

Periodikum z histologie & embryologie

Ústav histologie and embryologie

3. lékařská fakulta University Karlovy v Praze

Listopad

2014

Ročník 2/ Číslo 2

Přístupné na:

<http://www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/histologie/phe>

Interní časopis 3.LF UK, Ústav histologie & embryologie

Redakční rada:

MUDr. Klára Matoušková – editor

klara.matouskova@lf3.cuni.cz

MUDr. Lucie Hubičková-Heringová, Ph.D.

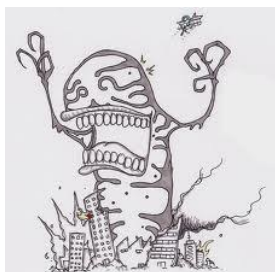
MUDr. Eva Maňáková, Ph.D.

Co se děje...

V listopadu se našim myslím otevírá druhý kurz modulu Buněčné základy medicíny nazvaný **Energie pro buňku**.

Zároveň však ještě několika praktiky dokončíme kurz první, Struktura buňky (ačkoli formálně jsou tyto praktika zařazena v kurzu 2). Konkrétně budeme pod mikroskopem rozeznávat buňky exokrinních a endokrinních žláz, epitelových tkání ve funkci bariér a všechno zakončíme praktikem opakovacím.

V sedmém týdnu se na vás, v rámci kurzu Energie pro buňku těší MUDr. Maňáková se svou poutavou přednáškou na téma funkce a původ mitochondrií. Nebojte se a přijďte!



Připomenutí

10. prosince 2014

Druhý ročník semináře

„Trendy v současné vývojové toxikologii a teratologii“

Jakkoli vám termín „vývojová toxikologie“ (developmental toxicology) může znít zatím trochu studeně vězte, že tento patří v dnešní době k velmi žhavým oborům.

Ve Spojených státech amerických, například, se denně používá více než 85 000 chemikálií, z nichž je asi 2500

v kategorii tzv. produkce vysokého objemu, „high production volume“ (HPV), s definicí produkce přes 500 tun ročně. Ústav pro kontrolu toxických látek státu Kalifornie uvádí, že skoro polovina těchto „HPV“ látek postrádá „odpovídající toxikologické studie jejich vlivu na zdraví člověka a zvířat žijících ve volné přírodě“. Navíc, podle stejného zdroje, světlo světa spatří v USA ročně asi 2000 nových chemikálií, tedy sedm nových chemických látek ve vodě, kterou pijeme, v polích, kde roste obilí, ze kterého jíme rohlíky, ve vzduchu, bez kterého to prostě nejde, každý den (!).¹ Zaměříte-li se ve své budoucí kariéře na vývojovou toxikologii, potažmo teratologii, nikdy si nebudete moci stěžovat na nedostatek podnětů. Přijďte na seminář!

*

Připomenutí ze sekretariátu, že nejen studiem živ je člověk citátem Johanna Wolfganga Goethe na motiv jeho románu Vilém Meister, Léta učednická;

“Každý den by si měl člověk dopřát něco hudby, přečíst dobrou báseň, vidět pěkný obraz a, pokud je to možné, prohodit pár smysluplných slov. Jen tak ho jeho dennodenní povinnosti neumoří, a neamlží smysl pro všechnu tu krásu, kterou Bůh vložil do lidské duše.“

Nobelova cena za chemii 2014

„za vývoj
fluorescenční mikroskopie
s velmi vysokým
rozlišením“²



Za většinu současných znalostí z oblasti biologie vděčíme mikroskopii. Na přelomu 17. a 18. století základy mikroskopie položili především **Robert Hook** se svými mikroskopickými pozorováními, a **Antonie Van Leeuwenhoek**, který pomocí mikroskopů, které sám sestrojoval pozoroval a popsal první jednobuněčné organismy.



Mikroskopy a jejich rozlišovací schopnost se v průběhu skoro dvou století stále zlepšovaly, až v roce 1873 **Ernst Abbe** v teorii i praxi narazil na limit rozlišení světelné mikroskopie. Zobrazení v optické mikroskopii se přirozeně děje pomocí světla, a proto rozlišení, informaci, kterou světelným

mikroskopem získáme, nemůže být lepší než v rámci vlnové délky světla. Tuto skutečnost popsal právě Ernst Abbe německý fyzik, astronom, autor a konstruktér optických přístrojů a také sociální reformátor, tzv. **Abbeho formulí**^a. Možnost tak vysokého rozlišení mikroskopu je skvělá zpráva, protože jím můžeme vidět objekty stokrát menší než je velikost buňky, na druhou stranu víry, molekuly či většina nitrobuněčných struktur jsou velikostí hluboko pod difrakčním limitem.

Ve dvacátých letech minulého století pak přišla na pomoc fyzika s elektronovou mikroskopií, již je možné zobrazovat pomocí kratších vlnových délek v řádu nanometrů. Jenže ani přes lepší zobrazení elektronovými mikroskopy světelná mikroskopie nikdy neztratila své uplatnění v praxi. Je to proto, že obsluha a užití optického mikroskopu jsou relativně snadné, stejně tak péče o něj.

^a $d = \lambda / 2NA$, kde d je rozlišení mikroskopu, λ vlnová délka a NA tzv. numerická apertura vyjadřující účinnou světelnost objektivu

Ale především má světelná mikroskopie dvě významné výhody: a) možnost **neinvazivního zobrazení** živých systémů vs. elektronová mikroskopie, kdy voda ve vzorku musí být nahrazena pryskyřicí nebo je potřeba vzorek zmrazit, protože samotné pozorování probíhá ve vakuu, ve kterém by se voda vypařovala a vzorek by se zničil, b) optická mikroskopie umí zobrazení specifických proteinů a nitrobuněčných struktur a funkcí jinými slovy; dává možnost **detekce** buněčných konstituentů **pomocí fluorescenčního značení**³. Tyto výhody světelné mikroskopie byly vždy omezením pro elektronografii; ačkoli dokázala rozlišit struktury až do úrovně atomů, není slučitelná se zobrazením živé hmoty.

Jaká technologie by tedy dokázala spojit výhody optické mikroskopie a zároveň dosahovala rozlišení elektronového mikroskopu?

*

Nobelova cena za chemii v roce 2014 je sdílena třemi vynikajícími vědci z oboru fyziky či fyzikální chemie za jejich mimořádné přispění k „vývoji fluorescenční mikroskopie s velmi vysokým rozlišením“.

Stefan W. Hell



Profesor experimentální fyziky
na Univerzitě v Göttingenu
&
Profesor fyziky
na Univerzitě v Heidelbergu

Stefan W. Hell je fyzik a vědecký člen Společnosti Maxe Plancka a ředitel **Institutu Maxe Plancka pro biofyzikální chemii** v německém Göttingenu, kde vede Ústav nanobiofotoniky.

Stefan W. Hell **vymyslel, prokázal a aplikoval první použitelný koncept, který dokázal přestoupit** přes 120 let platnou **hranici rozlišení ve světelné mikroskopii vyplývající z Abbeho difrakčního limitu**.

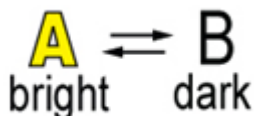
Mladému fyzikovi s čerstvým diplomem z Heidelbergu a převratnou myšlenkou však neležel vědecký svět hned u nohou. Hell věděl, že jeho revoluční koncept sníží hranici rozlišení na nejméně 30 nanometrů, téměř desetinu tehdy možné hranice, stálo ho však mnoho let a odhodlání než našel vhodnou půdu pro uskutečnění svého konceptu. Sám

si musel zainvestovat - 10 000 marek od prarodičů k diplomu⁴ - patentování **4Pi mikroskopu**, který sice vypadá jako běžný konfokální mikroskop, má však dva stejné objektivy zaměřené proti sobě se vzorkem mezi nimi. Obrazy z těchto objektivů se pak skládají, a ve výsledku tak mikroskop funguje jako jeden objektiv s lepším rozlišením. Dveře od svých laboratoří pak Stefanu Hellovi otevřel právě Institut Maxe Plancka, a od té doby, přes dobré pracovní nabídky z Londýna či Harvardu, mu Hell zůstává věrný. Mimo jiné proto, že právě tam se prof. Hell cítí jako vědec nejvíce svobodný a dostává nejlepší podmínky ke své další práci.⁴

Zaměření současného výzkumu prof. Hella

Ústav nanobiofotoniky pod vedením profesora Hella je po léta na popředí vývoje metod, které pracují za hranici difrakčního limitu, tj. Abbeho formule. Ústav má dobré zázemí optické techniky a zkušeností, proto dokáže vyvíjet nové mikroskopy s čím dál lepším rozlišením, rychlejším přenosem obrazu, vyšší citlivostí a flexibilitou. Rovněž v oblasti chemie a genetiky má Ústav vynikající vybavení a zkušenosti, proto na míru vyvíjí barvení preparátů a nové fluorescenční proteiny.⁵

Základní koncept nanoskopie



Obrázek: základní princip nanoskopie

Obecně se dá říci, že všechny koncepty nanoskopie využívají **přechodu mezi dvěma rozeznatelnými stavy fluoroforů**. Mezi těmito stavy může být molekula přepnuta světlem určité vlnové délky. Klíčovou myšlenkou je, že vyzařující objekty, ačkoli navzájem velmi blízko, mohou být viděny odděleně pokud je osvětlíme jeden po druhém. Toho může být dosaženo právě „zapnutím“ a „vypnutím“ sousedních objektů, a to buď v náhodném či předem určeném modu. Obrázek výše ilustruje dva různé cíle a čtecí programy.⁵

Implementací těchto konceptů je potom např. mikroskopie vyčerpání stimulovanou emisí (**STED**), další z Hellových patentů, „ground state depletion microscopy“ (GSD) či „single molecule switching microscopy“ (SMS).

Podrobný úvod do fluorescenční nanoskopie je možné si dále prostudovat v článku prof. Hella na téma světelná nanoskopie vzdáleného pole „**far-field optical microscopy**“⁶.

*

William E. Moerner



Profesor
chemie
a
aplikované fyziky

William E. Moerner vystudoval Washingtonovu universitu v St. Louis ve státě Missouri, USA a v současnosti působí na univerzitě ve Stanfordu, stát Kalifornie.

Prof. Moerner je uznáván pro svůj výzkum a vytvoření nového vědeckého oboru, **spektroskopie a zobrazení jednotlivé molekuly**.

Jeho profesní záběr je nesmírně široký; už na vysoké škole získal ocenění v oboru elektro-inženýrství, fyziky a matematiky, a jeho současnými výzkumnými oblastmi jsou fyzikální chemie, chemická fyzika, biofyzika jednotlivé molekuly, zobrazení s velmi vysokým rozlišením a zachycení nanočástic.

Prof. Moerner vysvětluje své zaujetí světelnou nanoskopií jediné molekuly:

„Komplexní systémy - včetně molekul – mohou obsahovat skrytou heterogenitu způsobenou vlivem blízkého prostředí, různé konformace či rozličného skládání proteinů. Studium jednotlivých molekul nám umožňuje zkoumat tuto skrytou heterogenitu, protože měříme distribuci chování zaznamenáváním vlastností jednotlivých členů skupiny. Existuje několik specifických způsobů, kterými od jednotlivých molekul získáme nové informace, a ty právě zkoumáme v našich laboratořích.“⁷

Zatímco koncept Stefana Hella využívá k získání obrazu detailní skenování vzorku do jednoho snímku, postup prof. Moernera, ale i dalšího ze spolulaureátů Erica Betziga, je jiný. Konečný snímek vzniká skládáním mnoha obrazů, které se jen nepatrně liší, na sebe.

Prof. Moerner se ve svém výzkumu soustředil na jedinou, zato však nesmírně důležitou molekulu; zelený fluorescenční protein (GFP). GFP se používá jako jakési univerzální označení, „tagging“, proteinů v buňce, a díky tomu mohou biologové zjistit co se kde, prostřednictvím jakých proteinů, v buňce děje. V roce 1997 prof. Moerner

také zjistil, že jeden z GFP se dá zapínat a vypínat světly o různé vlnové délce, tzv. „**photoswitchable single-molecule fluorophores**“.

V průběhu svého výzkumu team laboratoře prof. Moernera vyzkoušel mnoho geneticky kódovaných fluorescenčních proteinů jako GFP, kinesinové molekulární motory, sensory koncentrace vápenatých iontů, chaperony či „čaperony“, které asistují při skládání proteinů či transmembránové proteiny imunitního systému vně či uvnitř živých buněk, a genetické regulátory proteinů bakterií, a dále se aktivně podílel na vývoji nových přepínatelných fluoroforů.

„Jednotlivé molekuly představují „okno“ do nového, rozvíjejícího se vědeckého oboru **nanofotoniky**.... Na hlubší úrovni, jednotlivé molekuly je možné vnímat jako sondy do jejich blízkého „nanoprostředí“. Protože jednotlivé molekuly jsou vlastně emitery mohli bychom jejich pomocí zobrazovat objekty s velmi vysokým rozlišením, daleko za difrakčním limitem.“⁷ Na několika nových technikách pro 3D informace získané fotopřepínáním jedné určité molekuly v laboratořích prof. Moernera právě pracují...

*

Eric Betzig, PhD

Eric Betzig je fyzik, vynálezce a inženýr narozený v USA, ve státě Michigan.

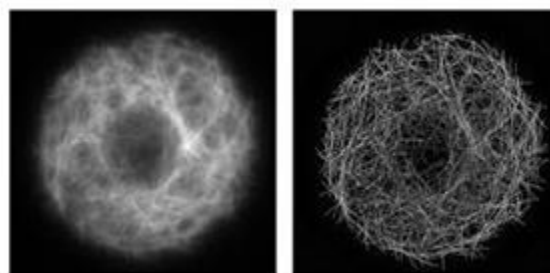
V současnosti pracuje pro Lékařský Institut Howarda Hughese (**Howard Hughes Medical Institute, HHMI**), kde působí jako vedoucí skupiny ve výzkumném oddělení **Janelia Farm Research Campus** v Ashburn, stát Virginie.



Než začal spolupracovat s HHMI Eric Betzig neměl ani svou laboratoř. Jak s typickou americkou zdrženlivostí přiznává ve své biografii, jeho pracovními nástroji byli „laptop a pár skutečně dobrých nápadů“⁸.

Ve svém prvním zaměstnání, Bellových Laboratořích, nicméně laboratoř dostal též, a začal v ní své první práce v oboru **fluorescenční mikroskopie blízkého pole** („near-field fluorescent microscopy“). Pomocí sondy, kterou sám

navrhl a vytvořil, a která mu, bod po bodu, osvětlovala objekt zájmu, byl brzy schopen předložit první výsledky své práce.

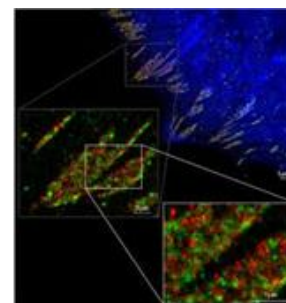


Obrázek: porovnání zobrazení z konvenčního mikroskopu a mikroskopu s velmi vysokým rozlišením. Mikrotutuly S2 buněk u drosofily.⁹

Přibližně v tomtéž období kdy prof. Moerner objevil světu zobrazení jednotlivé molekuly, Erik Betzig se nezávisle začal věnovat stejnému oboru. Ale když se v roce 1997 prof. Moernerovi úspěšně podařilo dopravit do molekuly zelený fluorescenční protein z medúzy a zapnout, a vypnout, jej jako malou lampičku, Eric Betzig právě dával vědeckému světu na delší dobu vale. I když se o pokusech prof. Moernera ještě dozvěděl, jak říká, „čas ještě nedozrál“ a s oborem mikroskopie blízkého pole plněm se dalšími a dalšími zájemci se Betzig rozloučil a odešel do svého rodného města Ann Arbor ve státě Michigan, aby pracoval pro továrnu svého otce. Výsledkem sedmi let práce byl dokonalý, ale komerčně v té době naprosto neúspěšný stroj, tzv. „flexibilní adaptivní servohydraulická technologie“. A když po třech letech úsilí prodal přesně dva tyto převratné stroje, přečetl si další článek o zeleném fluorescenčním proteinu (GFP), a vrátil se, zatím v myslí, do vědeckého světa. Ve své chatce na břehu michiganského jezera, a za dlouhých procházek pak promýšlel, a se svým kolegou Haraldem Hessem pak společně, bez zaštiťující instituce, postavili nový mikroskop a vytvořili první obrázky technologií PALM (photoactivated localization microscopy). Tato nově používá GFP jako „osvětlení“ nikoli ke „značení“ proteinů.

Obrázek: Přibližné zobrazení proteinů v lidské kůži pomocí PALM. H. Shroff et al. PNAS 104. 20308 (2007)

V Janelii pak Betzig pracoval nejprve s PALM,



později on a jeho tým vyvinuli digitální skenovací laserovou „light sheet microscopy“ (DSLM).

Nicméně Betzigoých snem už od vysoké školy bylo uvidět co se doopravdy děje uvnitř buňky, nikoli pouze na jejím povrchu. A pak jednoho dne zaslechl rozhovor s americkým biologem Scottem E. Fraserem, který řekl, že „biologie, to je jako pokusit se porozumět pravidlům hry“.



Je to podobné jako když má člověk před sebou fotografie hráčů fotbalu (amerického fotbalu, samozřejmě) v nějaké herní situaci. Ale z pouhé fotografie nelze vyčíst o co ve hře vlastně jde a jak se hraje.

„Potřebujeme zobrazení filmovým záznamem, abychom se dozvěděli, co se tam děje“, říká Betzig³.

A tím se Eric Betzig posunul zase o pořádný vědecký krok dále, když se sám sebe ptal „můžeme postavit mikroskop, který vylepší zobrazení 3D živých buněk v nějaké metrice tak, jako PALM vylepšuje rozlišení?“ Bez dlouhého napínání, Ericu Betzigovi a jeho týmu se v roce 2011 podařilo vymyslet a postavit „**Bessel Beam illumination microscope**“¹⁰ – vysokorychlostní mikroskop s vysokým rozlišením využívající tvz. Besselova paprsku, 3D technologie, která poskytuje mimořádně detailní pohled na buněčné pochody v přímém přenosu). A jen před několika týdny team Erica Betziga představil tvz. „**lattice light sheet microscope**“. Detaily a návody, jak si takový mikroskop v laboratoři postavit, jsou vědcům s patřičnými znalostmi a zkušenostmi volně přístupné. Nicméně společnost Zeiss (společnost, ve které se na vývoji optických přístrojů podílel, a kterou spoluvlastnil Ernst Abbe) vlastní licenci na výrobu obou výše uvedených mikroskopů, a jak říká Eric Betzig „Bude to stát ještě mnoho úsilí uvést tuto špičkovou technologii od prototypu do širokého užití, ale komercializace je klíčovým krokem jak umožnit širší vědecké komunitě přístup k těmto technologiím“. ³

*

Česká televize odvysílala v roce 2011 příspěvek o Ericu Betzigovi a mikroskopech z dílny jeho teamu na Janelii, který je stále přístupný v archivu ČT. ¹¹

*

Krátké, a úžasné video záznamy z Betzigoých mikroskopů jsou online přístupné např. na:

<http://vimeo.com/109405410>

*

A ještě jeden článek o nových mikroskopech z dílny Erica Betziga, ve kterém naleznete několik obrázků a video záznamů, které stojí za to shlédnout, byl publikován v časopise Scientific American v květnu 2013.

<http://www.scientificamerican.com/article/no-kill-high-resolution-3d-movies-cells-now-possible/>

Repetitio, mater studiorum...

... APOPTÓZA



Odborný termín „apoptóza“ pochází:

- ze starého Řecka?
- z Aberdeen?
- ze starověkého Egypta, kde mytická bytost „Apop“ reprezentovala princip chaosu?

V roce 1972 tři významní vědci Kerr, Wyllie a prof. Currie otiskli článek v British Journal of Cancer ¹², ve kterém navrhují pro „kontrolovanou buněčnou delecii“ termín „apoptosis“. Tento název jim navrhl profesor řečtiny na Ústavu řečtiny na Universitě v Aberdeen, James Cormack. Slovo samé je v řečtině používáno pro popis „padání“ či „opadávání“ okvětních lístků či listů stromů.

Co v roce 1972 autoři věděli o kontrolované buněčné smrti, čili apoptóze?

- Věděli, že apoptóza je **aktivní**, svojí podstatou programovaný, fenomén
- Věděli, že apoptóza může být **iniciována** či **inhibována** (i když ještě nevěděli jak), např. estrogeny inhibující očekávanou regresi Mülleroých tubulů u mužského pohlaví, či androgenní steroidy prosazující regresi těchto tubulů u ženského genotypu
- Autoři popsali dvě oddělené fáze apoptózy; první jako kondenzaci v jádře i cytoplasmě a roztržení buňky do tvz. **apoptotických tělísek**, a druhou, kdy jsou

apoptotická tělíška oddělena od povrchu a fagocytována

- Věděli, že apoptóza je normální součástí **ontogeneze**, např. při tvorbě lumina ve vývoji tubulárních struktur, ve vytváření mezivrstevních prostor či involuci pozůstatků z fylogeneze
- Autoři konstatovali, že kontrolovaná buněčná smrt hraje opačnou však zásadní a doplňující roli k mitoze, a že v dospělosti buněčná smrt přesně vyrovnává buněčné dělení¹³

Apoptotická tělíška

- a) Zachovávají si buněčnou membránu pro zabránění místní zánětlivé reakci (vs. nekroza)?
- b) Jsou nacházena i v histologických preparátech naprosto zdravých tkání?
- c) Některá jsou pozřena histiocyty, ale většina z nich je rychle fagocytována zdravými buňkami parenchymu (např. v nádorových tkáních)?
- d) a, b i c jsou správně?

D je správně.

Nobelova cena za objevy v oblasti apoptózy byla udělena

- a) v roce 2002?
- b) v roce 1996?
- c) ještě nebyla udělena?

Nobelova cena za medicínu nebo fyziologii v roce 2002 byla udělena vědcům Sydney Brennerovi, H. Robert Horowitzovi a John. E. Sulstonovi za jejich „**objevy týkajících se genetické regulace vývoje orgánů a programované buněčné smrti**“.

Během své spolupráce všichni tři nerozdílným úsilím osvětlili přesné pořadí, ve kterém se buňky hlístice nazvané **hád'átko obecné** „*Caenorhabditis elegans*“ dělí a úspěšně vysledovali celou linii jeho embryonálních buněk.



*

Na důkaz slov Erica Betziga o důležitosti video zobrazení pro kvalitní porozumění věci, se můžete podívat na krátké

video v obrazové knihovně časopisu The Cell ukazující apoptózu nádorové buňky prostaty při léčbě cytostatikem.

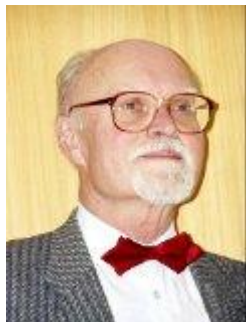
<http://www.cellimagelibrary.org/images/43705>

*

Tak, a teď je tedy čas otevřít učebnice a nastudovat si všechny ty mediátory apoptózy, její iniciaci pomocí extrabuněčných či nitrobuňčných signálů, Bcl2 a IAP, kaspázy, Fas a TNF, mitochondriální regulaci a mnoho dalších hledisek apoptózy. Aby vám z toho neodešla hlava kolem, třeba vám pomůže si pamatovat, že tím co rozhoduje bude-li buňka žít či podstoupí programovanou smrt je **dynamická rovnováha** mezi antiapoptotickými a proapoptotickými faktory!

Prof. MUDr. Richard Jelínek, DrSc.

(8. října 1934 - 27. října 2008)



Prof. Richard Jelínek byl člověkem mnoha talentů. Rozhodoval se mezi studiem matematiky, medicíny a muziky. Zvolil medicínu a matematiku. Po dvou semestrech obojího současně dal přednost výhradně medicíně. Matematické se pak ve zralém věku věnoval postgraduálním studiem kurzu "Aplikovaná logika" na FF UK. Odstrčená muzika jej přesto provázela celý život. Prátlil se s klavírem, zobcovou flétnou, kytarou. Rád a dobře zpíval.

Již jako medik na FVL UK v Praze pracoval na Anatomickém ústavu. Tam byl prof. Borovanským nasměrován ke studiu mozku a embryologie. První vědeckou práci publikoval ve 4. ročníku. Posléze jich bylo na 300. Poslední publikační počín byl věnován překladu učebnice L. C. Junqueira et al.: Základy histologie (Basic Histology) v roce 1993 a učebnice embryologie K. L. Moore, T. V. N. Persaud: Zrození člověka (The Developing Human) v r. 2000. Tuto práci vnímal jako splátku dluhu vůči studentům za dvacet let, kdy nemohl učit. Od přednášení byl odstaven označiv na studentském shromáždění 21. srpen 1968 jako akt agrese.

Všechno olbřímí pracovní zaujetí mělo pochopitelně i svoji stinnou stránku. Na rodinný život čas neměl. Takže dcery si jej užily až když byly schopné absolvovat dovolené na kolech se stanem a vařením v kotli na ohni. Nejlépe po červených turistických cestách, třeba v Jeseníkách. Kolo, běžky, plavání, košíková, kdysi šerm a každoroční splouvání českých řek na kajaku s jezevčíkem na kolenou manželky coby háčka, ho provázelo celým životem. V admirálské čepici ho zastihl ne jeden ze studentů.

Byl to člověk pevného charakteru, velice náročný v prvé řadě k sobě, vládnoucí humorným nadhledem. Noblesní.

Básník Karel Šiktanc ve sbírce "Horoskopy" uvádí znamení vah veršem "*Jsem celý z křídel. Z rozpjatého peří*"

Ano, byl.

Ivana Jelínková
Praha, 14. října 2014

¹ California Department of Toxic Substance Control [online]. ©2007. Cit. 31. 10. 2014. Dostupné z: <http://www.dtsc.ca.gov/assessingrisk/emergingcontaminants.cfm>

² The Nobel Prize in Chemistry 2014 [online]. © Nobel Media AB 2014. Cit. 30. 10. 2014. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014

³ Eric Betzig. In: *Youtube* [online]. 24. 5. 2012 [cit. 26.10. 2014]. Dostupné z: <http://www.youtube.com/watch?v=UqMIL8-eaxk>. Kanál uživatele YH Park.

⁴ DEFFKE, Uta. *Outsmarting Optical Boundaries Personal Portrait Stefan Hell*. In: Max Planck Research Special 09, p. 74 - 81. (Cit. 26. 10. 2014). Dostupné z: http://nanobiophotonics.mpibpc.mpg.de/objects/docs/popular/MP-Research_2008.pdf

⁵ Max Planck Institute. Department of Nanobiophonics. [online] ©2014. (Cit. 27.10. 2014). Dostupné z: <http://nanobiophotonics.mpibpc.mpg.de/research/philosophy.html>

⁶ Hell, S. W. (2009): "Far-field optical nanoscopy." In: Graeslund, A.; Rigler, R.; Widengren, J. (Eds.): *Single Molecule Spectroscopy in Chemistry, Physics and Biology*. Springer, Heidelberg (2009), pp. 365-398.

⁷ Stanford University. Department of Chemistry, Faculty: William E. Moerner [online]. © 2014. (cit. 29. 10. 2014). Dostupné z: <https://chemistry.stanford.edu/faculty/w-moerner>

⁸ HHMI. Our scientists: Eric Betzig [online]. ©2014. (cit. 30. 10. 2014). Dostupné z: <http://www.hhmi.org/scientists/eric-betzig>

⁹ MBL. Catalyst. [online]. Volume 6 No. 2 Fall 2011. (cit. 30.10.2014). Dostupné z: http://hermes.mbl.edu/publications/catalyst/fall11_comparison.html

¹⁰ Michalowski, J. *Have Microscope, will travel*. In: HHMI Bulletin ©November 2011. [online]. (cit. 30.10. 2014). Dostupné z: <http://www.hhmi.org/bulletin/november-2011/have-microscope-will-travel>

¹¹ Česká televize. Prizma z 26.3.2011 [online]. (Cit. 2.11. 2014). Dostupné z: <http://www.ceskatelevize.cz/ivysilani/10095523948-prizma/211411058100013?index%5B%5D=152304&x=42&y=17>

¹² Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 1972. **26**. p. 239-255.