

Rozsviťme mozek!

D. Friedrich

Gymnázium Elišky Krásnohorské
Ohradní 55, Praha 4, 143 00

daniel.friedrich@gmail.com

R. Čanigová

Bilingválne gymnázium Milana
Hodžu, Komenského 215,
Sučany 038 52

r.canigova@gmail.com

A. Robbová

Církevní gymnázium Plzeň
Mikulášské náměstí 15, 326 00

anna.robbova@seznam.cz

Abstrakt:

Játra jsou nenahraditelným centrem metabolismu a regulátorem glukózové, acidobazické a teplotní homeostázy. Jsou ale životně důležitá i svou syntetickou, sekreční a obrannou funkcí a poškození jater může vést k vážným onemocněním jako je jaterní cirhóza, hepatitida, po sléze rakovina. V naší práci používáme fluorescenční optovláknový konfokální mikroskop, abychom ukázali, jak lze jejich příčinám porozumět – pomocí pozorování znaků zdravých tkání na buňkách potkana. Cílem naší práce je seznámit čtenáře se základními principy, pomocí níž můžeme studovat strukturu orgánů živých organismů, včetně zobrazení *in vivo* (pozorování jater nebo žaludku ve funkci).

1 Úvod

Fluorescenční mikroskopie využívá nejmodernějších poznatků lékařské fyziky, a to fluorescence. Fluorescence je jev, kdy určité struktury ve tkáních reagují na světlo našeho laseru vyzářením světla o určitou vlnovou délku nižšího. Tento rozdíl (tzv. *Stokes shift*) nám pak může dávat informaci o různých látkách v pozorovaném vzorku.

Při pozorování živočichů se však na přirozenou fluorescenci (autoluminiscenci) spolehnout nemůžeme (to nám však zároveň dává kontrolu nad spektry, které v nich pozorujeme), různé struktury si ale můžeme zobrazit, pokud nalezneme fluorescenční látky, které budou vstřebány různými částmi tkání.

V našem experimentu toho docílíme za použití fluorescenčního optovláknového konfokálního mikroskopu Cellvizio Dual Band. Jako mikroskop *optovláknový* využívá pro přenos informací ze vzorku na monitor optická vlákna, a proto se v průběhu ztratí minimum informace. Je to mikroskop *konfokální* a proto světlo z těchto vláken prochází malou štěrbinou, pomocí níž lze přenášet podobu vzorku do 2D obrazu na monitoru. Předtím, než se světlo odrazí od vzorku, je světlo totiž zrcadly nakláněno do různých úhlů, tak, že získáme rozlišení několika bodů na jedno vlákno. Mikroskop je *fluorescenční*, a tak pomocí poloprostného zrcadla zároveň do vzorku vysílá světlo dané barvy (proto potřebujeme lasery, jejichž vlastosti známe) a zároveň můžeme pozorovat posunuté světlo, které vzorek svítí nazpět.

2 Pozorování

Postup

Ke studiu takových struktur laboratoře užívají potkany, protože zdravotní stavy, které studují je na nich možné pozorovat ve velkém. Náš potkan bol na začiatku uspaný pomocou anestetika isofloran, ktoré mu bolo podávané inhalačne počas celej dĺžky experimentu a držal

ho v spánku. Orgán, ktorý sme sa chystali zobrazovať sa nachádzal v pravej časti brušnej dutiny, konkrétne v okolí posledných rebier a tu sme viedli rez kožou. Keď sme sa dostali k svalovému tkanivu brušnej dutiny, rez sme potiahli pozdĺž tzv. bielej čiary, kde sa nachádzajú prevažne šľachovité úchyty svalov a tým pádom sa tam vyskytuje najmenšie krvácanie počas procesu. Keď sa pred nami otvorila brušná dutina zvieratá, mohli sme pozorovať pečeň voľným okom. Takto by sme však nedokázali zobrazit' jej štruktúru, pretože i keď pečeň obsahu aj niekoľko autofluorescentných látok, obsahuje ich v dostatočne malom množstve na to, aby sme ich odmerať nedokázali a zároveň ich aj mohli z nášho merania vylúčiť.

Na to, aby ju naša sonda naopak dokázala zmerať sme najprv museli do brušnej dutiny aplikovať niekoľko kvapiek Akryflavínu, ktorý sa nám naviaže priamo do buniek. Toto farbivo je svojou farbou originálne oranžové, avšak my ho na nameraných výsledkoch vidíme v zelenom odtieni pretože počítač farby transformuje na RGB.

Pozorování orgánů

Keď sme po aplikácii farbiva priložili sondu na pečeň, na počítači sme dokázali rozoznať jej štruktúru až do hĺbky 60 mikrometrov. Dokázali sme pekne rozoznať zväzky buniek a pozorovať ako sa zbiehajú do už predtým spomínaných šesťuholníkových štruktúr.

Naskytlo sa nám však veľa čiernych miest, na ktorých sa mohli nachádzať buď cievy alebo žľčovody. Na to aby sme dokázali presne odlíšiť tieto dve možnosti bolo potkanovi do krvného obehu aplikované ďalšie farbivo, tentoraz Evans blue alebo Evansova modrá. Toto farbivo sa naviaže na krvné bielkoviny a následne prúdi celým telom. Zaujímavosťou je, že toto farbivo je veľmi silné a v priebehu pol hodiny boli modré potkanove orgány, rovnako ako mu omdrievali aj jeho končatiny.

Toto farbivo sme pod mikroskopom videli ako červené a tým dokázali rozoznať cievy od žľčovodov. Žľčovody zostali na našom obraze tmavé, pretože sa v nich nenachádzala žiadna krv s naviazaným farbivom, zatiaľ čo cievy sme dokázali sledovať vo výrazne červených odtieňoch.

Dokázali sme rozoznať malé vlásoknice, ktorými bolo popretkávané tkanivo a vo väčších cievach bol dokonca badateľný aj nepatrný pohyb červených krviniek.

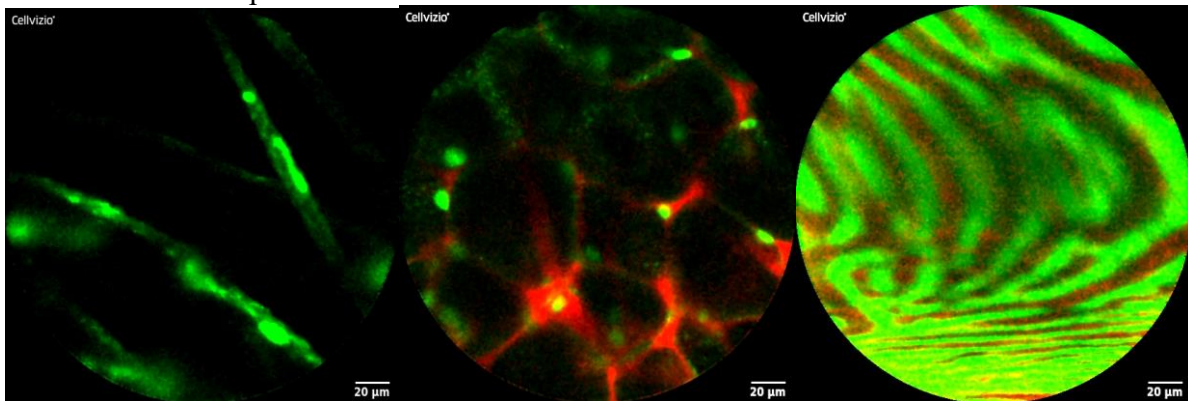
Jiné

Na rozdiel od živočíšnych tkanív, rastlinné pletivá obsahujú vysoký pomer autofluorescentných látok. Keby chceme merať rastlinu rovnakým spôsobom, museli by sme buď vziať do úvahy všetky farbivá, ktoré obsahuje a následne ich vylúčiť alebo ich využiť v náš prospech. Preto keď sme skúmali pod mikroskopom lístok z rastliny, nemuseli sme mu dodávať žiadne farbivo a i tak sme mali viditeľný výsledok. Boli viditeľné žilky, ktoré sa v liste nachádzajú rovnako ako aj v prípade zvieracieho tkaniva. Okolie žiliek a vlastne väčšina listu mala pod našim mikroskopom červenú farbu. Z toho sa dá logicky vydedukovať, že chlorofyl dosahuje v našich meraniach vlnovú dĺžku červeného svetla. Taktiež sme na rastline narazili aj na akési zeleno-žiariace objekty ale tie sme neboli schopní ďalej identifikovať, keďže listy obsahujú množstvo podobných látok. Taktiež to mohlo byť spôsobené aj nejakými nečistotami na povrchu listu.

3 Výsledky

Po aplikaci obou barviv jsme získali zobrazení různých struktur v těle potkana. Dle popisu jednotlivých orgánů se nám podařilo určit nejen játra (obr.1), ale i tukové váčky, vnější obal žaludku a srst zapadlou do řezu (obr. 2), čímž jsme si potvrdili, že metodu fluorescenčního

mikroskopu lze použít k rozlišování orgánů, popřípadě různých dalších struktur a rozpoznat zdravou tkáň od například nádoru.



obr. 2: chlupy v řezu

tukové buňky

povrch jater

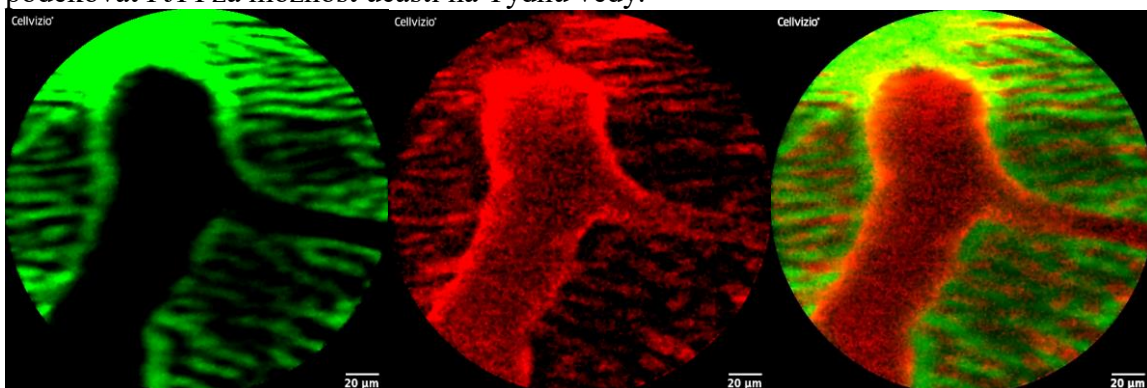
4 Shrnutí

Ukázalo se, že pomocí fluorescenční mikroskopie lze zobrazit rozdíly mezi mikroskopickou stavbou různých tkání (žaludek, játra, tukové buňky). Zároveň jsme si ukázali, že je možné sledovat jak pracují játra v reálném čase.

Táto metóda má širokú škálu využitia najmä v medicínskej sfére. Keďže je možné subjekt pozorovať za stavu celkovej anestézie, všetky životné funkcie mu fungujú tak, ako majú. Operujúci lekár by aj pomocou tejto metódy dokázal priamo na operačnom stole rozoznať zdravé tkanivo od poškodeného a rozhodnúť sa, ako ďalej postupovať. Metóda je momentálne výhodnejšia pre objekty, ktoré sa príliš nehýbu, pretože napríklad dýchanie dokáže narušiť a sťažiť pozorovanie. Do budúcnosti by sa však podobné problémy mohli odstrániť a tým zlepšiť celkové fungovanie a hlavne pracovanie s touto metódou.

5 Poděkování

Rádi bychom poděkovali Jakubu Otáhalovi, MD, Ph.D., Assoc.Prof. za možnost účasti na pokusu a veškerou pomoc, kterou nám v souvislosti s realizací poskytl. Dále bychom chtěli poděkovat FJFI za možnost účasti na Týdnu vědy.



obr. 1: Zelený kanál - 488nm

Červený kanál – 660 nm

Sloučené kanály