



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Radek Bura

**Studium isotopicky značených látek v živých buňkách
pomocí Ramanovy mikroskopie**

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika (N0533A110012)

Studijní obor: FBCHP (0533TA1100120000)

Praha 2021

Tato práce by nemohla vzniknout bez podpory celé řady lidí, kteří byli mými pedagogy, mými kolegy a mými přáteli. A mnohdy zastávali i vícero těchto rolí současně. Jen stěží bych je všechny zmiňoval. Přesto děkuji všem, kteří přispěli k mému rozvoji a vzdělání, zejména a především ale svému školiteli, docentovi Petrovi Mojzešovi, za jeho pochopení, nadhled a povzbuzování.

Diplomová práce byla součástí řešení grantového projektu GAČR 17-06264S „Růst a dělení ve stabilních izotopech - více než metabolické značení“. Děkuji tímto Grantové agentuře České republiky za finanční podporu.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Dolní Lutyni dne 16. 7. 2021

podpis

A handwritten signature in black ink, consisting of a long horizontal line followed by a stylized, cursive flourish.

Název práce: Studium isotopicky značených látek v živých buňkách pomocí Ramanovy mikroskopie

Autor: Radek Bura

Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Jednobuněčné řasy (mikrořasy) jsou schopny produkovat řadu látek, jako jsou škroby, oleje, proteiny, karotenoidy, polyfosfáty nebo krystalické puriny přímo z anorganických zdrojů pomocí fotosyntézy. Různé druhy mikrořas je možno využít pro ekonomicky výhodnou produkci různých biomolekul. Díky autotrofnímu charakteru jsou mikrořasy výjimečné i v tom, že mohou syntetizovat složité isotopicky značené biomolekuly z jednoduchých isotopicky značených anorganických látek. Analýza chemického složení mikrořas pomocí chemicko-analytických metod je poměrně složitá, časově náročná a pracná. Mezi optické metody, pomocí kterých lze určit chemické složení mikrořas *in situ*, tj. přímo v intaktních buňkách, patří konfokální Ramanova mikroskopie. Tato technika, kombinující konfokální optickou mikroskopii s Ramanovou spektroskopií, umožňuje rychlou a nedestruktivní analýzu chemického složení látek ve zkoumaných objektech, a to včetně vlivu isotopického značení. Odrazem chemického složení objektů jsou Ramanova spektra, v případě Ramanova mapování mikroskopických objektů pak jejich chemické mapy. V této práci byl studován specifický případ isotopického značení, a to vliv těžké vody (D_2O) na deuteraci biomolekul v živých buňkách mořské řasy *Amphidinium carterae*. Hlavním tématem byla detekce různě deuterovaných forem krystalického guaninu v závislosti na procentuálním zastoupení D_2O v kultivačním médiu a určení stupně deuterace porovnáním se spektry synteticky připravených deuterovaných forem. Zajímavým a cenným objevem, který nebyl původně záměrem této práce, bylo zjištění přetrvávání nanokrystalického guaninu i ve vysoce zředěných roztocích.

Klíčová slova: Ramanova mikroskopie, stabilní isotopy, isotopické značení, buňky, metabolity, jednobuněčné řasy

Title: Study of isotopically labeled substances in living cells by means of Raman microscopy

Author: Radek Bura

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: doc. RNDr. Peter Mojzeš, CSc., Institute of Physics of Charles University

Abstract: Unicellular algae (microalgae) are able to produce a number of substances such as starches, oils, proteins, carotenoids, polyphosphates, or crystalline purines directly from inorganic sources by photosynthesis. Different species of microalgae can be used for the economic production of various biomolecules. Due to their autotrophic nature, microalgae are also unique as they can synthesize complex isotopically labeled biomolecules from simple isotopically labeled inorganic substances. Analysis of the chemical composition of microalgae by means of chemical-analytical methods is relatively complex, time-consuming, and laborious. Confocal Raman microscopy represents one of the optical methods by which the chemical composition of microalgae can be determined in situ, *i.e.* directly within intact cells. This technique combining confocal optical microscopy with Raman spectroscopy enables fast and non-destructive analysis of the chemical composition of substances in the investigated objects, including the effect of isotopic labeling. The chemical composition of the investigated objects is reflected by their Raman spectra, in the case of Raman mapping of microscopic objects by their chemical maps. In this work, a specific case of isotopic labeling was studied, namely the effect of heavy water (D₂O) on the deuteration of biomolecules in living cells of the marine microalgae *Amphidinium carterae*. The main topic was the detection of variously deuterated forms of crystalline guanine depending on the percentage of D₂O in the culture medium and the determination of the deuteration degree by comparison with the spectra of synthetically prepared deuterated forms of guanine. An interesting and valuable discovery, which was not originally the intention for this work, was the finding of persistence of nanocrystalline guanine even in highly diluted solutions.

Keywords: Raman microscopy, stable isotopes, isotopic labeling, cells, metabolites, microalgae

OBSAH

ÚVOD	1
1. TEORETICKÁ ČÁST	4
1.1. Molekula	4
1.2. Interakce elektromagnetického záření s hmotou	9
1.3. Ramanův jev	17
1.4. Měření Ramanových spekter – Ramanova spektroskopie	22
1.5. <i>Amphidinium carterae</i>	23
1.6. Ramanova spektra živých buněk	25
1.7. Guanin, jeho vlastnosti a Ramanova spektra	31
1.8. Využití isotopicky značených látek v Ramanově mikroskopii živých buněk	38
1.9. Nezáporná maticová faktorizace	43
1.10. Faktorová analýza	44
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
2.1. Měřicí aparatury	46
2.2. Příprava vzorků a postup práce	49
2.3. Programy ke zpracování dat	57
3. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE	59
3.1. Kultivace a počítání živých buněk	59

3.2. Morfologie a pohyblivost buněk	61
3.3. Chemické mapy živých buněk	63
3.4. Rozklad guaninových spekter z živých buněk do deuterovaných forem	74
3.5. Umělá guaninová spektra	79
3.6. Model deuterace guaninu a rozklad spekter z buněk do umělých spekter	94
ZÁVĚR	100
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	103
SEZNAM TABULEK	112
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	113
PŘÍLOHY	116

ÚVOD

Tématem diplomové práce je studium přítomnosti isotopicky značených látek v živých buňkách pomocí Ramanovy mikroskopie. Práce představuje součást širšího grantového projektu GAČR 17-06264S „Růst a dělení ve stabilních izotopech - více než metabolické značení“, který se zabýval studiem vlivu těžké vody na mikroskopické řasy.

Ramanova mikroskopie jako moderní optická mikroskopická metoda se využívá napříč různorodými obory od materiálového výzkumu přes chemii, mineralogii, biofyziku a biochemii, až po mikrobiologii, molekulární biologii nebo biomedicínu. Při studiu se nemůžeme vyhnout otázce, jak tato mikrospektroskopická metoda funguje a jaké má při studiu mikroskopických řas výhody oproti jiným analytickým metodám. Než čtenáře seznámíme s Ramanovou mikroskopií živých buněk a detekcí isotopicky značených molekul, představíme Ramanův rozptyl, na kterém je tato metoda založená.

Ramanův rozptyl je nepružný (neelastický) rozptyl elektromagnetického záření na vibracích atomů tvořících molekulu nebo na vibracích atomů v krystalové mříži. Tento jev byl objeven ve 20. letech 20. století a umožnil tak vzniku celé vědní disciplíny, a to Ramanovy spektroskopie (RAMAN et al., 1928), která je součástí vibrační spektroskopie. Tato rychlá, nedestruktivní a bezkontaktní vibrační technika kombinovaná s konfokální optickou mikroskopií představuje Ramanovu mikrospektroskopii. V případě, že se používá jako zobrazovací technika se specifickým chemickým kontrastem, označuje se jako Ramanova mikroskopie. Ramanova mikroskopie našla v posledních přibližně dvaceti letech velké využití v analýze chemického složení biologických vzorků, např. biologických tkání a živých buněk různého charakteru, a to včetně sledování jejich metabolismu. Pracoviště, na kterém byla diplomová práce realizována, dosáhlo v posledních letech značného pokroku v použití Ramanovy mikroskopie pro studium fotosyntetických mikroorganismů – mikroskopických řas. (MOJZEŠ et al., 2020)

Autotrofní fotosyntetické mikrořasy jsou zajímavé studijní objekty, protože jsou schopné pomocí fotosyntézy vytvářet složité biomolekuly z jednoduchých anorganických látek. Pomocí Ramanovy mikroskopie lze kvalitativně i kvantitativně charakterizovat chemické složení mikrořas a přitom jednoduše ovlivňovat chemické

složení kultivačního média, které je jediným zdrojem makroelementů jako jsou fosfor, dusík a síra, a taky mikroelementů (Fe, Mo, Co, Cu, Se, atd.). Kromě toho je možné ovlivňovat dostupnost uhlíku ve formě CO₂ nebo rozpustných uhličitů, a zejména složení vody, jako základního média. Snadné ovlivňování anorganických živin je možno využít pro isotopické značení, vliv kterého je možno studovat právě pomocí Ramanovy mikroskopie vysoce citlivé na hmotnost atomů tvořících molekuly. Isotopické značení, zejména radioisotopy, se v biologickém výzkumu široce využívá už řadu desetiletí, ale s ohledem na bezpečnost se v současnosti upřednostňuje využívání stabilních isotopů. (ZACHLEDER et al., 2018) V rámci diplomové práce byla podrobná rešerše tématu a byly shrnuté poznatky z asi padesáti článků vydaných v posledních letech, které se problematiky isotopického značení týkají. Studium isotopicky značených molekul v Ramanově mikroskopii živých buněk v současnosti můžeme nalézt v řadě publikací zabývajících se sledováním metabolismu buněk, tříděním buněk pomocí optické pinzety a sledováním interakce mezi buňkami.

Tato diplomová práce se zabývá sledováním metabolismu buněk, konkrétně biosyntézou deuteriem značených látek v buňkách pěstovaných v médiích s různým obsahem D₂O. Zkoumaným organismem byly jednobuněčné mořské řasy *Amphidinium carterae*. Tyto mikrořasy kvůli snadné kultivaci často využívají pro laboratorní výzkum jako modelový organismus. Taxonomicky je řadíme do oddělení zvané obrněnky (Dinoflagellata), tedy do superskupiny SAR (Stramenopila, Alveolata a Rhizaria). (BURKI et al., 2007) Pomocí Ramanovy mikroskopie studovali přítomnost a metabolickou dynamiku biomolekul jako jsou lipidy, škrob, karotenoidy, proteiny, ale zejména krystalického guaninu, který tyto řasy tvoří nebo akumulují z okolního prostředí. Právě identifikace a lokalizace krystalického guaninu pomocí různých zobrazovacích, chemických a extrakčních metod je mnohdy velmi obtížná a náchylná k mnoha artefaktům měření. Oproti tomu konfokální Ramanova mikroskopie umožňuje relativně rychlou, spolehlivou a přesnou (rozlišení v řádu mikrometrů) chemickou analýzu guaninu v kontextu ostatních biomolekul. (MOUDŘÍKOVÁ et al., 2017)

Diplomová práce je rozdělena na teoretickou část, experimentální část a výsledky měření a diskuzi. Teoretická část popisuje pojmy jako například Ramanův jev a Ramanova mikroskopie živých buněk. Zabývá se taky teoretickými základy matematických metod použitých pro zpracování měření, jako je nezáporná maticová faktorizace a faktorová analýza.

Experimentální část se zabývá přípravou studovaných vzorků, nastavením a popisem aparatury, pomocí které byly zkoumány živé buňky. Dále se zmiňuje o programech, které byly využity k vyhodnocování.

Ve výsledkové části a v diskuzi jsou uvedeny všechny změřené výsledky zobrazené v grafech, tabulkách a histogramech, nebo jsou výsledky slovně popsány a doprovázené komentářem a odpovídajícími diskusemi. Jednotlivé podkapitoly na sebe navazují v takovém pořadí, v jakém byly měřeny. Práce obsahuje popis přípravy médií pro kultivaci buněk, aby bylo možno experimenty zopakovat za stejných podmínek. Dále popisujeme podmínky kultivace, posloupnost přeočkování a sledování vývoje kultur v médiích s různým procentuálním zastoupením D₂O. Následně uvádíme metodologii použitou pro měření Ramanových spekter jednotlivých buněk a zjišťování jejich chemického složení. Následuje popis spektrální analýzy naměřených map s využitím funkce *True Component Analysis* v programu Project Five Plus (WITec), tvorby chemických map různých látek v buňce a sledování deuterace jednotlivých biomolekul v závislosti na různé době kultivace po přeočkování a v závislosti na médiích s různým obsahem D₂O, v kterých byly buňky kultivovány. Hlavním bodem práce pak byla analýza spekter krystalického guaninu biosyntetizovaného v buňkách a určení stupně deuterace. Bylo využito několika nástrojů ke zpracování spekter jako například faktorová analýza (Singular Value Decomposition). Pro určení stupně deuterace krystalického guaninu v buňkách byly připraveny syntetické krystaly guaninu s dobře definovaným stupněm deuterace a byly naměřeny jejich Ramanova spektra. Stupeň deuterace biosyntetizovaného guaninu byl určen fitováním na spektra těchto referencí. Kromě deuterace krystalického guaninu byla studována i deuterace dalších biomolekul, nicméně z časových důvodů a omezeními vyvolanými pandemií koronaviru nebylo možné tyto studie realizovat v původně zamýšleném rozsahu.

V závěru diplomové práce jsou shrnuté dosažené výsledky a nastíněny další možnosti studia této problematiky.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Molekula

Je známo, že určité typy kvarků vytvářejí elementární částice označované jako protony a neutrony. Ty dále společně s elektrony tvoří různé atomy. Pro ilustraci na obrázku 1.1.1. uvádíme periodickou soustavu prvků, která umožňuje seřadit atomy dle jejich atomového čísla (počtu protonů) a uspořádat jednotlivé prvky dle určitých společných chemických vlastností daných počtem elektronů a řídících se zákony kvantové mechaniky. I prvky se stejným počtem protonů (a elektronů) však mohou obsahovat různý počet neutronů a mají tudíž různé nukleonové číslo. Označujeme je jako isotopy. Některé isotopy jsou stabilní a počet jejich protonů a neutronů je v čase konstantní. Pokud podléhají radioaktivnímu rozpadu, jedná se o radioisotopy. Přestože se isotopy stejného prvku liší hmotností, jejich chemické vlastnosti jsou stejné.

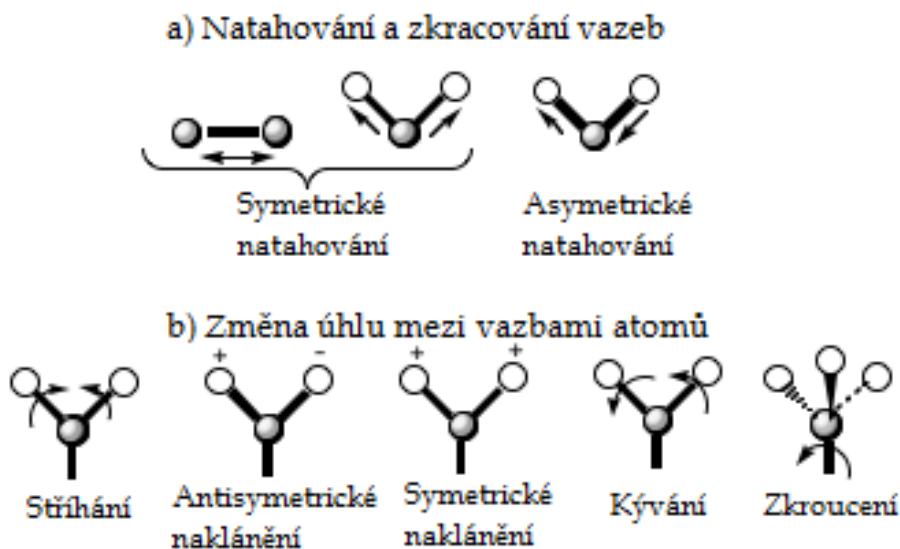
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
I A	II A	III B	IV B	V B	VI B	VII B	VIII	VIII	VIII	I B	II B	III A	IV A	V A	VI A	VII A	0		
Vodík 1 H 1,00794(7)																	Helium 2 He 4,002602(2)		
Lithium 3 Li 6,94(2)	Beryllium 4 Be 9,012182(3)																Neon 10 Ne 20,1797(6)		
Sodík 11 Na 22,989770(2)	Hořčík 12 Mg 24,3050(6)																Argon 18 Ar 39,948(1)		
Draslík 19 K 39,0983(1)	Vápník 20 Ca 40,078(4)	Skandium 21 Sc 44,955910(8)	Titan 22 Ti 47,867(1)	Vanad 23 V 50,9415(1)	Chrom 24 Cr 51,9961(6)	Mangan 25 Mn 54,938049(8)	Železo 26 Fe 55,845(2)	Kobalt 27 Co 58,933200(5)	Nikl 28 Ni 58,6934(2)	Měď 29 Cu 63,546(3)	Zinek 30 Zn 65,39(2)	Gallium 31 Ga 69,723(1)	Germanium 32 Ge 72,61(2)	Arzen 33 As 74,92160(2)	Selen 34 Se 78,96(3)	Brom 35 Br 79,904(1)	Krypton 36 Kr 83,80(1)		
Rubidium 37 Rb 85,4678(3)	Stroncium 38 Sr 87,62(1)	Yttrium 39 Y 88,90586(2)	Zirkonium 40 Zr 91,224(2)	Niob 41 Nb 92,90638(2)	Molybden 42 Mo 95,94(1)	Technecium 43 Tc (98,9063)	Ruthenium 44 Ru 101,07(2)	Rhodium 45 Rh 102,90550(2)	Palladium 46 Pd 106,42(1)	Stříbro 47 Ag 107,8682(2)	Kadmium 48 Cd 112,411(8)	Indium 49 In 114,818(3)	Cin 50 Sn 118,710(7)	Antimon 51 Sb 121,760(1)	Tellur 52 Te 127,60(3)	Jod 53 I 126,90447(3)	Xenon 54 Xe 131,29(2)		
Cesium 55 Cs 132,90545(2)	Baryum 56 Ba 137,327(7)	57-70 Lanthano- idny	Hafnium 72 Hf 178,49(2)	Tantal 73 Ta 180,9479(1)	Wolfram 74 W 183,84(1)	Rhenium 75 Re 186,207(1)	Osmium 76 Os 190,23(3)	Iridium 77 Ir 192,227(3)	Platina 78 Pt 195,078(2)	Zlato 79 Au 196,96656(2)	Rtuť 80 Hg 200,59(2)	Thalium 81 Tl 204,3833(2)	Olovo 82 Pb 207,2(1)	Bismut 83 Bi 208,98038(2)	Polonium 84 Po (209,9824)	Astát 85 At (209,9871)	Radon 86 Rn (222,0176)		
Francium 87 Fr (223,0197)	Rádium 88 Ra (226,0254)	89-102 Akti- no- idny	Rutherfordium 104 Rf (261,110)	Dubnium 105 Db (262,1144)	Seaborgium 106 Sg (263,1186)	Bohrium 107 Bh (264,12)	Hassium 108 Hs (265,1308)	Melcherium 109 Mt (268)	Ununilium 110 Uun (269)	Ununium 111 Uuu (272)	Ununbium 112 Uub (277)								
Lanthano- idny:	Lanthan 57 La 138,90549(2)	Cer 58 Ce 140,116(1)	Praseodym 59 Pr 140,90766(2)	Neodym 60 Nd 144,242(3)	Promethium 61 Pm (144,9127)	Samarium 62 Sm 150,36(3)	Europium 63 Eu 151,964(1)	Gadolium 64 Gd 157,25(3)	Terbium 65 Tb 158,92534(2)	Dysprosium 66 Dy 162,50(3)	Holmium 67 Ho 164,93032(2)	Erbium 68 Er 167,26(3)	Thulium 69 Tm 168,93421(2)	Ytterbium 70 Yb 173,04(3)	Lutecium 71 Lu 174,967(1)				
Aktino- idny:	Aktinium 89 Ac (227,0277)	Thorium 90 Th 232,0381(1)	Protaktinium 91 Pa 231,03588(2)	Uran 92 U 238,02891(1)	Neptunium 93 Np (237,0482)	Plutonium 94 Pu (244,0642)	Amerikium 95 Am (243,0614)	Curium 96 Cm (247,0703)	Berkelium 97 Bk (247,0703)	Kalifornium 98 Cf (251,0796)	Einsteinium 99 Es (252,0830)	Fermium 100 Fm (257,0861)	Mendelevium 101 Md (258,0884)	Nobelium 102 No (259,1011)	Lavrencium 103 Lr (262,110)				

Obrázek 1.1.1. – Periodická tabulka prvků

Atomy se mohou dále spojovat vazbami mezi sebou a vytvářet molekuly. Vazby mezi atomy nejsou rigidní (neměnné), ale podléhají změnám délky nebo úhlů

mezi nimi. Atomy v molekule tedy vykonávají vibrační pohyby. Kromě toho molekula jako celek může rotovat nebo se v prostoru lineárně pohybovat. Protože na translační pohyb nelineární molekuly připadají tři stupně volnosti a na rotační pohyb taky tři stupně volnosti, pro vibrační pohyby nelineární molekuly sestávající z N atomů zbývá $3N-6$ stupňů volnosti. U lineárních molekul je to $3N-5$ vnitřních stupňů volnosti (vibračních módů) z důvodů menšího počtu rotačních stupňů volnosti. (SCHRADER, 1995)

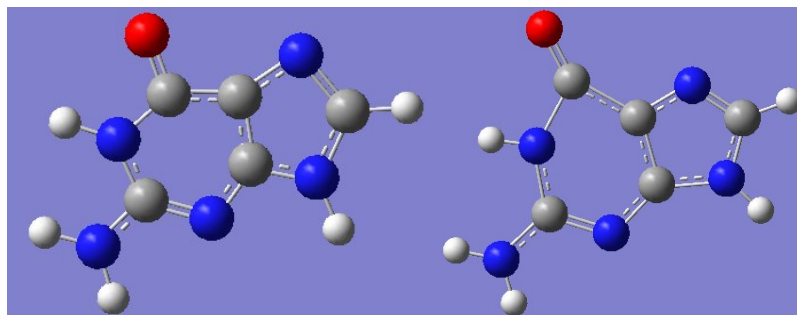
Vibrační módy v molekulách dělíme na dva základní typy, a to zaprvé na zkracování a natahování vazeb (valenční vibrace, anglicky stretching vibrations) a zadruhé na změny úhlu mezi vazbami atomů (deformační vibrace, anglicky deformation vibrations). Na obrázku 1.1.2. máme typy vibrací vazeb znázorněné. Vidíme, že můžeme mít symetrické nebo antisymetrické natahování a zkracování vazeb nebo že existují různé typy deformačních vibrací, kterých je většinou obecně podstatně více než valenčních vibrací. (PROCHÁZKA, 2016)



Obrázek 1.1.2. – Vibrační módy v molekulách (BURA, 2020)

Jednoduchá schémata vibrací atomů jsou názorná, ale neodpovídají situaci ve složitějších molekulách. Ve skutečnosti jsou jednotlivé vibrace komplexní a vzájemně propojené, kdy se na vibračním pohybu o určité frekvenci podílejí všechny atomy tvořící molekulu. Takto existuje například tzv. dýchací vibrace, kterou můžeme pozorovat u všech molekul obsahujících benzenové jádro, například i u molekuly guaninu. Na obrázku 1.1.3. jsou znázorněná dvě extrémní uspořádání atomů guaninu,

mezi kterými se při dýchací vibraci přechodem přes rovnovážnou polohou pohybují jednotlivé atomy.



Obrázek 1.1.3. – Změny uspořádání atomů při dýchací vibraci guaninu

Zatím jsme si molekulu představovali z velké části klasicky. Molekula je ale kvantově-relativistický objekt, který se popisuje pomocí vlnové funkce a Diracovy rovnice. (DIRAC et al., 1928) Kvůli neřešitelnosti této rovnice i pro malé molekuly se používá známější nerelativistická stacionární Schrödingerova rovnice:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (1)$$

Používají se i další aproximace, které se snaží obtížnost jejího přesného řešení nějakým způsobem obejít. (ELEUCH et al., 2018) Stručně si popíšme nejznámější aproximaci v kvantové teorii molekul, a to tzv. Born-Oppenheimerovu aproximaci, na které stojí spousta speciálních metod kvantové chemie. Atomová jádra jsou totiž 1836krát těžší než elektrony, a tedy na molekulu můžeme nahlížet jako na těžká a pomalá jádra, kolem kterých obíhají velkými rychlostmi lehké elektrony. Můžeme tedy vlnovou funkci separovat na elektronovou část $u_{R_j}(r_i)$, ve které vystupují polohy jader jakožto pevné parametry, a vlnovou funkci jader $v(R_j)$. (GERBER, 1969)

$$\psi_i = u_{R_j}(r_i)v(R_j) \quad (2)$$

Následně pak můžeme řešit zvlášť rovnici pro elektronovou část vlnové funkce a vypočítat jí patřící hyperplochu potenciální energie v závislosti na poloze jader. Měli bychom zmínit, jak elektronovou část vlnové funkce můžeme popsat. Často se popisuje pomocí molekulových orbitalů (MO). V kvantové chemii se MO optimalizují pomocí metody lineární kombinace atomových orbitalů (AO), tzv. metodou MO-LCAO, kdy jednotlivé molekulové orbitály se vytváří jako lineární kombinace atomových orbitalů lokalizovaných na jednotlivých jádrech. (MULLIKEN, 1927)

$$\psi_i = \sum_{\mu} c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (3)$$

Báze atomových orbitalů na daném jádře je obecně nekonečná, a proto se počítá pouze s dostatečnou množinou bázevých funkcí, které lze vyjádřit jako součin reálné kulové funkce a radiální části. Radiální část můžeme popisovat například pomocí Slaterových funkcí (STO) nebo pro svou lepší výpočetní rychlost jejich aproximací. Aproximaci Slaterových funkcí můžeme provést pomocí lineární kombinace K Gaussovských funkcí (STO-KG), přičemž je nutné zmínit, že existují přesnější popisy lépe popisující radiální část vlnové funkce. Kvůli rychlému poklesu Slaterových funkcí a jejich aproximací ve tvaru lineární kombinace Gaussovských funkcí se mohou tyto funkce doplnit o polarizační funkci. Obecně se zabývá záležitostmi bázevých funkcí kvantová chemie. (SKÁLA, 1995)

Například právě pomocí metody MO-LCAO můžeme vypočítat hyperplochu potenciální energie v závislosti na poloze jader a pro vlnovou funkci jader pak můžeme vypočítat celkovou energii molekuly. Z Hamiltonova variačního principu víme, že molekula se snaží nabývat minima energie. Proto polohy jader nemohou být libovolně rozmístěné v prostoru a například molekula guaninu je planární. Popišme si ještě stručně rovnici pro jadernou část vlnové funkce. Vzhledem k složitosti úlohy se potenciál mezi jednotlivými atomy jader dále aproximuje pomocí tzv. Morseho potenciálu nebo harmonického potenciálu, přičemž harmonický potenciál se používá vždy pro molekulu s více než dvaceti atomy. (SZABO et al., 1996) Nakonec pak můžeme pomocí výpočetní techniky a různých programů jako například Gaussian vypočítat frekvence patřící různým vibračním módům molekuly. Například u zmíněného guaninu má ilustrovaná dýchací vibrace frekvenci 638 cm^{-1} shodnou s experimentem. Pro více informací odkazujeme čtenáře na zápočtový projekt v příloze A, který byl vedený pod dohledem doktora Profanta a tvořil teoretickou přípravu na diplomovou práci.

Vibrační módy nejsou lokalizované pouze na dvou konkrétních atomech, ale podílí se na nich všechny atomy molekuly. Z tohoto důvodu se přechází k tzv. nezávislým normálním módům molekuly, kdy se daného vibračního pohybu o určité frekvenci účastní všechny atomy molekuly, jak tomu bylo například u již zmíněné dýchací vibrace guaninu. Po separaci proměnných (oddělíme translační pohyb těžiště a rotační část, přičemž zanedbáváme interakci mezi rotačními a vibračními stavy) hamiltonián popisující pouze vibrace můžeme pro nelineární molekuly zapsat jako $3N-6$ ($3N-5$ pro lineární molekuly)

stacionárních Schrödingerových rovnic, které můžeme řešit přímo v harmonické aproximaci v analogii s rovnicemi pro lineární harmonické oscilátory pomocí Hermitových polynomů. Pro přesný popis, jak se frekvence normálních módů v molekule počítají například v harmonické aproximaci v programu Gaussian, odkazujeme čtenáře na internetové stránky tohoto výpočetního programu. (FRISCH et al., 2016)

Pro snazší pochopení čtenáři nastíníme, že frekvence vibrace ν pro dvou atomovou molekulu o redukované hmotnosti μ je rovna

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\partial^2 V}{\partial r^2} \frac{1}{\mu}} \quad (4)$$

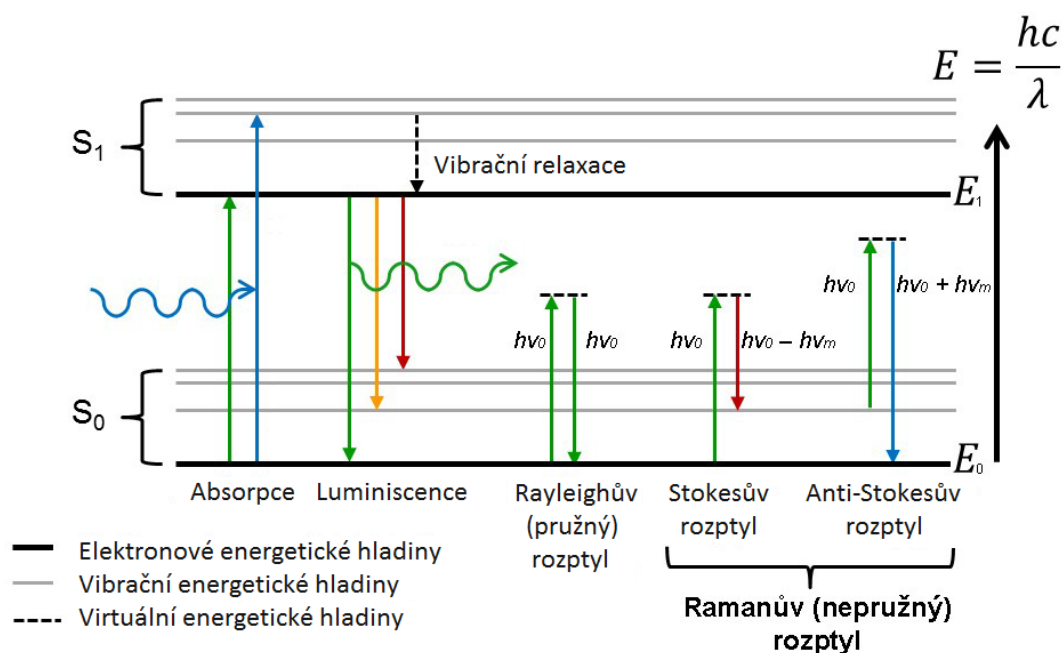
kde V je celková potenciální energie (v níž je zahrnuta hyperplocha potenciální energie vypočtená z rovnice pro elektronovou část vlnové funkce a elektrostatická potenciální energie jader, případně i vnější pole), která se mění v závislosti na vzájemné poloze jader r . Pro více atomové molekuly dostaneme v podstatě podobný vztah pro frekvence vibrace. Důležitou informací je, že frekvence této vibrace závisí nepřímo úměrně na odmocnině z redukované hmotnosti. Pro dvouatomovou molekulu je redukovaná hmotnost dána vztahem:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (5)$$

kde ve vztahu vystupují hmotnosti jednotlivých jader. Uvažme situaci, kdy jedno jádro (například vodíkové) nahradíme těžším isotopem (deuteriem). Následně se pak redukovaná hmotnost zvýší a frekvence vibrace sníží. Toto snížení frekvence vibrace je dle vztahu (5) největší pro zmíněnou záměnu vodíku za deuterium, u ostatních isotopů (například u dusíku, uhlíku nebo selenu) je snížení frekvence vibrace menší. Právě této vlastnosti využijeme při studiu isotopicky značených látek v Ramanově mikroskopii živých buněk, kdy jednotlivé signály pocházející z daného normálního módu, budeme detekovat v jiné spektrální oblasti vibračního, konkrétně Ramanova spektra.

1.2. Interakce elektromagnetického záření s hmotou

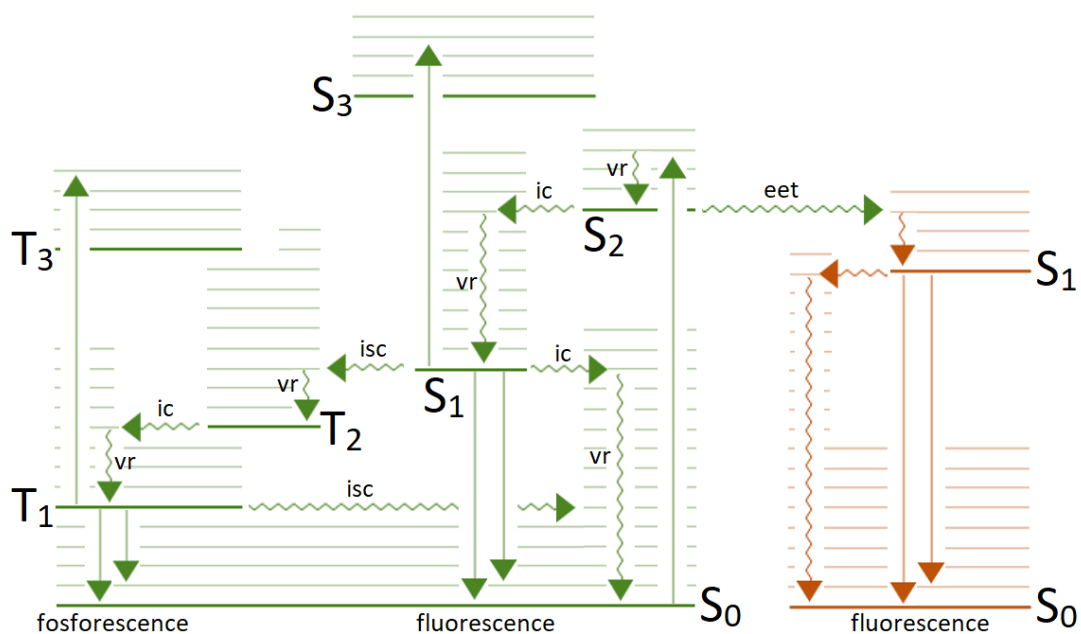
Uvažme, že elektromagnetické záření interaguje s hmotou za standardní teploty a tlaku. Tento děj může zahrnovat několik procesů, a to absorpci, luminiscenci, difrakci, lom, dvojlom, disperzi, fotoelektrický jev, fotochemické reakce, odraz, pružný rozptyl, nepružný rozptyl. Může docházet i k dalším složitějším jevům, jakým je například vznik signálu po interakci tří za sebou přicházejících pulzů využívaný ve dvoudimenzionální elektronové spektroskopii. (ALSTER et al., 2014) Zde se zaměříme pouze na základní procesy zahrnující interakci kontinuálního optického záření s hmotou. Tyto procesy můžeme rozdělit podle toho, za jaký časový interval se odehrají. Například luminiscence po interakci s fotonem se odehrává na časových škálách delších než pikosekundy. Oproti tomu absorpce, difrakce, lom, odraz, rozptyl jsou okamžité procesy trvající méně než jednu femtosekundu. Na obrázku 1.2.1. máme znázorněný tzv. Jablonského diagram kvantových energetických přechodů při interakci fotonů s molekulami, na kterém se dobře vysvětlují rozdíly mezi jednotlivými procesy. (WENDELL T. HILL, 2006)



Obrázek 1.2.1. - Jablonského diagram kvantových energetických přechodů při interakci fotonů s molekulami (SUJA, 2018)

Většina molekul je v základním stavu singletní (oproti například molekule kyslíku, která je v základním stavu tripletní), a tedy můžeme si představit, že na

obrázku 1.2.1. máme základní stav molekuly a její první excitovaný singletní stav (celkový spin molekuly S je nula, multiplicita dle definice rovna $2S+1$ je tedy jedna, jedná se o singlet). Energetické vzdálenosti sousedních elektronových hladin jsou řádově tisíc krát větší než vzdálenosti vibračních hladin. U luminiscence vidíme, že došlo ke ztrátě energie vyzářeného fotonu v důsledku vibrační relaxace. Následně tedy energie vyzářeného fotonu je menší než energie původního fotonu a tento proces trvá delší dobu než rozptyl. Na obrázku 1.2.1. také vidíme, že oba tyto procesy jsou dvou fotonové. Rozptyl si na tomto diagramu můžeme představit jako interakci s virtuálním (nereálným) energetickým stavem molekuly a můžeme ho dělit na pružný (energie fotonů zůstává stejná) a nepružný (energie přicházejícího fotonu je různá od energie emitovaného fotonu). Na obrázku 1.2.2. máme znázorněny procesy, jakými jsou přenos excitační energie, vibrační relaxace, mezi systémový přechod a vibrační konverze. K těmto procesům může docházet po excitaci zářením.

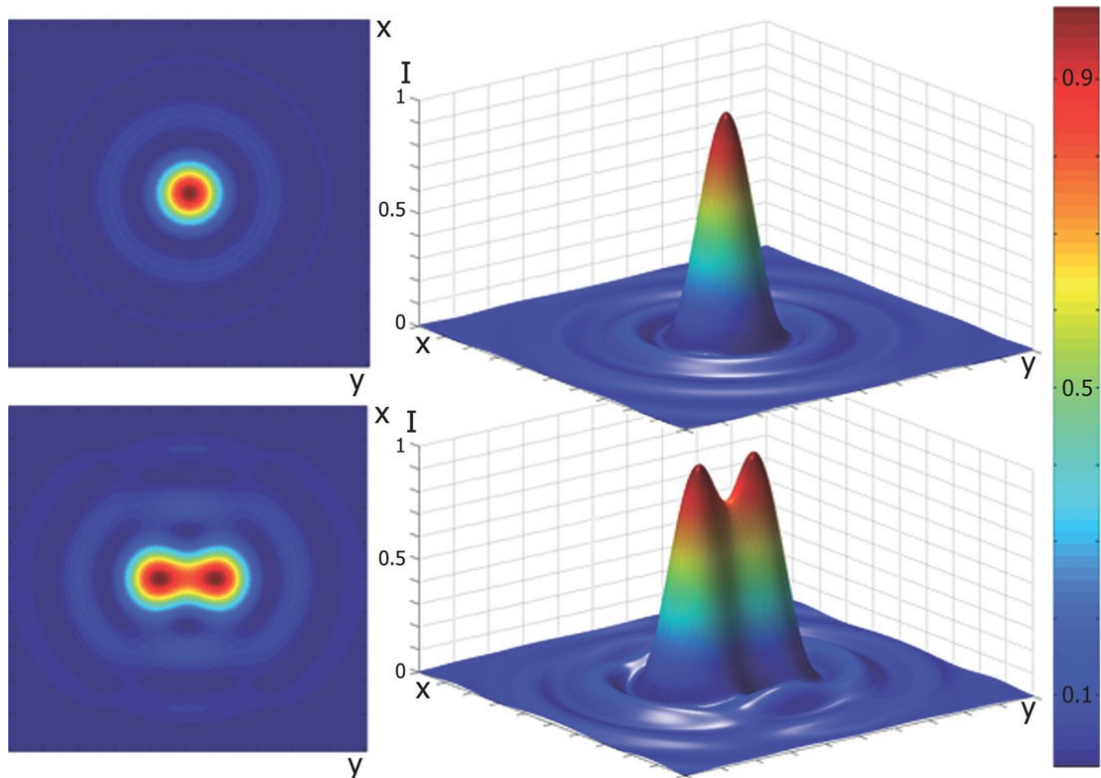


Obrázek 1.2.2. – Schéma elektronových tripletních (T_i) a singletních (S_i) stavů molekuly a přechodů mezi nimi u fluorescence a fosforescence (Jablonského diagram): vr – vibrační relaxace, isc – mezi systémový přechod, eet – přenos excitační energie, ic – vnitřní konverze

Jedná se o druhý Jablonského diagram, v kterém máme znázorněné singletní a tripletní stavy jedné molekuly (zeleně) a dva další singletní stavy jiné molekuly

(oranžově). Vlnkované šipky značí nezářivé přechody v molekulách a rovné svislé šipky značí zářivé přechody. Tmavé vodorovné plné čáry jsou opět elektronové energetické hladiny a světlé vodorovné plné čáry jsou vibrační energetické hladiny. Máme zde naznačené dva typy luminiscence, a to fluorescenci a fosforescenci. Fluorescence probíhá rychleji než fosforescence, jak si můžeme i povšimnout ze schématu a plyne také ze spinových výběrových pravidel. K tomuto schématu je třeba dodat, že fluorescenci bychom si neměli plést se zpožděnou fluorescencí. Při ní excitovaný elektron přejde ze singletního stavu do metastabilního tripletního stavu a potom zpět do téhož singletního stavu, odkud dochází k emisi záření, která má stejnou energii jako fluorescence, ale dochází k ní později.

V jednoduchosti jsme si zatím popsali všechny základní procesy až na lom, dvojlom, disperzi, difrakci, fotoelektrický jev a fotochemické reakce. Tyto procesy se nedají jednoduše popsat pomocí Jablonského diagramu. Tyto jevy si popíšeme alespoň slovně, abychom pochopili všechny základní způsoby interakce elektromagnetického záření z kontinuálního zdroje s hmotou (při měření za standardní teploty a tlaku). Při lomu dochází ke změně směru elektromagnetického záření na rozhraní dvou různých prostředí, konkrétně lišících se indexem lomu. Dvojlom je jev, při kterém závisí index úhlu na polarizaci a směru šíření světla a setkáváme se s ním jen u některých materiálů. Difrakce je ohyb světla za překážkami. Můžeme ji popsat pomocí tzv. Kirchhoff-Fresnelova integrálu, přičemž jde dále zjednodušit ve dvou důležitých aproximacích: Fraunhoferově a Fresnelově. Právě ve Fraunhoferově aproximaci jsme schopni zjistit, jak bude interagovat optické záření na mřížce (řadě štěrbin). Pomocí mřížky lze prostorově oddělit optické záření dle vlnové délky ve spektrografu a následně detekovat jeho spektrum. Dále můžeme vysvětlit pomocí difrakce rozbíhavost laserových svazků nebo ovlivnění kvality zobrazení při průchodu záření optickými elementy, tzv. difrakční limit. Zmíněný difrakční limit určuje právě rozlišovací schopnost optického mikroskopu, což souvisí z rozlišovací schopností Ramanovy mikroskopie. Bodové objekty se na stínítku nezobrazují jako body, ale jako Airyho disky, viz obrázek 1.2.3. Je třeba dodat, že pokud je zdroj záření koherentní, dochází navíc k interferenci záření. U laserů a výbojek to často platí. (MALÝ, 2013)

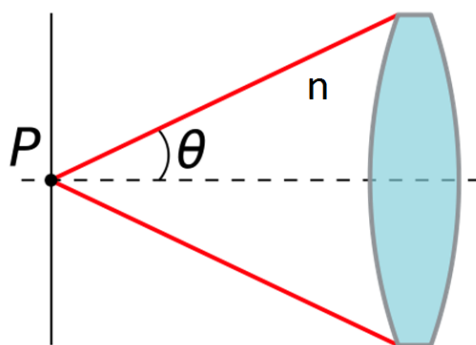


Obrázek 1.2.3. – Velikost intenzity Airyho disků v rovině xy : v horní části pro jeden bodový objekt a v dolní části pro dva bodové objekty (CREMER *et al.*, 2011)

Velikost poloměrů Airyho disků (vzdálenost mezi maximem intenzity Airyho disku a jeho prvním minimem v rovině stínítka xy) se zvětšuje se zmenšující se numerickou aperturou NA a rostoucí vlnovou délkou světla λ dle vztahu

$$r_{lateral} = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad (6)$$

přičemž numerická apertura je dána součinem indexu lomu prostředí před objektivem n a sinem poloviny rovinného sbíraného úhlu objektivu $\sin(\theta)$. Názorně máme tyto veličiny na obrázku 1.2.4. Reálně máme objektivy složené z množství čoček a NA je dána nejužším místem, kterým paprsky mohou efektivně projít dál. (GRAY, 2009)



Obrázek 1.2.4. – Numerická apertura

K podobnému omezení rozlišení dochází ještě více v rovině kolmé na rovinu stínítka, a to dle vztahu

$$r_{axial} = \frac{1,4n\lambda}{NA^2} \quad (7)$$

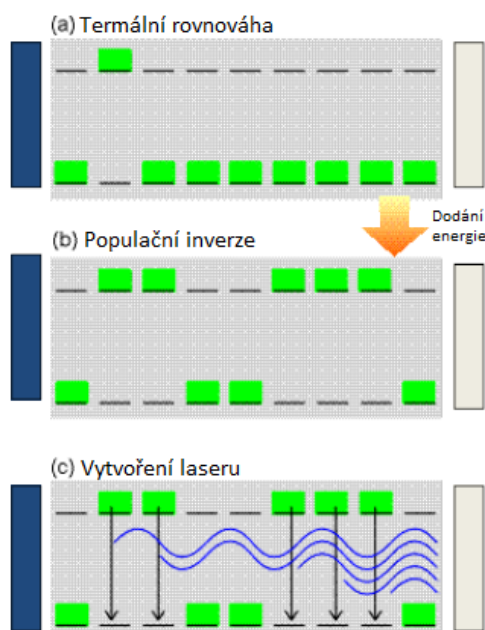
Z těchto vztahů tedy plyne, že celkově sbíráme záření z elipsoidu, tzv. funkce bodové odezvy. Popisuje tvar, do nějž se v zobrazovací soustavě vykreslí bodový zdroj světla. Proto je snaha tento elipsoid udělat co nejmenší pomocí různých metod. (COLE et al., 2011) Můžeme zmínit například konfokální mikroskopii, o které bude ještě zmínka, nebo mikroskopii se strukturovaným osvětlením, která využívá počítačového zpracování série *moiré* obrazů (překrytí dvou strukturovaných vzorů, a to mřížky pod různým natočením a vzorku). (HEINTZMANN et al., 2017) I přesto díky difrakčnímu omezení nedokážeme v Ramanově mikroskopii živých buněk rozlišit objekty menší než přibližně 200 nm, aniž bychom nedegradovali měřené buňky a nevložili do buněk cizorodé značky a sondy. Je třeba dodat, že sice pomocí různých zobrazovacích soustav můžeme vzorek zvětšit na libovolné zvětšení, ale dostaneme tzv. prázdné zvětšení bez nových detailů omezené právě difrakčním limitem. Celkové užitečné zvětšení mikroskopu je menší než dva tisíce. (DEROSE et al., 2018)

Dalším jevem interakce optického záření s hmotou je disperze. Tento jev, lze využít společně s lomem například při spektrálním rozkladu pomocí optického hranolu. Při disperzi totiž dochází k změně fázové rychlosti elektromagnetického záření, tedy k změně indexu lomu, v závislosti na jeho frekvenci. Vzhledem k velkému spektrálnímu rozsahu, nízké intenzitě bludného světla (vzniklé záměrně nezamyšlené světlo v optickém systému) se optický hranol často využívá k prostorovému rozdělení spektra a k následné analýze signálu. Při spektrálním rozkladu hranolem také

nedochází k polarizaci světla a nevznikají jiné vyšší řády jako při spektrálním rozkladu mřížkou. Nevýhodou je nižší spektrální rozlišení a nízká závislost indexu lomu na vlnové délce pro viditelné a infračervené světlo než například pro mřížku. Optické hranoly se pro spektrální rozklad Ramanových spekter v minulosti používaly, ale v současnosti je plně nahradily disperzní mřížky. (GOMES DA COSTA et al., 2019)

Předposledním jevem, který jsme zmínili, je fotoelektrický jev, který připomeneme pouze proto, že je fyzikálním základem detektorů optického záření, které se v Ramanově mikroskopii používají. Při absorpci fotonu dochází k emisi elektronu z elektronového obalu. Volné elektrony je pak možno detekovat jako elektrický proud, co umožňuje kvantitativní spektrální detekci. Vnější a vnitřní fotoefekt je základem detekce signálu pomocí fotonásobičů, lavinových, křemíkových a InGaAs diod a detektorů CCD (Charge Coupled Device) nebo CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). V případě Ramanovy mikroskopie je nejčastějším detektorem křemíkový CCD, který umožňuje rychlou mnohokanálovou detekci. Fyzikální omezení vnitřního fotoelektrického jevu v křemíku způsobuje, že CCD detektory není možno použít pro excitace nad cca 850 nm. (WORSFOLD et al., 2005)

Popišme si ještě pojmy spontánní a stimulovaná emise, které souvisí s fungováním laserů, které se v současnosti používají jako zdroje světla pro Ramanovou spektroskopii. Stimulovaná emise vzniká při ozáření atomů (iontů, molekul) v excitovaném elektronovém stavu elektromagnetickou vlnou reprezentovanou jinými fotony, vlivem které excitované atomy přejdou do nižšího elektronového stavu, přičemž emitují fotony se stejnými vlastnostmi (vlnová délka, směr, fáze), jaké měl působící foton. Naproti tomu u spontánní emise dochází k emisi fotonů bez stimulace zářením, tudíž v různých směrech a s různými vlastnostmi. Na principu stimulované emise pracují lasery, s kterými v Ramanově mikroskopii pracujeme. (PROSSER, 1989) Funkce laseru je popsána na obrázku 1.2.5.



Obrázek 1.2.5. – Princip fungování laseru

Kromě aktivního prostředí, ve kterém dochází k stimulované emisi, k vytvoření laseru potřebujeme rezonátor. V jednoduchosti se jedná o dvě paralelní zrcadla, z nichž jedno má téměř 100 % odrazivost a druhé o něco nižší (například 95 %). Mezi zrcadly je dutina, ve které je aktivní prostředí. To se skládá z atomů, iontů, molekul, polovodiče nebo pevné látky s vhodnými energetickými hladinami. Nejprve dojde k excitaci elektronů pomocí vhodného zdroje vnější energie. Zdrojem může být například výbojka, elektrický proud nebo chemická reakce. Následně dojde k porušení termální rovnováhy mezi základním a excitovaným stavem a populační inverzi. Spontánně emitovaný první foton vyvolá lavinovitě stimulovanou emisi dalších fotonů, které jsou díky rezonátoru a ním udržované stimulované emisi ve fázi. Navíc v rezonátoru dochází k interferenci záření, v důsledku kterého vzniká stojaté vlnění mezi zrcadly. Toto stojaté vlnění vytváří diskrétní set frekvencí, které mohou v rezonátoru existovat, tzv. podélné módy. Vztah mezi možnými vlnovými délkami λ_N a délkou rezonátoru L je pak

$$\lambda_N = \frac{2L}{N} \quad (8)$$

kde N je kladné celé číslo. Důležitými vlastnostmi laseru jsou rovnoběžnost, monochromaticnost a koherence emitovaného záření. Je třeba dodat, že existují taky lasery, které nejsou monochromatické (například titan-safírový). (RENK, 2017)

Popišme si poslední nezmíněný jev, ke kterému dochází při interakci optického záření s hmotou, a tedy molekulami v nich, a o kterém je v souvislosti s Ramanovou spektroskopií dobré vědět už vzhledem k tomu, že pro excitaci Ramanových spekter se používají relativně vysoké intenzity záření. Tento jev jsme taky využívali pro eliminaci autofluorescence chlorofylu mikrořas, která je pro Ramanovou mikroskopii fotosyntetických mikroorganismů zásadním problémem. Uvažme, že molekula nebo část molekuly je excitována do vyššího elektronového stavu díky absorpci optického záření. Následně tato molekula nebo její část může být chemicky reaktivnější. Může buď reagovat s jinými molekulami adicí (zánik násobné π vazby a vznik σ vazby), eliminací (opak adice) nebo substitucí (poruší se vazba na jednom atomu a na témže atomu dojde k vytvoření nové vazby, přičemž nedochází ke změně počtu σ ani π vazeb), anebo může dojít k její isomerizaci (změně prostorového uspořádání molekuly, přičemž sumární vzorec molekuly zůstane stejný). Mluvíme o fotochemických reakcích. Isomerizace se například děje u pigmentu retinalu nacházející se v buňkách v sítnici, a to v tyčinkách a čípcích. Pro živé buňky je nežádoucí fotochemickou reakcí například vznik velkého množství singletního kyslíku a jeho reakce s biomolekulami. Společně s dalšími reaktivními formami kyslíku ROS (Reactive Oxygen Species; například hydroxylové radikály, superoxid molekuly kyslíku) poškozují DNA (deoxyribonukleové kyseliny) a RNA (ribonukleové kyseliny), oxidují polynenasycené mastné kyseliny, aminokyseliny nebo deaktivují některé enzymy kvůli oxidaci kofaktorů. Na druhou stranu, fotooxidaci prostřednictvím ROS generovaných fotosyntetickým aparátem mikrořas jsme s výhodou používali pro eliminaci nežádoucí autofluorescence. (YANG et al., 2019)

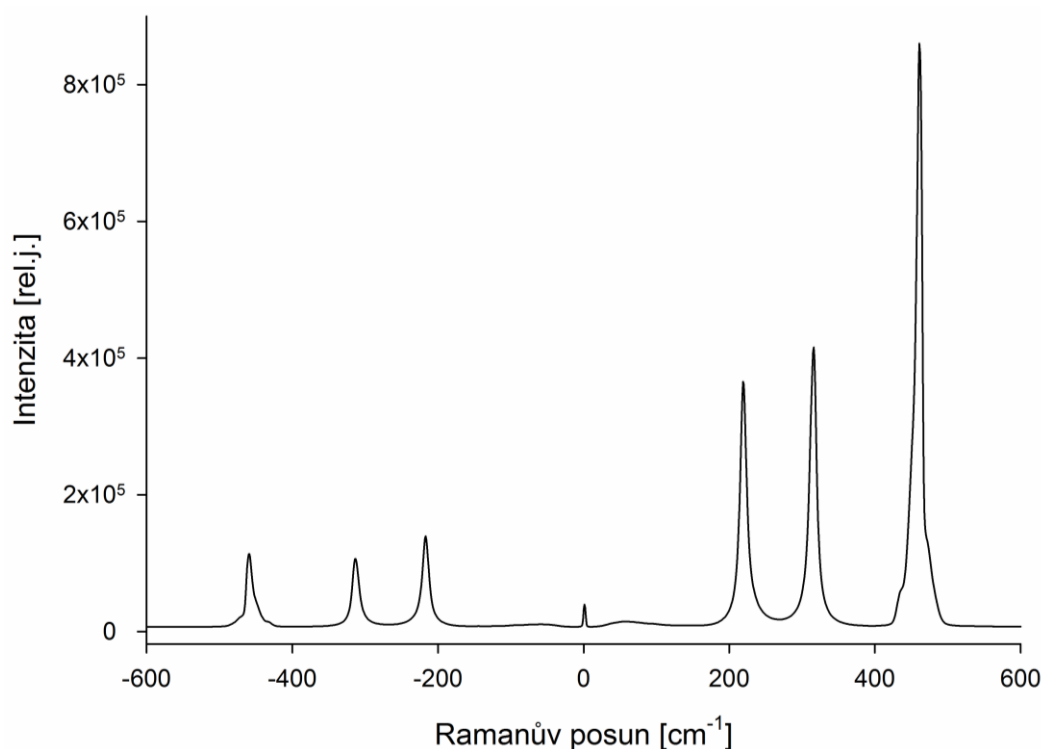
K poškození živých buněk optickým zářením může docházet i jinými způsoby než například kvůli singletnímu kyslíku. (COWAN, 1976) Detailní popis těchto způsobů interakce je ale nad rámec problematiky diplomové práce a postačí nám vědět, že je nežádoucí buňky poškodit, popřípadě i narušit jejich přirozenou fyziologickou funkci. Pokud totiž chceme studovat metabolismus individuálních živých buněk v rámci nějakého časového intervalu, je nutné nenarušit jejich fyziologickou funkci. Často ale stačí vybrat několik náhodných živých buněk z kultury v různých časových intervalech, abychom jsme si vytvořili představu o jejich stavu. Obecnou snahou je tedy zvolit vhodný výkon laseru tak, aby v excitačním objemu vzorku nedocházelo k biodegradaci a zároveň jsme pozorovali dostatečný signál, který je v Ramanově mikroskopii obecně velmi nízký.

Ve shrnutí všechny zmíněné optické procesy budou probíhat více nebo méně dle vlastností studovaného objektu a vlastností okolního prostředí. Tyto vlastnosti se dají snadno popsat pomocí fyzikálních a chemických veličin, které pro dané látky známe z různých databází. Vlastnostmi studovaného objektu a prostředí mohou být například objem, složení vzorku, koncentrace molekul ve vzorku, vodivost, pH roztoků, aj. Kromě toho je dobré znát vlastnosti jednotlivých molekul ve vzorku (například kvantový výtěžek fluorescence, doby života stavů), popřípadě i vliv okolního prostředí (matrice) na dané vlastnosti a možné interakce mezi molekulami. Příkladem může být změna Ramanova spektra při vzniku vodíkových můstků s molekulou. Kromě toho například z molekuly guaninu může vzniknout guanosin, který má také mírně odlišné Ramanovo spektrum, viz příloha A.

1.3. Ramanův jev

Základem Ramanovy mikroskopie je Ramanův rozptyl, proto se mu budeme věnovat podrobněji. V tomto oddíle nás bude zajímat zejména nepružný rozptyl fotonů na molekulách, tzv. Ramanův jev. K tomuto jevu dochází, když fotony (elektromagnetické záření) interagují s vibrujícími molekulami a po interakci získají nebo ztratí energii na daných vibračních módech molekul. Teoretickým vysvětlením tohoto jevu se ve 20. letech 20. století zabýval rakouský fyzik Adolf Smekal, který tento jev vysvětlil v rámci představ klasické fyziky jako frekvenční modulaci emitovaného záření oscilujícím dipólem, tj. molekulou, ovlivněným vibračním pohybem jader. (SMEKAL, 1923) Zájem o praktické využití začal až po experimentálním objevu Ramanova jevu v roce 1928 indickým fyzikem Chandrasekharou Venkatou Ramanem, po jehož jménu se tento jev jmenuje a který za svůj objev obdržel v roce 1930 Nobelovou cenu za fyziku. Hlavní informace je schovaná ve změně frekvence záření, tzv. (Stokesův nebo Anti-Stokesův) Ramanův posun, což je rozdíl mezi vlnočty záření přicházejícího a emitovaného fotonu, a v intenzitě emitovaného záření. Běžně tedy najdeme v článkách grafy s intenzitou Ramanova signálu závislé na Ramanově posunu (udávaného v převrácených centimetrech) nazývané Ramanova spektra. (FERRARO, 2002) Vibrační pohyby jednotlivých molekul mají nahodilý fázový posun vůči kmitům působícího optického záření. Na rozdíl od emise na neposunuté frekvenci (tj. elastického Rayleighova

rozptylu) nejsou vlny Ramanova rozptylu od jednotlivých molekul vzájemně koherentní. To znamená, že celková intenzita Ramanova rozptylu ze souboru molekul je prostým součtem intenzit Ramanova rozptylu od jednotlivých molekul (neuplatňuje se interference). Ramanův signál tedy závisí lineárně na koncentraci molekul v daném excitačním objemu vzorku, což umožňuje kvantifikovat koncentrace. Dosud bychom si vystačili se Smekalovým popisem Ramanova jevu, u kterého má Stokesova a Anti-Stokesova část Ramanova rozptylu stejnou intenzitu. Experiment však ukazuje, že Stokesův Ramanův rozptyl je zpravidla výrazně intenzivnější než Anti-Stokesův rozptyl. (SMITH E., 2005) Relativní rozdíl v intenzitách narůstá s rostoucím Ramanovým posunem, jak je to ilustrováno na Ramanově spektru tetrachlormethanu na obrázku 1.3.1.



Obrázek 1.3.1. – Ramanova spektrum tetrachlormethanu v oblasti Stokesova i Anti-Stokesova rozptylu (Rayleighův rozptyl je potlačen filtrem)

Pro přesnější popis Ramanova rozptylu proto budeme potřebovat alespoň semiklasické přiblížení, v němž se kombinuje klasický pohled na působící elektromagnetické záření a kvantový pohled na molekulu. Jak v klasickém, tak v kvantově-mechanickém popisu jsou zdrojem rozptýleného záření oscilující elektrické a magnetické multipólové momenty indukované v molekule vnějším elektromagnetickým polem. Vnější elektromagnetické pole působí na molekulu

prostřednictvím obou svých složek, a to elektrickou intenzitou a magnetickou indukcí. Na molekulu má ale největší vliv elektrická intenzita, která působí na elektrický náboj jader a elektronů. Tudíž pro popis rozptylu je nejdůležitějším multipólem oscilující elektrický dipól jako zdroj sekundárních vln. Další příspěvky jako magnetický dipól nebo elektrický kvadrupól mají o několik řádu menší velikost ve srovnání s oscilujícím elektrickým dipólem. Proto se většinou omezujeme pouze na oscilující indukovaný elektrický dipól jako zdroj rozptýleného záření. Následně s použitím Born-Oppenheimerovy aproximace, časové poruchové teorie druhého řádu a přiblížení dlouhých vln (dipólová aproximace) se dá odvodit vztah pro spektrální hustotu zářivosti odpovídající danému Ramanovu přechodu mezi dvěma stacionárními stavy 1 a 2 (CAREY, 1982), (SZYMANSKI, 1967)

$$L_{12}^R(\nu, \vec{e}^0, \vec{e}^R) \approx \left\{ \sum_{i,j}^3 e_i^0 (\alpha_{12}^R)_{ij} e_j^R \right\}^2 C p_1 F_{12}^R (\nu_{12}^R)^4 I_0 \quad (9)$$

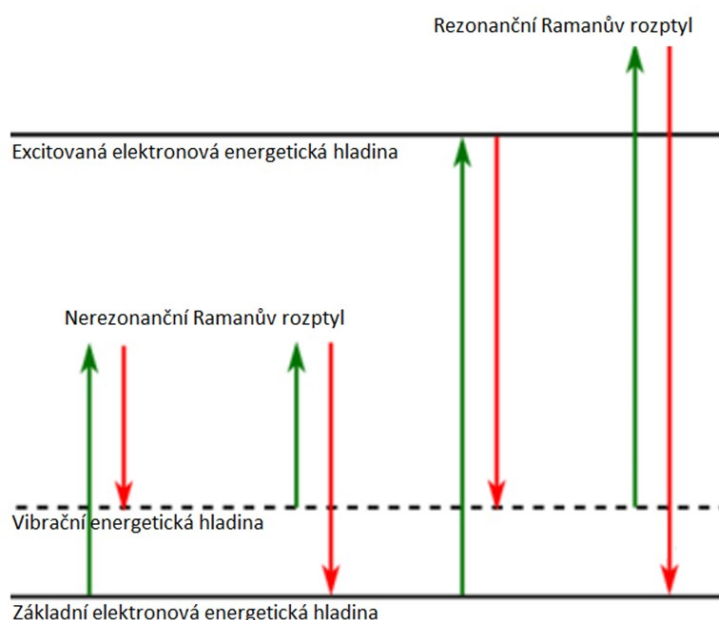
Spektrální hustota zářivosti je tedy úměrná molární koncentraci molekul v daném excitačním objemu C , pravděpodobnosti obsazení výchozího stacionárního stavu p_1 (která je dána teplotou), spektrálnímu tvaru čáry s maximem na frekvenci odpovídající Ramanovsky rozptýlenému záření F_{12}^R , intenzitě excitačního záření I_0 a čtvrté mocnině vlnočtu Ramanovsky rozptýleného záření $(\nu_{12}^R)^4$. Dále v ní vystupuje druhá mocnina projekce tzv. Ramanova přechodu α_{12}^R do polarizačních směrů excitačního \vec{e}^0 a rozptýleného záření \vec{e}^R vystředované přes všechny možné orientace molekul. V právě již zmíněných aproximacích lze odvodit pro složky Ramanova tenzoru následující vztah (CAREY, 1982)

$$(\alpha_{12}^R)_{ij} = \sum_{s \neq 1,2} \left[\frac{\langle 2 | \hat{d}_i | s \rangle \langle s | \hat{d}_j | 1 \rangle}{E_1 - E_s + E_0} + \frac{\langle 2 | \hat{d}_j | s \rangle \langle s | \hat{d}_i | 1 \rangle}{E_2 - E_s - E_0} \right] \quad (10)$$

Ramanův tenzor je molekulární veličina, která charakterizuje schopnost molekuly vyvolat Ramanův rozptyl excitačního záření. Vztahuje se ke konkrétnímu vibračnímu přechodu, tj. přechodu mezi vibračními stavy 1 a 2. Je to tenzor druhého řádu, tedy má devět složek. Ve vztahu (10) probíhá sumace přes všechny stacionární stavy s s výjimkou stavů 1 a 2, mezi kterými dochází k Ramanovu přechodu. Ve jmenovatelích máme energie patřící daným stavům s , 1, 2 a energii přicházejícího fotonu E_0 . Také ve vztahu (10) máme operátor elektrického dipólového momentu \hat{d} , z něhož část působí na jádra a část působí na elektrony, respektive na příslušné části

vlnové funkce. Pokud uvážíme vibrační přechody pouze v rámci základního elektronového stavu, integrace přes elektronové souřadnice se bude odehrávat mezi různými elektronovými funkcemi, na které jaderná část operátoru dipólového momentu nepůsobí, a uplatní se pouze elektronová část operátoru elektrického dipólového momentu. Přestože Ramanův přechod je přechodem mezi dvěma vibračními stavy, jeho existence je primárně spojena s dipólovou interakcí optického záření s elektronovým obalem molekuly.

U Ramanova tenzoru se ještě dělají dvě stěžejní aproximace vzhledem k excitační vlnové délce a elektronovým přechodům molekuly, a to nerezonanční a rezonanční. U nerezonanční aproximace je Ramanův rozptyl buzen fotony s energií, která je podstatně menší než rozdíl energií mezi základním a excitovaným elektronovým stavem a která je zároveň podstatně větší než rozdíl energií vibračních hladin, mezi kterými dochází k Ramanově přechodu. U rezonanční aproximace je rozdíl energií mezi základním a excitovaným elektronovým stavem srovnatelný s energií přicházejících fotonů. Poté první člen v rovnici (10) poroste do nekonečna, tedy dojde k rezonančnímu zesílení signálu. (PROCHÁZKA, 2016) Dle zmíněných aproximací tedy můžeme rozdělit Ramanův jev na rezonanční a nerezonanční tak, jak je ilustrováno na obrázku 1.3.2.



Obrázek 1.3.2. – Rezonanční a nerezonanční Ramanův rozptyl (zelená šipka – přicházející foton, červená šipka – Ramanovsky rozptýlený foton)

Obě ze zmíněných aproximací mají charakteristické vlastnosti, které si nebudeme odvozovat, ale pouze zmíníme. U nerezonanční aproximace je Ramanův tenzor tvořen symetrickou maticí, z čehož plyne i symetrie vůči záměně výchozího a konečného stavu. V přiblížení tzv. malých výchylek platí výběrové pravidlo pro vibrační přechody. Povoleny jsou totiž pouze fundamentální přechody, kdy dochází ke změně kvantového stavu pouze jednoho normálního vibračního módu, a to mezi sousedními vibračními hladinami. Dále v přiblížení malých výchylek platí, že Ramanův tenzor je dán změnou polarizovatelnosti molekuly při daném vibračním módu při průchodu rovnovážnou polohou. V případě molekul se středem symetrie jsou zakázány všechny vibrační přechody antisymetrických vibrací, což je přesně opačně než u vibračních absorpčních spekter. V nerezonanční aproximaci pro molekuly se středem symetrie se tedy hovoří o tzv. alternativním zákazu. (SCHRADER, 1995)

U rezonanční aproximace dojde k rezonančnímu zesílení signálu kvůli prvnímu členu v rovnici (10). Následně po zanedbání druhého členu a všech příspěvků od ostatních excitovaných elektronových stavů sumace probíhá pouze přes vibrační stavy příslušného excitovaného elektronového stavu, se kterým je excitační foton v rezonanci. Je zřejmé, že v tomto případě Ramanův tenzor ztrácí obecně svoji symetrii jak maticovou, tak vůči záměně počátečního a konečného stavu. Při rozvoji dipólového momentu elektronového přechodu podle normálních vibračních souřadnic se tak může uplatnit i nulový člen, pokud jsou dostatečně velké překrytové integrály mezi vibračními vlnovými funkcemi v základním a excitovaném elektronovém stavu. Musí tedy docházet ke změně vibračního módu při změně elektronového stavu, který lze očekávat hlavně u plně symetrických vibrací, kde dochází k změně rovnovážné hodnoty normální vibrační souřadnice. Podobně jako u elektronově-vibračních absorpčních spekter lze očekávat u rezonančního Ramanova rozptylu výskyt vyšších harmonických a kombinačních přechodů. Při vyšších harmonických přechodech dochází ke změně vibračního kvantového čísla o hodnoty vyšší než jedna. V případě kombinačních přechodů dochází ke změnám vibračních kvantových čísel u více vibračních módů najednou. (PROCHÁZKA, 2016)

Ramanův tenzor má tři nezávislé invarianty označované jako izotropní, anizotropní a antisymetrický. Tyto invarianty je třeba zmínit, protože určují polarizační vlastnosti a intenzitu rozptýleného záření pro různé excitační a detekční konfigurace. Izotropní invariant je složený z diagonálních elementů Ramanova tenzoru a je dominantní u symetrických vibrací, ale nulový u neúplně symetrických

vibrací. Anizotropní invariant udává intenzitu Ramanova rozptylu neúplně symetrických vibrací. Antisymetrický invariant je nenulový pouze u rezonančního Ramanova rozptylu. (LONG, 2002)

1.4. Měření Ramanových spekter – Ramanova spektroskopie

Na měření Ramanových spekter potřebujeme zdroj excitačního záření, vzorek, kde bude docházet k Ramanově rozptylu, dále spektrometr k prostorovému rozdělení spektra a detekční zařízení. Na tomto principu funguje celá spektroskopická disciplína, a to Ramanova spektroskopie. Z hlediska uspořádání experimentu je Ramanova spektroskopie velice jednoduchá a flexibilní. Lze volit různé rozptylové úhly, pod kterými detekujeme Ramanovo spektrum ze vzorku vůči přicházejícímu svazku záření. Nejčastější je pravoúhlá geometrie (90°), zpětný rozptyl (180°) nebo dopřední rozptyl (0°) a výběr rozptylového úhlu většinou souvisí s konkrétní aplikací nebo některými praktickými výhodami. Není to však principiální omezení. Další výhodou této techniky je možnost měření Ramanova rozptylu v principu na jakémkoliv objektu, na kterém dochází a z kterého můžeme analyzovat rozptýlené záření, ať už z povrchu nebo objemu vzorku. Ramanovu spektroskopii lze tedy použít na různé typy vzorků: plyny, kapaliny, roztoky, gely, pevné látky, prášky nebo krystaly. Vzorek ani nemusí být opticky propustný. (PROCHÁZKA, 2016)

Nicméně Ramanova spektroskopie, zejména spektroskopie založená na spontánním Ramanově rozptylu, má i řadu omezení a nevýhod. Spontánní Ramanův rozptyl, tj. nerezonanční nebo nějakým jiným mechanismem nezesílený Ramanův rozptyl, je velmi málo pravděpodobný jev. Pouze jeden foton se rozptýlí neelasticky na milion fotonů elasticky rozptýlených. Pokud dojde při interakci záření se vzorkem i k jiným optickým jevům jako je absorpce fluoroforů, může nám následně luminiscence značně znesnadnit měření Ramanova signálu. Vznikne vysoce intenzivní luminiscenční pozadí, které stochasticky fluktuuje. Úroveň těchto fluktuací může být násobně vyšší, než je intenzita Ramanova signálu, který v stochastickém šumu fluorescenčního signálu zanikne. Luminiscence ze vzorku nám také může znesnadnit zpracovávání spekter. Například u buněk, můžeme naměřit různé fluorescenční pozadí v jejich různých místech (pixelech). Pokud tedy máme naměřená Ramanova spektra i z desítek pixelů na jedné buňce, museli bychom odečítat pozadí z patřičných

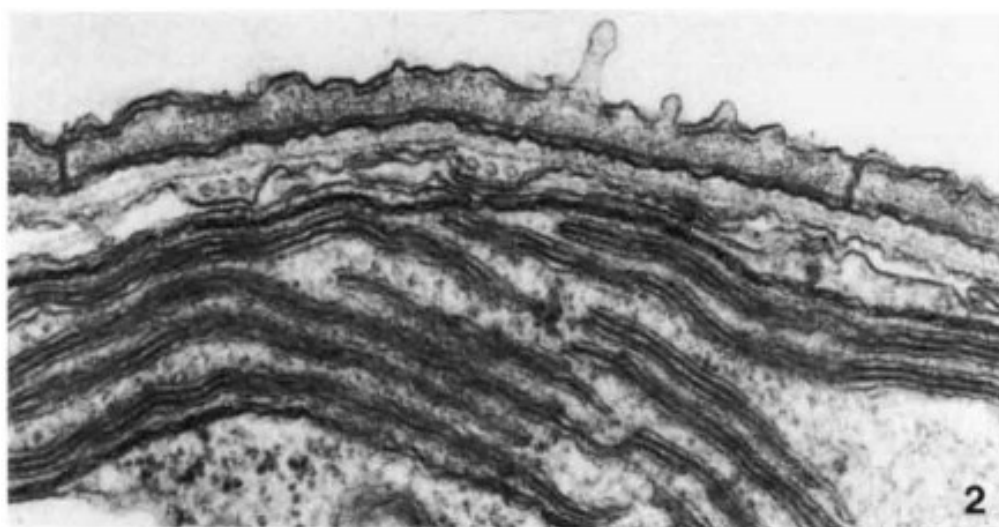
pixelů. Manuálně to není z časových důvodů možné. Programy, které pozadí automaticky odečítají, neodečítají pozadí tak přesně, jak by bylo potřeba, a stále potřebují uživatelskou kontrolu. A navíc, i kdybychom fluorescenční pozadí dokázali odečíst správně (a třeba plně automaticky), u vzorků s vysokým pozadím pořád zůstává problém stochastického šumu, ve kterém se Ramanův signál ztrácí. (SMITH E., 2005)

1.5. *Amphidinium carterae*

Jedná se o jednu z mnoha zajímavých mikrořas (jednobuněčných řas), které se nacházejí v mořském ekosystému prakticky ve všech oceánech. Dle taxonomického dělení patří *Amphidinium carterae* do domény eukaryot, superskupiny SAR. Přestože je to eukaryota, jedná se o velice zajímavou výjimku. Tyto obrněnky (dinoflagellates) mají totiž několik krátkých (asi 4 kb) cirkulárních genomů chloroplastů, tzv. minikruhy, a mají odlišný metabolismus jejich mediátorové RNA (možnost polyuridylace místo polyadenylace 3' konce). Kromě toho se jedná o významný modelový organismus. (DORRELL et al., 2019)

Superskupina SAR byla v roce 2007 navržena do taxonomického systému a dle molekulárních analýz bylo potvrzeno, že se jedná o přirozenou monofyletickou větev zahrnující v sobě bývalé superskupiny Stramenopila, Alveolata a Rhizaria (jejich počáteční písmena dala nové superskupině jméno SAR). *A. carterae* se řadí mezi Alveolata charakteristické tím, že pod svou cytoplazmatickou membránou obvykle mají ploché vakuoly. Ty pomáhají buňkám si zajistit pružnost i tuhost najednou. *A. carterae* následně patří do oddělení zvané obrněnky (Dinoflagellata). Obrněnky jsou zajímavé tím, že obsahují peridinin-chlorofyl proteinový komplex. Tento komplex je vlastně fotosyntetická anténa, přes kterou se absorbovaná energie fotonů dostává do reakčního centra a následně využije k fotosyntéze. Mimo jiné komplex obsahuje čtyři molekuly peridininu, které absorbují světelná kvanta a zodpovídají za charakteristickou žluto-hnědou barvu obrněnek. Dále je toto oddělení specifické tím, že chromozomy nemají histony. Zásobními látkami je obvykle škrob, polyfosfát a guanin. Mají dva bičíky (překlad latinského názvu oddělení) a chloroplasty s třemi membránami (poslední je spojena s jádrem) vzniklé druhou nebo třetí endosymbiózou.

Chloroplasty často v sobě obsahují pyrenoidy a thylakoidy se vyskytují po trojicích představujících jednu lamelu. Český název oddělení obrněnky je odvozen od toho, že mají schránky tvořené celulózovými destičkami sloužícími jako pancíř, ale to se netýká *A. carterae*. Na obrázku 1.5.1. máme viditelné zmíněné celulózové destičky. Jedná se o SEM (Scanning Electron Microscope) snímek rodu *Amphidinium*. Pod strukturou celulózové vrstvy si můžeme povšimnout plochých vakuol a dalších organel, které jsou společné pro všechny obrněnky. (HOFMANN et al., 1996), (DODGE, 1984), (RIZZO, 2003)



Obrázek 1.5.1. – SEM snímek rodu *Amphidinium*: Struktura celulózové vrstvy, pod níž se nachází ploché vakuoly a další organely společné pro všechny obrněnky (DODGE, 1984)

Izolace *A. carterae* a jiných tříd obrněnek z přírody je přehledně shrnuta v (DODGE, 1984). Kultivace *A. carterae* je velmi jednoduchá. Je nutné připravit médium nahrazující mořskou vodu. Bylo provedeno velké množství studií, které poukázali na užitečnost protokolu algologa Guillarda. Tento protokol je například zmíněný v knize (SMITH, 1975) a byl použit i v práci.

Z hlediska vhodnosti jako objektů pro Ramanovou mikroskopii můžeme o řasách *A. carterae* konstatovat: jsou malé a mají plastidy obsahující chlorofyly. Jejich malá velikost umožňuje naměření Ramanových spekter na desítkách buněk, což je výhodou oproti větším modelovým mikrořasám, jako jsou *Desmodesmus quadricauda* nebo *Chlamydomonas reinhardtii*. Nevýhodou je naopak jejich složení. V chloroplastech najdeme různé pigmenty (např. chlorofyly a karotenoidy), které mají

vysoký kvantový výtěžek fluorescence. Nechtěné fluorescenční pozadí od chlorofylů je v Ramanových spektrech nutné odstranit, a to buď zpracováním nebo fotovybělením. Pro fotovybělení *A. carterae* jsme použili metodologii vyvinutou na našem pracovišti (MOUDŘÍKOVÁ, et al., 2017), která spočívá v plošném ozáření živých buněk intenzitou světla, která je asi o dva řády vyšší, než nejvyšší intenzity vyskytující se v přírodě. Fotosyntetický systém řasy v okamžiku vyprodukuje velké množství ROS a singletního kyslíku, které zoxidují chlorofyl, a tím zredukuje jeho autofluorescenci. Technická realizace je velice jednoduchá. Plošného ozáření vzorku nízkou intenzitou je možno dosáhnout tím, že se excitační paprsek rozostří zvednutím objektivu o několik desítek mikrometrů nad zaostřenou rovinu se vzorkem. Přitom je možno použít stejnou excitaci, jako pro měření Ramanových spekter (např. 532 nm) a není nutno měnit celkový výkon samotného paprsku.

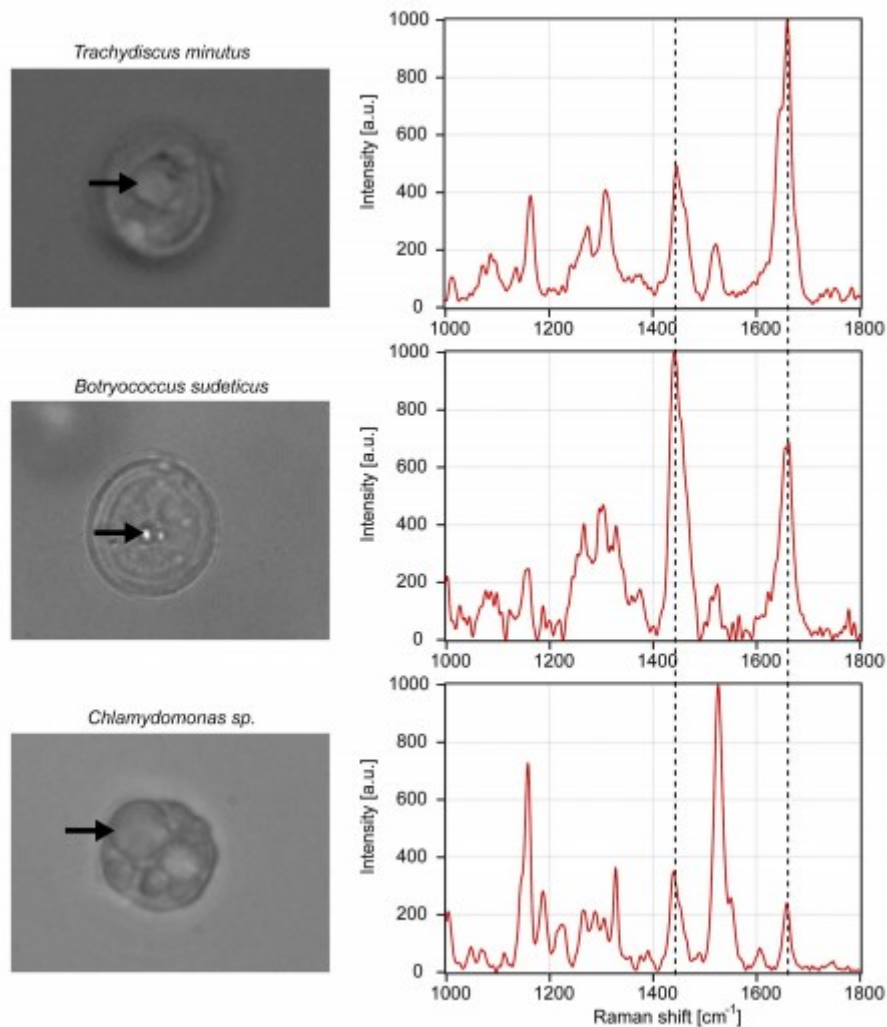
1.6. Ramanova spektra živých buněk

V posledních dvaceti letech došlo k velkému nárůstu publikací věnovaných Ramanově spektroskopii a mikroskopii živých buněk. To dosvědčuje například počet článků registrovaných v databázích Scopus nebo Web of Sciences, jejichž množství se pohybuje kolem osmi set článků. Vzhledem k tomu, že intenzita Ramanova signálu závisí na koncentraci molekul v excitačním objemu, je jasné, že pomocí Ramanovy mikroskopie bude možno pozorovat spektra jen molekul, které jsou v buňkách obsažené ve vysokých koncentracích, v kondenzovaném (např. krystalickém) stavu, nebo které vykazují rezonanční zesílení Ramanova signálu. Zde je možno připomenout, že určitě existují pokročilé metody Ramanovy spektroskopie, které nám mohou intenzitu Ramanova signálu zesílit o několik řádů, jak bylo nastíněno v předešlých kapitolách, ale ne všechny tyto metody jsou vhodné pro studium živých buněk. Za druhé je třeba zmínit, že spektra z určitého excitačního objemu nemusí pocházet od identických molekul. V různých organelách buněk existuje široká paleta biomolekul, které mohou přispívat do Ramanova signálu v daném excitačním objemu, tj. že změřené spektrum může být složitá superpozice spekter různých látek. Navíc různé látky se mohou v určitých spektrálních pásech shodovat, což komplikuje jejich identifikaci. Ramanovo spektrum pořízené z daného pixelu buňky je potřeba nějakým způsobem interpretovat. Níže je uvedeno několik příkladů spekter biomolekul

charakteristických pro buňky. Tyto spektra často nelze připsat konkrétní molekule, ale jsou specifické pro chemické skupiny biomolekul s příslušnými vibračními módy. Z hlediska Ramanovy mikroskopie mikrořas je potřeba uvést typická spektra biomolekul, které jsou v mikrořasách obsaženy nejčastěji. Jedná se zejména o proteiny, lipidy, polysacharidy, polyfosfáty, karotenoidy a krystalické puriny.

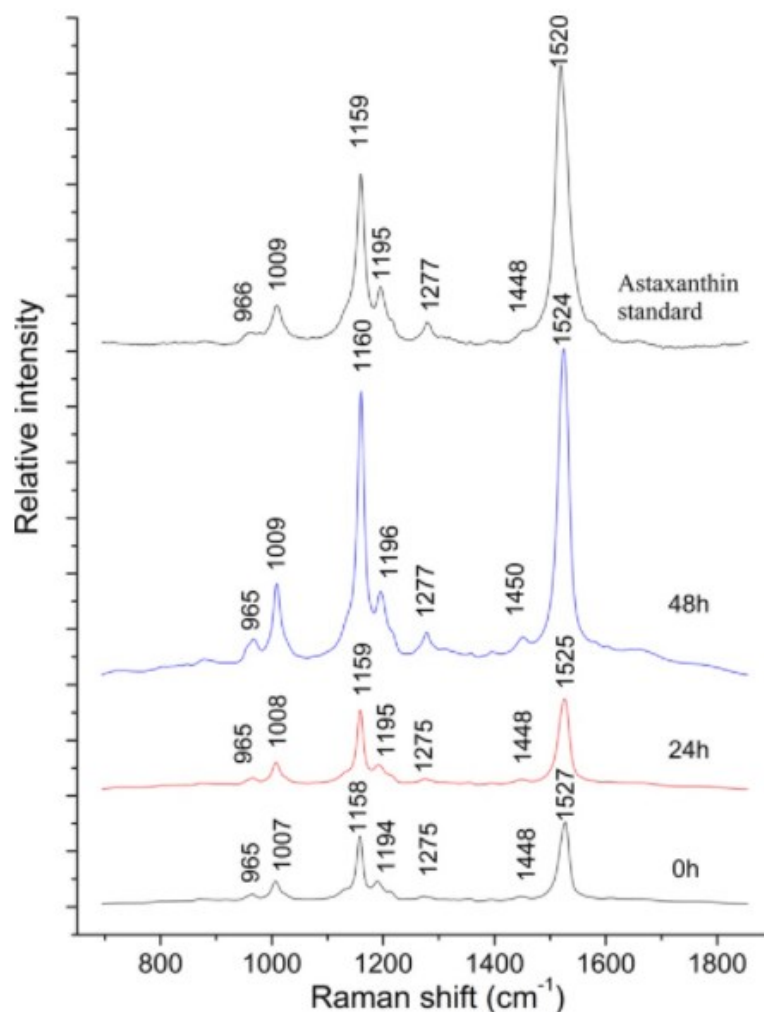
Pro identifikaci proteinů nám často slouží pásy označované jako amid I (pás na 1660 cm^{-1}), amid II (pás na 1545 cm^{-1}) a amid III (pás na 1250 cm^{-1}). Z intenzitních poměrů a tvarů pásů lze odhadnout i konformaci proteinů jako α -helix, β -skládaný list nebo neuspořádané klubko. Z Ramanových spekter lze určit i množství aminokyseliny fenylalanin v proteinu podle intenzitních poměrů pásu fenylalaninu na 1005 cm^{-1} vůči pásu Amid I. Dále například tyrosin poskytuje charakteristický dublet na 830 cm^{-1} a 850 cm^{-1} . Pokud tyrosin tvoří vodíkové vazby s molekulami vody, intenzivnější je pás na 850 cm^{-1} . Je-li však tyrosin schovaný uvnitř proteinu, nedostupný molekulám vody z okolí, a pokud může tvořit vodíkové vazby pouze s jinými aminokyselinami, intenzivnější je pás dubletu na 830 cm^{-1} . (MOUDŘÍKOVÁ et al., 2021)

Další velkou skupinou biomolekul s výrazným Ramanovým spektrem dobře pozorovatelným v živých buňkách jsou lipidy. U nich obvykle můžeme jen rozeznat, zda se jedná o lipidy s nasycenými (mají výrazný pás na 1445 cm^{-1}) nebo nenasyčenými mastnými kyselinami (mají taky pás na 1656 cm^{-1}). Právě u lipidů s nenasyčenými mastnými kyselinami si můžeme povšimnout shodnou polohu pásu na 1656 cm^{-1} s pásem Amid I, která komplikuje spektrální interpretaci, zejména pokud je založená pouze na tomto jediném pásu (univariantní analýza). Tvar pásu lipidů je ale obvykle užší, k rozlišení lipidů od proteinů nám může také pomoci oblast 2800 cm^{-1} až 3000 cm^{-1} , tedy informace z více spektrálních oblastí (multivariantní analýza). Na obrázku 1.6.1. můžeme vidět Ramanova spektra ze tří různých mikrořas obsahujících lipidová tělíska s různým složením nasycených a nenasyčených mastných kyselin.



Obrázek 1.6.1. – Ramanova spektra z třech různých živých mikrořas s vyznačenými pásy lipidů (SAMEK et al., 2010)

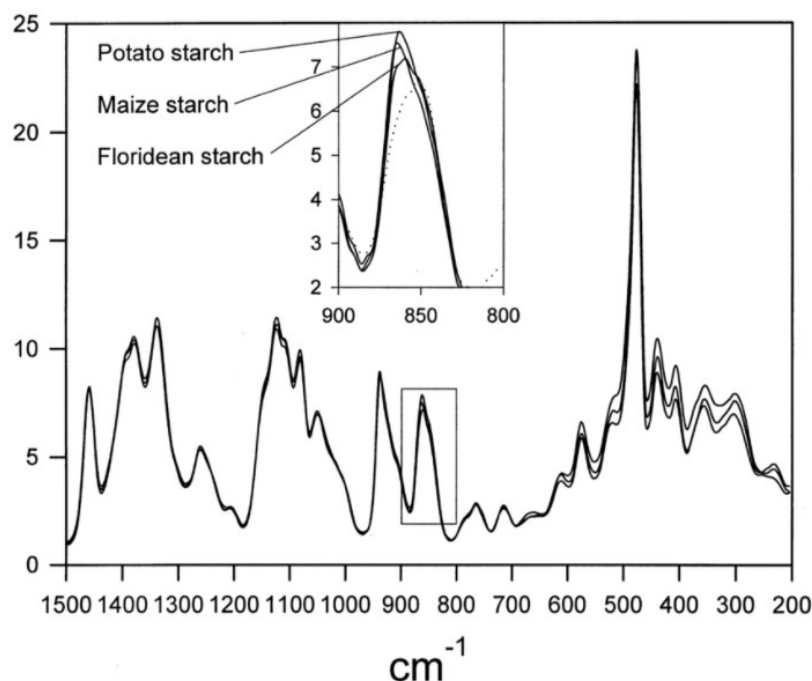
Další sloučeniny, které se v buňkách, a to především fotosyntetických, mohou vyskytovat, jsou karotenoidy. Pro ně je charakteristický pás na 1525 cm^{-1} . Na obrázku 1.6.2. jsou uvedena spektra astaxantinu, jakožto standardu, a pak spektra karotenoidů z živé buňky *Haematococcus pluvialis* v různé době po přeočkování. Právě mikrořasy jako *Haematococcus pluvialis* si ve stresových podmínkách karotenoidy syntetizují. (SHAO et al., 2019)



Obrázek 1.6.2. – Ramanova spektra karotenoidů (nahore spektrum z izolovaného astaxantinu a dole spektra karotenoidů z buněk v různé době po přeočkování) (SHAO, et al., 2019)

Škrob je další sloučeninou často přítomnou v mikrořasách s výrazným úzkým pásem na 479 cm^{-1} , jehož šířka je spojená s jeho krystalinitou. (BULKIN et al., 1987) Ví se, že škrob se sestává z jednotek α -amylózy a rozvětveného amylopektinu. Kromě mikrořas se škrob nachází ve formě granulí hlavně v rostlinách a makroskopických řasách. Může se nacházet v chloroplastu (u zelených rostlin) anebo mimo něj (u červených řas – ruduch nebo glaukofýt). Pokud buňky chloroplasty nemají (např. prokaryota), vyskytuje se přímo v cytoplazmě opět ve specializovaných útvarech – granulích. Různé druhy škrobu se dají odlišit dle tzv. α -anomerního pásu na 860 cm^{-1} (β -anomerní pás se vyskytuje na 890 cm^{-1}). Na obrázku 1.6.3. máme spektra různých forem škrobu, a to florideanového škrobu (vyskytující se

např. u ruduch), škrobu z kukuřice a brambor a škrobu z houby *Aspergillus niger*. (YU et al., 2002)

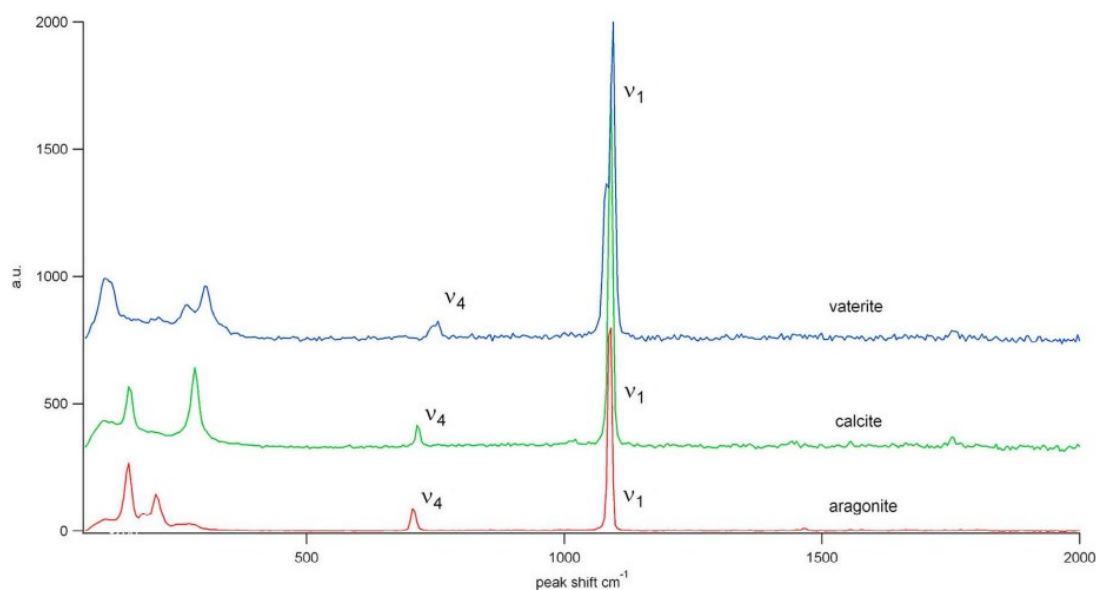


Obrázek 1.6.3. – Ramanova spektra škrobů (potato starch – škrob z brambor, maize starch – škrob z kukuřice, floridean starch – škrob vyskytující se u ruduch, tečkovaně je pak spektrum škrobu z houby *Aspergillus niger*) (YU, et al., 2002)

Kromě granulí škrobu a lipidů mohou buňky obsahovat granule se zásobami fosforu, tzv. volutinová nebo také metachromatické granule. Ty se skládají z polyfosfátu a v Ramanově spektru je pro ně typický pás na 1155 cm^{-1} . (GREGOROVÁ, 2013) Poloha tohoto pásu se může mírně lišit dle koncentrace dvojmocných kationtů, které jsou polyfosfátem přitahovány. Granule z polyfosfátu tedy mohou sloužit jako významná zásobárna signálního kationtu Ca^{2+} nebo účinkovat při detoxikaci buňky při nadbytku kationtů kovů. (KORNBERG et al., 1999)

Tělísek s větším množstvím určitých typů molekul v buňce je větší množství. To, že guanin funguje jako zásobní zdroj dusíku u některých mikrořas, se tušilo ve dvacátém století při izolaci látek z buněk. (DODGE, 1984) Avšak až Ramanova mikroskopie dokázala přesně identifikovat a přiřadit naměřené spektrum ke guaninu. V nedávné studii (MOJZEŠ, et al., 2020) bylo toto potvrzeno, a právě na spektra deuterovaných forem krystalického guaninu spektra bude tato práce hlavně zaměřena. Guanin je specifický hlavně intenzivním pásem dýchací vibrace na 651 cm^{-1} , ale taky řadou dalších pásů, poloha kterých je velice citlivá na izotopické záměny.

Krystalický guanin, resp. krystaly dalších purinů, nejsou jedinou velkou zásobárnou dusíku v buňkách mikroorganismů. Stejným způsobem mohou sloužit tělíška s kyanofycinem (kopolymerem kyseliny asparagové a argininu) vyskytující se především u sinic, ale i u některých bakterií (např. *Clostridium*). Zrna tohoto kopolymeru nebyly pomocí Ramanovy spektroskopie studovány přímo v buňkách, ale pouze po izolaci z buněk *Anabaena cylindrica*. Bylo zjištěno, že se vyskytují především ve formě β -listu pomocí analýzy poměru intenzit pásů Amidů I, II a III. (SIMON et al., 1980) Většina prací týkajících se Ramanovy mikroskopie na živých sinicích nebo mikrořasách se zabývá karotenoidy (DE OLIVEIRA et al., 2015), (NEKVAPIL et al., 2021) a biominerálními inkluzemi (apatitu, hematitu, kalcitu aj.) (MOROZ et al., 2021), (BENZERARA et al., 2021). Zde například intenzivní pás na 1086 cm^{-1} je typický pro uhličitanové minerály, tzv. karbonáty. (NEHRKE et al., 2012) Spektra tří karbonátů uvádíme na obrázku 1.6.4.



Obrázek 1.6.4. – Ramanova spektra valeritu, kalcitu a aragonitu, která můžeme nalézt ve spektrech živých buněk (NEHRKE, et al., 2012)

Ramanovu mikroskopii je možno použít i na detekci nukleových kyselin (DNA, RNA; většinou v komplexech s proteiny jako nukleoproteinový komplex) přímo v živých buňkách (MATUSZYK et al., 2021), (RYU et al., 2021). Nedávno publikovaná studie (PILÁT et al., 2020) se zabývá využitím Ramanovy mikroskopie v kombinaci s optickou laserovou pinzetou na studium bakteriofágů jako vysoce specifických patogenů bakterií, které mají potenciál nahradit antibiotika při léčení

některých infekčních nemocí. V posledně zmíněné studii byla práce soustředěna na sledování poměrů pásů DNA a RNA v oblasti 785 cm^{-1} k pásu fenylyalaninu na 1001 cm^{-1} . Například Ramanův pás na 785 cm^{-1} sestává z pásu na 782 cm^{-1} patřící vibracím fosfodiesterových vazeb (O-P-O) a pásu na 788 cm^{-1} patřící uracilu, thyminu a cytosinu.

1.7. Guanin, jeho vlastnosti a Ramanova spektra

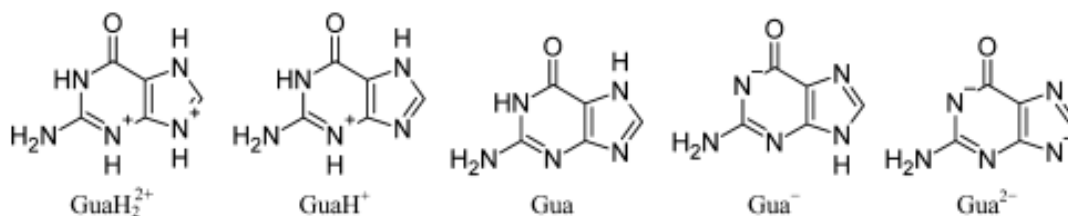
Krystalický guanin, deuterací kterého se v této práci zabýváme, se v mikrořasách *A. carterae* vyskytuje jako anhydrid. Synteticky je možno připravit i monohydrát krystalického guaninu, který se od anhydridu spektrálně odlišuje, ale jeho výskyt v řasách nebyl zatím pozorován. Ramanova spektra guaninu naměřena přímo v živých buňkách bylo potřeba rozložit do dobře definovaných standardů deuterovaných forem guaninu připravených v naší laboratoři. Nejdříve uvedeme některé z důležitých vlastností krystalického guaninu známých z literatury.

V přírodě se guanin vyskytuje v nukleových kyselinách jako jedna z bází nebo v různých guanosin-fosfátech (GMP, GDP, GTP, c-di-GMP), ale kromě toho ho můžeme v krystalické podobě najít například v rybích šupinách, tělech mořských bezobratlovců, měkkýšů, kutikulách pavouků, kůži chameleonů, nebo v očích některých organismů kde tvoří tapetum lucidum (TADEPALLI et al., 2017), (GUR et al., 2017), (PALMER et al., 2017). Krystalický guanin (anhydrid) má jeden z nejvyšších indexů lomu (1,83) mezi biologickými materiály, a právě vysoký index lomu má svou fyziologickou roli v organismech. Vysoký index lomu má krystalický guanin ve směru kolmém na rovinu vodíkovými vazbami zesíťovaných molekul uspořádaných vertikálními patrovými interakcemi. Ve směru rovnoběžném s rovinami molekul má index lomu pouze 1,45 (HINRICHS et al., 2005). Jedná se tedy o dvojlomný krystal, který mění polarizační stav procházejícího světla. Ve viditelné oblasti je krystalický guanin průhledný, ale silně absorbuje ultrafialové světlo.

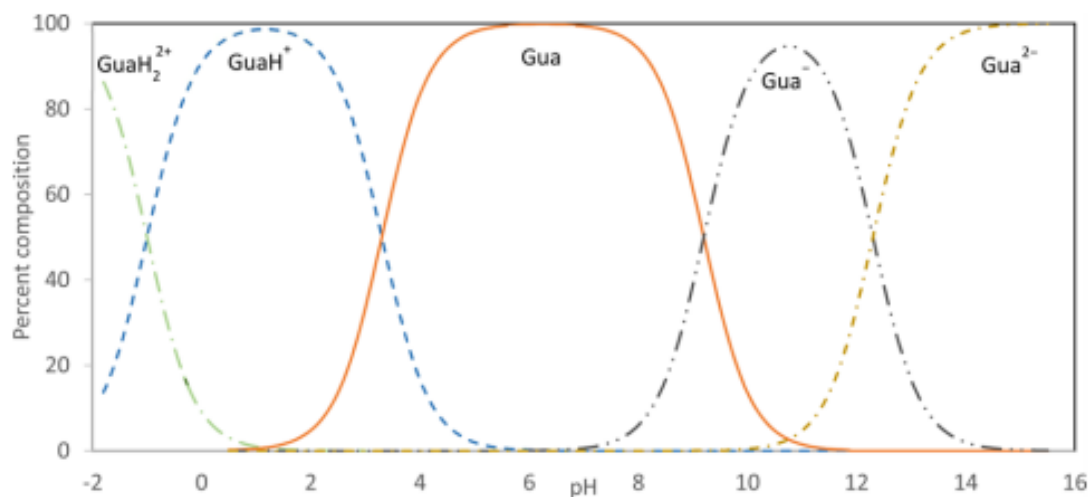
Guanin je za neutrálního pH nejméně rozpustný purin. Podle tabelovaných hodnot, za teploty 20 °C a pH 7 je saturační koncentrace guaninu pouze $30\text{ }\mu\text{M}$ až $40\text{ }\mu\text{M}$, což je asi $100\times$ méně než u adeninu. Nicméně i kolem jeho skutečné rozpustnosti doposud panují nejasnosti. V publikacích různých autorů (DEVOE et al., 1984), (HINZ, 1986), (HIRANO et al., 2010), (DARVISHZAD et al., 2017)

lze nalézt značně rozporné hodnoty v rozmezí 40 μM až 100 μM při jinak stejných podmínkách. Jiné studie, např. (LI et al., 2010) uvádějí saturační rozpustnost guaninu při pH 7 jenom 25 μM . Rozpustnost se přitom dá určit ze známých hodnot pK_a , poměru guaninu v pevném skupenství a jeho neutrální formy v roztoku, který by měl být pro všechny hodnoty pH stejný.

V nedávném článku (DARVISHZAD et al., 2018) byl zkoumán guanin v roztoku při různých hodnotách pH, různých navážkách a koncentracích. Roztoky byly pečlivě charakterizovány absorpčními spektry a dynamickým rozptylem světla kvůli podezření, že i v roztoku zůstávají nanoskopické částice krystalického guaninu, které zkreslují jeho skutečnou rozpustnost. Na obrázku 1.7.1. převzatého z této práce je uvedeno pět protonačních forem guaninu, které se vyskytují v roztocích při různých hodnotách pH. Na obrázku 1.7.2. je uvedena závislost procentuálního výskytu různých forem guaninu na hodnotách pH. Závislost byla vypočtena z pK_a hodnot, které byly převzaty z článků (MASON, 1954), (BENOIT et al., 1985) a koncentrace byly určeny pomocí UV-VIS elektronové spektroskopie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR).

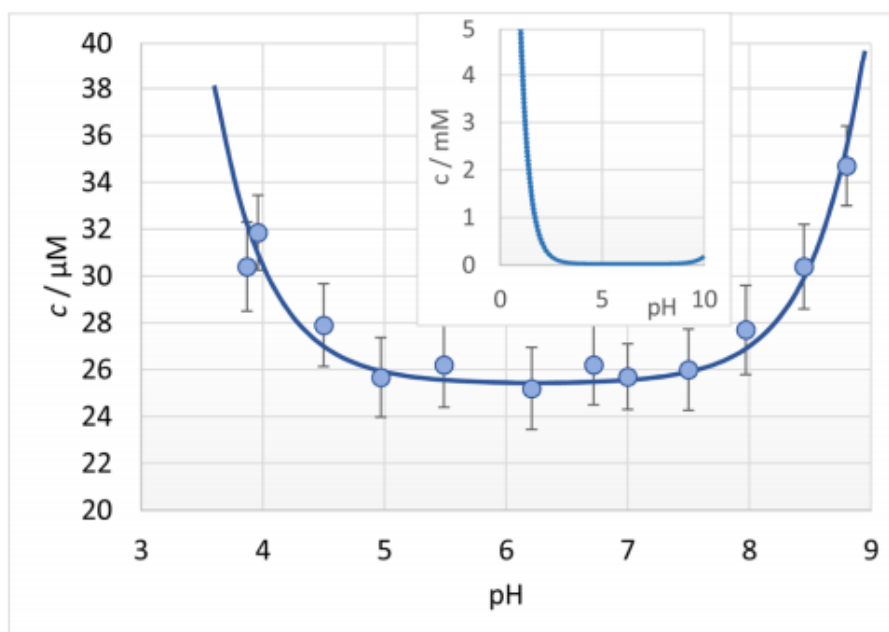


Obrázek 1.7.1. – Pět různých protonačních forem guaninu (DARVISHZAD, et al., 2018)



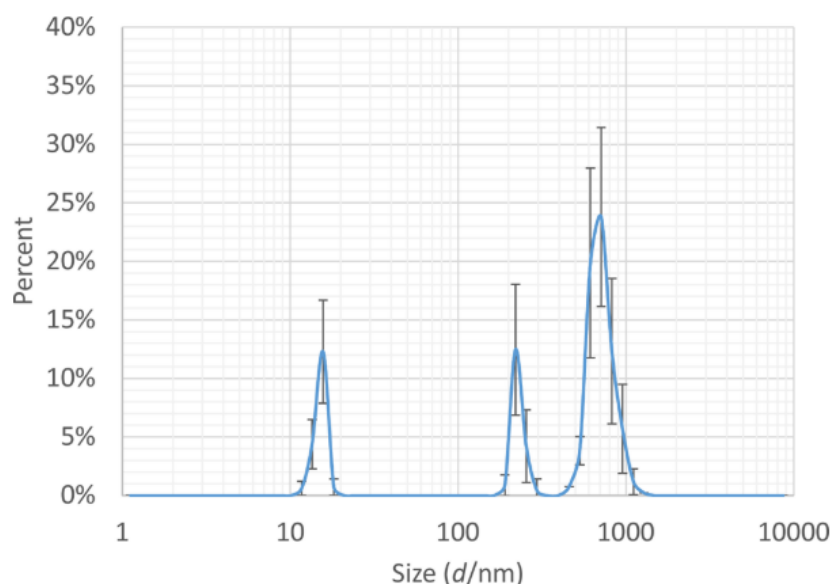
Obrázek 1.7.2. – Procentuální zastoupení různých forem guaninu při různém pH (DARVISHZAD, et al., 2018)

Na obrázku 1.7.3. převzatého z (DARVISHZAD, et al., 2018) je pak závislost rozpustnosti guaninu pro různé hodnoty pH, z které vidíme, že pod hodnotou pH 4 rozpustnost vzrůstá i na několiknásobek. K podobnému jevu, ale v menším měřítku, dochází nad hodnotou pH 8, kdy rozpustnost guaninu v roztoku při pH 9 je až 40 μM .



Obrázek 1.7.3. – Závislost rozpustnosti guaninu pro různé hodnoty pH (DARVISHZAD, et al., 2018)

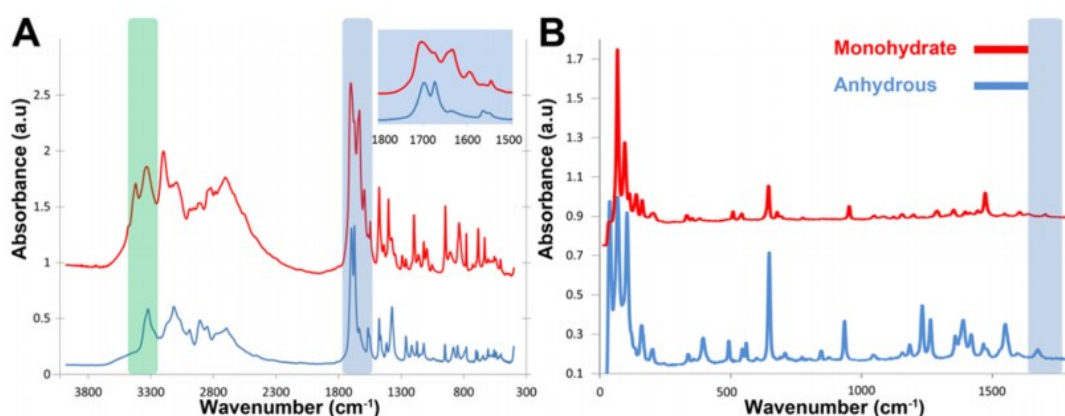
V práci (DARVISHZAD, et al., 2018) byl tento rozpor vysvětlen tím, že při vyšších koncentracích (nebo při přípravě roztoků z navážek výrazně větších než pro dosažení saturovaných roztoků) dochází k tvorbě a přetrvávání nanokrystalů guaninu tak malých, že je není možné odstranit běžnou centrifugací nebo filtrací. Předtím nebylo zjevné, že tyto nanokrystaly v roztocích existují, a proto byla rozpustnost guaninu udávána vyšší. Tyto nanokrystaly o velikosti 20 nm až 1000 nm se tvoří Ostwaldovým zráním a fiktivně zvyšují zdánlivou rozpustnost guaninu. Na obrázku 1.7.4. uvádíme distribuci částic, které byly změřeny dynamickým rozptylem světla. U distribucí těchto nanočástic bylo zjištěno, že po čtrnácti dnech se menší částice zvětšují na velikost až zmíněných 1000 nm.



Obrázek 1.7.4. – Distribuce nanočástic guaninu v roztoku (DARVISHZAD, et al., 2018)

K výše uvedenému je třeba podotknout, že velké množství guaninu může samo o sobě snížit hodnotu pH roztoku, a tedy i jeho rozpustnost a formu guaninu, která se v roztoku vyskytuje. Kromě toho se může guanin oxidovat a jakákoliv nečistota může hrát zásadní roli při měření velmi málo koncentrovaných nasycených roztoků guaninu. (DARVISHZAD, et al., 2018)

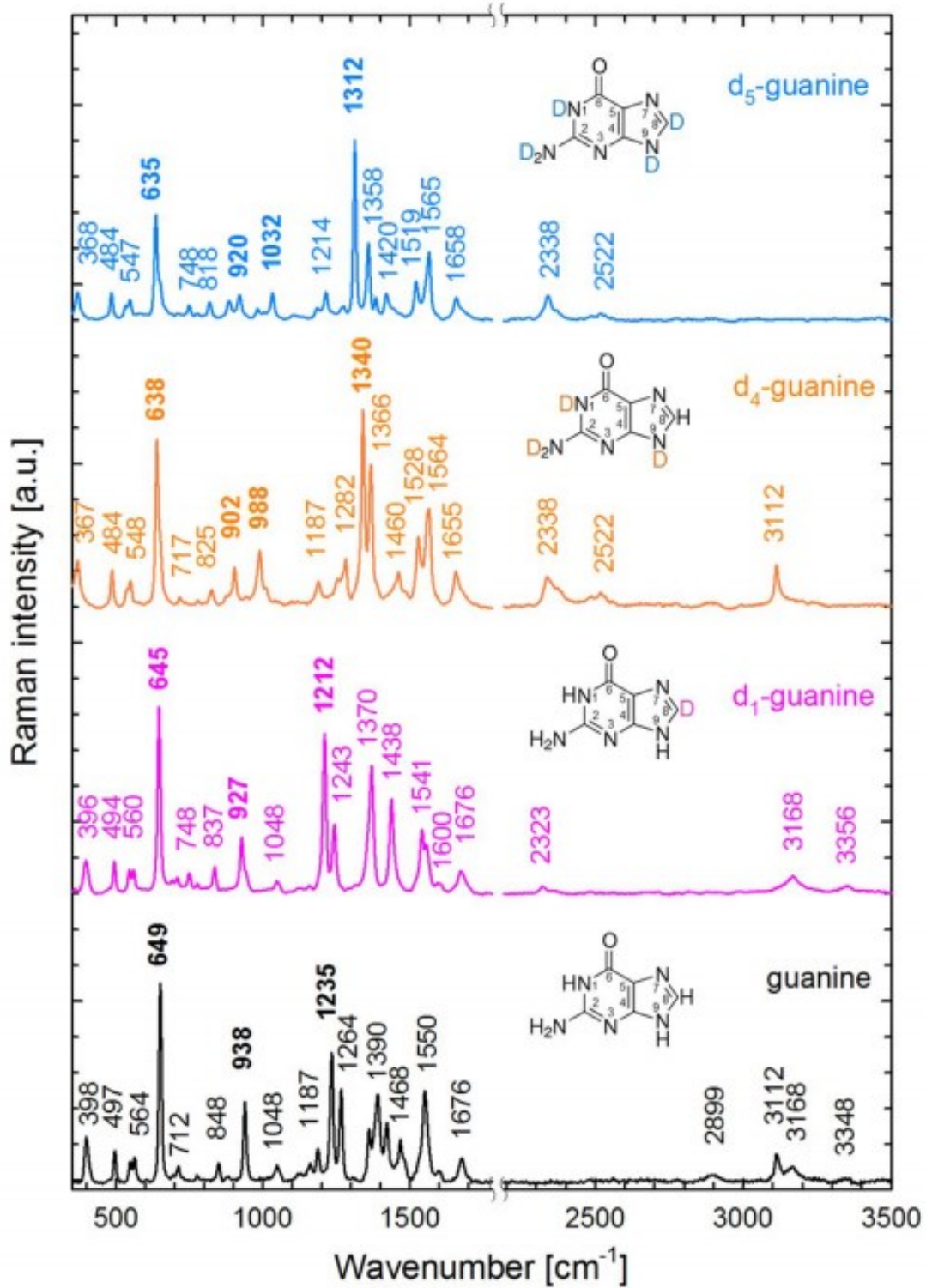
Na začátku kapitoly jsme popsali, že se syntetický krystalický guaninu může vyskytovat jako anhydrid nebo monohydrát, přičemž jenom anhydrid byl doposud pozorován v mikrořasách. Krystalizace různých forem guaninu z roztoku závisí na hodnotě pH roztoku, jak ukázali (DARVISHZAD, et al., 2018). Při hodnotách pH nižších než pH 3 vzniká monohydrát, při pH 4 až pH 6 vzniká směs hydrátu a anhydridu a při pH 7 až pH 13 vzniká především anhydrid. Při ještě vyšších hodnotách pH (nad pH 13, tj. v přítomnosti NaOH) vzniká dvojsodná sůl heptahydrátu guaninu. U guaninu monohydrátu si autoři (GUR et al., 2016) všimli tvorby krystalických jehel dlouhých 1 mm až 10 mm, přičemž u anhydridu se spíše tvořily hranolové krystaly. Autoři zmíněné dvě formy rozlišili pomocí rentgenové strukturní analýzy, a dále zjistili, že se anhydrid může vyskytovat ve dvou formách popisovaných jako α a β polymorfy (GUR, et al., 2016). Pomocí pomalých změn pH v roztoku, a dokonce při malých koncentracích (13 mM) bylo docíleno vzniku velkých krystalů guaninu (všech forem) oproti opačnému procesu s vyšší koncentrací (130 mM) a rychlou změnou pH. Dále bylo například zjištěno, že při zahřátí guaninu monohydrátu na teplotu 95 °C dochází k přechodu na guanin anhydrid. Ramanova a infračervená spektra anhydridu a monohydrátu byla také naměřena (GUR, et al., 2016). Na obrázku 1.7.5. můžeme vidět jejich rozdílnost. (GUR, et al., 2016)



Obrázek 1.7.5. – Infračervená (A) a Ramanova spektra (B) guaninu (GUR, et al., 2016)

Zatím jsme se věnovali pouze normálnímu, tj. isotopicky neznačenému guaninu. I když v molekule guaninu zaměníme pouze jeden vodík H jeho těžším isotopem deuteriem D, některé charakteristiky guaninu, jako jsou jeho Ramanova spektra se značně změň. Ramanovými a infračervenými (IR) spektry různě deuterovaných forem guaninu v jeho krystalické podobě se zabývali (DELABAR et al., 1978). Kromě toho se zabývali krystalickým guaninem s isotopicky

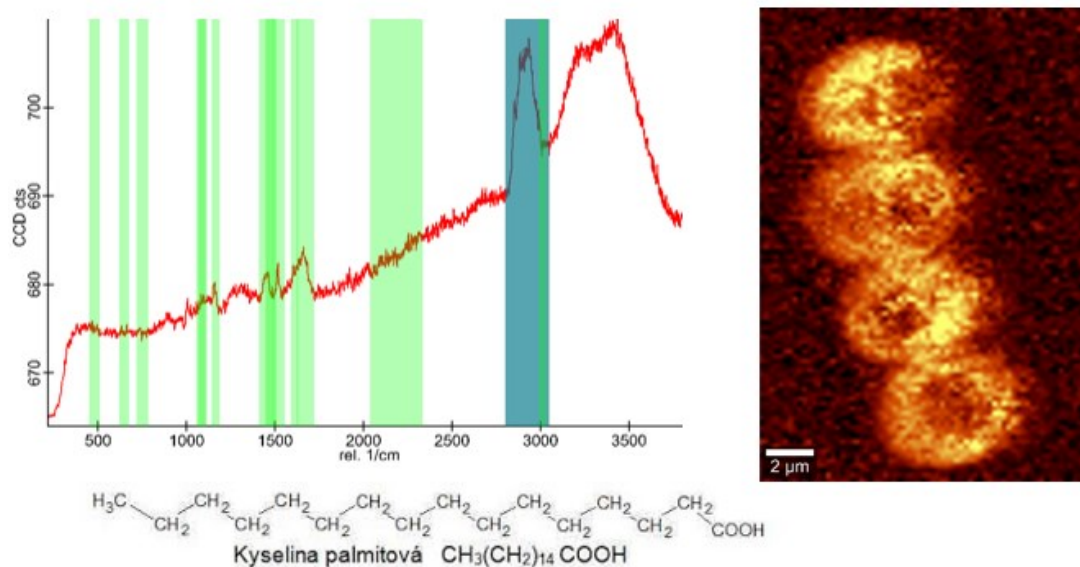
zaměněnými dusíky (^{15}N), a to nejen jejich Ramanovými spektry, ale také jejich IR absorpčními spektry. V práci (DELABAR, et al., 1978) je popsán postup přípravy, který jsme použili i v naší práci. Guanin byl pročištěn krystalizací z roztoku (D_2O nebo H_2O) hydroxidu amonného nebo dimethylaminu a vysušen při teplotě $70\text{ }^\circ\text{C}$ *in vacuo*. Z obou příprav měly krystaly stejné difrakční spektra. Plně deuterovaná forma guaninu (guanin D5) byla připravena zahřátím roztoku guaninu v D_2O s přídavkem ND_4OD (kvůli zvýšení rozpustnosti v bazickém pD) na teplotu cca $100\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu dvou hodin. Po následném ochlazení byl guanin D5 vysrážen neutralizací na pD 7 přídavkem DCl . Guanin deuterovaný pouze na dusících (guanin D4) byl připraven podobným způsobem, ale bez zahřívání. Guanin deuterovaný pouze na pozici C8 (guanin D1) byl připraven z guaninu D5, který byl následně rozpuštěn za studena v H_2O s přídavkem DCl (kvůli zvýšení rozpustnosti) a vysrážen titrací pomocí NaOH . Určení pozice deuterace každé formy guaninu a jeho procentuální zastoupení po každé přípravě bylo autory provedeno pomocí NMR, kde byly potvrzeny procentuální zastoupení guaninu D1 a guaninu D5 jako 95 % a zastoupení guaninu D4 jako 88 %. (DELABAR, et al., 1978) Stejná příprava byla provedena i v článku (MOJZEŠ, et al., 2020) a příslušná Ramanova spektra deuterovaných forem guaninu (obrázek 1.7.6.) byla použita v této diplomové práci jako báze pro fitování spekter naměřených v buňkách *A. carterae*.



Obrázek 1.7.6. – Ramanova spektra různě deuterovaných forem krystalického guaninu (MOJZEŠ, et al., 2020)

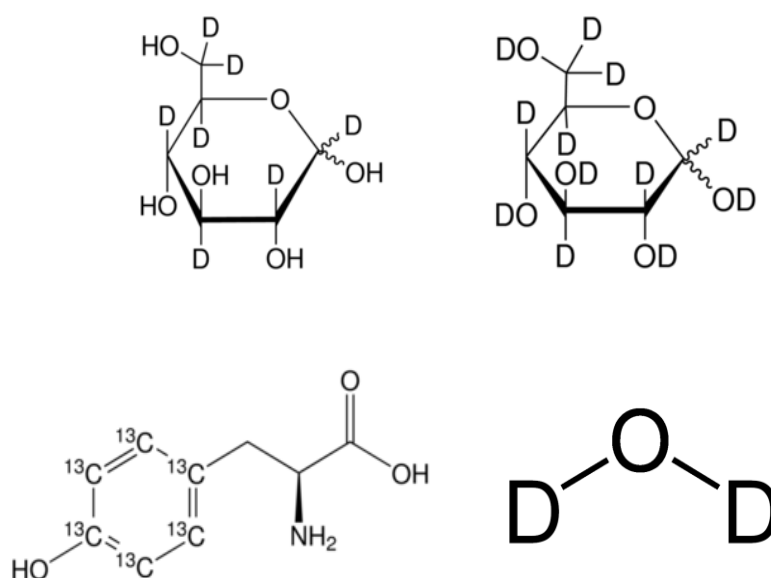
1.8. Využití isotopicky značených látek v Ramanově mikroskopii živých buněk

Jak už bylo zmíněno, pomocí Ramanovy mikroskopie jsme schopni naměřit Ramanova spektra z velkého množství pixelů buňky. Jejich analýzou můžeme vytvořit chemické mapy molekul, tj. na základě spektrální podobnosti s referenčním vzorkem určit přibližné množství molekul s danými vibračními módy v každém pixelu. Na obrázku 1.8.1. vpravo máme chemickou mapu C-H módů, který patří hlavně lipidům, např. i mastné kyselině palmitové, viz na obrázku dole. Vlevo máme jeho Ramanovo spektrum ze série spekter naměřených v několika pixelech. Jeden pixel měl rozměr 200×200 nm. Kromě informace o aktuálním chemickém složení buňky můžeme studovat i metabolické změny prostřednictvím dynamiky chemických map. Proměříme-li buňky opakovaně v různých časových intervalech, můžeme sledovat měnící se průběh chemických map, a získat informaci o metabolickém vývoji buněk. Časový vývoj chemických map ale neumožňuje rozlišit, které substance z média nebo jiných částí buňky jsou metabolizované na jiné. K tomu je možno využít isotopicky značené látky (živiny), které se stávají substrátem pro metabolické dráhy a postup isotopů je možno sledovat ze spektrálních posunů ve spektrech příslušných metabolických produktů.



Obrázek 1.8.1. – Chemická mapa lipidů (vpravo) s naměřeným Ramanovým spektrem z jednoho vybraného pixelu (vlevo) a chemický vzorec kyseliny palmitové (dole)

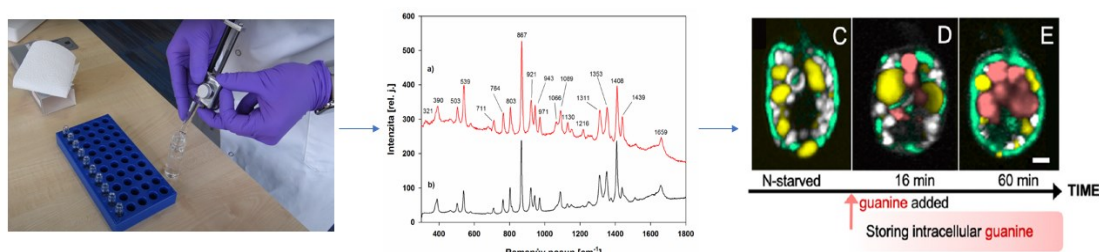
Co si představit pod pojmem isotopicky značené molekuly? Jedná se o širokou škálu molekul od monosacharidů, polysacharidů, aminokyselin, nukleotidů, mastných kyselin, po jejich deriváty, kde jsou atomy uhlíku, dusíku, fosforu, kyslíku nebo vodíku nahrazené jejich isotopy s vyšším nukleonovým číslem. Nejčastější používanou isotopicky značenou molekulou je obyčejná deuterovaná voda, D₂O a nejběžnější isotopické značení je deuterace. Některé biomolekuly je možno deuterovat pouhým rozpuštěním dané látky v D₂O, případně zvýšením teploty nebo změnou pH (pD), u jiných je to složitý proces, který je lépe nahradit biosyntézou. Je třeba také upozornit, že jedna a ta samá molekula, jako například glukosa, se může vyskytovat ve více (částečně) deuterovaných variantách. Na obrázku 1.8.2. nahoře máme dvě molekuly glukosy různě deuterované. Vpravo má glukosa dvanáct vodíků nahrazených deuteriem, kdežto vlevo má pouze nahrazených sedm vodíků. Vpravo dole pak máme deuterovanou vodu a vlevo dole tyrosin, u něhož došlo k isotopické záměně některých uhlíků. Takové selektivní izotopické značení je náročné, a přestože řadu izotopicky značených biomolekul lze zakoupit například od firmy Sigma Aldrich, jejich cena je řádově vyšší oproti cenám normálních látek.



Obrázek 1.8.2. – Isotopicky značené molekuly: dvě různě deuterované molekuly glukosy (nahore), deuterovaná voda (vpravo dole) a tyrosin, u něhož došlo k isotopické záměně některých uhlíků ¹²C za ¹³C (vlevo dole)

Jak tedy autotrofní mikroorganismy můžou sloužit pro produkci isotopicky značených biomolekul? Pokud jsou autotrofní řasy kultivovány v médiích s isotopicky

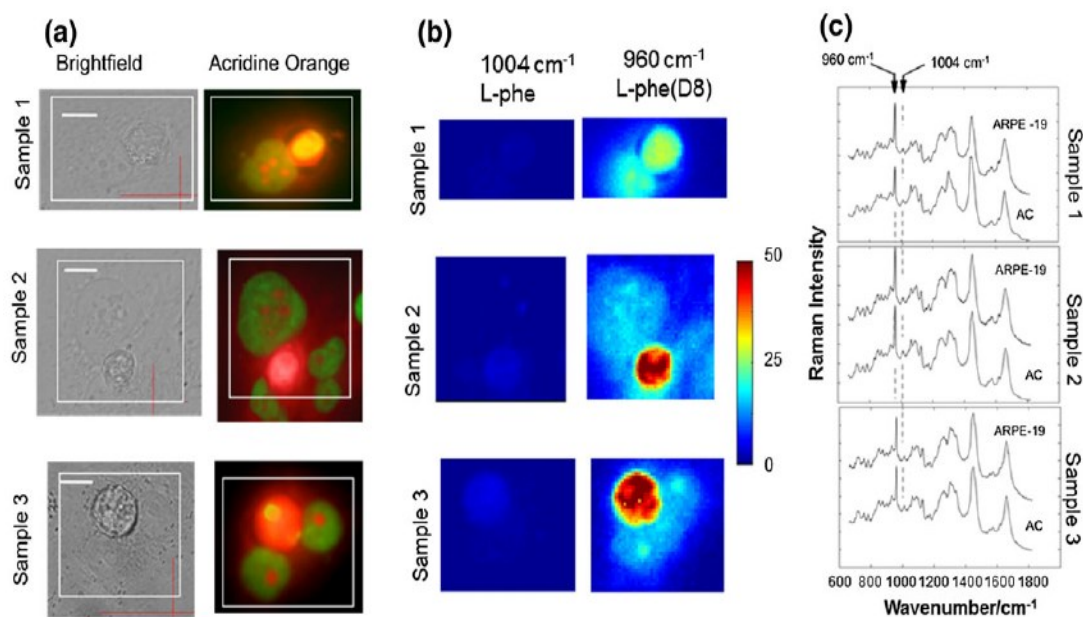
značenými anorganickými živinami, budou produkovat isotopicky značené biomolekuly (např. škrob nebo lipidy), které pak můžou sloužit jako substrát pro heterotrofní organismy. Vhodným výběrem organismů produkujících žádané biomolekuly je možno biosyntézou připravit i velice složité látky s vysokým stupněm dobře definovaného značení. Výjimkou je deuterace, protože rozdíl v hmotnostech vodíku a deuteria je ze všech isotopických substitucí největší a pro řadu organismů fatální. Studium deuterace v kulturách buněk může být náročné, protože jejich růst je deuterací omezen a produkují málo biologického materiálu pro standardní analytické metody. Tady může být řešením Ramanova mikroskopie, která si vystačí s velice malým množstvím vzorku. Kultury tedy možno pěstovat v malých množstvích a pro analýzu postačí pár buněk, které jsou z kultury odebrány a umístěny na podložní sklíčko. Pak naměříme Ramanova spektra, porovnáme je se známým Ramanovým spektrem isotopicky značených molekul, a také i neznačených molekul. Naměřená data zpracujeme statistickými metodami, vyhodnotíme a získáme informaci o probíhajících procesech.



Obrázek 1.8.3. – Měření dynamiky chemických map, obrázek napravo převzat z článku (MOJZEŠ, et al., 2020)

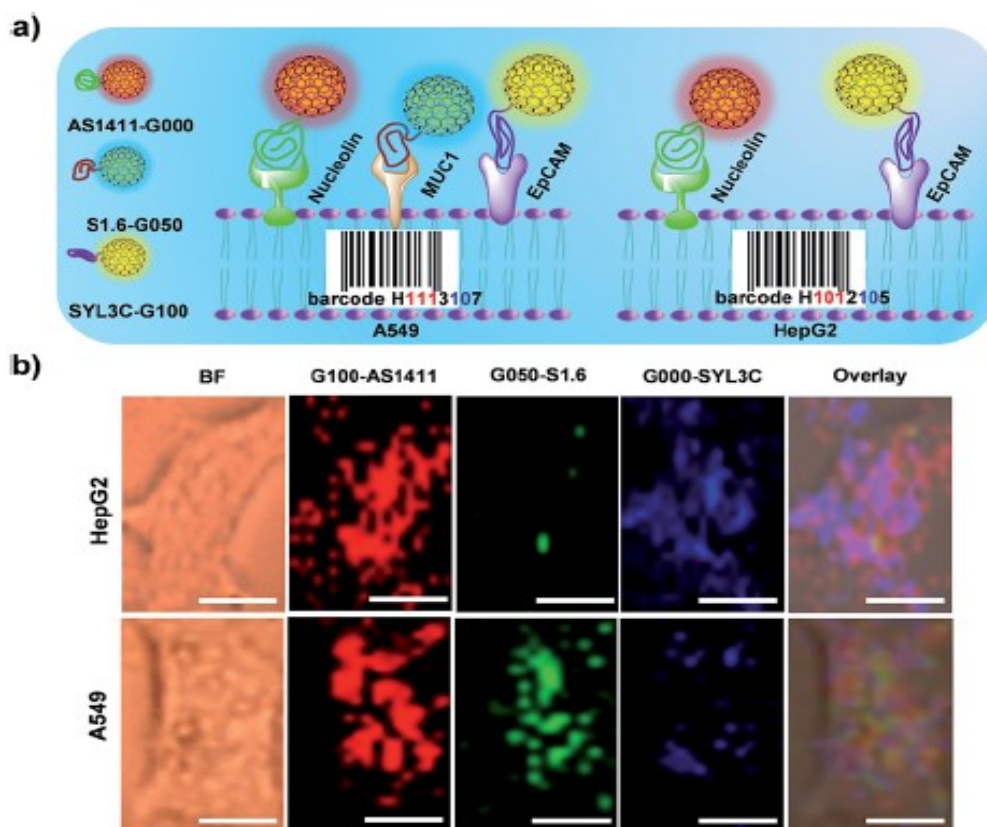
V rámci diplomové práce byla udělána literární rešerše z přibližně padesáti článků, které se týkají námi nastíněné problematiky a byly publikované v posledních třech letech. Všechny tyto články byly shrnuty do třech oddílů dle použité techniky.

Zprvė můžeme popsat interakci mezi buňkami a sledovat vývoj buněk v čase. Na obrázku 1.8.4. je zobrazení lidských buněk napadených prvokem *Acanthamoeba castellanii*. V části (a) jsou snímky ze světlého pole a snímky z naměřené fluorescence, v části (b) chemické mapy zobrazující signál z deuterovaného a nedeuterovaného fenylalaninu a v části (c) průměrné Ramanova spektra z trofozoitů *Acanthamoeba castellanii* a lidských buněk. Bílá čára na snímcích v světlém poli má velikost 10 μm . Obrázky pochází z článku (NAEMAT et al., 2018).



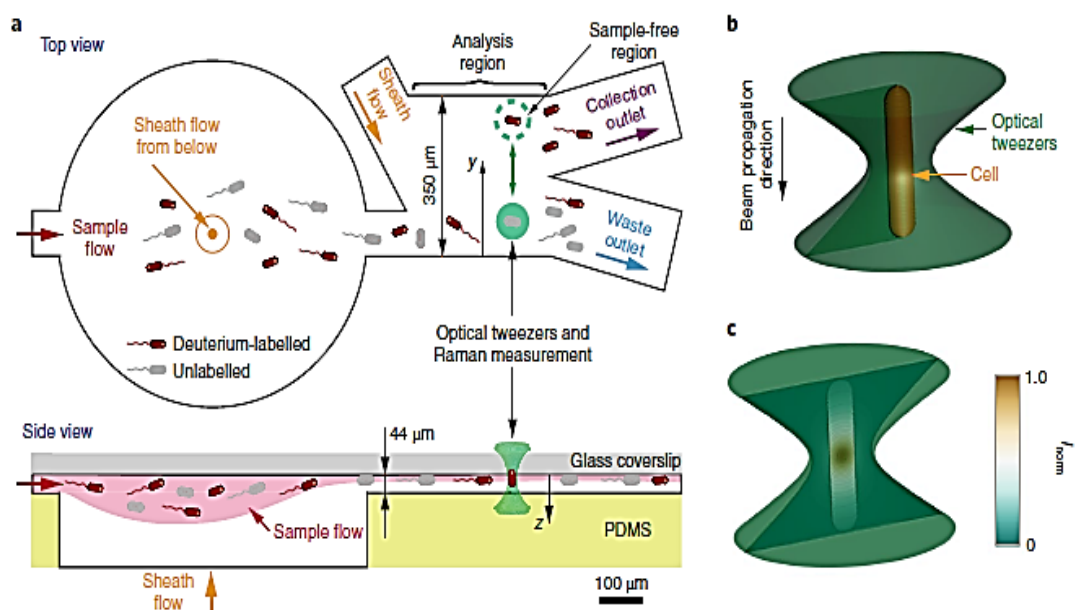
Obrázek 1.8.4 – Zobrazení napadených lidských buněk prvokem *Acanthamoeba castellanii* (NAEMAT, et al., 2018)

Druhé použití techniky je sledování metabolismu buněk, který si ilustrujeme na obrázku 1.8.5. V části a) v pravé části slidu jsou schémata třech typů vyvinutých značek pro dva typy rakovinotvorných buněk. Podle toho, jaké značky se na buňky navazují, si můžeme označit každý typ buněk jakýmsi čárovým kódem. V části b) je zpracovaný signál, který pochází z vyvinutých značek. Vidíme, že lze pomocí vyvinutých značek mapovat rakovinotvorné buňky, které vykazují určitou expresi proteinů na membráně. Obrázky pochází z článku (ZOU et al., 2018).



Obrázek 1.8.5. – Sledování metabolismu rakovinotvorných buněk (ZOU, *et al.*, 2018)

Třetí použití techniky je na třídění buněk pomocí optické pinzety. Na obrázku 1.8.6. máme znázorněn princip metody třídění buněk pomocí optické pinzety. V části **a** byly buňky vpraveny do mikrofluidního kanálku a následně pomocí laseru vpraveny do odpadního vývodu (waste outlet) nebo sbírajícího vývodu (collection outlet), v části **b** tyčinkovitá buňka umístěná v optické pinzetě má stejný směr jako je směr laseru a může dojít k její manipulaci, v části **c** je naměřená normovaná škála Ramanova signálu pocházejícího z buňky a tekutiny. Obrázky pochází z článku (LEE *et al.*, 2019).



Obrázek 1.8.6. – Princip metody třídění buněk pomocí optické pinzety (LEE, et al., 2019)

Podrobnější popis využití isotopicky značených látek v Ramanově mikroskopii živých buněk v letech 2018 až 2020 dále nalezneme v příloze B.

1.9. Nezáporná maticová faktorizace

V rámci zpracování chemických map jsme použili program Project Five Plus dodávaný výrobcem jako softwarový balík společně s aparaturou. Při zpracovávání dat jsme použili techniku, kterou výrobce udává pod názvem *True Component Analysis*. Na stránkách výrobce není zmíněno, jakou techniku přesně používá. Domníváme se, že tato technika je nezáporná maticová faktorizace, přičemž má akorát jiný specifický název a využívá algoritmy pro ni specifickou (aplikace na Ramanova spektra).

Jedná se o široce používaný nástroj pro analýzu vícedimenzionálních dat. Předpokladem je, že všechny vstupující data mají nezáporné hodnoty (například právě Ramanova spektra). Označme tedy matici R o m řádcích (například Ramanův posun) a n sloupcích (například intenzita Ramanova spektra) jako tzv. vstupní matici. Nezáporná maticová faktorizace má pak za cíl rozložit matici R následovně

$$R \approx ST \quad (11)$$

Matice $S = [s_1, \dots, s_k]$ je složena z k sloupců, jakýchsi k báзовých vektorů, s nezápornými hodnotami elementů a je vynásobena maticí T , která má také nezáporné

elementy. Důležitým dodatečným požadavkem na matice S a T je jejich řídkost. Existuje tedy velké množství algoritmů, které se snaží tuto vlastnost do modelu implementovat, a tedy tato metoda najde své využití v různých oblastech (REN et al., 2020), (REN et al., 2018), (MURRELL et al., 2011), (GEMULLA et al., 2011). Co nejlepší aproximace matice R součinem matic S a T můžeme dosáhnout například metodou nejmenších čtverců. (TANDON, 2010), (DHILLON et al., 2005)

1.10. Faktorová analýza

Analýza velkého množství dat, například právě spekter, může být velmi obtížný problém. V rozeznání charakteristik, které jsou pro spektra společné a i odlišné, je velkým pomocníkem právě faktorová analýza. Faktorová analýza je technika, která s pomocí matematických metod umožňuje určit nejnižší počet faktorů, které studovaný problém charakterizují. Mezi nejpoužívanější metodu faktorové analýzy řadíme metodu singulárního rozkladu matice. Uvažme, že máme reálnou matici A s m řádky a n sloupci a že $m \geq n$. Označme matici A^T jako transponovanou matici A . Singulární rozklad matice A je rozklad matice A na součin matic,

$$A = U\Sigma V^T \quad (12)$$

kde matice U je složena z n sloupců tvořících ortonormální množinu vlastních vektorů, které jsou spojeny s n vlastními čísly pozitivně semidefinitní matice AA^T . Následně pak matice $U^T U$ je jednotková matice. Ortonormální matice V je složena z n sloupců tvořících ortonormální množinu vlastních vektorů matice $A^T A$. Diagonální elementy diagonální matice Σ nazýváme singulární čísla σ_i . Jsou odmocninou z vlastních čísel matice $A^T A$. Předpokládáme, že

$$\sigma_1 \geq \sigma_2 \geq \dots \geq \sigma_n \geq 0 \quad (13)$$

Jestliže máme hodnotu matice A rovnu r , následně bude platit $\sigma_{r+1} = \sigma_{r+2} = \dots = \sigma_n = 0$. Je třeba dodat, že singulární rozklad matice A , má i jiné podoby. (WILKINSON, 1971), (STRANG, 2006), (BURA, 2020)

V této diplomové práci budou prvky matice A složeny z mnoha naměřených intenzit Ramanových spekter. Na každém řádku máme intenzity pro daný posun vlnočtů. Po singulárním rozkladu matice A musíme určit singulární čísla, tedy statistické váhy patřící danému subspektru, a na základě nich určit, jestli příslušné

subspektrum ještě významně přispívá k výslednému (experimentálnímu) spektru. Obvykle se od nějakého singulárního čísla jedná jen o šum, tyto hodnoty pak lze proložit lineární závislosti a tyto singulární hodnoty pak vylučujeme. To, kolik singulárních čísel bereme v úvahu, nazýváme faktorovou dimenzí analyzovaných dat. Výstupem faktorové analýzy kromě zmíněných singulárních hodnot a subspekter jsou také normalizované koeficienty udávající relativní zastoupení subspekter v experimentálních spektrech. (MALINOWSKI, 2002), (BURA, 2020)

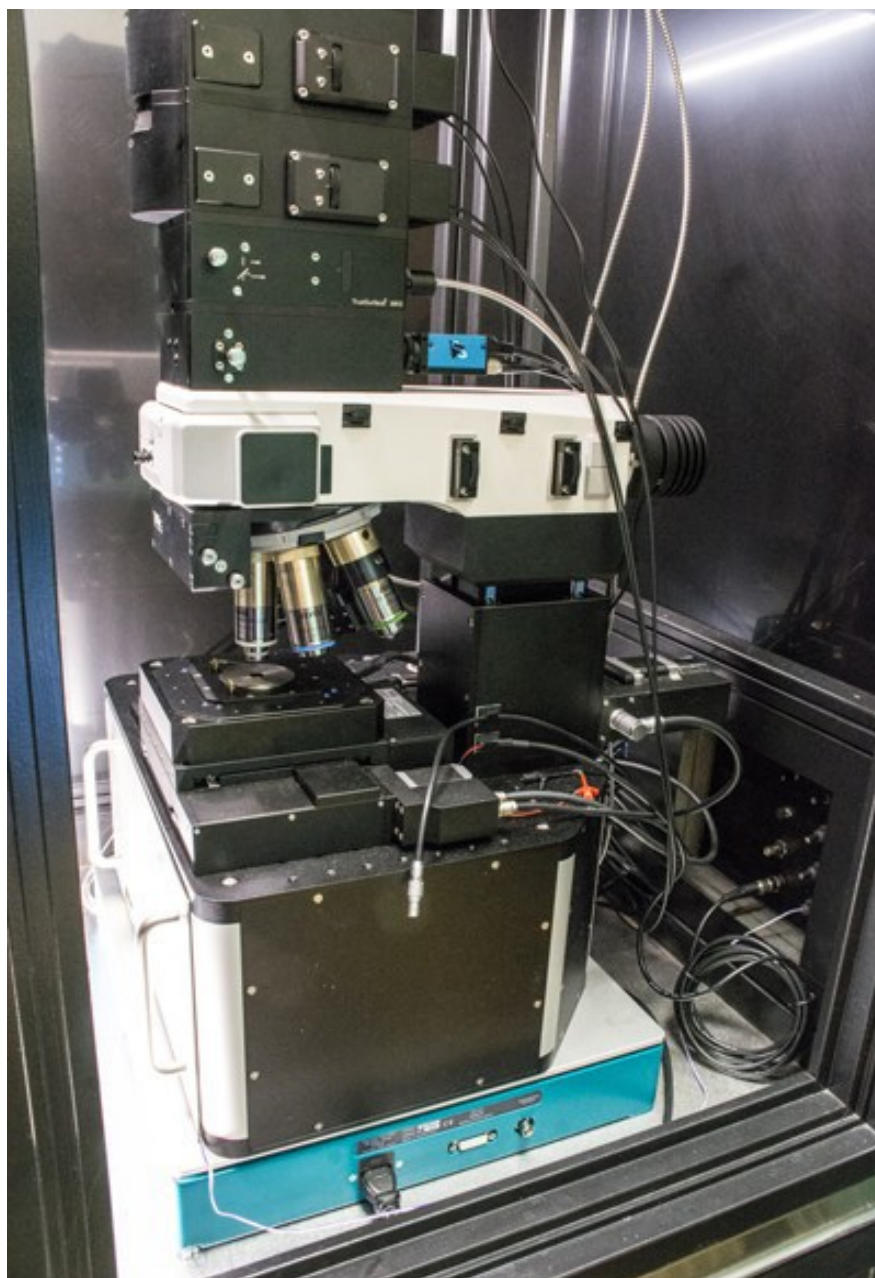
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Měřicí aparatury

Ústřední aparaturou, na které byla provedena většina všech měření k této práci, byl konfokální Ramanův mikrospektrometr WITec alpha300 RSA. Tento Ramanův mikroskop je ve světě dodáván německou společností WITec (Wissenschaftliche Instrumente und Technologie) a vlastní ho Univerzita Karlova v Praze. Konkrétně se nachází v laboratoři na Oddělení fyziky biomolekul Fyzikálního ústavu Matematicko-fyzikální fakulty a byl pořízen v rámci projektu „Modernizace vybavení pro fyzikální výzkum a vývoj“ v roce 2015.

Hlavní část mikrospektrometru WITec alpha300 RSA tvoří optický mikroskop Zeiss. Ten je v současnosti vybaven sadou suchých, vodních imerzních a imerzních olejových objektivů se zvětšením v rozmezí $10\times$ až $100\times$. V této práci byl pro měření spekter použit pouze vodní imerzní objektiv Olympus UPlanSApo se zvětšením $60\times$, s korekcí na nekonečno, s možností výkonu do 1,2 W a numerickou aperturou 1,3 a také byl použit suchý objektiv se zvětšením $50\times$. Osvětlení vzorku při pozorování mikroskopem zajišťuje kombinace LED (Light-Emitting Diode) diod, a to jak v episkopickém, tak diaskopickém osvětlení. Posuv vzorku pod objektivem je vykonáván motorizovaným stolcem v rovině xy . Také můžeme posouvat samostatným tělesem mikroskopu v z -ové ose a piezoelektrickým skenerem ve všech osách x , y , z , a to vše s přesností na desetiny mikrometrů u motorizovaného stolku a z posuvu, respektive na setiny mikrometrů u piezoelektrického skeneru. Mikrospektrometr je vybaven pěti lasery různých vlnových délek (s jejich patřičnými hranovými a notch filtry), je tedy možné přizpůsobovat vlnovou délku excitačního záření podle potřeb experimentu. Ve všech měřeních byl k excitaci použit laser s vlnovou délkou 532 nm. Záření ze vzorku fokusované na konfokální clonu samotného světlovodu je přivedeno do jednoho ze dvou mřížkových spektrografů vybavených CCD detektory, optimalizovanými pro detekci signálů v spektrálních oblastech 400 nm až 700 nm (Newton EMCCD, Andor) a 600 nm až 1000 nm (iDUS DU401A-BR-DD, Andor). Tyto vysoce citlivé detektory jsou chlazené na pracovní teploty až $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ speciálním chladicím Peltierovým oběhem. Ovládání celé aparatury zajišťuje speciální komerční software Control Five (WITec) dodávaný společně s mikrospektrometrem, který

ovládá i například otáčení mřížky, s čímž můžeme detekovat záření v spektrálních oblastech až po Ramanův posun 3900 cm^{-1} . Na obrázku 2.1.1. máme pořízenou fotku aparatury. Můžeme zahlédnout karusel s objektivy a pod jedním z objektivů prostor pro vzorek. Vidíme, že velkou součástí aparatury tvoří optická vlákna, která usnadňují manipulaci.



Obrázek 2.1.1. - Konfokální Ramanův mikrospektrometr WITec alpha300 RSA

V rámci měření absorpčních spekter guaninových krystalů byl použit dvoupaprskový ultrafialovo-viditelný absorpční spektrometr Specord 250 od firmy Analytik Jena s teplotně stabilizovaným kyvetovým prostorem umožňující velmi

přesná měření biomolekul v ultrafialovo-viditelné oblasti 190 nm až 1100 nm. K excitaci využívá halogenovou žárovku a deuteriovou výbojku. Aparatura se ovládá z externího počítače programem WinASPECT. V základní výbavě aparatury patří měření absorbance, spekter a kalibračních křivek. Specord 250 se hodí i pro měření opticky hustých suspenzí a zakalených vzorků. Obsahuje detektor s chlazením CDD (Cooled Double Detection) a monochromátor s vysokým rozlišením s nastavitelnou štěrbinou 0,5 nm až 4 nm. Dále obsahuje optické prvky firmy Zeiss a zabudovaný holmiový filtr pro kontrolu vlnových délek. Rychlost měření spekter je až 6000 nm za minutu. Na obrázku 2.1.2. máme vyfocenou aparaturu.



Obrázek 2.1.2. - Dvoupaprskový ultrafialovo-viditelný absorpční spektrometr Specord 250

Kromě zmíněných dvou aparatur byly použity další aparatury, které budou zmíněné v následující podkapitole o přípravě vzorků a postupu práce.

2.2. Příprava vzorků a postup práce

Hlavní částí při přípravě vzorků zahrnovala příprava vzorků pro měření Ramanových spekter živých buněk kultivovaných v médiích s různým procentuálním zastoupením těžké vody. Bylo tedy potřeba buňky získat, kultivovat je v patřičném médiu a v různých časových intervalech měřit jejich Ramanova spektra.

Živé buňky *A. carterae* byly získány od vedoucího práce docenta Mojzeše. Tyto buňky totiž delší dobu kultivuje v umělé mořské vodě na Oddělení fyziky biomolekul. Byly odebrány 4 ml média s buňkami a suspenze byla centrifugována přibližně po dobu deseti sekund. Následně byl odebrán supernatant (horní vrstva v mikrozkuhavce Eppendorf bez buněk) a zbylé zhuštěné buňky byly přeneseny do připraveného média o objemu 20 ml s různým složením těžké a deionizované vody.

Byly připraveny média s umělou mořskou vodou s procentuálním zastoupením těžké vody 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 90 % vůči zbylé deionizované vodě, a to s živinami dle následujícího protokolu uvedeného v tabulce 2.2.1.

Tento protokol vychází ze známého protokolu f/2 popsáného průkopníkem v oceánografii a akvakultuře Guillardem (SMITH, 1975). Médium neobsahuje žádné sacharidy ani jiný organický zdroj energie. Jako zdroj dusíku médium obsahuje NaNO_3 . Kromě toho médium obsahuje různé soli vytvářející správný osmotický tlak a dále vitamíny a kovové prvky pro správnou funkci enzymů. Rozpouštědlem pak byla buď D_2O , anebo deionizovaná H_2O .

Na této stránce vidíme, že protokol pro přípravu média se skládá ze suché složky a mokré složky. Nejprve se v 200 ml těžké vodě a deionizované vodě rozpustí suché složky. Následně je potřeba připravit mokré složky. Na další stránce máme tabulku 2.2.2. s popisem přípravy zásobních roztoků, z kterých se mokré složky připravují a odebírají.

A – suché složky	Počet miligramů pro 200 ml média
NaCl	4676
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	986
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	222
KBr	44
KCl	150
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	812
B – mokré složky	Počet mikrolitrů pro 200 ml média
H ₃ BO ₃	200
NaNO ₃	200
Vitamin Mix (skladovat při -18 °C)	100
TRIZMA	1000
TRACE METALS	200
FOSFÁT	200
SILIKÁT	200
SELEN	200

Tabulka 2.2.1. – Protokol pro přípravu umělé mořské vody (suché a mokré složky)

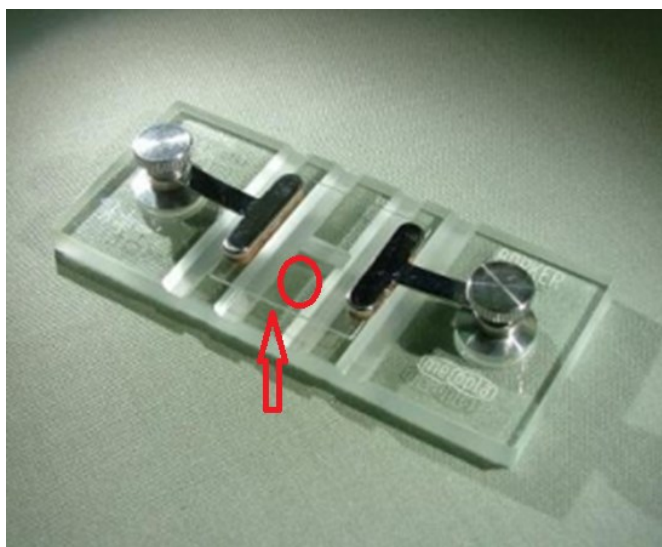
Zásobní roztoky	Výroba 10 ml každého ze zásobního roztoku
H ₃ BO ₃	123 mg rozpustit v 10 ml
NaNO ₃	750 mg rozpustit v 10 ml
Vitamin Mix (B1, B7, B12)	Nejdříve připravit zásobní roztoky vitamínů B7 a B12, a to 1 mg každého z nich rozpustit zvlášť v 1 ml deionizované vody. Následně 12,5 µl z každého zásobního roztoku přidat k 10 ml deionizované vody a navíc přidat 2 mg vitamínu B1.
TRIZMA	364,5 mg TRIS-hydrochloridu a 135,5 mg TRIZMA-base (Tris pure pH 10) přidat do 10 ml deionizované vody
FOSFÁT	56,5 mg NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O rozpustit v 10 ml
SILIKÁT	300 mg Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O rozpustit v 10 ml
SELEN	Nejdříve připravit zásobní roztok, a to 1,71 mg Na ₂ SeO ₃ rozpustit v 10 ml deionizované vody. Následně ze zásobního roztoku odebrat 0,1 ml a přidat ho k 9,9 ml deionizované vody.
TRACE METALS	Je potřeba připravit celkem 5 zásobních roztoků, a to následovně: 1) 49 mg CuSO ₄ · 5 H ₂ O rozpustit v 5 ml, 2) 110 mg ZnSO ₄ · 7 H ₂ O rozpustit v 5 ml, 3) 50 mg CoCl ₂ · 6 H ₂ O rozpustit v 5 ml, 4) 900 mg MnCl ₂ · 4 H ₂ O rozpustit v 5 ml, 5) 160,9 mg (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 2 H ₂ O rozpustit v 5 ml. Poté v 10 ml deionizované vody rozpustíme 44 mg Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O a po rozpuštění přidáme 31,5 mg FeCl ₃ · 6 H ₂ O. Následně rozpustíme a přidáme z každého z pěti připravených zásobních roztoků 200 µl a zamícháme.

Tabulka 2.2.2. – Protokol pro přípravu umělé mořské vody (zásobní roztoky)

Byly tak připraveny dvě média základní umělé mořské vody (artificial sea water), jejichž rozpouštědlem byla deionizovaná voda nebo těžká voda. Následně pak

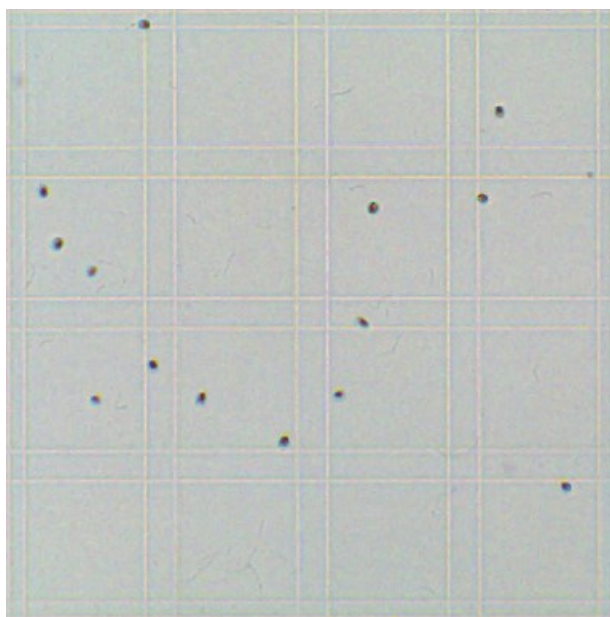
byly tyto dvě média smíchány ve správném poměru v celkovém množství 20 ml do standardních 50 ml láhví pro buněčné kultury a připravena pro přeočkování buněk. Buňky byly přeočkovány z původního média z umělé mořské vody složené pouze z deionizované vody do média s patřičným procentuálním zastoupením těžké vody, a to 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 90 %. Byla měřena jejich Ramanova spektra a byl sledován jejich vývoj v čase pomocí Bürkerovy komůrky.

Počítání buněk pomocí Bürkerovy komůrky bylo následovné. Na obrázku 2.2.1. máme Bürkerovu komůrku pro lepší popis postupu práce při měření.



Obrázek 2.2.1. – Bürkerova komůrka

Z média s živými buňkami (dále kultury) bylo odebráno devět mikrolitrů a přeneseno mezi krycí a podložní sklo (naznačeno červenou šipkou) tak, aby zaplnilo plochu mezi rýhami (plocha označena kolečkem). Toto bylo provedeno i z druhé strany. Následně na Ramanově mikroskopu Witec bylo pomocí objektivu se zvětšením $5\times$ získáno celkově osmnáct snímků čtverců (jsou vyryty v oblasti červeného kolečka), a to z každé strany Bürkerovy komůrky bylo získáno devět snímků čtverců. Na obrázku 2.2.2. máme jeden snímek čtverce z celkových osmnácti s živými buňkami. Je možné je identifikovat jako černé tečky (je jich čtrnáct). Tyto snímky byly dále zpracovány v programu Image J nebo buňky byly počítány přímo ze snímků. Z počtů buněk na osmnácti snímcích jsme pak spočítali aritmetický průměr a směrodatnou odchylku. Pokud tyto hodnoty vynásobíme faktorem deset tisíc (vypočteno dle parametrů čtverců a vzdáleností mezi krycím a podložním sklem) dostaneme počet buněk nacházejících se v 1 ml.



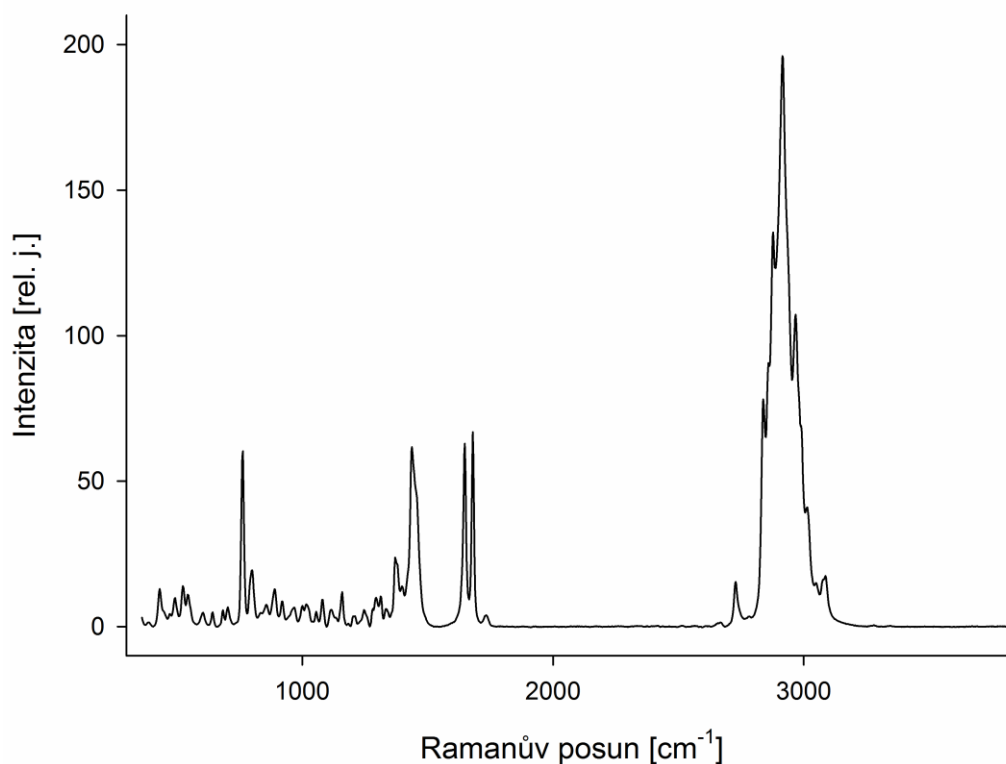
Obrázek 2.2.2. – Snímek z Bürkerovy komůrky

Pro přípravu vzorků k měření Ramanových spekter živých buněk byl proveden odlišný postup. Obvykle bylo z kultury odebráno 200 ml do mikrozkušavky Eppendorf (eppendorfky) a suspenze byla centrifugována při zrychlení 2000 g po dobu přibližně dvacet sekund. Někdy bylo potřeba odebrat větší objem z kultury, abychom mohli buňky ve vzorku pozorovat. Pokud se objevila po centrifugaci naspod eppendorfky tečka o průměru alespoň 500 μm , bylo to dostatečné. Dále byl odebrán supernatant a ke zhuštěným buňkám bylo přidáno mořské médium z deionizované vody, ale pouze se solemi kvůli osmotickému tlaku (bez dalších živin). Přidání tohoto média ke zhuštěným buňkám mělo také způsobit, že se ve vzorku nevyskytovala těžká voda, a v Ramanových spektrech jsme tedy nepozorovali pro nás parazitický signál samotné těžké vody. Následně byl opakován postup s centrifugací a odebráním supernatantu a ke zhuštěné buněčné suspenzi bylo přidáno pět mikrolitrů 1 % roztoku agarózy. Vzniklá suspenze se promíchá a zajistí malou pohyblivost buněk. Následně se přenese pět mikrolitrů na podložní sklíčko a navrch se jemně přitlačí krycí sklíčko. Jemný přitlak eliminuje distribuci buněk v různých rovinách a vytvoří mezi sklíčky buněčnou monovrstvu. Okraj sklíčka se proti úniku a odpařování vzorku utěsní pomocí speciálního fixačního laku CoverGripTM Coverslip Sealant. Takto připravený preparát poté vložíme do Ramanova mikroskopu a upevníme na mikroskopický stolek. Můžeme tedy měřit Ramanova spektra a získat chemické mapy molekul.

Ve všech měřeních byl k excitaci použit laser s vlnovou délkou 532 nm. Výkon laseru byl laděn pomocí utahovacího šroubu v rozmezí 10 μ W až 34 mW a byl měřen vestavěným měřičem výkonu. Pro měření spekter karotenoidů byl použit laser o výkonu 10 μ W, jinak byl použit laser s plným výkonem 34 mW podobně jako v měření guaninových krystalů. Před měřením s 34 mW výkonem laseru pro chemické mapování molekul jako lipidů, plastidů, škrobu a guaninu bylo nutné vzorek fotovybělit, abychom odstranili nežádoucí fluorescenční pozadí. Fotovybělení na mikrořasách jsme udělali tak, že jsme zvedli objektiv 30 μ m nad zaostřenou rovinu a nefokusem svazkem s plným výkonem ozařovali vzorek přibližně minutu. Následně po fotovybělení buněk jsme začali buňky chemicky mapovat, tj. měřit Ramanova spektra buněk bod po bodu s krokem 200 nm. Mapovaná oblast byla vždy individuálně přizpůsobena rozměrům měřené buňky, případně jejich shluku. V každém pixelu měřené oblasti byl snímán signál typicky po dobu 0,1 s. Doba tohoto mapování je tedy přímo úměrná nastaveným parametrům a pohybuje se v řádu několika minut. Takto jsme vybrali a postupně zmapovali vždy několik reprezentativních buněk měřené kultury a získali tak informace o výskytu a distribuci molekul v jejich organelách. Zároveň můžeme z naměřených dat porovnávat individuální rozdíly v molekulovém složení mezi jednotlivými buňkami kultury.

Příprava guaninových krystalů byla provedena čtyřikrát, a to různými způsoby (dále označujeme měření A, B, C a D). Ve všech měřeních bylo na začátku do zkumavek přidáno celkově 5 ml o daném procentuálním zastoupení deionizované a těžké vody. V měření A bylo připraveno několik vzorků s procentuálním zastoupením těžké vody 0 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % a 100 %. Do každé ze zkumavek bylo přidáno větší množství guaninu, než je jeho maximální rozpustnost. Naspod zkumavek se pak usadila vrstva guaninu, který se nerozpustil. Následně se nechali zkumavky kývat pro lepší rozpuštění asi jednu hodinu na kývačce. Poté se nechali okem viditelné nerozpuštěné krystaly guaninu usadit opět naspod zkumavek a byly připraveny vždy dva vzorky o objemu 2 ml, a to pro měření za studena (dále cold), kdy jsme vzorek neohřívali, a pro měření za tepla (dále hot), kdy jsme nechali vzorek ohřívat přes noc při teplotě 80 °C. Měli jsme pak například vzorek s procentuálním zastoupením těžké vody 60 % připravený za tepla, uvádíme ho jako 60 hot. Připravené vzorky se pak nechali zamrazit. Zde je zajímavé podotknout, že těžká voda mrzla rychleji než voda deionizovaná (má vyšší bod tání, a to 3,8 °C (YANG, 2016)). Zmražené vzorky se pak daly lyofilizovat při tlaku 20 hPa a teplotě

60 °C v lyofilizátoru Concentrator 5301 od firmy Eppendorf. Po lyofilizaci jsme mohli vidět na spod eppendorfky vykrystalizovaný guanin. Přidali jsme k němu 5 μ l deionizované vody a centrifugovali takto připravený vzorek. Následně jsme znovu odebrali 5 μ l a nanесли je na podložní sklíčko podobně jako při přípravě živých buněk. Na takto nanesenou kapku jsme pak přiložili krycí sklíčko a zafixovali jeho okraje pomocí fixačního laku CoverGrip™ Coverslip Sealant. V rámci měření Ramanových spekter je možné nešikovným způsobem kontaminovat měřené místo tímto fixačním lakem. Pro jistotu bylo naměřeno Ramanovo spektrum fixačního laku, abychom měli povědomí o některých možných pásech, které by při kontaminaci byly pozorovatelné. Na obrázku 2.2.3. máme Ramanovo spektrum fixačního laku CoverGrip™ Coverslip Sealant.



Obrázek 2.2.3. – Ramanovo spektrum fixačního laku CoverGrip™ Coverslip Sealant

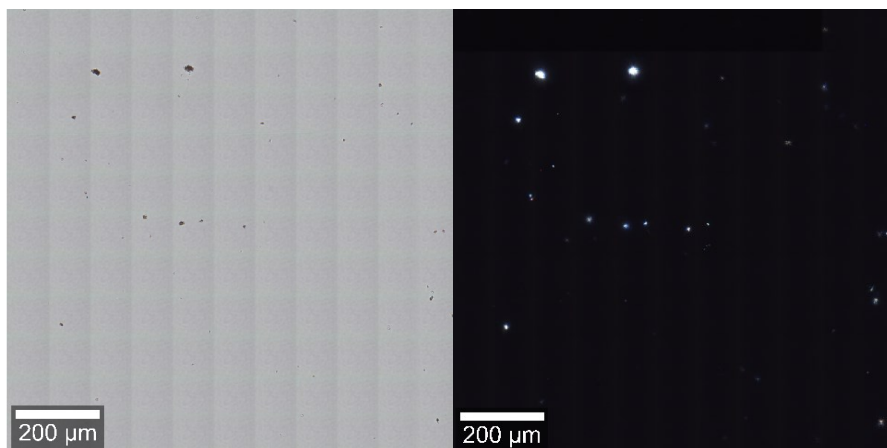
Měření B proběhlo mírně odlišným způsobem. Při přenášení roztoků guaninu do 2 ml eppendorfky jsme roztoky profiltrovali, abychom podpořili deuteraci guaninu. Filtrace proběhla přes 220 nm filtry Millex®-GP pomocí injekčních stříkaček. Kromě toho byl navíc změřena absorpční spektra před filtrací a po filtraci. Dále roztoky guaninů pro přípravu za tepla (hot) byly oproti předešlému experimentu ohřívány přes

víkend, tedy více než šedesát hodin. Cílem bylo úplně deuterovat všechny přístupné molekuly guaninu. Byly připraveny pouze čtyři vzorky 0 hot, 0 cold, 100 cold, 100 hot.

V měření C bylo připraveno stejné množství vzorků jako v měření A. Proběhla filtrace podobně jako v měření B a byla změřena absorpční spektra. Vzorky připravené za tepla byly ohřívány pouze dvacet hodin. Filtrace proběhla přes 20 nm filtry Whatman® Anotop® od firmy Sigma-Aldrich pomocí injekčních stříkaček.

V měření D byly připraveny opět čtyři vzorky, a to 0 hot, 0 cold, 100 cold, 100 hot. Filtrace proběhla přes 3 kDa centrifugační filtry Amicon® Ultra-15. S uvážením molekulární hmotnosti guaninu 151,13 Da by filtr neměl propustit více než dvacet molekul guaninů. (NATIONAL, Citace z 3. 6. 2021) Pokud by krystaly byly ve tvaru krychlí, mohla by být nanejvýše propuštěna krychle o hraně třech molekul guaninů, kdy jedna molekula guaninu není vůbec přístupná deuteraci.

K měření na Ramanovu mikroskopu byly využity některé jeho další součásti. Přímo na Ramanovu mikroskopu jsme totiž mohli využít polarizátorů a tzv. stitching snímku (kombinace více snímků v jednom velkém snímku), který nám může rychle pomoci zmapovat oblast o velikosti přibližně 1 mm². Na obrázku 2.2.4. máme dva stitching snímky vzorku s guaninovými krystaly, a to bez zkřížených polarizátorů (vlevo) a se zkříženými polarizátory (vpravo).



Obrázek 2.2.4. – Dva panoramatické (stitching snímky) mikroskopické snímky guaninových krystalů (vlevo bez zkřížených polarizátorů a vpravo se zkříženými polarizátory)

2.3. Programy ke zpracování dat

V rámci zpracovávání dat byly v diplomové práci použity tyto programy: Main2013, Project Five Plus, WITec TrueMatch 5.1, SigmaPlot 12.5, Excel, Gaussian 09, GaussView 6.0.16 a ImageJ 1.53e.

V posledně zmíněném programu ImageJ 1.53e byly zpracovávány snímky z Bürkerovy komůrky. Tento program byl vyvinutý na Javě v National Institutes of Health a Laboratory for Optical and Computational Instrumentation a je volně přístupný na internetu. Přímou v programu bylo třeba nejdříve snímek ořezat a následně změnit jeho typ z 24-bitové hloubky RGB do 32-bitové hloubky odstínu šedi. Následně bylo možné použít funkci *Threshold*, pomocí které jsme na obrázku ponechaly pouhé černé buňky. Dále bylo využito dalších funkcí jako například *Fill holes* nebo *Watershed*, díky kterým jsme prázdná místa uprostřed buněk mohli vyplnit černou barvou nebo mohli jednotlivé buňky od sebe rozdělit. Nakonec byly buňky počítány pomocí funkce *Analyze particles*. Pokud bylo buněk málo (méně než dvacet) nebo byly buňky hůře zpracovatelné, byly počítány ručně.

V programu GaussView 6.0.16 od společnosti Gaussian, Inc. byly pořízeny některé obrázky a byly v něm vytvořeny vstupní data pro kalkulaci energií a spekter guaninu a guanosinu v přiloženém zápočtovém projektu. V programu Gaussian 09 od společnosti Gaussian, Inc. byly pak optimalizovány molekuly guaninu a guanosinu za pomoci výpočetní techniky Karlovského klastru na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. V programu Excel byly vytvořeny jednoduché tabulky a vypočteny základní údaje jako směrodatná odchylka, aritmetický průměr a suma pomocí systému dynamických rovnic. Také byly vytvořeny pro jednoduchou rychlou kontrolu grafy.

V programu SigmaPlot 12.5 od společnosti Systat Software Inc. byly autorem vytvořeny všechny grafy v této práci a dále v programu byla fitována izolovaná spektra guaninů z živých buněk na uměle připravená standardní Ramanova spektra dodaná od vedoucího práce docenta Mojžeše. Podobně byla fitována Ramanova spektra a subspektra uměle připravených guaninových krystalů na zmíněné standardní Ramanova spektra. Oproti programu Excel bylo využito nedynamické vlastnosti polí tabulky.

Programy Project Five Plus a WITec TrueMatch 5.1 pochází od společnosti WITec. V programu WITec TrueMatch 5.1 byla porovnáována izolovaná spektra

s databází biomolekul. V této databázi je možné rozložit izolovaná spektra až do tří komponent a zjistit jejich procentuální zastoupení. V programu Project Five Plus byla zpracovávána naměřená Ramanova spektra. Bylo potřeba spektrum ořezat pomocí funkce *Crop* na rozsah 362 cm^{-1} až 3812 cm^{-1} . Následně byly odstraněny pomocí funkce *Cosmic Ray Removal* pásy od kosmického záření. Tyto vysoce energetické fotony interagují s detektorem a obvykle je v chemických mapách můžeme vidět na dvou pixelech vedle sebe. Mají velmi úzké vysoce intenzivní pásy, a proto je lze dobře rozeznat. Někdy automatické odstraňování těchto pásů nefungovalo a bylo potřeba pásy odstranit pomocí funkce *Repair* ručně. Od vzniklého spektra jsme mohli odečíst pozadí pomocí funkce *Graph Background Substraction*, a to jsme obvykle odečítali pomocí polynomu čtvrtého nebo šestého stupně. Je nutné dodat, že odečítání pozadí pomocí polynomu probíhalo automaticky dle vlastností spektra. Bylo nutné vynechat některé oblasti, abychom rozumně odečetli spektrum. Nakonec bylo použito funkce *True Component Analysis*, pomocí které jsme spektra mohli rozložit do několika vybraných komponent. Tyto komponenty jsme mohli zprůměrovat přes pixely a odečítat od sebe komponenty navzájem.

Program *Main 2013* byl vytvořen doktorem Palackým a docentem Mojžešem na Matematicko-fyzikální fakultě Univerzity Karlovy v Praze. Disponuje funkcemi jako *eqscale*, pomocí které jsme u spekter zařídili stejnou vzdálenost mezi sousedními Ramanovými posuny, a *background – older version*, pomocí které jsme spektra zpracovali metodou singulárního rozkladu a mohli v ní dokonce odečítat ručně pozadí pomocí polynomů nebo spline křivek.

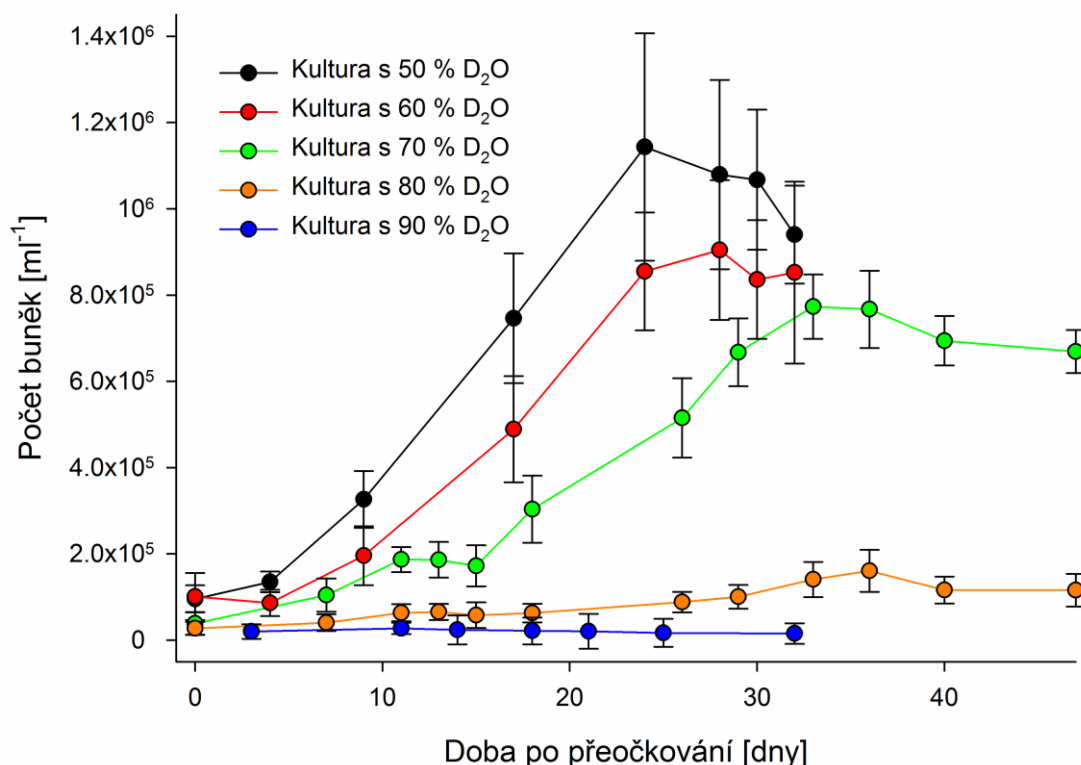
3. VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUZE

3.1. Kultivace a počítání živých buněk

Přeočkování buněk do nového média nebylo provedeno ve stejný den pro všechny kultury pěstované v médiu s různým procentuálním zastoupením těžké vody. Nejprve byly přeočkovány buňky do média s 50 % a 60 % zastoupením těžké vody. Buňky se zpočátku aklimatizovaly na nové prostředí a tolik nerostly. Po devíti dnech jsme mohli vidět, že buňky ztrojnásobily svůj počet. Po sedmnácti dnech jich bylo dokonce sedmkrát více než na začátku a bylo možné vidět, že buňky rostou a jsou aklimatizované. Buňky byly tedy přeočkovány do nového média s procentuálním zastoupením těžké vody 70 % a 80 %. Z kultury s 50 % zastoupením těžké vody byly odebrány 2 ml média s buňkami a byly centrifugovány. Následně byl odebrán supernatant a zhuštěná suspenze byla přenesena do média se 70 % zastoupením těžké vody. Podobně byly buňky přeočkovány z kultury s 60 % zastoupením těžké vody do média s 80 % zastoupením těžké vody. Tyto nové kultury se také musely aklimatizovat a zpočátku nerostly. Kultura se 70 % zastoupením těžké vody se za jedenáct dnů zčtyřnásobila, kdežto kultura s 80 % zastoupením těžké vody se pouze zdvojnásobila. Bylo možné upozorovat, že buňky v médiu s 80 % zastoupením těžké vody rostou výrazně hůře. Ještě více jsme si toho mohli všimnout po čtyřech týdnech, kdy buňky se 70 % zastoupením těžké vody se téměř zesedmnáctinásobily a buňky s 80 % zastoupením těžké vody se pouze zčtyřnásobily. I přesto, že buňky v médiu s 80 % zastoupením těžké vody tolik nerostly, pokusili jsme se buňky přeočkovat dále do média s 90 % zastoupením těžké vody. Buňky byly přeočkovány z patnácti dní staré kultury se 70 % zastoupením těžké vody podobně jako v předchozím přeočkování. Je třeba dodat, že objem kultury se 70 % zastoupením těžké vody byl po osmnácti dnech už jen 12 ml a nejmenší ze všech kultur. Podobně tomu bylo u ostatních kultur, ale jejich objem byl větší. Kultura s 90 % zastoupením těžké vody už téměř nerostla. Mohli jsme vidět zdvojnásobení počtu buněk po dvaceti jedna dnech, dále už ale kultura nerostla. Zmíněné kultury s 50 % a s 60 % zastoupením těžké vody byly po čtyřech týdnech přeočkovány do nového média podobně jako v předchozích přeočkováních s cílem izolovat co nejčistší Ramanova spektra guaninů. Podobně byla vytvořena nová kultura s 90 % zastoupením

těžké vody, a to z kultury s 80 % zastoupením těžké vody a z kultury se 70 % zastoupením těžké vody.

Ze všech kultur byly pak na buňkách pořizovány snímky ve světle poli bez zkřížených polarizátorů a se zkříženými polarizátory. Dále byla měřena Ramanova spektra buněk a sledována jejich hustota počítáním pomocí Bürkerovy komůrky. Mohli jsme tak rychle zjistit informaci o stavu a růstu počtu buněk. Na obrázku 3.1.1. máme znázorněnou závislost počtu živých buněk (včetně směrodatných odchylek) v 1 ml na době přeočkování. Tuto závislost máme znázorněnou pro všechny připravené kultury v médiu s procentuálním zastoupením těžké vody 50 %, 60 %, 70 %, 80 % a 90 %. Vidíme charakteristiku, kterou jsme již popsali. Kultura v médiu s větším procentuálním zastoupením těžké vody hůře roste. Ale i přesto, že kultury se zastoupením těžké vody 80 % a 90 % podstatně hůře rostly než ostatní kultury, byli jsme schopni izolovat spektra lipidů, karotenoidů, škrobu, plastidů a hlavně guaninu. Právě na guanin jsme se v této práci zaměřili.

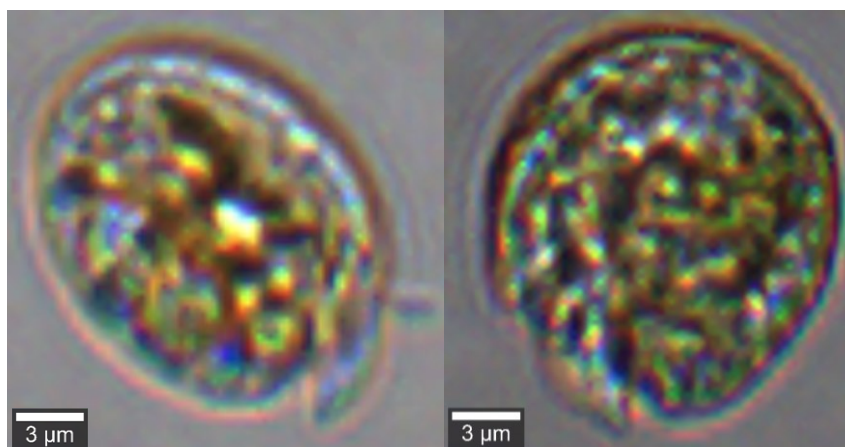


Obrázek 3.1.1. – Růst buněk *A. carterae* v médiu s příslušným obsahem těžké vody

3.2. Morfologie a pohyblivost buněk

Před samotným měřením Ramanových spekter byly pořízeny snímky ve světlém poli a v tmavém poli se zkříženými polarizátory. I přesto, že chemické mapy poskytnou velmi širokou paletu informací, hodí se k rychlé charakterizaci buněk si popsat jejich základní vlastnosti jako jejich tvar, velikost, pohyblivost, barvu a lokalizaci některých organel.

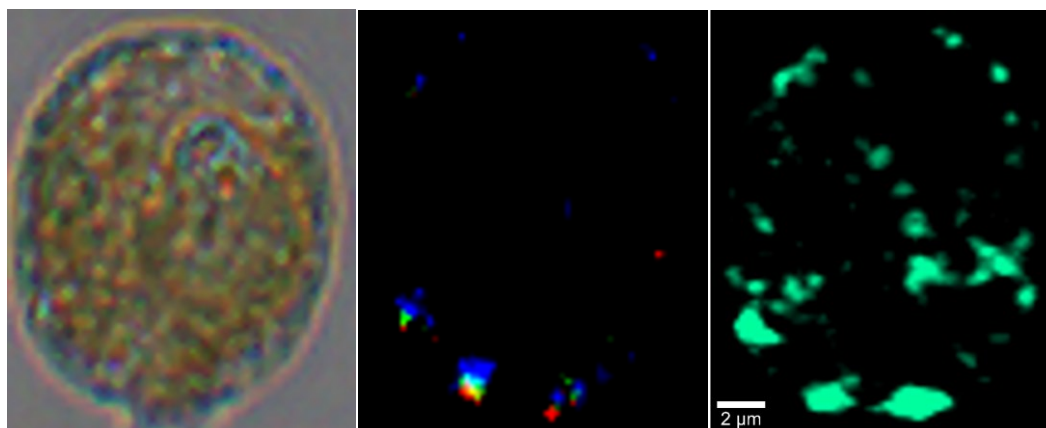
Zdravé buňky *A. carterae* mají podlouhlý tvar, jsou barevné (zeleno-žluté, zeleno-hnědé) a jsou pohyblivé (např. mají pohyblivé bičíky). Poprvé byly popsány fykologem Hulburtem už v roce 1957. (HULBURT, 1957) Vzhledem k velkému množství pořízených snímků a k jejich stejným charakteristikám pro danou dobu po přeočkování předložím jen některé snímky, na kterých si popíšeme stav buněk. Všechny kultury buněk kromě kultury s 90 % zastoupením těžké vody v médiu vykazovaly podlouhlé tvary o velikosti 16 μm na délku a 12 μm na šířku. U zbylé kultury měly buňky kulovitý tvar o průměru 16 μm , viz obrázek 3.2.1. Také byly téměř nepohyblivé. U ostatních buněk byla tendence větší pohyblivosti buněk v exponenciální fázi růstu buněk a větší pohyblivosti buněk pro danou fázi kultury v médiu s menším procentuálním zastoupením D_2O .



Obrázek 3.2.1. – Obvyklý protáhlý tvar buněk (vlevo) a kulovitý tvar buněk u kultury s 90 % zastoupením D_2O v médiu (vpravo)

Pro rychlé ověření syntetizovaného guaninu v buňkách stačilo pozorovat buňky v světlém poli pomocí zkřížených polarizátorů. Toto bylo několikrát prověřeno pomocí změřených Ramanových spekter, rozkladu spektra do lineárních spekter chemických látek a vytvoření chemických map (včetně chemické mapy guaninu). Na

obrázku 3.2.2. máme obrázky stejné buňky v různém kontrastu. Chemická mapa guaninu nám stále poskytuje daleko důvěrnější a přesnější informaci o obsahu guaninu v buňce než pouhý pořizovaný snímek v světlém poli s využitím polarizátorů.

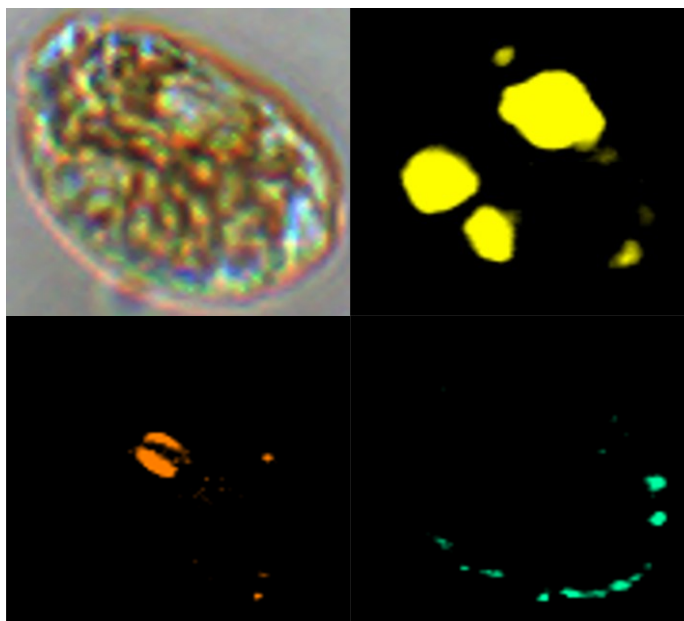


Obrázek 3.2.2. – Stejná buňka naměřena v různém kontrastu: ve světlém poli (vlevo), v světlém poli pomocí zkřížených polarizátorů (uprostřed) a pomocí chemické mapy guaninu (vpravo)

Krystaly guaninu, které můžeme pozorovat na snímku v světlém poli nebo na chemické mapě jsou obvykle lokalizovány na okrajích buňky. Na obrázku 3.2.2. máme příklad lokalizace krystalů guaninu i uvnitř buňky. Tato lokalizace byla ojedinělá mezi desítkami buněk a vždy na téže buňce byla navíc viditelná lokalizace krystalů guaninu i na okrajích buňky. Na okraji buňky rozumíme vzdálenost maximálně 2 μm od buněčné stěny.

Kromě pozorovatelných guaninových krystalů v světlém poli lze pozorovat větší lipidová tělíska. Jedná se o nebarevné kulové útvary, které se obvykle nacházejí mimo střed buňky. Přítomnost malých lipidových tělísek ale není ze snímku ve světlém poli viditelná. K přesnější informaci o lokalizaci tělísek poskytne opět chemická mapa, tentokrát lipidů. Na obrázku 3.2.3. máme porovnání snímků ve světlém poli (vlevo nahoře) a chemické mapy lipidů (vpravo nahoře) získané pomocí Ramanovy mikroskopie. Vidíme, že menší kulovité nebarevné tělíska lipidů se ztrácí na pozadí za jinými strukturami buňky. Na obrázku 3.2.3. také máme chemickou mapu guaninu (s jeho obvyklou distribucí na okraji buňky) a chemickou mapu škrobu. Z porovnání chemické mapy škrobu a snímku ve světlém poli vidíme, že nelze přesně přisoudit strukturu škrobu (dvou granulí) ke snímku ve světlém poli. Je nutné dodat,

že někdy tyto granulovité struktury možné určit jsou, ale často se pletou se strukturou plastidů a jiných struktur v buňce.

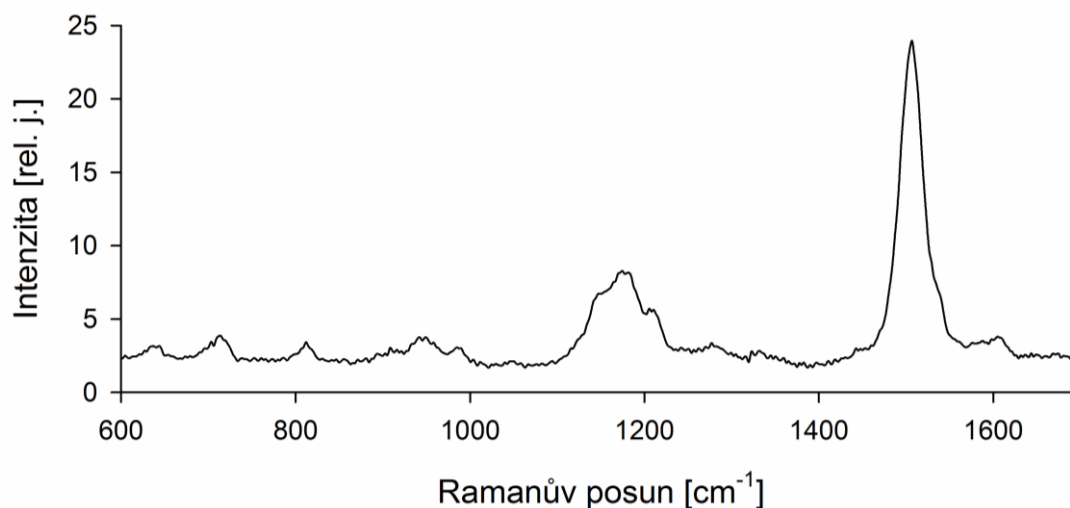


Obrázek 3.2.3. – Stejná buňka naměřena v různém kontrastu: ve světlém poli (vlevo nahoře), pomocí chemické mapy lipidů (vpravo nahoře), chemické mapy škrobu (vlevo dole) a chemické mapy guaninu (vpravo dole)

3.3. Chemické mapy živých buněk

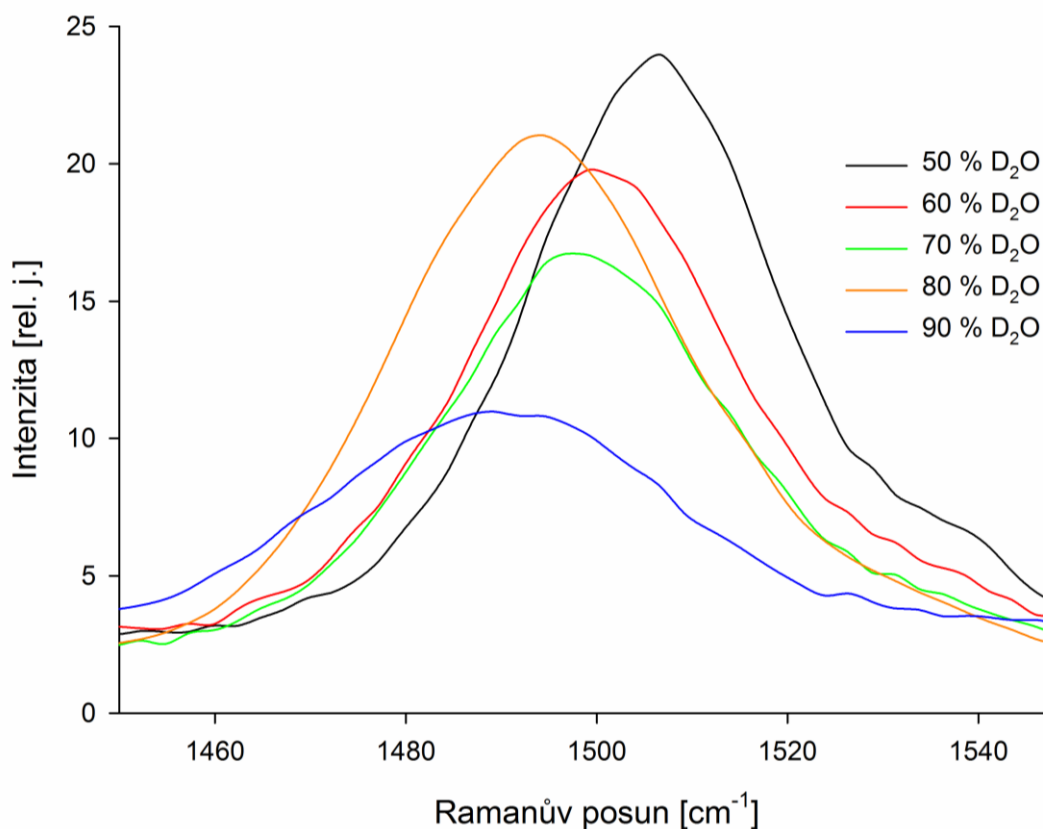
V předešlé podkapitole jsme si pověděli o důležitosti, důvěryhodnosti a přesnosti chemických map při určování a lokalizaci chemických látek v buňce. Naměření Ramanových spekter a sestrojování chemických map hraje důležitou roli při získávání dalších informací o buňce. Tato práce je hlavně zaměřena na guanin a jeho chemické mapy. Ramanova spektra byla změřena tedy v daných časových intervalech tak, abychom mohli extrahovat kvalitní spektra guaninu z buněk. Kromě toho byla extrahována spektra karotenoidů, škrobu, plastidů, lipidů a umělé mořské vody. Jejich chemické mapy byly porovnány v závislosti na době po přeočkování a procentuálním zastoupením těžké vody v médiu.

Karotenoidy byly měřeny zvlášť při nižším výkonu laseru tak, abychom je při měření nezničili. Mohli jsme pozorovat rezonanční Ramanovo spektrum, jehož některé pásy se posouvaly dle procentuálního zastoupení těžké vody v kultuře. Na obrázku 3.3.1. máme extrahované spektrum z buňky, která rostla v médiu s 50 % zastoupením těžké vody.



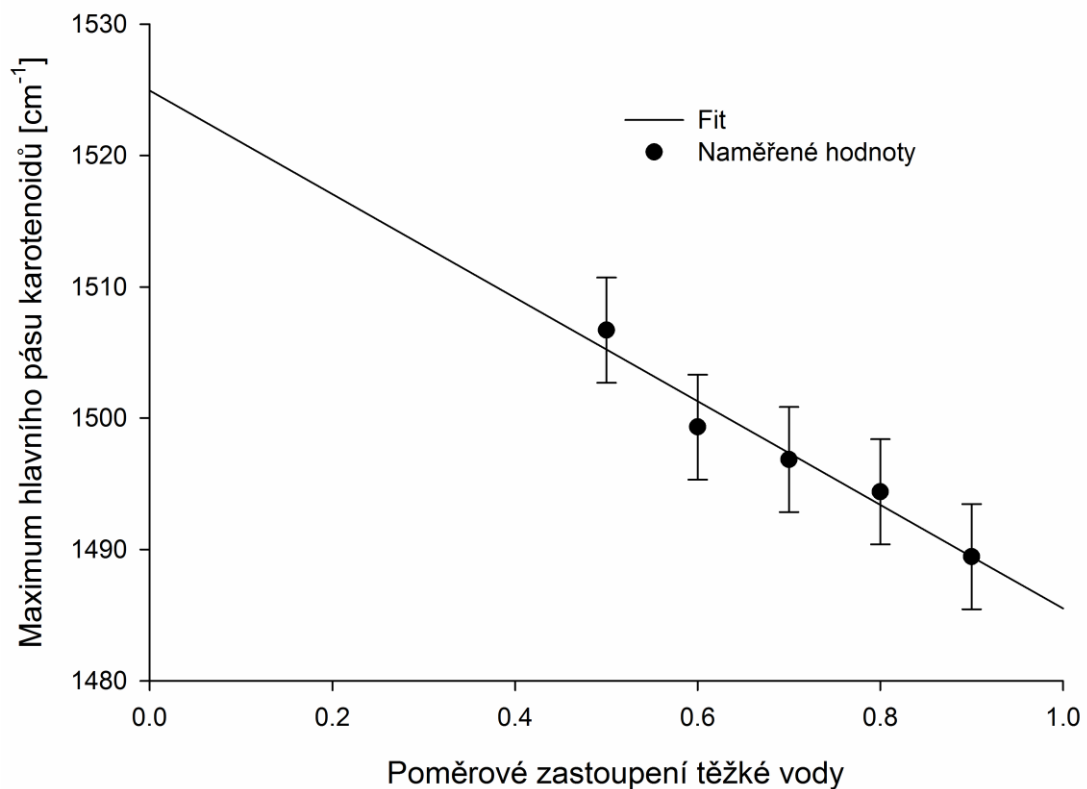
Obrázek 3.3.1. – Extrahované rezonanční Ramanovo spektrum karotenoidů z buňky, která rostla v médiu s 50 % zastoupením těžké vody

Na obrázku 3.3.2. pak máme závislost nejvýznačnějšího pásu karotenoidů (nacházejícího se na cca 1500 cm⁻¹) na procentuálním zastoupením těžké vody v kultuře.



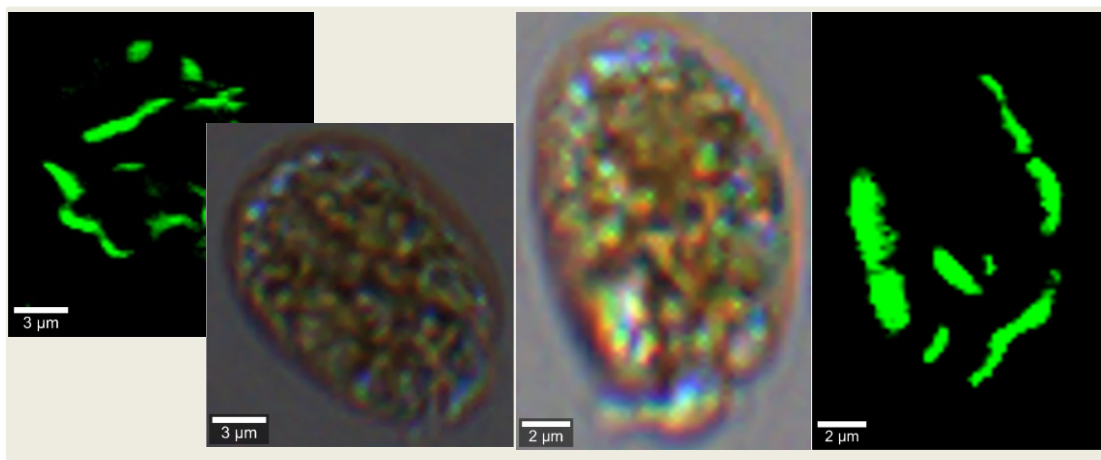
Obrázek 3.3.2. – Extrahovaná Ramanova spektra karotenoidů syntetizovaných v kultuře s různým procentuálním zastoupením těžké vody

Tento pás byl vybrán, protože je nejintenzivnější a vykazuje lineární závislost posunu pásu v závislosti na procentuálním zastoupení těžké vody. Extrapolací byl zjištěn pás 1525 cm^{-1} pro karotenoid syntetizovaný ve vodě, který souhlasí s naměřenou hodnotou pásu valenčních vibrací dvojných vazeb uhlíků. Tento pás karotenoidů je uváděn v různých pracích. (JEHLIČKA et al., 2014), (MAIA et al., 2014) Pro 100 % zastoupení těžké vody v médiu byl vypočten pás na 1486 cm^{-1} . Chybu v určování maxima pásu odhaduji na 4 cm^{-1} . Zastoupení těžké vody v médiu c lze po několika dnech (cca po osmi dnech, kdy si buňky vytvoří nové karotenoidy) určit podle polohy maxima hlavního pásu karotenoidů x pomocí následující empirické rovnice $x = 1524,96 - 39,45c$, která souhlasí s experimentálními daty. Poloha hlavního pásu nezávisí na celkové koncentraci karotenoidů v buňce, ale pouze na poměrovém složení deuterovaných a nedeuterovaných karotenoidů, viz obrázek 3.3.3.



Obrázek 3.3.3. – Závislost posunu maxima hlavního pásu karotenoidů na poměrovém zastoupení těžké vody v kultuře

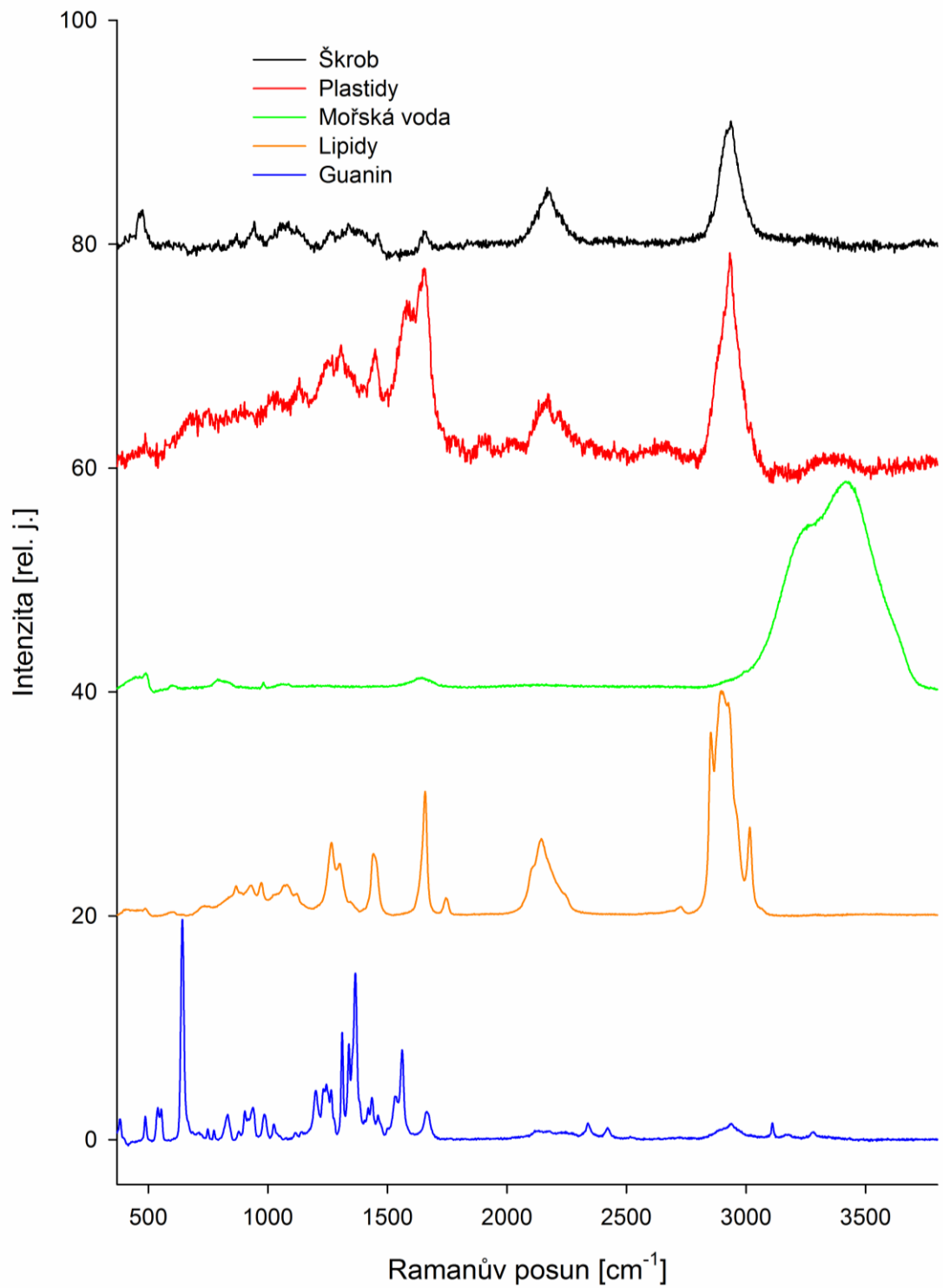
Distribuce karotenoidů nezávisela na době po přeočkování ani na procentuálním zastoupení těžké vody v médiu. Karotenoidy se vyskytovaly napříč buňkou v úzkých pásích, a to běžně na okrajích buňky, ale také i uvnitř buňky. Na obrázku 3.3.4. máme dvě chemické mapy karotenoidů z dvou různých buněk stejné kultury naměřené ve stejné době po přeočkování. Můžeme vidět, že distribuce karotenoidů má pásovou strukturu okolo membrány dále zasahující dovnitř buňky.



Obrázek 3.3.4. – Distribuce karotenoidů u dvou různých buněk stejné kultury

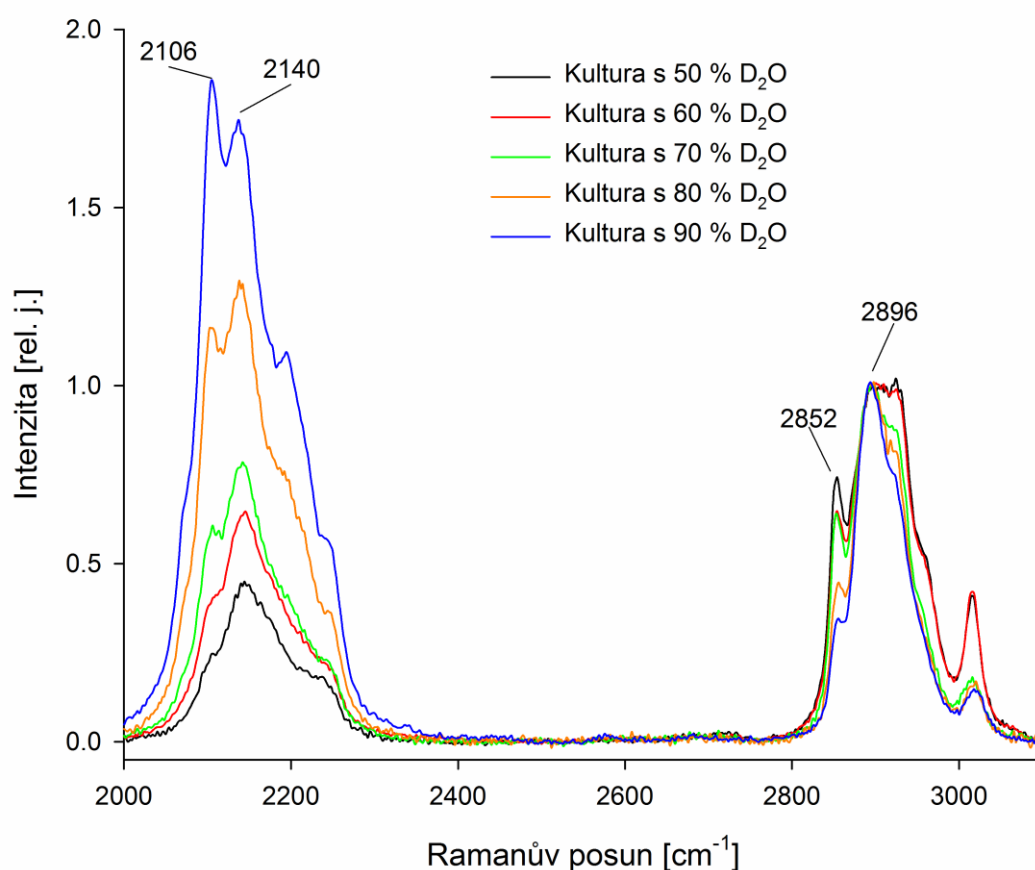
Další chemické mapy byly pořízeny při měření s větším výkonem 34 mW na stopě o průměru 0,5 μm , což odpovídá fotonové hustotě toku v řádu $10^{11} \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ a je o sedm řádu větší než fotosyntetická hustota toku fotonů (hustota toku fotonů v poledne za jasného letního dne v Praze). Před měřením byl vzorek vždy fotovybělen, a to pomocí stejného výkonu laseru 34 mW, ale s větším průměrem stopy (cca 0,2 mm). Vzorek pak byl osvětlen asi o pět řádů nižší fotonovou hustotou toku.

Chemické mapy byly vytvořeny tak, aby po fitování pomocí lineární kombinace spekter chemických látek v každém pixelu zbyl pouze šum. Vždy byly vytvořeny chemické mapy pouze následujících chemických látek, a to vody, lipidů, škrobu, plastidů a guaninu. Na obrázku 3.3.5. máme obvyklá Ramanova spektra, z kterých se vytvářely chemické mapy. Je nutné podotknout, že tyto standardy, do kterých se vytvářely chemické mapy, byly vytvářeny zvlášť pro každou buňku. U obrázku 3.3.5. si můžeme ještě povšimnout značného šumu ve spektru plastidů. Ten obvykle vzniká, pokud nešlo zprůměrovat spektra ve více pixelech. Také je nutné zmínit, že všechna spektra nebyla pozorována u všech buněk. Některé buňky neobsahovaly látky jako například škrob v dostatečném množství, že by byl pozorovatelný v Ramanově spektru. Zde narážíme na limit Ramanovy mikroskopie, kdy pomocí standardních metod Ramanovy mikroskopie nemůžeme zobrazit oblasti s velmi nízkými koncentracemi zobrazované látky. U guaninových krystalů, jehož spektra jsme extrahovali, byla koncentrace dostatečná. Mohli jsme tedy extrahovat kvalitní Ramanova spektra, která reprezentovala chemickou mapu guaninu buněk kultivovaných v médiu s daným procentuálním zastoupením těžké vody a v dané době po přeočkování buněk. Tato Ramanova spektra jsme dále použili ke zpracování, kdy jsme extrahovaná spektra rozkládali do čtyř různých deuterovaných forem guaninu.



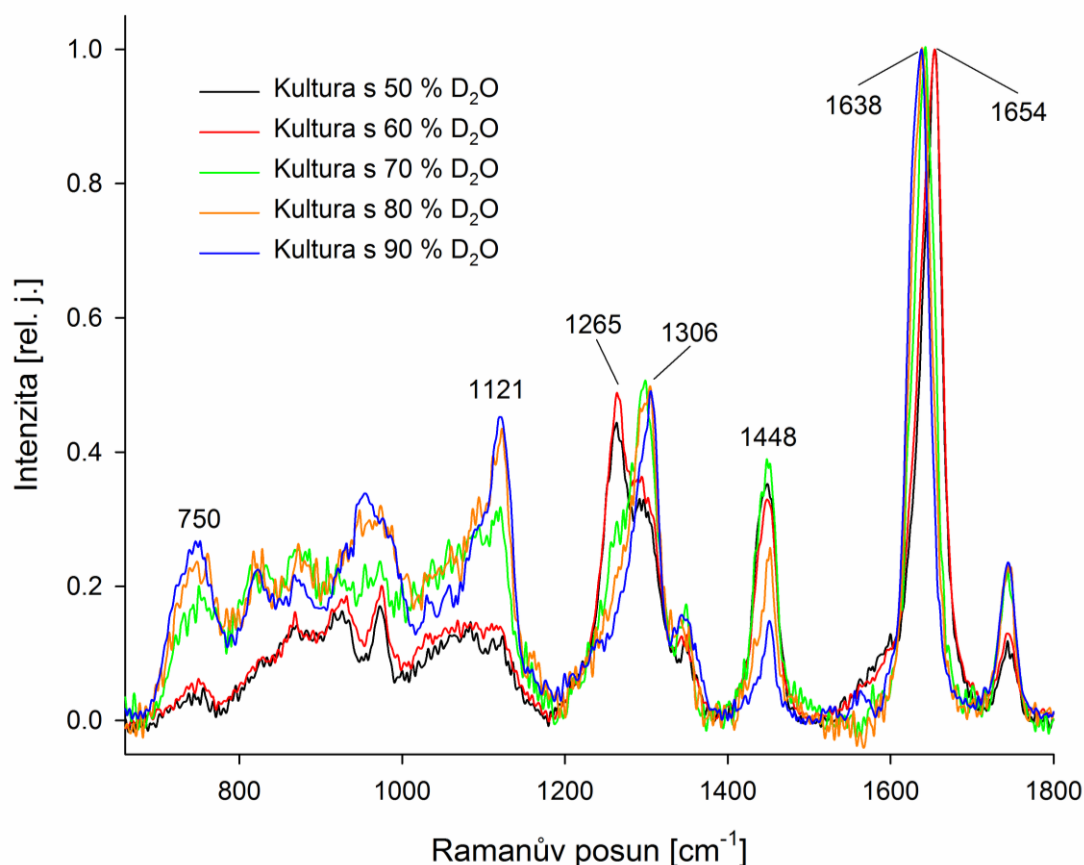
Obrázek 3.3.5. – Ramanova spektra biomolekul, látek a organel, ze kterých byly konstruované chemické mapy

Kromě chemických map guaninu a karotenoidů byly zpracovány další chemické mapy. Na obrázku 3.3.6. máme reprezentující extrahovaná Ramanova spektra lipidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu v oblasti s vyššími hodnotami Ramanova posunu. Intenzity spekter byly vyděleny intenzitou pásu na 2896 cm⁻¹. V grafu můžeme vidět vyšší intenzitu pásu v oblasti okolo 2140 cm⁻¹ v kulturách s větším obsahem D₂O v médiu. Pás v této oblasti zahrnuje více pásů, které odpovídají neekvivalentním vibracím v lipidových tělískách. U kultury s vyšším obsahem D₂O v médiu byl vyšší poměr mezi pásem na 2106 cm⁻¹ a pásem na 2140 cm⁻¹. Naopak u kultury s vyšším obsahem D₂O v médiu byl nižší poměr mezi pásem na 2852 cm⁻¹ a pásem na 2896 cm⁻¹. Poměrová změna pásů byla vyvolána deuterací některých molekul.



Obrázek 3.3.6. – Extrahovaná Ramanova spektra lipidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu v oblasti s vyššími hodnotami Ramanova posunu

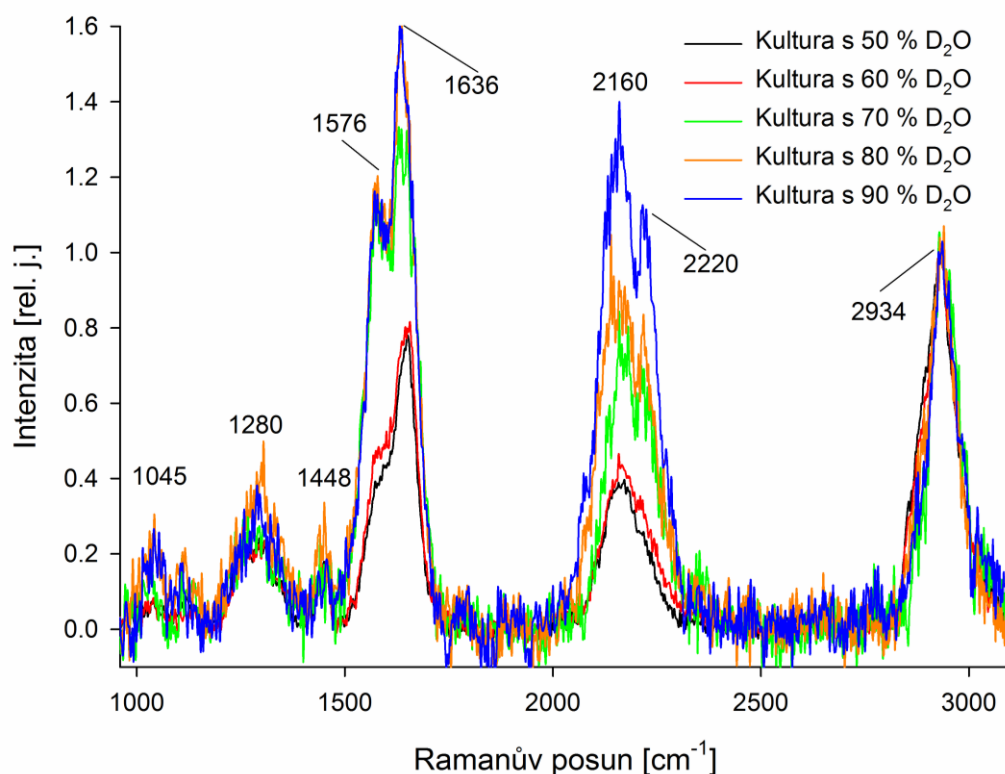
Na obrázku 3.3.7. máme extrahovaná Ramanova spektra lipidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu v oblasti otisku prstů. Intenzity spekter na všech Ramanových posunech byly vyděleny maximální hodnotou intenzity pásu v oblasti na 1644 cm⁻¹. Tento pás se přemísťoval k nižším Ramanovým posunům u kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu. U kultur s 50 % a 60 % D₂O v médiu měl pás maximum na 1654 cm⁻¹. Dále měl pás maximum na 1642 cm⁻¹ u kultury se 70 % D₂O a na 1638 cm⁻¹ u kultury s 80 % a 90 % D₂O v médiu. V oblasti otisku prstu došlo také k následujícím změnám. U kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu došlo k snížení intenzity pásu na 1265 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹ a naopak k zvýšení intenzity u pásu na 750 cm⁻¹, na 1121 cm⁻¹ a na 1306 cm⁻¹. K určování pásů s nižšími intenzitami už velkou roli hraje šum.



Obrázek 3.3.7. – Extrahovaná Ramanova spektra lipidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu v oblastech otisku prstu

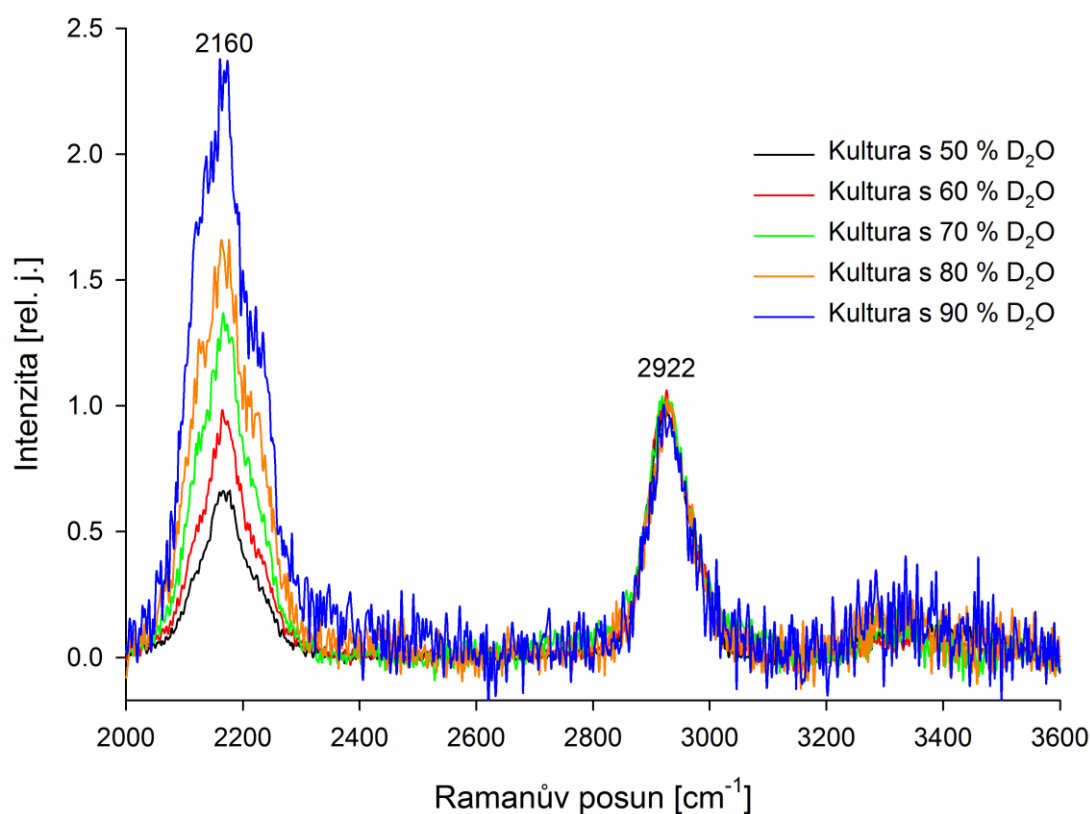
U plastidů byly také zkonstruovány chemické mapy, ale obsahovaly malý poměr signálu a šumu. Nebylo možné identifikovat všechny pásy, které jsou pro ně typické. Na obrázku 3.3.8. máme extrahovaná Ramanova spektra plastidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu znázorněna. Pouze ve zvolené oblasti spektra byly

pozorovatelné pásy, které nezanikaly v šumu. Nejvíce šumu obsahovala spektra kultur se 70 %, 80 % a 90 % D₂O v médiu. Pás na 1280 cm⁻¹ se ve skutečnosti skládá ze dvou pásů, a to pásu na 1259 cm⁻¹ a 1307 cm⁻¹. Tyto pásy bylo možné odlišit pouze u spekter, které byly dostatečně průměrovány, a to u extrahovaných spekter z kultur s 50 % a 60 % obsahem D₂O v médiu. Pro lepší srovnání spekter byly intenzity spekter na všech Ramanových posunech vyděleny maximální hodnotou intenzity pásu na 2934 cm⁻¹. V grafu můžeme vidět vyšší intenzity pásů na 1576 cm⁻¹, 1636 cm⁻¹, 2160 cm⁻¹, 2220 cm⁻¹ u kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu. Vyšší intenzity pásů jsou spojeny s deuterací plastidů. Plastidy jsou více deuterovány u kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu. V grafu také můžeme vidět jiné pásy plastidů jako na 1045 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹. Pás na 1045 cm⁻¹ je viditelný pouze u kultur s 80 % a 90 % D₂O v médiu. Tento pás patří deuterovaným formám plastidů. Intenzity pásu na 1448 cm⁻¹ u kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu se zmenšují nebo jsou rovny intenzitám stejného pásu u kultur s nižším obsahem D₂O v médiu. Tento pás patří nedeuterovaným nebo málo deuterovaným formám plastidů.



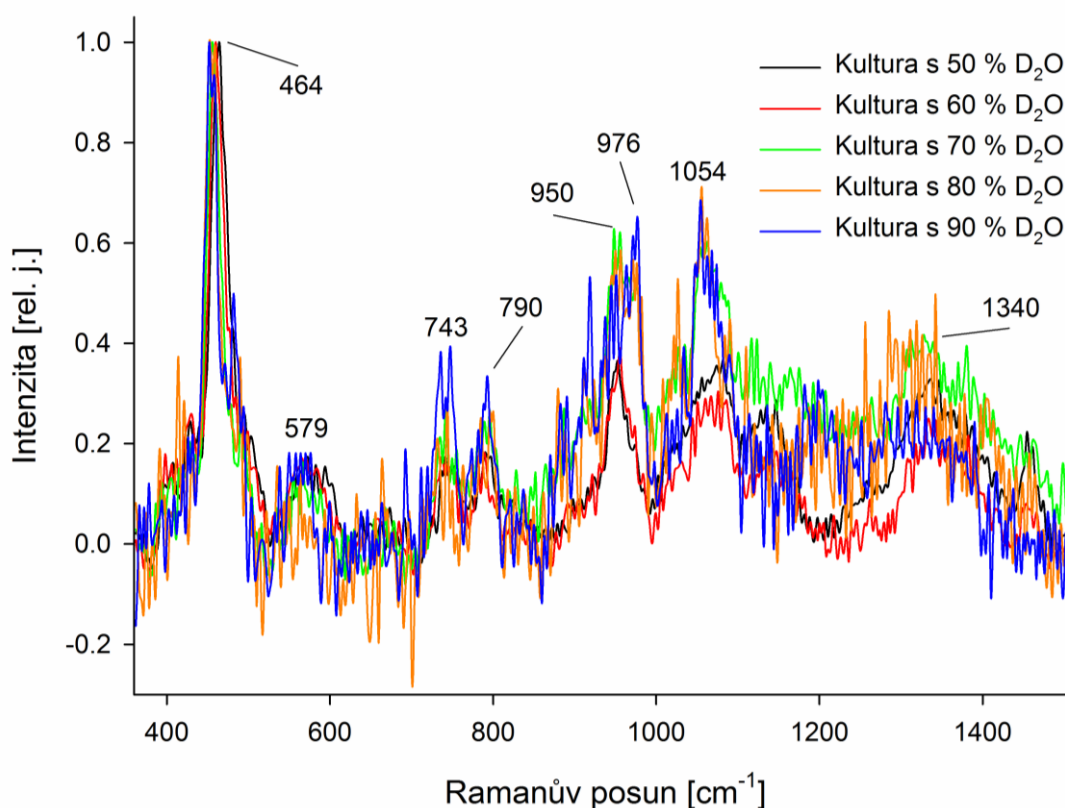
Obrázek 3.3.8. – Extrahovaná Ramanova spektra plastidů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu

Podobně jako u plastidů byly zkonstruovány chemické mapy škrobu, které obsahovaly malý poměr signálu a šumu. Nebylo možné identifikovat všechny pásy, které jsou pro něj typické. Na obrázku 3.3.9. máme extrahovaná Ramanova spektra škrobů z kultur s různým obsahem D_2O v médiu znázorněna v oblasti s vyššími hodnotami Ramanova posunu. Pro lepší srovnání spekter byly intenzity spekter na všech Ramanových posunech vyděleny maximální hodnotou intenzity pásu na 2922 cm^{-1} . V grafu můžeme vidět vyšší intenzitu pásu na 2160 cm^{-1} u kultur s vyšším obsahem D_2O v médiu. Vyšší intenzity pásu jsou spojeny s deuterací škrobů. Škroby jsou více deuterovány u kultur s vyšším obsahem D_2O v médiu. V grafu je také možné vidět široký málo intenzivní pás O-H valenčních vibrací na 3300 cm^{-1} , který ani nebyl možný odečíst pomocí průměrovaného spektra mořské vody.



Obrázek 3.3.9. – Extrahovaná Ramanova spektra škrobu z kultur s různým obsahem D_2O v médiu v oblasti s vyššími hodnotami Ramanova posunu

Na obrázku 3.3.10. máme extrahovaná Ramanova spektra škrobů z kultur s různým obsahem D₂O v médiu znázorněna v oblasti otisku prstu. Pro lepší srovnání spekter byly intenzity spekter na všech Ramanových posunech vyděleny maximální hodnotou intenzity pásu přibližně na Ramanově posunu 464 cm⁻¹. Hodnota Ramanova posunu pásu se měnila od 464 cm⁻¹ u kultury s 50 % obsahem D₂O v médiu k 452 cm⁻¹ u kultury s 90 % obsahem D₂O v médiu. Tento trend posunu pásu k nižším Ramanovým posunům odpovídá vyšší hodnotě Ramanova posunu 478 cm⁻¹ pro škrob v buňkách kultivovaných v médiu bez D₂O. V grafu můžeme vidět další pásy škrobu, a to na 579 cm⁻¹, 743 cm⁻¹, 790 cm⁻¹, 950 cm⁻¹, 1054 cm⁻¹, 1340 cm⁻¹. Můžeme si také všimnout pásu na 976 cm⁻¹ u kultur s vyšším obsahem D₂O v médiu (70 %, 80 %, 90 %). U posledně zmíněných málo intenzivních pásů nevyvozujeme žádný závěr. Pásy v této oblasti mají nízký poměr signálu a šumu. Nejvíce šumu obsahovala spektra kultur se 70 %, 80 % a 90 % D₂O v médiu. Pro přesnější analýzu pásů by bylo nutné více průměrovat spektra.

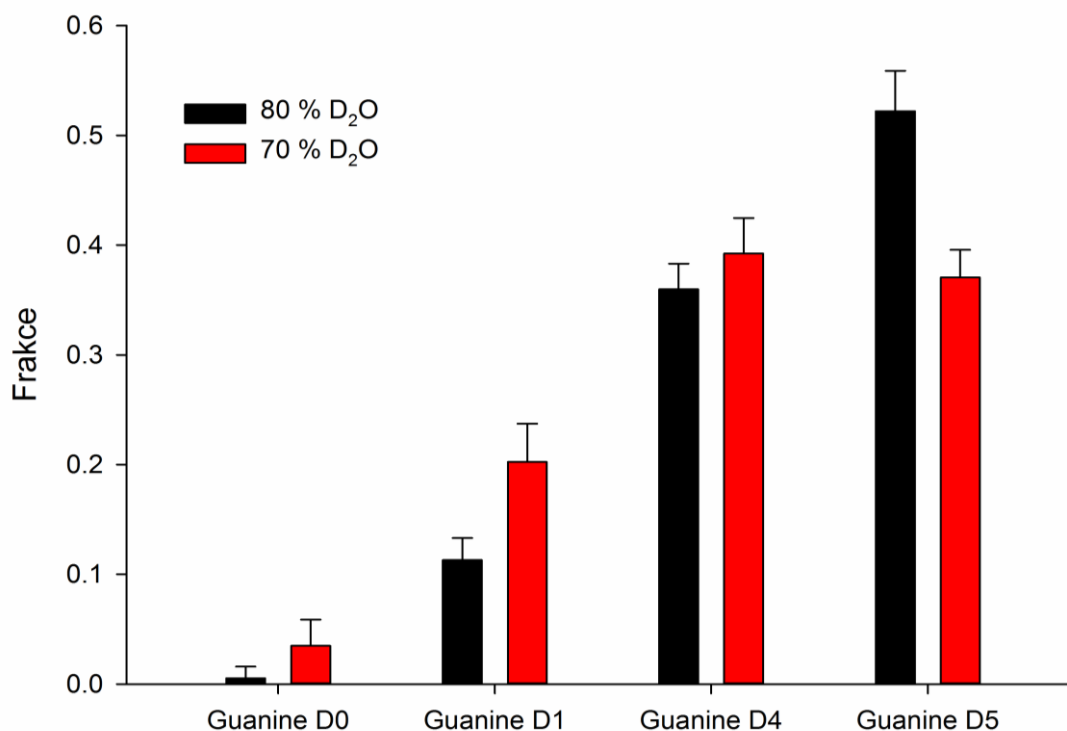


Obrázek 3.3.10. – Extrahovaná Ramanova spektra škrobu z kultur s různým obsahem D₂O v médiu v oblasti otisku prstu

3.4. Rozklad guaninových spekter z živých buněk do deuterovaných forem

Extrahovaná spektra guaninu z živých buněk jsme rozkládali do čtyř spekter patřících různě deuterovaným formám guaninu. Tato čtyři spektra byla dodána vedoucím práce docentem Mojzešem jako standardy. Spektra máme znázorněna na obrázku 1.7.6. v podkapitole o guaninu, jeho vlastnostech a Ramanových spektrech. Byl sledován vliv deuterace guaninu v závislosti na době po přeočkování a v rámci různých kultur pěstovaných v médiích s různým obsahem těžké vody.

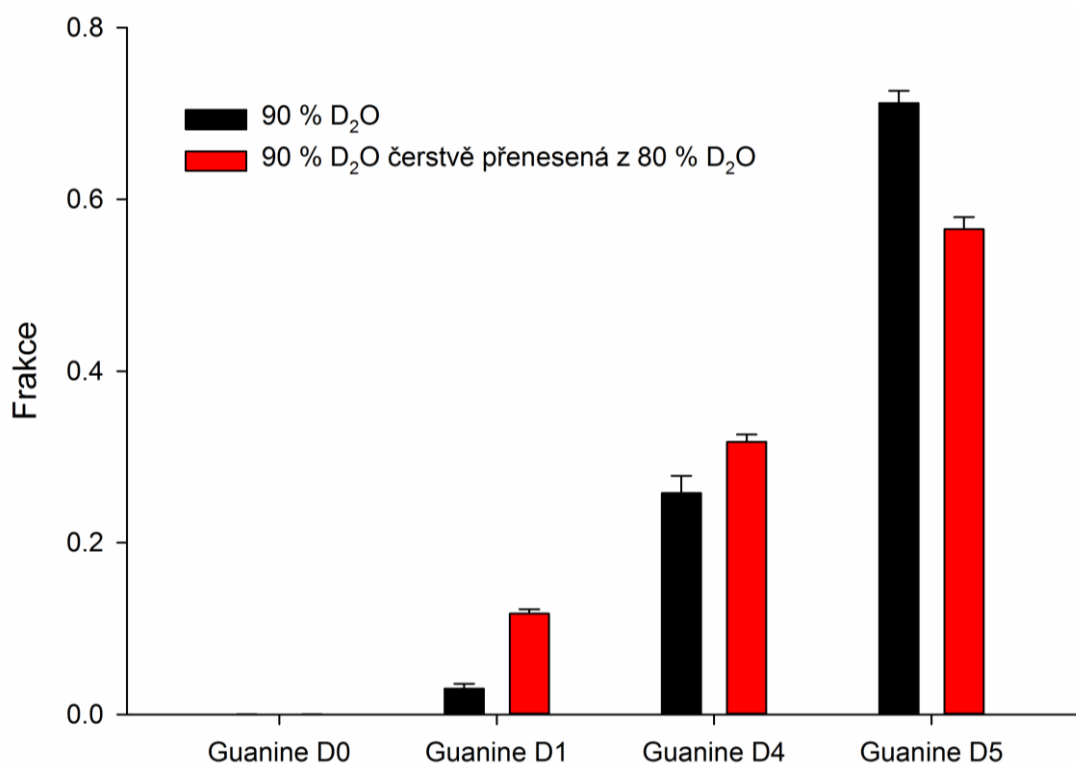
Extrahovaná spektra guaninu z živých buněk byla fitována do čtyř spekter deuterovaných forem. Následně jsme dostali poměrové zastoupení jednotlivých forem v extrahovaném spektru. Takto jsme dostali poměrové zastoupení pro několik extrahovaných spekter (obvykle tři až pět) pro každou kulturu v daném čase po přeočkování. Tyto poměrové zastoupení jsme dále statisticky zpracovávali. Byl vypočten aritmetický průměr poměrových zastoupení a jejich směrodatná odchylka. Tato data jsme pak dále používali k sestrojování histogramů. Na obrázku 3.4.1. máme znázorněn histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu pro dvě různé kultury ve stejné době po přeočkování. Vidíme, že buňky kultivované v médiu s vyšším zastoupením D_2O obsahují vyšší poměrové zastoupení guaninu D_5 .



Obrázek 3.4.1. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu pro dvě různé kultury sedm dní po přeočkování

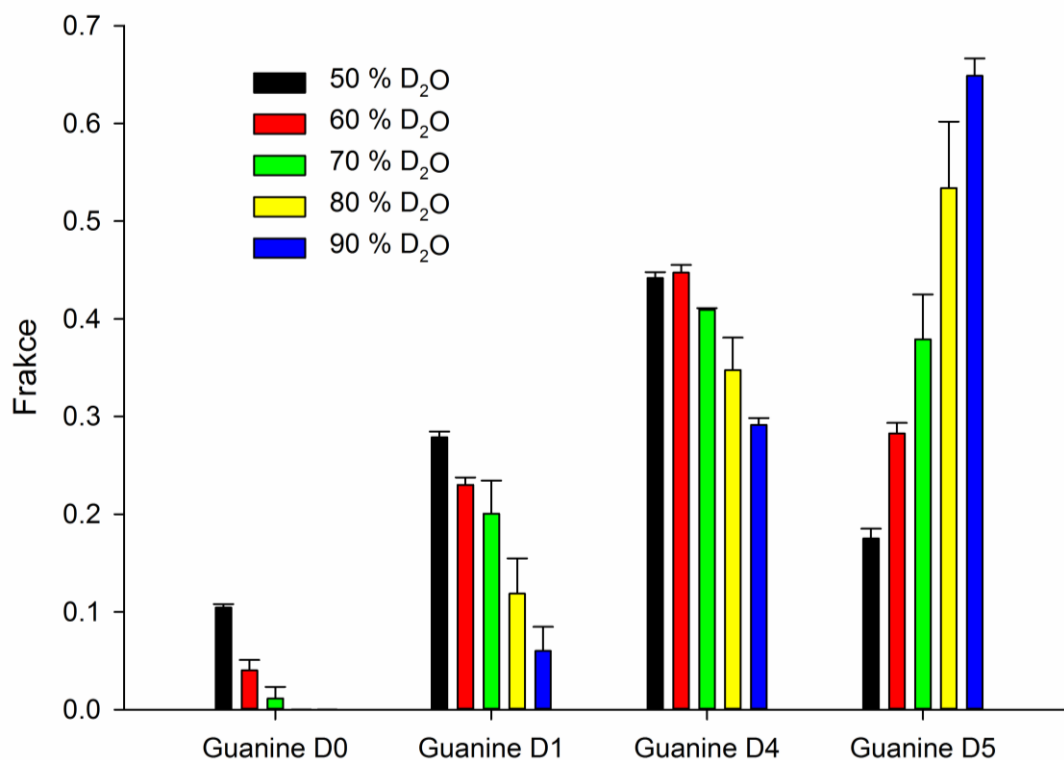
Na obrázku 3.4.1. si můžeme také povšimnout, že Guanin D0 není téměř vůbec obsažen v kultuře s vyšším obsahem těžké vody. Zajímavých hodnot zastoupení deuterovaných forem guaninu pro dvě různé kultury si můžeme všimnout u Guaninu D1 a Guaninu D4. U obou těchto forem je vyšší výskyt v kultuře s nižším zastoupením těžké vody. Jak se ukáže dále, výsledky byly podobné i pro jiné kultury a doby po přeočkování. Tato tendence, a to hlavně u Guaninu D4, je méně očekávaná. Ve skutečnosti deuterovaných forem guaninu je mnohem více, než lze připravit čistých deuterovaných forem guaninu (a to zmíněné čtyři). Následně pak ve spektrech nemáme superpozici čtyř spekter patřících čtyřem různým deuterovaným formám guaninu, ale superpozici několika spekter patřících velkému množství různým deuterovaným formám guaninu. Další informace budou zmíněny v podkapitole o 3.6. o rozkladu spekter z buněk do umělých spekter a modelu deuterace guaninu.

Na obrázku 3.4.2. máme jiný histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu u dvou různých kultur. Tyto dvě kultury obsahovaly stejné množství těžké vody v médiu, ale lišily se dobou po přeočkování. Jedna z kultur byla přeočkována už devět dní, ale druhá byla čerstvě přenesená z kultury s 80 % zastoupením těžké vody v médiu. Ramanova spektra byla měřena asi půl hodinu po přeočkování buněk. Na histogramu vidíme podobné zastoupení deuterovaných forem mezi dvěma kulturami jako na obrázku 3.4.1., kdy vyšší zastoupení Guaninu D5 nalezneme v kultuře s vyšším obsahem D₂O. Podobnost je ale s tím rozdílem, že tentokrát si kultura nedokázala vytvořit nový guanin, který by obsahoval zastoupení deuterovaných forem guaninu odpovídající kultuře pěstované v médiu s 90 % zastoupením těžké vody. Také to potvrzuje fakt, že molekuly D₂O a H₂O v daném procentuálním zastoupení nemohou deuterovat, popřípadě protonovat molekuly guaninu. Nevyskytuje se žádný tunel nebo díra, kterými by mohlo dojít k deuteraci, popř. protonaci, a většina molekul guaninu není okolí přístupná. Jedná se tedy doopravdy o krystaly guaninu, jehož molekuly jsou přístupné okolí pouze na povrchu. Oproti obrázku 3.4.1. je navíc rozdíl v tom, že zastoupení guaninu D5 je mnohem vyšší díky vyššímu zastoupení těžké vody v kultuře. Navíc guanin D0 není vůbec přítomný. Guanin D1 a guanin D4 je podobně jako v předešlém případě ve vyšším zastoupení v kultuře s nižším zastoupení těžké vody v médiu.



Obrázek 3.4.2. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu u dvou kultur s různou dobou po přeočkování

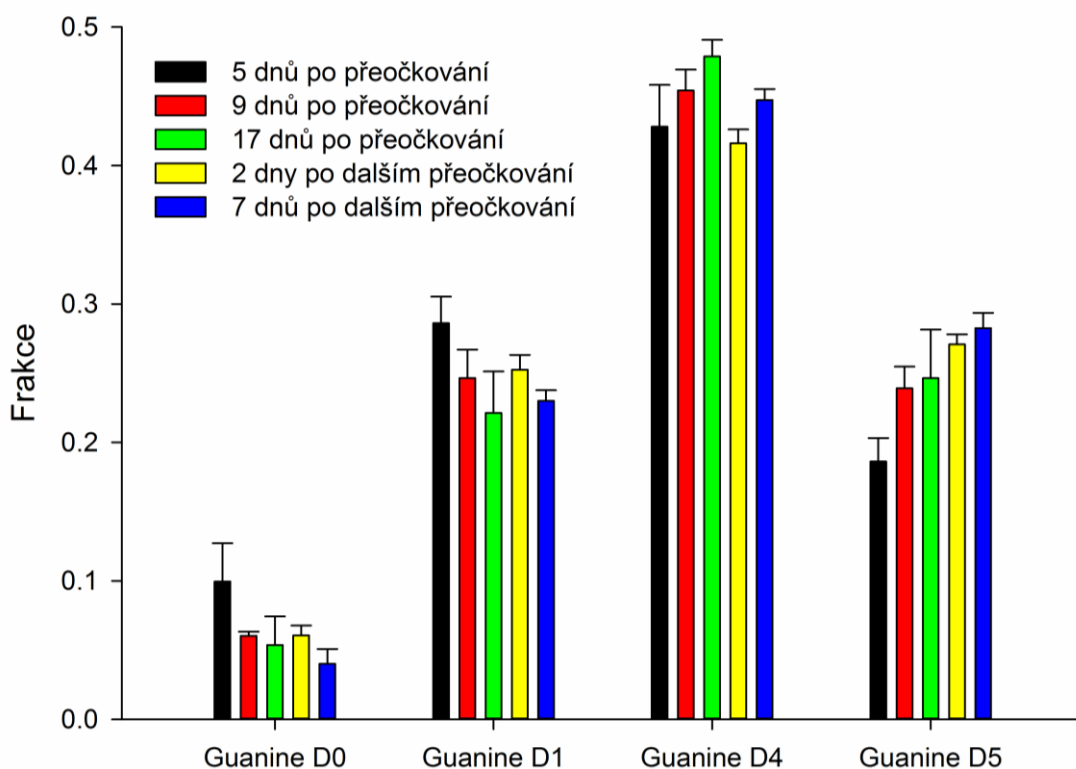
Na předešlých dvou histogramech u kultur pěstovaných v médiích s různým zastoupením těžké vody byla pozorovatelná tendence, že kultury s větším zastoupením D₂O obsahují více Guaninu D5, ale méně ostatních forem. Stejná tendence byla pozorovatelná u všech kultur, jak bude popsáno dále. Bylo vybráno několik charakteristických spekter, které reprezentovaly danou kulturu. Spektra byla vybrána z kultur, které byly kultivované dostatečnou dobu a zároveň obsahovaly dostatečné množství guaninu (nebyly kultivované moc dlouho bez přísunu živin). Guanin obvykle zmizel z buněk po čtyřech týdnech kultivace, bylo tedy nutné buňky přeočkovat do jiného média a extrahovat tak lepší a čistší spektra. Na obrázku 3.4.3. máme histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu ze všech pěstovaných kultur. Charakteristické spektra guaninu byla získána z kultur obvykle po sedmi až sedmnácti dnech po přeočkování.



Obrázek 3.4.3. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu ze všech pěstovaných kultur

Pokud máme kulturu, která neobsahuje žádný guanin, mohli bychom čekat deuteraci guaninu podle toho, jak dochází ke syntéze guaninu. Pokud by deuterace probíhala pořád stejně, čekali bychom stejné Ramanovo spektrum guaninu z kultury v různých dnech po přeočkování. Je třeba, ale uvážit několik faktorů, které mají vliv na to, jak probíhá deuterace. Uvažme, že krystaly guaninu byly syntetizovány enzymaticky, popřípadě, že existuje prostředí umožňující syntézu guaninu přímo v buňce. Každá buňka je individuální, má jiné okolí v místě syntézy deuterovaného guaninu (počet přístupných D₂O a H₂O, popřípadě počet přístupných protonů a deuteria z jiných molekul). Syntéza guaninu tedy neprobíhá v každé individuální buňce stejně. Pokud chceme zjistit charakteristické spektrum pro kulturu, tak tento faktor bychom mohli například eliminovat tím, že extrahujeme několik spekter z buněk a uděláme jejich průměr. Bohužel měření chemických map není tolik rychlé (obvykle dvacet minut trvá chemická mapa jedné buňky), a tedy je potřeba udělat kompromis. Naším kompromisem bylo naměření dvou až pěti chemických map z dané kultury v dané době po přeočkování. Dalším faktorem, který může hrát vliv, je přítomnost deuterovaných molekul přímo v buňce. Pokud by syntéza guaninu

probíhala ze začátku v prostředí, jehož molekuly jsou více protonované v porovnání se zastoupením protonů a deuteria vně buňky, budeme pozorovat postupný pokles zastoupení guaninu D0 ve spektrech. Na obrázku 3.4.4. máme histogram z kultury pěstované v médiu s 60 % zastoupením těžké vody v různé době po přeočkování. Zmíněné dva faktory mohou mít vliv na tento histogram. Zmíněná tendence úbytku guaninu D0 po přeočkování je viditelná, i přestože směrodatné odchylky v histogramu jsou dosti velké, a odpovídalo by to druhému zmíněnému faktoru. Je nutné dodat, že v tak komplexním systému jako je kultura buněk by mohly hrát roli další faktory jako například vliv různé fáze kultury buněk v různé době po přeočkování. Z provedených statistických analýz kromě toho nemáme úplnou informaci o deuteraci guaninu, jehož model deuterace si popíšeme v poslední podkapitole. Pokud by buňky obsahovaly guanin se stejným počtem deuterií na různých místech, následná různá distribuce různě deuterovaných guaninů by odpovídala různým Ramanovým spektrům. Extrahovaná Ramanova spektra z živých buněk by po rozložení do čistých deuterovaných forem (do kterých spektra rozkládáme) odpovídala jiným poměrovým zastoupením guaninu D0, guaninu D1, guaninu D4 a guaninu D5. Máme tedy plno faktorů, které nám stěžují přesnou interpretaci spekter a histogramů a které nelze eliminovat.

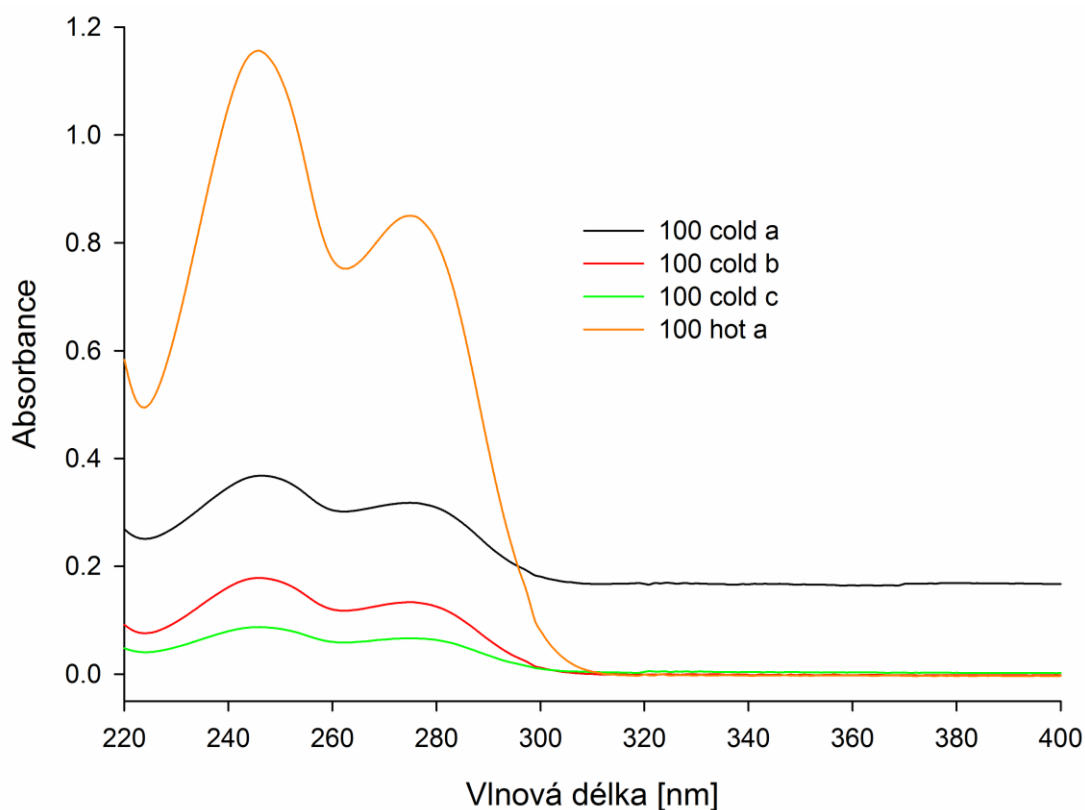


Obrázek 3.4.4. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu z jedné kultury v různé době po přeočkování

3.5. Umělá guaninová spektra

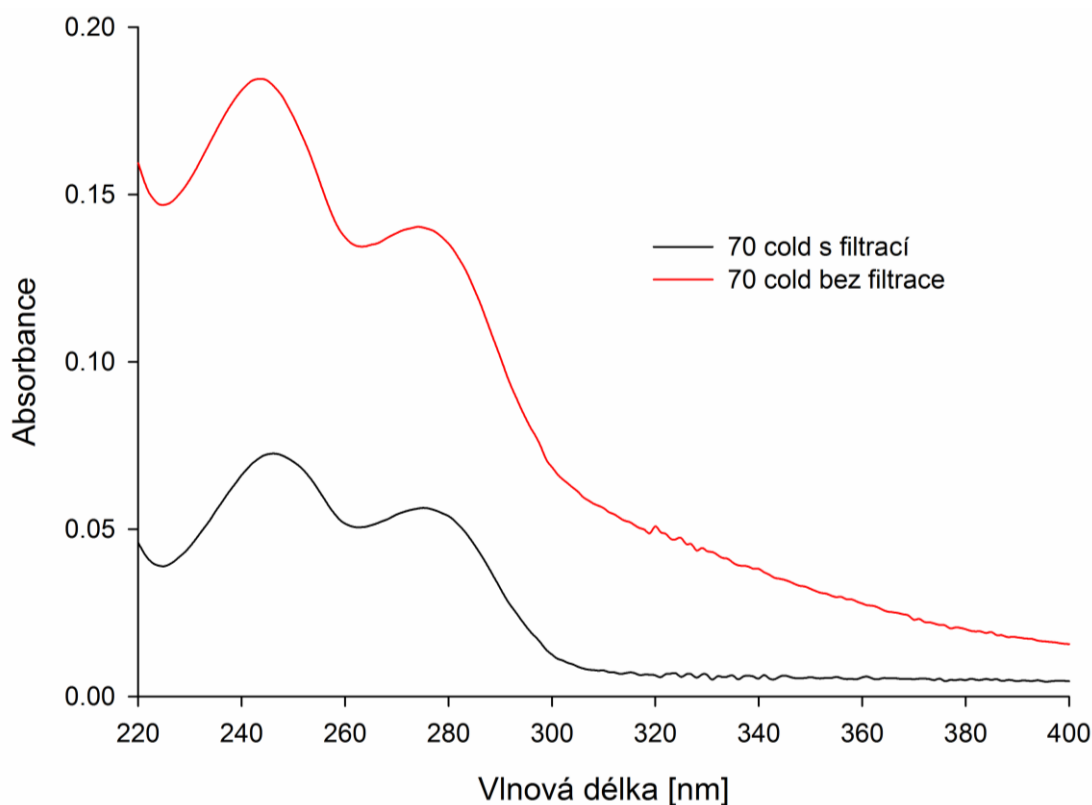
Bylo zmíněno, že čtyři deuterované formy guaninu (D0, D1, D4 a D5) nejsou všechny možné deuterované formy guaninu. Bylo by vhodné nalézt jiné standardy, do kterých by bylo možné rozložit extrahovaná spektra z buněk. Jako vhodným řešením se hodí rozložit spektra do umělých guaninových spekter krystalů připravených z roztoků o různém procentuálním zastoupení těžké vody. V podkapitole o guaninu, jeho vlastnostech a Ramanových spektrech jsme se zmínili o přípravě guaninu z látek jako hydroxidu amonného nebo dimethylaminu. Právě přípravu pomocí hydroxidu amonného zvolil vedoucí práce. Čtyři standardní deuterované formy guaninu pochází z tohoto experimentu. Na těchto vzorcích byla naměřena Ramanova spektra, která byla použita v práci jako čtyři standardní spektra guaninu (D0, D1, D4 a D5).

V práci byla vyzkoušena také jiná cesta syntézy deuterovaných forem guaninů. Byl použit zakoupený guanin v prášku, který jsme se snažili deuterovat a popis přípravy krystalů guaninu byl uveden v podkapitole 2.2. o přípravě vzorků a postupu práce. Bylo zmíněno, že guanin v roztoku tvoří nanokrystaly neviditelné pouhým okem. Tyto nanokrystaly byly ale pozorovatelné při měření absorpčních spekter, neboť velmi dobře rozptylují. Na obrázku 3.5.1. máme absorpční spektra naměřená na čtyřech různých kyvetách. Zkratky hot/cold zůstávají stejné jako v předešlé části práce (hot – příprava za tepla, cold – příprava za studena). Podobně zůstává stejné značení vzorku číslem označující přípravu z roztoku o daném procentuálním zastoupení těžké vody (90 hot – roztok z 90 % D₂O a z 10 % H₂O připravený za tepla) a označení měření A, B, C a D dle popisu v podkapitole o přípravě vzorků a popisu práce. Při nižších koncentracích guaninu (spektrum 100 cold c) nebylo vidět žádné rozptylové pozadí. Podobně tomu bylo při měření o trochu větší koncentraci guaninu (spektrum 100 cold b). Pokud bylo v roztoku guaninu ještě více, začínalo se objevovat rozptylové pozadí tak, jak je tomu u spektra 100 cold a. Zajímavostí bylo, že u guaninu připraveného za tepla, nebylo pozadí viditelné (spektrum vzorku 100 hot a). Při vyšší teplotě se totiž zvyšuje rozpustnost guaninu (nanokrystaly zanikaly), a proto nebylo ve spektru rozptylové pozadí. Podobné charakteristiky byly naměřeny i u jiných koncentrací roztoku. Tyto charakteristiky byly naměřeny u vzorků z měření A (tedy bez filtrů) a z měření B (s 0,22 μm filtry). Standardní koncentrací je míněna špetka prášku přidána do 5 ml rozpouštědla (D₂O a H₂O v daném poměru) kvůli malé rozpustnosti guaninu.



Obrázek 3.5.1. – Absorpční spektra naměřená na čtyřech různých kyvetách: 100 cold a – měření při standardní koncentraci, 100 cold b – měření při koncentraci 10× zředěnější, 100 cold c – měření při koncentraci 100× zředěnější, 100 hot a – měření při standardní koncentraci

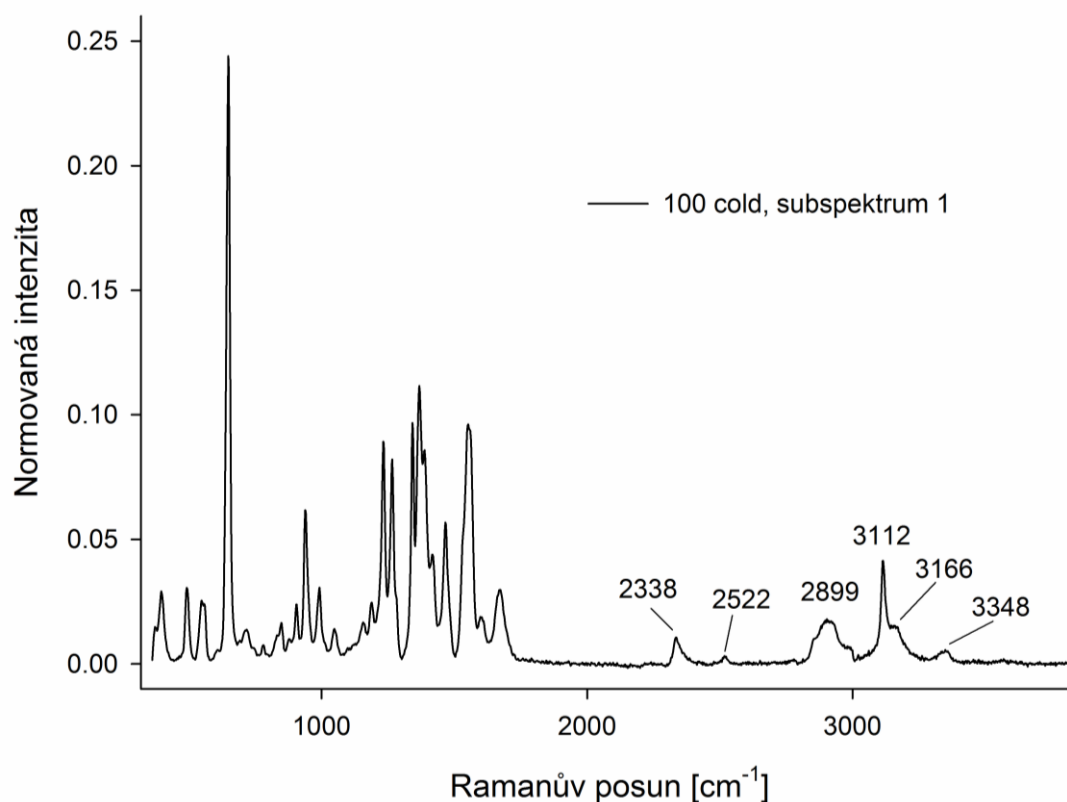
U měření C byla provedena filtrace přes 20 nm filtry. Po přefiltrování bylo rozptylové pozadí za standardní koncentrace téměř eliminováno, viz obrázek 3.5.2. Na obrázku si můžeme povšimnout dobře znatelné závislosti λ^{-4} , která odpovídá teoretické závislosti pro rozptyl. Na 220 nm máme hodnotu absorbance 0,16, kdežto na 400 nm máme hodnotu 0,04. Stále viditelné pozadí absorpčního spektra přisuzují přítomnosti menších nanočástic, které nemohly být odstraněny nebo které vznikaly po přefiltrování a jeví se jako výhodnější termodynamické stavy. Obrázek 3.5.2. reprezentuje měření vzorku za studena se 70 % zastoupením D₂O a 30 % zastoupením H₂O. Podobné absorpční spektra byla naměřena pro všechny vzorky. Vzorky připravené za tepla nevykazovaly rozptylové pozadí opět jako v předešlém případě.



Obrázek 3.5.2. – Absorpční spektra naměřená na dvou vzorcích, z nichž jeden vzorek byl filtrován a druhý vzorek nebyl

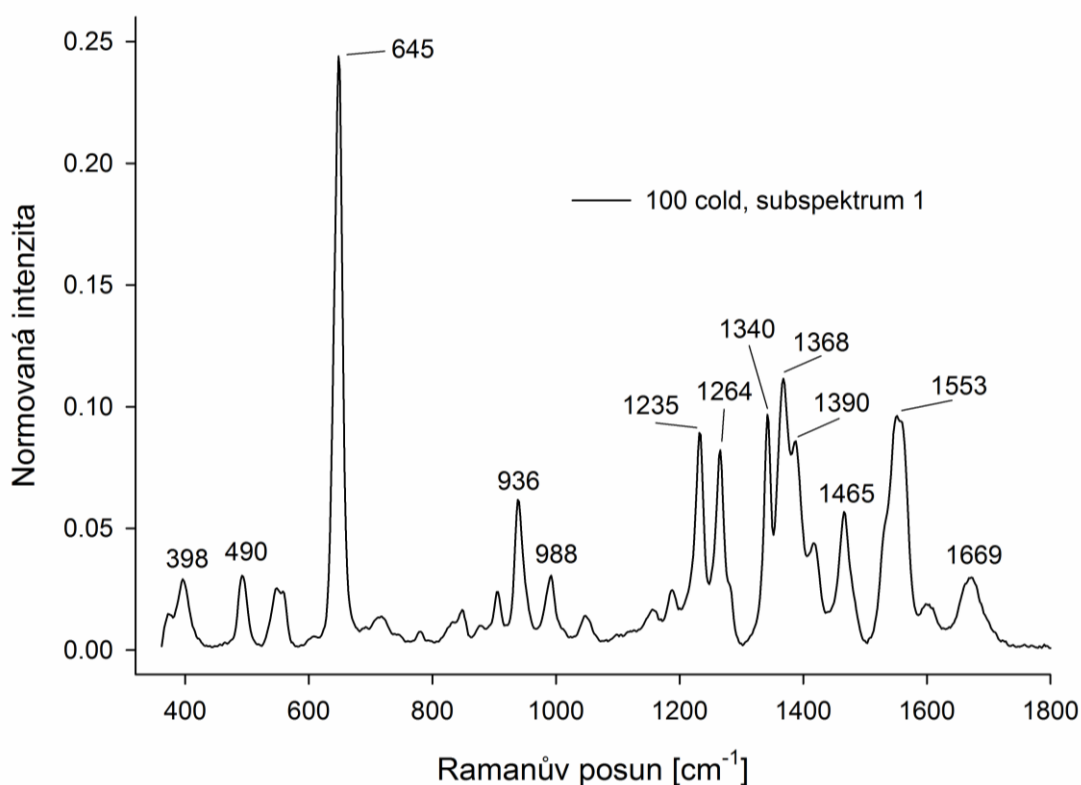
Podle postupu v experimentální části jsme krystalizovali vzorky a měřili Ramanova spektra z několika krystalů (tří až šesti) každého vzorku. Měli jsme tedy pro každý vzorek několik naměřených Ramanových spekter, které jsme ještě měli naměřené různými způsoby (měření A, B, C a D). Jako vhodný nástroj pro analýzu těchto dat se jevila faktorová analýza. Pro každý vzorek (např. 100 cold) byla provedena faktorová analýza a její výsledky byly dále analyzovány. Obecně byly pouze první dvě singulární hodnoty dostatečně vysoké, a tedy jsme vždy použili k další analýze pouze první dva subspektra. Ostatní singulární hodnoty měly malé hodnoty a jejich subspektra obsahovala šum nebo posun mřížky. Pro další analýzu byly sestrojeny grafy prvních dvou subspekter ve dvou různých spektrálních oblastech (obrázek 3.5.3., obrázek 3.5.4., obrázek 3.5.5. a obrázek 3.5.6.), dále grafy se singulárními hodnotami (obrázek 3.5.7.), grafy s koeficienty zastoupení prvního a druhého subspektra pro jednotlivá spektra (obrázek 3.5.8.), a zároveň tyto grafy byly sestrojeny pro všechny vzorky. Na následujících stránkách jsou předloženy výsledky faktorové analýzy pouze na vzorku 100 cold. Ostatní sestrojené grafy a analýzy nejsou předloženy.

Na obrázku 3.5.3. máme první subspektrum v celé měřené oblasti vzorku 100 cold. Můžeme si povšimnout pás v oblasti přibližně 2333 cm^{-1} , který odpovídá deuteraci guaninu. Je tedy jasné, že se jedná o subspektrum, které obsahuje nějaké deuterované formy guaninu. Můžeme si také povšimnout pásu na 2522 cm^{-1} , který souhlasí s pásy guaninu D4 a guaninu D5. Kromě toho subspektrum obsahuje charakteristické pásy pro neúplně deuterované formy guaninu, a to pásy v oblasti 2800 cm^{-1} až 3400 cm^{-1} . Vidíme charakteristický úzký pás na 3112 cm^{-1} pro guanin D4 a guanin D0. V jeho pravé části si můžeme všimnout širšího pásu na 3166 cm^{-1} patřící guaninu D0 a guaninu D1. U pásů v těchto vyšších oblastech Ramanova posunu je někdy horší z extrahovaného spektra odečíst pásy, které patří jiným látkám jako například plastidům. Také se jedná o méně intenzivní pásy oproti nejintenzivnějším pásům v oblasti otisku prstu. Jevilo se jako výhodné rozkládat extrahovaná spektra guaninu a jejich subspektra do deuterovaných forem guaninu pouze v oblasti 360 cm^{-1} až 1800 cm^{-1} . Tato oblast je dostatečná k odlišení čtyř deuterovaných forem a umožňuje nám jejich lepší rozklad do lineární kombinace spekter deuterovaných forem.



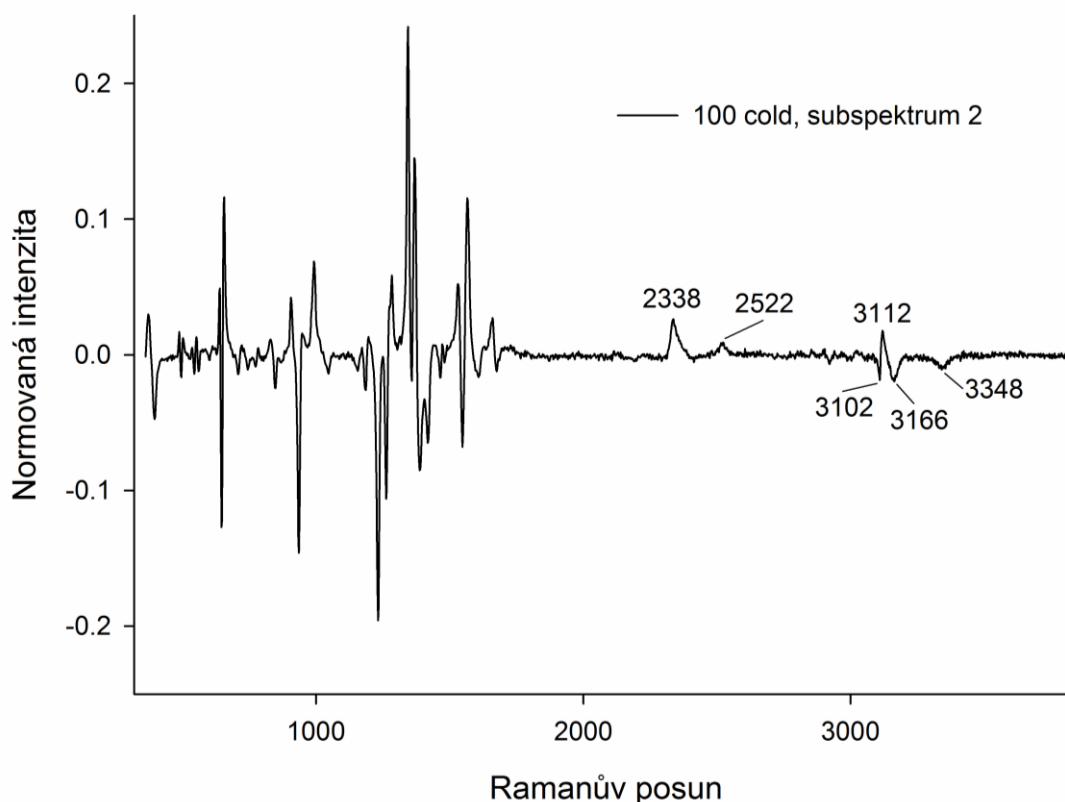
Obrázek 3.5.3. – První subspektrum (v celé měřené oblasti) vzorku 100 cold

Interpretujme pásy v oblasti otisku prstu prvního subspektra, tedy přiřaďme hodnoty Ramanových posunů pásů deuterovaným formám guaninu. Na obrázku 3.5.4. je asi nejintenzivnější pás na 645 cm^{-1} , který svou hodnotou Ramanova posunu odpovídá pásu guaninu D1. Zde je nutné zpozornět, neboť tento pás je značně široký a obsahuje v sobě dva pásy patřící guaninu D0 (pás na 649 cm^{-1}) a guaninu D4 (pás na 638 cm^{-1}). Analogická situace platí pro pásy na 490 cm^{-1} , na 1368 cm^{-1} , na 1465 cm^{-1} , na 1553 cm^{-1} a na 1669 cm^{-1} . Dále můžeme vidět několik dalších charakteristických pásů, a to pásů na 398 cm^{-1} , 936 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1264 cm^{-1} a 1390 cm^{-1} pro guanin D0 a pásů na 988 cm^{-1} a 1340 cm^{-1} pro guanin D4. V prvním subspektru vidíme rozšiřování pásů. Krystaly, které vznikly v sobě obsahují různě deuterované molekuly guaninu, a to nejvíce guanin D0 a guanin D4. Vzorek 100 cold byl připraven takovým způsobem, aby vznikl guanin D4. Tohoto bohužel nebylo docíleno. Dále si popíšeme vliv přípravy vzorků na deuteraci molekul guaninu pomocí druhého subspektra u stejného vzorku 100 cold.

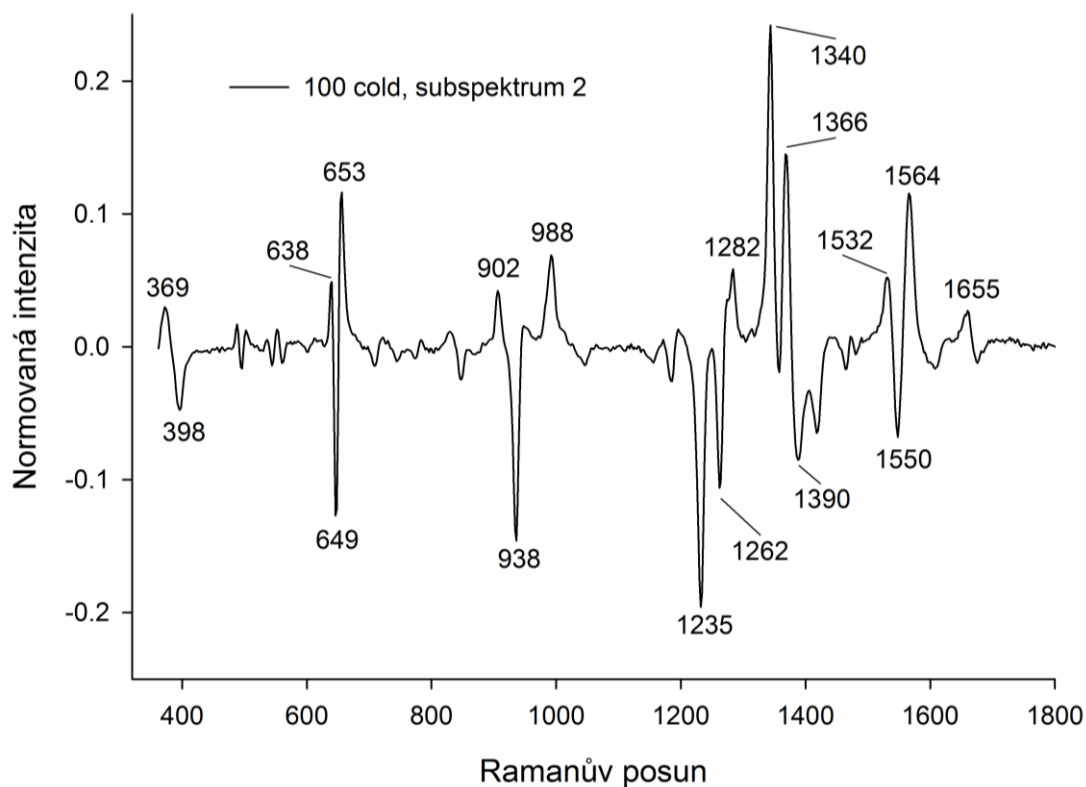


Obrázek 3.5.4. – První subspektrum (oblast otisku prstu) vzorku 100 cold

Na obrázku 3.5.5. a 3.5.6. máme pásy druhého subspektra, které mají kladné a záporné normované intenzity. Jejich hodnoty odpovídají různému stupni deuterace guaninu. Na obrázku 3.5.5. máme druhé subspektrum v celé měřené oblasti. Můžeme si povšimnout kladných hodnot normovaných intenzit pásů na 2338 cm^{-1} , 2522 cm^{-1} a 3112 cm^{-1} . Pás na 2338 cm^{-1} a 2522 cm^{-1} můžeme přiřadit guaninu D4 nebo guaninu D5, pás na 3112 cm^{-1} můžeme přiřadit guaninu D4 nebo guaninu D0. Pokud všechny tyto kladné hodnoty normovaných intenzit pásů chceme přiřadit jedné deuterované formě guaninu, odpovídal by těmto hodnotám guanin D4. Jak si dále ukážeme na pásech v oblasti otisku prstu, kladné hodnoty normovaných intenzit opravdu odpovídají pásům spektra guaninu D4. Záporné hodnoty normovaných intenzit máme na pásu 3102 cm^{-1} , což odpovídá modifikaci pásu na 3112 cm^{-1} , a další hodnoty máme na pásech 3166 cm^{-1} a 3348 cm^{-1} , z nichž některé odpovídají buď guaninu D0, anebo guaninu D1. V oblasti otisku prstu budou záporné hodnoty normovaných intenzit pásů odpovídat guaninu D0.



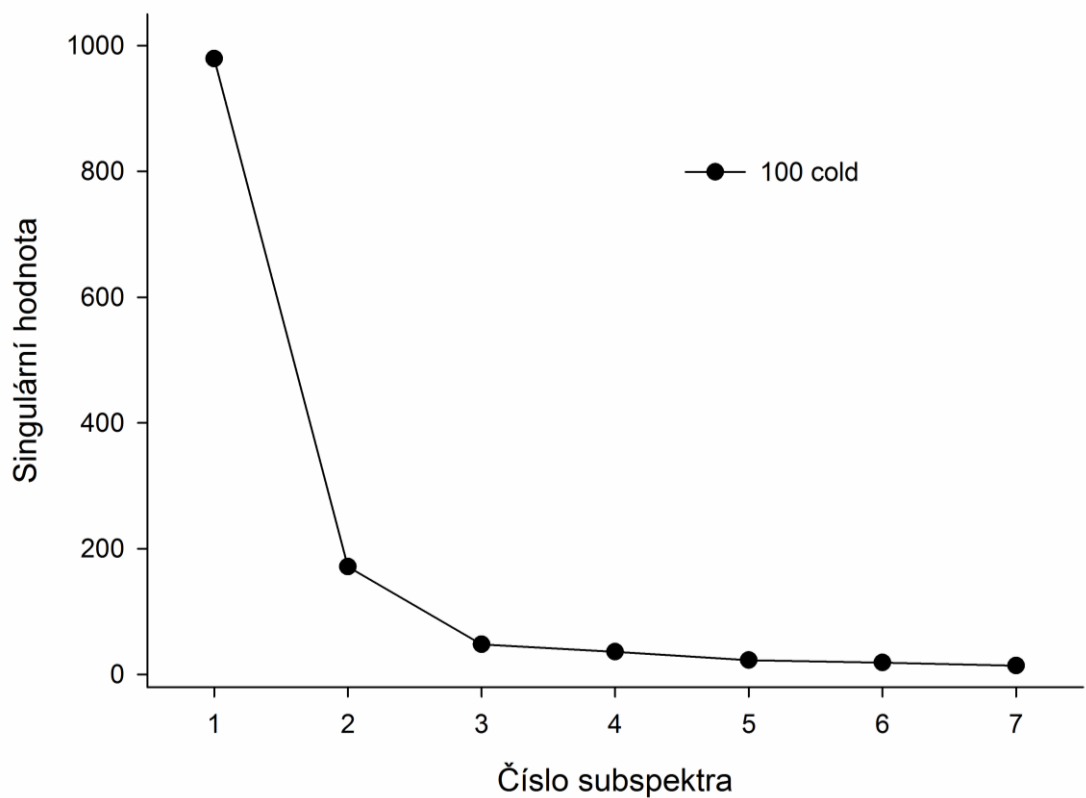
Obrázek 3.5.5. – Druhé subspektrum (v celé měřené oblasti) vzorku 100 cold



Obrázek 3.5.6. – Druhé subspektrum (oblast otisku prstu) vzorku 100 cold

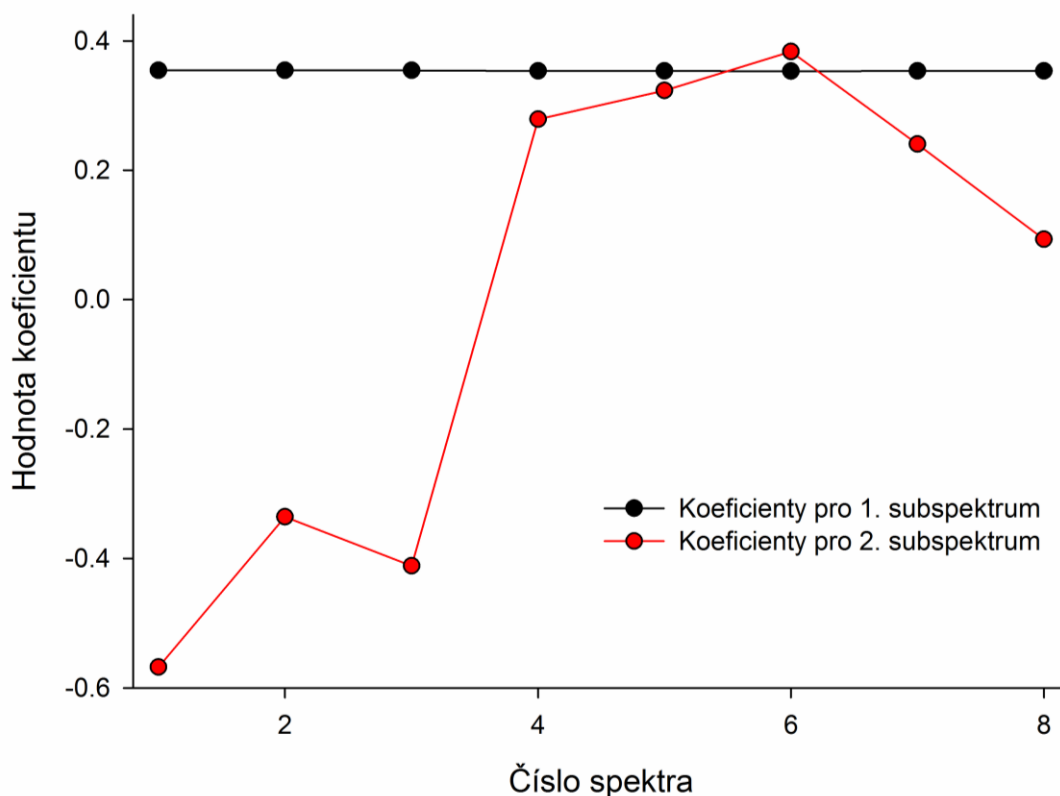
Na obrázku 3.5.6. máme druhé subspektrum v oblasti otisku prstu. Popíšme si v krátkosti, které pásy odpovídají daným formám guaninu. Kladné hodnoty intenzit odpovídají guaninu D4 a záporné hodnoty intenzit guaninu D0. Pásy guaninu D0 v druhém subspektru nalezneme na 398 cm^{-1} , 649 cm^{-1} , 938 cm^{-1} , 1235 cm^{-1} , 1262 cm^{-1} , 1390 cm^{-1} a na 1550 cm^{-1} . Pásy guaninu D4 v druhém subspektru nalezneme na 369 cm^{-1} , 638 cm^{-1} , 902 cm^{-1} , 988 cm^{-1} , 1282 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1532 cm^{-1} , 1564 cm^{-1} a na 1655 cm^{-1} . Kromě zmíněných pásů je na grafu pás na 653 cm^{-1} . Tento intenzivní pás jen modifikuje celkový pás na 645 cm^{-1} v prvním subspektru. Jedná se o příspěvek k rozšíření pásu Guaninu D4 s maximem intenzity na Ramanově posunu 638 cm^{-1} . Faktorová analýza nám tedy zatím umožnila odhalit společné pásy dvou různých forem ve spektrech.

Na obrázku 3.5.7. máme potvrzenou charakteristiku přítomnou u všech vzorků. Pouze první dvě singulární hodnoty jsou dostatečně vysoké na to, aby byl pozorován vliv příspěvku patřičných subspekter do spektra a odpovídal společné charakteristické deuteraci guaninu.



Obrázek 3.5.7. – Singulární hodnoty pro dané číslo subspektra u vzorku 100 cold

Na obrázku 3.5.8. máme koeficienty zastoupení prvního a druhého subspektra pro jednotlivá spektra u vzorku 100 cold. První tři spektra (tj. z měření A) obsahují navíc k hodnotám intenzit prvního subspektra sčítanec se zápornými hodnotami normované intenzity druhého subspektra a menšitel s kladnými hodnotami normované intenzity druhého subspektra. U dalších pěti spekter (patřících měření B a C) je situace opačná. Můžeme tedy říct, že deuterace proběhla lépe u měření, kdy proběhla filtrace. Filtrem projdou jen menší nanočásticové krystaly, které obsahují méně guaninu ve vnitřní části nanokrystalu. To odpovídá situaci, že v roztoku guanin obsahuje menší nanokrystaly, může dojít k větší deuteraci molekul guaninu, a ve spektru tedy pozorujeme větší přítomnost deuterovanějších forem guaninu. Tato tendence byla viditelná pro všechny vzorky. Pro guanin připravený za tepla byla akorát odlišná situace v tom, že guanin se mohl deuterovat úplně a ve spektrech byl přítomen guanin D5. U vzorku 0 cold a 0 hot, kdy guanin nemohl být deuterován, nebyl spatřen žádný rozdíl ve spektru, a tedy různost přípravy vzorků za studena a za tepla nevnáší chyby na náš experiment

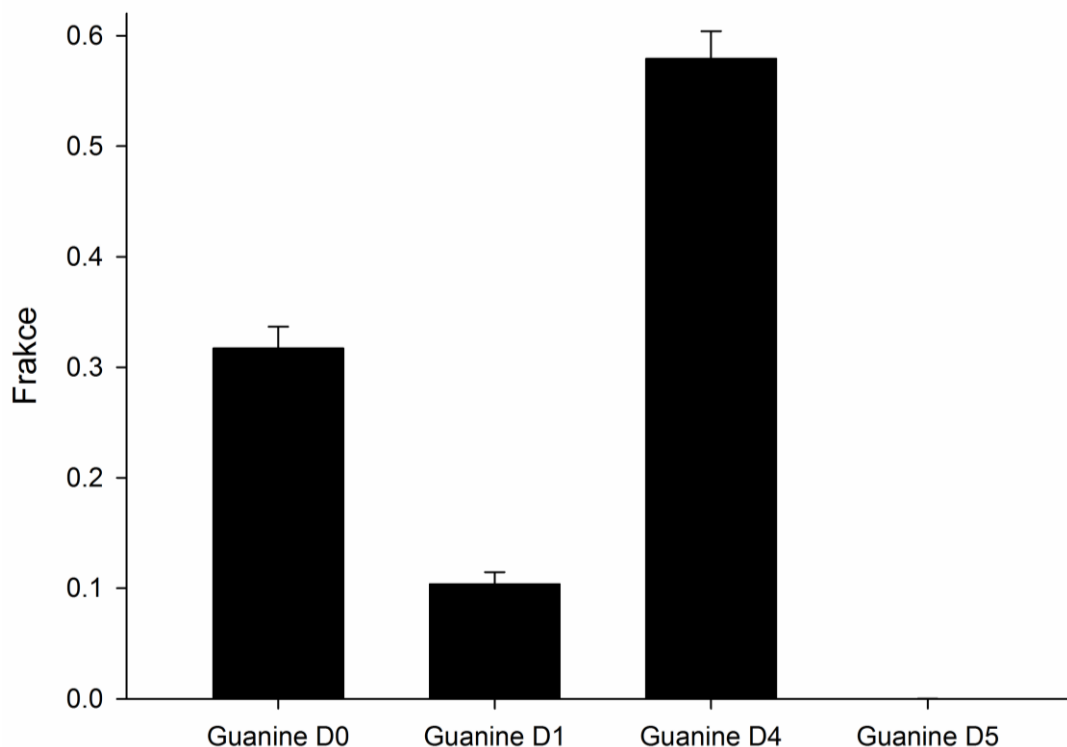


Obrázek 3.5.8. – Koeficienty zastoupení prvního a druhého subspektra pro jednotlivá spektra u vzorku 100 cold

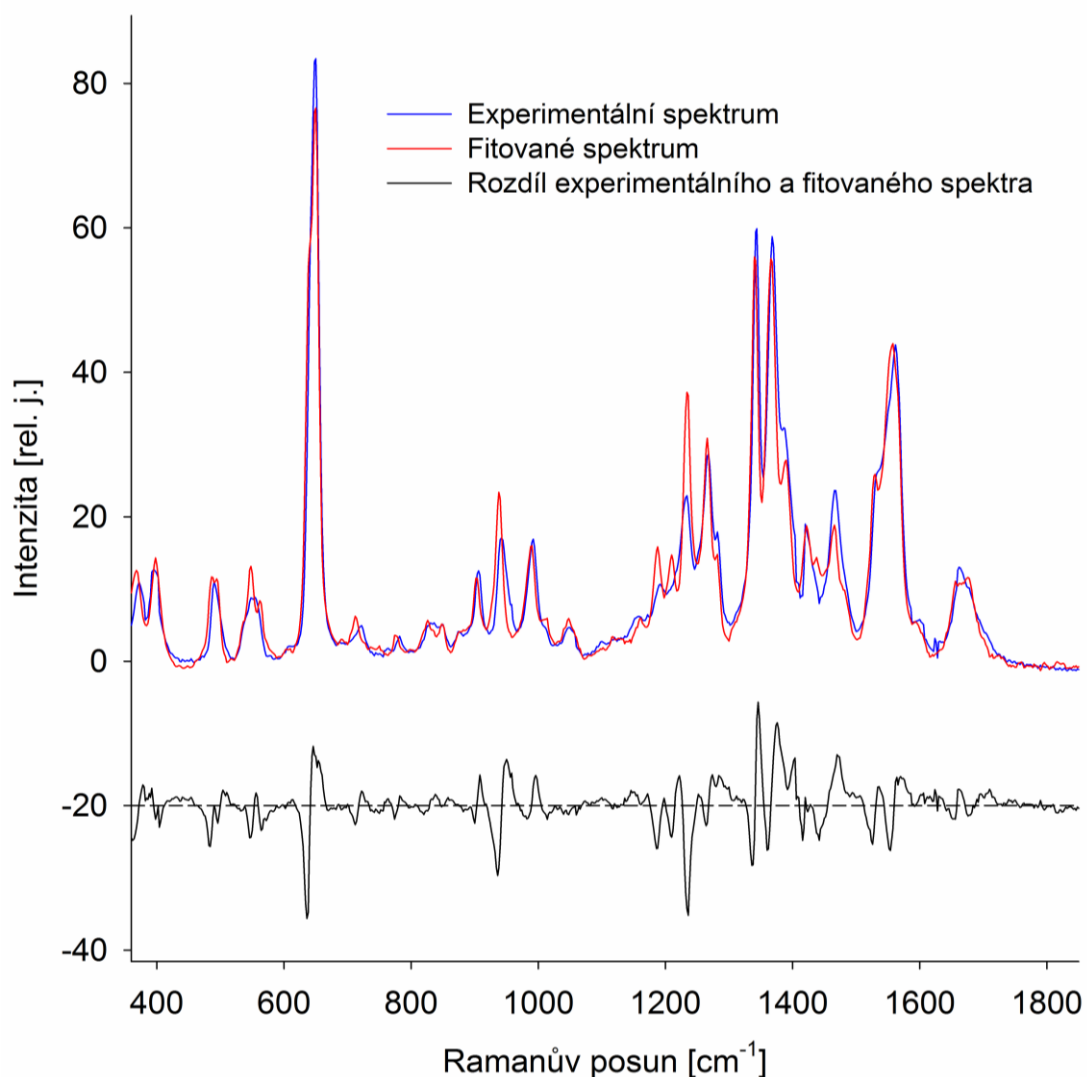
U vzorku 100 cold jsme si ukázali, že se guanin nedeuteroval na formu guanin D4 úplně. Pokud uděláme faktorovou analýzu na vzorky připravené z roztoků, které obsahovaly nějaké zastoupení H_2O a D_2O , máme dva vlivy, kterými můžeme získat různě deuterované a protonované formy guaniny. Jedním ze zmíněných vlivů je neúplná deuterace guaninu díky nanokrystalům v roztoku a druhým vlivem je současná deuterace a protonace v daném poměrovém zastoupení H_2O a D_2O . Tyto dva vlivy by bylo možné odlišit pouze tehdy, kdyby v roztoku nevznikaly nanokrystaly guaninu. Zánik nanokrystalů v roztoku (a tedy možnost nadeuterování všech molekul guaninu) při zvoleném způsobu přípravy nebylo možné zapříčinit ani při filtraci 3 kDa filtrem.

Zmínili jsme si, že mohou vznikat krystaly jako guanin D0 a guanin D4. Reálně existují i jiné deuterované formy guaninu. Samotná deuterace guaninu totiž může proběhnout i na jiných polohách než u poloh čtyř používaných deuterovaných forem. Jedná se tedy o faktor, který je třeba uvážit v interpretaci spekter (brát v potaz fakt, že ve skutečnosti dochází i k jiné deuteraci guaninu) a který je třeba uvážit při rozkladu

spekter do lineární kombinace čtyř standardních deuterovaných forem. Po faktorové analýze provedené na všech vzorcích byla rozdělena spektra pro jednotlivá měření. Na těchto spektrech byl proveden rozklad do lineární kombinace čtyř standardních deuterovaných forem a následně byly hodnoty v rámci jednotlivých měření a vzorků statisticky zpracovány. Byl spočten aritmetický průměr a směrodatná odchylka poměrového zastoupení čtyř deuterovaných forem daného vzorku pro dané měření. Jako příklad uvádíme na obrázku 3.5.9. poměrové zastoupení deuterovaných forem guaninu na vzorku 100 cold z měření B, na kterém byla v předchozím textu předložena společně s měřeními A a C faktorová analýza. Kromě zmíněných deuterovaných forem guaninu D1 a guaninu D4 si můžeme všimnout deuterované formy guaninu D1. Guanin D5 není ve vzorku přítomný a tento výsledek odpovídá skutečnosti, že přípravou za studena by tato deuterovaná forma neměla vznikat. Guanin D1 by také neměl být ve vzorku přítomný. Jeho poměrové zastoupení ve spektru se dá vysvětlit modelem deuterace, který bude uveden v další podkapitole. Jedno spektrum ze zpracovaných experimentálních extrahovaných spekter si můžeme prohlédnout na další stránce a prohlédnout si rozdíl mezi fitovaným a experimentálním spektrem.



Obrázek 3.5.9. – Poměrové zastoupení deuterovaných forem guaninu na vzorku 100 cold z měření B



Obrázek 3.5.10. – Experimentální, fitované spektrum a jejich rozdíl (vzorek 100 cold měření B)

Na obrázku 3.5.10. máme experimentální extrahované spektrum ze vzorku 100 cold měření B společně s jeho fitovaným spektrem a rozdílným spektrem. Na grafu je lehce shlédnutelné, že některé pásy nejsou dobře fitované. Například u oblasti 1200 cm^{-1} až 1600 cm^{-1} je několik pásů, které nejsou dobře fitované. Podobně oblast okolo 950 cm^{-1} a pás na 645 cm^{-1} není dobře fitována. Ve zmíněných oblastech chybí pásy na 938 cm^{-1} nebo na 1235 cm^{-1} , které by odpovídaly guaninu D0. Ve fitovaném spektru jsou také obsaženy pásy na 638 cm^{-1} , 1187 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} , 1564 cm^{-1} , které by odpovídaly guaninu D4, ale ve experimentálním spektru nejsou přítomné. Podobně guanin D1, který by měl být ve spektru pouze v 10 %, má ve fitovaném spektru navíc oproti experimentálnímu spektru pás

na 1212 cm^{-1} . Ostatní pásy, které ve fitovaném spektru přebývají, odpovídají formám guaninu D0, guaninu D1 nebo guaninu D4. Následně pak ve fitovaném spektru máme rozšířené pásy, z nichž některé pásy nejsou reálné, a odpovídají pouze nejlepšímu možnému fitu pomocí metody nejmenších čtverců.

Tento fit ale nedokázal pomocí čtyř spekter standardních deuterovaných forem sestrojít pásy na následujících Ramanových posunech. Jedná se o pásy na 646 cm^{-1} , 908 cm^{-1} , 950 cm^{-1} , 996 cm^{-1} , 1222 cm^{-1} , 1346 cm^{-1} , 1376 cm^{-1} , 1404 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} a 1662 cm^{-1} . Některé pásy mají analogické hodnoty pásů s pásy spekter čtyř standardně používaných deuterovaných forem guaninu. Například pás na 646 cm^{-1} je téměř shodný s pásem guaninu D1, a právě proto máme spektrum guaninu D1 ve fitovaném spektru zastoupeno. Jedná se ale pouze o fiktivní zastoupení guaninu D1 ve spektru. Právě zmíněné pásy, které ve spektrech nadbývají, patří pásům ostatních deuterovaných forem (viz podkapitola o modelu deuterace guaninu). Proto nám ve fitovaném spektru nadbývají některé pásy ze spekter čtyř standardně používaných deuterovaných forem. Pokud bychom chtěli získat informaci o průměrném spektru ostatních deuterovaných forem, je možné rozložit spektrum fyzikálně pouze do spekter guaninu D1 a guaninu D4. Při této redukci se nám lépe vyjeví zmíněné pásy, které jsou spojeny s průměrným spektrem ostatních deuterovaných forem.

Podobně jako u analogického pásu guaninu D1 na 646 cm^{-1} nalezneme analogické pásy guaninu D0 a guaninu D4, které ve fitovaném spektru nejsou zastoupeny. Jedná se o pásy na 908 cm^{-1} , 1346 cm^{-1} pro guanin D4 a pásy na 646 cm^{-1} , 1470 cm^{-1} pro guanin D0. Dále například pás na 1376 cm^{-1} spektra ostatních deuterovaných forem guaninu je společný pro pásy současně guaninu D0, guaninu D1, guaninu D4. Podobně bychom mohli nalézt i některé pásy guaninu D5, které jsou analogické pásům ostatních deuterovaných forem guaninu. Z předložených úvah na vzorku 100 cold měření B je jasné, že zastoupení guaninu D0, guaninu D1, guaninu D4 a guaninu D5 ve vzorku není úplně přesné (je menší než vypočtené). O zastoupení ostatních deuterovaných forem ve vzorku nemáme žádnou informaci.

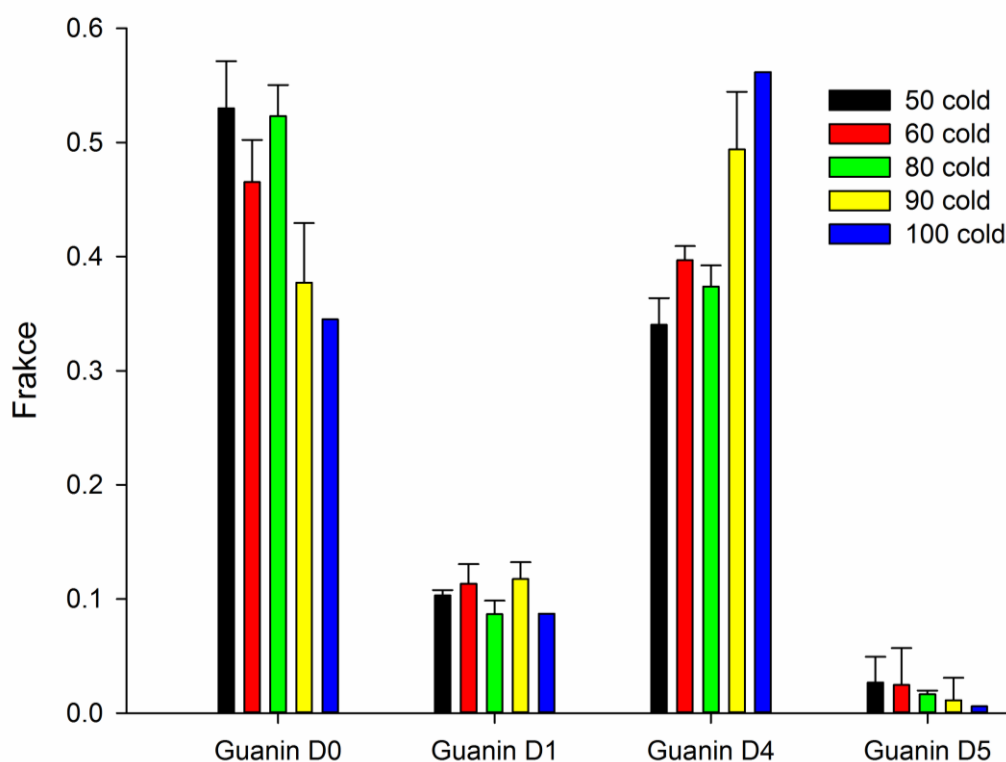
Podobně jako na příkladu spektra 100 cold měření B budou hrát roli v jiných spektrech vzorků (kromě vzorků guaninu 0 cold a guaninu 0 hot) ostatní deuterované formy guaninu. Spočtené zastoupení jednotlivých čtyř standardních deuterovaných forem bude vždy menší než jejich reálné zastoupení ve vzorku. Ostatní deuterované formy guaninu budou pak hrát ještě větší roli u vzorků připravených z roztoků se současným zastoupením H_2O a D_2O . Ostatní deuterované formy guaninu pak vznikají

díky nanokrystalům, které neumožňují deuteraci molekul guaninu ve vnitřní části nanokrystalů nebo u kterých některé molekuly jsou rozpouštědlo přístupné jen částečně. Navíc situaci komplikuje možnost současné protonace a deuterace na různých místech molekul guaninu. U deuterace vzorků připravených za tepla bude situace ještě složitější, protože deuterovaných forem guaninu je oproti vzorkům připravených za studena ještě více v důsledku možnosti deuterace vodíku napojeného na osmý uhlík.

Nakonec zmíníme ještě poslední možný faktor, který má vliv na spektrum. Ve skutečnosti nepozorujeme signál od ekvivalentních vibrací jednotlivých čistých různě deuterovaných molekul (krystalů), ale vibrací v různých neekvivalentních místech krystalové mříže. V podkapitole o molekule jsme hovořili o frekvenci vibrace dvouatomové molekuly a zmínili jsme se, že frekvence závisí na druhé derivaci celkové potenciální energie a na hmotnosti jader. U víceatomových molekul (jako guaninu) bude stále frekvence vibrací záviset určitým způsobem (dle daného uspořádání systému) i na těchto veličinách. Pokud vložíme jakýkoliv defekt nebo dopant do vzorku (pro nás deuterium místo protonu a naopak), změníme tím hmotnosti jader a frekvence určitých vibrací (efekt nemusí být u všech vibrací) se díky změně hmotností jader změní. Navíc se ale může také změnit frekvence vibrací díky změně celkové potenciální energie a její závislosti. Tato změna může být například způsobena jiným uspořádáním molekul guaninu v krystalu, když obsahují deuterium. Můžeme pak pozorovat jinou frekvenci určitých vibrací (efekt nemusí být u všech vibrací) na různém Ramanově posunu. Také jiný vliv okolí na molekuly bude měnit frekvence určitých vibrací a ve výsledku budeme pozorovat nehomogenní rozšiřování pásů (čar) podobně jako v případě elektronových přechodů. Zmíněné vlivy by bylo možné odstranit v případě malé koncentrace (méně než 1 %) protonů anebo deuteria tak, aby nenarušovala charakteristickou krystalovou strukturu mříže. Podobný efekt dopantu na Ramanovo spektrum nalezneme například v publikaci (TUSCHEL, 2017). Tento efekt by šel tedy eliminovat pouze u vzorků 100 cold, 100 hot, 0 cold a 0 hot. Podařilo se nám ale tyto vzorky připravit v čisté formě pouze v jednom experimentu.

Na obrázku 3.5.11. a 3.5.12. jsou výsledky fitování spekter do čtyř standardních deuterovaných forem guaninu z měření C (tedy při filtraci 20 nm filtry). Vidíme, že při přípravě vzorků v roztoku s větším procentuálním zastoupením D₂O, máme větší zastoupení deuterovanějších forem guaninu. Na obrázku 3.5.11. máme zastoupení deuterovaných forem připravených za studena. Opět se nám potvrzuje fakt,

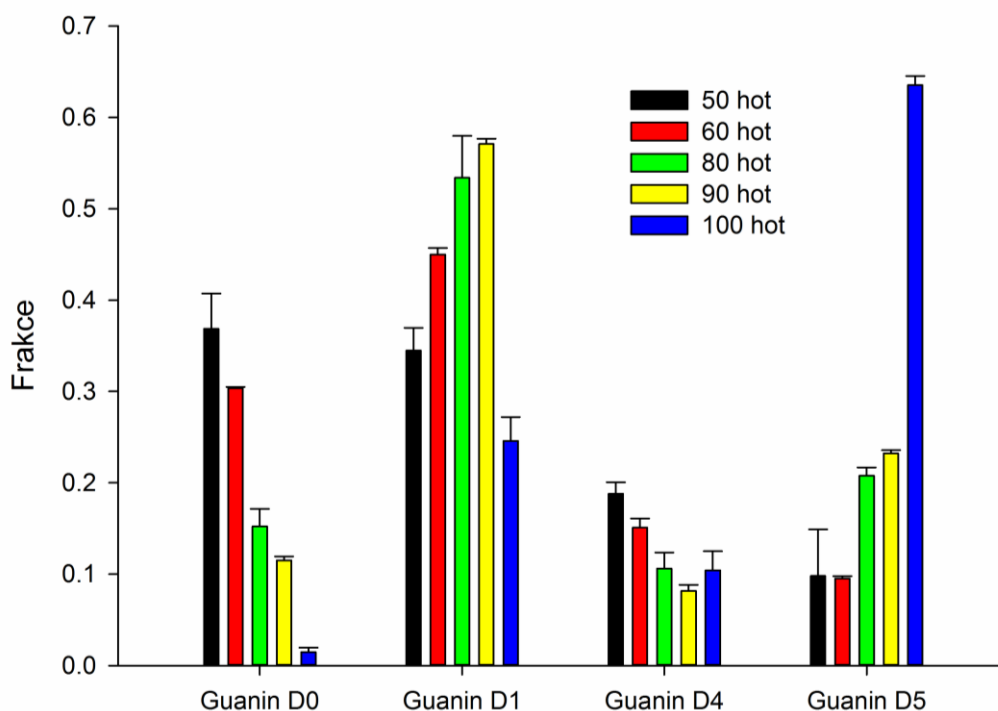
že 20 nm filtry procházejí nanočástice guaninu. V histogramu si můžeme všimnout přítomnosti guaninu D0 i u vzorku 100 cold. Guanin D5 není přítomný a odpovídá správným očekávaným hodnotám. Guanin D1 je přítomný, ale obdobně jako v předchozích případech bych chtěl poukázat na přítomnost ostatních deuterovaných forem. Histogramy u těchto umělých vzorků připravených za studena jsou velmi odlišné od histogramů u guaninu extrahovaného z živých buněk. I při 50 % zastoupení D₂O v médiu byl guanin D0 zastoupen ve spektru pouze z 10 %. Naproti tomu i při 100 % zastoupení D₂O v roztoku byl guanin D0 přítomný ve více než 30 %. Zmíněné umělé krystaly guaninu připravené za studena tedy vůbec neodpovídají spektrům z buněk.



Obrázek 3.5.11. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu umělých vzorků připravených za studena s filtrem 20 nm

Na obrázku 3.5.12. máme zastoupení deuterovaných forem připravených za tepla. 20 nm filtry nanočástice guaninu procházely, neboť je viditelná přítomnost guaninu D1 a guaninu D4, tedy i ostatních deuterovaných forem. Oproti přípravě za studena se ale molekuly guaninu lépe rozpouštěly při vyšší teplotě (nanokrystaly zanikaly a zmenšovaly se) a molekuly guaninu se nadeuterovaly více. Histogramy u těchto umělých vzorků připravených za tepla jsou podobnější k histogramům

u guaninu extrahovaného z živých buněk, ale jsou rozhodněji podobnější než histogramy u umělých vzorků připravených za studena. V buňkách se totiž syntetizuje guanin D5 a nesyntetizuje se skoro vůbec guanin D0. Rozdílnost v histogramech hlavně tkví v zastoupení guaninu D1 a guaninu D4. U buněk jsme si mohli povšimnout zastoupení guaninu D1 menší než 28 %, u umělých vzorků je situace opačná, tedy zastoupení guaninu D1 je vyšší než 25 %. Zastoupení guaninu D4 je naopak vyšší u buněk (je ho více než 30 %) a menší u umělých vzorků připravených za tepla (je ho méně než 20 %). Opět připomínáme zastoupení ostatních deuterovaných forem, kterých je u vzorků připravených za tepla více než u vzorků připravených za studena.



Obrázek 3.5.12. – Histogram zastoupení deuterovaných forem guaninu umělých vzorků připravených za tepla s filtrem 20 nm

Na závěr této podkapitoly ještě zmíníme vliv guaninu monohydrátu na přípravu umělých vzorků. Při přípravě umělých vzorků totiž nemusí vznikat guanin v anhydridové podobě tak, jako vznikl v buňkách. Na obrázku 3.5.12. si můžeme všimnout, že v histogramu chybí data vzorku 70 hot. Tento vzorek byl také připraven, ale nepodařilo se nám vytvořit krystaly v anhydridové podobě. Krystaly, které byly vytvořeny, obsahovaly guanin monohydrát. Nebylo tedy možné na pozadí spektra krystalického guaninu monohydrátu nebo v důsledku velkého šumu ve spektru

extrahovat kvalitní Ramanovo spektrum krystalického guaninu v anhydridové podobě. Guanin monohydrát se vyskytoval nezávisle napříč téměř všemi vzorky.

3.6. Model deuterace guaninu a rozklad spekter z buněk do umělých spekter

Bohužel je možné připravit pouze čtyři čisté různě deuterované formy guaninu, a to již zmíněné D0, D1, D4 a D5. Pokud uvážíme, že protony na amino skupině nejsou ekvivalentní kvůli odlišnému prostorovému umístění, máme celkově pět neekvivalentních možností deuterace. Je potřeba odlišovat guanin připravený za tepla (hot), kdy je možné isotopicky zaměnit všechny vodíky, a guanin připravený za studena (cold), kdy je možné isotopicky zaměnit pouze čtyři vodíky, které nejsou kovalentně navázány na uhlík. Na matematický model deuterace guaninů lze lehce nahlédnout na obrázku 3.6.1. Obsazené čtverečky znázorňují deuteraci. Ještě lehčím způsobem lze počet možností deuterace pro každou formu guaninu spočítat, pokud si uvědomíme, že vždy vlastně vybíráme k-člennou kombinaci z n-prvků. Jedná se vlastně o dva řádky Pascalova trojúhelníku. Tedy pro měření za studena máme $n=4$ a pro měření za tepla máme $n=5$. V tabulce 3.6.1. máme zapsán výsledek pro všechny formy guaninu a přípravy za tepla nebo za studena. Je jasné, že ostatní deuterované formy jsou různé pro vzorek připravený za tepla a za studena. Pro vzorek za studena se jedná o směs jednou, dvakrát nebo třikrát deuterovaných forem guaninu, kdežto pro vzorek připravený za tepla se jedná o směs jednou, dvakrát, třikrát a čtyřikrát deuterovaných forem guaninu.

Počet deuterací	Pro měření za studena	Pro měření za tepla
Žádná	1	1
Jednou	4	5
Dvakrát	6	10
Třikrát	4	10
Čtyřikrát	1	5
Pětkrát	0	1

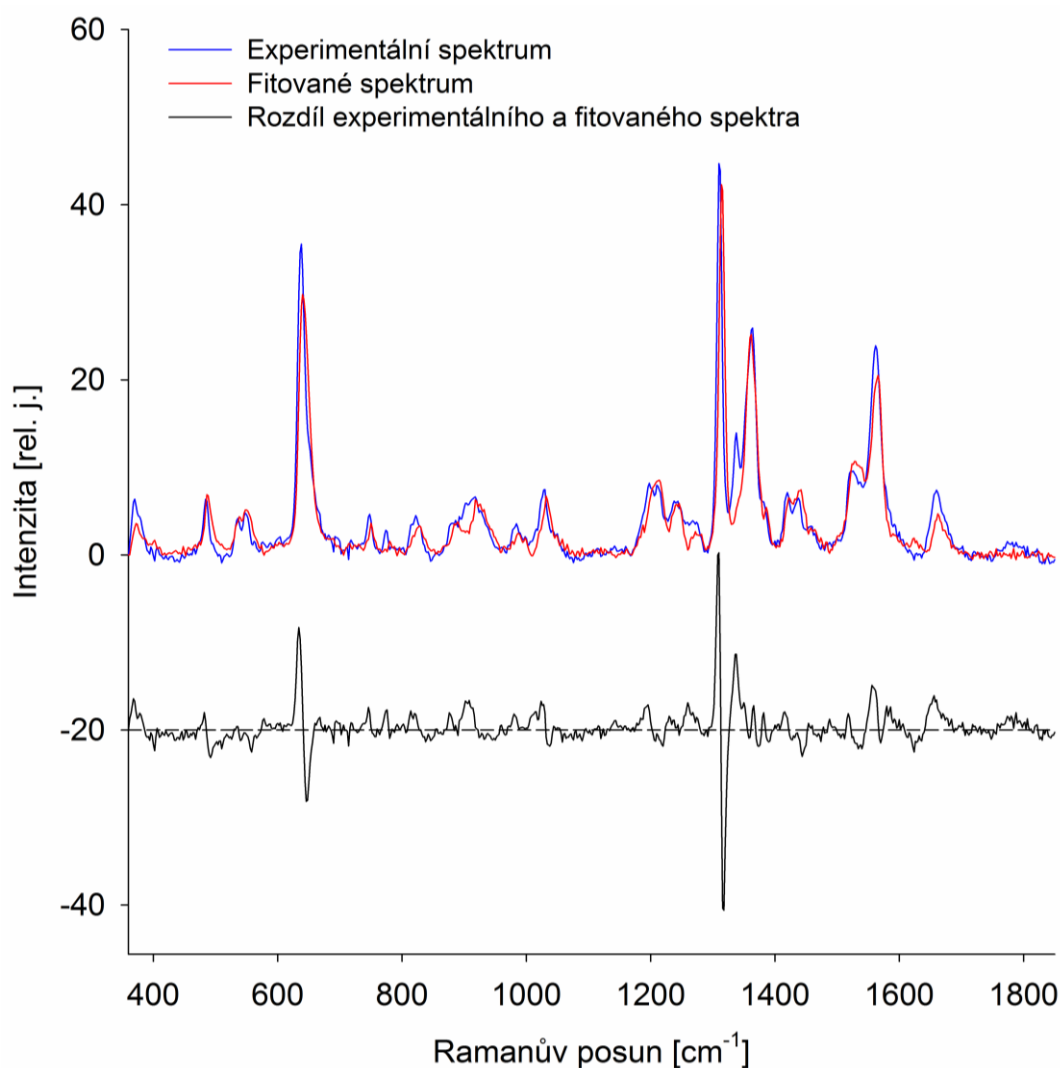
Tabulka 3.6.1. – Počet možností pro různě deuterované formy guaninu, a to pro měření za studena a pro měření za tepla

Počet deuterací	Pro měření za studena				Pro měření za tepla				
Žádná									
Jednou									
Dvakrát									
Třikrát									
Čtyřikrát									
Pětkrát									

Obrázek 3.6.1. – Model deuterace guaninu

Odůvodnili jsme si, že ostatní deuterované formy guaninu jsou ve vzorcích, a tedy i ve spektrech, obsaženy. Následně tedy spočtené poměrové zastoupení čtyř deuterovaných forem guaninu je pouze přibližné. Zkusme oproti tomu porovnat extrahované spektrum z buňky se spektry z uměle připravených krystalů.

Extrahované spektrum z buňky kultivované v médiu s 90 % zastoupením D₂O bylo rozkládáno do celkem šesti forem guaninu. Jednalo se o uměle připravené vzorky pomocí 20 nm filtru, a to vzorky 0 cold, 50 hot, 60 hot, 80 hot, 90 hot, 100 hot. Nebylo možné najít tak dobrý rozklad spekter jako u rozkladu pomocí čtyř standardních deuterovaných forem, a to i přesto, že se jedná o rozklad spektra do více komponent. Pro přehlednost uvádíme na obrázku 3.6.2. rozdílové spektrum experimentálního spektra a fitovaného spektra (vertikálně posunuté kvůli přehlednosti), na kterém si dále popíšeme rozdíly mezi fitovaným a experimentálním spektrem. Fitované a experimentální spektrum je také v grafu vyneseno.



Obrázek 3.6.2. – Rozklad spektra z živých buněk do spekter z umělých krystalů

Bylo vypočteno, že experimentální spektrum obsahuje téměř 100 % zastoupení guaninu připraveného ve vzorku 100 hot. Ostatní použité formy k fitování nebyly ve fitovaném spektru zastoupené. Opět se jedná pouze o orientační hodnoty, které nejlépe odpovídají zastoupení uměle připravených krystalů v buňkách. Podobně jako v předchozích případech nedokážeme spektrum rozložit pomocí zvolených standardů spekter přesně. Ukážeme si dále, že by se dalo spektrum lépe popsat pomocí dodatečného rozkladu do uměle připravených krystalů za studena.

Na obrázku 3.6.2. si můžeme povšimnout jasného nadbytku některých pásů ve fitovaném spektru (záporné hodnoty intenzity rozdílového spektra). Například rozdílový pás na 649 cm^{-1} patří guaninu D0. Ten není ale obsažen dle obrázku 3.5.12. ve vzorku 100 hot a při podrobné analýze si lze všimnout, že skutečný pás vzorku 100 hot se nachází na 640 cm^{-1} . Také si lze všimnout rozdílné poloviny šířky v polovině maxima γ (HWHM, half width at half maximum) jednotlivých pásů. HWHM jsme spočetli pomocí fitu Lorentzovou funkcí.

$$y = \frac{a}{1 + \left(\frac{x - x_0}{\gamma}\right)^2} \quad (14)$$

V rovnici mají další proměnné a konstanty následující význam. Poloha středu pásu je označena jako x_0 a odchylka od jejího středu jako x . Konstanta a potom škáluje hodnoty v maximu Lorentzovy funkce, aby co nejlépe vystihovala průběh pásu a jeho naměřenou experimentální hodnoty intenzity y . Následně pak byly v programu Sigmaplot vypočteny následující hodnoty HWHM s jejich směrodatnou odchylkou, a to $8,6 \pm 0,3\text{ cm}^{-1}$ pro vzorek 100 hot a $7,6 \pm 0,4\text{ cm}^{-1}$ pro guanin z živých buněk. Uvažujeme, že guanin v buňkách má pravidelnější a jinou strukturu krystalové mřížky než u krystalů guaninu u vzorku 100 hot, což odpovídá změně šířky a posunu pásů.

Podobně jako u neskutečného pásu guaninu D0 je viditelný nadbytek intenzity u pásu na 1315 cm^{-1} , který odpovídá vlastnímu charakteristickému pásu vzorku 100 hot posunutému od skutečného pásu guaninu D5 (nejedná se o posunutí spektra díky rozdílnému nastavení polohy difrakční mřížky). Proto naopak chybí ve fitovaném spektru (kladné hodnoty intenzity rozdílového spektra) také pás na 1309 cm^{-1} . Podobně ve fitovaném spektru nenajdeme další pásy (nebo ve spektru nejsou tolik intenzivní) jako na 638 cm^{-1} , 902 cm^{-1} , 988 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , 1564 cm^{-1} a na 1658 cm^{-1} , které patří guaninu D4 (mohli bychom zmínit i jiné pásy). Zde by bylo vhodné místo ostatních vzorků, které nebyly ve spektru zastoupeny, použít k fitování spektra uměle připravených krystalů za studena. U těchto krystalů připravených za studena právě

vznikal ve větším množství guanin D4 (odpovídající spíše více deuterovanějším formám guaninu).

Zmíněným postupným fitováním bychom se nedostali k žádné další důležité informaci. Bohužel jsme nepřipravili umělé krystaly tak, aby obsahovaly přesné zastoupení deuteria a protonů ve vzorku. V roztoku vznikaly nanokrystaly, které by bylo možné odstranit pouze filtrací s ještě menšími filtry. I potom by ale záleželo na rovnovážné konstantě mezi různými deuterovanými a protonovanými formami guaninu, tedy záleželo by na ochotě deuterovat a protonovat guanin v daných místech molekuly. Pokud by ale ochota deuterovat a protonovat molekuly guaninu by byla stejná, mohli bychom ze spekter vzorků o známé přesné deuteraci a protonaci guaninu zjistit lepší informace o pásech ostatních deuterovaných forem. Z těchto spekter by bylo totiž možné statistickým zpracováním v modelu deuterace přiřadit a následně i simulovat spektra (popřípadě pouze jejich určitých pásů) průměrného zastoupení daných forem guaninu. Tyto spektra nebo pásy budou ale zatíženy chybou při nevhodně zvoleném modelu deuterace guaninu a chybou statistického zpracování.

Ke konci této podkapitoly bych zmínil ještě právě vliv statistického a zároveň i uživatelského zpracování na výsledky. Odstraňování pásů kosmického záření proběhlo dvakrát, poprvé automaticky pomocí funkce *Cosmic Ray Removal* a po druhé manuálně, kdy byla prohlédnuta chemická mapa, která byla fitována spektry různými charakteristickými spektry (lipidů, mořské vody, guaninu, aj.) a u které byl hledán jeden nebo dva výrazně odlišné pixely (obsahovaly spektra s vysoce intenzivními úzkými pásy nebo pásem). Pásy kosmického záření byly odstraněny dvakrát a různými způsoby, proto chybu způsobenou pásy kosmického záření vůbec neuvažují. Dále bylo provedeno odečtení pozadí pomocí polynomu čtvrtého nebo šestého stupně. Zde mohlo dojít k vnesení malé chyby do spektra, a to hlavně u krajních hodnot spektra. Bylo nutné pozorně odečítat pozadí, aby nedocházelo k vzniku artefaktů ve spektru. Intenzivní pásy ale určitě tímto efektem nebyly tolik ovlivněny. Navíc jsme se po odečítání spekter snažili tyto spektra zprůměrovat. Zprůměrování spekter v programu Project Five Plus určitě pomohlo získat spektrum, které nebylo zatíženo šumem. Zde bylo nutné zpozornět, abychom nezprůměrovaly spektra, které nemají už tak velkou intenzitu a obsahují větší množství šumu. Podobně nemohly být zprůměrována spektra, která v sobě obsahovala spektra jiných molekul než guaninu. Zprůměrování by pak nevedlo ke zlepšení celkového spektra. Bohužel se někdy nepodařilo vyhnout spektrům, které v sobě obsahují jiná spektra látek. Tedy tyto spektra bylo nutné odečíst

pomocí jiných zprůměrovaných spekter například mořské vody nebo plastidů, které mohly obsahovat ve vyšší míře šum. Při tomto odečítání spektra mohlo dojít ke snížení kvality spektra a nepřesnostem v intenzitách některých pásů. Pokud k nepřesnostem docházelo, pravděpodobně minimálně. Následně jsme měli celková spektra guaninů (i jiných charakteristických látek), u kterých jsme dále odečítali pozadí. Spektra jsme odečítali takovým způsobem, abychom získali spektra vhodné k rozkladu spekter do různých forem guaninu. I při málo odlišném odečtení pozadí se změnila zastoupení forem guaninu. Tato změna v zastoupení forem guaninu byla ale stále menší, než jaká byla směrodatná odchylka spočtená z několika zastoupených forem guaninu napříč stejnými vzorky. Pro měření jsme měli větší systematickou chybu, než je chyba statistická. Větší chybu uvažujeme v různorodosti stejných vzorků než chybě patřící mírně odlišnému statistickému zpracování a chybě ve samotném statistickém zpracování. Navíc opět nakonec připomeneme, že neznalost zastoupení ostatních deuterovaných forem guaninu ve vzorku vnáší do spočtených hodnot zastoupení forem guaninu největší chybu.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala konfokální Ramanovou mikroskopií živých buněk a možnostmi monitorováním syntézy biomolekul značených stabilními isotopy, konkrétně jejich deuterace. Práce představuje součást širšího grantového projektu GAČR 17-06264S „Růst a dělení ve stabilních izotopech - více než metabolické značení“. Pro sledování syntézy deuterovaných biomolekul byl použit jednobuněčný organismus mořská obrněnka *A. carterae*. Bylo připraveno celkem pět různých kultur lišících se procentuálním zastoupením těžké a normální vody v médiu. U každé z kultur byl sledován její růst a společné charakteristiky. Z výsledků vyplývá, že buňky *A. carterae* v médiích s větším obsahem D₂O (nad 80 %) rostly hůře. U kultur s obsahem D₂O větším než 90 % byla viditelná změna morfologie (kulovitý tvar), zastavení dělení a snížená pohyblivost buněk. Pro *A. carterae* tedy prostředí s vysokým obsahem D₂O představuje značnou stresovou zátěž. Přes omezený růst byly buňky i v 90 % D₂O metabolicky aktivní a vytvářely deuterované biomolekuly včetně krystalického guaninu.

Pomocí Ramanovy mikroskopie byly naměřeny kvalitní chemické mapy odrážející deuterací stav buněk. Chemické mapy byly vytvořeny z naměřených Ramanových spekter s nižším (10 μW pro chemické mapy karotenoidů) a vyšším (34 mW pro chemické mapy ostatních látek) výkonem laseru. Zvýšení kvality chemických map bylo docíleno dvojnásobným přeočkováním suspenze buněk do média s požadovaným zastoupením D₂O. Z chemických map byla extrahována charakteristická spektra základních biomolekul nebo organel, tj. karotenoidů, plastidů, neutrálních lipidů, škrobu a krystalického guaninu. V naměřených Ramanových spektrech byla viditelná jasná tendence větší deuteraci molekul v mikrořasách pěstovaných v médiích s větším obsahem D₂O.

Hlavním přínosem této práce pak byla analýza stupně deuterace guaninových krystalů biosyntetizovaných v živých buňkách. Tato analýza byla provedena pomocí rozkladu spekter extrahovaných z buněk do lineární kombinace spekter čtyř referenčních deuterovaných forem guaninu, nedeuterovaného guaninu D₀ a tří deuterovaných forem guaninu D₁, D₄ a D₅. Guanin, který se v buňkách nacházel, se vyskytoval ve formě krystalu v anhydridové podobě. Na histogramech zastoupení

deuterovaných forem guaninu byla ukázána postupná deuterace guaninu v krystalech vlivem delší doby po přeočkování a vlivem většího zastoupení D₂O v médiích.

Rozklady prokázaly, že spektra krystalů deuterovaných biosynteticky v *A. carterae* nelze beze zbytku aproximovat spektry syntetických referenčních vzorků. Na nepřesnost určení zastoupení čtyř standartních deuterovaných forem guaninu má vliv několik faktorů. Největší vliv má zřejmě přítomnost jiných deuterovaných forem guaninu, které nešlo připravit jako čisté referenční vzorky postupem použitým v této práci. Pro objasnění byl vytvořen teoretický model deuterace guaninu. Ten umožnil lépe pochopit, proč tak velkou roli hraje přítomnost ostatních deuterovaných forem guaninu ve spektru.

Ze zmíněných důvodů jsme se pokusili připravit další syntetické krystaly guaninu deuterovaného v neutrálních roztocích se stejným zastoupením D₂O a H₂O, v jakých byly pěstované *A. carterae*, pomocí kterých by bylo možné lépe aproximovat přítomnost ostatních deuterovaných forem biogenního guaninu. Umělé krystaly byly připraveny za neutrálního pH (pD) odlišným způsobem než krystaly čtyř standartních deuterovaných forem guaninu. Bohužel jsme přitom zjistili, že tento postup komplikuje přítomnost nanokrystalů nerozpuštěného guaninu v roztocích, která brání deuteraci zejména za nižších teplot. Existence těchto nanokrystalů byla objevena a publikována pouze nedávno (2018) jinými autory a naše zjištění představuje potvrzení jejich pozorování nezávislou metodou.

Provedli jsme celkem čtyři různé pokusy eliminovat vliv nanokrystalů na deuteraci vzorků. Snaha odstranit nanokrystaly z roztoků byla provedena pomocí filtrace různě propustných filtrů. Práce proto obsahuje informace o postupném vlivu různé filtrace na vzorky. Všechny výsledky měření byly zpracovány pomocí faktorové analýzy. Zpracování pomocí faktorové analýzy je detailněji ukázáno ve výsledcích měření a diskuzi na jednom ze vzorků. I filtrováním různými filtry nebylo možné úplně eliminovat nanokrystaly z roztoků. Uvedeným postupem jsme získali vzorky guaninu o nižším stupni deuterace, než s jakou deuterací se vzorky ve skutečnosti měly připravit. Spektra nových referencí jsme rozložili do čtyř standartních deuterovaných forem, s podobným výsledkem jako v případě biogenního guaninu. Opět v interpretaci hrálo nejvyšší roli zastoupení jiných deuterovaných forem guaninu nepostižitelných základními standardy.

Nakonec byla testována možnost rozkladu spekter biogenního guaninu do spekter uměle připravených krystalů. Jako nejvhodnější se ukázal rozklad do spekter

uměle připraveného guaninu za tepla (obsahuje guanin D5) a zároveň do spektra uměle připraveného guaninu za studena (obsahuje ve větším množství guanin D4). Spektra nebo některé pásy ostatních deuterovaných forem by bylo možné sestavit s pomocí modelu deuterace. Byl proveden pouze výčet některých pásů, které by mohly patřit ostatním deuterovaným formám guaninu. Tato diplomová práce se podrobnějšími analýzami spekter a pásů ostatních deuterovaných forem guaninu již nezabývala z časových důvodů, ale získané výsledky by mohly být podkladem pro další studium v rámci této problematiky.

K diplomové práci jsou přidány dvě přílohy. V první příloze je zápočtový projekt, v němž se autor seznámil s nástroji kvantové chemie. K správné interpretaci kvantově-chemických výsledků a jejich použitím na tak složité systémy, jakými jsou krystaly deuterovaného guaninu, tato technika sama o sobě není dostatečná. V druhé příloze je literární rešerše zabývající se současným stavem Ramanovy mikroskopie živých buněk s využitím isotopicky značených látek. Je v ní uvedeno několik příkladů ilustrujících současné tendence výzkumu a možných kombinací s dalšími experimentálními technikami, které by bylo možno v dalším výzkumu využít. Příkladem může sloužit využití tzv. průtokové Ramanovy cytometrie ve výzkumu vlivu antibiotik na lidský mikrobiom.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alster, J., Lokstein, H., Dostál, J., Uchida, A. a Zigmantas, D. 2D Spectroscopy Study of Water-Soluble Chlorophyll-Binding Protein from *Lepidium virginicum*. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014, **118**(13), 3524-3531. ISSN 1520-5207.

Benoit, R. L. a Fréchette, M. Protonation of hypoxanthine, guanine, xanthine, and caffeine. *Canadian Journal of Chemistry*. 1985, **63**(11), 3053-3056. ISSN 0008-4042.

Benzerara, K., Bolzoni, R., Monteil, C., Beyssac, O., Forni, O., Alonso, B., Asta, M. P. a Lefevre, C. The gammaproteobacterium *Achromatium* forms intracellular amorphous calcium carbonate and not (crystalline) calcite. *Geobiology*. 2021, **19**(2), 199-213. ISSN 1472-4669.

Bulkin, B. J., Kwak, Y. a Dea, I. C. M. Retrogradation kinetics of waxy-corn and potato starches; a rapid, Raman-spectroscopic study. *Carbohydrate Research*. 1987, **160**, 95-112. ISSN 0008-6215.

Bura, R. *Vliv hydrofobicity povrchu a náboje molekuly pro Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy.

Burki, F., Shalchian-Tabrizi, K., Minge, M., Skjæveland, Å., Nikolaev, S. I., Jakobsen, K. S. a Pawlowski, J. Phylogenomics Reshuffles the Eukaryotic Supergroups. *PLOS ONE*. 2007, **2**(8), e790. ISSN 1932-6203.

Carey, P. *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies 1st Edition*. Londýn: Academic Press, 1982. ISBN 978-0-12-159650-7.

Cole, R. W., Jinadasa, T. a Brown, C. M. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nature Protocols*. 2011, **6**(12), 1929-1941. ISSN 1750-2799.

Cowan, D. O., Drisko, L. *Elements of Organic Photochemistry*. New York: Plenum Press, 1976. ISBN 978-1-4684-2132-3.

Cremer, C., Kaufmann, R., Gunkel, M., Pres, S., Weiland, Y., Müller, P., Ruckelshausen, T., Lemmer, P., Geiger, F., Degenhard, S., Wege, C., Lemmermann, N. a W., Holtappels, R., Strickfaden, H. a Hausmann, M. Superresolution imaging of biological nanostructures by spectral precision distance microscopy. *Biotechnology Journal*. 2011, **6**(9), 1037-1051. ISSN 1860-6768.

- Darvishzad, T. a Kurek, S. S. Anti- and pro-oxidative activity measured directly as the extent of 8-oxoguanine production. *Electrochimica Acta*. 2017, **240**, 466-473. ISSN 0013-4686.
- Darvishzad, T., Lubera, T. a Kurek, S. S. Puzzling Aqueous Solubility of Guanine Obscured by the Formation of Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2018, **122**(30), 7497-7502. ISSN 1520-6106.
- De Oliveira, V. E., Neves Miranda, M. a. C., Soares, M. C. S., Edwards, H. G. M. a De Oliveira, L. F. C. Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015, **150**, 373-380. ISSN 1386-1425.
- Delabar, J.-M. a Majoube, M. Infrared and Raman spectroscopic study of ¹⁵N and D-substituted guanines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. 1978, **34**(2), 129-140. ISSN 0584-8539.
- Derose, J. A. a Doppler, M. Guidelines for Understanding Magnification in the Modern Digital Microscope Era. *Microscopy Today*. 2018, **26**(4), 20-33. ISSN 1551-9295.
- Devoe, H. a Wasik, S. P. Aqueous solubilities and enthalpies of solution of adenine and guanine. *Journal of Solution Chemistry*. 1984, **13**(1), 51-60. ISSN 1572-8927.
- Dhillon, I. a Sra, S. Generalized Nonnegative Matrix Approximations with Bregman Divergences. *Neural Information Processing Systems*. 2005, 283-290. ISSN 1049-5258.
- Dirac, P. a. M. a Fowler, R. H. The quantum theory of the electron. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*. 1928, **117**(778), 610-624. ISSN 1471-2946.
- Dodge, J. D. *Dinoflagellates*. San Diego: Academic Press, 1984. ISBN 978-0-12-656520-1.
- Dorrell, R. G., Nisbet, R. E. R., Barbrook, A. C., Rowden, S. J. L. a Howe, C. J. Integrated Genomic and Transcriptomic Analysis of the Peridinin Dinoflagellate *Amphidinium carterae* Plastid. *Protist*. 2019, **170**(4), 358-373. ISSN 1434-4610.
- Eleuch, H. a Hilke, M. ERS approximation for solving Schrödinger's equation and applications. *Results in Physics*. 2018, **11**, 1044-1047. ISSN 2211-3797.
- Ferraro, J. R., Nakamoto, K., Brown, C. W. *Introductory Raman Spectroscopy, second edition*. Londýn: Academic Press, 2002. ISBN 978-0-08-050912-9.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A. V., Bloino, J., Janesko, B. G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H. P., Ortiz, J. V., Izmaylov, A. F., Sonnenberg, J. L., Williams, Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V. G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J. J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Keith, T. A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J. M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J. B. a Fox, D. J. Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT, 2016.

Gemulla, R., Nijkamp, E., Haas, P. J. a Sismanis, Y. Large-scale matrix factorization with distributed stochastic gradient descent. *Knowledge Discovery and Data Mining*. 2011, 69-77. ISSN 1942-4795.

Gerber, R. B. On the Order of Accuracy of the Born-Oppenheimer Approximation for Molecular Collision States. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1969, **309**(1497), 221-244. ISSN 1364-5021.

Gomes Da Costa, S., Richter, A., Schmidt, U., Breuninger, S. a Hollricher, O. Confocal Raman microscopy in life sciences. *Morphologie*. 2019, **103**(341), 11-16. ISSN 1286-0115.

Gray, N. Knowing the limit. *Nature Cell Biology*. 2009, **11**, S8. ISSN 1476-4679.

Gregorová, Š. *Ramanova mikrospektroskopie a mapování jednotlivých buněk*. Praha, 2013. Diplomová práce. Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy.

Gur, D., Palmer, B. A., Weiner, S. a Addadi, L. Light Manipulation by Guanine Crystals in Organisms: Biogenic Scatterers, Mirrors, Multilayer Reflectors and Photonic Crystals. *Advanced Functional Materials*. 2017, **27**(6), 1603514. ISSN 1616-301X.

Gur, D., Pierantoni, M., Eloul Dov, N., Hirsh, A., Feldman, Y., Weiner, S. a Addadi, L. Guanine Crystallization in Aqueous Solutions Enables Control over Crystal Size and Polymorphism. *Crystal Growth & Design*. 2016, **16**(9), 4975-4980. ISSN 1528-7483.

Heintzmann, R. a Huser, T. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. *Chemical Reviews*. 2017, **117**(23), 13890-13908. ISSN 0009-2665.

Hinrichs, K., Silaghi, S. D., Cobet, C., Esser, N. a Zahn, D. R. T. Ellipsometry from infrared to vacuum ultraviolet: Structural properties of thin anisotropic guanine films on silicon. *physica status solidi (b)*. 2005, **242**(13), 2681-2687. ISSN 0370-1972.

Hinz, H.-J. *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*. Berlín: Springer, 1986. ISBN 978-3-642-71116-9.

Hirano, A., Tokunaga, H., Tokunaga, M., Arakawa, T. a Shiraki, K. The solubility of nucleobases in aqueous arginine solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, **497**(1-2), 90-96. ISSN 0003-9861.

Hofmann, E., Wrench, P. M., Sharples, F. P., Hiller, R. G., Welte, W. a Diederichs, K. Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science*. 1996, **272**(5269), 1788-1791. ISSN 1095-9203.

Hulburt, E. M. The taxonomy of unarmored *Dinophyceae* of shallow embayments on Cape Cod, Massachusetts. *Biological Bulletin (Woods Hole)*. 1957, **112**, 196-219. ISSN 0006-3185.

Jehlička, J., Edwards, H. G. M., Osterrothová, K., Novotná, J., Nedbalová, L., Kopecký, J., Němec, I. a Oren, A. Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2014, **372**(2030), 1-17. ISSN 1364-503X
1471-2962.

Kornberg, A., Rao, N. N. a Ault-Riché, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*. 1999, **68**, 89-125. ISSN 0066-4154.

Lee, K. S., Palatinszky, M., Pereira, F. C., Nguyen, J., Fernandez, V. I., Mueller, A. J., Menolascina, F., Daims, H., Berry, D., Wagner, M. a Stocker, R. An automated Raman-based platform for the sorting of live cells by functional properties. *Nature Microbiology*. 2019, **4**(6), 1035-1048. ISSN 2058-5276.

Li, Q., Batchelor-Mcauley, C. a Compton, R. G. Electrochemical Oxidation of Guanine: Electrode Reaction Mechanism and Tailoring Carbon Electrode Surfaces To Switch between Adsorptive and Diffusional Responses. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, **114**(21), 7423-7428. ISSN 1520-6106.

Long, D. A. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. ISBN 978-0-471-49028-9.

- Maia, L., Fleury, B., Lages, B., Creed, J. a Cappa De Oliveira, L. F. Chapter 10. New Strategies for Identifying Natural Products of Ecological Significance from Corals. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2014, **43**, 313-349. ISSN 1572-5995.
- Malinowski, E. R. *Factor analysis in chemistry, 3rd edition*. New York: Wiley, 2002. ISBN 978-0-471-13479-4.
- Malý, P. *Optika, 2. vydání*. Praha: Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2246-0.
- Mason, S. F. Purine studies. Part II. The ultra-violet absorption spectra of some mono- and poly-substituted purines. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1954, 2071-2081. ISSN 0368-1769.
- Matuszyk, E., Adamczyk, A., Radwan, B., Pieczara, A., Szcześniak, P., Mlynarski, J., Kamińska, K. a Baranska, M. Multiplex Raman imaging of organelles in endothelial cells. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021, **255**, 119658. ISSN 1386-1425.
- Mojzeš, P., Gao, L., Ismagulova, T., Pilátová, J., Moudříková, Š., Gorelova, O., Solovchenko, A., Nedbal, L. a Salih, A. Guanine, a high-capacity and rapid-turnover nitrogen reserve in microalgal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020, **117**(51), 32722-32730. ISSN 0027-8424.
- Moroz, T. N., Edwards, H. G. M. a Zhmodik, S. M. Detection of carbonate, phosphate minerals and cyanobacteria in rock from the Tomtor deposit, Russia, by Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021, **250**, 119372. ISSN 1386-1425.
- Moudříková, Š., Ivanov, I. N., Vítová, M., Nedbal, L., Zachleder, V., Mojzeš, P. a Bišová, K. Comparing Biochemical and Raman Microscopy Analyses of Starch, Lipids, Polyphosphate, and Guanine Pools during the Cell Cycle of *Desmodesmus quadricauda*. *Cells*. 2021, **10**(1), 62. ISSN 2073-4409.
- Moudříková, Š., Nedbal, L., Solovchenko, A. a Mojzeš, P. Raman microscopy shows that nitrogen-rich cellular inclusions in microalgae are microcrystalline guanine. *Algal Research*. 2017, **23**, 216-222. ISSN 2211-9264.
- Mulliken, R. S. Electronic States and Band Spectrum Structure in Diatomic Molecules. IV. Hund's Theory; Second Positive Nitrogen and Swan Bands; Alternating Intensities. *Physical Review*. 1927, **29**(5), 637-649. ISSN 1539-3755.
- Murrell, B., Weighill, T., Buys, J., Ketteringham, R., Moola, S., Benade, G., Du Buisson, L., Kaliski, D., Hands, T. a Scheffler, K. Non-Negative Matrix Factorization

for Learning Alignment-Specific Models of Protein Evolution. *PLOS ONE*. 2011, **6**(12), e28898. ISSN 1932-6203.

Naemat, A., Sinjab, F., McDonald, A., Downes, A., Elfick, A., Elsheikha, H. M. a Notingher, I. Visualizing the interaction of *Acanthamoeba castellanii* with human retinal epithelial cells by spontaneous Raman and CARS imaging. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2018, **49**(3), 412-423. ISSN 0377-0486.

National Library of Medicine [online] COMPOUND SUMMARY: CID 135398634. Dostupné z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-amino-1_7-dihydropurin-6-one. Citace z 3. 6. 2021.

Nehrke, G., Poigner, H., Wilhelms-Dick, D., Brey, T. a Abele, D. Coexistence of three calcium carbonate polymorphs in the shell of the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *Geochemistry Geophysics Geosystems*. 2012, **13**(5), Q05014. ISSN 1525-2027.

Nekvapil, F., Bunge, A., Barbu Tudoran, L. a Cintă Pinzaru, S. Single-cell Raman micro-spectroscopy for tracking of carotenoids in cyanobacteria exposed to Mn and Zn doped ferrite nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021, **254**, 119607. ISSN 1386-1425.

Palmer, B. A., Taylor, G. J., Brumfeld, V., Gur, D., Shemesh, M., Elad, N., Osherov, A., Oron, D., Weiner, S. a Addadi, L. The image-forming mirror in the eye of the scallop. *Science*. 2017, **358**(6367), 1172-1175. ISSN 1095-9203.

Pilát, Z., Jonáš, A., Pilátová, J., Klementová, T., Bernatová, S., Šiler, M., Maňka, T., Kizovský, M., Růžička, F., Pantůček, R., Neugebauer, U., Samek, O. a Zemánek, P. Analysis of Bacteriophage–Host Interaction by Raman Tweezers. *Analytical Chemistry*. 2020, **92**(18), 12304-12311. ISSN 0003-2700.

Procházka, M. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Bioanalytical, Biomolecular and Medical Applications*. Cham: Springer, 2016. ISBN 978-3-319-23990-3.

Prosser, V. *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 978-80-200-0059-0.

Raman, C. V. a Krishnan, K. S. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928, **121**(3048), 501-502. ISSN 1476-4687.

Ren, B., Pueyo, L., Chen, C., Choquet, É., Debes, J. H., Duchêne, G., Ménard, F. a Perrin, M. D. Using Data Imputation for Signal Separation in High-contrast Imaging. *The Astrophysical Journal*. 2020, **892**(2), 74. ISSN 1538-4357.

- Ren, B., Pueyo, L., Zhu, G. B., Debes, J. a Duchêne, G. Non-negative Matrix Factorization: Robust Extraction of Extended Structures. *The Astrophysical Journal*. 2018, **852**(2), 104. ISSN 1538-4357.
- Renk, K. F. *Basics of Laser Physics: For Students of Science and Engineering, 2nd edition*. Cham: Springer, 2017. ISBN 978-3-319-50650-0.
- Rizzo, P. J. Those amazing dinoflagellate chromosomes. *Cell Research*. 2003, **13**(4), 215-217. ISSN 1001-0602.
- Ryu, Y., Hong, M., Kim, S. B., Lee, T. K. a Park, W. Raman spectroscopy reveals alteration of spore compositions under different nutritional conditions in *Lysinibacillus boronitolerans* YS11. *Journal of Microbiology*. 2021, **59**(5), 491-499. ISSN 1225-8873.
- Samek, O., Jonáš, A., Pilát, Z., Zemánek, P., Nedbal, L., Tříška, J., Kotas, P. a Trtílek, M. Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids in vivo. *Sensors*. 2010, **10**(9), 8635-8651. ISSN 1424-8220.
- Shao, Y., Gu, W., Jiang, L., Zhu, Y. a Gong, A. Study on the Visualization of Pigment in *Haematococcus pluvialis* by Raman Spectroscopy Technique. *Scientific Reports*. 2019, **9**(1), 12097. ISSN 2045-2322.
- Schrader, B. *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. Weinheim: Wiley, 1995. ISBN 978-3-527-26446-9.
- Simon, R. D., Lawry, N. H. a Mclendon, G. L. Structural characterization of the cyanophycin granule polypeptide of *Anabaena cylindrica* by circular dichroism and Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1980, **626**(2), 277-281. ISSN 0006-3002.
- Skála, L. *Kvantová teorie molekul*. Praha: Karolinum, 1995. ISBN 978-80-7184-007-7.
- Smekal, A. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Naturwissenschaften*. 1923, **11**, 873. ISSN 0028-1042.
- Smith E., D., G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. ISBN 978-0-471-49668-7.
- Smith, W. L., Chanley, M. H. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Boston: Springer, 1975. ISBN 978-1-4615-8716-3.
- Strang, G. *Linear Algebra and Its Applications, 4th Edition*. Boston: Cengage Learning, 2006. ISBN 978-0-03-010567-8.

- Suja, M. *Studium mikrokrystalických inkluzí v jednobuněčných řasách pomocí Ramanovy mikroskopie*. Praha, 2018. Diplomová práce. Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy.
- Szabo, A. a Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. New York: Dover Publications, 1996. ISBN 978-0-486-69186-2.
- Szymanski, H. A. *Raman Spectroscopy: Theory and Practice*. New York: Springer, 1967. ISBN 978-1-4684-3026-4.
- Tadepalli, S., Slocik, J. M., Gupta, M. K., Naik, R. R. a Singamaneni, S. Bio-Optics and Bio-Inspired Optical Materials. *Chemical Reviews*. 2017, **117**(20), 12705-12763. ISSN 0009-2665.
- Tandon, R., Sra, S. Sparse nonnegative matrix approximation: new formulations and algorithms. *Technical report. Max Planck Institute for Biological Cybernetics*. 2010, 1-17.
- Tuschel, D. Effect of dopants or impurities on the raman spectrum of the host crystal. *Journal of Spectroscopy*. 2017, **32**(12), 13-19. ISSN 2314-4939.
- Wendell T. Hill, C. H. L. *Light-Matter Interaction: Atoms and Molecules in External Fields and Nonlinear Optics*. Weinheim: Wiley, 2006. ISBN 978-3-527-40661-6.
- Wilkinson, J. H., Reinsch, C. *Handbook for Automatic Computation: Volume II: Linear Algebra*. Berlín: Springer, 1971. ISBN 978-3-642-86940-6.
- Worsfold, P., Townshend, A. a Poole, C. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, 2005. ISBN 978-0-12-369397-6.
- Yang, J. *Deuterium. Discovery and applications in organic chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-811040-9.
- Yang, L., Mih, N., Anand, A., Park, J. H., Tan, J., Yurkovich, J. T., Monk, J. M., Lloyd, C. J., Sandberg, T. E., Seo, S. W., Kim, D., Sastry, A. V., Phaneuf, P., Gao, Y., Broddrick, J. T., Chen, K., Heckmann, D., Szubin, R., Hefner, Y., Feist, A. M. a Palsson, B. O. Cellular responses to reactive oxygen species are predicted from molecular mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019, **116**(28), 14368-14373. ISSN 0027-8424.
- Yu, S., Blennow, A., Bojko, M., Madsen, F., Olsen, C. E. a Engelsen, S. B. Physico-chemical Characterization of Floridean Starch of Red Algae. *Starch - Stärke*. 2002, **54**(2), 66-74. ISSN 0038-9056.

Zachleder, V., Vítová, M., Hlavová, M., Moudříková, Š., Mojzeš, P., Heumann, H., Becher, J. R. a Bišová, K. Stable isotope compounds - production, detection, and application. *Biotechnology Advances*. 2018, **36**(3), 784-797. ISSN 0734-9750.

Zou, Y., Huang, S., Liao, Y., Zhu, X., Chen, Y., Chen, L., Liu, F., Hu, X., Tu, H., Zhang, L., Liu, Z., Chen, Z. a Tan, W. Isotopic graphene-isolated-Au-nanocrystals with cellular Raman-silent signals for cancer cell pattern recognition. *Chemical Science*. 2018, **9**(10), 2842-2849. ISSN 2041-6520.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 2.2.1. – Protokol pro přípravu umělé mořské vody (suché a mokré složky)

Tabulka 2.2.2. – Protokol pro přípravu umělé mořské vody (zásobní roztoky)

Tabulka 3.6.1. – Počet možností pro různě deuterované formy guaninu, a to pro měření za studena a pro měření za tepla

SEZNAM ZKRATEK

- 50 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 50 % zastoupení D₂O
- 50 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 50 % zastoupení D₂O
- 60 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 60 % zastoupení D₂O
- 60 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 60 % zastoupení D₂O
- 70 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 70 % zastoupení D₂O
- 70 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 70 % zastoupení D₂O
- 80 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 80 % zastoupení D₂O
- 80 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 80 % zastoupení D₂O
- 90 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 90 % zastoupení D₂O
- 90 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 90 % zastoupení D₂O
- 100 cold – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za studena z roztoků o 100 % zastoupení D₂O
- 100 cold a – roztok guaninu o 100 % zastoupení D₂O připraveného za studena při původní standardní koncentraci
- 100 cold b – roztok guaninu o 100 % zastoupení D₂O připraveného za studena při koncentraci 10× zředěnější, než byla jeho původní standardní koncentrace
- 100 cold c – roztok guaninu o 100 % zastoupení D₂O připraveného za studena při koncentraci 100× zředěnější, než byla jeho původní standardní koncentrace
- 100 hot – uměle připravený vzorek krystalů guaninu za tepla z roztoků o 100 % zastoupení D₂O

100 hot a – roztok guaninu o 100 % zastoupení D₂O připraveného za tepla při původní standardní koncentraci

A. Carterae – *Amphidinium carterae*, mořská mikrořasa z oddělení obrněnky
aj. – a jiné

Amid I – pás na 1660 cm⁻¹ často sloužící k identifikaci proteinů

Amid II – pás na 1545 cm⁻¹ často sloužící k identifikaci proteinů

Amid III – pás na 1250 cm⁻¹ často sloužící k identifikaci proteinů

AO – atomový orbital

CCD – Charge-Coupled Device, detektor fungující na principu přenosu signálu z pixelu na pixel a následném převedení signálu na napětí

CDD – Cooled Double Detection, typ detektoru s chlazením

CMOS – Complementary Metal Oxide Semiconductor, detektor fungující na principu transformace signálu na napětí přímo uvnitř každého pixelu detektoru

DNA – deoxyribonukleová kyselina, nukleová kyselina hrající roli například v uchování genetické informace u všech živých organismů

eet – přenos excitační energie, nezářivý přechod mezi dvěma molekulami

guanin D0 – nedeuterovaná forma molekuly guaninu

guanin D1 – jednou deuterovaná forma molekuly guaninu, deuterace je na uhlíku

guanin D4 – čtyři krát deuterovaná forma molekuly guaninu, všechny dusíky jsou deuterované, jediná deuterace není provedena na uhlíku

guanin D5 – plně deuterovaná forma guaninu

ic – vnitřní konverze, nezářivý přechod v rámci jedné molekuly

IR – infračervený

isc – mezi systémový přechod, nezářivý přechod v rámci jedné molekuly

LED – Light-Emitting Diode, světelná dioda

měření A – příprava krystalů guaninu z roztoků, které nebyly filtrovány

měření B – příprava krystalů guaninu z roztoků, které byly filtrovány přes 220 nm stříkačkové filtry Millex[®]-GP

měření C – příprava krystalů guaninu z roztoků, které byly filtrovány přes 20 nm stříkačkové filtry Whatman[®] Anotop[®]

měření D – příprava krystalů guaninu z roztoků, které byly filtrovány přes 3 kDa centrifugační filtry Amicon[®] Ultra-15

MO – molekulový orbital

MO-LCAO – metoda lineární kombinace atomových orbitalů, která se často využívá v kvantové chemii

RNA – ribonukleová kyselina, nukleová kyselina hrající roli například v čtení genetického kódu nebo regulaci genové exprese

ROS – Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku

S_i – elektronová hladina tripletního stavu molekuly

SAR – Stramenopila, Alveolata a Rhizaria, superskupina patřící do domény eukaryota

SEM – Scanning Electron Microscope, řádkovací elektronový mikroskop využívající k zobrazování látek urychleného svazku elektronů

stitching snímek – kombinace více snímků v jednom velkém snímku

STO – Slaterův typ orbitalu nebo Slaterova funkce, funkce popisující radiální část bázových funkcí

STO-KG – funkce aproximující Slaterův typ orbitalu pomocí lineární kombinace K Gaussovských funkcí

UV – ultrafialový

VIS – viditelný

T_i – elektronová hladina tripletního stavu molekuly

tzv. – takzvaný

vr – vibrační relaxace, nezářivý přechod v rámci jedné molekuly

WITec – Wissenschaftliche Instrumente und Technologie, německá společnost prodávající řadu různých mikroskopů včetně Ramanova mikroskopu použitého v této práci

PŘÍLOHY

- A) Zápočtový projekt – Simulace isotopicky značených spekter bází nukleových kyselin
- B) Literární rešerše – Využití isotopicky značených látek v Ramanově mikroskopii živých buněk