocí MALDI-MSI. Pro jednotlivá zvětšení byly na přesně definovaná místa doplňovány SEM snímky. Pomocí tohoto zobrazování je možné určit místa ve tkáni, kde došlo k rozvoji infekce a produkci bakteriálního sideroforu pyoverdinu.

5.6 Plíce potkana infikované *P. aeruginosa*

Cíle pokusu:

- ověřit přítomnost bakterií *P. aeruginosa* v plicích potkana, ve kterých byl pomocí MALDI-MSI detekován pyoverdin,
- vyzkoušet MALDI-MSI i SEM na jednom preparátu.

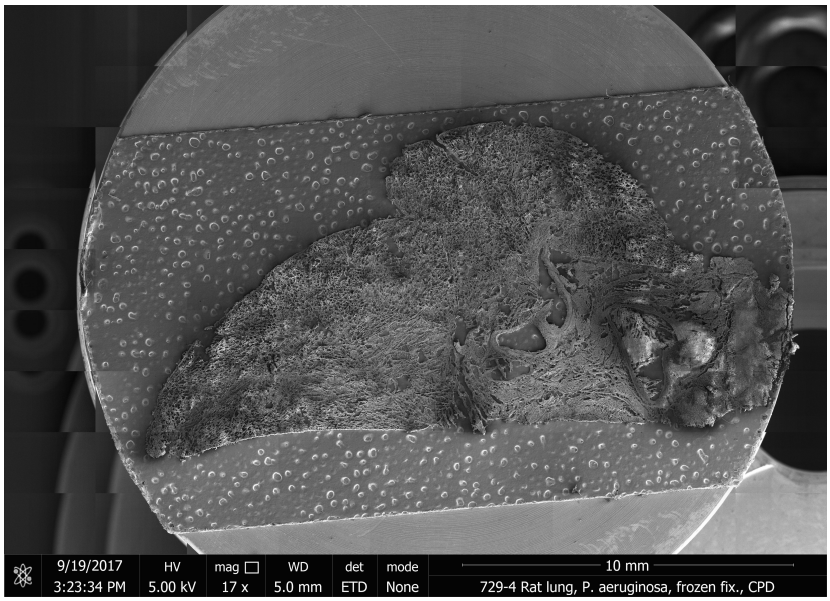
Příprava vzorků

Z nefixované plicní tkáně infikované *P. aeruginosa* jsme připravili řezy:

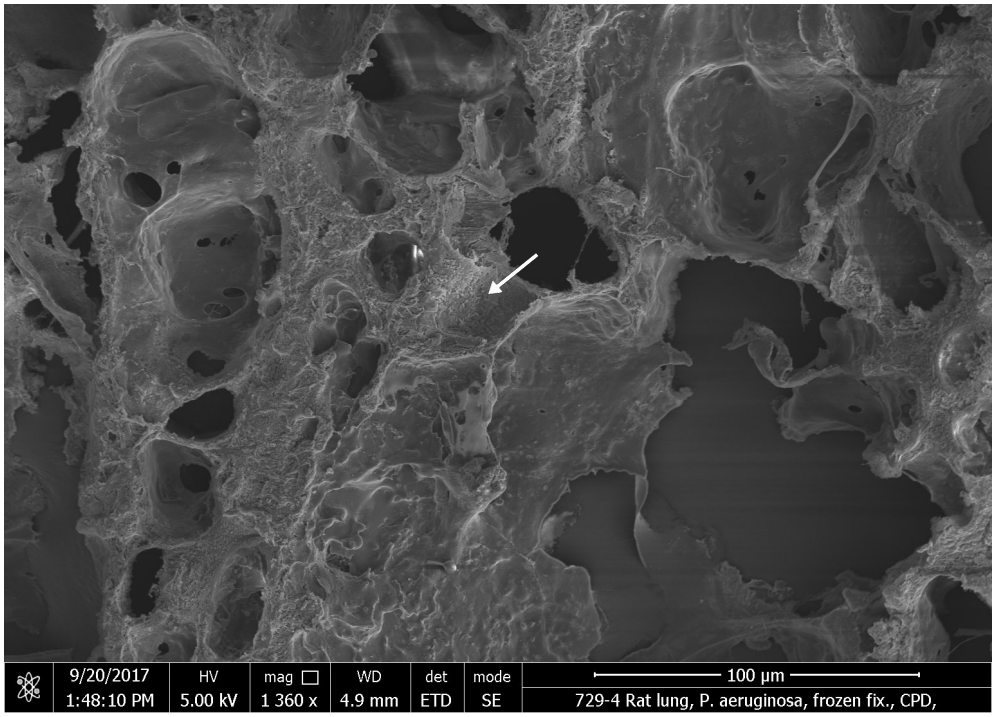
- o tloušťce 15 μm, které jsme umístili na ITO sklíčko. Toto sklíčko jsme umístili do par 25% roztoku glutaraldehydu. Následně jsme sklíčko z jedné poloviny pouhlíkovali 10 nm vrstvou uhlíku. Po mikroskopii se na toto sklíčko nanesla matrice a bylo změřeno pomocí MALDI-MSI.
- o tloušťce 50 μm, které jsme umístili na povrch zmraženého fixačního roztoku. Tyto řezy jsme následně propláchli, odvodnili a vysušili metodou CPD a pokryli 3 nm vrstvou platiny.

Výsledky

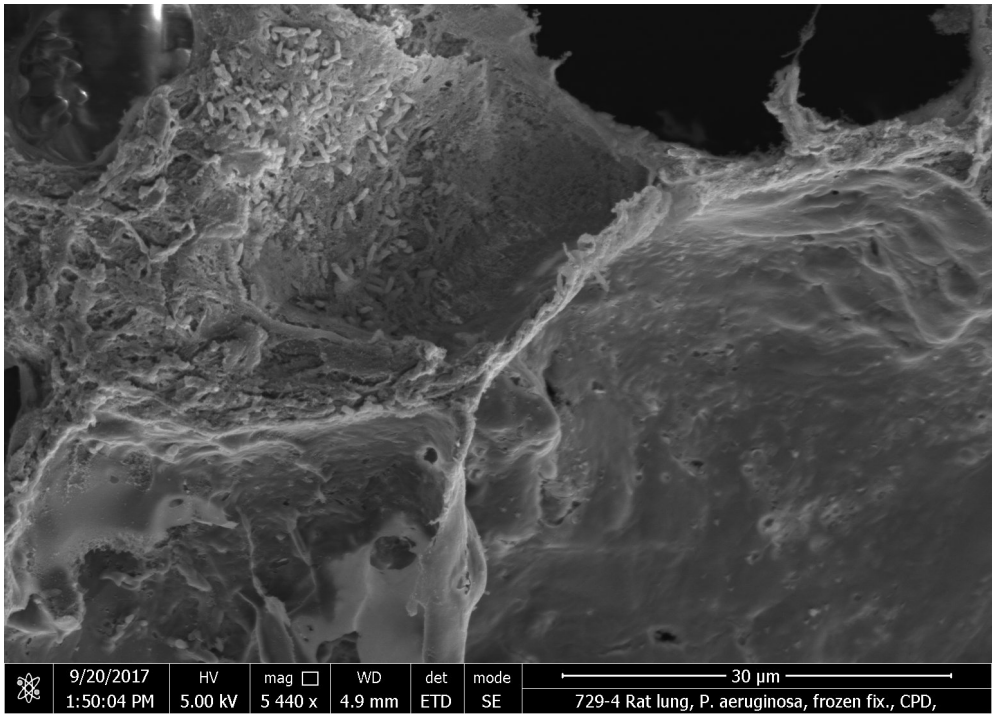
Řezy umístěné na povrch zmraženého fixačního roztoku



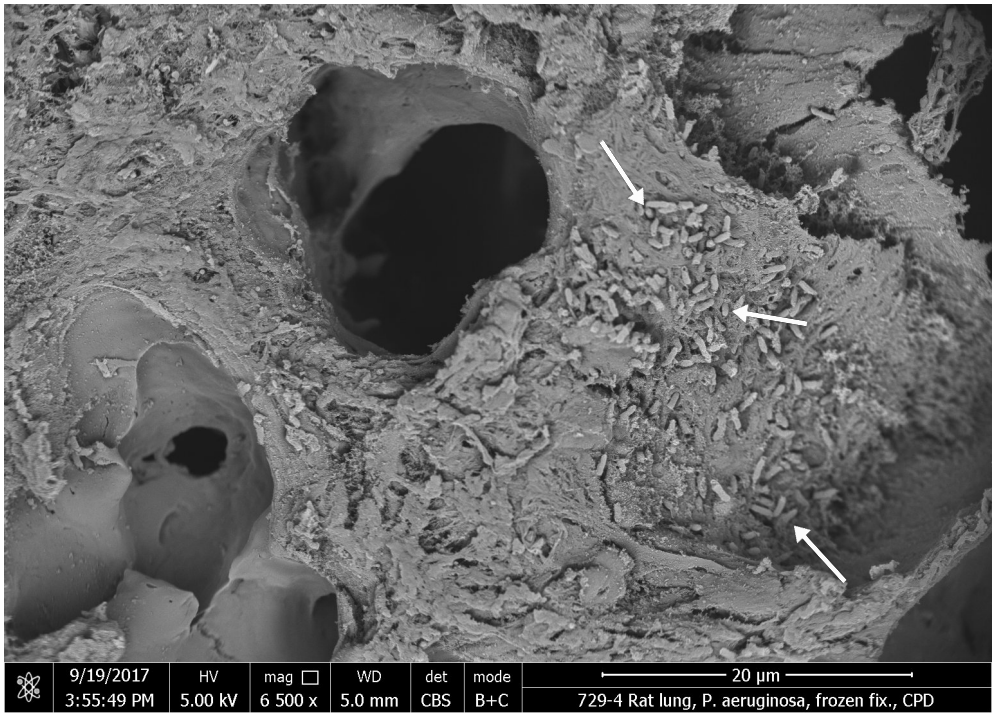
Obrázek 5.68: SEM navigační obraz řezu infikované tkáně. Během sušení metodou CPD nedošlo k viditelnému poškození řezu. Primární zvětšení 17x, zobrazeno v SE.



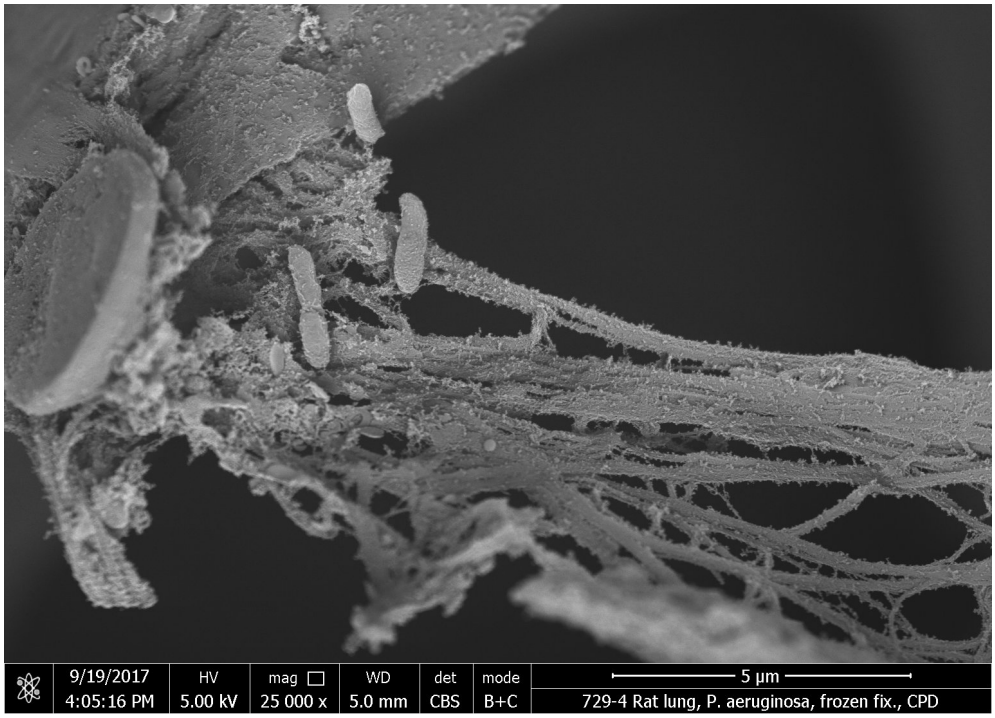
Obrázek 5.69: Plicní tkáň, oblast s bakteriemi *P. aeruginosa* označena šipkou. Primární zvětšení 1 360x, zobrazeno v SE.



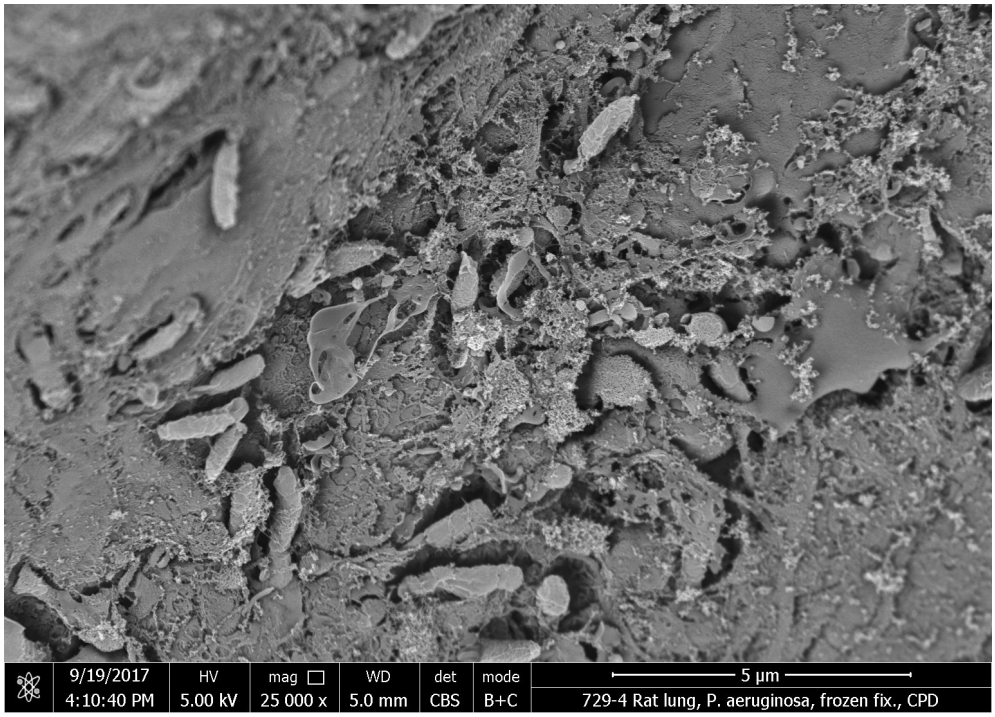
Obrázek 5.70: Detail oblasti tkáně s bakteriemi *P. aeruginosa*. Primární zvětšení 2 720x, zobrazeno v SE.



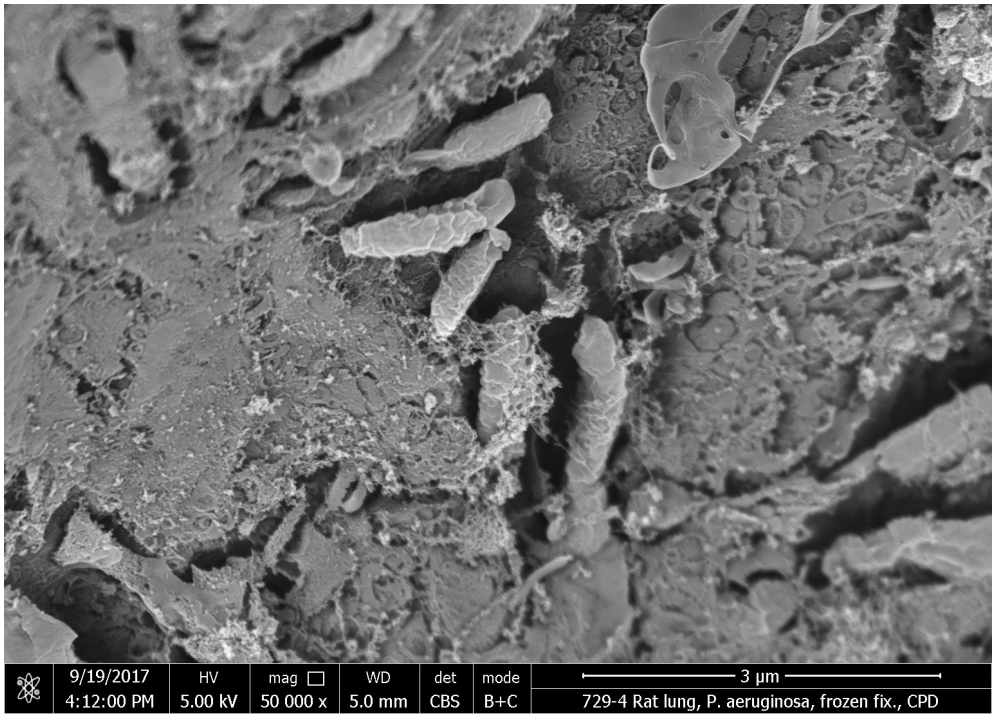
Obrázek 5.71: Plicní tkáň, bakterie *P. aeruginosa* jsou označeny šipkami. Primární zvětšení 6 500x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.72: Detail bakterií na rozvolněné pojivové tkáni. Primární zvětšení 25 000x, zobrazeno v BSE.

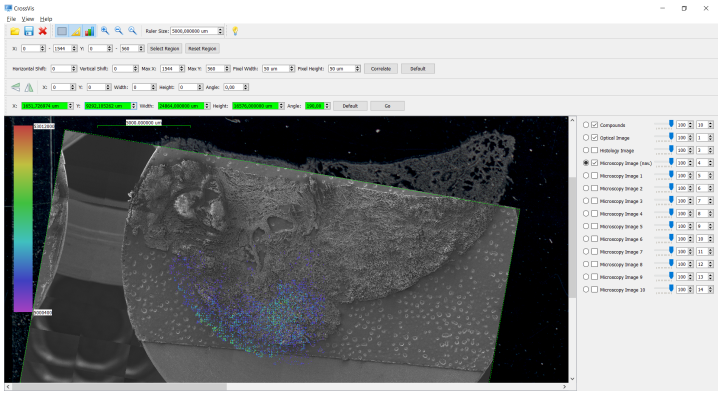


Obrázek 5.73: Detail bakterií ve tkáni. Primární zvětšení 25 000x, zobrazeno v BSE.

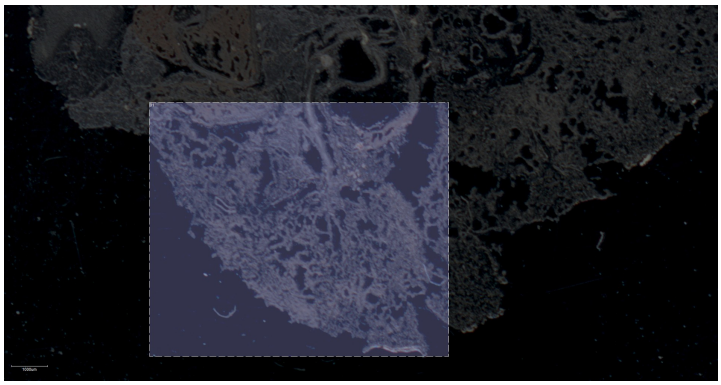


Obrázek 5.74: Detail bakterií. Primární zvětšení 50 000x, zobrazeno v BSE.

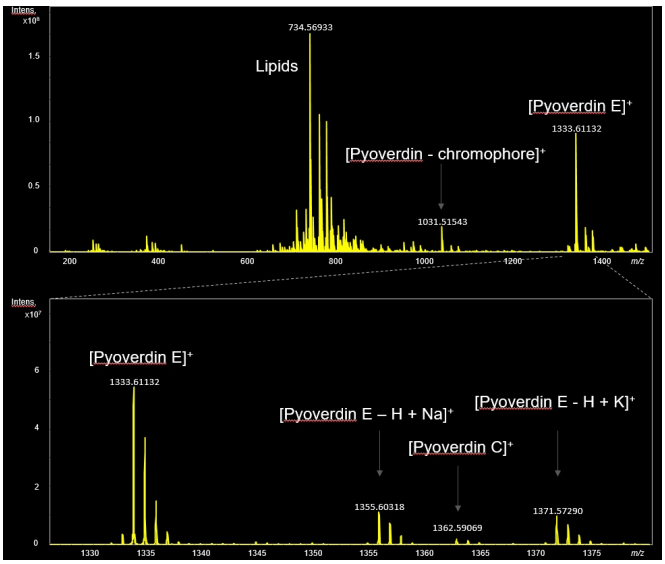
MALDI-MSI a korelace snímků



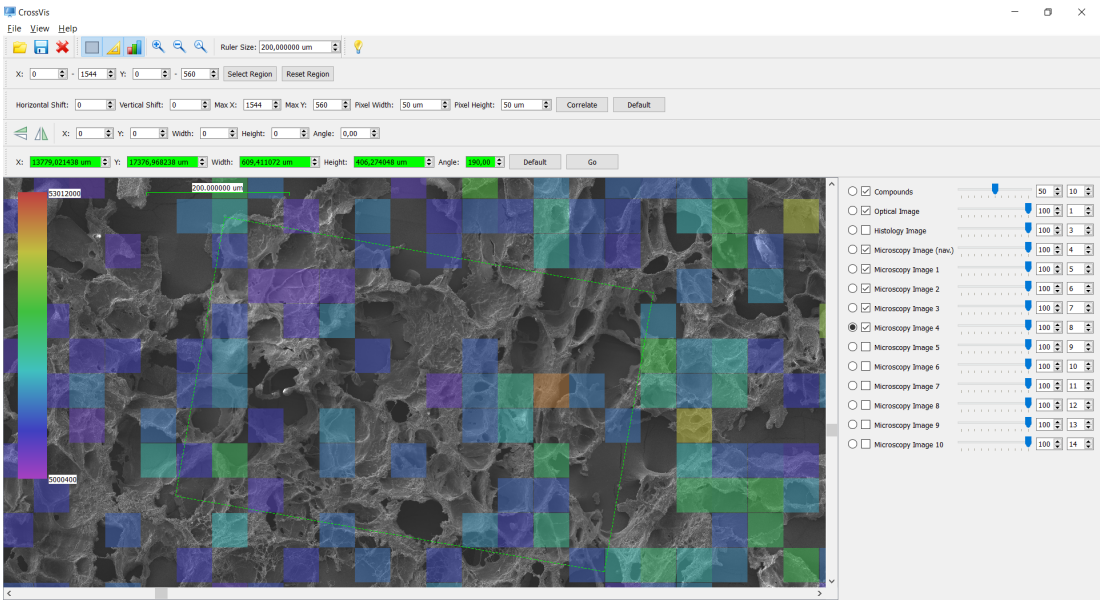
Obrázek 5.75: Korelace optického snímku ze skeneru, SEM navigačního snímku (primární zvětšení 17x) a MALDI-MSI snímku distribuce pyoverdinu na řezu plic pomocí softwaru CycloBranch.



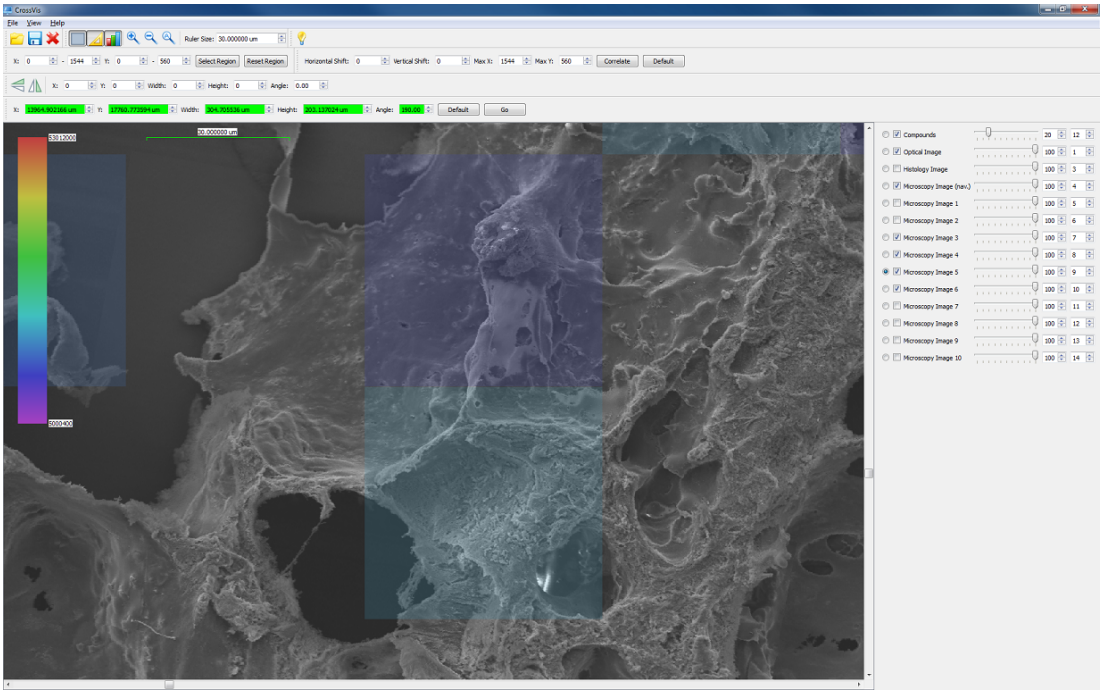
Obrázek 5.76: Vybraná oblast přesného překryvu snímků v oblasti detekce pyoverdinu.



Obrázek 5.77: Spektrum z analýzy MALDI-MSI z oblasti plic infikovaných *P. aeruginosa* (nahoře) a detekce bakteriálních sideroforů pyoverdinu E a pyoverdinu C (dole).



Obrázek 5.78: Detail oblasti detekce pyoverdinu vyhodnocený pomocí softwaru CycloBranch. Primární zvětšení 340x.



Obrázek 5.79: Detail oblasti detekce pyoverdinu s bakteriemi *P. aeruginosa* zobrazené v softwaru CycloBranch. Primární zvětšení 2 720x.

Závěr

1. Ověřili jsme přítomnost bakterií *P. aeruginosa* v plicích potkana, ve kterém byl pomocí MALDI-MSI detekován pyoverdin. Pro zobrazení bakterií v nefixované tkáni je nutné, stejně jako v předchozím pokusu, umístit řezy tkáně na povrch zmraženého fixačního roztoku. Díky využití metody sušení CPD jsme získali vzorky, ve kterých jsme zobrazili bakterie i při velkých zvětšeních.

2. Umístění sklíček s řezy tkáně do par roztoku glutaraldehydu nestačí k dostatečné fixaci tkáně. Takto fixované řezy mají lépe zachovanou strukturu než zcela nefixované řezy (5.2), nicméně v nich není možné rozlišit jednotlivé struktury. Vzhledem k velikosti bakterií (přibližně 2 μm) je není možné v takto připravených vzorcích zobrazit.

3. K sestavení korelačního snímku byl proto obdobně jako v předchozím pokusu použit SEM snímek řezu umístěného na zmražený fixační roztok a snímek distribuce pyoverdinu z následného řezu. Po registraci snímků pomocí softwaru CycloBranch jsme určili konkrétní oblasti v plicní tkáni, kde došlo k rozvoji infekce, která byla prokázána detekcí sideroforu pyoverdinu a potvrzením přítomnosti bakterií *P. aeruginosa* pomocí SEM.

5.7 Plíce potkana infikované *A. fumigatus*

Cíle pokusu:

- ověřit přítomnost houby *A. fumigatus* v plicích potkana pomocí SEM na základě lokalizace infekce v preparátech barvených stříbrem,
- vyzkoušet MALDI-MSI i SEM na jednom preparátu,
- ověřit vliv použití 30% roztoku sacharózy jako kryoprotektivního média na zachování struktury při mražení tkáně kapalným dusíkem.

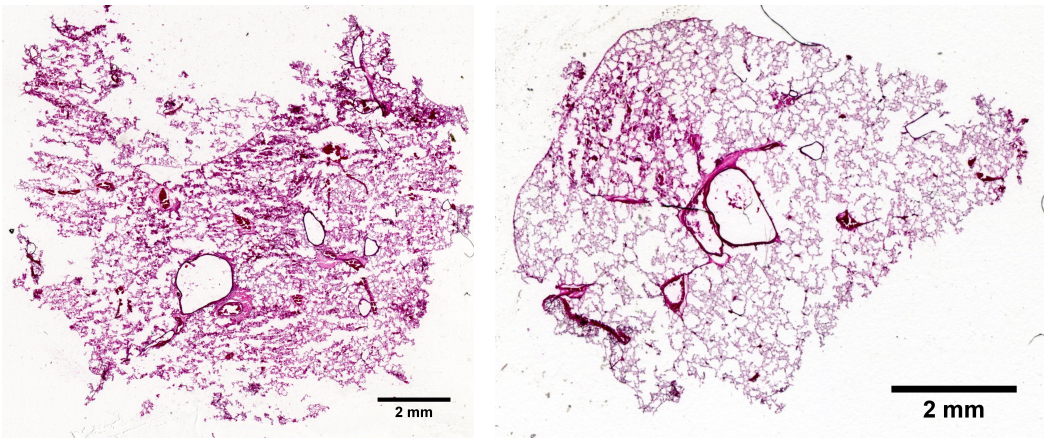
Příprava vzorků

Plíce potkana infikované *A. fumigatus* fixované v 3% roztoku GA jsme rozdělili na jednotlivé laloky. Po propláchnutí laloků jsme některé z nich umístili do 30% roztoku sacharózy. Po zamrazení tkáně jsme z ní připravili řezy a vyhodnotili přítomnost houbových vláken pomocí světelného mikroskopu. V případě pozitivního nálezu jsme připravili řezy o tloušťkách:

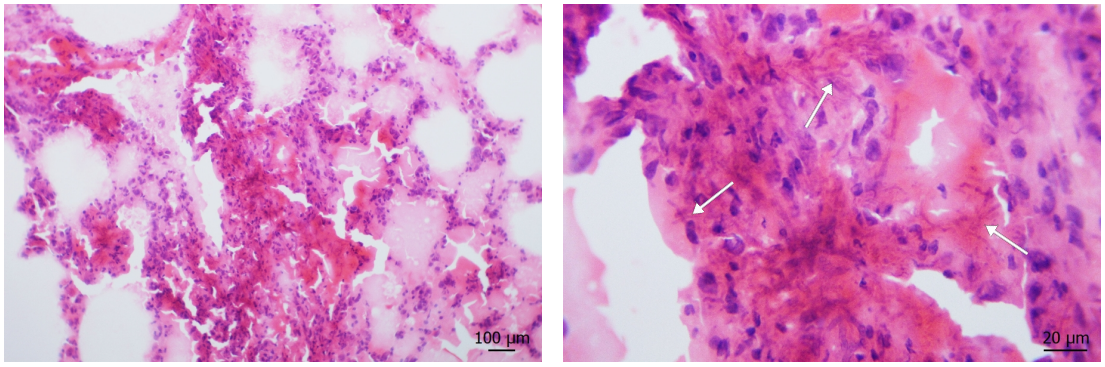
- 15 μm, které jsme umístili na ITO sklíčko pro měření MALDI-MSI a SEM,
- 30 μm, které jsme umístili na StarFrost sklíčko pro histologické barvení a barvení stříbrem pro průkaz hub,
- 60 μm, které jsme umístili na hladinu zmraženého fixačního roztoku a zpracovali jako v předchozích pokusech.

Výsledky

Histologické barvení

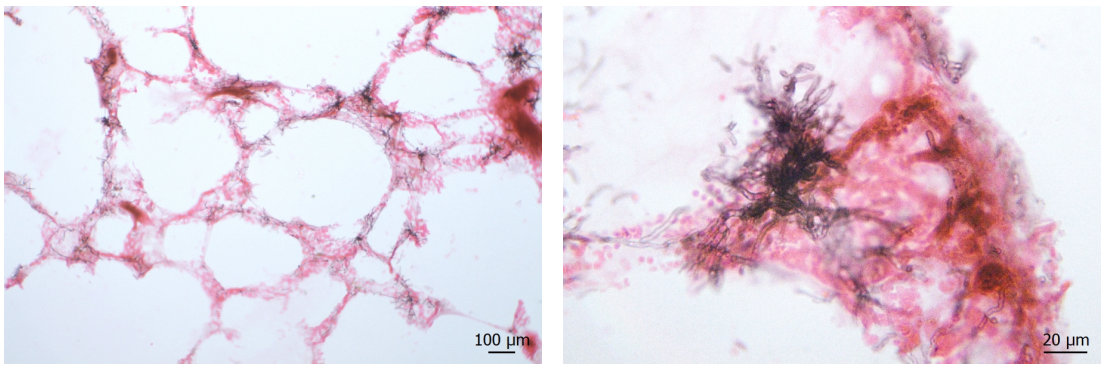


Obrázek 5.80: Plicní tkáň infikovaná *A. fumigatus* obarvená hematoxylinem a eosinem. Intenzivně růžová barva odpovídá masivní hemoragii ve tkáni. Snímky ze skeneru.

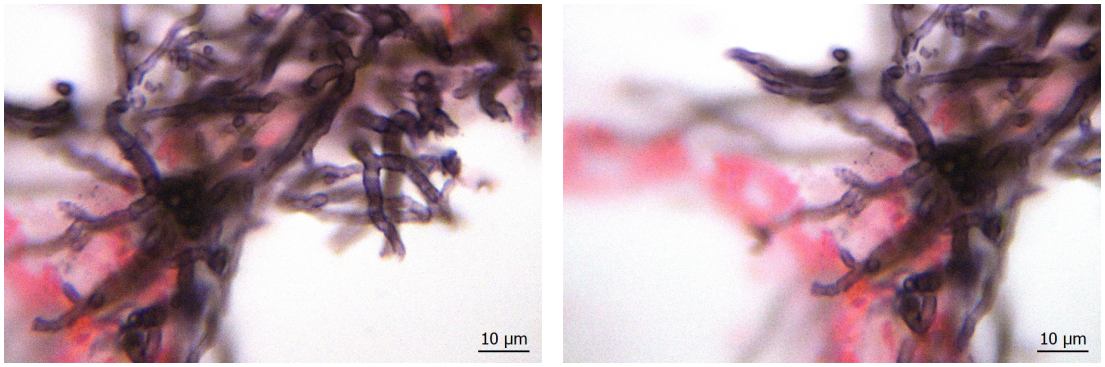


Obrázek 5.81: Detail řezu infikované tkáně obarvené hematoxylinem a eosinem. Fialově jsou obarvena jádra buněk, růžově acidofilní struktury. Hyfy *A. fumigatus* jsou obarvena světle fialově (označena šipkami).

Barvení stříbrem pro průkaz hub

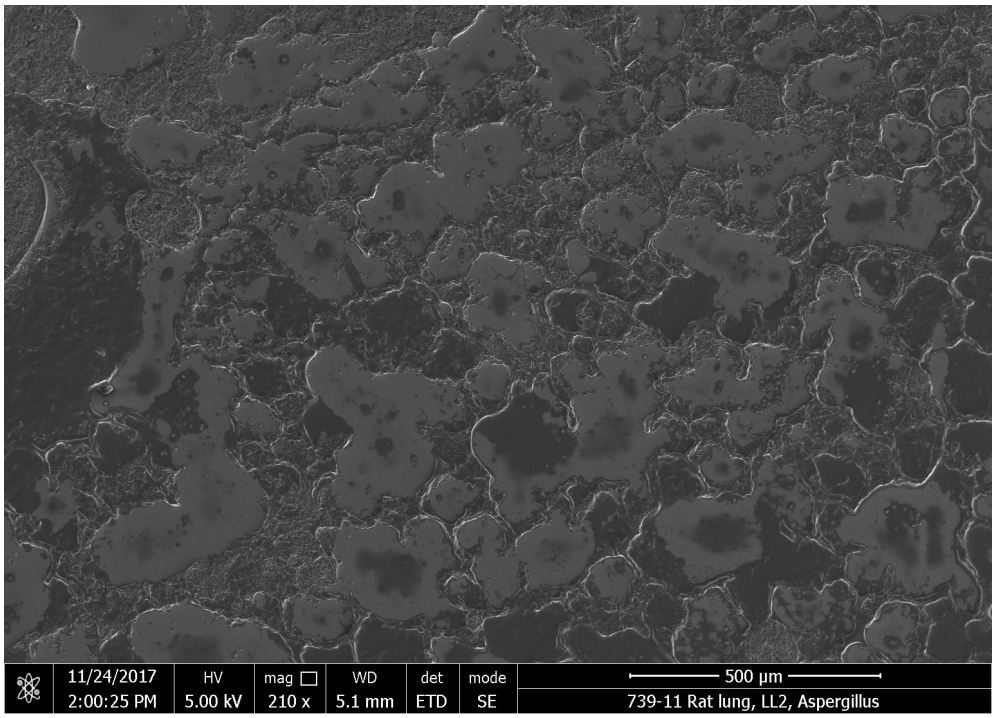


Obrázek 5.82: Detail řezu infikované tkáně obarvené stříbrem, kontrastní barvení eosinem. Hyfy *A. fumigatus* prorůstají plicní alveoly a šíří se plicním parenchymem. Řezy jsou zaplaveny erytrocyty.

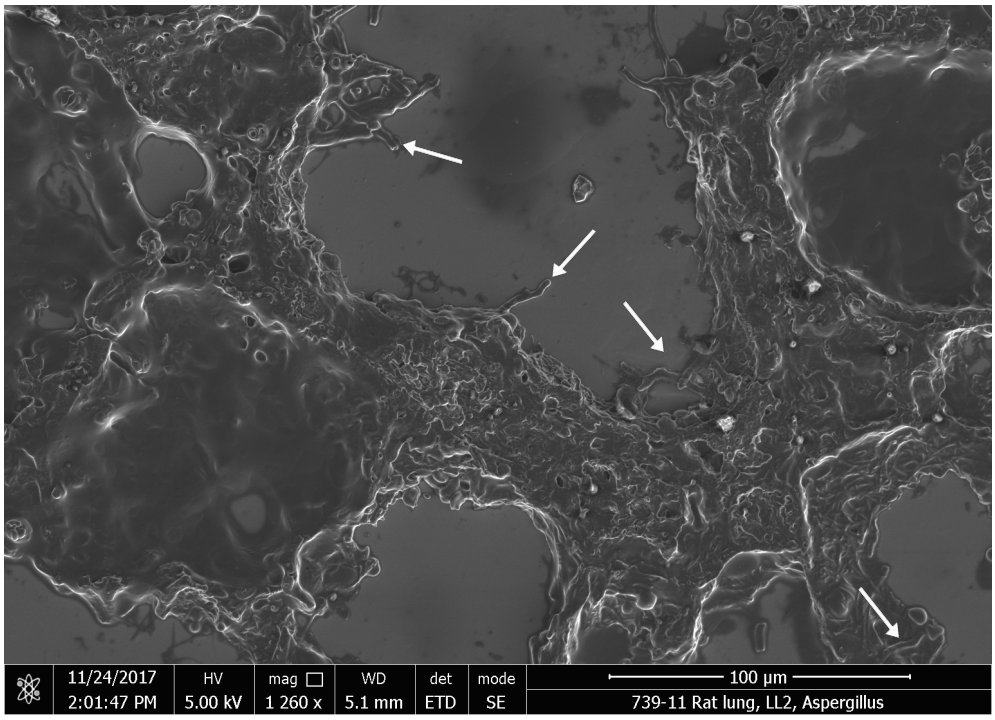


Obrázek 5.83: Detail hyf s charakteristickým dichotomickým větvením.

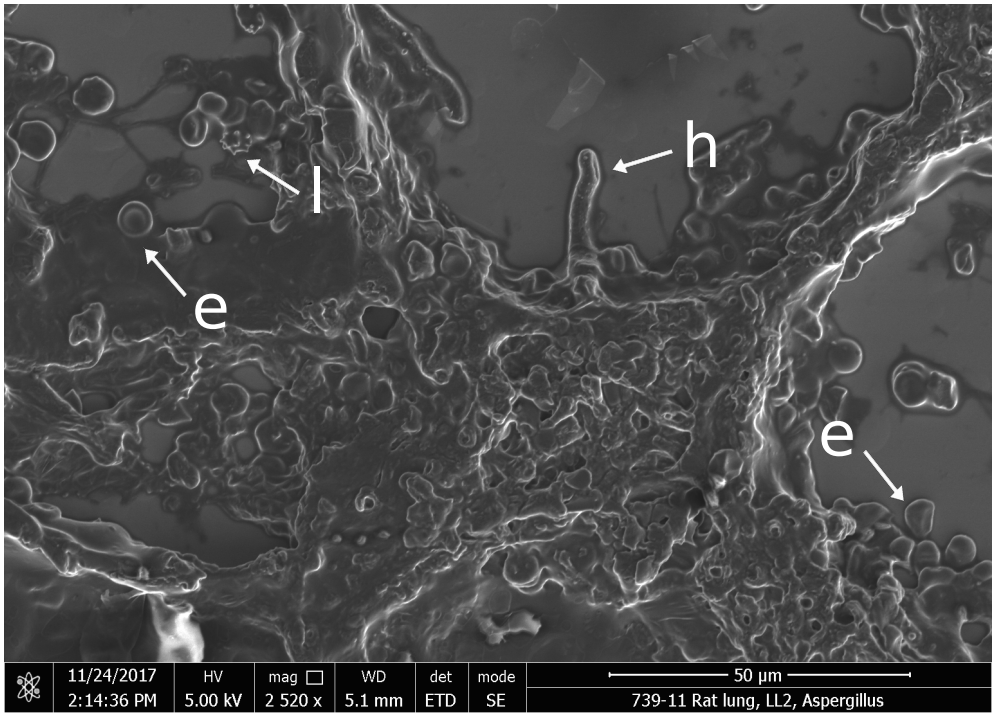
Řezy umístěné na ITO sklo



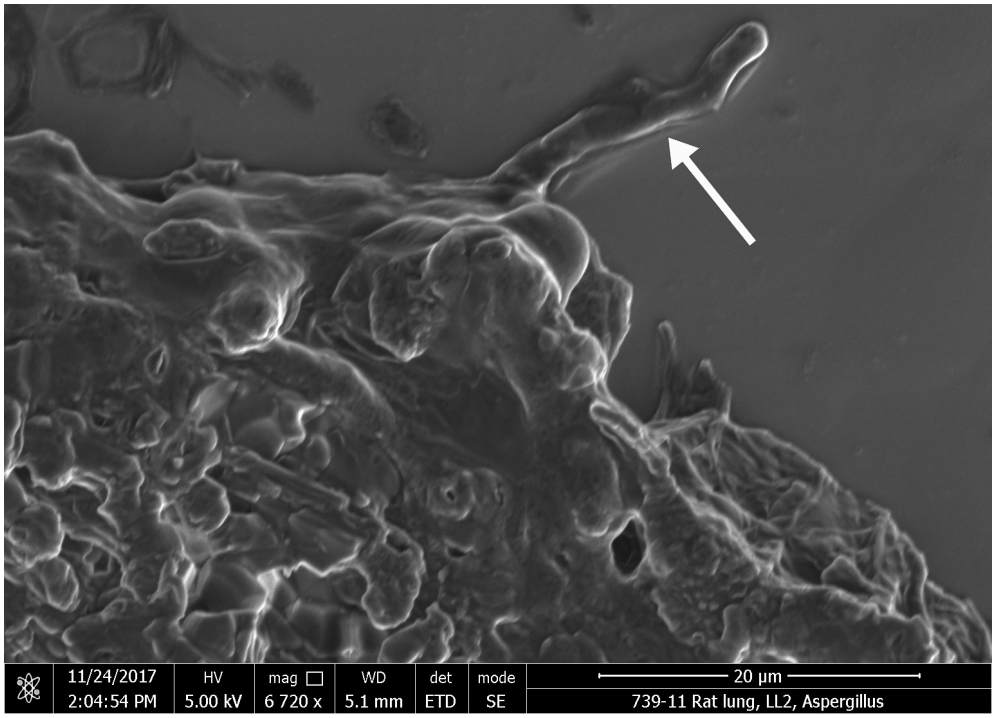
Obrázek 5.84: Řez infikovanou fixovanou tkání umístěný na ITO skle. Struktury plicní tkáně jsou dobře rozpoznatelné. Primární zvětšení 210x, zobrazeno v SE.



Obrázek 5.85: Detail infikované tkáně. Pozorujeme hyfy *A. fumigatus* (označeny šipkami). Primární zvětšení 1 260x, zobrazeno v SE.

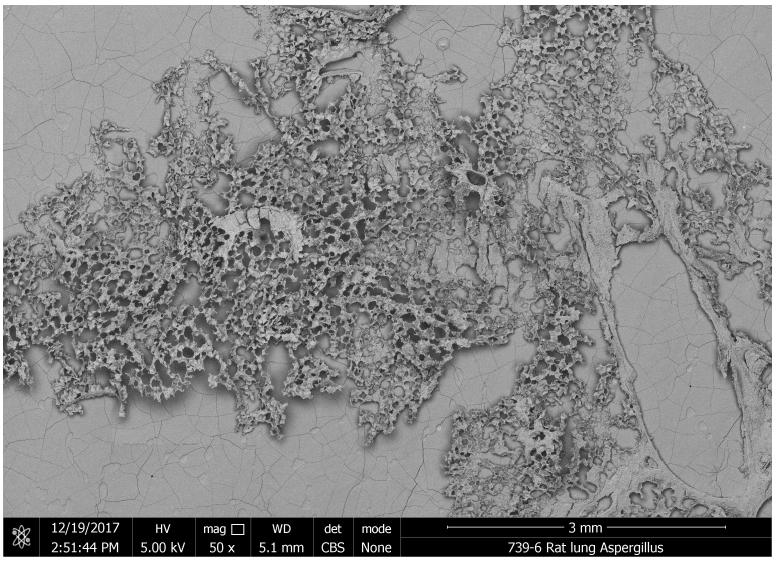


Obrázek 5.86: Detail infikované tkáně. Pozorujeme hyfy *A. fumigatus* (h), erytrocyty (e), leukocyty (l). Primární zvětšení 2 520x, zobrazeno v SE.

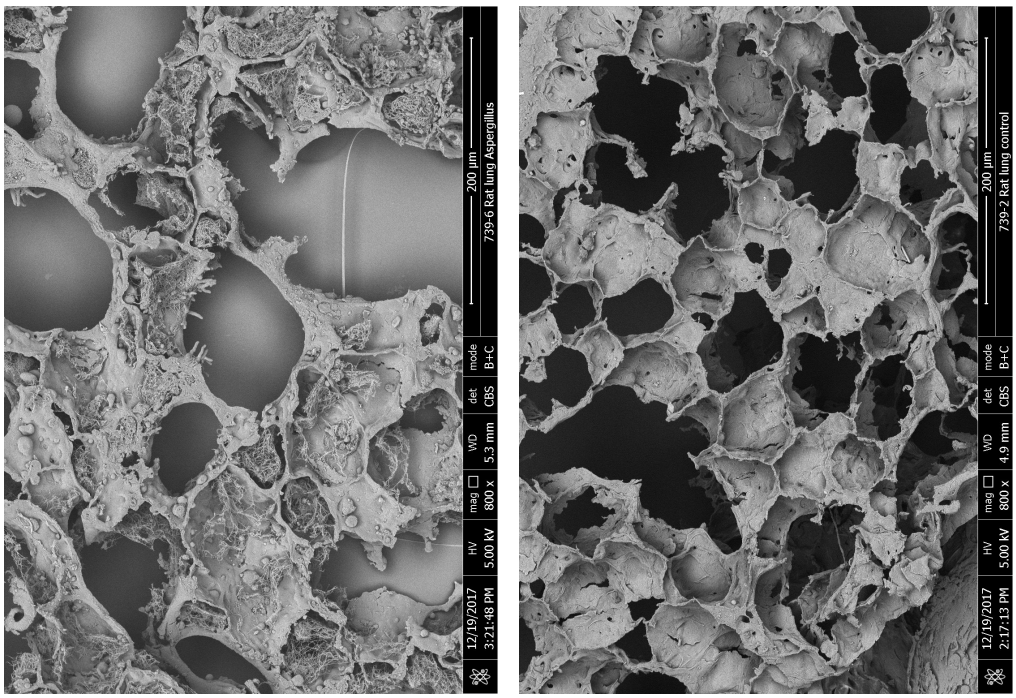


Obrázek 5.87: Detail hyfy *A. fumigatus*. Primární zvětšení 6 720x, zobrazeno v SE.

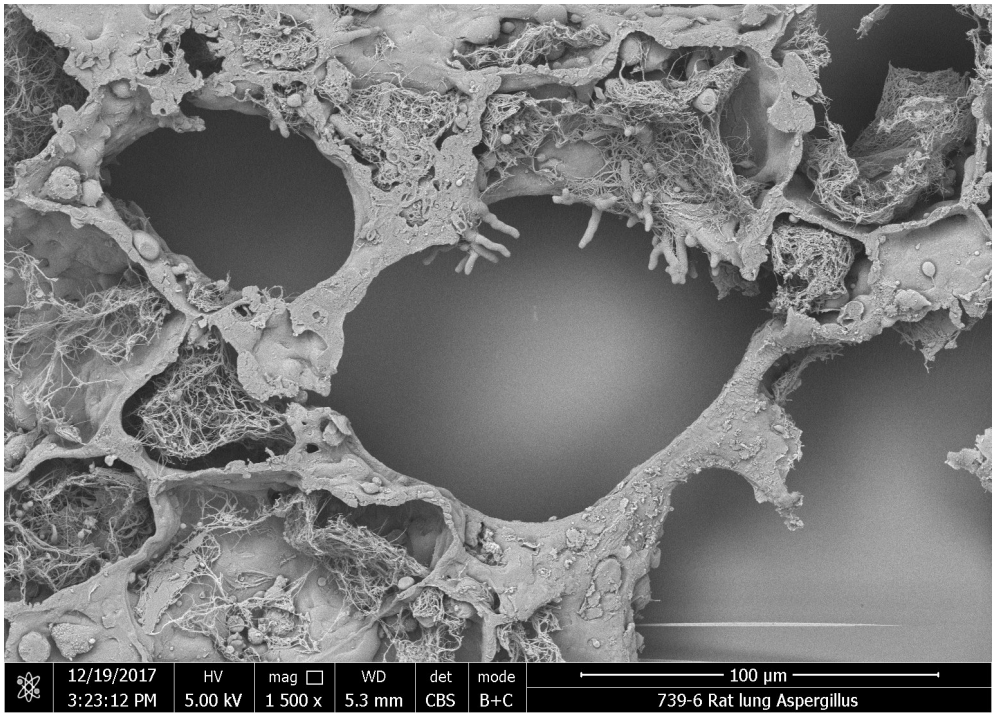
Řezy sušené metodou CPD



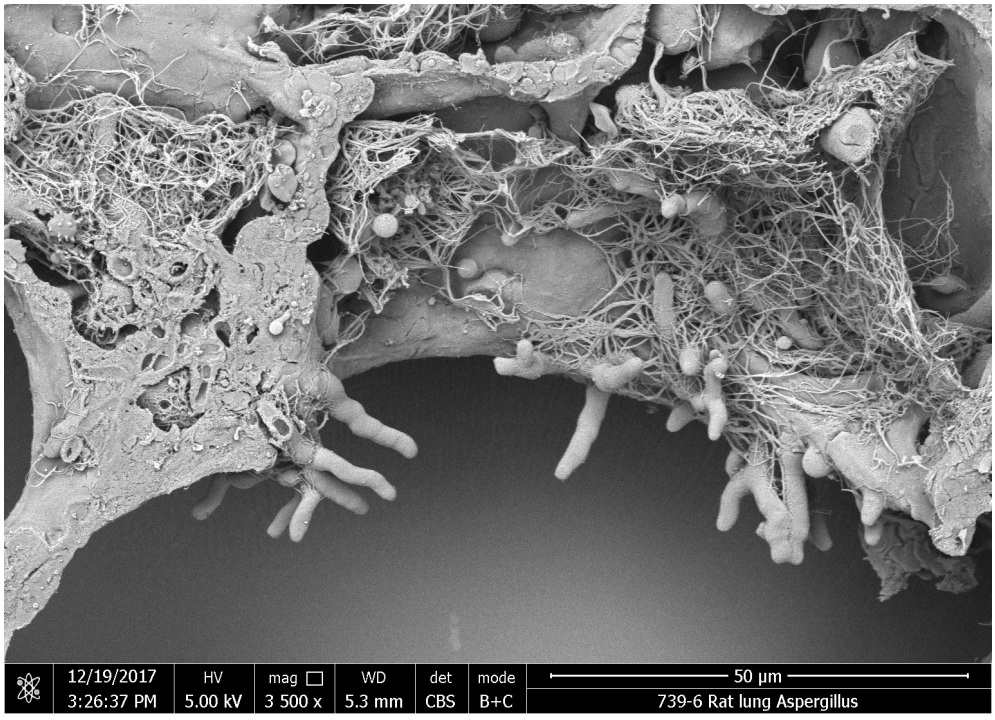
Obrázek 5.88: Navigační snímek řezu infikované tkáně. Primární zvětšení 50x, zobrazeno v BSE.



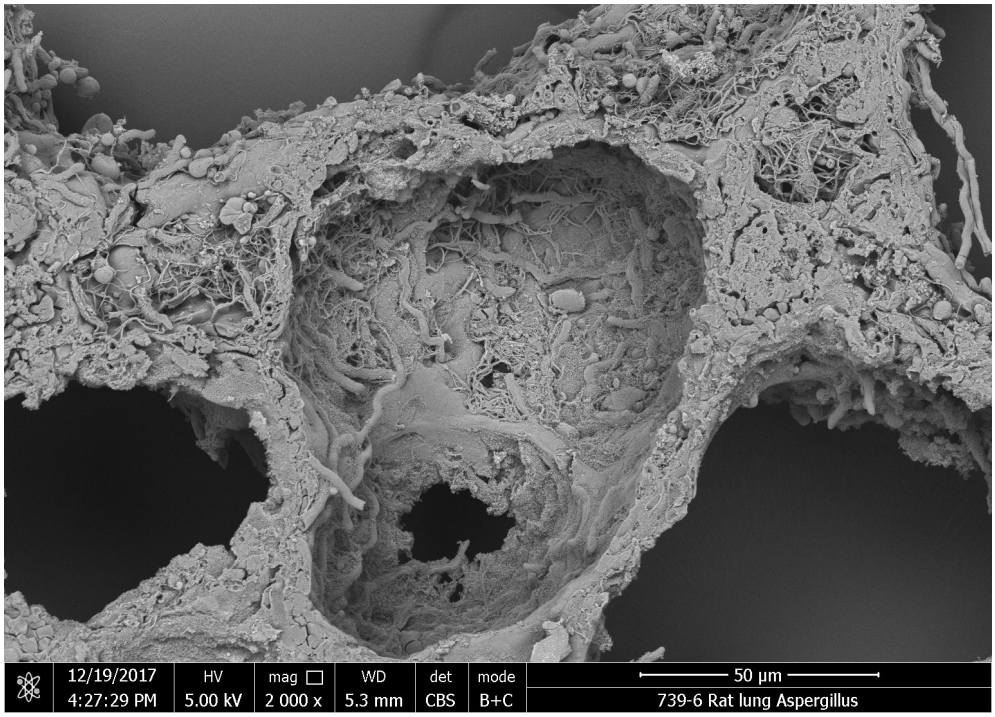
Obrázek 5.89: Řez infikovanou (vlevo) a kontrolní tkání (vpravo). Struktura kontrolní tkáně je dobře zachovaná. V infikované tkáni dochází k její degradaci. Primární zvětšení 800x, zobrazeno v BSE.



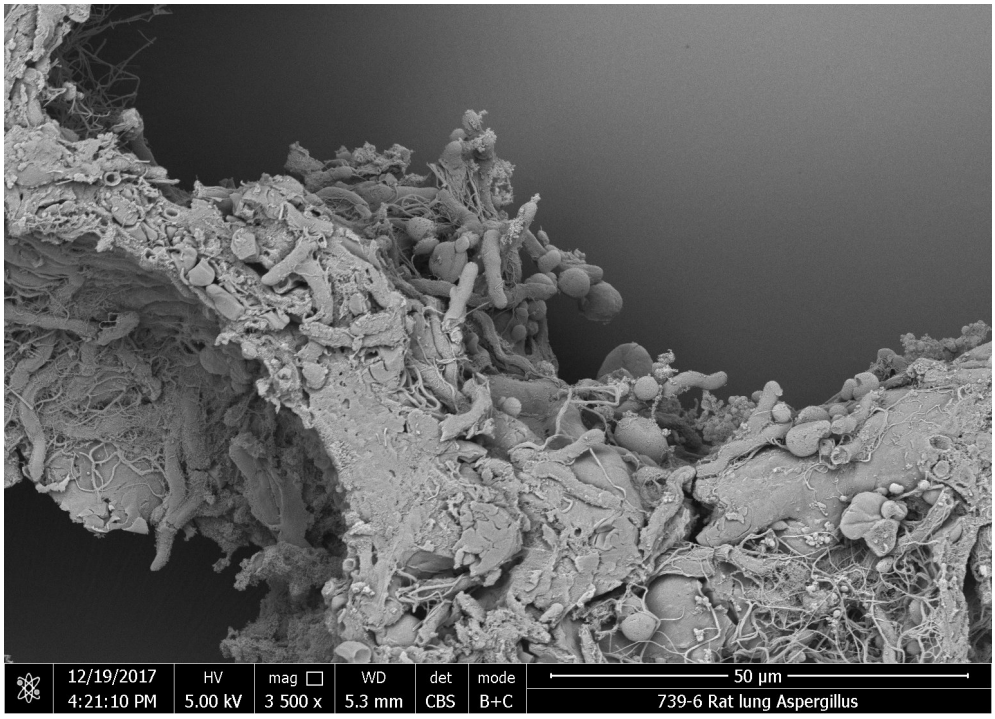
Obrázek 5.90: Detail alveoly s hyfami *A. fumigatus*. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.



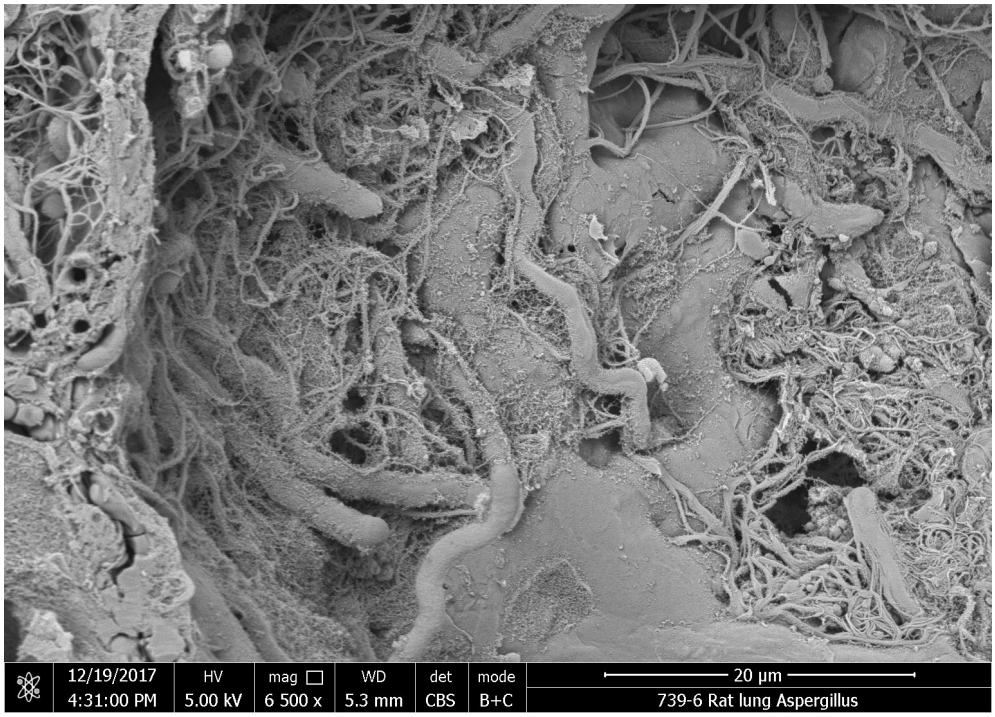
Obrázek 5.91: Detail hyf *A. fumigatus* a fibrinových vláken. Primární zvětšení 3 500x, zobrazeno v BSE.



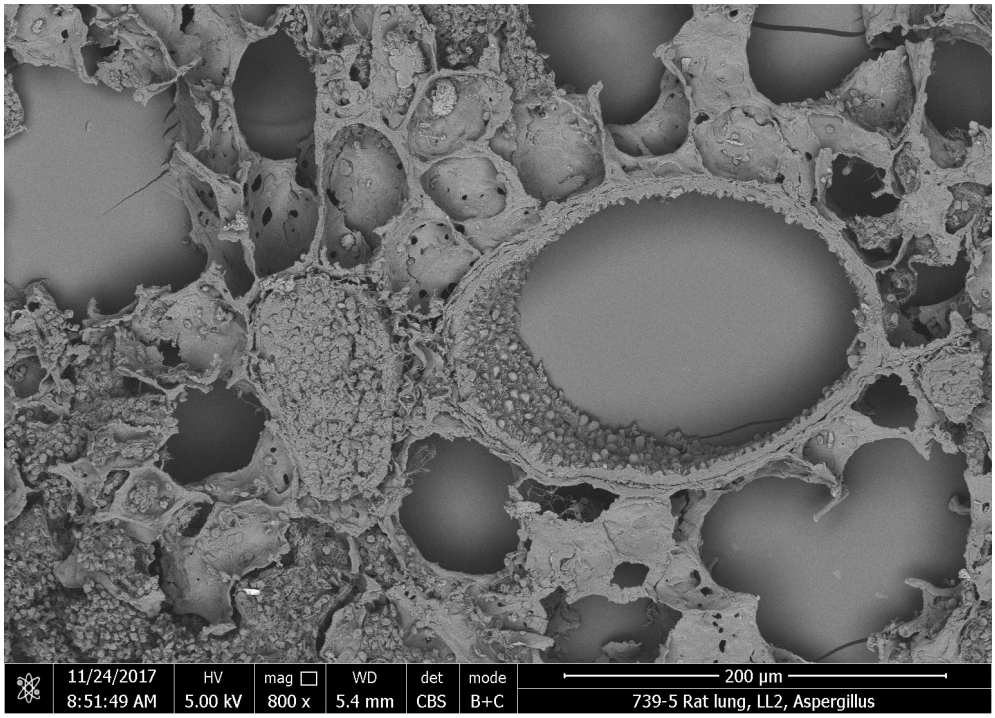
Obrázek 5.92: Biofilm *A. fumigatus* prorůstající alveoly. Primární zvětšení 2 000x, zobrazeno v BSE.



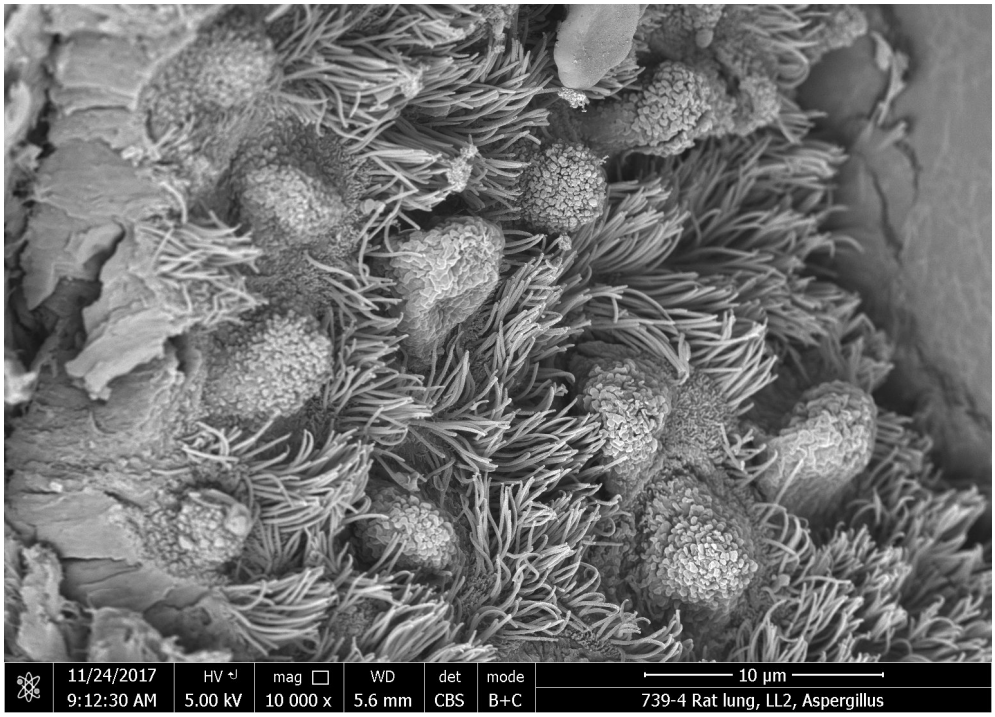
Obrázek 5.93: Detail hyf *A. fumigatus*. Primární zvětšení 3 500x, zobrazeno v BSE.



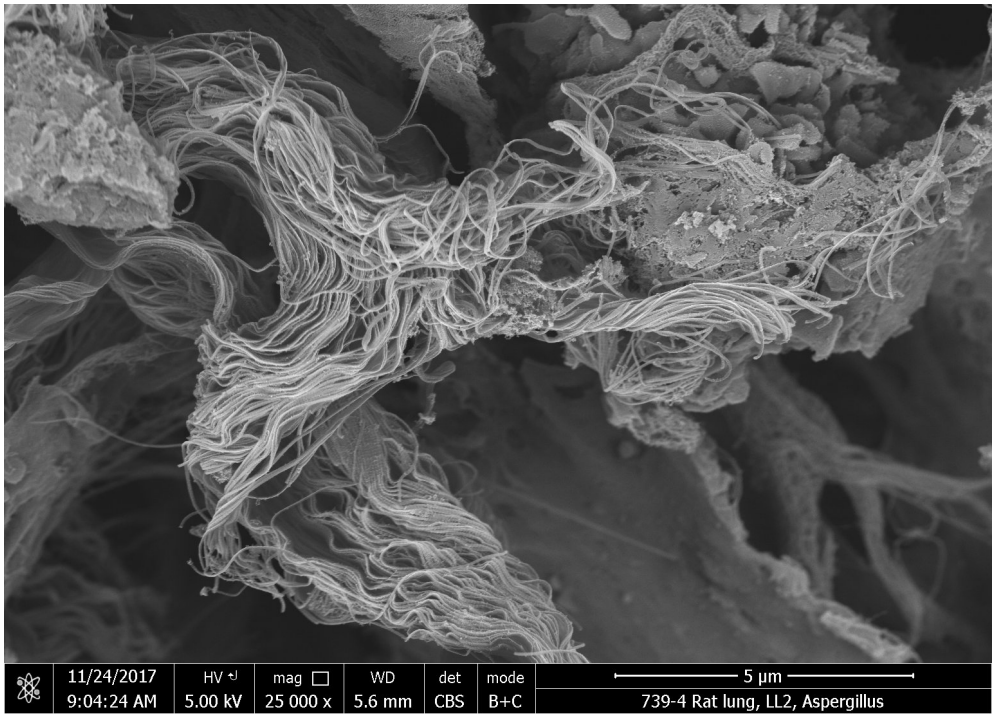
Obrázek 5.94: Detail hyf *A. fumigatus*. Primární zvětšení 6 500x, zobrazeno v BSE.



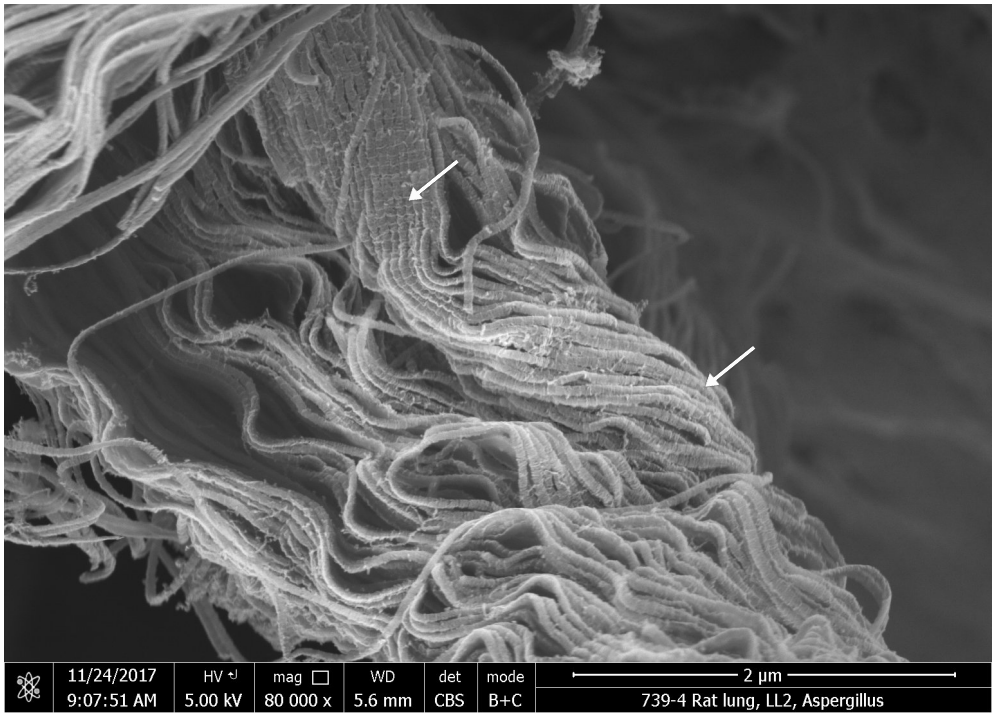
Obrázek 5.95: Řez bronchem. Primární zvětšení 800x, zobrazeno v BSE.



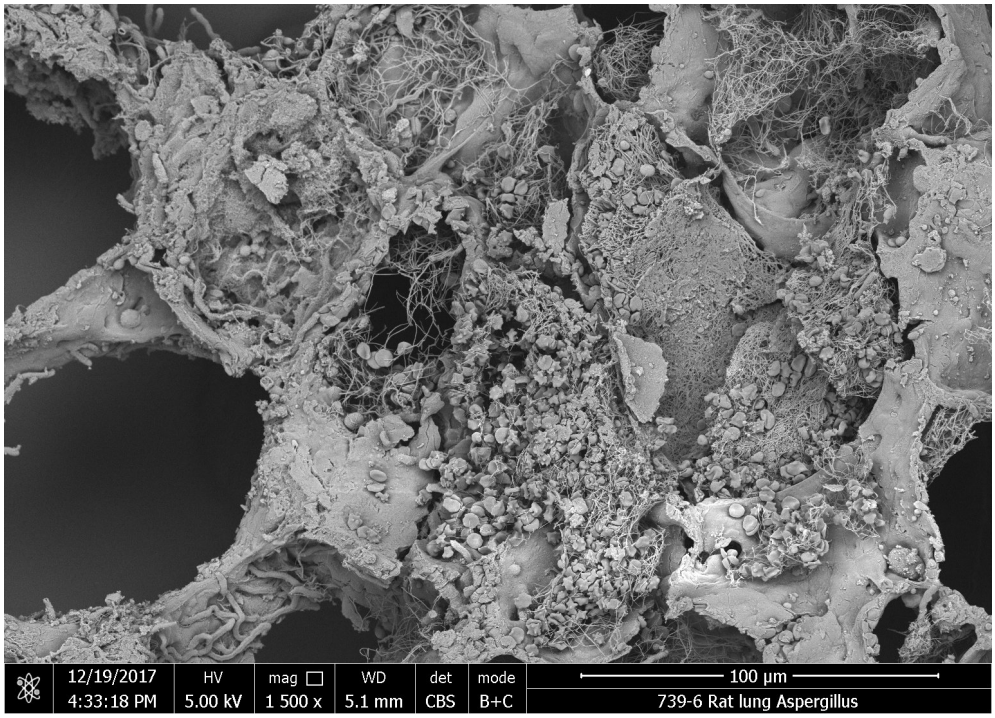
Obrázek 5.96: Detail části řasinkového epitelu a pohárkových buněk. Primární zvětšení 10 000x, zobrazeno v BSE.



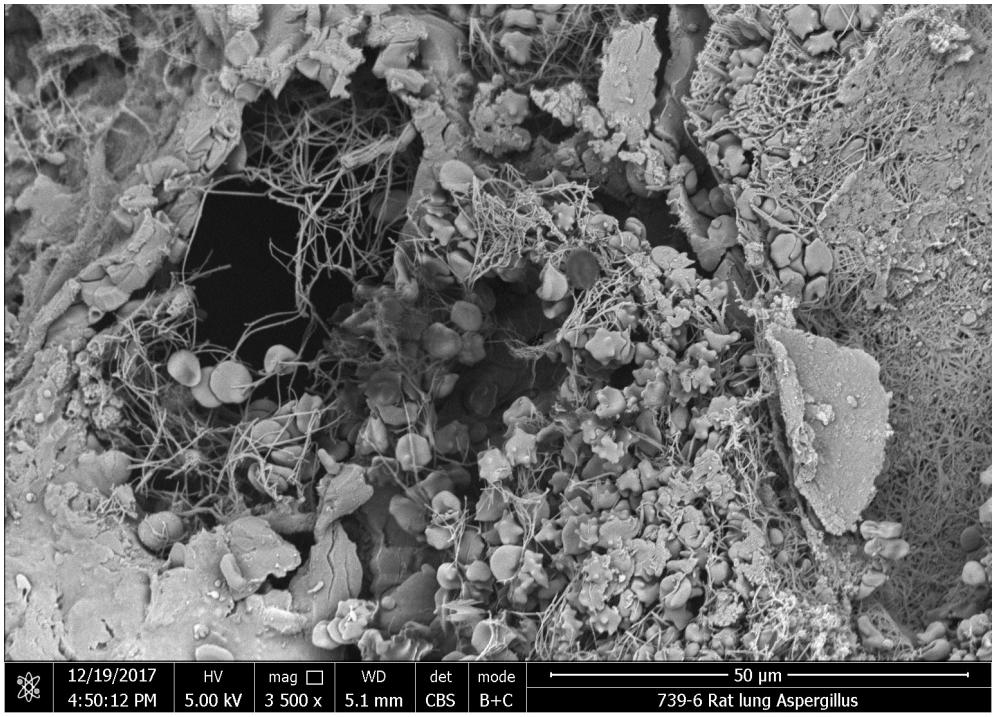
Obrázek 5.97: Rozvolněná kolagenní vlákna. Primární zvětšení 25 000x, zobrazeno v BSE.



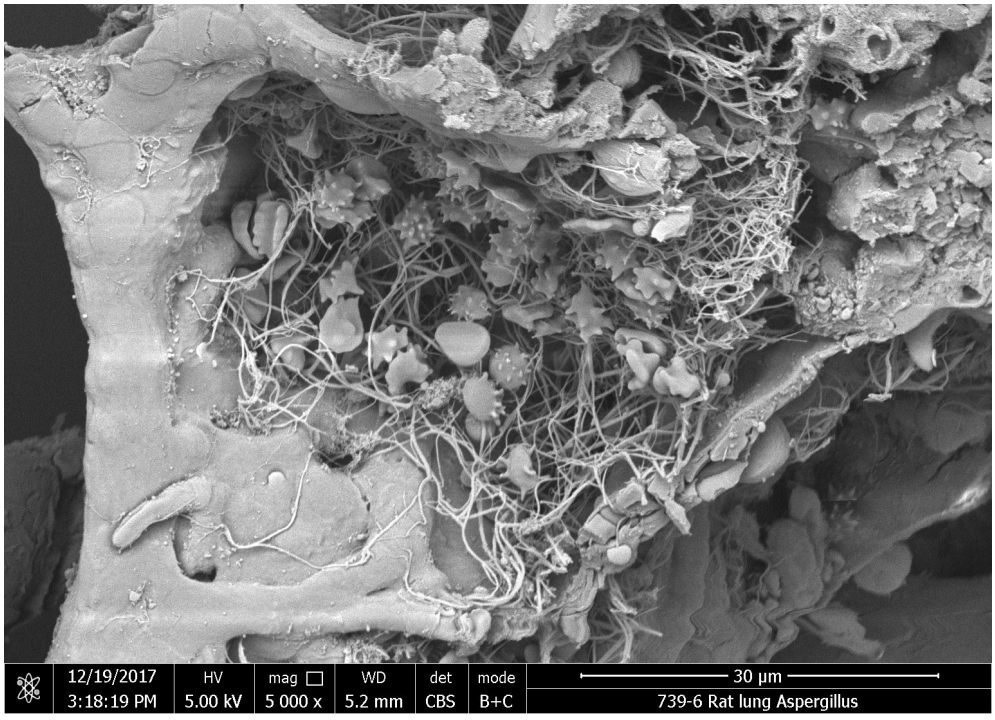
Obrázek 5.98: Detail kolagenních vláken s charakteristickým proužkováním (označeno šipkami). Primární zvětšení 80 000x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.99: Zánětlivá odpověď v místě infekce. Primární zvětšení 1 500x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.100: Detail krevních buněk. Primární zvětšení 3 500x, zobrazeno v BSE.



Obrázek 5.101: Detail krevních buněk. Primární zvětšení 5 000x, zobrazeno v BSE.

Závěr

1. Ověřili jsme přítomnost houby *A. fumigatus* v plicích potkana. Infekci jsme lokalizovali díky porovnání SEM navigačního obrazu se snímkem řezu obarveného stříbrem. Vzhledem k rozsáhlé infekci je tkáň z velké části poškozená. Pozorujeme hyfy prorůstající plicní parenchym, mnoho krevních buněk, fibrinových a kolagenních vláken.

2. Na základě barvení řezů infikované tkáně hematoxylinem a eosinem můžeme identifikovat hyfy *A. fumigatus*, které se barví světle fialově. Při barvení stříbrem pro průkaz hub se hyfy barví černě. Vzhledem k rozsáhlé degradaci infikované tkáně neposkytla tato barvení mnoho detailů o morfologii tkáně.

3. Použití fixované tkáně umožnilo zobrazit hyfy *A. fumigatus* jak na řezech, které byly umístěny na roztok zmraženého fixačního roztoku, tak na řezech umístěných na ITO sklíčka. Řezy na ITO sklíčkách nedosahovaly vysokého rozlišení, ale vzhledem k velikosti houbových vláken (průměr 3–6 μm, délka desítky μm) je bylo v těchto řezech možné mezi jednotlivými alveolami odlišit. Na řezech sušených metodou CPD je možné pozorovat změny ve struktuře tkáně způsobené infekcí *A. fumigatus* s vysokým rozlišením.

4. Nepozorovali jsme vliv použití sacharózy jako kryoprotektivního média na zachování struktury tkáně. U řezů kontrolní tkáně (obr. 5.89) nedošlo k významným změnám v zachování struktury v porovnání s řezy fixované tkáně v předchozích pokusech. U řezů infikované tkáně není možné tento vliv vyhodnotit, jelikož je tato tkáň značně degradována.

5. Analýza MALDI-MSI na společném preparátu nebyla možná, jelikož použitý fixační roztok glutaraldehydu zřejmě interferoval s analyzovanými molekulami. V těchto řezech proto nebyly naměřeny siderofory ferricrocin ani triacetylfusarinin C.

5.8 EDS prvková mikroanalýza

Cíle pokusu:

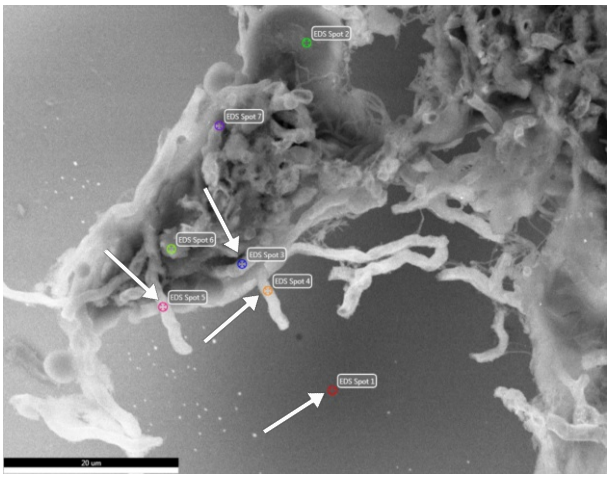
- EDS prvková mikroanalýza na řezech plicní tkáně infikované *A. fumigatus*,
- tvorba map prvků,
- korelace optických a elektronmikroskopických snímků.

Příprava vzorků

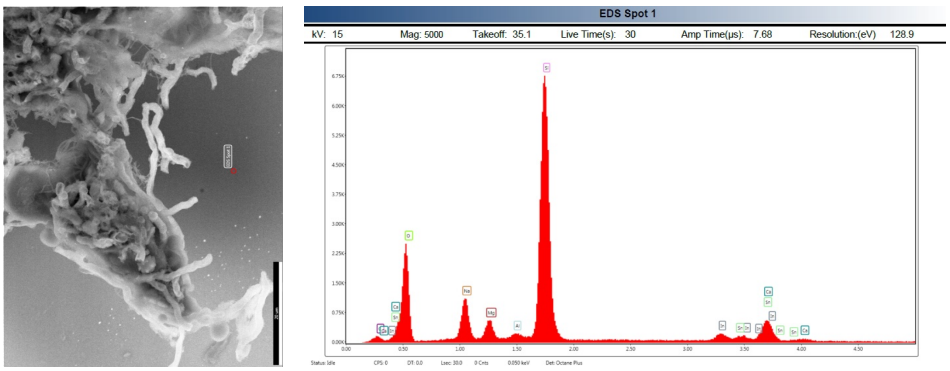
Připravili jsme řezy o tloušťce 25 μm z plicní tkáně infikované *A.fumigatus*, která byla fixovaná 4% roztokem GA a z hluboce zamrazené tkáně. Tyto řezy jsme nabarvili stříbrem pro průkaz hub a pokryli 10 nm vrstvou uhlíku.

Výsledky

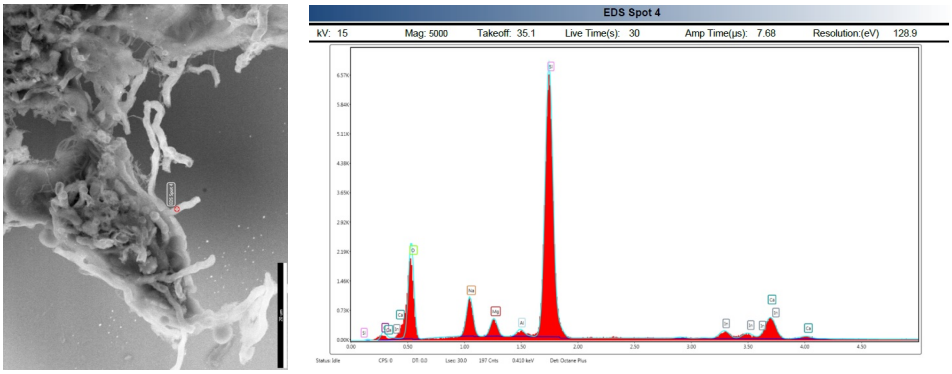
Fixovaná tkáň



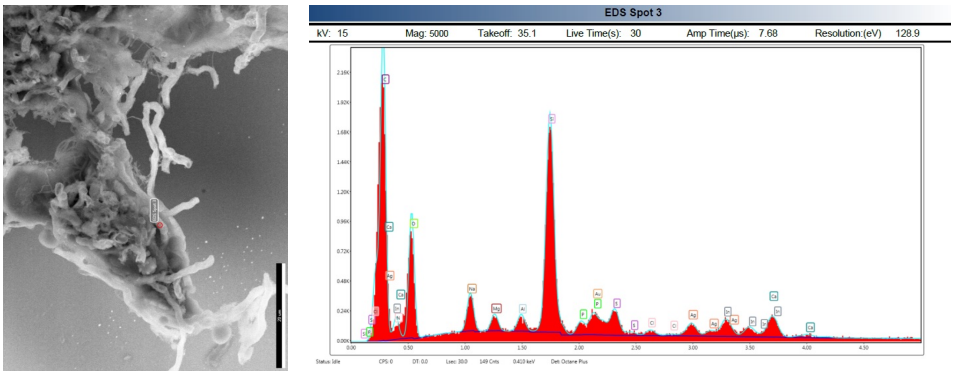
Obrázek 5.102: Oblast řezu fixované tkáně, ve které jsme detekovali prvky. Jednotlivé body jsou označeny šipkami (spot 1, 3, 4, 5).



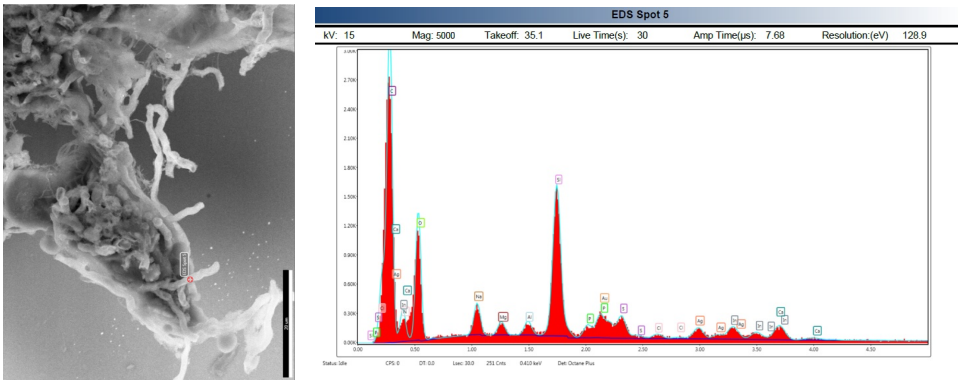
Obrázek 5.103: Spektrum naměřené z bodu 1 - pozadí. Všechny prvky zobrazené ve spektru (Al, Ca, In, Mg, Na, O, Si, Sn) jsou součástí ITO skla, na které byly řezy umístěny.



Obrázek 5.104: Spektrum naměřené z bodu 4 - hyfa. V hyfě byly detekovány stejné prvky, jako na pozadí. Důvodem může být, že je tato hyfa prázdná.

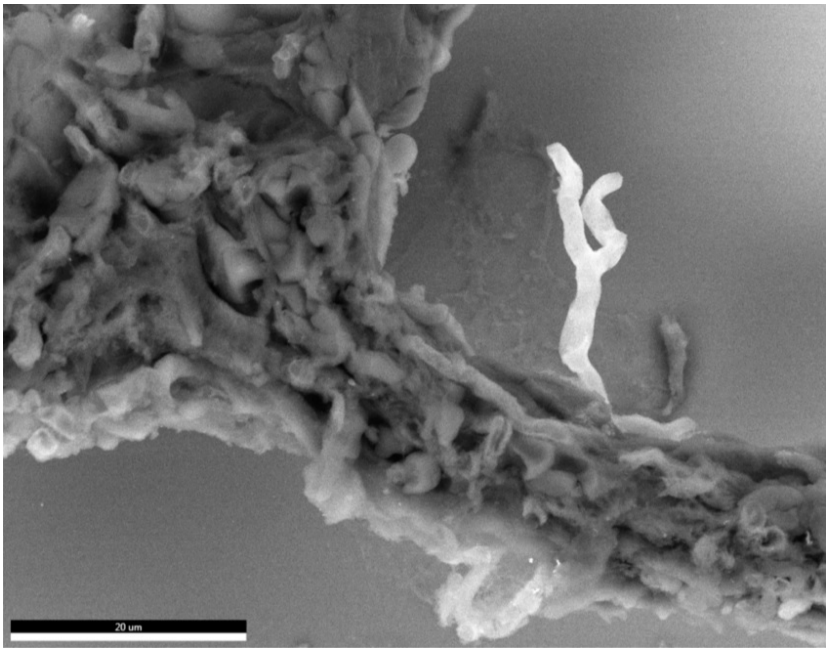


Obrázek 5.105: Spektrum naměřené z bodu 3 - hyfa. V hyfě byly detekovány prvky organické hmoty (C, O, N, P) a prvky specificky inkorporované do stěny hyf (Ag, Au). Pozorujeme i píky prvků přítomných ve skle.

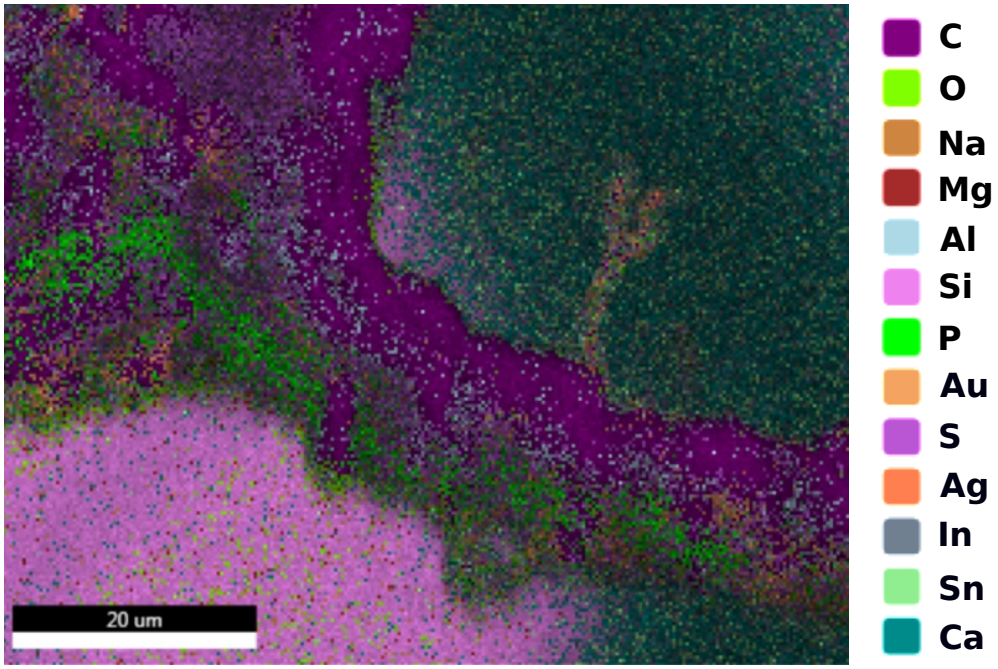


Obrázek 5.106: Spektrum naměřené z bodu 5 - hyfa. V hyfě byly detekovány prvky organické hmoty (C, O, N, P) a prvky specificky inkorporované do stěny hyf (Ag, Au). Pozorujeme i píky prvků přítomných ve skle.

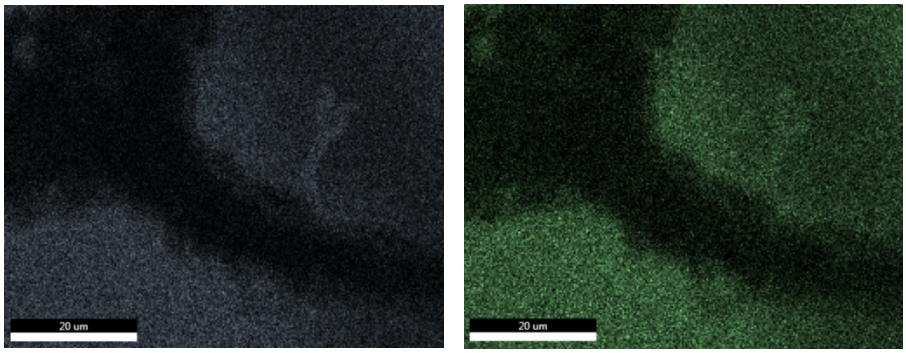
Prvková mapa



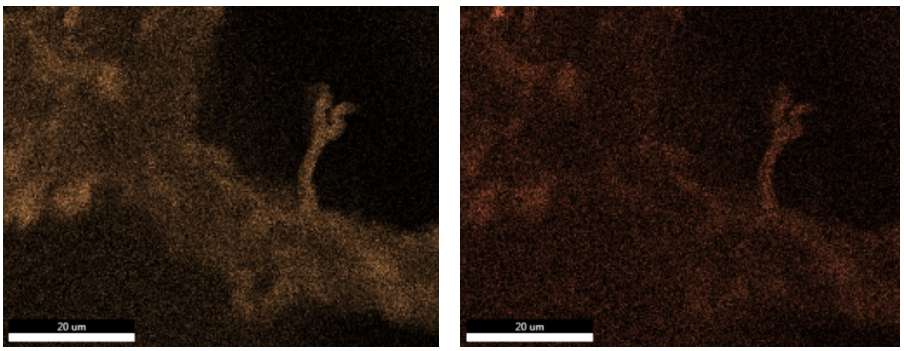
Obrázek 5.107: Vybraná oblast, ve které jsme mapovali prvky přítomné ve vzorku. Houbová vlákna kompletně obalují struktury tkáně.



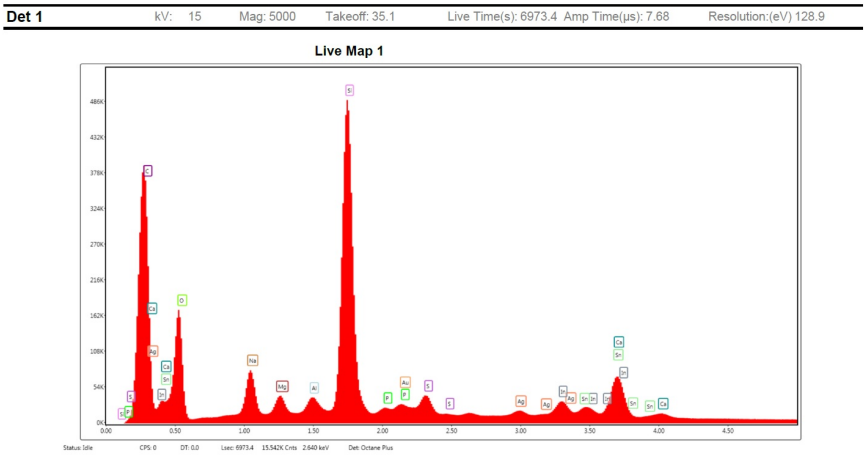
Obrázek 5.108: Výsledná mapa sledovaných prvků vzorku. Vzhledem k malé stabilitě vzorku pozorujeme posun lokalizace signálu některých prvků. Křemík, který je součástí skla a jeho distribuce by měla být ve všech jeho částech rovnoměrná, má podstatně vyšší signál v dolní části snímku. Obdobně tomu je u většiny prvků, které jsou součástí skla. Distribuce prvků organické hmoty (C, O, N, P) odpovídá místům vzorku, ve které se nachází tkáň a houbová vlákna.



Obrázek 5.109: Mapa distribuce In (vlevo) a Sn (vpravo). Oba prvky jsou součástí ITO skla a jejich signál odpovídá místům bez organické hmoty s výjimkou větvícího se vlákna, které vystupuje z tkáně.

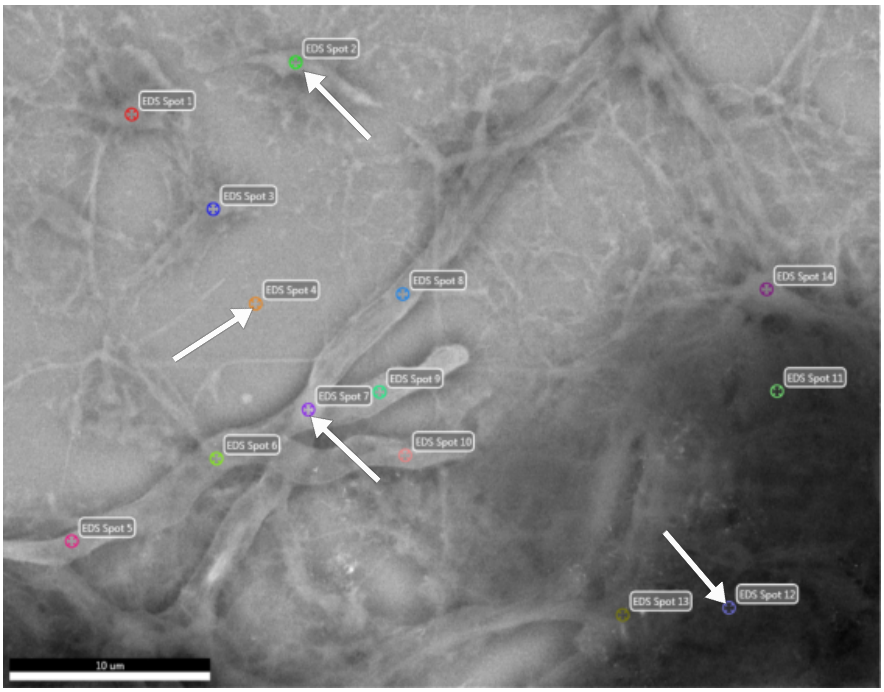


Obrázek 5.110: Mapa distribuce Au (vlevo) a Ag (vpravo). Tyto prvky by měly být specificky inkorporovány do buněčné stěny hyf *A. fumigatus*. Distribuce těchto prvků odpovídá morfologickému nálezu ve tkáni.

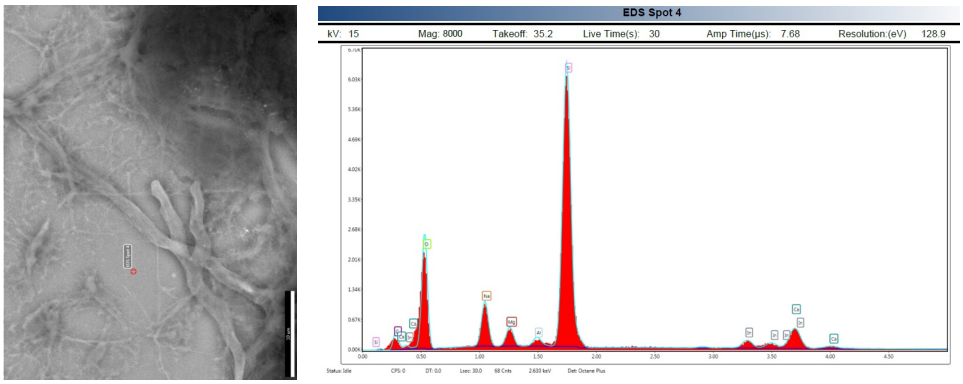


Obrázek 5.111: Výsledné spektrum prvků vybrané oblasti. Nejvyšší pík má křemík, vysoký signál mají i prvky organického původu. Píky prvků, které jsou součástí skla a píky Ag a Au jsou přibližně stejně vysoké.

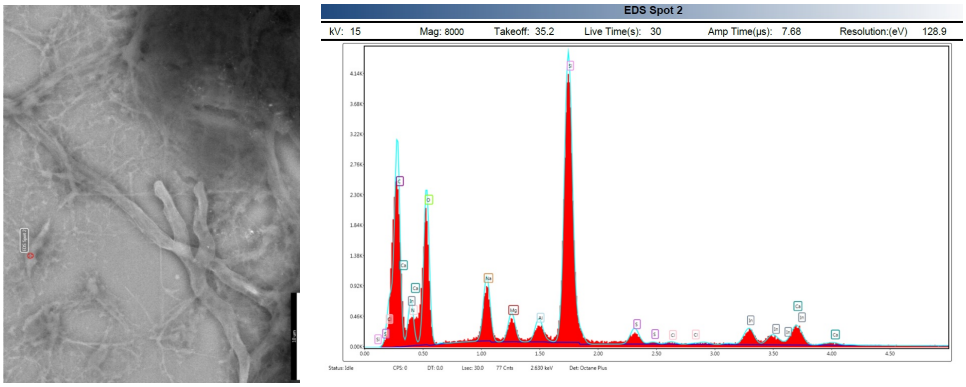
Nefixovaná tkáň



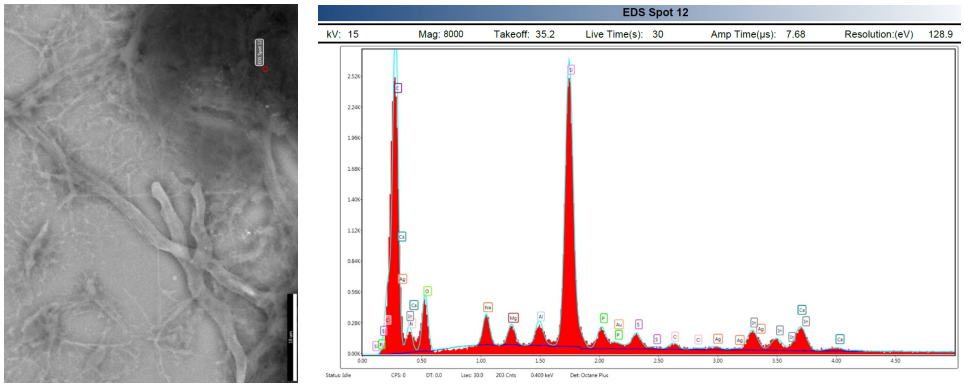
Obrázek 5.112: Oblast řezu nefixované tkáně, ve které jsme detekovali prvky. Jednotlivé body jsou označeny šipkami (spot 2, 4, 7, 12).



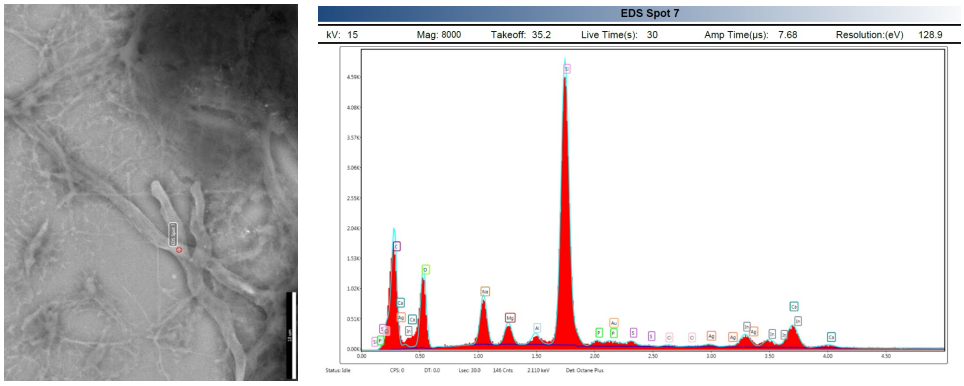
Obrázek 5.113: Spektrum naměřené z bodu 4 - pozadí. Všechny prvky zobrazené ve spektru (Al, Ca, In, Mg, Na, O, Si) jsou součástí ITO skla, na které byly řezy umístěny.



Obrázek 5.114: Spektrum naměřené z bodu 2 - fragment tkáně. Vysoký signál mají píky prvků organické hmoty (C, O, N). Detekovány byly rovněž prvky, které jsou součástí skla, síra a chlor.

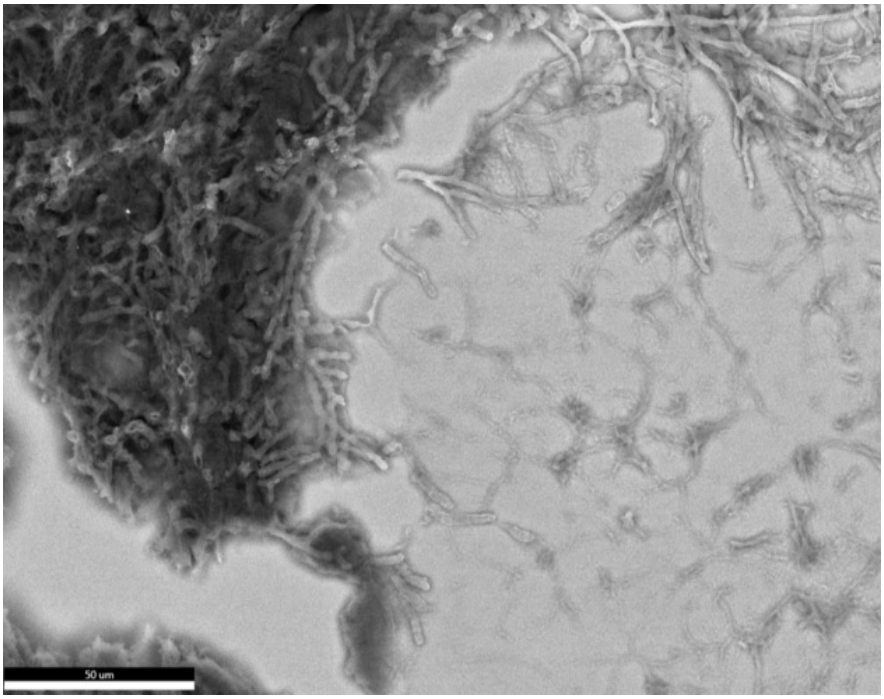


Obrázek 5.115: Spektrum naměřené z bodu 12 - tkáň obalená hyfami. Píky prvků organické hmoty (C, O, N, P) mají vysoký signál. Dále byly detekovány prvky specificky inkorporované do stěny hyf (Ag, Au) a prvky přítomné ve skle (Al, Ca, In, Mg, Na, Si), chlor a síra.

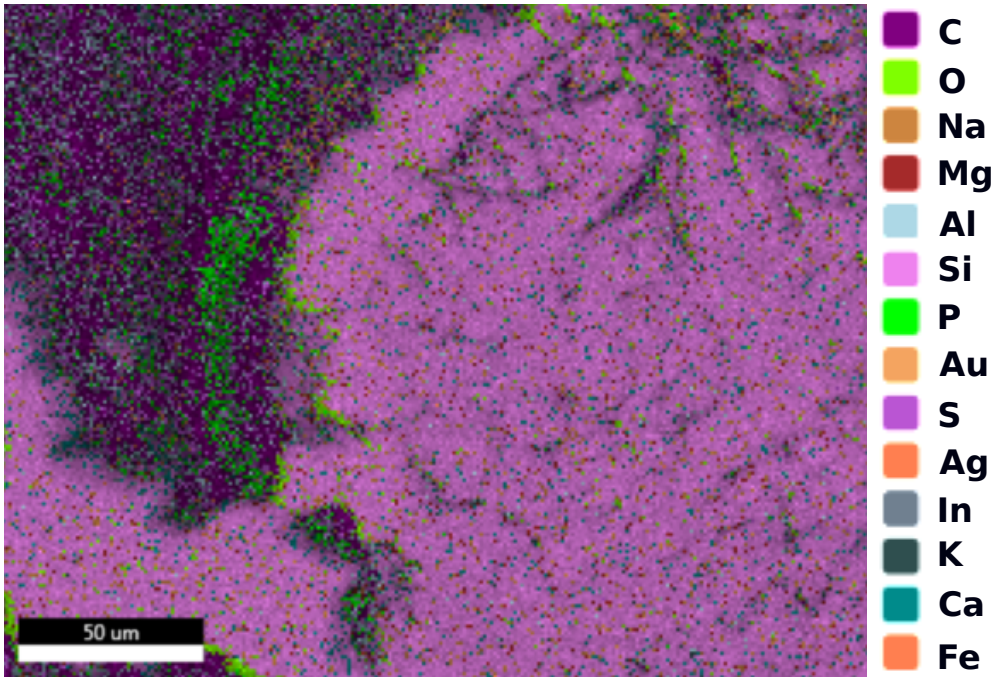


Obrázek 5.116: Spektrum naměřené z bodu 7 - hyfa. Detekovány byly prvky specificky inkorporované do stěny hyf (Ag, Au), prvky organické hmoty (C, O, P), prvky přítomné ve skle (Al, Ca, In, Mg, Na, Si), síra a chlor. Kromě píku křemíku je ve srovnání s fixovanou tkání většina píku menších.

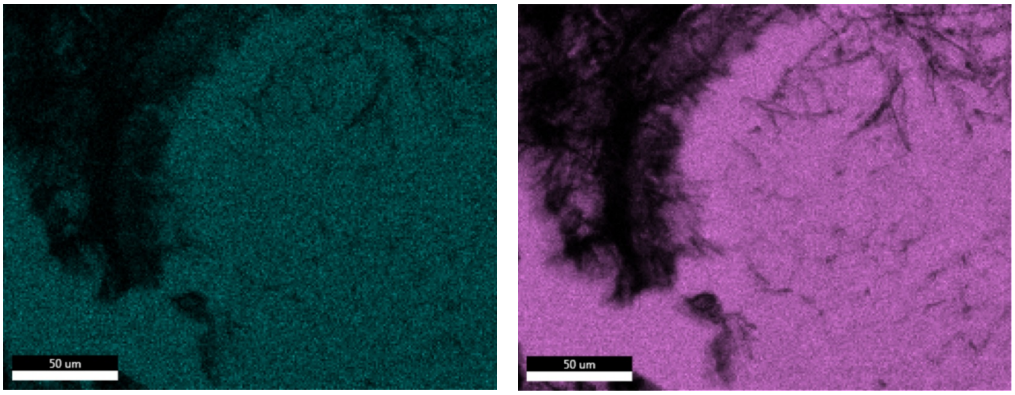
Prvková mapa



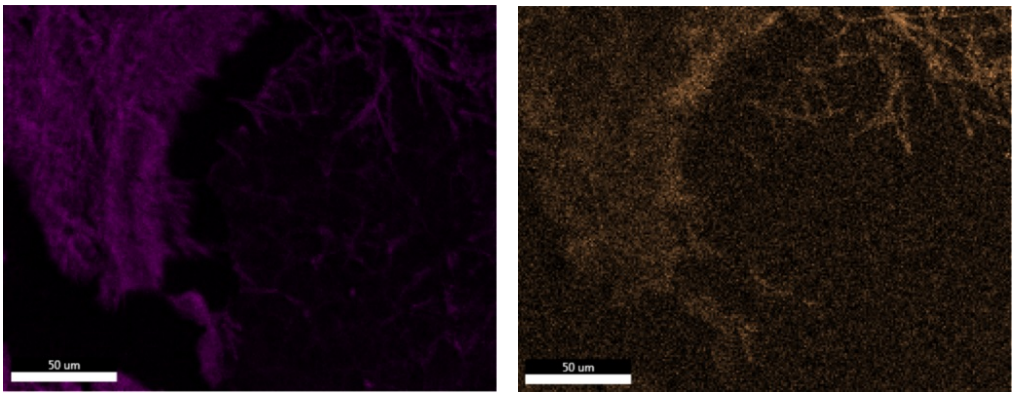
Obrázek 5.117: Vybraná oblast, ve které jsme mapovali prvky přítomné ve vzorku. Houbová vlákna kompletně prorůstají plicní tkáň.



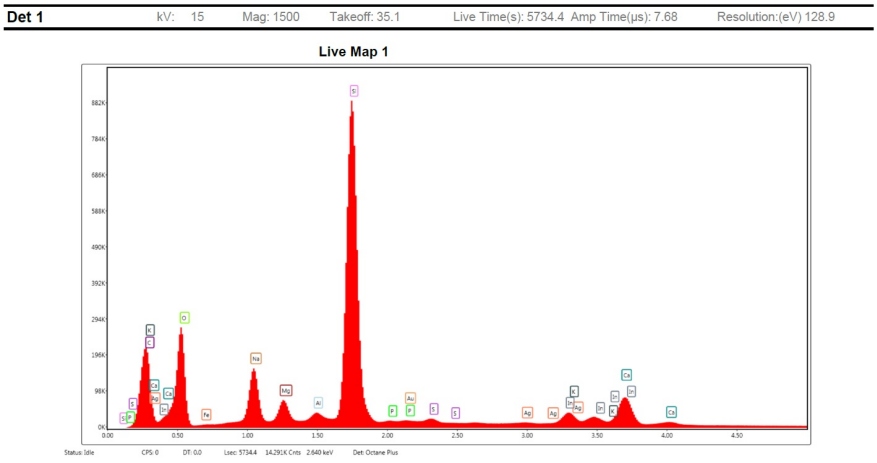
Obrázek 5.118: Výsledná mapa sledovaných prvků vzorku. Distribuce prvků organické hmoty i prvků přítomných ve skle odpovídá.



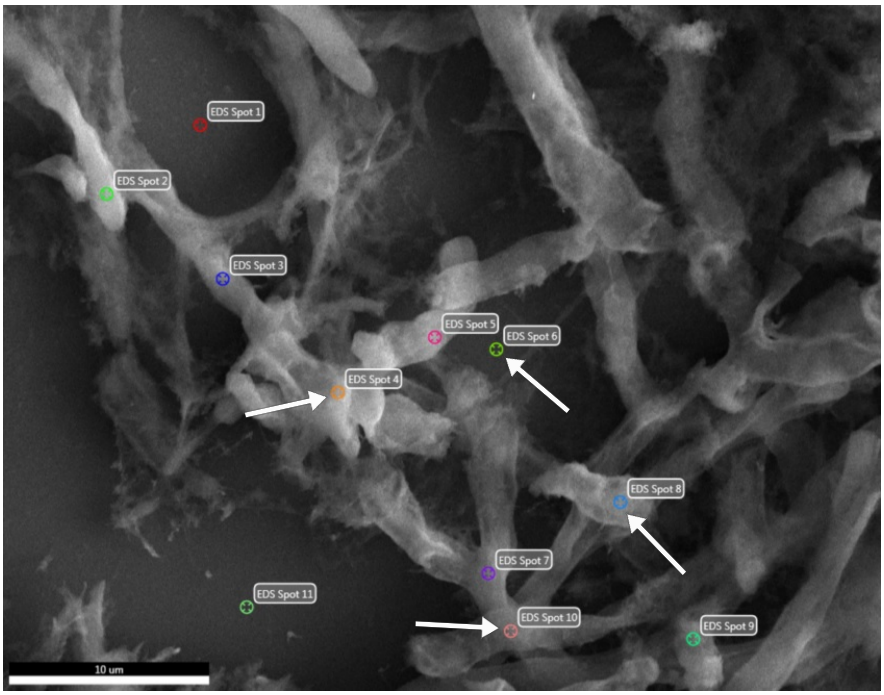
Obrázek 5.119: Mapa distribuce Ca (vlevo) a Si (vpravo). Oba prvky jsou součástí ITO skla a jejich signál odpovídá místům bez organické hmoty.



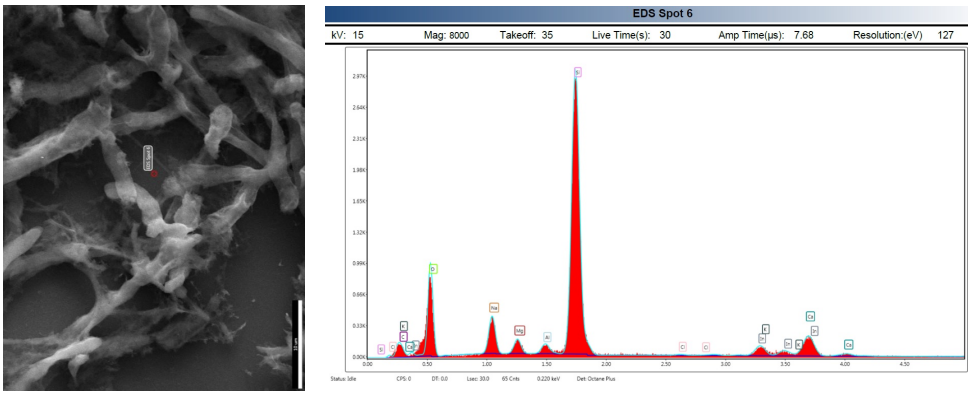
Obrázek 5.120: Mapa distribuce C (vlevo) a Au (vpravo). Distribuce obou prvků přibližně odpovídá místům vzorku, ve kterých se nachází organická hmota.



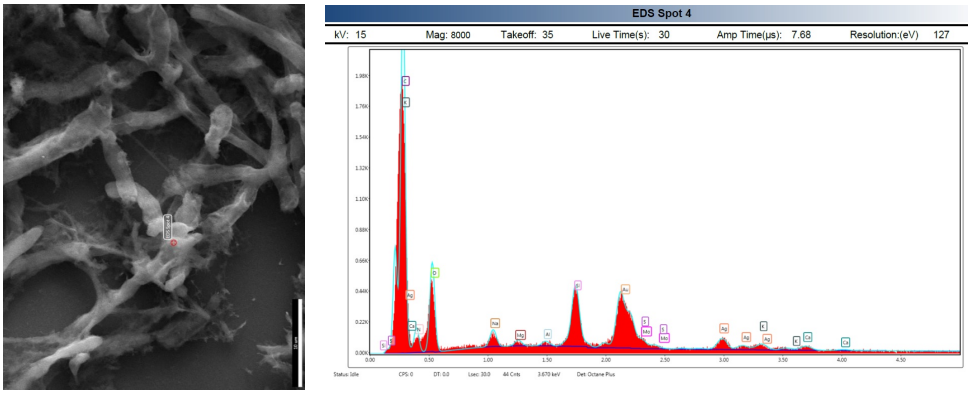
Obrázek 5.121: Výsledné spektrum prvků vybrané oblasti. Nejvyšší pík představuje křemík, signál ostatních prvků je podstatně nižší.



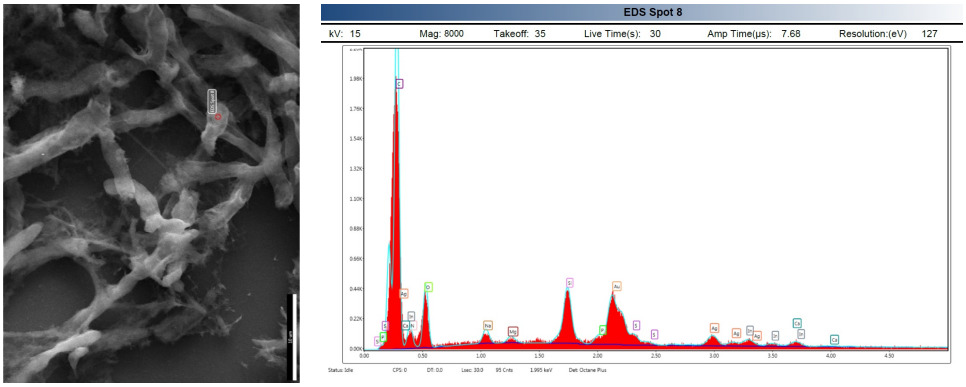
Obrázek 5.122: Oblast řezu nefixované tkáně, ze které byly detekovány prvky. Jednotlivé body jsou označeny šipkami (spot 4, 6, 8, 10).



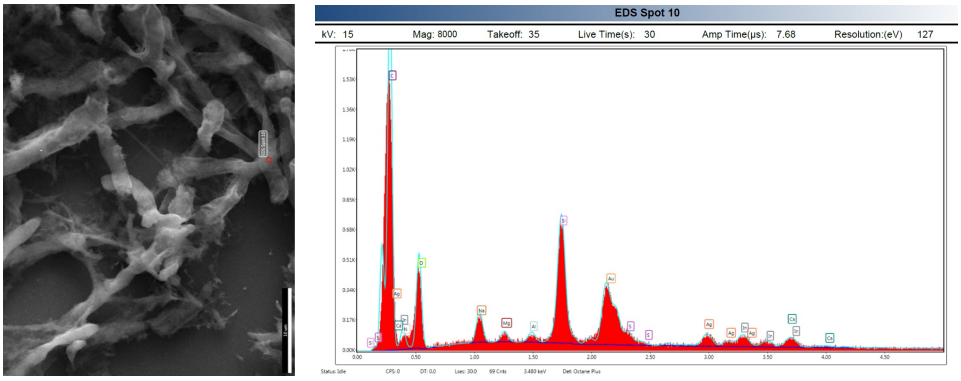
Obrázek 5.123: Spektrum naměřené z bodu 6 - pozadí. Většina prvků spektra (Al, Ca, In, Mg, Na, O, Si) jsou součástí ITO skla, na které byly řezy umístěny. Dále byl detekován uhlík a chlor.



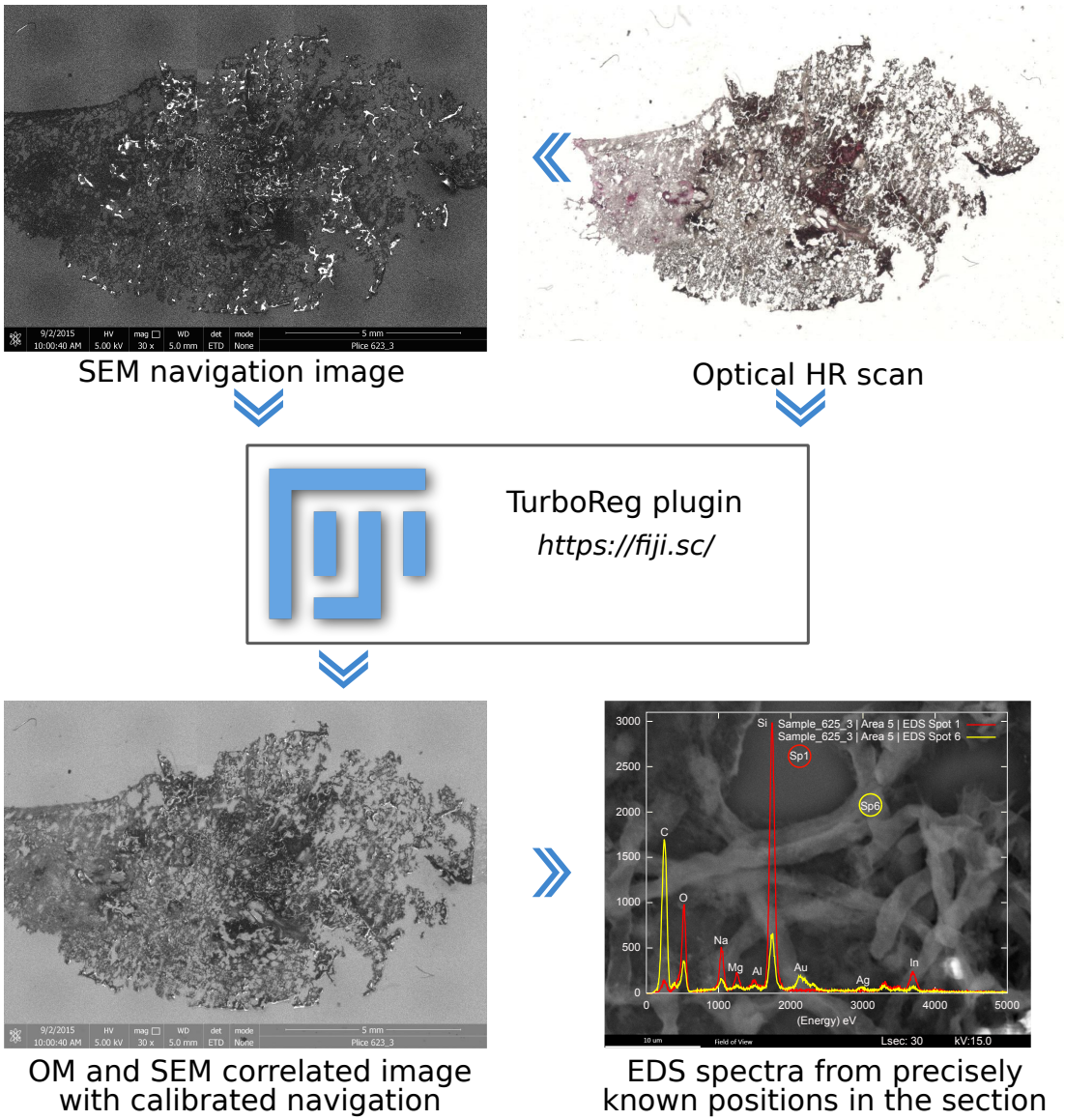
Obrázek 5.124: Spektrum naměřené z bodu 4 - hyfa. Detekovány byly prvky specificky inkorporované do stěny hyf (Ag, Au), prvky organické hmoty (C, O, P) i prvky přítomné ve skle (Al, Ca, Mg, Na, Si). Signál zlata je ve srovnání s výše uvedenými spektry podstatně silnější.



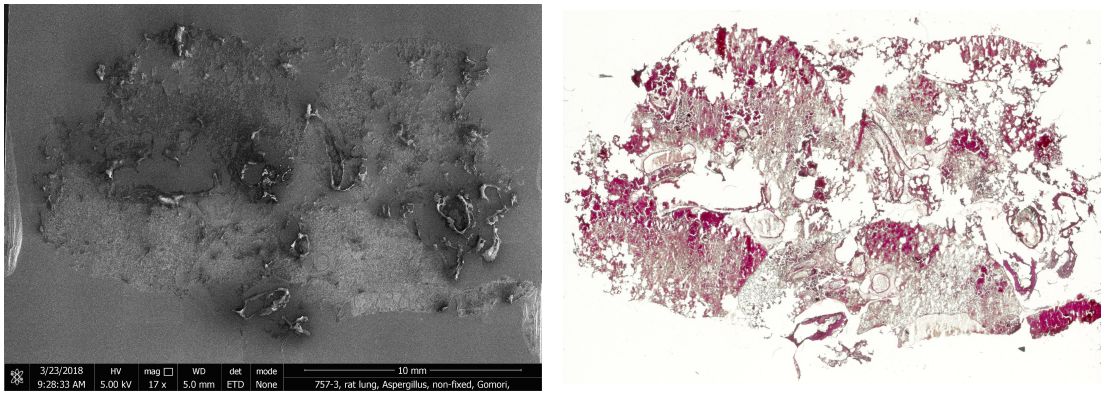
Obrázek 5.125: Spektrum naměřené z bodu 8 - hyfa. Ve srovnání s výše uvedenými spektry je signál Au i Ag podstatně silnější.



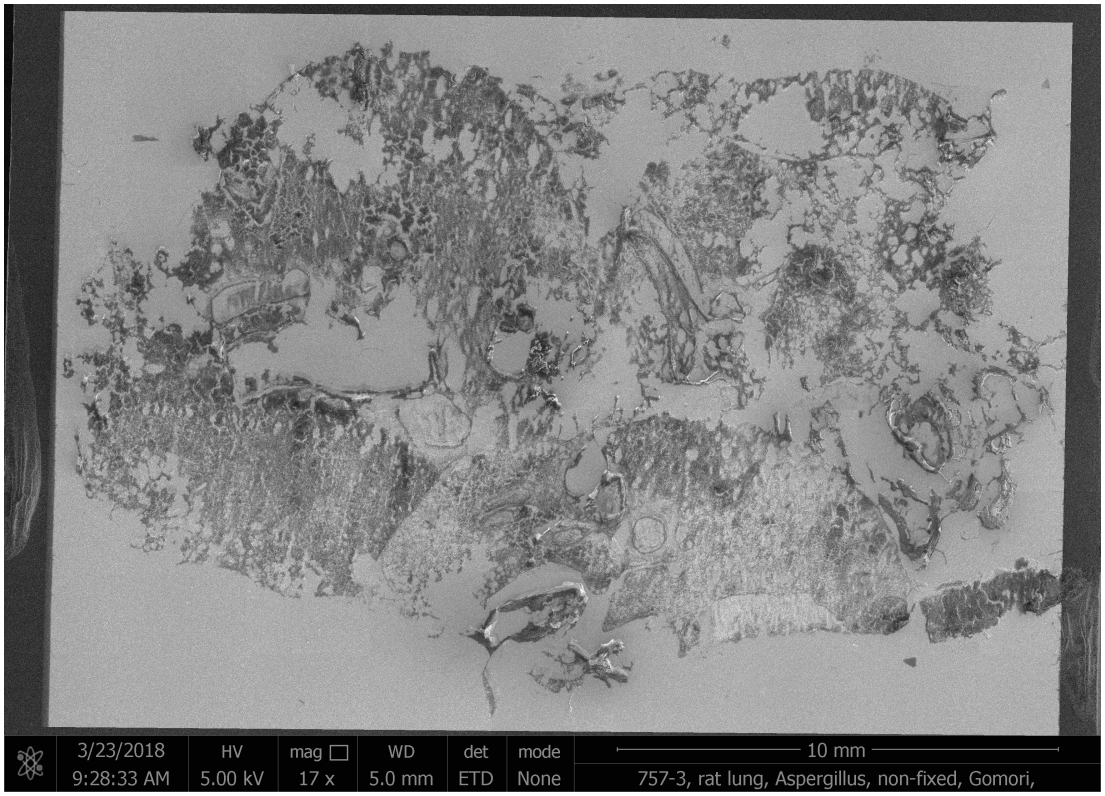
Obrázek 5.126: Spektrum naměřené z bodu 10 - hyfa. Obdobně jako u spektra z bodu 4 a 8 má pík Au podstatně silnější signál než pík Ag.



Obrázek 5.127: Korelací optického a SEM navigačního snímku získáme snímek, ve kterém je možné orientovat se na základě rozeznání charakteristických tkáňových struktur. Díky přesné kalibraci SEM navigačního obrazu můžeme zobrazit vybranou oblast, kde probíhá infekce. V konkrétních strukturách tkáně a hyfách houby můžeme následně zjistit prvkové složení vzorku EDS prvkovou mikroanalýzou (Juříková *et al.*, 2017).



Obrázek 5.128: Řez nefixovanou plicní tkání obarvený stříbrem, SEM navigační obraz (vlevo) a snímek ze skeneru (vpravo). Tyto snímky jsme použili pro tvorbu výsledného korelačního snímku.



Obrázek 5.129: Výsledný korelační snímek.

Závěr

1. V řezech plicní tkáně infikované *A. fumigatus*, které byly obarveny stříbrem pro průkaz hub, jsme s využitím EDS prvkové mikroanalýzy zjistili prvkové složení. Detekce zlata a stříbra v houbových vláknech potvrdila specifitu barvení. Dalšími detekovanými prvky byly křemík, hliník, hořčík, vápník, sodík, indium a cín, které jsou součástí skla. Dále byl detekován uhlík, kyslík, dusík a fosfor. Tyto prvky tvoří organickou hmotu. Přítomnost síry ve vzorcích svědčí o nedostatečném odstranění thiosíranu sodného, jehož roztok byl použit během barvení.

2. Silnější signál zlata a stříbra detekovaný v nefixované tkáni v předchozím experimentu napovídá, že při barvení řezů fixované i nefixované tkáně neproběhly některé kroky barvení správně.

3. Vytvořili jsme mapy distribuce prvků vybraných oblastí řezu. V těchto mapách je možné pozorovat vliv stability vzorku na posun signálu jednotlivých prvků. Výsledné spektrum prvků vybrané oblasti má vyšší rozlišení než spektra měřená v jednotlivých bodech.

4. Korelovali jsme SEM navigační snímek s optickým snímkem řezu obarveného stříbrem. Podle těchto snímků je možné přesně lokalizovat místa infekce a analyzovat prvkové složení konkrétních struktur pomocí SEM.

6. Diskuze

Invazivní plicní aspergilóza (IPA) způsobená oportunně patogenní houbou *Aspergillus fumigatus* je onemocnění, které postihuje imunokompromitované pacienty. S jejich zvyšujícím se počtem v posledních desetiletích roste i incidence IPA (Poeta, 2016). Onemocnění se rozvíjí po vdechnutí všudypřítomných spor *A. fumigatus*, které nejsou účinně odstraňovány z dýchacích cest. Tvorba biofilmu v postižené tkáni poskytuje *A. fumigatus* částečnou ochranu před antimikrobiálními látkami. Pozdní zahájení antimykotické léčby proto nemusí být účinné a mortalita IPA se pohybuje mezi 40–90% (van de Veerdonk *et al.*, 2017). V současnosti stále není dostupná rychlá neinvazivní diagnostická metoda pro průkaz *A. fumigatus* s vysokou specifitou a senzitivitou (Pluhacek *et al.*, 2016).

Dalším mikroorganismem, pro který je typická tvorba biofilmů a infekce imunokompromitovaných pacientů, je bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Kaur & Singh, 2014). Je častým původcem nosokomiálních infekcí a vzhledem k produkci mnoha virulenčních faktorů a zvyšování počtu multirezistentních kmenů je velmi obávaným patogenem (Gellatly & Hancock, 2013). Spolu s *A. fumigatus* často kolonizuje dýchací cesty zejména pacientů s cystickou fibrózou. Ve tkáních infikovaných oběma mikroorganismy probíhá mnoho interakcí. *P. aeruginosa* je díky svým antifungálním účinkům schopná inhibovat biofilm *A. fumigatus* (Mowat *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2015). Oba tyto mikroorganismy produkují siderofory, pomocí kterých získávají železo jak z tkání hostitele, tak ve volném prostředí. Tyto siderofory jsou druhově specifické a mohou sloužit jako biomarkery (Pluhacek *et al.*, 2016; Schalk & Cunrath, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b).

Detekce sideroforů metodami hmotnostní spektrometrie by mohla vést ke zrychlení diagnostiky obou mikroorganismů. Právě rychlost diagnózy a neinvazivní způsob odběru biologického materiálu k testování jsou pro invazivní mykotické či bakteriální infekce velmi důležité (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b). Projekt „Multimodální zobrazování“ Laboratoře charakterizace molekulární struktury si proto klade za cíl vývoj technik včasné a neinvazivní diagnostiky těchto infekcí. Hlavním cílem této práce byla optimalizace přípravy vzorků infikovaných plicních tkání pro rastrovací elektronovou mikroskopii s ohledem na multimodální zobrazování, zejména na MALDI-MSI. Tato optimalizace by měla vést k zobrazení mikroorganismů ve tkáních pomocí SEM a k současné detekci mikrobiálních sideroforů pomocí MALDI-MSI na jednom řezu, případně na následných řezech infikované tkáně. Obě metody však mají odlišné požadavky na přípravu biologických vzorků (Pól *et al.*, 2010; Goldstein *et al.*, 2003). Tyto zdánlivě nekompatibilní přístupy jsme se pokusili optimalizovat tak, abychom pomocí MALDI-MSI a SEM byli schopni analyzovat stejný materiál.

Pokusy, kterými jsme ověřili různé způsoby fixace a zpracování plicní tkáně, byly provedeny na neinfekčním modelu myších plic. Cílem těchto pokusů bylo vyhodnotit optimální způsob přípravy vzorků, který byl následně aplikován na přípravu vzorků z infekčního materiálu. Prvním krokem optimalizace byla charakterizace morfologie jednotlivých struktur v plicní tkáni (obr. 5.3). Srovnáním s tímto standardem jsme v průběhu dalších pokusů vyhodnotili zachování struktur tkáně. Důležitým krokem v optimalizaci přípravy vzorků bylo zjištění, že řezy připravené z hluboce zamrazené plicní tkáně nemají bez následné fixace zachovanou

strukturu (obr. 5.19). Při krájení nefixované tkáně v kryostatu dochází při rozmrazování k uvolnění buněčného obsahu, který pokryje celou plochu řezu. Jsou-li tyto řezy sušeny na vzduchu či v exsikátoru bez dalšího propláchnutí, zaschne tato vrstva na povrchu řezu a znemožní rozlišení charakteristických struktur v tkáni (obr. 5.17). Hluboce zamrazená tkáň je však běžně používána pro přípravu vzorků pro MALDI-MSI (Pól *et al.*, 2010). Sérií pokusů jsme zjistili, jak řezy nefixované tkáně zpracovat, abychom dosáhli co nejlepšího zachování struktury (5.3). Ověřili jsme rovněž možnost zachování struktury dlouhodobě skladované hluboce zamrazené tkáně (5.4). Dále jsme porovnali vliv lepících technik řezů tkáně na sklíčka. Při přípravě vzorků pro MALDI-MSI mohou mít tyto techniky vliv na distribuci analytů v řezu tkáně (Pluhacek *et al.*, 2016; Luptáková *et al.*, 2017b). Změny v mikrostruktuře tkáně jsme pomocí SEM nezaznamenali (obr. 5.10). Vyhodnotili jsme rovněž optimální tloušťku řezů pro zobrazení hyf *A. fumigatus* ve tkáni. Pro MALDI-MSI se běžně využívají řezy o tloušťkách 10–20 μm (Pól *et al.*, 2010). Řezy o větší tloušťce však zachycují větší objem tkáně (obr. 5.36) a pro zobrazení houbových hyf o průměru 3–6 μm jsou vhodnější. Průběžné výsledky některých z těchto pokusů byly prezentovány ve formě posteru (8.1).

Konkrétní postupy jsme následně využili k přípravě vzorků infikovaných *P. aeruginosa* a *A. fumigatus*. Pomocí SEM jsme potvrdili přítomnost bakterií *P. aeruginosa* ve svalu myši (obr. 5.58) a v plicích potkana (obr. 5.71). Lokalizace bakterií v řezech tkáně proběhla na základě distribuce sideroforu pyoverdinu měřené pomocí MALDI-MSI. Výskyt bakterií v infikované tkáni převážně odpovídal distribuci pyoverdinu. Takto získané snímky byly korelovány pomocí analytického systému CycloBranch (Novák *et al.*, 2017). Při korelaci snímků řezu svalu nedošlo k přesnému překryvu oblasti výskytu bakterie a distribuce pyoverdinu. To mohlo být způsobeno mnoha faktory. Jedním z těchto faktorů, který obecně znesnadňuje analýzu dat při multimodálním zobrazování, je prostorové rozlišení metod (Pluhacek *et al.*, 2016). U MALDIMSI se toto rozlišení pohybuje v desítkách mikrometrů (Aichler & Walch, 2015), zatímco u SEM dosahujeme rozlišení desítek nanometrů (Goldstein *et al.*, 2003). Při primárním zvětšení SEM snímku větším než 2 500x, které je nutné pro zobrazení bakterií ve tkáních, proto může dojít k posunu jednotlivých pixelů snímku MALDI-MSI. Extracelulárně produkovaný pyoverdin může rovněž na krátkou vzdálenost difundovat (Weigert & Kümmerli, 2017). Dalším faktorem mohla být deformace struktury řezu svalu sušeného metodou CPD (obr.5.53). Tato metoda je standardně využívaná k přípravě biologických vzorků pro SEM a umožňuje dosáhnout vysokého rozlišení vzorků. Na rozdíl od sušení vzorků na vzduchu nedochází při sušení metodou CPD ke vzniku artefaktů působením sil povrchového napětí, nicméně může dojít ke kompresi vzorků (Goldstein *et al.*, 2003). U vzorků svalu došlo v průběhu sušení CPD ke značnému rozvolnění svalových vláken. Tento způsob přípravy vzorků však jako jediný vedl ke zobrazení bakterií v infikované tkáni. Řez infikovanou plicní tkání (obr. 5.68) nebyl v porovnání s řezem svalu poznamenán těmito artefakty spojenými se sušením metodou CPD.

V plicích infikovaných *A. fumigatus* jsme lokalizovali infekci porovnáním SEM navigačního snímku se snímkem následného řezu, který byl obarven stříbrem pro průkaz hub. Toto barvení se běžně využívá k histopatologickému stanovení přítomnosti hub v klinických laboratořích (Bartáková *et al.*, 2007). V průběhu infekce došlo ke značnému poškození tkáně a přestože byla zvířatům tlumena imunitní

odpověď, pozorovali jsme v postižených místech tkáně množství leukocytů dokládajících probíhající imunitní reakci (obr. 5.99). Vzhledem k rozsáhlé hemoragii byly značné plochy řezů zaplaveny erytrocyty (obr. 5.80). Pokud by se testovaný materiál odebraný ze zvířete využíval pouze k analýze v SEM, bylo by vhodnější využít perfuzní fixaci, která by zamezila dalšímu úniku erytrocytů z krevního řečiště (Wisse *et al.*, 2010). Nicméně pro společnou analýzu s MALDI-MSI není tato fixace vhodná. Molekuly fixačních roztoků mohou při MALDI-MSI interferovat s analyty, což negativně ovlivní detekční limit metody (Pluhacek *et al.*, 2016). Tento problém zřejmě vysvětluje, proč v řezech tkáně fixované roztokem glutaraldehydu nebyl detekován siderofor ferricrocin. Plicní lalok, ze kterého jsme připravili řezy, byl navíc prosycen 30% roztokem sacharózy, který mohl mít obdobný účinek. Roztoky některých sacharidů se používají jako kryoprotektivní média (Goldstein *et al.*, 2003), nicméně přímý vliv roztoku sacharózy na zachování struktury plicní tkáně jsme nepozorovali. Dalším možným vysvětlením, proč neproběhla detekce ferricrocinu, je nedostatečná ko-krystalizace analytů s matricí (Pól *et al.*, 2010).

Zpracování tkáně a příprava vzorků má stěžejní vliv na výsledky prováděných analýz. K přípravě vzorků pro SEM i MALDI-MSI jsme aplikovali běžně používané postupy a částečně se nám podařilo optimalizovat přípravu vzorků tak, aby obě analýzy mohly probíhat na následných řezech. Alternativní možností, jak zachovat strukturu tkáně pro SEM a zároveň kompatibilitu s MALDI-MSI by mohlo být nahrazení fixačního roztoku glutaraldehydu použitím roztoku formaldehydu. Tkáně fixované formaldehydem zalité parafinem se běžně používají k přípravě vzorků pro MALDI-MSI (Pól *et al.*, 2010). Existují také protokoly pro přípravu těchto tkání pro elektronovou mikroskopii (Widáhn & Kindblom, 1988). K zachování struktury plicní tkáně by rovněž mohly být použity roztoky, které jsou využívány k zachování fyziologických funkcí plic při transplantacích. Tyto roztoky obsahují zejména sacharidy (sacharózu, trehalózu) a umožňují uchovávání tkáně až po 96 h (Okada & Kondo, 2009; Tatsuo *et al.*, 1999). Možnou interferenci složek těchto roztoků s analyzovanými molekulami v MALDI-MSI a jejich vliv na zachování struktury ověříme dalšími pokusy v rámci mého doktorského studia.

Dále jsme v řezech tkáně infikované *A. fumigatus* analyzovali prvkové složení pomocí EDS prvkové mikroanalýzy. Ověřili jsme přítomnost zlata a stříbra v houbových vláknech, která kompletně prorůstala plicní tkání (obr. 5.107). Problémem tedy bylo lokalizovat v tkáni takové místo, ve kterém bychom mohli analyzovat prvkové složení bez přítomných mikroorganismů a určit tak standardní zastoupení prvků v organické hmotě. Zlato a stříbro je do stěny hub specificky inkorporováno během barvení stříbrem (Kazuya *et al.*, 2015). V případě řezů nefixované tkáně pravděpodobně neproběhlo toto barvení úspěšně, jelikož signál detekovaných kovů byl podstatně nižší než při předchozím experimentu (obr. 5.126). Příčinou mohl být nedostatečný účinek roztoku methenaminu stříbra, který je během barvení redukován reakcí s aldehydy buněčných stěn mikroorganismů za vzniku kovového stříbra (Kazuya *et al.*, 2015). Tomu by odpovídal i shodný trend snížení intenzity píků kovů v řezech fixované tkáně (obr. 5.105). Překryvem map prvků detekovaných z vybrané infikované oblasti získáme barevný snímek distribuce vybraných prvků (obr. 5.118). Píky prvků výsledného spektra tohoto snímku dosahují vyššího rozlišení než píky spekter detekovaných v jednotlivých bodech. Tato metoda je vhodná k potvrzení výsledků metody LA-ICP-MS, jejíž rozlišení se pohybuje

v nižších řádech (Pluhacek *et al.*, 2016).

Informace o přesné lokalizaci hyf *A. fumigatus* a jejich prvkovém složení může být následně spojena s informací o struktuře tkáně, kterou získáme kontrastním barvením řezů eosinem (obr. 5.127). Korelace optické a elektronové mikroskopie přináší řadu výhod. Umožňuje spojení vysokorezoluční metody s metodou, která dovoluje orientaci ve tkáni při malém zvětšení (Loussert *et al.*, 2012). Po lokalizaci oblastí zájmu v řezu infikované tkáně s využitím optické mikroskopie můžeme následně pomocí SEM sledovat patofyziologické změny ve tkáni vyvolané mikroorganismy. Následnou korelací s daty získanými analytickými metodami v rámci multimodálního zobrazování získáme komplexní informace o infikované tkáni.

7. Souhrn

V této práci jsem se věnovala analýze plicních vzorků infikovaných oportunně patogenními mikroorganismy, konkrétně houbou *Aspergillus fumigatus* nebo bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, metodami rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat přípravu vzorků pro SEM s ohledem na multimodální zobrazování, zejména na společnou analýzu s MALDI zobrazovací hmotnostní spektrometrií (MALDI-MSI) a EDS prvkovou mikroanalýzou.

Tento cíl byl z velké části naplněn. Optimalizovala jsem přípravu vzorků plic tak, aby bylo možné provést analýzy SEM a MALDI-MSI na následných řezech tkáně. Pomocí SEM jsem ověřila přítomnost *P. aeruginosa* v plicích potkana, ve kterých byl ve stejné lokaci pomocí MALDI-MSI detekován siderofor pyoverdin. Tyto analýzy proběhly na následných řezech tkání a korelací výsledných obrazů jsme získali překryv oblasti výskytu bakterií a distribuce pyoverdinu.

V plicích potkana s invazivní plicní aspergilózou jsem ověřila přítomnost *A. fumigatus*, přestože v nich nebyl detekován siderofor ferricrocin pomocí MALDI-MSI. V řezech této tkáně jsem s využitím prvkové analýzy detekovala zlato a stříbro v houbových hyfách. Tyto prvky se specificky inkorporovaly do buněčné stěny hyf během barvení stříbrem. Korelací optického snímku obarveného řezu s elektronmikroskopickým snímkem jsem získala informaci o přesné lokalizaci infekce ve tkáni.

Poznatky získané ostatními pokusy položily základ k vývoji metod pro zpracování vzorků infikované tkáně tak, aby analýzy MALDI-MSI, SEM a EDS mohly probíhat na jednom řezu tkáně. Těmto metodickým postupům se budu dále věnovat v rámci doktorského studia.

Seznam použité literatury

Acosta J., Catalan M., del Palacio-Peréz-Medel A., Lora D., Montejo J.C., Cuetara M.S., Moragues M.D., Ponton J., del Palacio A., 2010: A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1,3) –β– d-glucan chromogenic assay in serum samples. Clin. Microbiol. Infect. 17: 1053–1060.

Aichler M., Walch A., 2015: Maldi imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. Laboratory Investigation 95: 422–431.

Angeletti S., 2017: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (maldi-tof ms) in clinical microbiology. J. Microbiol. Methods 138: 20–29.

Bartáková H., Cetkovský P., Drgoňa L., Haber J., Hamal P., Kocmanová I., Kouba M., Koukalová D., Lengerová M., Mallátová N., Mayer J., Mencl K., Ráčil Z., Tesařová M., 2007: Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky. Vnitř. Lék. 53.

Bennett J.W., Klich M., 2003: Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev. 16: 497–516.

Bongomin F., Batac C.R., Richardson M.D., Denning D.W., 2017: A review of onychomycosis due to *Aspergillus* species. Mycopathologia : doi:10.1007/s11 046–017–0222–9.

Burns J.L., Rolain J.M., 2014: Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? J. Cystic Fibrosis 13: 1–9.

Caverly L.J., Zhao J., LiPuma J.J., 2015: Cystic fibrosis lung microbiome: opportunities to reconsider management of airway infection. Pediatric Pulmonology 50: 31–38.

Crousilles A., Maunders E., Bartlett S., Fan C., Ukor E.F., Abdelhamid Y., Baker Y., Flotos A., Spring D.R., Welch M., 2015: Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? Future Microbiol. 10(11): 1825–1836.

Deschaght P., Baere T.D., Simaey L.V., daele S.V., Baets F.D., Vos D.D., Pirnay J.P., Vaneechoutte M., 2009: Comparison of the sensitivity of culture, pcr and quantitative real-time pcr for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. BMC Microbiol. 9: doi:10.1186/1471–2180–9–244.

Deschaght P., daele S.V., Baets F.D., Vaneechoutte M., 2011: Pcr and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of cf patients. a literature review. J. Cystic Fibrosis 10: 293–297.

Egerton R.F., 2005: Physical principles of electron microscopy. Springer. ISBN 978-0387-25800-0.

Fallon J.P., Reeves E.P., Kavanagh K., 2010: Inhibition of neutrophil function following exposure to the *Aspergillus fumigatus* toxin fumagillin. J. Med. Microbiol. 59: 625–633.

Ferreira J.A.G., Penner J.C., Moss R.B., Haagensen J.A.J., Clemons K.V., Spormann A.M., Nazik H., Cohen K., Banaei N., Carolino E., Stevens D.A., 2015: Inhibition of *Aspergillus fumigatus* and its biofilm by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the source, phenotype and growth conditions of the bacterium. PLoS One 10: doi:10.1371/journal.pone.0134 692.

Filler S.G., Sheppard D.C., 2006: Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. PLoS Pathogens 2: 1099–1105.

Ge M.C., Kuo A.J., Liu K.L., Wen Y.H., Chia J.H., Chang P.Y., Lee M.H., Wu T.L., Chang S.C., Lu J.J., 2016: Routine identification of microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Success rate, economic analysis, and clinical outcome. J. Microbiol., Immunol. Infect. 50: 662–668.

Gellatly S.L., Hancock R.E., 2013: *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog. Dis. 67: 159–173.

Goldstein J., Newbury D., Joy D., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael J., 2003: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Kluwer Academic/Plenum Publishers, third edition edition.

Hanker S.J., Franz K., Bloom M.G., an Arnold M Seligman J.S.C., 1967: Coordination polymers of osmium: the nature of osmium black. Science 156: 1737–1738.

Havliš J., Holčapek M., Volný M., 2016: Česká terminologie hmotnostní spektrometrie. Staženo dne 23.3.2018. http://terminologie-ms.sci.muni.cz/info.

Holland R.D., Wilkes J.G., Ralli F., Sutherland J.B., Persons C.C., Voorhees K.J., Jr. J..L., 1996: Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-off-light mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 10: 1227–1232.

Index Fungorum Partnership, 2018: Index Fungorum. Staženo 23.3.2018. http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=211776.

JEOL, 2009: Scanning Electron Microscope A To Z. Staženo 26.4.2018. https://www.jeol.co.jp/en/applications/pdf/sm/sem_atoz_all.pdf.

JEOL Co. Ltd., 2004: Invitation to the SEM World. Staženo 29.4.2018. https://wiki.nbi.ku.dk/w/cleanroom/images/ b/b5/Invitation_to_the_SEM_World.pdf.

Juříková T., Luptáková D., Pluháček T., Petřík M., Palyzová A., Havlíček V., Benada O., 2017: Maldi-imaging and scanning electron microscopy-eds in an invasive aspergillosis diagnostics. CSMS Mikroskopie, Grand Hotel Pressburg Bratislava, 9.-10. května 2017, konference pořádaná Československou mikroskopickou společností, z.s. .

Kaur S., Singh S., 2014: Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 52: 2–9.

Kazuya S., Kayo K., Yasuyoshi M., Takanori O., Ken-Ichi I., Yutaka T., 2015: New grocott stain without using chromic acid. Acta Histochem. Cytochem. 48: 9–14.

Keene D.R., Tufa S.F., Wong M.H., Smith N.R., Sakai L.Y., Horton W.A., 2014: Correlation of the same fields imaged in the tem, confocal, lm, and microct by image registration: from specimen preparation to displaying a final composite image. Methods Cell Biol. 124: 391–417.

Krasny L., Benada O., Strnadova M., Lemr K., Havlicek V., 2015: Lateral resolution in naldi msi: back to the future. Anal. Bioanal. Chem. 407: 2141–2147.

Kwon-Chung K.J., Sugui J.A., 2013: *Aspergillus fumigatus* - what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? PLoS Pathog. 9: doi:10.1371/journal.ppat.1003 743.

Latgé J.P., Beauvais A., Chamilos G., 2017: The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. Annu. Rev. Microbiol. 71: 99–116.

Latgé J., Mouyna I., Tekaia F., Beauvais A., Debeaupuis P., Nierman W., 2005: Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. Med. Mycol. 43: 15–22.

Loussert C., Forestier C.L., Humbel B.M., 2012: Correlative light and electron microscopy in parasite research. Methods Cell Biol. 111: 59–73.

Luptáková D., Pluháček T., Palyzová A., Přichystal J., Balog J., Lemr K., Juránek I., Havlíček V., 2017a: Meet interesting abbreviations in clinical mass spectrometry: from compound classification by reims to multimodal and mass spectrometry imaging (msi). Acta virol. 61: 353 – 360.

Luptáková D., Pluháček T., Petřík M., Novák J., Palyzová A., Sokolová L., Škríba A., Šedivá B., Lemr K., Havlíček V., 2017b: Non-invasive and invasive diagnoses of aspergillosis in a rat model by mass spectrometry. Sci. Rep. : doi:10.1038/s41 598–017–16 648–z.

McCulloch E., Lucas C., Ramage G., Williams C., 2011: Improved early diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time pcr to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. J. Cystic Fibrosis 10: 21–24.

McMullan D., 1995: Scanning electron microscopy 1928–1965*. Scanning 17: 175–185.

Meyer J.M., Neely A., Stintzi A., Georges C., Holder I.A., 1996: Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 64: 518–523.

Mowat E., Rajendran R., Williams C., McCulloch E., Jones B., Lang S., Ramage G., 2010: *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 313: 96–102.

MyScope, 2016: Microanalysis. Staženo 25.4.2018. http://www.ammrf.org.au/myscope/analysis/introduction/.

Neuschmelting V., Lucas C.W., Stoffels G., Oros-Peusquens A.M., Lockau H., Shah N., Langen K.J., Goldbrunner R., Grefkes C., 2016: Multimodal imaging in malignant brain tumors: enhancing the preoperative risk evaluation for motor deficits with a combined hybrid mri-pet and navigated transcranial magnetic stimulation approach. AJNR Am J. Neuroradiol. 37: 266–273.

Novák J., Sokolová L., Lemr K., Pluháček T., Palyzová A., Havlíček V., 2017: Batch-processing of imaging or liquid-chromatography mass spectrometry datasets and de novo sequencing of polyketide siderophores. BBA - Proteins and Proteomics 1865: 768–775.

Okada Y., Kondo T., 2009: Preservation solution for lung transplantation. Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg. 57: 635–639.

O'Rourke C., Gaillard A.F., et al, 2018: Aspergilloma. Staženo 27.4.2018. https://radiopaedia.org/articles/aspergilloma.

O'Gorman C.M., Fuller H.T., Dyer P.S., 2009: Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 457: 471–474.

Pail M., Mikulenka P., Mareček R., Mikl M., Brázdil M., 2014: Multimodální přístup k funkčnímu zobrazení mozku. Neurologie pro praxi 15: 26–34.

Paulussen C., Hallsworth J.E., Alvarez-Perez S., Nierman W.C., Hamill P.G., Blain D., Rediers H., Lievens B., 2016: Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. Microb. Biotechnol. 10: 296–322.

Pederson K.J., Vallis A.J., Aktories K., Frank D.W., Barbieri1 J.T., 1999: The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exos disrupts actin filaments via small-molecular-weight gtp-binding proteins. Mol. Microbiol. 32: 393–401.

Peek M.E., Bhatnagar A., McCarty N.A., Zughaier S.M., 2012: Pyoverdine, the major siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, evades ngal recognition. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. : doi:10.1155/2012/843 509.

Pietzsch J., 2014: The Nobel Prize in Physics 1986 - Perspectives: Life through a Lens. Staženo dne 23.3.2018. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/perspectives.html.

Pluhacek T., Petrik M., Luptakova D., Benada O., Palyzova A., Lemr K., Havlicek V., 2016: *Aspergillus* infection monitored by multimodal imaging in a rat model. Proteomics 16: 1785–1792.

Poeta M.D., 2016: Special issue: Novel antifungal drug discovery. J. Fungi 2: 33.

Pól J., Strohalm M., Havlíček V., Volny M., 2010: Molecular mass spectrometry imaging in biomedical and life science research. Histochem. Cell. Biol. 134: 423–443.

Quorum Technologies Ltd, 2015: E3100, K850 and K850WM Critical Point Dryers. Quorum Technologies Ltd.

Ratjen F., Walter H., Haug M., Meisner C., Grasemann H., Döring G., 2007: Diagnostic value of serum antibodies in early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. Pediatric Pulmonology 42: 249–255.

Robinson A.L., 1986: Electron microscope inventors share noble physics prize. Science 234: 821–822.

Ruska E., 1987: The development of the electron microscope and of electron microscopy. Biosci. Rep. 7: 607–629.

Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J., 2007: Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr. Opin. Microbiol. 10: 644–648.

Schalk I.J., Cunrath O., 2016: An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. Soc. Appl. Microbiol. 18: 3227–3246.

Schalk I.J., Guillon L., 2013: Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. Environ. Microbiol. 15: 1661–1673.

Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E.e.a., 2012: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat. Methods 9: 676–682.

Schlam D., Canton J., Carreno M., Kopinski H., Freeman S.A., Grinstein S., Fairnb G.D., 2016: Gliotoxin suppresses macrophage immune function by subverting phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate homeostasis. mBio 7: doi:e02 242–15.

Schöne C., Höfler H., Walch A., 2016: Maldi imaging mass spectrometry in cancer research: Combining proteomic profiling and histological evaluation. Clin. Biochem. 46: 539–545.

Shaver C.M., Hauser A.R., 2004: Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* exou, exos, and exot to virulence in the lung. Infect. Immun. 72: 6969–6977.

Sheppard D.C., Howell P.L., 2016: Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: Lessons from bacteria. J. Biol. Chem 291: 12 529–12 537.

Shirazi F., Ferreira J.A.G., Stevens D.A., Clemons K.V., Kontoyiannis D.P., 2016: Biofilm filtrates of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients inhibit preformed *Aspergillus fumigatus* biofilms via apoptosis. PLoS ONE : doi:10.1371/journal.pone.0150 155.

Smith K., Rajendran R., Kerr S., Lappin D.F., Mackay W.G., Williams C., Ramage G., 2015: *Aspergillus fumigatus* enhances elastase production in pseudomonas aeruginosa co-cultures. Med. Mycol. 53: 645–655.

Tatsuo F., Toshiki H., Takayuki N., Mitsuhiro U., Masahiro K., Shigeki H., Wada H., 1999: Role of saccharides on lung preservation. Transplantation 68: 110–117.

Torelli R., Sanguinetti M., Moody A., Pagano L., Caira M., Carolis E.D., Fuso L., Pascale G.D., Bello G., Antonelli M., Fadda G., Posteraro B., 2011: Diagnosis of invasive aspergillosis by a commercial real-time pcr assay for *Aspergillus* dna in bronchoalveolar lavage fluid samples from high-risk patients compared to a galactomannan enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. 49: 4273–4278.

Tramper-Stranders G.A., van der Ent C.K., Slieker M.G., Terheggen-Lagro S.W.J., van Berkhout F.T., Kimpen J.L.L., Wolfs T.F.W., 2016: Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. Thorax 61: 689–693.

Tsunawaki S., Yoshida L.S., Nishida S., Kobayashi T., Shimoyama T., 2004: Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst nadph oxidase. Infect. Immun. 72: 3373–3382.

van de Veerdonk F.L., Gresnigt M.S., Romani L., Netea M.G., Latgé J.P., 2017: *Apergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. Nat. Rev. Microbiol. : 10.1038/nrmicro.2017.90.

Weigert M., Kümmerli R., 2017: The physical boundaries of public goods cooperation between surface-attached bacterial cells. Proc. R. Soc. B 284: doi:10.1098/rspb.2017.0631.

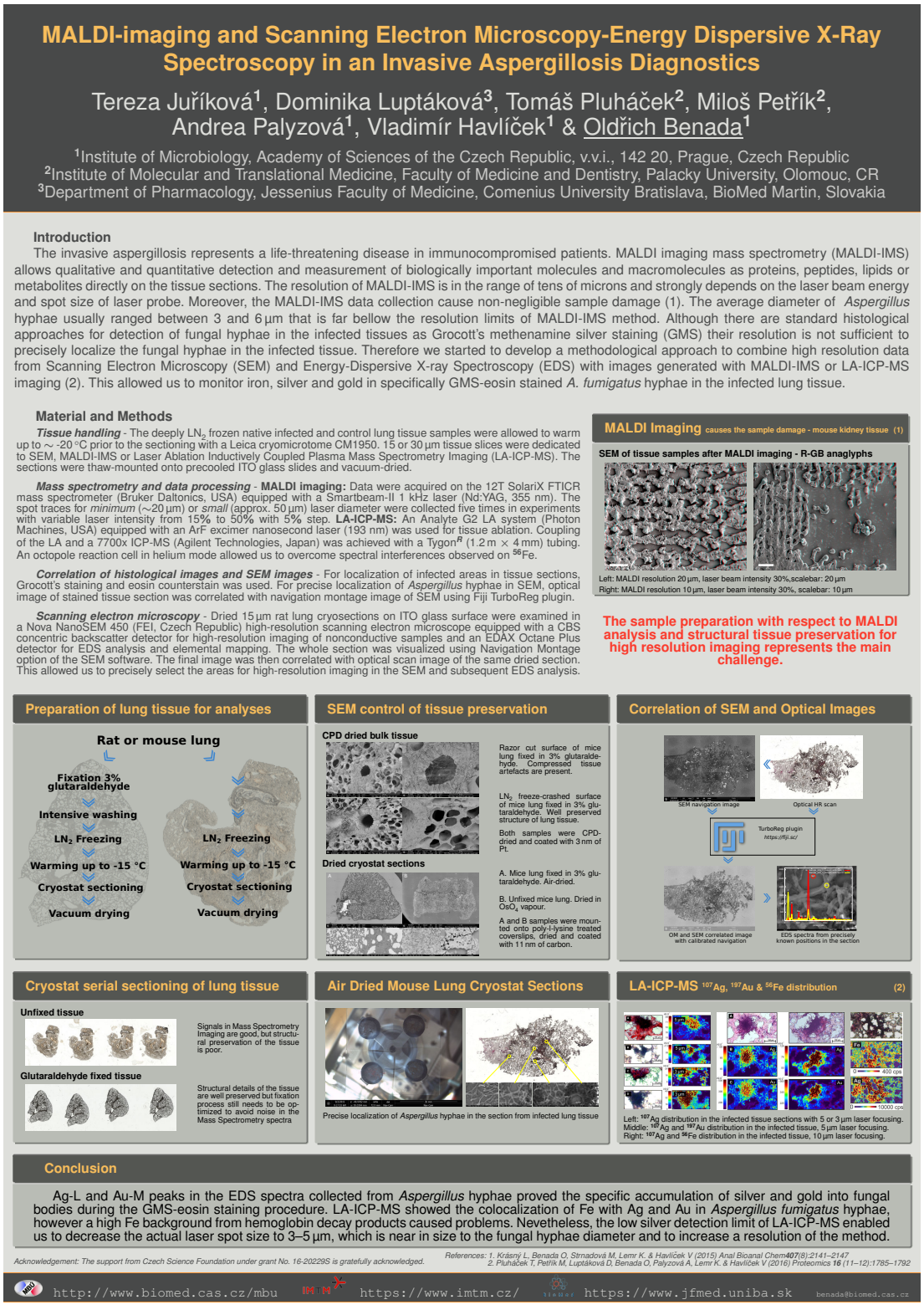
Widáhn S., Kindblom L.G., 1988: A rapid and simple method for electron microscopy of paraffin-embedded tissue. Ultrastruct. Pathol. 12: 131–136.

Wisse E., Braet F., Duimel H., Vreuls C., Koek G., Damink S.W.O., van den Broek M.A., Geest B.D., Dejong C.H., Tateno C., Frederik P., 2010: Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. World J. Gastroenterol. 16: 2851–2866.

Zhang Y., Huang T., Jorgens D.M., Nickerson A., Lin L.J., Pelz J., Gray J.W., Lopez C.S., Nan X., 2017: Quantitating morphological changes in biological samples during scanning electron microscopy sample preparation with correlative super-resolution microscopy. PLoS ONE 12: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176 839.

8. Přílohy

8.1 Poster autorky



Obrázek 8.1: Poster prezentovaný na konferenci CSMS Mikroskopie 2017, Grand Hotel Pressburg Bratislava, 9.-10. května 2017, pořádané Československou mikroskopickou společností, z.s.