

# **Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně**

**Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol.**



# **Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně**

**Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol.**

Olomouc 2014

## PRINCIPY A VYUŽITÍ VYBRANÝCH ANALYTICKÝCH METOD V LABORATORNÍ MEDICINĚ

### Hlavní autoři a pořadatelé:

MUDr. Norbert Cibiček, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

### Autoři:

doc. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové

MUDr. Petr Džubák, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc

MUDr. Zuzana Heřmanová, Ústav imunologie, FN Olomouc

Mgr. Pavel Kosina, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D., Katedra biofyziky, PŘF UP Olomouc

RNDr. Martin Novák, Hematoonkologická klinika, FN Olomouc

RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D., Katedra analytické chemie, PŘF UP Olomouc

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP Olomouc

Ing. Jaroslava Vávrová, Ph.D., Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové

doc. RNDr. Jitka Vostálová, Ph.D., Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

Mgr. Martina Zatloukalová, Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP Olomouc

doc. MUDr. Helena Živná, CSc., Radioizotopové laboratoře a vivárium, LF UK Hradec Králové

### Recenzenti:

prof. MUDr. David Stejskal, Ph.D., MBA, EurChem,

Oddělení laboratorní medicíny, Středomoravská nemocniční, a.s., Prostějov

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc., Ústav experimentální biologie, PŘF MU Brno

1. vydání

© Norbert Cibiček, Jan Vacek a kol., 2014

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2014

Obrázková dokumentace: Jan Hubert

Sazba: Michal Muzikant, Milan Matoušek

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením

autorských práv a může zakládat

občanskoprávní, správněprávní

popř. trestněprávní odpovědnost.

ISBN 978-80-244-3951-8



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vznik tohoto učebního textu byl finančně podpořen Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky v rámci řešení projektu: **Inovace předmětů biochemie a klinické biochemie v rámci spektra oborů lékařské fakulty a fakulty zdravotnických věd směrem k lepšímu uplatnění absolventů v oblasti vědy, výzkumu i praxe.** Registrační číslo: CZ.1.07/2.2.00/15.0293



# Obsah

<b>Slovo úvodem</b> . . . . .	<b>5</b>
<b>Preanalytická fáze laboratorního vyšetření (N. Cibiček)</b> . . . . .	<b>7</b>
1.1 Prepreanalytické vlivy na výsledek . . . . .	8
1.2 Typy vzorků, jejich příprava a význam. . . . .	10
1.2.1 Plná krev, plazma a sérum . . . . .	10
1.2.2 Moč . . . . .	15
1.2.3 Další materiály. . . . .	16
<b>Metody detekční</b> . . . . .	<b>20</b>
2.1 Metody optické detekce (M. Kubala, N. Cibiček) . . . . .	20
2.1.1 Světlo . . . . .	20
2.1.2 Experimentální technika pro optické spektroskopie v UV/VIS/NIR oblasti spektra . . . . .	21
2.1.3 Optické spektroskopie . . . . .	24
2.1.4 Refraktometrie a interferometrie. . . . .	31
2.2 Hmotnostní spektrometrie (B. Papoušková, P. Džubák) . . . . .	34
2.2.1 Princip fungování a součásti hmotnostního spektrometru . . . . .	34
2.2.2 Využití hmotnostní spektrometrie v klinické praxi a biomedicinském výzkumu. . . . .	40
2.3 Elektrochemické metody, (bio)senzory a čipové platformy (J. Vacek, M. Zatloukalová, J. Srovnal). . . . .	43
2.3.1 Elektrochemické metody . . . . .	44
2.3.2 Elektrochemické senzory a biosenzory . . . . .	45
2.3.3 Čipy a jejich aplikace v analýze nukleových kyselin a proteinů . . . . .	47
2.3.4 Využití DNA čipových platform v experimentální a klinické medicíně . . . . .	50
2.4 Imunoanalýza (N. Cibiček, Z. Heřmanová) . . . . .	52
2.4.1 Diagnostické protilátky . . . . .	53
2.4.2 Dělení imunoanalytických metod. . . . .	53
2.4.3 Limitace imunoanalytických metod . . . . .	56
2.4.4 Imunoanalytické metody a jejich aplikace. . . . .	57
2.5 Radioaktivita a detekce ionizujícího záření (N. Cibiček, H. Živná) . . . . .	67
2.5.1 Radioaktivita . . . . .	68
2.5.2 Ionizující záření (IZ) . . . . .	71
<b>Metody izolační, separační a amplifikační</b> . . . . .	<b>81</b>
3.1 Centrifugační techniky (J. Vostálová, N. Cibiček). . . . .	81
3.1.1 Sedimentace a centrifugace . . . . .	81
3.1.2 Centrifugy (odstředivky) . . . . .	83
3.1.3 Metody centrifugace . . . . .	86
3.1.4 Využití centrifugace . . . . .	89
3.2 Polymerázová řetězová reakce (M. Beránek) . . . . .	92
3.2.1 Příprava vzorku k analýze nukleových kyselin . . . . .	93

3.2.2	Amplifikace vybraných úseků NA . . . . .	96
3.2.3	Identifikace hledané sekvence a kvantifikace NA . . . . .	101
3.3	Membránové separace (J. Vacek, N. Cibiček) . . . . .	106
3.3.1	Membrány . . . . .	107
3.3.2	Dialýza, elektrodialýza a mikrodialýza . . . . .	107
3.3.3	Reverzní osmóza a membránové separace za zvýšeného tlaku . . . . .	109
3.4	Elektroforéza (J. Vávrová, N. Cibiček) . . . . .	112
3.4.1	Elektroforéza – teoretické základy . . . . .	112
3.4.2	Zónová elektroforéza . . . . .	114
3.4.3	Kapilární elektroforéza (CE) . . . . .	115
3.4.4	Diagnostické aplikace elektroforetických technik . . . . .	117
3.5	Kolonové separace – chromatografie (P. Kosina) . . . . .	122
3.5.1	Princip chromatografie . . . . .	122
3.5.2	Dělení chromatografických technik . . . . .	123
3.5.3	Chromatografické metody a jejich aplikace . . . . .	124
3.6	Průtoková cytometrie (M. Novák) . . . . .	131
3.6.1	Technické principy průtokové cytometrie . . . . .	131
3.6.2	Biomedicínské aplikace průtokové cytometrie . . . . .	137

<b>Seznam zkratk . . . . .</b>	<b>140</b>
--------------------------------	------------

<b>Terminologický slovník . . . . .</b>	<b>144</b>
---	------------

<b>Rejstřík . . . . .</b>	<b>149</b>
---------------------------	------------

## Slovo úvodem

Moderní medicína klade na lékaře velké nároky – musí být schopen zpracovat velké množství informací, a to nejenom klinických. Kromě zobrazovacích metod se dnes klinické uvažování z velké části opírá o laboratorní metody, jejichž správná indikace a interpretace jsou klíčovými požadavky nejenom ke stanovení správné diagnózy a sledování léčby, ale rovněž z hlediska etického, ekonomického i forenzního. S otázkami využívání laboratorních vyšetření se student medicíny setká téměř ve všech oborech, včetně teoretických a preklinických. Ke správné indikaci laboratorních vyšetření a interpretaci výsledků je však kromě literárních údajů a klinické zkušenosti zapotřebí alespoň základní orientace v problematice odběru biologického materiálu, jeho preanalytického zpracování a také **pochopení principů** použitých analytických metod. Tyto často podceňované informace jsou pro lékaře nezbytné nejenom k uvědomění si obrovských možností, ale také limitací laboratorních vyšetření, na základě kterých může být pacient i významně biologicky, psychicky i ekonomicky poškozen. Význam uvedených znalostí při vlastní vědecko-výzkumné činnosti je zřejmý. Každý klinik by měl být schopen cíleně komunikovat se všemi laboratorními pracovníky, a to i za předpokladu nepřítomnosti lékaře (např. klinického biochemika).

Předkládaná skripta „Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně“ si kladou za cíl poskytnout studentům medicíny souhrnné informace o nejdůležitějších moderních instrumentálních metodách, jejich principech a současném využití především v klinické praxi. Vzhledem k rychlosti přesunu primárně vědecko-výzkumné laboratorní technologie do oblasti klinické praxe jsme se však nebránili ani extrapolaci skript do biomedicínského a farmaceutického výzkumu. Obsah skript byl z edukačních důvodů rozdělen na tři hlavní části – na *preanalytickou fázi, metody detekční a metody izolační, separační a amplifikační*, a upraven tak, aby zahrnoval zejména instrumentaci, se kterou z ekonomických důvodů není možné studenty seznámit v rámci praktické výuky na teoretických ústavech lékařských fakult. Na klinických pracovištích, kde je tato technika dostupná, z provozních důvodů zpravidla nezbyvá dostatek času na bližší seznámení se s jejími principy, spektrem možností jejího využití a pochopení praktických limitací. Při přípravě publikace bylo naší snahou, aby svým rozsahem a zaměřením vhodně doplnila, a přitom nevybočovala z kontextu vzdělávání lékaře. Text byl metodicky zaměřen na analýzu v kapalinách. Nejsou zde detailně popsány metody pro analýzy plynů (až na několik výjimek týkajících se např. krevních plynů nebo dechových testů), techniky barvení tkání ani vizualizační techniky.

Vzhledem k současnému trendu spojovat různé laboratorní obory působící na poli medicíny do jednoho celku (tzv. **laboratorní medicína**) jsme při tvorbě skript oslovili řadu autorů s bohatými zkušenostmi jak z rutinního vyšetřování, tak z vědecko-výzkumné a pedagogické činnosti. Spolupráce odborníků z oblastí klinické biochemie, molekulární biologie, imunologie, analytické chemie a dalších umožnila vznik týmu, který mohl text přiblížit konceptu laboratorní medicíny, dát mu přiměřenou hloubku a terminologickou preciznost, obohatit ho o cenné poznatky z praxe a poskytnout čtenářům vzhled do budoucího vývoje. Společně jsme usilovali o atraktivní, čtivou

publikaci s bohatou obrazovou dokumentací včetně schémat, tabulek, aplikačních poznámek a otázek k zopakování nabytých poznatků. Jako důležitou součást skript považujeme i Appendix s přehledem a jednoduchým vysvětlením odborné terminologie a také Rejstřík. K prohloubení svých znalostí může student využít i četných odkazů na literární zdroje.

Je naší milou povinností poděkovat na tomto místě paní prof. Jitce Ulrichové (ÚLCHB, LF UP Olomouc), paní dr. Cibičkové (III. Interní klinika FN Olomouc), paní doc. Walterové (ÚLCHB, LF UP Olomouc), paní dr. Metelkové (ONM, FN Olomouc), panu dr. Malinovi (OKB, Nemocnice Písek, a.s.), panu dr. Lochmanovi (OKB, FN Olomouc) a studentce 3. ročníku LF UP v Olomouci Lence Janouškové. Uvedené kolegyně a kolegové text, resp. jeho části pečlivě přečetli a pomohli tak rukopis posunout směrem k lepší srozumitelnosti a využitelnosti pro cílovou skupinu čtenářů. Poděkování patří také dvěma nezávislým recenzentům – panu prof. Šmardovi (PřF MU, Brno) a panu prof. Stejskalovi (OLM, Středomoravská nemocniční, a.s.), jejichž připomínky významně přispěly k celkové kvalitě a hodnotě díla. Za finanční podporu děkujeme Evropskému sociálnímu fondu a MŠMT ČR.

Bude pro nás velkým uspokojením, pokud studenti v předkládaném učebním textu najdou nejenom užitečné informace, ale který si také oblíbí a k němuž se v průběhu pregraduálního studia i následné klinické praxe budou rádi vracet. Snad i s motivací dále směřovat svůj profesní profil do tak významné, dynamicky se rozvíjející oblasti, jakou je laboratorní medicína.

Za kolektiv autorů  
Norbert Cibiček a Jan Vacek



# 1 Preanalytická fáze laboratorního vyšetření

N. Cibiček

Moderní medicína se stále více opírá o výsledky laboratorních a pomocných vyšetření. Paralelně s tímto trendem rostou požadavky na profesionalitu zdravotnických pracovníků a jejich činnost v souladu s pravidly etiky. Správná indikace vyšetření, odběr, identifikace, zpracování, uchovávání a transport vzorků do laboratoře, kde je vzorek přijat a připraven k analýze (tj. **prepreanalytická a preanalytická fáze**), hrají významnou roli v poskytování kvalitní lékařské péče. Lékař odesílající materiál předpokládá, že vyšetření bude spolehlivé, tj. analýzy a výpočty budou v laboratoři provedeny kvalitně (**analytická fáze**). Naopak laboratoř po potvrzení (verifikaci) dat a jejich přenosu klinikovi předpokládá, že výsledky budou správně interpretovány a povedou k volbě adekvátní diagnosticko-léčebné strategie (tzv. **postanalytická a postpostanalytická fáze**). Při důrazu, který se klade na kvalitu analytické části (chyby „za desetinnou čárkou“), nabývá na významu jak preanalytická složka (chyby „před desetinnou čárkou“), tak procesy následující po analýze (tab. 1). Důvodem je skutečnost, že k převážné většině chyb dochází mimo laboratoř, zhruba dvě ze tří chyb jsou předvídatelné a jedna ze čtyř má přímý vliv na diagnostiku a léčbu. Velká množství požadavků na nepotřebné diagnostické testy vedou ke zbytečným nákladům, k množství chybně interpretovaných výsledků spojených s riziky pro pacienty a představují jeden z hlavních zdrojů neefektivity ve zdravotnictví<sup>2</sup>.

**Tab. 1** Některé zdroje chyb v průběhu procesu laboratorního vyšetření.

(pre-)preanalytická fáze (~ 60 % chyb)	analytická fáze (~ 15 % chyb)	(post-)postanalytická fáze (~ 25 % chyb)
nesprávně indikovaný test	špatná kalibrace	sdělení chybných dat
nepochopená žádanka	skrytá interference	odeslání dat na jiné místo
pacient není náležitě připraven	měření mimo rozsah	pozdní odeslání dat
odběr u jiného pacienta	nehomogenita vzorku	data jsou nekompletní
odběr do nevhodného systému		špatná interpretace dat
nesprávně označený vzorek		chybná reakce na data
neadekvátní kvantita vzorku		pozdní reakce na data
nevhodný transport vzorku		
nesprávná doba centrifugace		

- 1 Součástí postanalytické fáze je zápis dat do laboratorního informačního systému (LIS) a jejich přenos do nemocničního informačního systému (NIS), a tím k lékaři. Koncept může být doplněn o tzv. perianalytickou fázi, která zahrnuje konzultaci ošetřujícího lékaře specialistou v laboratorní medicíně při znalosti dílčích výsledků.
- 2 Příkladem je stanovení všech dostupných nádorových biomarkerů při screeningu malignity na lůžkovém oddělení nebo bezmyšlenkovitě vyšetřování u klinicky zcela jasného či léčebně dále neovlivnitelného stavu.

Moderní trendy ve vyšetřování v místě péče o pacienta (**POCT**, Point Of Care Testing) mohou vést k usnadnění diagnostiky z hlediska místa a času. Za kvalitu laboratorního testování však nese odpovědnost provozovatel POCT přístroje, kterým může být nejenom laboratoř, ale i terénní ambulantní lékař. Vzhledem k této skutečnosti (POCT analyzátor je považován za malou laboratoř) je nutné, aby měli všichni zainteresovaní lékaři alespoň základní povědomí o řízení kvality v laboratorním provozu.

Přestože se objekty zkoumání a metodiky používané v oborech **laboratorního komplementu** (klinická biochemie, mikrobiologie, hematologie, imunologie, farmakologie a další) v minulosti dramaticky lišily, jsou dnes v některých aspektech velmi podobné<sup>3</sup>, což umožňuje vznik efektivnějších oddělení nebo ústavů „**laboratorní medicíny**“. Ke stanovovaným látkám (**analytům**) a testům, které již na samostatných odděleních tvořily heterogenní skupiny (tab. 2), může ve spojených (konsolidovaných) laboratořích přibýt široké spektrum vyšetření – od radioizotopů, přes nukleové kyseliny, antigeny, viry, jednotlivé buňky až ke tkáním resp. mikroorganismům.

**Tab. 2** Příklady některých analytů běžně vyšetřovaných v klinicko-biochemických laboratořích.

anorganické látky	malé organické molekuly	makromolekuly
sodné ionty	glukóza	albumin
draselné ionty	močovina	transferin
vápník	kreatinin	alaninaminotransferáza
hořčík	bilirubin	lipáza
chloridy	cholesterol	imunoglobuliny
fosforečnany	volný trijodtyronin	α-1-fetoprotein
železo	digoxin	C-reaktivní protein
oxid uhličitý	etanol	srdeční troponin

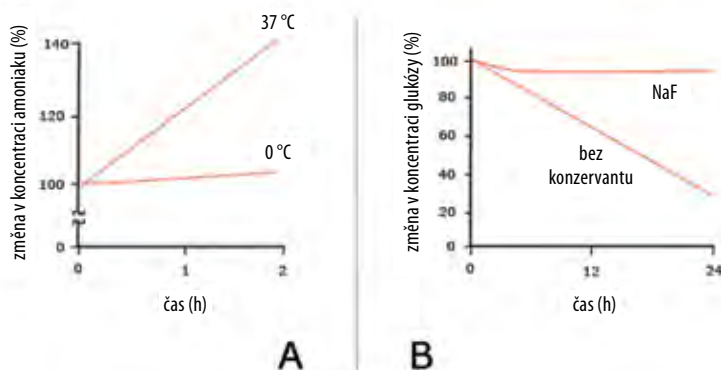
## 1.1 Prepreanalytické vlivy na výsledek

Výsledek vyšetření může z hlediska prepreanalytické fáze ovlivnit řada faktorů (tab. 1). Některé z nich mohou být pro laboratoř důvodem k odmítnutí vzorku. Vliv správného uchování vzorku před analýzou a výběru vhodného odběrového systému demonstruje obr. 1.

U konkrétního pacienta lze rozlišovat faktory „neovlivnitelné“ (věk, gravidita, intra-individuální variabilita<sup>4</sup>) a faktory „ovlivnitelné“ (stres, příjem potravy, užívání léků). **Pohlaví** má vliv zejména na pohlavní hormony, červený krevní obraz a molekuly závislé

3 Jde o molekulární přístupy, sdílení příjmu a zpracování materiálu, přístrojové techniky, řízení kvality a využívání komunikačních a archivačních systémů.

4 Intraindividuelní variabilita (neboli biologická proměnlivost) je rozptýl hodnoty vyšetřovaného analytu v důsledku přítomnosti biologických faktorů a jejich působení u daného pacienta v čase.



**Obr. 1** Při stanovení amoniaku je nutné okamžité chlazení a časná analýza (A). Uchování vzorku pro stanovení glukózy (při standardní laboratorní teplotě) vyžaduje odběrový systém s inhibitory glykolytických enzymů – fluoridem sodným (B).

na svalové hmotě. **Věk** hraje roli u analytů souvisejících s množstvím svalové hmoty, pohlavím (hormony vč. hypotalamo-hypofyzární osy), růstem a remodelací pojiva. Zvláštní kapitolu tvoří novorozenci. **Cyklické variace** jsou pravidelné jevy s predikovatelnou periodou. Rozeznáváme variace ultradiánní (s periodou < 24 h), cirkadiánní nebo diurnální (~ 24 h), infradiánní (> 24 h) a sezónní nebo cirkanuální (~ 1 r). Látky, jejichž koncentrace se mění ultradiánně, se vyplavují nárazově (některé hormony). Analyty kolísající s cirkadiánní periodou mají maximum v různé denní nebo noční době. Kromě řady hormonů sem řadíme celkovou bílkovinu, draslík (obojí max. ráno), kreatinin (max. večer) a interleukin-1α (max. v noci). Třetí kategorie je typická pro analyty závislé na menstruačním cyklu. Sezónní změny se týkají látek s vazbou na výživu a/nebo klima (vitamin D). Pro zhodnocení dynamiky musíme zachovat dobu odběru, resp. počítat s vlivem rytmu. V **graviditě** nemůže překvapit nárůst koncentrací látek produkovaných trofoblastem nebo orgány plodu<sup>5</sup>. Dochází také k hemodiluci, zvýšení glomerulární filtrace a změnám v rovnováze srážecích a zánětlivých faktorů (ve smyslu +). U méně specifických testů uvažujeme i o vlivu jiných onemocnění – **komorbidit**. Z ovlivnitelných faktorů jmenujeme **tělesnou zátěž**, která při vysoké intenzitě vede k laktátové acidóze, hemokoncentraci, poklesu glomerulární filtrace, uvolnění látek ze svalů (např. myoglobin nebo AST) a proteinurii. **Stres** má za následek sympatikotonii a mimo jiné i vyplavení hormonů kůry i dřeně nadledvin se všemi metabolickými a funkčními důsledky. **Příjem potravy a tekutin** bývá krátkodobě spojen se změnami metabolických ukazatelů (postprandiální vzestup glykémie a triacylglycerolémie, nárůst koncentrace kyseliny močové po konzumaci masa, pokles koncentrace draslíku a fosforu spojený se zahájením výživy po delším hladovění), může modifikovat pH moči nebo zkomplikovat analytickou fázi interferencí lipidů. Přijaté tekutiny mohou obsahovat např. sacharidy a ovlivnit tak vyšetření glukózy nebo alkohol, který vede ke zvýšení koncentrace

5 Např. zvýšený onkomarker α-fetoprotein musí u fertálních žen vždy vést k podezření na těhotenství.

triacylglycerolů a osmolality; nedostatek tekutin vede k hemokonztraci (projevující se např. zvýšením albuminémie, koncentrace hemoglobinu, hematokritu a počtu erytrocytů v litru krve). Z dlouhodobého hlediska ovlivňuje výživa zastoupení lipidů, proteinů, minerálů, vitamínů i metabolitů (např. striktní veganství vede ke snížení sérové koncentrace cholesterolu a triacylglycerolů, ale i proteinů, železa a vitamínu B<sub>12</sub>, u alkoholiků pozorujeme snížení koncentrace kyseliny listové a zvýšení homocysteinu).

**Kouření, užívání léků a pravidelný příjem návykových látek** se projevuje pestrými metabolickými změnami, změnami v koncentraci antioxidantů (např. poklesem vitamínu C, A a selenu u kuřáků), onkomarkerů (např. nárůst CEA u kuřáků), modulací krevního obrazu (makrocytóza u alkoholiků, granulocytóza u kuřáků), orgánovým poškozením a četnými analytickými interferencemi. **Otravy, úrazy a operace** mají za následek velmi komplexní poruchy vnitřního prostředí provázené řadou kompenzačních mechanismů. Z výše uvedených důvodů lze k přípravě před odběrem biologického vzorku obecně doporučit následující pravidla:

- zdržení se intenzivní fyzické aktivity<sup>6</sup> (po dobu 1–2 dnů),
- vynechání postradatelných léků a návykových látek<sup>7</sup> (včetně alkoholu, kofeinu a nikotinu), a to po dobu 1 až 3 dnů (důvodem jsou potenciální interference v analýze moči a vliv těchto látek na některé funkční testy),
- 10–12 hod lačnění (je povoleno pouze pití čisté vody).

Odběr má být proveden po 15-minutovém zklidnění vsedě nebo vpolosedě (u imobilních pacientů vleže), ideálně mezi 6–8 h ranní. Pokud se protokol odběru významně liší (např. při funkčních testech nebo vyžaduje-li to charakter analytu a stabilita vzorku), musí na tuto skutečnost indikující lékař upozornit nejenom pacienta, ale také odebírající zdravotnický personál a laboratoř.

## 1.2 Typy vzorků, jejich příprava a význam

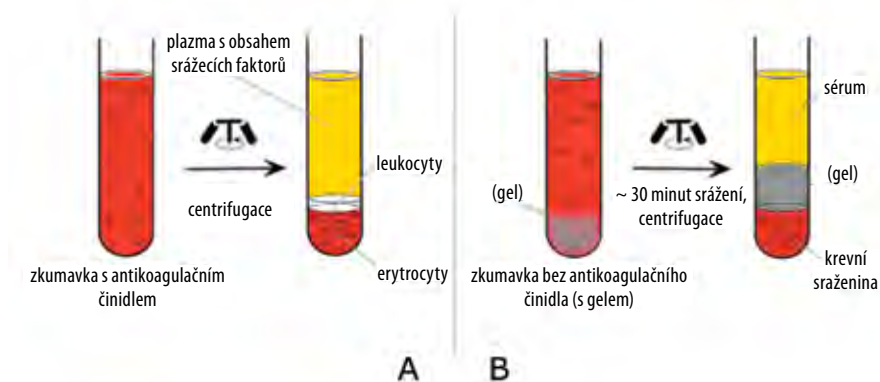
### 1.2.1 Plná krev, plazma a sérum

Plná krev je využívána nejenom v hematologii (vyšetření hemoglobinu, hematokritu, diferenciálního rozpočtu krvinek, koagulačních parametrů), ale i v jiných oborech. Sražení krve zabráníme výběrem zkumavky s přidaným **aditivem** – zde antikoagulačním činidlem. Může jít buď o soli heparinu (litná, sodná, draselná nebo amonná), anebo o chelatační činidlo, které váže volné ionty kalcia – sodná, draselná nebo amonná sůl kyseliny citronové (citrát), etylendiamintetraoctové (EDTA), nebo šťavelové (oxalát).

Centrifugací (viz kap. 3.1) nesražené plné krve se nad formovanými krevními elementy (v supernatantu) vytvoří plazma (obr. 2A). Hlavní výhodou vyšetření plazmy

6 Vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) vyžaduje i vyloučení jízdy na kole (falešné zvýšení).

7 Na možnost užívání těchto látek a jejich vlivy musí lékař myslet a od pacienta důkladně odebrat anamnézu.



**Obr. 2** Příprava plazmy (A) a séra (B). Hlavní rozdíl je v možnosti sražení krve před centrifugací (podmínky závisí na zkumavce a testu – 1500 až 3000 g, 10 – 15 min, 4 nebo 20 °C).

je zkrácení času od odběru materiálu k jeho analýze. Plazma se proto doporučuje jako materiál volby v naléhavých situacích (**statimová vyšetření**). Odběr plazmy je nutný při stanovení glukózy z diagnostických důvodů, dále při stanovení laktátu a amoniaku. Nevýhodou aditiv je jejich interference s některými testy (stanovení minerálů a různých enzymů vč. DNA-polymerázy využívané v polymerázové řetězové reakci, viz kap. 3.2).

Pokud plnou krev necháme nejdříve (cca 30 min) srazit<sup>8</sup>, následnou centrifugací od sraženiny oddělíme krevní sérum (obr. 2B). Koncentrace většiny látek se mezi plazmou a sérem významně neliší. Výjimkou je např. koncentrace celkové bílkoviny<sup>9</sup> (v plazmě o 4 % vyšší) a koncentrace draslíku, fosforu a glukózy (v plazmě o 5–8 % nižší). Odebíráme žilní, arteriální a (arterializovanou<sup>10</sup>) kapilární krev, přičemž centrifugace se využívá zejména u krve žilní.

Odběr žilní krve (**venepunkci**) provádí zaškolený zdravotnický personál (v naší zemi nejčastěji zdravotní sestra). Kvalitní odběr má několik předpokladů – jedním z prvních je správné načasování odběru (cyklické variace, eliminace látky z organismu, funkční testy). Před samotným odběrem je potřeba dbát na:

- **identifikaci** pacienta (zejména u dětí a seniorů),
- poskytnutí jeho informovaného **souhlasu** (např. u genetických testů nebo testů na HIV),
- získání **anamnestických dat** (medikace, dodržení režimu),
- správnou **polohu** pacienta (nejenom při odběru ale také před ním z důvodu ovlivnění např. glomerulární filtrace),

8 K urychlení koagulace slouží aktivátor srážení (pokračování srážení v analyzátoru by vedlo k interferencím).

9 Jde zejména o fibrinogen a faktory krevního srážení, které nebyly koagulací spotřebovány.

10 Tzv. „arterializace“ se dosáhne postupy (např. lokálním zahřátím), které mají za cíl maximalizovat krevní průtok v kapilárách („hyperemizaci“) a přiblížit tak hodnoty vyšetřovaných parametrů situaci v tepenném řečišti.

- zamezení přenosu **infekčních agens** (ochranné pomůcky a dezinfekce),
- prevenci **alergické reakce** pacienta (latex, dezinfekce, náplasti),
- správný výběr **jehly a místa vpichu** (zejména při nitrožilních infuzích, operacích, jizvách a krevních podlitinách),
- a na počet, typ a pořadí použití **odběrových stříkaček** (viz dále).

Standardní volbou při vpichu je kubitální žíla. V indikovaných případech, např. pro vyšetření krevních plynů (více viz dále), lze k odběru využít i zavedený centrální žilní katetr<sup>11</sup>. Místo vpichu musí být po dezinfekci suché kvůli prevenci rozpadu krvinek a analytickým interferencím. Průběh žíly můžeme ozřejmit krátkým (~ 1 min) a mírným stažením proximální části paže turniketem. Nejvalidnější výsledky jsou z prvního vzorku. Další vzorky mohou vykazovat vlivy venostázy, lokální hemokoncentrace a aktivace hemostázy. „Pumpování“ rukou/paží vede k lokálnímu anaerobnímu metabolismu a vyplavení buněčného obsahu. V současnosti jsou pro odběr krve využívány téměř výhradně tzv. **uzavřené systémy**, které neumožňují přímý kontakt pracovníka se vzorkem. Chrání tak nejenom před kontaminací biologického materiálu, ale i před kontaktem osob s (potenciálně) infekční krví. Krev má být odebírána (resp. vypouštěna do zkumavek) pomalu, aby se předešlo rozpadu krvinek. Obsahuje-li odběrový systém aditiva, je nutné odebrat přesný objem krve uvedený na odběrové nádobce<sup>12</sup>. Po odběru se nádobka několikrát otočí víčkem dolů a zpátky, aby se krev s aditivem promíchala. Charakter aditiva lze rozeznat z barvy víčka (tab. 3)<sup>13</sup>.

Krev odebranou do odběrové nádoby s aditivem nikdy nepřeléváme do nádoby jiné. Z důvodu možné kontaminace existuje doporučené pořadí odběrů:

- odběrový systém pro **hemokulturu** (nativní krev – mikrobiologie),
- zkumavka s akcelerátorem srážení (sérum – biochemie, sérologie, léčiva),
- zkumavka s **citrátem** (plná krev – hemokoagulace, sedimentace erytrocytů),
- zkumavka s **heparinem** (plazma nebo plná krev – vyšetření krevních plynů),
- zkumavka s **EDTA** (plná krev nebo plazma – krevní obraz, molekulární biologie),
- zkumavka s **NaF** (plná krev nebo plazma – glykovaný hemoglobin, glukóza).

**Separční zkumavky** obsahují gel, který díky své hustotě vytvoří při centrifugaci vrstvu oddělující supernatant od krevních elementů, čímž po dobu několika dní zamezí jeho kontaminaci obsahem buněk. Nevýhodou gelu je možnost způsobit interference v imunoanalýze (viz kap. 2.4). Granule krastenu (inertní plast) mají podobnou funkci jako gel, urychlují srážení a brání hemolýze. Molekulárně-biologické metody mohou vyžadovat odběr do zvláštních zkumavek (např. pro izolaci RNA).

11 Před odběrem se musí (na půl minuty) zastavit všechny infúze. Odběr se provádí až po odsátí 5–10 ml krve mimo odběrovou nádobu. U dvou- a vícecestných katetrů odebíráme pouze z lumen, které ústí nejbližší k pacientovi. Při interpretaci výsledků testů je potřeba znát rozdíly ve složení centrální a periferní žilní krve.

12 Pokud poměr mezi činidlem a krví není dodržen, vzniká riziko osmotických přesunů vody a hemolýzy.

13 Značení víček odběrových nádobek není mezi výrobci jednotné – závisí na harmonizaci výrobce se zvoleným standardem nebo platnou normou. Odebírající personál se proto musí vždy řídit pokyny své laboratoře.

**Tab. 3** Příklad značení víček, obsahu aditiv a využití odběrových nádobek<sup>13</sup>.

barva víčka	aditivum	požadovaný materiál a využití
<b>červená</b> (případně bílá) v kombinaci s černou (bílou)	žádné nebo akcelerátor srážení	<b>sérum</b> – klinická biochemie (speciální metody), mikrobiologická sérologie, imunologie, léčiva
<b>červená</b> v kombinaci se žlutou (gel) nebo červenou (granule)	akcelerátor srážení (separační gel / granule)	<b>sérum</b> – klinická biochemie (rutinní metody), sérologie, léčiva
<b>zelená</b> v kombinaci s černou nebo žlutou (gel)	heparinát litný, sodný atd. (separační gel)	<b>plazma nebo plná krev</b> – klinická biochemie (statim), krevní plyny
<b>levandulová nebo růžová</b> v kombinaci s černou nebo žlutou (gel)	EDTA draselný, příp. aprotinin k inhibici trypsinu (separační gel)	<b>plná krev</b> – krevní obraz, <b>plazma</b> – imunohematologie, molekulární biologie a genetika, polypeptidy
<b>bledě modrá</b>	citrát sodný (1:10)	<b>plná krev</b> – hemokoagulace
<b>černá</b>	citrát sodný (1:5)	<b>plná krev</b> – sedimentace (FW)
<b>šedá</b> v kombinaci s černou	antikoagulans (EDTA...) a inhibitor glykolýzy (NaF)	<b>plná krev (plazma)</b> – stanovení glykovaného Hb, glukózy a laktátu
<b>tmavě modrá</b> v kombinaci s černou	aktivátor srážení nebo naopak heparinát sodný	<b>sérum nebo plazma</b> – stanovení stopových prvků
<b>žlutá</b> v kombinaci s černou	roztoky s obsahem citrátu	<b>plná krev</b> – určení krevní skupiny

**Punkce tepny** se nejčastěji provádí pro stanovení krevních plynů (vyšetření dle Astrupa<sup>14</sup>) a laktátu. Primárně se volí radiální tepna na nedominantní končetině<sup>15</sup>. Odběr provádí zkušený zdravotnický personál (většinou lékař). Sérii odběrů lze u novorozence udělat po kanylaci umbilikální tepny. Stříkačka obsahuje heparinát litný, v případě stanovení iontů musí jít o tzv. titrovany, čili iontově vyvážený heparin. Odběr pro vyšetření krevních plynů je přísně anaerobní, tj. bez bublin a vyžaduje dokonalé promíchání vzorku s protisrážlivým činidlem. Pokud není k dispozici POCT analyzátor umožňující vyšetření u lůžka pacienta, pak je zpravidla nutné zajistit neprodlený (do 15 minut) transport do laboratoře. Pokud je nádobka vložena do prostředí tajícího ledu, lze stabilitu vzorku prodloužit až na dvě hodiny<sup>16</sup>.

Důvody k **odběru kapilární krve** zahrnují snížení rizika spojeného s punkcí tepny při vyšetření krevních plynů, možnost odběru omezeného objemu krve např. u malých dětí, nepřístupnost cév v důsledku popálenin nebo bandáží, případně sníženou kvalitu žil či komfort pacienta. Kromě stanovení krevních plynů a glukózy se tento typ odbě-

14 Změřené parametry jsou pH a  $p_a\text{CO}_2$  (parciální tlak  $\text{CO}_2$  v arteriální krvi), vypočítané jsou koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  a tzv. base excess;  $p_a\text{O}_2$  a saturace hemoglobinu kyslíkem se uvádějí pro pochopení acidobazických změn.

15 Lze využít i femorální (výjimečně brachiální) tepnu. Tzv. Allenův test slouží k posouzení průchodnosti tepen dlaňových tepenných oblouků. Při špatné funkci tepen není odběr doporučen (riziko trombotizace tepny).

16 Při nedodržení uvedených podmínek dojde k falešnému poklesu pH a  $p_a\text{O}_2$  provázanému zvýšením  $p_a\text{CO}_2$ .

ru nejčastěji provádí u malých dětí, pro POCT nebo pro vyšetření ze suché kapky krve v rámci screeningu dědičných metabolických poruch. Standardním místem odběru je laterální strana špičky prstu ruky, která se po dezinfekci propíchnou jehlou (lancetou). U novorozenců volíme laterální stranu patičky, u starších dětí ušní lalůček. Tento typ odběru naopak nevolíme v případech sníženého prokrvení periferie. Před odběrem dbáme na vysušení antiseptika, event. na nutnost předchozího zahřátí<sup>17</sup>. Jde o **otevřenou formu** odběru – krev má po propíchnutí kůže volně vytékat. Bříško prstu se nestlačuje, aby se krev nemíchala s tkáňovým mokem. První kapka se neodebírání. Další kapka je nasáta do (heparinizované) kapiláry, sbírána do zvláštní zkumavky, anebo je nasáta filtračním papírkem, který je poté vysušen. Kapiláry jsou vybaveny kovovou tyčinkou k usnadnění promíchání krve (pomocí magnetu). Krev odebraná do kapiláry již zpravidla nesmí být přenesena na filtrační papír. Rozdíly oproti standardnímu žilnímu odběru jsou v jednotkách % – koncentrace glukózy a draslíku je v kapilární krvi vyšší, naopak sodík a vápník jsou zde mírně nižší.

Na průběh analýzy vzorku a také na procesy následující po analýze má významný vliv **matrice**. Matrice je nosič zkoumaného analytu neboli všechny složky analyzovaného vzorku kromě stanovované látky. Mezi složky systému, které mají v případě nepřiměřeně vysokých koncentrací rušivý vliv, patří hemoglobin, bilirubin a lipoproteiny. Vzhledem k charakteristickému zbarvení, které uvedené látky matrici propůjčují, pak mluvíme o **hemolytickém** (hemoglobin, červené zbarvení), **ikterickém** (bilirubin, žlutý kolorit) a **lipemickém** (lipoproteiny, „mléčné“ neboli chylózní zbarvení) vzhledu séra, plazmy, mozkomíšního moku, výpotku apod. Vysoká koncentrace hemoglobinu vzniká v důsledku hemolýzy. **Hemolýza** je definovaná jako porušení membrány erytrocytů, které vyústí v uvolnění koncentrovaných intracelulárních komponent (nejenom hemoglobinu, ale i draslíku, hořčíku, fosfátu a enzymů) do okolního média. Hemolýzu plné krve, ale ani mírné hemolytické změny séra/plazmy (do zhruba 0,1–0,5 g Hb/l) laboratorní personál nepozná. K hemolýze může dojít jak *in vivo* (intravaskulárně při různých onemocněních), tak *in vitro* (při odběru, transportu, přípravě nebo skladování vzorku). Ve druhém případě se na jevu podílejí činitele mechanické (třepání, rychlé nasávání podtlakem nebo vypouštění do zkumavky přes jehlu, nevhodná centrifugace nebo transport), osmotické (voda ve zkumavce), tepelné (jak zmrznutí tak přehřátí vzorku) nebo chemické (dezinfekce). Hemoglobin a další látky vedou k řadě analytických interferencí jak u biochemických<sup>18</sup>, tak molekulárně-biologických<sup>19</sup> metod. Moderní automatické biochemické analyzátoři dokáží tyto parametry poměrně přesně sledovat a zabránit tak vydání potenciálně chybného výsledku. Míra interference matrice vzorku se běžně vyjadřuje pomocí tří indexů – hemolytického, ikterického a lipemického. Výsledky některých metod (např. kalémie) lze do jisté míry korigovat; správná interpretace dat však zpravidla vyžaduje nový odběr (pokud je ovšem předpoklad, že se při dalším odběru kvalita vzorku upraví).

17 Arterializovaná kapilární krev může mít nižší hodnoty pO<sub>2</sub> než krev arteriální.

18 Týká se např. vyšetření bilirubinu, cholesterolu, glukózy, kyseliny močové nebo amylázy.

19 Hemoglobin může interferovat s analýzou RNA pomocí PCR s reverzní transkriptázou (RT-PCR).



## 1.2.2 Moč

Moč se odebírá neinvazivními (při močení, čili mikci), miniinvazivními (aseptickým cévkováním) a invazivními (aseptickou suprapubickou punkcí) způsoby<sup>20</sup>. Při potížích s udržení moči (inkontinenci) nebo naopak při neschopnosti se vymočit do sběrné nádoby (v důsledku těžkého stavu, bezvědomí nebo prosté obstrukce močových cest) lze odběr realizovat pomocí **cévkování**. Zákrok vzhledem k rizikovosti (zejména u mužů) provádí zkušený zdravotnický pracovník. U kojenců může být sběr proveden do plastového vaku fixovaného kolem ústí močové trubice. Jestliže se moč sbírá v čase, může sběr probíhat buď v průběhu noci, kdy je pacient v horizontální poloze<sup>21</sup>, anebo přes den po definovanou dobu, např. 4, 12 nebo (nejčastěji) 24 hodin. Výhodou delší doby sběru je minimalizace vlivu cirkadiálních změn – lze ho využít např. pro stanovení vylučování bílkovin (proteinurie), kortizolu, minerálů nebo pro odhad glomerulární filtrace pomocí clearance kreatininu. Před zahájením odběru musí být močový měchýř vyprázdněn. Odběrová nádoba má být po celou dobu sběru chlazená a musí obsahovat veškerou vyloučenou moč. Před odběrem vzorku se moč promíchá. Celkový objem lze určit ze změny hmotnosti odběrové nádoby. Vzhledem k obtížím provést sběr moči kvalitně a úplně se od něho v indikovaných případech ustupuje a doporučuje se první ranní vzorek po celonočním lačnění. Odběru má předcházet očištění ústí močové trubice (riziko bakteriální kontaminace) a také instruktáž pacienta týkající se režimových opatření (dieta, vysazení interferujících léků). První ranní moč je koncentrovaná a je proto vhodná jak pro mikroskopické vyšetření, tak pro stanovení látek vylučovaných v minimálním množství, např. albuminu<sup>22</sup>. Náhodný vzorek moči se využívá pro rutinní screeningové testy a testy mikrobiologické (kultivace mikrobiálních agens na živných půdách). Naopak odběry pro toxikologii vyžadují načasování. Detekce patogenů v prvních několika ml moči může svědčit pro zánět močové trubice; tzv. střední proud může informovat o mikrobiálním osídlení močového měchýře. Moč lze při sběru stabilizovat kyselinou chlorovodíkovou, dusičnou, nebo uhličitánem sodným. Vzhledem k interferencím se však dává přednost neprodlené analýze jednorázového čerstvého vzorku nativní moči, která ještě může obsahovat neporušené válce (odlitky ledvinných tubulů), event. se volí vzorky chlazené.

Moč lze v ambulantních podmínkách orientačně vyšetřit pomocí testovacích papírků obsahujících cca 10 testů<sup>23</sup>. V klinicko-biochemické laboratoři se moč rutinně vyšetřuje jednak chemicky a jednak mikroskopicky (sediment). Zvláštní význam v diferenciální diagnostice hematurie (přítomnosti krve v moči) má vyšetření erytrocytů

20 Invazivní odběr se typicky provádí např. u kojenců.

21 Např. albuminurie stoupá již po 15–30 min ve vertikální pozici kvůli nárůstu hydrostatického tlaku v glomerulech způsobenému změnou výšky vodního sloupce (zhruba o jeden metr).

22 Vyšetření vylučování malého množství albuminu do moči (původně a nesprávně „mikroalbuminurie“) má zásadní význam jak u hypertoniků, tak u diabetiků, u kterých může prokázat časnou fázi poškození funkce ledvin.

23 Patří sem např. vyšetření glukózy, celkové bílkoviny, bilirubinu, ketolátek, pH, hustoty (specifické hmotnosti), krve a leukocytů. Papírky lze hodnotit i pomocí automatických analyzátorů (reflexní spektroskopie, viz kap. 2.1).

ve fázovém kontrastu<sup>24</sup>. Další látky (např. monoklonální imunoglobuliny) lze stanovit elektroforeticky (viz kap. 3.4), imunochemicky (viz kap. 2.4) nebo hmotnostní spektrometrií (proteomika, viz kap. 2.2). Při analýze moči se využívají i metody mikrobiologické (kultivační), toxikologické (léky, alkohol, drogy) a molekulárně-biologické (u rakoviny močového měchýře a v diagnostice pohlavně přenosných chorob).

### 1.2.3 Další materiály

Analýzy dalších materiálů jsou prováděny v omezené míře a obvykle na specializovaných pracovištích. K vyšetření **stolice** se zpravidla používá vzorek čerstvé stolice, nekontaminovaný močí (nutné zajistit především u kojenců). Nejčastější indikací je odběr v rámci populačního screeningu rakoviny tlustého střeva. Jde o imunochemické stanovení lidského hemoglobinu (původní kvalitativní biochemické testy měly název „testy na okultní/skryté krvácení“). Velmi důležité je také imunochemické stanovení koncentrace fekálního kalprotektinu. Jde o leukocytární cytosolový protein, který se uplatňuje jako ukazatel aktivity střevních zánětů. Společně s jinými (méně specifickými) krevními parametry tak umožňuje snížit frekvenci nákladnějších, rizikovějších a pro pacienta zatěžujících kolonoskopických vyšetření. Je dostupné i v režimu POCT. Význam má také stanovení jiných bílkovin – enzymů. Fekální elastáza se využívá v diagnostice zevně sekretorické insuficience pankreatu<sup>25</sup>, trypsin může pomoci ve screeningu cystické fibrózy. Přestože jsou techniky odběru stolice zcela neinvazivní a z gastroenterologického hlediska jde o optimální materiál, požadavky na komfort pacienta i personálu vedly k zavedení uživatelsky přijatelnějších vyšetření, a to tzv. kapslové endoskopie (viz učebnice interny) a dechových testů (viz kap. 2.5). Odběr vzorku **mekonia** (první stolice u novorozence) má smysl pro posouzení příjmu léků nebo návykových látek matkou v průběhu těhotenství. Sběr stolice se provádí zcela výjimečně, a to např. pro stanovení lipidů, dusíku, porfyrinů<sup>26</sup> a bilance látek. Kromě vizuálního a čichového hodnocení (přibližný objem, konzistence, barva a zápach), které klinikovi pomůže odhalit různé poruchy trávení (světlá, acholická stolice), krvácení (meléna) apod. přímo u lůžka, lze vzorek stolice vyšetřit i světelnou mikroskopií. Onemocnění trávicího traktu se mohou projevit přítomností tukových kapének (barvení Sudanovou červení), škrobu (barvení Lugolovým roztokem) a svalových vláken (kdy se stolice nebarví), mikroskopem zachytíme také parazity, erythrocyty, leukocyty a další buňky.

**Likvor** (CSF) je nejčastěji odebírán tzv. lumbální punkcí<sup>27</sup>. 3–5 ml CSF se nechá volně odkapat do sterilních zkumavek. První vzorek má být odeslán ke klinicko-biochemickému vyšetření, další pro mikrobiologické vyšetření a až třetí by měl být určen pro mikroskopické a cytologické techniky. Obvykle je však vzorku málo, proto se před

24 Tvarově změněné erythrocyty prošly glomerulární membránou, neporušené pochází z močových cest.

25 Porucha transportu iontů zvýší viskozitu sekretů a zablokuje vývody exokrinních žláz včetně pankreatu. Tento test lze však dnes považovat za obsoletní.

26 Pro posouzení poruch trávení živin a v diferenciální diagnostice poruch metabolismu hemu (porfyrii).

27 Po místním znecitlivění se provede aseptický vpich jehly do subarachnoidálního prostoru mezi 3. a 4. (4. a 5.) bederním obratlem. Vzhledem k rizikovosti odběr provádí infektolog, neurolog, anesteziolog, příp. internista.

ostatními vyšetřeními upřednostňují cytologické techniky. Transport je bez prodlení, vzorek stabilizaci nevyžaduje. Vyšetření je indikováno zejména při degenerativních onemocněních CNS (roztroušená skleróza), při nádorovém a zánětlivém postižení mozkových blan (meningitidy) či mozku (encefalitidy). Molekulárně-biologické vyšetření CSF slouží k definitivní identifikaci infekčních agens a přispívá k diagnostice hematologických malignit. Ke správné interpretaci biochemických vyšetření CSF bývá nutné paralelní vyšetření (periferní žilní) krve.

Odběr **synoviální tekutiny** (kloubní punkci, čili artrocentézu) provádí v situacích jejího zmožnění zkušený zdravotnický personál (zpravidla lékař), a to po lokálním znečistlivění a za přísně sterilních podmínek. Po vpichu se tekutina nechá volně odkapat do sterilních zkumavek, které se odešlou k mikrobiologickému (kultivace vč. extrahumánního genomu, viz kap. 3.2), biochemickému (glukóza, bílkovina) a hematologickému (leukocyty, erytrocyty) vyšetření. Význam spočívá v odlišení zánětlivé a nezápětlivé etiologie výpotku, v diferenciální diagnostice zánětů, resp. metabolických onemocnění pojiva (dna) a v případě infekční etiologie i v určení původce.

Odběr asi 10 ml **plodové vody** (amniocentéza) je prováděn po 15. týdnu těhotenství nabodnutím amoniového obalu zárodku skrze břišní stěnu matky<sup>28</sup>. Kožní epitelie plodu umožňují cytogenetickou diagnostiku vrozených vývojových vad (např. trisomie chromozomu 13, 18 a 21). Plodovou vodu lze vyšetřit i pomocí biochemických, mikrobiologických, či molekulárně-biologických metod – indikace zahrnují diagnostiku intrauterinní infekce nebo ohrožení plodu při Rh-izoimunizaci matky (tj. její senzibilizaci cizími erytrocytárními antigeny vyvolávajícími produkci IgG).

**Choriové klky** jsou geneticky identické s tkání zárodku. Odběr z placenty provádí lékař transvaginálním nebo abdominálním přístupem za ultrazvukové kontroly. Po odběru je tkáň kultivována v médiu a dále zpracována pro analýzu DNA podobně jako plodová voda. Výhodou oproti amniocentéze je časnější diagnostika vrozených vývojových vad (odběr v 10. až 12. týdnu těhotenství).

K akumulaci **pleurálního, perikardiálního a ascitického výpotku** dochází nejčastěji v důsledku infekce, zánětu, nádoru nebo při poklesu onkotického tlaku plazmy. Diagnostická punkce dutiny se nazývá paracentéza. Stanovením celkové bílkoviny, laktátdehydrogenázy, případně cholesterolu lze odlišit zánětlivý výpotek (**exsudát**) od nezápětlivého (**transsudátu**). Výpotek se vyšetřuje i mikroskopicky (leukocyty a další buňky, kultivační techniky) a pomocí metod polymerázové řetězové reakce (viz kap. 3.2).

**Pot** se odebírání zejména v rámci screeningu návykových látek. Vzorek se získá pomocí speciálního odběrového systému, který se jako náplast na několik dní připevní na kůži paže a umožní jeho sběr do celulózového polštářku. V minulosti se pot hojně využíval i pro diagnostiku cystické fibrózy. Toto vyšetření však již bylo na řadě pracovišť nahrazeno molekulárně-biologickými metodami.

Odběr **slin** může být proveden po výplachu úst vodou a následném žvýkání inertního materiálu (guma, vosk), anebo po stimulaci salivace dotykem jazyka s kostkou cukru. **Buňky bukalní sliznice** získáme výplachem úst ústní vodou nebo pomocí

28 Obvykle jde o ženy nad 35 let. Odběr je přísně aseptický a veden zpravidla pod ultrazvukovou kontrolou. Vzhledem k možnosti závažných komplikací patří výhradně do rukou zkušeného lékaře.

vatové štětičky. Sliny se využívají k vyšetření kortizolu, pro analýzu návykových látek, antigenů krevních skupin, nebo jako zdroj nukleových kyselin. Buňky bukalní sliznice jsou vhodným zdrojem nukleových kyselin u pacientů po transfúzi nebo po transplantaci kostní dřeně, kdy jejich krev obsahuje rovněž DNA dárce.

Při vyšetření **pevných tkání** jde zpravidla o biopsii tumorů, a to nejenom pro histopatologické, imunohistochemické nebo toxikologické vyšetření, ale také k analýze mutací DNA, což může mít terapeutický význam, např. při vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů u karcinomu ženského prsu.

**Vlasy a nehty** slouží pro vyšetření stopových prvků, návykových látek a pro forenzní účely (identifikace lidí pomocí DNA analýzy, viz kap. 2.3., 3.2., 3.4). Vyšetření chemického složení **močových konkrementů** má význam v prevenci i léčbě urolitiázy.

Laboratorní vyšetření je nutné vnímat v celé jeho šíři. Smysluplné využívání laboratorních vyšetření se neobejde bez znalosti správné indikace testů, podmínek odběru, značení a transportu materiálu a dalších faktorů s vlivem na výsledek. Metody POCT kladou zvýšené nároky na uživatelské řízení kvality analytické fáze. Pro předcházení zbytečným nedorozuměním a omylům vedoucím k ohrožení pacienta má zásadní význam studium lokálních laboratorních příruček, informačních letáků a také osobní komunikace kliniků a dalšího ošetřujícího personálu s pracovníky laboratorního komplementu.

## Seznam literatury

- Haverstick DM, Groszbach AR. Specimen collection and processing. In: Tietz textbook of clinical chemistry and laboratory diagnostics (Ed.: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE). Elsevier. St. Louis, 2012. p. 145–162.
- Racek J. Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření. In: Klinická biochemie. (Ed. Racek J.) Galén, Praha, 2006. p. 23–31.
- Sanford KW, McPherson RA. Preanalysis. In: Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods – 22<sup>nd</sup> ed. (Ed.: McPherson RA, Pincus MR). Elsevier. Philadelphia, 2011. p. 24–36.
- CD ROM – Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi – speciál 2008, ISBN 80-238-9775-6.
- Plebani M, Lippi G. Closing the brain-to-brain loop in laboratory testing. Clin Chem Lab Med. 2011; 49 (7): 1131–1133.
- Beránek M. The role of bio-analysts in peri-analytical and post-analytical phases of the diagnostic laboratory process. A case report of a patient with hemochromatosis. Konference FONS 2004, Pardubice, 19. 9. – 21. 9. 2004. Pořadatel Stapro a ČSKB. Abstrakt in: Program a sborník sympozia, p. 156. ISBN 80-903167-3-5.

### Testová část

1. Popište fáze laboratorního vyšetření, specifikujte nejčastější zdroje chyb a jejich četnost.
2. Uveďte zdroje (pre)preanalytické variability a několik příkladů analytů, kterých se mohou týkat.
3. Detailně popište správný postup odběru periferní žilní krve a hlavní rozdíly mezi sérem a plazmou.
4. Definujte hemolýzu, shrňte hlavní příčiny jejího vzniku, možné vlivy na výsledky laboratorních testů a uveďte způsob, kterým se rutinně stanovuje.
5. Vymenujte různé typy biologických vzorků, jejich klinické využití a nejdůležitější specifika jejich odběru.

## 2 Metody detekční

### 2.1 Metody optické detekce

M. Kubala, N. Cibiček

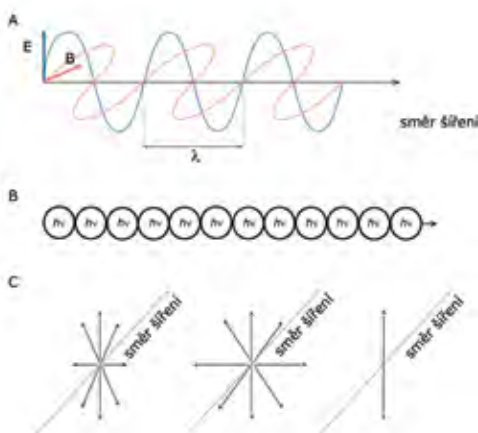
Zkoumání látek pomocí světla zahrnuje širokou škálu analytických metod. Jejich výhodou obecně je, že jsou nedestruktivní, to znamená, že vzorek při analýze není poškozen nebo modifikován a může být následně použit pro další analýzy. Aparatury pro tyto analýzy mohou fungovat samostatně, ale často jsou jako analyzátoři součástí složitějších přístrojů. Typicky se s nimi setkáváme např. na výstupu separačních kolon (např. HPLC, viz kap. 3.4. a 3.5), nebo v průtokové cytometrii (viz kap. 3.6). Současným trendem je aplikace těchto metod v neinvazivních analýzách *in vivo* a v zobrazovacích technikách.

#### 2.1.1 Světlo

##### 2.1.1.1 Vlastnosti světla

Při popisu chování elektromagnetického záření narážíme na vlnově-korpuskulární dualismus. To znamená, že některé experimenty můžeme snáze vysvětlit, pokud na světlo pohlížíme jako na vlnu, která se šíří prostorem, pro jiné experimenty je zase vhodnější nahlížet na světlo jako na proud částic, které nazýváme fotony (obr. 3).

**Obr. 3** Vlastnosti světla. **(A)** Světlo jako elektromagnetické vlnění, ve kterém kmitají vektory elektrického ( $E$ ) a magnetického ( $B$ ) pole ve směru kolmém na směr šíření světla (vektory  $E$  a  $B$  jsou navzájem také kolmé). Vlna je charakterizována vlnovou délkou  $\lambda$  a intenzitou elektromagnetického pole. **(B)** Světlo jako proud fotonů, z nichž každý nese kvantum energie o velikosti  $h\nu$ . Světlo je charakterizováno energií fotonu a počtem fotonů. **(C)** Polarizace světla je obecně eliptická (vlevo), tj. intenzita elektrického pole je v různých směrech různá. V případě kruhově polarizovaného světla (uprostřed) je velikost elektrického pole ve všech směrech stejná. U lineárně polarizovaného světla (vpravo) elektrický vektor kmitá pouze v jednom směru. Velikost šipky je ve vlnovém modelu úměrná velikosti vektoru elektrického pole, v korpuskulárním modelu pak pravděpodobnosti, že má foton polarizaci v daném směru.



Základní charakteristikou vlny je **vlnová délka** ( $\lambda$ , nejčastěji v jednotkách nm), v některých metodách je obvyklejší udávat **vlnoččet** ( $\nu$ , počet vln na jednotku délky, nejčastěji v  $\text{cm}^{-1}$ ). V korpuskulárním modelu je s touto vlastností svázána energie fotonu ( $E$ , nejčastěji v jednotkách  $\text{eV} = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$ ). Intenzita záření je spojená s velikostí vektoru elektrického pole nebo s počtem fotonů. Další sledovanou vlastností je polarizace světla (obr. 3). Vlnová délka  $\lambda$ , vlnoččet  $\nu$  a energie fotonu  $E$  jsou spolu svázány vztahy:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (\text{vztah č. 1})$$

kde  $h$  je Planckova konstanta a  $c$  je rychlost světla ve vakuu<sup>29</sup>. Vidíme tedy, že fotony krátkovlnného světla mají vyšší energii než fotony dlouhovlnného světla. Přehledné srovnání korpuskulárního a vlnového modelu poskytuje tab. 4.

**Tab. 4** Srovnání základních charakteristik korpuskulárního a vlnového modelu.

vlnový model	korpuskulární model
vlnová délka, vlnoččet	energie fotonu
intenzita	počet fotonů
polarizace vlny	polarizace fotonu

### 2.1.1.2 Interakce světla s hmotou

Spektroskopické metody jsou založeny na sledování interakce světla s hmotou (obr. 4). Na molekulární úrovni se jedná především o pohlcení (absorpci), vyzáření (emisi) a změnu směru světla (elastický a neelastický rozptyl).

### 2.1.1.3 Měřené veličiny

V nejjednodušších případech měření měříme intenzitu světla (množství fotonů dopadajících na detektor) např. v závislosti na koncentraci některého z reaktantů, nebo v závislosti na čase. Měření závislosti intenzity signálu na vlnové délce (nebo vlnočtu či energii) označujeme jako měření spektra.

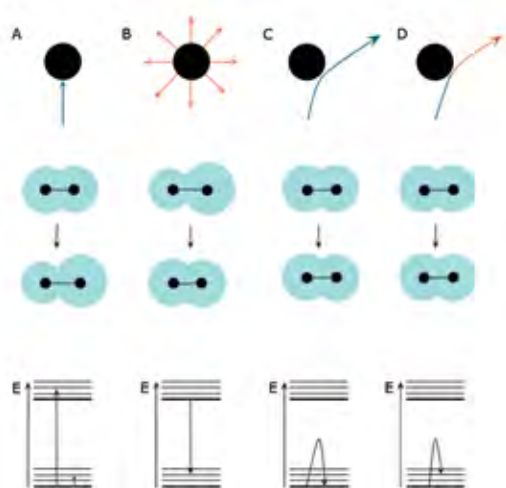
## 2.1.2 Experimentální technika pro optické spektroskopie v UV/VIS/NIR oblasti spektra

Většina technik využívá světlo ve viditelné oblasti spektra (visible, VIS, 390–790 nm), v blízké ultrafialové oblasti (ultraviolet, UV, oblast od 190 nm až po VIS<sup>30</sup>) a blízkou infračervenou oblast (near infrared, NIR, delší vlnové délky než VIS). Přístroje se typicky

<sup>29</sup> Planckova konst.  $h \sim 6,6 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ , rychlost světla ve vakuu  $c \sim 3,0 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

<sup>30</sup> V oblasti pod 190 nm už je velmi silná absorpce dvouatomových molekul vzduchu ( $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ ) a pro měření v této oblasti je nutná velmi nákladná vakuová aparatura. Naopak v infračervené části spektra nad 900 nm absorbuje vodní pára a  $\text{CO}_2$ , ale tento problém je možné relativně snadno minimalizovat saturací aparatury dusíkem.

**Obr. 4** Interakce světla s molekulami. Horní část obrázku ukazuje možné interakce světla s molekulami, prostřední část znázorňuje změny, které tato interakce v molekule vyvolá (černě jsou jádra, modře elektronový obal). Dole je potom energetický diagram, reflektující změny v molekule při daném procesu (tlustší čáry označují energie elektronových stavů, tenčí čáry pak příslušné stavy vibrační). Při absorpci (A) dojde k pohlcení světla. Pokud se jedná o foton z UV/VIS oblasti spektra, dojde ke změně elektronového stavu molekuly (přejde ze základního do excitovaného stavu), pokud se jedná o foton z infračervené části spektra, dojde pouze ke změně vibračního stavu (na prostředním obrázku není tento proces ukázán, na dolním je znázorněn malou šipkou). Emise (B) je procesem opačným. Dochází k vyzáření fotonů libovolným směrem a přechodu molekuly z excitovaného stavu do základního. Při elastickém rozptylu (C) dochází pouze ke změně směru světla, energetický stav molekuly se nemění. Při neelastickém rozptylu (D) dochází nejenom ke změně směru světla, ale i k současné změně vibračního stavu molekuly, což se projeví změnou vlnové délky světla.



skládají ze zdroje světla, monochromátoru a detektoru, které mohou být doplněny dalšími optickými elementy. Kapalně vzorky bývají umísťovány do spektroskopických kyvet.

### 2.1.2.1 Zdroje světla

Zdroje světla můžeme rozdělit podle jejich spektrálních (a) a časových (b) charakteristik či podle jejich výkonu (c).

- Většina běžných přístrojů obsahuje jako zdroj světla lampu, která vyzařuje světlo v širokém spojitém rozsahu vlnových délek. Spektrální oblast vyzařování je dána použitým plynem (nejčastěji jde o xenon) uvnitř lampy. Typickým příkladem monochromatického zdroje jsou **lasery**, které vyzařují na jedné nebo několika málo diskrétních vlnových délkách. V současné době získává popularitu využití LED diod a laserových **diod**, které emitují v části spektra o rozsahu několika desítek nm a představují v mnoha ohledech kompromis mezi lampami a lasery, přičemž jejich velkou výhodou je nízká cena, levný provoz a dlouhá životnost.
- Většina standardních přístrojů využívá kontinuálního světla, jehož intenzita se v čase nemění. Některé pokročilejší metody pro měření časových charakteristik systému



však vyžadují použití pulzních nebo harmonicky modulovaných zdrojů, které se vyznačují sinusoidním průběhem intenzity<sup>31</sup>.

- c) Nejvýkonnějším zdrojem jsou lasery. Silné vysokotlaké xenonové lampy sice také poskytují vysoký výkon, ale ten je rozložen přes širokou oblast spektra. Po vybrání úzké oblasti spektra monochromátorem však pro vlastní měření bude výkon o několik řádů menší. Kompromisem jsou kvalitní LED diody.

Měření spekter vyžaduje použití polychromatického zdroje, přičemž jsou nejčastěji využívané lampy. Lasery nacházejí uplatnění v aplikacích, kde měříme za pevně daných podmínek, vysoký výkon pak umožňuje měření vzorků, jejichž signál je slabý.

### 2.1.2.2 Monochromátor

Monochromátor je prvek, který z polychromatického světla vybere pouze úzkou část spektra. Využívá difrakci světla na mřížce. Výběr požadované vlnové délky je dán natočením mřížky a šířka spektrálního pásu je dána šířkou výstupní štěrbiny. Čím je štěrbina užší, tím je měření z hlediska spektrálního rozlišení přesnější, na druhou stranu intenzita detektovaného signálu je nižší<sup>32</sup>. V jednodušších přístrojích bývá monochromátor nahrazen filtrem. Filtry dělíme na krátkovlnné hranové (propouštějí kratší vlnové délky než je udaná hodnota), dlouhovlnné hranové (propouštějí delší vlnové délky než je udaná hodnota) a pásové filtry (propouštějí pás spektra v okolí udané vlnové délky). Výhodou filtrů je nízká cena a vysoká světelná propustnost, nevýhodou je malá flexibilita při měření a horší spektrální rozlišení.

### 2.1.2.3 Detektory

Dlouhodobě nejpoužívanějším detektorem světla je **fotonásobič**. Princip jeho fungování spočívá v tom, že při dopadu fotonu je ze světlocitlivé fotokatody vyražen elektron (vnější fotoelektrický jev), který je poté urychlen v silném elektrickém poli a multiplikován pomocí systému dynod (viz kap. 2.5.). V současné době se čím dál více uplatňují různé typy **photodiody**, ve kterých dochází po dopadu fotonu k uvolnění elektronu do vodivostního pásu uvnitř materiálu (vnitřní fotoelektrický jev). Vzhledem k tomu, že dopadající foton musí mít k vyvolání požadovaného efektu dostatečnou energii (tj. jistou maximální vlnovou délku), mají detektory své limitní vlnové délky na dlouhovlnné straně spektra – běžné fotonásobiče mají 820 nm, fotodiody 1100 nm.

### 2.1.2.4 Další optické elementy a umístění vzorků

Ve většině metod je pro dobrou reprodukovatelnost výsledků důležité mít pod kontrolou celou optickou dráhu. Standardními elementy optických přístrojů jsou čočky a zrcadla, v aplikacích, ve kterých hraje roli polarizace světla, se setkáváme také s polarizátory. Standardizované bývá i umístění vzorku. Kapalné vzorky obvykle umísťujeme

31 Nejkratší pulzy poskytují lasery (až  $10^{-14}$  s) nejdelší pulzy poskytují pulzní lampy ( $10^{-9}$  s, dnes jsou na ústupu), kompromisem jsou LED diody ( $10^{-11}$ – $10^{-10}$  s).

32 Mřížkový monochromátor propouští (i když s nižší intenzitou) i vyšší harmonické frekvence, takže jím při nastavení na 600 nm, 900 nm, atd. prochází i („parazitní“) světlo o vlnové délce 300 nm, což může vést k nežádoucím artefaktům.

do kyvet, což jsou transparentní nádoby pravoúhlého průřezu s dobře definovanou délkou optické dráhy. V přístrojích, které umožňují automatickou analýzu většího množství vzorků, pipetujeme vzorky do tzv. **mikrojamkových destiček**, ve kterých ale nemáme tak dobrou kontrolu nad délkou optické dráhy. Většina přístrojů umožňuje i měření pevných vzorků (suchá chemie, buněčné kultury rostoucí na pevné matici, aj.), vyžaduje to ale jejich upevnění do speciálního držáku. Také zde bývá problémem přesná kontrola délky optické dráhy, přičemž signál mohou ovlivnit i nerovnosti povrchu.

Použitelnost všech elementů je dána především materiálem, ze kterého jsou vyrobeny. Například v UV oblasti pod 360 nm již absorbuje sklo a pro měření již nelze použít optické elementy ze skla, nýbrž křemennou optiku, která je výrazně dražší. V UV oblasti také absorbují některé plasty, na což je třeba dbát při měření v jednorázových plastových kyvetách a mikrojamkových destičkách.

## 2.1.3 Optické spektroskopie

### 2.1.3.1 UV/VIS absorpční spektroskopie

Absorpční spektroskopie (někdy označována jako **fotometrie**) je základní a nejpoužívanější spektroskopická technika. Při průchodu světelného paprsku vzorkem dochází k exponenciálnímu poklesu intenzity světla (obr. 5) podle Lambert-Beerova zákona:

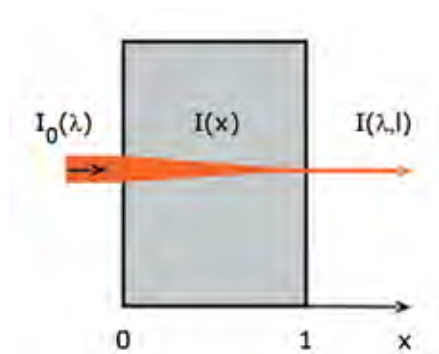
$$I(\lambda) = I_0(\lambda) 10^{-\varepsilon(\lambda) c l} \quad (\text{vztah č. 2})$$

kde  $I_0$  značí intenzitu dopadajícího paprsku,  $I$  intenzitu prošlého paprsku,  $l$  (v exponentu) optickou dráhu (tj. tloušťku vzorku) a  $c$  koncentraci vzorku.

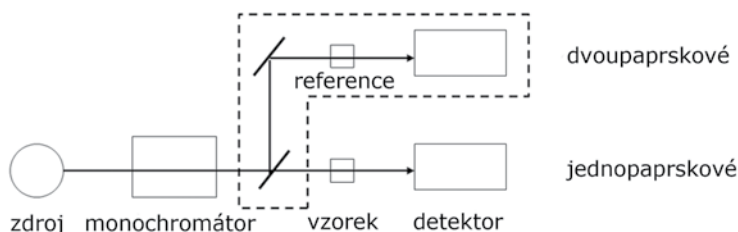
**Extinkční koeficient**  $\varepsilon$  (molární absorpční koeficient) a jeho závislost na vlnové délce jsou charakteristické pro každou molekulu a jeho měřením můžeme získat informace o chemickém složení vzorku. Při vlastním měření spektrometry obvykle ukazují hodnoty **absorbance**  $A$ , která je přímo úměrná koncentraci vzorku.

$$A = \log(I_0/I) = \varepsilon(\lambda) c l \quad (\text{vztah č. 3})$$

Hodnoty extinkčního koeficientu bývají tabelované v jednotkách  $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ , a pokud měříme ve standardní kyvetě s optickou dráhou 1 cm, tak prostým podílem  $A/\varepsilon$



**Obr. 5** Absorpce světla vzorkem. Při průchodu světla vzorkem dochází k exponenciálnímu poklesu intenzity v závislosti na tloušťce vzorku  $l$ , jeho koncentraci  $c$  a na vlnové délce světla  $\lambda$ .



**Obr. 6** Schéma absorpčního spektrometru. V absorpčním spektrometru jsou zdroj, monochromátor, vzorek a detektor v jedné přímce (jednopaprskové, lineární uspořádání). V kvalitnějších přístrojích bývá část paprsku odkloněna polopropustným zrcadlem do referenčního kanálu (reference, blank), což umožňuje korekci nestabilit signálu (dvoupaprskové uspořádání).

dostáváme koncentraci vzorku v jednotkách  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Protože provedení experimentu i obsluha přístroje jsou velmi snadné, je měření absorbance nejčastější metodou pro stanovení koncentrace látek v roztocích.

Absorpční spektrometr se standardně skládá z polychromatického zdroje (lampy), monochromátoru, držáku vzorku a detektoru (obr. 6).

Metody umožňující automatickou analýzu desítek vzorků v mikrojamkových destičkách na jedné straně představují velkou časovou úsporu, na druhé však vyžadují velkou obezřetnost při vyhodnocování dat. Pozornost je třeba věnovat už výběru vhodné destičky, která musí mít rovné dno a především musí být transparentní v té oblasti spektra, kde chceme měřit<sup>33</sup>. Jak jsme již zmínili, při měření v destičce, kdy je paprsek světla orientován vertikálně, nemáme pod kontrolou optickou dráhu<sup>34</sup>, čili znalost absorbance a extinkčního koeficientu nám k určení absolutní koncentrace vzorku nepostačí. Musíme se proto spokojit jen s relativním srovnáním vzorků, přičemž spoléháme na to, že všechny jamky obsahují identický objem roztoku. Příkladem metod běžně využívajících mikrojamkové destičky jsou imunoanalytické metody ELISA (viz kap. 2.4).

U pevných netransparentních vzorků můžeme určit jejich absorpční spektrum nepřímo, pomocí tzv. **reflexní spektroskopie**. Metoda vychází z toho, že reflexní spektrum (tj. závislost intenzity odraženého světla na vlnové délce) je doplňkovým spektrem ke spektru absorpčnímu. Typickým příkladem rutinního využití reflexní spektroskopie je sledování barevných změn papírových proužků sloužících k chemické analýze moči (viz kap. 1).

V klinické praxi existují stovky látek, které je možné kvalitativně i kvantitativně analyzovat pomocí absorpční spektroskopie. Je-li vzorek čistý (např. izolovaný protein), lze změřit absorbanci na jedné vlnové délce (v maximu absorpčního pásu) a pomocí

33 Toto není problémem ve viditelné části spektra, ale většina běžně užívaných destiček není propustná v UV oblasti.

34 Při měření v kyvetě je optická dráha horizontální a její délka je přesně daná rozměrem kyvety.

tabelované hodnoty  $\epsilon$  spočítat koncentraci. Matrice je v případě biologických vzorků složitější – obsahuje řadu „nečistot“ (tj. dalších látek, které přispívají k signálu). Absorbance analytu se proto měří i na dalších vlnových délkách a vliv matrice<sup>35</sup> se eliminuje pomocí empirických (předprogramovaných) vzorců.

Přímé měření absorbance provádíme u látek barevných<sup>36</sup>, u přečištěných vzorků<sup>37</sup>, nebo na výstupech separačních kolon (viz kap. 3.5). Koncentraci řady analytů taktéž stanovujeme pomocí specifické reakce s přidanou látkou, po níž vzniká barevný produkt, jehož absorbanci měříme. Příkladem je reakce hemoglobinu s kyanidy, reakce bilirubinu s diazoniovou solí či stanovení celkové koncentrace proteinů pomocí reakce s Coumassie Brilliant Blue (metoda Bradfordové), nebo s  $\text{CuSO}_4$  v alkalickém prostředí (biuretová reakce).

Velké množství aplikací je založeno na sledování kinetiky enzymové katalýzy a mohou mít za cíl jak stanovení koncentrace vybraného substrátu, tak stanovení katalytické aktivity samotného enzymu. Při těchto metodách sledujeme průběh absorbance na vybrané vlnové délce v čase, přičemž měření může probíhat kontinuálně nebo ve stanovených časových intervalech. Důležitým kontrolovaným parametrem je teplota vzorku. Často využívanou barevnou reakcí je konverze para-nitrofenylfosfátu na para-nitrofenol pomocí fosfatáz, příkladem je měření aktivity  $\alpha$ -amylázy. Časté je měření kinetiky reakcí pomocí nárůstu absorbance (340 nm) při redukci  $\text{NAD(P)}^+$  na  $\text{NAD(P)H}$ . To využíváme např. při stanovení koncentrace katalytické aktivity aminotransferáz, při stanovení glukózy pomocí hexokinázy nebo při měření koncentrace ury.

### 2.1.3.2 Fluorescenční spektroskopie

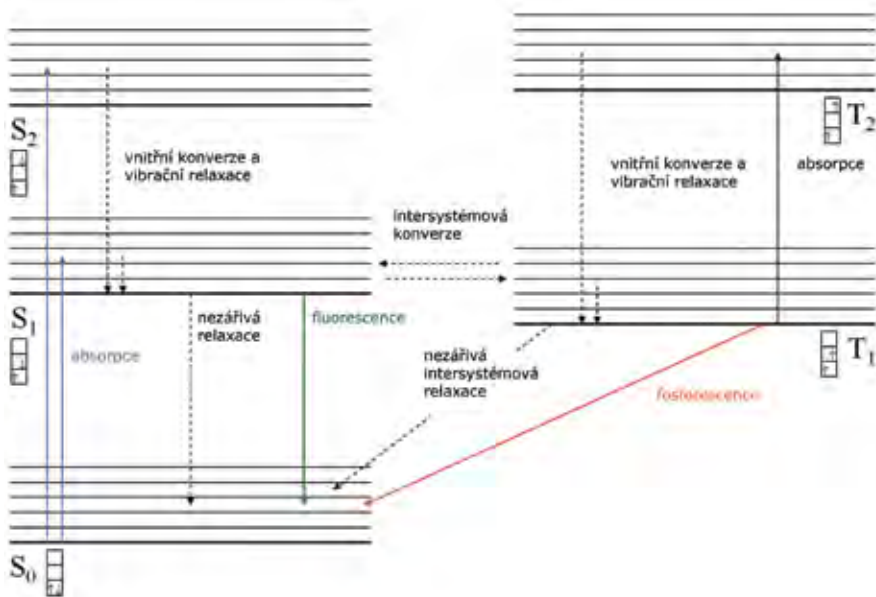
Absorpcí fotonu v UV/VIS oblasti spektra se molekula dostává do excitovaného stavu. Zbaví-li se přebytečné energie při návratu do základního stavu tím, že vyzáří (emituje) jiný foton, mluvíme o **(foto)luminiscenci** a látky nazýváme **luminofory**. Díky tomu, že během krátkého pobytu v excitovaném stavu dochází k různým relaxačním procesům (což představuje ztráty energie), vyznačuje se emitovaný foton menší energií, a tudíž větší vlnovou délkou, než měl foton absorbovaný<sup>38</sup>. Na tento jev můžeme pohlížet jako na schopnost některých molekul měnit barvu světla. V závislosti na mechanismu návratu molekuly do základního stavu rozlišujeme dva typy fotoluminiscence – **fluorescenci** a **fosforescenci**. První je způsoben zářivým přechodem mezi singletními elektronovými stavy a je pro něj typická kratší doba dohasínání emise po ukončení excitace (typicky  $10^{-10}$  až  $10^{-7}$  s). Látkám se schopností fluorescence říkáme **fluorofory**. U některých molekul však může docházet k relaxaci molekul do tzv. tripletního (metastabilního) stavu. Návrat do základního stavu potom vyžaduje současnou změnu elektronového i spinového stavu molekuly, což je málo pravděpodobné. V tomto případě hovoříme o fosforescenci a jejím nejnápadnějším rysem je pomalejší

35 Vliv matrice (matrix effect) je ovlivnění analytického měřicího postupu a jeho výsledku všemi ostatními složkami vzorku, kromě měřené složky.

36 Jde např. o stanovení celkového množství porfyrinů, kde využíváme silně absorbující tzv. Soretův pás (~ 405 nm).

37 Jde např. o izolované proteiny či DNA, které absorbují okolo 280 nm, resp. 260 nm.

38 Rozdíl mezi vlnovou délkou primárního a sekundárního záření je nazýván Stokesův posun.



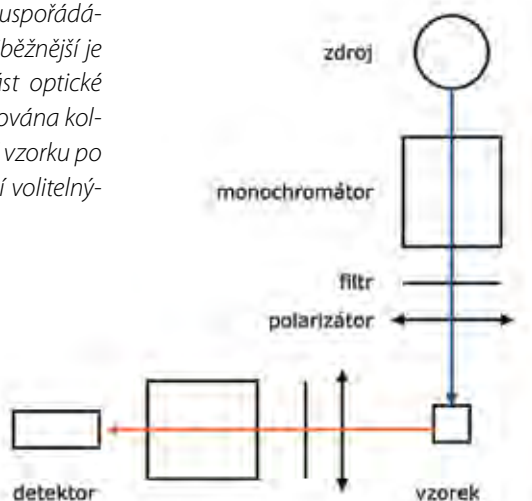
**Obr. 7** Jablonského diagram je energetický diagram popisující molekulární procesy při fotoluminiscenci. Po absorpci fotonu dojde k přechodu molekuly ze základního (u většiny molekul singletního,  $S_0$ ) do excitovaného (libovolného vyššího,  $S_n$ ) stavu. Poté dojde k relaxaci na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu, která je metastabilní. Odtud může dojít k přechodu do základního stavu nezářivě nebo s emisí fotonu (fluorescence), nebo může dojít k vnitřní konverzi do tripletového stavu ( $T_1$ ). Pokud při přechodu z  $T_1$  do základního stavu dochází k vyzáření fotonu, hovoříme o fosforescenci.

kinetika dohasínání luminiscence (typicky  $> 10^{-6}$  s). Procesy schematicky znázorňuje Jablonského diagram (obr. 7).

Přístroje pro fluorescenční spektroskopii většinou pracují v tzv. L-uspořádání, kdy emise ze vzorku je snímána ve směru kolmém na směr dopadajícího excitačního paprsku (obr. 8). V různých technikách jsou využívány monochromatické i polychromatické, kontinuální, pulzní i modulované zdroje světla. Použití emisního monochromátoru umožňuje odfiltrování rozptýleného excitujícího světla, což dává fluorescenčním technikám vysokou citlivost (detekce až femtomolárních koncentrací analytu). Fluorescenční detektory na výstupech separačních kolon (viz kap. 3.5) se vyznačují vysokou specifickou signálu a velkou citlivostí.

Co se týče počtu měřených veličin i využívaných experimentálních technik, je fluorescenční spektroskopie ve srovnání s absorpční spektroskopií mnohem pestřejší. Mezi nejčastěji sledované veličiny patří intenzita fluorescence pro dané vlnové délky excitace a emise, **excitační spektrum** (závislost intenzity na vlnové délce excitace při pevně dané vlnové délce emise), **emisní spektrum** (závislost intenzity na vlnové délce emise při konstantní vlnové délce excitace), **anizotropie fluorescence** (stočení polarizace emise vůči směru polarizace excitujícího světla) a doba života excitovaného

**Obr. 8** Schéma experimentálního uspořádání pro měření fotoluminiscence. Nejběžnější je tzv. L-uspořádání, kde excitační část optické dráhy (od zdroje po vzorek) je orientována kolmo na emisní část optické dráhy (od vzorku po detektor). Filtry a polarizátory bývají volitelnými doplňky spektrometru.



stavu. K dispozici je velké množství fluoroforů pokrývajících vlnové délky od ultrafialové až po blízkou infračervenou oblast spektra. Rozlišujeme **fluorescenční značky**, tj. fluorofory kovalentně navázané na zkoumanou molekulu a nekovalentně interagující **fluorescenční sondy**, které mění své fluorescenční vlastnosti v závislosti na interakci s molekulami analytu<sup>39</sup>. Využití obou skupin látek spočívá především v odlišení nebo specifickém zviditelnění určitých molekul buněk či tkání, ve sledování molekulárních interakcí a v specifické detekci vybraného analytu nebo popisu fyzikálních parametrů systému, jako je velikost molekuly, polarita, pH nebo viskozita okolního prostředí. Fluorescenční značení vybraných biomolekul je možné provádět buď přímo (pokud je lze izolovat), anebo nepřímo, pomocí označení jiné molekuly, která s danou molekulou specificky interaguje. Je-li vybraná látka antigenní povahy, interaguje se značenou protilátkou (viz kap. 2.4); v případě nukleových kyselin lze ke značení využít oligonukleotid s komplementární sekvencí (viz kap. 3.2).

Na fluorescenčním značení je založeno velmi citlivé a specifické barvení vybraných molekul nebo částí buňky – **fluorescenční mikroskopie** (viz kap. 2.4). K velkému rozvoji fluorescenční mikroskopie došlo poté, co se podařilo využít zvláštní druh značek, tzv. **fluorescenční proteiny**, které umožnily barvit jednotlivé buněčné komponenty s vysokou specificitou. Vysoká specificita značení je dána připojením genu pro fluorescenční protein ke genu vybraného buněčného proteinu. Buňka posléze exprimuje tzv. fúzní proteiny, které díky fluorescenčnímu proteinu emitují v oblasti VIS<sup>40</sup>. Existence barevných variant fluorescenčních proteinů umožňuje vícebarevné značení. Fluorescenční značení je rovněž součástí jiných metod, např. western-blottingu, metod ELISA nebo průtokové cytometrie (viz kap. 2.4. a 3.6).

39 V anglicky psané literatuře jsou fluorescenční značky i sondy označovány souhrnně jako „fluorescent probes“. Fluorescence, která nepochází ze samotné zkoumané biomolekuly, ale ze sondy či značky pak bývá označována jako „extrinsic fluorescence“.

40 Běžné proteiny emitují v UV části spektra.

Fluorescenční sondy jsou často využívány jako senzory  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}$ , reaktivních forem kyslíku nebo nukleových kyselin. Jiné sondy jsou fluorescenčními analogy přirozených substrátů enzymů (např. fluorescenční analoga ATP), a jsou tak využitelné ke studiu enzymové aktivity. Řada fluorescenčních sond slouží jako reportéry o svém okolí. Jejich fluorescenční charakteristiky mohou být citlivé na pH, polaritu okolního prostředí, teplotu nebo membránový potenciál. Fluorofory jsou také součástí složitějších senzorů (viz kap. 2.3).

Na rozdíl od uměle přidávaných fluoroforů existují ve tkáních (a tudíž i v biologických vzorcích) molekuly<sup>41</sup>, jež jsou po ozáření přirozeně schopny fluorescence. Mluvíme o vlastní fluorescenci (angl. „intrinsic fluorescence“), neboli autofluorescenci. Přestože v rutinním klinicko-biochemickém vyšetřování může mít tento fenomén spíše charakter interference (viz kap. 2.4), přitahuje fluorescenční spektroskopie tkání nebo tělních tekutin pozornost vědců. Vysoká citlivost, nedestruktivní charakter techniky, případně i její neinvazivita umožňuje např. studium degenerativních změn cév a kloubů<sup>42</sup>. Běžnější je sledování látek, které nejsou organismu vlastní, čili xenobiotik. Jde zejména o látky toxické nebo účinné složky léčiv, zpravidla polyaromatické sloučeniny emitující ve VIS oblasti. Pokud je vzorek přečištěn, lze autofluorescenci využít pro určení konformace izolovaných proteinů (tryptofanová fluorescence), nebo ke sledování kinetik enzymových reakcí (fluorescence NADH nebo  $\text{FAD}^+$  na rozdíl od nefluoreskujících  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{FADH}$ ).

Aplikace *in vivo* umožňují studium vybraného objektu s velkým rozlišením. Zpravidla vyžadují intravenózní podání fluoroforu. Příkladem je vyšetření krevního řečiště oční sítnice nebo zobrazení malých nádorových ložisek v oblasti vaječníků nebo jater pomocí fluorescenčně značené kyseliny listové<sup>43</sup>.

### 2.1.3.3 Metody elastického rozptylu

Při elastickém rozptylu dochází pouze ke změně směru světla na částicích s indexem lomu odlišným od okolního prostředí, bez změny vlnové délky světla. Podle velikostí částic, na kterých dochází k rozptylu, mluvíme o rozptylu Rayleighovu (velikost částic je menší než  $1/20$  vlnové délky světla, což se týká biomolekul), nebo Mieovu (velikost částic je srovnatelná s vlnovou délkou světla nebo je větší, což je případ buněk nebo organel). Ze znalosti intenzity dopadajícího světla  $I_0$ , intenzity rozptýleného světla  $I_R^0$  pod úhlem  $\theta$  a vzdálenosti detektoru od vzorku  $r$  můžeme při Rayleighovu rozptylu určit tzv. Rayleighův poměr, který je přímo úměrný molekulové hmotnosti částic zkoumané látky  $M$  a její koncentraci  $c$ .

$$R_0 = \frac{r^2 I_R^0}{I_0} = KMc \quad (\text{vztah č. 4})$$

41 Mezi látky vykazující fluorescenci patří tryptofan (max. emise 320–350 nm), pyridoxin (~390 nm), kolagen (~390 nm), elastin (~420 nm), NADH (~460 nm), lipo-pigmenty (500–600 nm), flaviny (~550 nm) a porfyriny (620–680 nm).

42 Při studiu synoviální tekutiny nebo kůže se uplatňuje autofluorescence AGEs (Advanced Glycation End-products).

43 Látky se v nádoru akumuluje a umožňuje tak odhalit až 30x menší karcinomy (0,1 mm), než je běžné při standardně vedených operacích.

Konstanta  $K$  zahrnuje další experimentální parametry jako je úhel  $\theta$ , pod kterým je rozptyl detektován, indexy lomu rozpouštědla a látky, či vlnovou délku světla. Měřením rozptylu můžeme tedy získat informace o koncentraci látky a o jejím stavu. Toho lze využít při studiu rozpustnosti látek nebo tvorby oligomerů či komplexů, jaké vytváří např. léčivo s cílovou molekulou, nebo antigen s protilátkou.

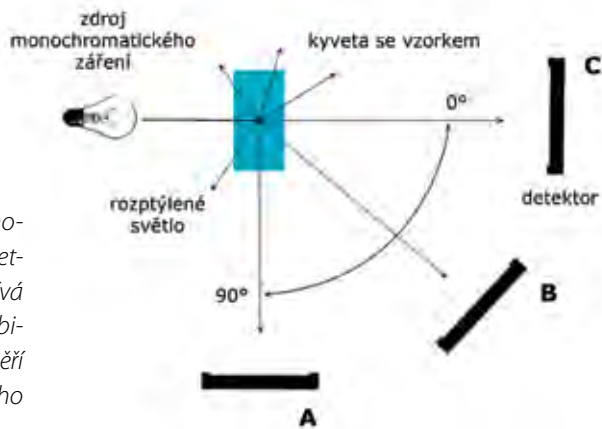
### Nefelometrie a turbidimetrie

Na Rayleighovu rozptylu světla jsou založené metody nefelometrické a turbidimetrické. Pokud je ke stanovení analytu využito záření rozptýlené (detektor je v úhlu  $0$  až  $90^\circ$  ke směru dopadajícího světla), dochází při zvýšení koncentrace analytu k nárůstu signálu (nefelometrie). Je-li intenzita světla měřena ve směru jeho dopadu (turbidimetrie), má rozptyl záření za následek pokles intenzity světla (obr. 9). Měření lze provést studiem rychlosti tvorby komplexů v prvních minutách reakce (**kinetický přístup**), anebo stanovením množství precipitátu v pseudoekvilibriu, tj. za 30 až 60 minut po zahájení reakce („**end-point**“ analýza, která se v případě interakce antigen-protilátka vyskytuje v zóně B precipitační křivky, viz obr. 20 v kap. 2.4).

Nefelometrické měření je řádově citlivější (na rozdíl od turbidimetrie se uplatní např. při stanovení IgM nebo haptoglobinu v CSF), naopak turbidimetrie je vhodnější pro analýzu koncentrovanějších roztoků. Využití (imuno)nefelometrie je popsáno v kap. 2.4. Turbidimetrie je užitečná nejenom pro imunochemická stanovení, ale také pro stanovení celkových proteinů v moči pomocí reakce s kyselinou trichloroctovou, stanovení aktivity amylázy za použití škrobu jakožto substrátu, nebo aktivity lipázy, když substrátem jsou triacylglyceroly. Aktivita enzymu má v těchto případech za následek snížení turbidity vzorku.

#### 2.1.3.4 Další metody

Pro zkoumání molekulárních struktur nebo interakcí lze využít řadu dalších metod optické spektroskopie. Jejich limitem pro uplatnění v klinicky zaměřených laboratořích



**Obr. 9** Princip měření pomocí nefelometrie a turbidimetrie. V nefelometrii se využívá rozptýl záření (A, B). Turbidita roztoku se naopak měří ve směru dopadu vstupujícího záření (C).



jsou komplikovaná a obtížně interpretovatelná spektra, nacházejí však využití např. ve farmacii.

### **Cirkulární dichroizmus**

Cirkulární dichroizmus (CD) je metoda, která využívá toho, že chirální centra absorbují levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované světlo s různou účinností. Metoda slouží ve farmacii ke stanovení enantiomerní čistoty léčiv nebo ve strukturní biologii k hodnocení sekundárních struktur proteinů či DNA (odlišení nativního stavu od stavu denaturovaného).

### **Infračervená spektroskopie**

Jde o absorpční spektroskopii v infračervené (IR) oblasti spektra<sup>44</sup>. Vzhledem k tomu, že tyto fotony nemají dostatek energie k excitaci molekul (jako v případě UV/VIS), navodí pouze změny vibračního či rotačního stavu. Díky charakteristickým vibracím jednotlivých chemických vazeb prakticky neexistují dvě různé molekuly s identickým IR spektrem, což lze využít k identifikaci a stanovení čistoty látek, zejména ve farmacii, klinické toxikologii či v klinicko-biochemické diagnostice (např. analýza močových konkrémentů a analýza vydechovaného vzduchu v dechových testech, viz kap. 2.5).

### **Ramanova spektroskopie**

Metoda je založená na Ramanově jevu, u kterého dochází k neelastickému rozptylu světla. Interakce světla s molekulou zapříčiní přechod molekuly do vyššího vibračního stavu, což vede ke ztrátě energie fotonu a tedy k nárůstu jeho vlnové délky<sup>45</sup>. Při měření Ramanových spekter se využívá laserová aparatura; rozptyl se detektuje pod úhlem 90° nebo 180°. Ramanova spektroskopie se uplatňuje při studiu vibračních stavů molekul. Jedná se o doplňkovou techniku k IR spektroskopii, neboť při Ramanově rozptylu se projevují ty typy vibrací, které IR spektroskopie nezachytí.

### **Ramanova optická aktivita**

Ramanova optická aktivita (ROA) je kombinací Ramanovy spektroskopie a cirkulárního dichroizmu. Ramanova spektra jsou měřena pomocí levo- nebo pravotočivě kruhově polarizovaného světla. Díky možnosti současného studia chemických vazeb a chiralit molekuly jde o velmi účinný nástroj pro sledování enantiomerní čistoty ve farmacii.

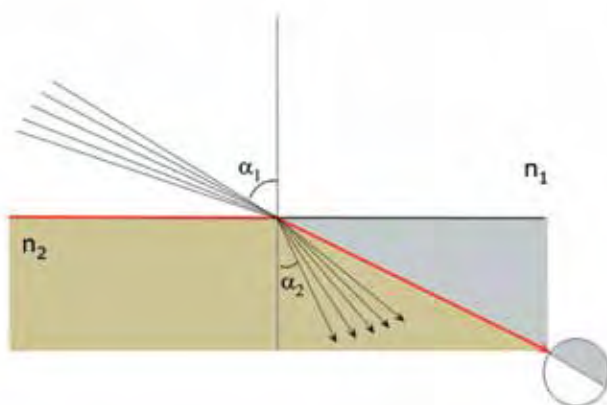
## **2.1.4 Refraktometrie a interferometrie**

Tyto detekční metody jsou založeny na rozdílu v indexu lomu mezi analytem a okolním prostředím. Vzhledem k tomu, že sledujeme makroskopický efekt (a nikoliv interakci molekul s fotony, jako v odst. 2.1.3) bez studia závislosti na vlnové délce světla, nejedná se v pravém slova smyslu o spektroskopické metody.

44 Pro studium molekul má největší význam oblast 4000–200 cm<sup>-1</sup> (tj. vlnové délky 2500–50 000 nm).

45 Obsahuje-li vzorek fluoreskující molekuly, může jejich signál interferovat se signálem Ramanova rozptylu.

**Obr. 10** Refraktometrie. Paprsek se při dopadu na rozhraní dvou prostředí s různým indexem lomu láme. Pokud dopadá z prostředí opticky řidšího ( $n_1$ ) a prochází do prostředí opticky hustšího ( $n_2$ , přičemž  $n_1 < n_2$ ), tak část druhého prostředí zůstane neosvětlená. Určením polohy hranice světla a stínu je možné stanovit index lomu druhého prostředí.



### 2.1.4.1 Refraktometrie

Při dopadu světelného paprsku na rozhraní dvou prostředí o indexech lomu  $n_1$  a  $n_2$  dochází k lomu paprsku podle Snellova zákona:

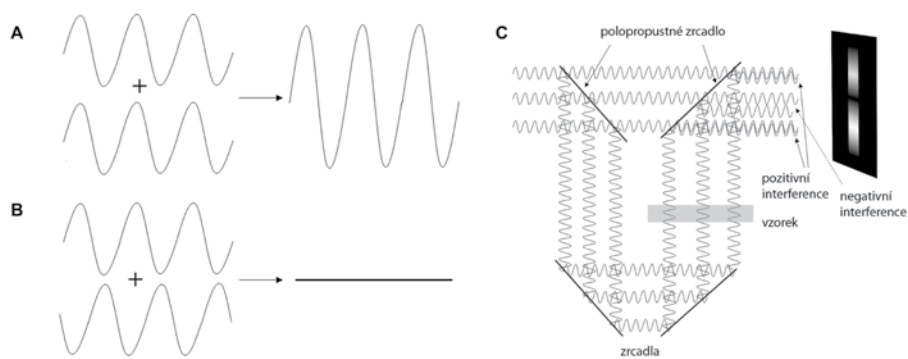
$$n_1 \cdot \sin \alpha_1 = n_2 \cdot \sin \alpha_2 \quad (\text{vztah č. 5}),$$

kde  $\alpha_1$  je úhel dopadu a  $\alpha_2$  je úhel lomu. Pokud paprsek vstupuje do vzorku ze vzduchu, uvažujeme  $n_1 = 1$ . V tomto případě dochází k lomu ke kolmici a  $n_2$  je určováno podle mezního úhlu lomu ( $\alpha_2$  při  $\alpha_1 = 90^\circ$ ), který tvoří rozhraní mezi osvětlenou a neosvětlenou částí zorného pole (obr. 10). Vzhledem k tomu, že hodnota indexu lomu závisí jak na vlnové délce světla, tak na teplotě, bývají tabelované hodnoty pro jednotlivé látky udávány jako  $n_D^{20}$  (D je označení pro žlutou čáru sodíkové výbojky na 589 nm, číslo pak symbolizuje teplotu 20°C). Refraktometrie je jednoduchá metoda využívaná ke kontrole čistoty a stanovení koncentrace látek. Ve veterinární medicíně slouží např. ke stanovení sérových proteinů nebo hustoty moči.

### 2.1.4.2 Interferometrie

Interferometrie je metoda založená na vlnové povaze světla. Zdrojem světla je laser. Pokud jsou dvě vlny ve fázi, dojde ke konstruktivní interferenci (zesílení). Pokud mají fáze opačné, dojde k destruktivní interferenci (zeslabení). Protože se světlo pohybuje v látce s větším indexem lomu pomaleji, dochází při průchodu takovou látkou ke „zpoždění“, čili k posunu fáze, což se projeví posunem světlých a tmavých proužků v interferenčním obrazci (obr. 11). Srovnáním interferenčního obrazce vzorku s obrazcem standardu je možné získat informace o čistotě a koncentraci látek podobně jako u refraktometrie, a to s větší citlivostí. Limitací interferometrie je podstatně náročnější experimentální vybavení.

Historie většiny diagnostických metod je podobná – nejprve se jedná o fenomén studovaný fyziky, poté se začne používat v materiálové a analytické chemii, pak následuje biochemie a biologie a teprve nakonec začnou tyto techniky pronikat do humánní



**Obr. 11** Interference. **(A)** Pozitivní interference, **(B)** negativní interference. **(C)** V interferometru je část paprsku odkloněna polopropustným zrcadlem po optické dráze definované délkou a po opětovném překrytí dráhy obou paprsků pozorujeme jejich interferenci. Díky malým rozdílům v délce optické dráhy sledujeme jak pozitivní, tak negativní interference a na stínítku se objevují tmavé a světlé proužky. Vložený vzorek změní optickou dráhu světla a tím ovlivní tvar interferenčních obrazců.

medicíny. Trendem současné doby je automatizace měření pro analýzu velkého množství vzorků a využití pozorovaných signálů pro specifické zobrazování buněk, tkání nebo celých organismů. Základní principy fungování však zůstávají stejné, a to bez ohledu na úroveň aplikace. Porozumění těmto principům je klíčem ke správnému používání přístrojů a adekvátní interpretaci získaných dat. To se týká i metod využívajících světlo v UV/VIS/NIR oblasti spektra. Ty nabízejí širokou škálu sledovatelných parametrů, přičemž pro medicínu jsou atraktivní z hlediska rychlosti analýz a především pro svou šetrnost ke studovaným vzorkům.

### Otázky k přípravě

1. Popište zdroje světla, monochromátor a detektory využívané v optické spektroskopii v UV/VIS/NIR oblasti spektra.
2. Při měření vzorku v kyvetě s optickou dráhou 1 cm byla naměřená absorbance  $A = 1$ . Kolik procent světla prošlo vzorkem? Určete koncentraci zkoumané látky, jestliže víte, že má na dané vlnové délce extinkční koeficient  $\epsilon = 20000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$ .
3. Srovnajte absorpční a fluorescenční spektroskopii z hlediska citlivosti detekce a z hlediska vhodnosti pro stanovení koncentrace zkoumané látky.
4. Popište principy metod založených na elastickém rozptylu světla.
5. Kde nachází uplatnění infračervená spektroskopie?

### Literatura

- Conway B. N. a kol., Skin Intrinsic Fluorescence Is Associated With Coronary Artery Disease in Individuals With Long Duration of Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* 2012; 35: 2331–2336.

- van Dam a kol., Intraoperative Tumor-Specific Fluorescent Imaging in Ovarian Cancer by Folate- $\alpha$ ; Receptor Targeting: First In-Human Results, *Nature Medicine* 2011; 17: 1315–1319.
- Gore M. G. (ed.), *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, Oxford University Press, Oxford (UK), 2000.
- Handl M. a kol. Fluorescent Advanced Glycation End Products in the Detection of Factual Stages of Cartilage Degeneration, *Physiological Research* 2007; 56: 235–242.
- Lakowicz J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy* (3<sup>rd</sup> ed.), Springer, 2006.
- Prosser V. a kol. *Experimentální metody biofyziky*, Academia, Praha, 1989.
- Tokudo N., Ishizawa T. Clinical Application of Fluorescence Imaging of Liver Cancer Using Indocyanine Green, *Liver Cancer* 2012; 1: 15–21.
- Upstone S. L. Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry, in *Encyclopedia of Analytical chemistry* (Meyers R. A. ed.), Wiley, Chichester, 2000: 1699–1714.

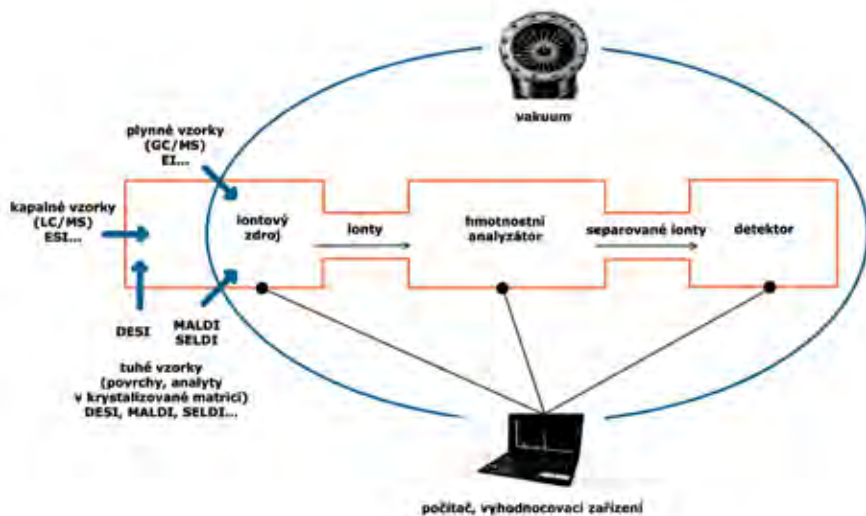
## 2.2 Hmotnostní spektrometrie

B. Papoušková, P. Džubák

Hmotnostní spektrometrie v současnosti patří mezi špičkové instrumentální analytické techniky. Tato univerzální, rychlá a přitom vysoce specifická a citlivá metoda umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu organických i anorganických látek ve složitých matricích. Díky těmto přednostem našla hmotnostní spektrometrie uplatnění nejen ve fyzikálním a chemickém výzkumu, ale i v celé řadě dalších odvětví, z nichž lze jmenovat biochemii, biotechnologii, farmacii či klinickou medicínu. Jedním z hlavních důvodů prudkého rozvoje hmotnostní spektrometrie v posledních desetiletích byl především vývoj nových typů iontových zdrojů (obzvláště ionizace elektrospřejem a ionizace laserem za přítomnosti matrice), které umožňují převod jak malých molekul tak i (bio)makromolekul do plynné fáze a jejich následnou analýzu.

### 2.2.1 Princip fungování a součásti hmotnostního spektrometru

Základním principem hmotnostní spektrometrie je tvorba pozitivně či negativně nabitých částic (iontů), které jsou rozlišeny na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a poté jsou kvalitativně a kvantitativně zaznamenány detektorem. Výsledkem je hmotnostní spektrum, které graficky znázorňuje závislost četnosti iontů na hodnotě  $m/z$ . Každý **hmotnostní spektrometr** se skládá z iontového zdroje, ve kterém dochází k ionizaci a převodu vzorku do plynné fáze, dále z hmotnostního analyzátoru, kde probíhá vlastní separace iontů na základě poměru  $m/z$ , a nakonec detektoru a vyhodnocovacího zařízení (obr. 12).



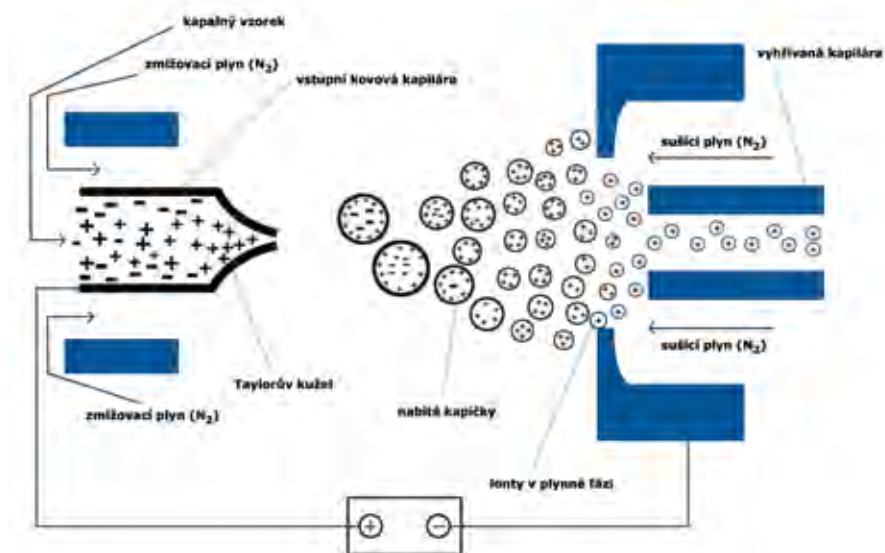
**Obr. 12** Zjednodušené schéma hmotnostního spektrometru. Iontové zdroje EI a MALDI pracují za vakua, DESI a ESI za atmosférického tlaku. Podrobnosti k principům viz text.

### 2.2.1.1 Iontový zdroj

Analyzovaná látka může být ionizována účinkem elektrického pole, zvýšené teploty, dopadem vysokoenergetických elektronů, iontů či fotonů, přičemž výzkum v oblasti ionizačních technik zdaleka není u konce. Ionizační techniky lze obecně rozdělit na „tvrdé“ a „měkké“, a to na základě množství energie, kterou molekula získá v průběhu ionizačního procesu. Mezi „tvrdé“ ionizační techniky patří primárně elektronová ionizace, která způsobuje rozsáhlé štěpení (fragmentaci) výchozí molekuly a vznik radikálových iontů. Tento typ ionizace je uskutečnitelný pouze u vzorků v plynné fázi, a tudíž je vhodný jen pro tekavé a tepelně stabilní látky. Většina biologického materiálu nicméně představuje směs převážně netěkavých látek podléhajících snadnému tepelnému rozkladu. Pro jejich ionizaci je tedy nezbytné použít některou z „měkkých“ ionizačních technik, které umožňují přímý převod analytů z kondenzované do plynné fáze.

### Elektrosprej (ES, ESI)

Mezi nejběžnější „měkké“ ionizační techniky patří elektrosprej, jehož základní funkcí je převod kapalného vzorku do plynné fáze při současně tvorbě (pseudo)molekulárních iontů (protonizované ionty, deprotonizované ionty, popř. adukty). Jedná se o standardní iontový zdroj pro spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovými separačními technikami (viz kap. 3.5). Na kapiláru, kterou je kapalným vzorkem přiváděný do hmotnostního spektrometru, se vkládá vysoký kladný nebo záporný potenciál. Tím dochází ke vzniku tzv. Taylorova kužele, ze kterého se uvolňují nabitě kapky, jež dále postupují do vyhřívané kapiláry, kde dochází k jejich rychlému zmenšování v důsledku odpařování rozpouštědla. Při dosažení vysoké hustoty povrchového náboje jsou malé ionty vypuzeny z kapky do plynné fáze. V případě velkých iontů dochází ke komplet-



**Obr. 13** Schéma zobrazující základní princip ionizace elektrosprejem v tzv. pozitivním módu. V tzv. negativním módu se namísto vysokého kladného potenciálu vkládá na vstupní kovovou kapiláru potenciál záporný a primárně tedy vznikají záporně nabití ionty.

ní desolvataci molekuly (tj. odstranění obalu složeného z molekul rozpouštědla). Pro urychlení procesu odpařování a zajištění stabilního sprejování se používá koaxiálně proudící inertní **zmlžovací plyn** (obr. 13).

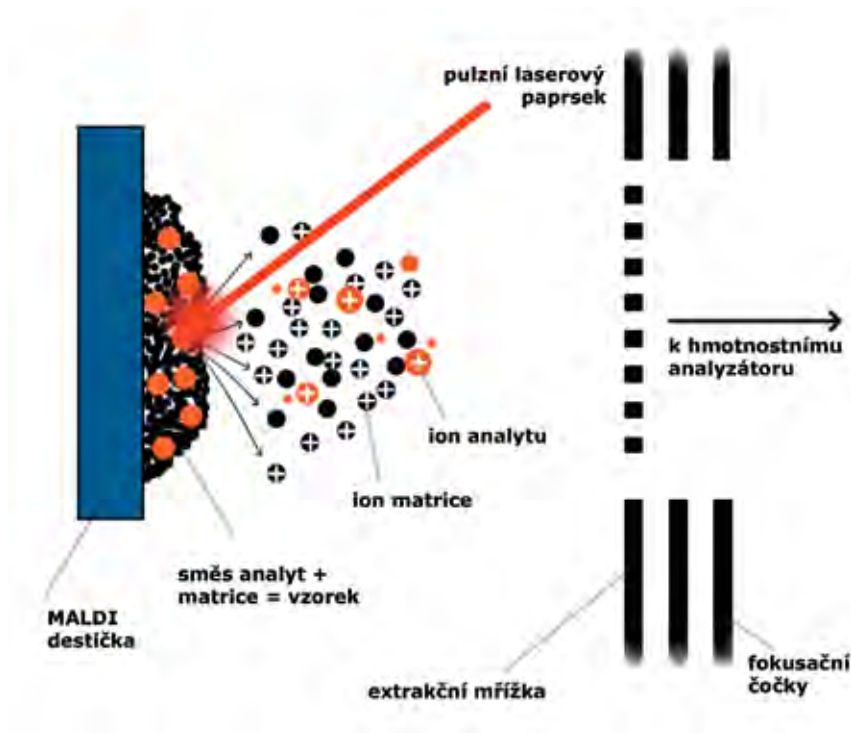
#### **Výhody ESI:**

- možnost pracovat v širokém rozsahu  $m/z$  (v praxi až do 70 000 Da<sup>46</sup>),
- maximální šetrnost ionizační techniky,
- velmi vysoká citlivost,
- tvorba vícenásobně nabitých iontů – možnost měřit i velmi velké molekuly na hmotnostním analyzátoru s omezeným rozsahem  $m/z$ , čehož se úspěšně využívá obzvláště při analýze (bio)makromolekul,
- snadné spojení s kapalinovou chromatografií,
- možnost miniaturizace (nanoelektrosprej).

#### **Nevýhody ESI:**

- snížení citlivosti v případě přítomnosti solí nebo ion-párovacích činidel ve vzorku,
- problematická analýza směsí bez předchozí separace,

46 Hmotnostní spektrometristé pracující v poli biomedicíny preferují jednotku dalton [Da] (na počest J. Daltona) namísto atomové hmotnostní jednotky [u]. Dalton není jednotka SI, nicméně je ekvivalentní atomové hmotnostní jednotce.



**Obr. 14** Zjednodušené schéma laserové desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI). Detaily viz text.

- snadná kontaminace analyty z předchozích vzorků,
- složitější interpretace vícenásobně nabitých iontů, obzvláště ve směsi.

### Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (MALDI)

MALDI představuje další typ „měkké“ ionizační techniky, která našla rozsáhlé uplatnění v praxi. Stejně jako v případě elektrospreje dochází při využití tohoto desorpčního iontového zdroje přednostně k tvorbě málo fragmentovaných (pseudo)molekulárních iontů analytu. Vzorek, který je složený z analytu smíchaného s nadbytkem matrice<sup>47</sup>, je nanesen na kovovou destičku, vložen do evakuovaného prostoru a poté ozařován krátkými pulzy laseru. Energie laserového pulzu je absorbována převážně matricí, čímž dochází k její rychlé excitaci a desorpci. Excitovaná matrice následně přenáší náboj na desorbované molekuly analytu (transfer protonu) a tím dochází k jejich ionizaci (obr. 14). Jelikož je tento proces prakticky nezávislý na velikosti analyzované

47 Matrice běžně používané v MALDI-MS zahrnují kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinu (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB), 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP) a další. Matrice musí splňovat několik parametrů: musí mít schopnost tvořit krystaly začleňující analyt do své krystalové mřížky (nebo schopnost pojmout analyt, je-li matricí kapalina), dále schopnost absorbovat energii laseru, schopnost ionizovat analyt, musí být schopna snadné desorpce při ozáření laserem a musí také být stabilní za vakua.

molekuly, MALDI umožňuje desorpci a ionizaci analytů s molekulovou hmotností i v řádech stovek kDa.

Výsledné hmotnostní spektrum primárně závisí na energii laserového paprsku a na kvalitativním složení směsných krystalů matrice-analyt. Ve srovnání s elektrosprejem MALDI poskytuje jednodušší spektra a je tedy vhodná i pro analýzu složitých směsí. MALDI je rovněž méně citlivá na kontaminaci analytu solemi a pufrů, nicméně při vyšších koncentracích kontaminantů může dojít k narušení procesu desorpce a ionizace.

### **Výhody MALDI:**

- možnost pracovat v širokém rozsahu  $m/z$  (i stovky tisíc Da),
- velmi vysoká citlivost,
- šetrnost ionizační techniky, minimální fragmentace (pseudo)molekulárních iontů,
- využitelnost i pro analýzu složitých směsí,
- vyšší tolerance kontaminantů (solí, pufrů).

### **Nevýhody MALDI:**

- nízká reprodukovatelnost měření,
- přítomnost iontů matrice v hmotnostním spektru,
- určité riziko fotodegradace analytu účinkem laserového záření,
- vysoká závislost výsledku na vybrané metodě přípravy vzorku.

### **Laserová desorpce/ionizace s vylepšeným povrchem (SELDI) a desorpční elektrosprej (DESI)**

Metody patří mezi nejnovější ionizační techniky s vysokým aplikačním potenciálem v oblasti klinické medicíny. Základní princip SELDI se v podstatě neliší od MALDI. Hlavní rozdíl spočívá v úpravě povrchu destičky, která aktivně váže analyt hydrofobními či elektrostatickými interakcemi, zatímco kontaminanty jsou odstraněny promytím. Tuto techniku lze použít analogickým způsobem v čipových analýzách (viz kap. 2.3). Terčíky modifikované kovalentně vázanými protilátkami, ligandy nebo receptory tímto způsobem umožňují extrakci vybraných proteinů z kapalných biologických vzorků přímo na pracovní destičce. Na takto přečištěný terčík je nanášena matrice a vzorek je podroben hmotnostně spektrometrické analýze.

DESI představuje ionizační techniku kombinující principy desorpce a elektrospreje a používá se za účelem analýzy povrchů. Technika vytváří jemný sprej nabitých kapek rozpouštědla, které směřují přímo k analyzovanému povrchu. Nabité kapky rozpouštědla dopadají na tento povrch pod určitým úhlem a smáčejí ho, čímž jsou molekuly z povrchu extrahovány do rozpouštědla. Sekundární kapky rozpouštědla jsou společně s ionty analytu desorbovány a transportovány do hmotnostního spektrometru (tzv. „droplet pick-up“ mechanismus). Metoda DESI takto umožňuje analyzovat malé a středně velké polární látky přímo z pevného povrchu nebo kapalného vzorku umístěného na pevném nosiči.

DESI a MALDI představují hlavní techniky zobrazovací hmotnostní spektrometrie („imaging mass spectrometry“). Mezi jejich nejdůležitější výzkumné aplikace patří sledování distribuce léků, jejich metabolitů, lipidů, hormonů, peptidů či proteinů



v různých živočišných tkáních. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie tak představuje velmi slibný diagnostický nástroj, ať již při rozpoznávání karcinomů či charakterizaci mikroorganismů.

### 2.2.1.2 Hmotnostní analyzátor

Poté, co jsou molekuly převedeny na ionty v plynné fázi, je nutné, aby byly rozděleny na základě jejich poměru  $m/z$ . Toho může být dosaženo s využitím několika různých principů, přičemž pokaždé je zapotřebí buď elektrického, nebo magnetického pole (případně jejich kombinace).

Běžné typy hmotnostních analyzátorů a jejich separační principy:

- elektrický sektor – kinetická energie,
- magnetický sektor – hybnost,
- kvadrupól (Q) –  $m/z$  (stabilita trajektorie iontů),
- iontová past (IT) –  $m/z$  (rezonanční frekvence),
- analyzátor doby letu (TOF) – rychlost (doba letu iontů),
- iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) –  $m/z$  (rezonanční frekvence),
- orbitrap (FT-OT) –  $m/z$  (rezonanční frekvence).

Základní charakteristiky hodnotící výkonnost hmotnostního analyzátoru jsou následující: hmotnostní rozsah, rychlost analýzy, transmise iontů, přesnost měření  $m/z$  a rozlišení. Z výše uvedených je nutné zmínit především měření přesné hmoty, které je vyjádřeno rozdílem mezi teoretickou hodnotou  $m/z$  a změřenou hodnotou  $m/z$ , a nejčastěji se udává v ppm (parts per million). Přesnost měření hmoty velmi úzce souvisí se stabilitou a rozlišením hmotnostního analyzátoru. Analyzátor s vysokým rozlišením (s vysokou schopností získat odlišné signály pro ionty s minimálním rozdílem jejich  $m/z$ ) mohou poskytnout informaci o elementárním složení iontů.

### Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS, MS<sup>2</sup>, MS<sup>n</sup>)

Tandemová hmotnostní spektrometrie je obecná metoda zahrnující přinejmenším dva stupně hmotnostně-spektrometrické analýzy spojené s disociačním procesem iontů v tzv. kolizní cele<sup>48</sup> anebo chemickou reakcí způsobující změny hmoty nebo náboje iontu.

- Tento typ hmotnostně-spektrometrického experimentu může být realizován buď:
- **v čase** – ionty jsou zadržovány v prostoru analyzátoru (IT, FT-OT); je možné provést izolaci iontů o vybraném poměru  $m/z$  a následně realizovat kolizní experiment (viz výše „kolizní cela“), přičemž tento postup je možné opakovat i se vznikajícími fragmenty,
  - **v prostoru** – dva hmotnostní analyzátorů jsou spojeny za sebou; často se jedná o kombinaci kvadrupólu a dalšího hmotnostního analyzátoru; principem je selekce vybraných iontů kvadrupólem, jejich následná fragmentace v kolizní cele

48 Jde o zařízení umístěné mezi dvěma hmotnostními spektrometry umožňující fragmentaci ionizovaných molekul produkovaných hmotnostním spektrometrem prvním v pořadí.

v důsledku srážek s inertním kolizním plynem a finální analýza fragmentů druhým analyzátozem.

Tandemová hmotnostní spektrometrie obecně slouží k bližší charakterizaci chemické struktury analyzované látky. Jednu z hlavních oblastí jejího uplatnění lze nalézt příkladně v sekvenování a identifikaci proteinů a léčiv.

### 2.2.1.3 Detektor a vyhodnocovací zařízení

Ionty, poté co jsou separovány hmotnostním analyzátozem, jsou převedeny na použitelný signál pomocí detektoru. Detektor je schopný generovat elektrický proud, který je úměrný četnosti dopadajících iontů.

Mezi nejběžnější typy detektorů v hmotnostní spektrometrii patří:

- elektronový násobič,
- channeltron,
- mikrokanálová destička (MCP),
- indukce (FT-ICR, FT-OT).

Po zpracování signálu vyhodnocovacím zařízením je získáno **hmotnostní spektrum**, které lze popsat jednak jako obraz chemické reaktivity iontů v plynné fázi, a jednak jako obraz transportních a elektrochemických procesů v kondenzované fázi. Z důvodu přímé závislosti na způsobu ionizace a konstrukci hmotnostního spektrometru se zde nejedná o fyzikální konstantu.

Hmotnostní spektra „měkkých“ ionizačních technik sice obsahují minimum fragmentů, zato však řadu iontů pocházejících buď z rozpouštědla (ESI, DESI), nebo z matrice (MALDI), resp. z kontaminace iontového zdroje. Díky tomu jsou tato spektra velmi komplexní a jejich interpretace vyžaduje znalost interpretačních pravidel. V hmotnostním spektru je samostatně zaznamenáván každý ion dopadající na detektor. Proto v případě existence přirozených izotopů prvků obsažených v molekule je hledaný analyt vždy přítomen na několika poměrech  $m/z$  v závislosti na počtu a hmotnosti izotopů. Charakteristická je přítomnost  $^{13}\text{C}$  (1,1 %) vedle  $^{12}\text{C}$  (lze použít pro odhad počtu uhlíků v molekule),  $^{37}\text{Cl}$  (~33 %) vedle  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{81}\text{Br}$  (~50 %) vedle  $^{79}\text{Br}$  a dalších. Profil izotopických píků lze využít pro zjištění počtu atomů v molekule, protože zastoupení izotopů v přírodě je konstantní.

## 2.2.2 Využití hmotnostní spektrometrie v klinické praxi a biomedicíném výzkumu

Vysoký stupeň analytické spolehlivosti předurčuje tyto metody k tomu, aby byly společně s chromatografickými separačními postupy (viz kap. 3.5) využívány v referenčních laboratořích jako součást primárních (čili definitivních nebo absolutních) a referenčních metod<sup>49</sup>. Přestože se vzhledem k pořizovacím i provozním nákladům tyto metody zatím

<sup>49</sup> Na tyto metody jsou pomocí řetězce kalibrací navázány metody výrobců diagnostických souprav a rutinní metody uživatelů – periferních laboratoř. Tato tzv. metrologická návaznost je podmínkou srovnatelnosti metod a výsledků.

v rutinních periferních pracovištích uplatňují relativně málo (nachází se zatím zejména v mikrobiologických laboratořích), v případě větších klinicko-biochemických laboratoří a výzkumných center je hmotnostní spektrometrie nepostradatelnou technikou, která stále nabývá na významu. Níže uvádíme stručný přehled nejdůležitějších aplikací.

### 2.2.2.1 Metabolická onemocnění

Z hmotnostní spektrometrie se stává významný nástroj k diagnostice řady metabolických onemocnění<sup>50</sup>. V separaci molekul je využívána zejména plynová chromatografie (viz kap. 3.5). V různých biologických materiálech (nejčastěji jde o krev a moč) lze identifikovat abnormality v profilech metabolitů a malých molekul, jako jsou organické kyseliny, puriny, pyrimidiny, acylkarnitiny, oligosacharidy a další. Hmotnostní spektrometrie přispívá k diagnostice strádavých lysozomálních onemocnění<sup>51</sup>, kdy je pomocí monitorování kvantity synteticky připraveného substrátu hodnocena aktivita enzymů extrahovaných například ze suché kapky (krve).

### 2.2.2.2 Identifikace alergenů

Alergie postihují miliony lidí po celém světě. Jednou z hlavních příčin jsou alergenys obsažené v potravě<sup>52</sup>. Jediným způsobem, jak alergenys z diety účinně eliminovat, je znát jejich přítomnost v potravinách. Detekce alergenů pomocí protilátek bývá limitovaná díky jejich tepelné denaturaci a následné změně antigenicity molekuly (tj. potenciálu molekuly interagovat se specifickou protilátkou, viz kap. 2.4). Výhodou hmotnostní spektrometrie je identifikace alergenů na základě přesné hmoty a fragmentace, která je na terciální struktuře proteinu nezávislá.

### 2.2.2.3 Identifikace infekčních agens

Proteomická MS analýza zejména abundančních ribozomálních proteinů nalezla rutinní uplatnění v mikrobiologii, a to v rychlé (~100 vzorků za ½ hod) identifikaci bakteriálních kmenů. K tomu stačí jedna bakteriální kolonie nebo malé množství tekutého média po namnožení bakteriální kultury. Bakterie jsou po promísění s matricí naneseny na terčík a analyzovány metodou MALDI-TOF/MS. Po porovnání spekter se spektry již obsaženými v databázi je hmotnostnímu spektru přiřazena identita. Časová úspora od odběru k identifikaci patogenu je přinejmenším 24 hodin, a to s vysokou mírou shody se standardními metodami.

### 2.2.2.4 Analýza bioaktivních peptidů a malých regulačních molekul

Hmotnostní spektrometrie umožňuje stanovit látky s velmi nízkými plazmatickými koncentracemi, jako jsou biogenní peptidy a hormony. Výhodou je nezávislost metody na terciární struktuře peptidu, která může mít za následek obtížnou přípravu protilátek

50 Jednou z limitací je obtížná syntéza a dostupnost standardů cílových metabolitů.

51 Jedná se o skupinu vzácných dědičných poruch metabolismu na podkladě defektů lysozomálních enzymů zodpovědných za štěpení lipidů, glykoproteinů a glykosaminoglykanů.

52 Jde např. o alfa- a betalaktalbumin, lysozym, ovomukoid, ovalbumin, proteiny pšenice, podzemnice olejné a další.

vhodných pro imunochemické testy<sup>53</sup> (viz kap. 2.4). Je-li k dispozici značený standard s totožnou terciální strukturou, je možné z kalibrační křivky získat informaci i o absolutní koncentraci látky. Pro dosažení vyšší citlivosti měření je výhodné předřadit separační metodu, např. HPLC (viz kap. 3.5) a zapojit citlivé analyzátoři, např. na principu trojitěho kvadrupólu. Metody mohou sloužit i pro screening analogů steroidních hormonů, růstových faktorů a dalších látek využívaných ve sportu jako nedovolený doping.

### 2.2.2.5 Toxikologie

Další rozsáhlou kapitolou je analýza toxických látek (pesticidů, bakteriálních toxinů, kontaminantů atd.), léčiv a drog v biologických tekutinách, potravinách a životním prostředí. Výhodou je možnost stanovení až několika set analytů v jednom vzorku; limitací je použití vhodné separační metody. Z léčiv jsou tímto způsobem stanovovány koncentrace antibiotik, antiepileptik, kardiovaskulárních léčiv, analgetik, protinádorových léčiv a dalších. Významné je zavádění analytických metod i v rámci vývoje nových léčivých přípravků, který vyžaduje znalost distribuce a eliminace látek z organismu zvířat (farmakokinetické studie). Současný výzkum je zaměřen na vývoj neinvazivních analytických metod, tj. takových, které nevyžadují odběr krve. Jde např. o analýzu potu nebo DESI techniky aplikované na kůži vyšetřovaného jedince.

### 2.2.2.6 Biomarkerové studie a expresní profilování

V případě infekčních, kardiovaskulárních a onkologických onemocnění dochází v organismu k významným regulačním a metabolickým změnám, které jsou spojeny se změnou koncentrace vybraných molekul, tzv. **biomarkerů**. Ty jsou pro dané onemocnění více či méně specifické a mohou sloužit buď v diagnostice, nebo častěji pro určení prognózy, hodnocení odpovědi na léčbu nebo pro časnou detekci progresu onemocnění. Analýza proteomu založená na hmotnostní spektrometrii hraje při identifikaci vhodných biomarkerů klíčovou roli.

Expresní profilování je proces paralelního stanovení exprese tisíců genů, jež poskytuje sumární obraz o buněčné funkci. Expresní profily dokáží např. rozlišit aktivně se dělicí buňky, anebo ukázat, které buňky reagují na působení studovaných látek. Metody hmotnostní spektrometrie se, podobně jako dvojrozměrná elektroforéza (viz kap. 3.4), uplatňují na úrovni proteomu a metabolomu. Mají význam při objasňování mechanismu účinku léčiv, mohou přispět k pochopení etiologie onemocnění, a také k optimalizaci (zacílení) terapie. Na úrovni transkriptomu lze využít expresní cRNA nebo cDNA čipy (viz kap. 2.3). Technický pokrok v této oblasti také umožnil vznik samostatných oborů jako je např. nutriční genomika, farmakogenomika nebo funkční genomika.

### 2.2.2.7 Sekvenční analýza DNA

Hmotnostní spektrometrie je využívána také pro analýzu DNA – s výhodou zejména u krátkých fragmentů, kdy je rychlejší než standardní sekvenační metody (viz kap. 3.2). Uplatnění nachází hlavně v případech, kdy je k dispozici dostatečně koncentrovaný

53 Příkladem takového peptidu je hepcidin – regulační molekula (25 aminokyselinových zbytků) zapojená do metabolismu železa.

vzorek (např. díky využití polymerázové řetězové reakce, PCR) a je známo, jaké změny se mají v genomu hledat. Jde o detekci známých mutací, SNP (Single Nucleotide Polymorphism) variability či epigenetických změn definovaných úseků DNA.

### 2.2.2.8 Další potenciální aplikace

Nejen proteiny, metabolity a DNA, ale i lipidy, složité sacharidy, glykoproteiny nebo glykolipidy mohou být předmětem hmotnostně spektrometrické analýzy komplexních biologických vzorků. Díky tomu začínají obory jako lipidomika nebo glykomika zažívat významný rozvoj a postupně nacházet využití i v klinické diagnostice.

### Seznam literatury

- Hoffman E, Stroobant V. Ion Sources. In: Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007. p. 33–54.
- Gross JH. Ambient Mass Spectrometry. In: Mass Spectrometry: A Textbook 2<sup>nd</sup> Edition. Springer-Verlag, Heidelberg, 2011. p. 621–645.
- Ytterberg AJ, Dunsmore J., Lomeli SH, Thevis M, Xie Y, Loo RRO, Loo JA. The Role of Mass Spectrometry for Peptide, Protein, and Proteome Characterization. In: Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications: Fundamentals, Instrumentation, and Applications (Ed.: Cole RB). John Wiley & Sons Ltd, 2010. p. 685–723.
- Dziuda DM. MALDI-TOF and SELDI-TOF Mass Spectrometry. In: Data Mining for Genomics and Proteomics: Analysis of Gene and Protein Expression Data. John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, 2010. p. 228–232.
- DeJesus VR, Zhou H, Vogt RF, Hannon WH: Changes in solvent composition in tandem mass spectrometry multiplex assay for lysosomal storage disorders do not affect assay results. Clin Chem 2009; 55 (3): 596–598.

#### Otázky k přípravě:

1. Co je to hmotnostní spektrometrie?
2. Popište hlavní součásti hmotnostního spektrometru.
3. Co je to rozlišení hmotnostního spektrometru?
4. Popište princip elektrospreje.
5. Jak velké molekuly mohou být analyzovány hmotnostním spektrometrem?
6. Které klinické aplikace hmotnostní spektrometrie znáte?

## 2.3 Elektrochemické metody, (bio)senzory a čipové platformy

J. Vacek, M. Zatloukalová, J. Srovnal

Senzory a čipy dnes představují nezastupitelný nástroj jak v experimentální tak klinické medicíně. Tato zařízení jsou typická tím, že jejich aplikace klade minimální nároky na obsluhující personál a pořizovací náklady jsou mnohonásobně nižší než v případě robustní laboratorní instrumentace. Tato přenosná a z hlediska aplikace flexibilní

zařízení jsou využívána při kontinuálním (*in situ*<sup>54</sup>) sledování celé řady chemických (např. koncentrace glukózy) či fyzikálních (např. teplota) parametrů. V předkládané kapitole budou ve stručnosti popsány teoretické základy a aplikace chemických senzorů, biosenzorů a čipů využívaných v (bio)medicínských oborech. Prostor bude nejprve věnován elektroanalytickým metodám, jelikož první senzory a taktéž biosenzory byly elektrody uzpůsobené k selektivnímu stanovení vybraných analytů právě pomocí elektrochemických metod.

### 2.3.1 Elektrochemické metody

Metody elektroanalytické jsou založeny na generování, resp. dekodování, analytických signálů elektrické povahy. Tyto metody můžeme rozdělit na metody založené na elektrodovém ději, v tomto případě sledujeme oxidačně-redukční reakci:



Do této kategorie spadají metody potenciometrické, voltametrické, elektrogravimetrické, coulometrické atd. Dále také známe metody založené na měření elektrických vlastností zkoumaných roztoků, jako jsou metody konduktometrické a dielektrické. Třetí skupinou by mohly být techniky založené na migraci nabitých částic v elektrickém poli, tj. metody elektroforetické (viz kap. 3.4). V případě biochemických a klinicko-biochemických analýz se elektrochemie uplatňuje výhradně na úrovni analýz vodných roztoků. Elektrochemický analyzátor se obvykle sestává z elektrodového systému, systému vodičů, zdroje elektrického proudu/napětí a vyhodnocovacího zařízení. K analýzám se používají různé typy **elektrod**. Elektrody využívané pro elektroanalytické účely obvykle označujeme jako indikační (měrné, nebo také pracovní), které jsou doplněny o referentní (srovnávací) či pomocné. Elektrochemická analýza obvykle probíhá tak, že elektrodový systém je ponořen do analyzovaného vzorku.

Principem **potenciometrických metod** je sledování rovnovážného napětí galvanického článku, který se sestává z elektrody indikační a referentní. Potenciál indikační elektrody závisí na koncentraci stanovované látky, přičemž potenciál srovnávací elektrody je konstantní. **Amperometrické metody** jsou naopak založeny na měření proudu procházejícího indikační elektrodou, na kterou je vložen konstantní potenciál. Velikost tohoto proudu v přítomnosti analytu (tzv. depolarizátoru) je mírou jeho koncentrace. Významné uplatnění v elektroanalýze nachází **metody voltametrické** (voltamperometrické), kdy na pracovní elektrodu vkládáme měnící se napětí a sledujeme proudovou složku v tříelektrodovém zapojení. Potenciál elektrochemické přeměny (viz vztah č. 6) je kvalitativním parametrem a velikost procházejícího proudu indikuje množství analytu ve vzorku.

**Elektrogravimetrie a coulometrie** jsou metody založené na kompletní přeměně zkoumaných látek. Proces, ke kterému při této přeměně dochází, nazýváme **elektrolýza**. Po jejím ukončení množství analytu ve vzorku odpovídá množství produktu vzniklého

54 Jde o umístění měřícího zařízení přímo ve tkáni, kterou sledujeme.

elektrolýzou, který je určen zvážením. V případě coulometrie se naopak sleduje potřebný náboj nutný k úplné elektrochemické přeměně analytů. **Konduktometrie a dielektrometrie** vychází, na rozdíl o výše uvedených metod, z analýzy elektrických vlastností analyzovaných vzorků. V konduktometrii např. měříme vodivost vyšetřovaných roztoků.

Výše uvedené metody jsou v klinické biochemii využívány k analýze pH, iontů, plynů, glukózy a dalších látek (viz tab. 5). Vzhledem k tomu, že se jedná o metody instrumentálně nenáročné, jsou společně s optickými metodami (viz kap. 2.1) využívány v podobě senzorů, biosenzorů a mikroanalýzátorů.

### 2.3.2 Elektrochemické senzory a biosenzory

Senzor je zařízení schopné měřit žádanou veličinu a převádět ji na výstupní veličinu (většinou elektrický proud), kterou lze vyjádřit číselně. Chemický senzor je schopen měřit změnu chemického složení ve svém okolí. Asi nejjednodušším a nejnámějším chemickým senzorem je elektroda pro měření pH. Pokud je senzor modifikován biologickou komponentou, hovoříme o biosenzoru. Biologická komponenta (tzv. **biorekogniční prvek**) je nejčastěji imobilizovaná vrstva enzymu, protilátky, DNA či aptameru (oligonukleotid nebo peptid schopný specifické vazby k cílové molekule). Společným jmenovatelem senzorů je aktivní povrch, který je v kontaktu se vzorkem a vyznačuje se selektivitou k analytu. V případě chemických senzorů je pro analyt selektivní přímo pracovní povrch senzoru (např. polopropustná membrána), v případě biosenzorů sehraává tuto roli biorekogniční prvek. Kromě samotného senzoru plní významnou úlohu **fyzikálně-chemický převodník**, který poskytuje vhodný signál reflektující přítomnost analytu ve vzorku. Většina zavedených senzorů jsou elektrochemické senzory, kde k detekci analytu slouží amperometrické, potenciometrické nebo voltamperometrické metody (viz výše). Kromě sledování elektrochemických parametrů mohou být jako detekční systémy (resp. fyzikálně-chemické převodníky) využity i optické metody (optody, viz kap. 2.1) nebo metody založené na sledování hmotnostních změn (piezoelektrické senzory) popřípadě kalorimetrické senzory (obr. 15A).

První práci pojednávající o elektrochemických biosenzorech publikoval L. C. Clark v roce 1962, který imobilizoval enzym glukózaoxidázu na kyslíkovou elektrodu<sup>55</sup> pomocí dialyzační membrány. Enzym je schopný katalyzovat oxidaci glukózy, což je spojeno s úbytkem kyslíku. Ten byl měřen pomocí kyslíkové elektrody a jeho koncentrace odpovídala koncentraci glukózy ve vzorku. Clarkův vynález se v různých modifikacích dodnes používá pro stanovení koncentrace glukózy v krvi. Glukózové senzory v současné době dominují jak v klinických, tak experimentálních aplikacích. Prostor je však otevřen i pro kontinuální *in situ* analýzu řady dalších analytů – iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), metabolitů (laktát), neurotransmiterů a jiných regulačních molekul (acetylcholin, dopamin, glutamát, kyselina gamaaminomáselná), vitaminů (askorbát) nebo markerů zánětu (oxid dusnatý).

55 Tzv. Clarkova elektroda slouží ke stanovení množství kyslíku. Je založena na elektrochemické metodě, kdy kyslík ve vzorku difunduje přes hydrofobní membránu propustnou pro plyny ke katodě, kde se redukuje na vodu. Elektroda se využívá v acidobazických analyzátoch pro stanovení kyslíku a také v analyzátoch glukózy.

**Tab. 5** Výchet vybraných molekulárních cílů/ukazatelů, k jejichž stanovení lze použít technologii biosenzorů nebo čipů.

analyt/marker	onemocnění	biorekogniční prvek/princip	převodník/ analytická metoda
<b>α-fetoprotein (AFP)</b>	nádorová onemocnění, nespecificky	protilátka protilátka (sendvič. test)	elektroanalýza (čip) elektroanalýza
<b>gen BRCA1</b>	rakovina prsu	DNA	elektroanalýza
<b>nádorový antigen 125 (CA 125)</b>	rakovina vaječníku	protilátka protilátka	elektroanalýza (čip) elektroanalýza
<b>nádorový antigen 15–3 (CA 15–3)</b>	rakovina prsu	protilátka	elektroanalýza (čip)
<b>nádorový antigen 19–9 (CA 19–9)</b>	rakovina pankreatu a GIT	protilátka	elektroanalýza (čip)
<b>karcino-embryonální antigen (CEA)</b>	rakovina tlustého střeva a konečníku, nádorová onemocnění, nespecificky	protilátka protilátka	elektroanalýza (čip) elektroanalýza
<b>srdeční troponin T (cTnT)</b>	akutní koronární syndrom	protilátka (sendvič. test)	elektroanalýza
<b>srdeční troponin I (cTnI)</b>	akutní koronární syndrom	protilátka (sendvič. test) protilátka protilátka (sendvič. test)	elektroanalýza (čip) optická detekce (FRET) optická detekce (SPR)
<b>kortizol</b>	celkový stres	protilátka protilátka	optická detekce (SPR) elektroanalýza (čip)
<b>C-reaktivní protein (CRP)</b>	zánětlivá onemocnění, onemocnění srdce a cév	protilátka (sendvič. test) protilátka (sendvič. test)	magnetická detekce akustická detekce (RAP test)
<b>receptor 2 pro lidský epid. růst. faktor (HER-2)</b>	rakovina prsu	protilátka	optická detekce (SPR)
<b>ferritin</b>	anémie	protilátka	elektroanalýza (čip)
<b>virus hepatitidy B</b>	hepatitida	DNA PNA protilátka (sendvič. test)	elektroanalýza akustická detekce (QCM) elektroanalýza
<b>lidský choriový gonadotropin (hCG)</b>	nádorová onemocnění germinativního původu, nespecificky	protilátka protilátka	elektroanalýza (čip) elektroanalýza
<b>interleukin 6 (IL-6)</b>	zánětlivá onemocnění	protilátka	akustická detekce (SAW)

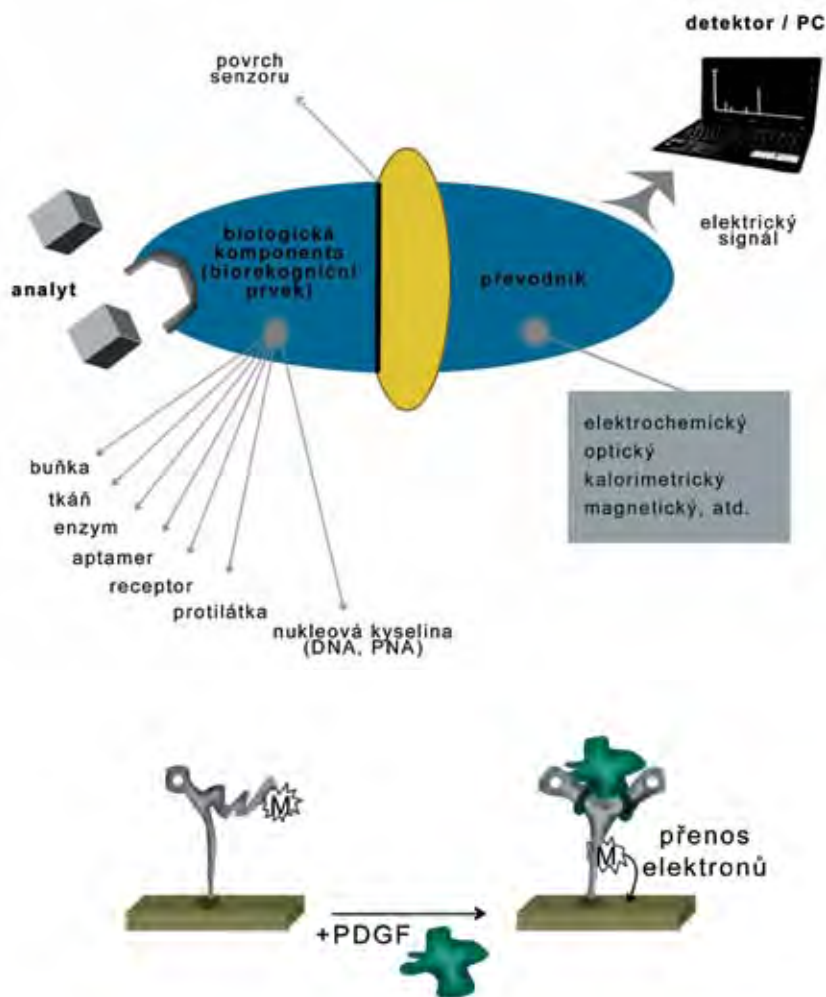


<b>analyt/marker</b>	<b>onemocnění</b>	<b>biorekogniční prvek/princip</b>	<b>převodník/ analytická metoda</b>
<b>interleukin 8 (IL-8)</b>	zánětlivá onemocnění, rakovina dutiny ústní	protilátka (sendvič. test)	optická detekce (fluorescenční konfokální mikroskopie)
<b>HPV DNA, konzervat. oblast</b>	infekce, lidský papilomavirus (HPV)	DNA DNA	magnetická detekce (čip) akustická detekce (QCM)
<b>prostatický specif. antigen (PSA)</b>	rakovina prostaty	protilátka (sendvič. test) protilátka (sendvič. test)	optická detekce (SPR) elektroanalýza
<b>trombin</b>	onemocnění srdce a cév	DNA aptamer (sendvič. test)	elektroanalýza
<b>HIV-1 reverzní transkriptáza</b>	infekce virem lidské imunodeficiency (HIV)	DNA aptamer	kapilární elektroforéza
<b>vask. endoteliální růst. faktor (VEGF)</b>	nádorová onemocnění, nespecificky	protilátka	elektroanalýza
<b>myeloperoxidáza (MPO)</b>	onemocnění srdce a cév	protilátka (sendvič. test)	elektroanalýza

Jedna ze současných aplikací elektrochemických biosenzorů je založena na imobilizaci DNA aptamerů (DNA oligonukleotidů o definované sekvenci) na povrch senzoru (elektrody). DNA aptamer se vyznačuje vysokou vazebnou afinitou k analytu, např. k růstovému faktoru PDGF (angl. zkr. platelet-derived growth factor), viz obr. 15B. DNA aptamer je označen elektroaktivní značkou (markerem, M), která při kontaktu s povrchem elektrody poskytuje elektrochemickou odezvu. Pokud je PDGF přítomen v analyzovaném vzorku, dojde k jeho vazbě na DNA aptamer, což vede ke konformační změně aptameru, díky čemuž se elektroaktivní značka dostává do kontaktu s povrchem elektrody. Aplikace biosenzorů pro stanovení vybraných molekulárních cílů a diagnostických markerů je souhrnně uvedena v tab. 5.

### 2.3.3 Čipy a jejich aplikace v analýze nukleových kyselin a proteinů

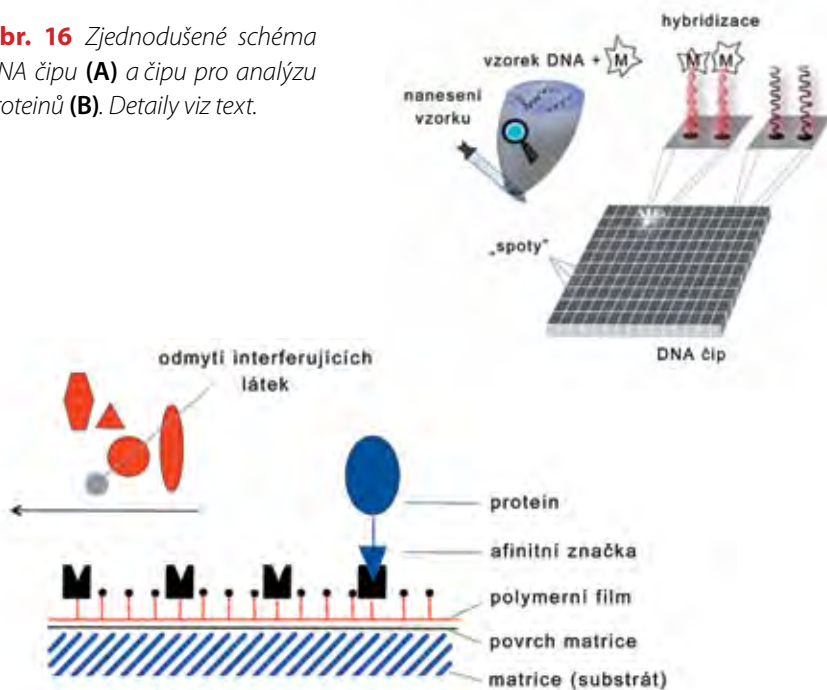
Technologii čipů lze vnímat jako rozšíření technologie senzorů, jelikož techniky imobilizace biologických komponent a detekční principy navržené pro čipy vyšly v řadě případů z technik původně zavedených pro DNA a proteinové senzory. Navíc, společným jmenovatelem obou analytických přístupů (biosenzorů i čipů) je pracovní povrch, na kterém probíhají chemické reakce a detekce analytu. Na rozdíl od senzorů jsou však čipové technologie dnes využívány výhradně pro analýzu DNA (DNA čip, obr. 16A) a proteinů (proteinový čip, obr. 16B).



**Obr. 15** Zjednodušené schéma biosenzoru s vyznačením jeho komponent (A). Příklad elektrochemického biosenzoru, kde biologickou komponentou je imobilizovaný DNA aptamer (B). Biosenzor byl navržen pro analýzu PDGF, detaily viz text.

Podstatou konstrukce čipů pro DNA a proteiny je jejich imobilizace jakožto biorekogničních prvků na pevnou matici (tzv. substrát). Nejčastěji se používá destička nebo fólie vyrobená ze skla, silikonu, teflonu, plastů nebo běžných syntetických polymerů (polystyren apod.). DNA či proteiny mohou být imobilizovány přímo na substrát nebo jeho modifikovaný povrch, a to fyzikální sorpcí nebo kovalentní vazbou. Na povrch substrátu bývá napařena vrstva zlata, hliníku nebo jiného kovu. Na tuto anorganickou vrstvu se nanáší polymerní film, který slouží především k omezení dehydratace povrchu čipu, což je důležité především pro proteinové čipy. Nejčastěji se používá agaróza, dextranové a polyakrylamidové gely. Důležitou součástí polymerního filmu jsou také

**Obr. 16** Zjednodušené schéma DNA čipu (A) a čipu pro analýzu proteinů (B). Detaily viz text.



specifická vazebná místa pro DNA či protein. Proces immobilizace DNA nebo proteinu na povrch čipu je klíčovým krokem v jeho konstrukci. Způsobů immobilizace biomakromolekul na povrch čipu je nespočet (tab. 5).

K tomu, aby bylo možné DNA nebo protein immobilizovat na povrch čipu, je potřeba jejich strukturu modifikovat tzv. „**afinitní značkou**“. Tato značka je specificky rozpoznána látkou (nebo funkční skupinou), která je součástí polymerního filmu.

- DNA může být immobilizována na povrch čipu pomocí SH-značených konců.
- Často se DNA a proteiny značí **biotinem**, což je ve vodě rozpustná látka s vysokou afinitou ke glykoproteinům: avidinu a streptavidinu (viz kap. 2.4). Biotinem značená DNA nebo protein se tedy může selektivně vázat na čip modifikovaný avidinem nebo streptavidinem.
- Jinou možností je modifikace proteinu **polyaminokyselinovou sekvencí** (např. poly (His)), které se váží s čipem, který byl modifikován kovy s komplexotvornými vlastnostmi (např. Ni).
- Pro immobilizaci proteinů lze využít i **rekombinantních fúzních proteinů**. Například fúzní protein GST (protein, který je na C-konci značený glutathion-S-transferázou) je možné navázat anti-GST protilátkou immobilizovanou na povrchu čipu.

Specifickým místům na povrchu čipu, která obsahují immobilizované molekuly DNA a proteinů, říkáme „**spoty**“. Běžné mikrometrové rozměry spotů mohly být díky nanotechnologiím v poslední době redukovány až na rozměry nanometrové. Stanovení DNA na konkrétním spotu je založeno na Watson-Crickově párování bází (hybridizace) dvou deoxyribonukleotidových řetězců – řetězce analyzované molekuly a molekuly

imobilizované. Na povrch čipu se tedy váže pouze ta molekula DNA, která obsahuje segment komplementární k imobilizované sekvenci nukleotidů a umožní tak vznik duplexů, které jsou následně detektovány. Analýza může probíhat pomocí elektroaktivní nebo fluorescenční značky (markeru, M), která se specificky váže pouze na tyto duplexy (obr. 16A). V případě proteinů jde o složitější situaci – jejich interakce závisí na složitější terciární struktuře, která navíc podléhá posttranslačním modifikacím. Chemické vlastnosti každé značené a/nebo imobilizované molekuly proto musí být detailně prozkoumány. Mezi nejčastější biorekogniční prvky proteinové povahy patří protilátky (viz kap. 2.4).

Optické metody detekce (viz kap. 2.1) se používají nejenom v technologii DNA čipů, ale taktéž pro identifikaci předem označených proteinů. Vazbu analytů na jednotlivé spoty lze prokázat pomocí automatických skenerů nebo CCD (Charge-Coupled Device) kamer. V případě proteinových čipů, které slouží k analýze nových proteinů (např. proteinů s diagnostickým potenciálem) je k detekci využívána především hmotnostní spektrometrie s desorpční ionizací vzorku (SELDI, viz kap. 2.2). Výhodou DNA čipů oproti proteinovým čipům je možnost amplifikace detektovaných molekul pomocí PCR (viz kap. 3.2), resp. vytvoření knihovny cDNA v případě analýzy mRNA. Ve výzkumně zaměřených klinických laboratořích jsou využívány především DNA čipové platformy, které slouží k analýze transkriptomu nebo ke genomovým analýzám (genotypizace). Technologie proteinových čipů mají v klinické medicíně zatím omezené využití (viz kap. 2.4).

### 2.3.4 Využití DNA čipových platform v experimentální a klinické medicíně

Přes rychlý rozvoj čipových technologií se jejich současné využití do značné míry omezuje na experimentální a **translační výzkum**<sup>56</sup>. Existuje několik pilotních platform, které se svým charakterem blíží diagnostice konkrétních pacientů. V našich zemích se v rutinním provozu zatím nevyužívají – pokud jde o aplikace klinické, překrývají se obvykle s aplikacemi experimentálními. Častá je analýza genové exprese na úrovni celého transkriptomu, a to nejenom v rámci humánního, ale i extrahumánního genomu. Dalším formátem jsou CGH čipy (comparative genome hybridization), které umožňují genotypizaci a analýzu CNV (copy number variations), často ve spojení s analýzou SNP (single nucleotide polymorphism) na úrovni celého genomu. Další možností využití je celogenomová analýza epigenetických<sup>57</sup> změn (metylace, acetylace aj.). Vybrané aplikace DNA čipů lze najít v tab. 5.

- **Molekulární podstata nemoci.** DNA čipy se v posledních letech uplatnily zejména při studiu zhoubných novotvarů, a to s cílem identifikovat geny, signální dráhy a jejich alterace, které jsou zodpovědné za vznik a progresi choroby. Změny v genové expresi nebo SNP mohou být následně využity jako biomarkery k časné

56 Synonymem je „translační medicína“. Jde o moderní koncepci v biomedicinském výzkumu zdůrazňující těsnější propojení laboratorního komplementu (obvykle zaměřeného na molekulární biologii) a klinické praxe. Vychází ze složitosti podstaty a výsledků výzkumu, které je nutno klinickým lékařům „překládat“.

57 Epigenetické změny jsou změny v genové expresi, které nejsou způsobeny změnou nukleotidové sekvence DNA. Mohou být děděny (při mitóze i při meióze). Genom včetně epigenetických změn se nazývá epigenom.

diagnostice nebo detekci progresu onemocnění. Identifikované geny mohou být také cílem pro vývoj nových specifických léčiv, nebo mohou sloužit jako prediktory odpovědi na léčbu.

- **Molekulární klasifikace nemocí.** DNA čipové analýzy umožnily rozpoznat nové podskupiny onemocnění (např. u karcinomu prsu nebo některých hematologických malignit), jejichž nositelé se liší prognózou anebo léčebnou odpovědí včetně rizika recurence, tj. opětovného objevení nemoci po léčbě. Na základě detekce genových amplifikací, delecí, balancovaných translokací a CNV lze lépe a rychleji individualizovat léčbu pacienta, což přispívá k naplnění konceptu tzv. **personalizované medicíny**<sup>58</sup>.
- **Vývoj léčiv.** DNA čipy jsou zapojeny do všech fází vývoje nových léčiv – od identifikace potenciálních cílů, přes validace jednotlivých vývojových stupňů, až po zavedení prediktivních biomarkerů.
- **Analýza patogenů.** Čipové technologie pomáhají blíže charakterizovat vyvolavatele závažných infekčních onemocnění, např. malárie. Jedná se o určení virulence daného mikroba (čili jeho schopnosti vyvolat onemocnění, resp. usmrtit hostitele) či jeho rezistence na léčbu. Takto lze rozpoznat slabá místa v biologii infekčního agens a vyvinout proti němu specifická léčiva.

Obrovský pokrok zaznamenaný v posledních letech v technologické oblasti DNA čipů (miniaturizace, nové metody imobilizace a úpravy pracovních povrchů a rutinně používaná metoda syntézy DNA oligonukleotidů) umožnil vznik rychlého a relativně levného způsobu analýzy celého genomu. Značný potenciál k dalšímu rozvoji představují nové inženýrské obory mechaniky tekutin, jako je mikrofluidika či nanofluidika, která se zabývá prouděním kapalin v zařízeních s velmi malými rozměry. V současné době je možné vytvořit tisíce spotů na povrchu 1 cm<sup>2</sup> a pomocí automatizovaných systémů dávkovat nanolitrové vzorky. Z těchto důvodů se pozornost zaměřuje i na rozvoj datových analýz a robustních statistických metod, které usnadní klinicky relevantní interpretaci získaných dat. Přestože probíhají intenzivní diskuse nad etickými principy zacházení s těmito citlivými daty, lze předpokládat, že nové aplikace brzy povedou k masivnějšímu uplatnění biosenzorů a čipů nejenom v experimentálním a translačním výzkumu, ale i v klinické medicíně.

## Literatura

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3; 403 (6769): 503–511.
- Eggins BR. *Chemical sensors and biosensors*. John Wiley and Sons, 2002. p. 202.
- Eicher D, Merten CA. Microfluidic devices for diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011 June; 11 (5): 505–519.
- Gil EdS, Melo GRd. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. *Braz. J. Pharm. Sci*. 2010 Sep; 46 (3): 375–391.

58 Jde o optimalizaci diagnostických a léčebných postupů pro konkrétního pacienta s využitím moderních metod informatiky. Přístup je uváděn v kontrastu s tradičním „statistickým“ pojetím medicíny.

- Le Roch KG, Zhou Y, Blair PL, et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*. 2003 Sep 12;301 (5639): 1503–1508. Epub 2003 Jul 31.
- Mascini M, Tombelli S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. *Biomarkers*. 2008 Nov; 13 (7): 637–657.
- Mazura I. Nové technologie v DNA diagnostice. In: Speciální metody molekulární biologie. Karolinum. Praha, 2001. p. 89–101.
- McGarraugh G. The chemistry of commercial continuous glucose monitors. *Diabetes Technol Ther*. 2009 June; 11 (Suppl 1): 17–24.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17; 406 (6797): 747–752.
- Russell S, Meadows LA, Russell RR. *Microarray Technology in Practice*. Elsevier 2009.
- Sato S, Murata A, Shirakawa T, Uesugi M. Biochemical target isolation for novices: affinity-based strategies. *Chem Biol*. 2010 June 25; 17 (6): 616–623.
- Šmarda J. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno, 2005. p. 188.
- Vacek J, Havran L, Fojta M. Electrochemical Analysis of DNA Damage, Hybridization and Interactions. *Chem. Listy*. 2011; 105: 15–26.
- Vacek J, Masařík M, Paleček E, Fojta M. Elektrochemické metody v analýze nukleových kyselin a bílkovin. *Čs. Čas. Fyz*. 2006; 56: 293–304.
- Vacek J. Hmotnostní spektrometrie intaktních tkání a její využití v diagnostice. *Klin. Biochem. Metab*. 2006; 14: 194–195.
- Vacek J. Proteinové čipy v moderní klinické biochemii. *Klin. Biochem. Metab*. 2006; 14 (35): 25–30.
- Yun YH, Eteshola E, Bhattacharya A, Dong Z, Shim JS, Conforti L, Kim D, Schulz MJ, Ahn CH, Watts N. Tiny Medicine: Nanomaterial-Based Biosensors. *Sensors*. 2009; 9 (11): 9275–9299.

### Otázky k přípravě

1. Jaký je rozdíl mezi (bio)senzorem a čipem?
2. Popište aplikace čipových technologií v klinické praxi.
3. Jaká je funkce aptameru?
4. Jaké uplatnění nachází hmotnostní spektrometrie při čipové analýze?
5. Vysvětlete, jak funguje glukózový senzor.

## 2.4 Imunoanalýza

N. Cibiček, Z. Heřmanová

Imunoanalýza je podmnožinou ligandové analýzy, která pracuje s pojmy **ligand** (zde antigen) a **vazebný reagent**, čili látka, která ligand váže (zde protilátka). Imunoanalytické metody jsou založené na imunochemickém principu – na interakci antigenu a protilátky s tvorbou **imunokomplexu**. Mezi imunoanalytické metody řadíme všechny způsoby detekce a stanovení látek ve vzorcích založené na vizualizaci nebo kvantifikaci

vzniklého imunokomplexu. Předností kvantitativních metod je jejich citlivost dovolující stanovovat látky v koncentracích v řádu  $\text{nmol.l}^{-1}$  až  $\text{fmol.l}^{-1}$ , zpravidla bez předchozí úpravy vzorků. Moderní metody jsou automatizovatelné a umožňují stanovovat celé spektrum analytů, jež zahrnuje jak makromolekuly, tak malé molekuly; od látek tělu vlastních, přes infekční agens, až po farmaka, resp. látky toxické. Z těchto důvodů našly imunoanalytické metody využití prakticky ve všech laboratořích komplementu.

### 2.4.1 Diagnostické protilátky

**Polyklonální protilátky** využívané v imunoanalýzách se běžně získávají ze séra různých druhů zvířat (např. myš, králík, kráva, opice). V organismu je tvoří různé klony aktivovaných B-lymfocytů v rámci odpovědi na podání kompletního antigenu, neboli **imunogenu** (imunizace). Imunogen kromě vazebných míst pro protilátky (tj. **antigenních determinant** neboli **epitopů**), jejichž tvorbu vyvolal, obsahuje i makromolekulární nosič. Nosič chybí u nekompletního (nízkomolekulárního) antigenu, neboli **haptenu**, který sice s protilátkou interaguje, její tvorbu však nevyvolá. Polyklonální protilátky jsou směsí protilátek namířených proti různým epitopům antigenu. V imunoanalýzách snižují specifčnost stanovení a vyžadují promývací kroky.

Pokud je *in vitro* vyselektován jeden klon plazmocytů<sup>59</sup> získaných ze sleziny imunizovaného zvířete a immortalizovaných fúzí s myelomem<sup>60</sup>, tj. **hybridom**, dojde ke tvorbě **monoklonálních protilátek**. Příprava monoklonálních protilátek je nákladnější, tyto protilátky však poskytují vyšší specifcitu nežli protilátky polyklonální. Novějším přístupem k výrobě monoklonálních protilátek jsou rekombinantní biotechnologie, které immortalizaci plazmocytů nevyžadují.

### 2.4.2 Dělení imunoanalytických metod

Imunoanalytické metody lze dělit z mnoha aspektů. Některé z nich popíšeme níže.

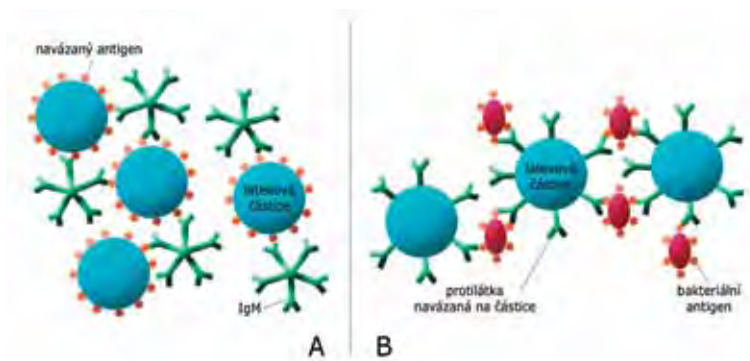
- Dle **přítomnosti a druhu použité značky** (indikátoru), která usnadní monitorování imunochemické reakce. Rozlišujeme skupinu bez značení a skupinu, která indikátory využívá. V prvním případě se při analýze produktu (antigen-protilátka) uplatňují dva procesy: jednak vznik nerozpustného konglomerátu imunokomplexů (precipitátu) z původně rozpuštěného antigenu a protilátky (**precipitace**) a jednak shlukování původně nerozpustných mikroskopických částic s obsahem povrchových antigenů (aglutinogenů) pomocí rozpuštěných protilátek (aglutininů) za vzniku makroskopicky hodnotitelného aglutinátu (**aglutinace**).

Specifickým značením antigenu nebo protilátky se vytvoří tzv. **konjugát**. Metody využívající indikátory se dělí dle druhu indikátorů, kterými mohou být radioizotopy, enzymy, látky, které vykazují luminiscenci, latexové částice, molekuly schopné tvořit volné radikály a viry.

59 Jeden epitop antigenu stimuluje dělení jednoho klonu plazmocytů (aktivovaných B-lymfocytů).

60 Myelom je nádor, tj. neregulovatelně se množící klon plazmocytů.





**Obr. 17** Schéma nepřímé metody (tzv. latex–fixační test). Pozitivita testu na protilátky (aglutininy, IgM), vede k aglutinaci latexových částic s povrchovým antigenem (A). Jinou variantou je vyšetření přítomnosti bakteriálního antigenu pomocí aglutinace partikul s navázanou diagnostickou protilátkou (B).

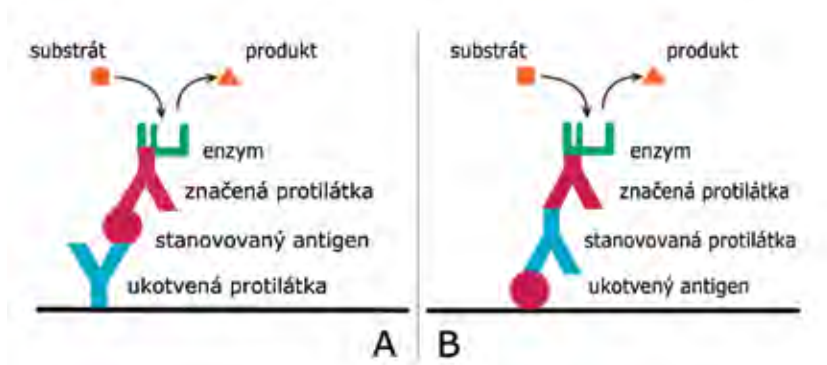
- Imunochemické metody lze dělit na **přímé** a **nepřímé**, a to ze dvou hledisek. Jestliže je za vizualizaci reakce zodpovědný makromolekulární nosič (aglutinace), je kritériem dělení jeho přítomnost v odebraném vzorku. U přímých metod je analyt součástí nosiče (erytrocytu<sup>61</sup> nebo bakterie), který je přirozeně obsažen v analyzovaném vzorku. U nepřímých metod nosič (erytrocyt, polystyrénová nebo latexová částice) ve vzorku chybí a musí proto být do reakční směsi přidán uměle (obr. 17).

Dle jiné definice se na přímé a nepřímé metody pohlíží odlišně. V první variantě se konjugát váže přímo na detekovaný antigen, který je součástí pevné fáze, resp. je na ni fixován. Pevnou fází je plast jamek mikrotitrační destičky, magnetické nebo latexové mikročástice, popř. tkáň. Ve druhé variantě (nepřímý test) se na antigen váže nejdříve primární nebo stanovovaná neznačená protilátka a až posléze dochází k vazbě konjugátu na tuto protilátku. Značená je tedy protilátka sekundární (schéma je identické s obr. 18B). Smysl nepřímého testu spočívá ve zvýšení citlivosti detekce. Kromě přímého a nepřímého testu se rozlišuje i **sendvičový test**. Název vyplývá z přítomnosti dvou odlišných protilátek namířených proti dvěma vzdáleným epitopům téhož antigenu (obr. 18A). Jedna z protilátek je neznačená. Svým  $F_c$  fragmentem je imobilizovaná („ukotvená“) na pevné fázi. Označuje se jako „vychytávací“ (z angl. „capture“) protilátka. Druhá, tzv. signální protilátka, je značená indikátorem.

- Dle **nutnosti separace volné a vázané frakce indikátoru**. Pokud se po vzniku imunokomplexu vlastnosti signálu nemění, je před měřením nutné obě frakce od sebe oddělit (**heterogenní metody**). Po fixaci částic na stěny zkumavky lze volné frakce odstranit aspirací–vysátím, nebo dekantací–vylitím. **Homogenní metody** změny signálu po vzniku imunokomplexu využívají, a proto separační krok nevyžadují.

61 V případě erytrocytů mluvíme o hemaglutinaci.





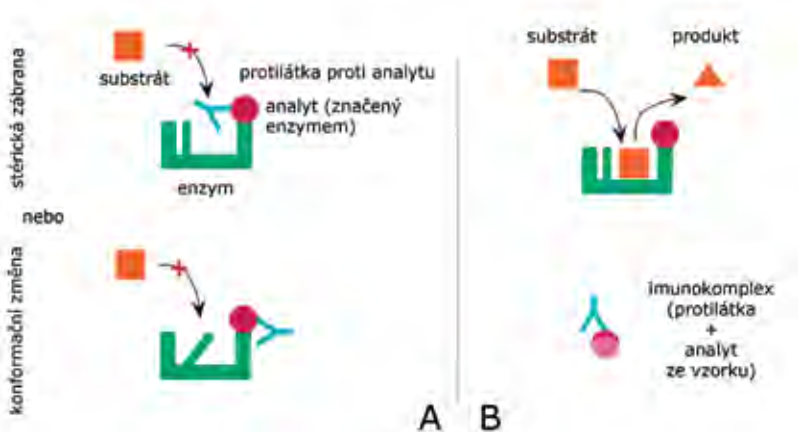
**Obr. 18** Nekompetitivní (imunometrická) analýza. Sendvičový test je založený na interakci dvou protilátek s dvěma odlišnými epitopy stanoveného antigenu (A). Varianta analýzy pro stanovení protilátek vyžaduje imobilizaci antigenu (B). Značení protilátky může být různé.

- Dle **základního metodického principu**. Vazba antigenu a protilátky může probíhat buď bez soutěžení o vazebné místo (nekompetitivně), anebo kompetitivně. U **nekompetitivních metod** interaguje jeden epitop pouze s jednou (značenou) protilátkou, která je v nadbytku. Signál je přímo úměrný koncentraci analytu. Synonymem je tzv. **imunometrická analýza**. Lze jí využít jak pro stanovení antigenů (technika s imobilizovanou protilátkou, obr. 18A), tak protilátek (technika s imobilizovaným antigenem, obr. 18B).

U **kompetitivních metod** se o jeden epitop uchází buď značená a neznačená protilátka, anebo se o jednu protilátku uchází značený a neznačený antigen. Signál bývá nepřímo úměrný koncentraci analytu. Výjimkou je kompetitivní imunoanalýza v homogenním prostředí, kdy je signál získáván nikoliv ze značeného imunokomplexu, ale z volného značeného ligandu (obr. 19).

- Dle **počtu kroků**. Kompetitivní metody se dělí na **jednokrokové**, čili simultánní (tzv. rovnovážné saturační metody) a **dvoukrokové** (tzv. sekvenční saturační metody). V prvním případě je k neznačenému analytu ve vzorku přidána diagnostická protilátka a značený analyt najednou. Ve druhém případě dochází nejdříve k vyvázání neznačeného analytu nadbytkem protilátky a poté k interakci volných molekul protilátky s analytem značeným, což vede k zvýšení citlivosti stanovení.
- Dle historického vývoje rozeznáváme čtyři generace metod<sup>62</sup>.

62 Metody I. generace jsou založené na precipitačních, aglutinačních a komplement-fixačních reakcích v roztoku. Jsou manuální, zdlouhavé a kvalitativní až semikvantitativní. Metody II. generace jsou kvantitativní, ale často manuální a obtížně hodnotitelné. Jde o imunodifúzní a imunoelktroforetické techniky v gelu. Metody III. generace jsou vysoce citlivé. Slouží ke stanovení antigenů, haptenu i protilátek. Využívají specifického značení, jsou plně automatizované. Metody IV. generace jsou účinná kontinuálně měřící zařízení na bázi imunosenzorů.



**Obr. 19** Homogenní formát kompetitivní metody. Stanovovaný analyt ze vzorku soutěží s analytem značeným. Separace frakcí indikátoru není vyžadována. Pokud je koncentrace analytu ve vzorku nízká, mohou molekuly diagnostické protilátky interagovat se značeným analytem a snížit tak aktivitu enzymu (A). Pokud je analyt ve vzorku koncentrovaný, protilátka vyváže a enzym zůstane aktivní (B). Odpověď metody je proto přímo úměrná koncentraci analytu.

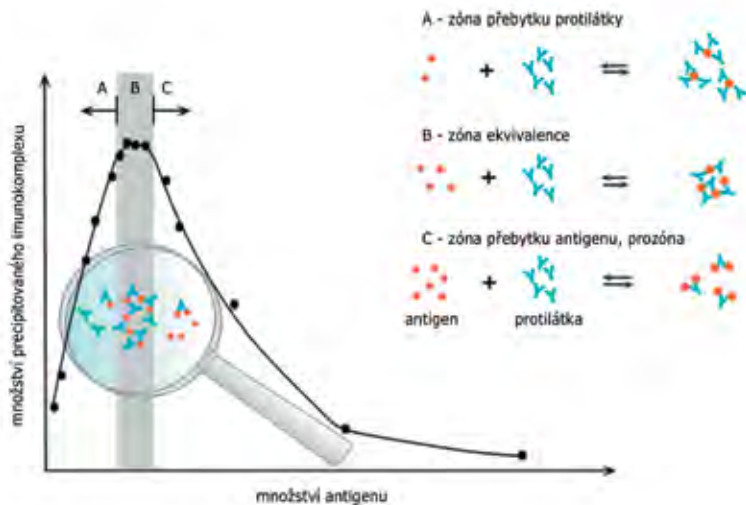
### 2.4.3 Limitace imunoanalytických metod

Při vysoké senzitivě a specifčnosti poskytují moderní automatické analyzátoři rychlé stanovení látek. Interakce mezi antigenem a protilátkou přesto může být ovlivněna interferujícími látkami (**interferenty**), a může vést k falešně nízkým, nebo vysokým hodnotám<sup>63</sup>.

- Příkladem interference samotného analytu je **„hook“ efekt** (z angl. slova s významem „háček“, které popisuje typický tvar precipitační křivky, obr. 20). Přesycení reakční směsi antigenem vede ke tvorbě imunokomplexů antigen–protilátka, resp. antigen–konjugát, čímž omezí tvorbu „sendvičů“ protilátka–antigen–konjugát tvořících signál.
- Pokud protilátka interaguje s antigenem, který její tvorbu nevyvolal, mluvíme o **zkřížené reakci**. Zdrojem interference může v tomto případě být přítomnost **autoprotilátek** (namířených proti vlastním strukturám), nebo **heterofilních protilátek**, které vznikají po expozici imunogenům z jiných živočišných druhů. Po kontaktu s myší se mohou tvořit **HAMA** protilátky (Human Anti-Mouse Antibodies), které interakcí s myšími diagnostickými protilátkami vedou ke změně výsledku<sup>64</sup>. K podezření na interferenci může vést inkonzistence výsledku s dalšími laboratorními testy a/nebo s klinickým stavem pacienta. Verifikaci lze provést ředěním vzorku nebo přidáním anti-heterofilní protilátky.

63 Zde má pojem „interference“ obecnější a pouze negativní význam (srov. obr. 11 v kap. 2.1).

64 U sendvičové analýzy může HAMA imitovat antigen, přemostit obě diagnostické protilátky a vést tak ke tvorbě alternativního sendviče – zdroje falešného signálu. Naopak po vazbě HAMA na imobilizovanou protilátku nebo výhradně na konjugát je tvorba „sendviče“ protilátka–analyt–konjugát omezena, což velikost signálu snižuje.



**Obr. 20** Heidelberger-Kendallova precipitační křivka popisující závislost tvorby imunokomplexu na množství antigenu ve vzorku (při konstantním množství protilátky). Ke stanovení koncentrace antigenu lze použít pouze zónu přebytku protilátky, která zajistí linearitu odpovědi. Zóna přebytku antigenu deformuje křivku do tvaru háku, který vysvětluje falešné snížení hodnot („fenomén prozóny“).

- Závislost výsledků měření na použité metodě, přístroji a diagnostické soupravě, čili na sadě chemikálií obsahující reagentie, standardní roztoky a kontrolní vzorky (tzv. „kitu“), je v laboratorní diagnostice obecným pravidlem. Pro imunochemické metody však platí dvojnásob. Podstatou nesrovnatelnosti imunochemických metod je zejména různost reagenčních protilátek využívaných výrobcí kitů. V praxi nastávají situace, kdy výsledek jedné laboratoře svědčí pro patologii, zatímco druhá laboratoř stejnou číselnou hodnotu považuje za normální. Dosažení standardizace je u těchto metod málo pravděpodobné – série vyšetření a interpretace výsledků lze proto provádět jen v rámci jednoho pracoviště.

## 2.4.4 Imunoanalytické metody a jejich aplikace

Mezi historické metody řadíme neutralizační reakce, jednoduché precipitační metody, imunodifúzní metody a elektroimunodifúzi. Jejich klinický význam je dnes minimální.

### 2.4.4.1 Aglutinační metody

Aglutinační metody probíhají ve vodné fázi. Hodnotí se na papíře, podložném sklíčku, nebo v mikrotitračních jamkách. Jsou kvalitativní až semikvantitativní a slouží k průkazu antigenů i protilátek. Příkladem je vyšetření kompatibility dárcovské erytrocytární masy před její transfúzí u lůžka pacienta (**malá křížová zkouška**) nebo **Coombsovy testy**. Přímý Coombsův test je určen k průkazu antierytrocytárních autoprotílátek navázaných

na povrchu krvinek pacienta. Po přidání Coombsova činidla<sup>65</sup> dojde k provázání buněk a vizuálně hodnotitelné hemaglutinaci. Nepřímá varianta testuje přítomnost rozpuštěných protilátek. Po inkubaci séra s erytrocyty zdravého dárce<sup>66</sup> se přidá Coombsovo činidlo. Pozitivita se projeví aglutinací dárcovských erytrocytů. Mezi další aplikace patří sérotypizace a stanovení titrů protilátek proti některým mikrobům. Pomocí série ředění séra se posuzuje, při jak velkém dilučním poměru ještě došlo k tvorbě aglutinátu – čím větší bylo ředění, tím vyšší je **titr protilátky**. Nedostatkem aglutinačních metod je omezené spektrum vyšetřovaných protilátek a možnost paradoxní tvorby aglutinátu jen ve zředěném vzorku, kdy při přítomnosti tzv. blokuujících protilátek dochází ke snížení jejich interferujícího vlivu.

#### 2.4.4.2 Metody založené na aktivaci komplementu

Tyto metody využívají přítomnosti komplementu (tj. glykoproteinové humorální složky nespecifické imunity) v séru v neaktivní formě a také jeho schopnosti narušovat erytrocyty poté, co se fixuje na buněčnou membránu. Takto lze hodnotit účinnost jednotlivých cest aktivace komplementu<sup>67</sup>, resp. detektovat antigeny a protilátky. Stanovení aktivity komplementu se provádí inkubací ovčích erytrocytů s navázanými protilátkami IgG se sérem. Vzniklá hemolýza se hodnotí v čase. Pro stanovení specifické protilátky pomocí **komplement-fixačního testu** se vyšetřované sérum inkubuje s antigenem v přítomnosti komplementu. Poté je přidána zmíněná suspenze ovčích erytrocytů. Vznik hemolýzy svědčí pro absenci vyšetřovaných protilátek, protože nedošlo k tvorbě imunokomplexů, které by komplement vyvázaly (fixovaly).

#### 2.4.4.3 Imunonefelometrie a imunoturbidimetrie

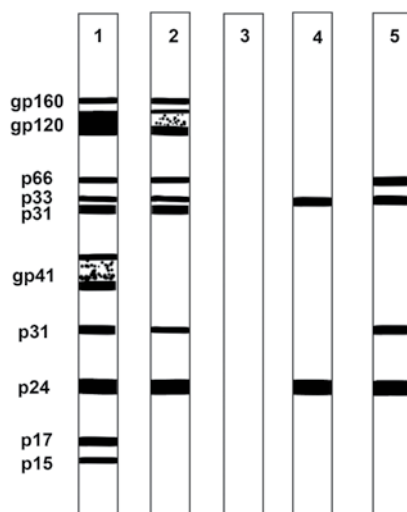
Jde o optické metody (viz kap. 2.1) využívající změnu vlastností roztoku při přeměně rozpuštěných částic na suspenzi imunoprecipitátů. Spektrum analytů zahrnuje především plazmatické proteiny, jako jsou imunoglobuliny, jejich třídy a konstituční součásti imunoglobulinů nebo koagulační faktory a řadu dalších látek, například léčiva. Pomocí nefelometrie lze vyhledávat a diagnostikovat onemocnění, jako jsou imunodeficiency nebo abnormality tvorby imunoglobulinů a monitorovat průběh jejich léčby. Zde je přínosná například imunonefelometrická analýza sérových volných lehkých řetězců imunoglobulinů (serum Free Light Chain analysis, sFLC), jež se vyznačuje řádově nižším detekčním limitem (kolem 1 mg.l<sup>-1</sup>) než má sérová imunofixační elektroforéza (viz níže). Limitace metod vyplývá z faktu, že rozptyl světla nezávisí jen na koncentraci analytu, ale i na velikosti částic imunoprecipitátu a efektu matrice (viz kap. 2.1) obsahující např. chylomikrony. Zdrojem zkřížené reakce a interference může být zejména použití nedostatečně specifického antiséra.

65 Coombsovo činidlo je antisérum obsahující antihumánní protilátky.

66 Erytrocyty zdravého dárce obsahují povrchové antigeny, proti kterým mají být protilátky pacienta namířeny.

67 K aktivaci a fixaci komplementu dochází klasickou, alternativní nebo lektinovou cestou. Klasicky je proces závislý na vazbě komplementu s imunokomplexem. Alternativní ani lektinová cesta na této vazbě závislé nejsou.

**Ob. 21** Použití imunoblottingu u detekce protilátek proti viru HIV-1. Proužek č. 1 představuje pozitivní kontrolu se standardy proteinů (p), resp. glykoproteinů (gp); proužek č. 2 představuje slabou, ale jistou pozitivitu; proužek č. 3 je negativní kontrola. Proužky č. 4 a 5 jsou výsledky vyšetření dvou pacientů – infekci u nich nelze jednoznačně prokázat, i když u druhého pacienta (č. 5) je pravděpodobnější.



#### 2.4.4.4 Imunoelektroforetické techniky

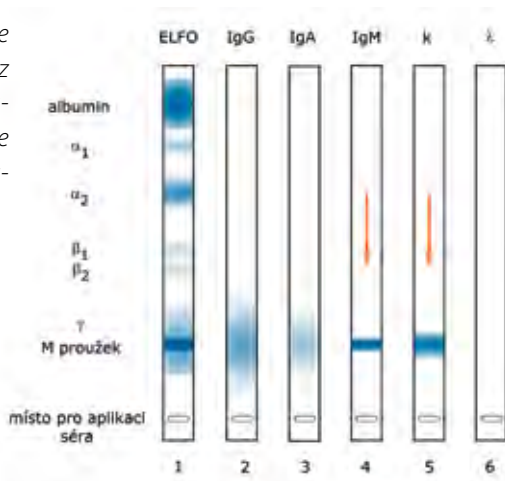
Techniky jsou založené na elektromigraci analytů v gelu a interakci antigenů a protilátek, sloužící k fixaci a identifikaci separovaných látek (viz kap. 3.4). V diagnostické praxi se využívají zejména metody kvalitativní – imunoblotting a imunofixace. **Imunoblotting** je technika založená na přenosu proteinů z gelu na membránu (Western blotting). Molekuly mají při navázání laurylsíranu sodného (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) záporný náboj a v gelu se dělí do zón dle molekulové hmotnosti. K (přímému nebo nepřímému) průkazu přenesených proteinů slouží enzymem značené protilátky. Jedná-li se o analýzu protilátek, je membrána se známým spektrem antigenů inkubována se sérem pacienta. Poté je aplikován konjugát (antihumánní globulin). Pozitivita odpovědi, tj. vznik barevných zón po přidání substrátu, značí přítomnost protilátek proti danému antigenu. Interpretace závisí na zhodnocení intenzity a počtu pásů. Imunoblotting slouží k ověření přítomnosti a specifčnosti protilátek proti infekčním agens (obr. 18B a 21).

**Imunofixace** (imunofixační elektroforéza) je založena na elektroforetickém rozdělení vzorku a následné aplikaci protilátek, která vede ke tvorbě imunokomplexů. Ty zůstávají „fixované“ v gelu i při promývání, které odstraní všechny neprecipitované molekuly. Imunofixované látky se barevně vizualizují a hodnotí. Metoda je využívána ke stanovení a typizaci monoklonálních imunoglobulinů a jejich frakcí v séru a/nebo moči<sup>68</sup>. Má význam především v diagnostice a sledování pacientů s hematologickými malignitami<sup>69</sup>. Využití protilátek proti třem nejčastěji se vyskytujícím těžkým řetězcům anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, a proti dvěma typům lehkých řetězců anti-kappa a anti-lambda umožňuje diagnostické určení typu kompletní molekuly postiženého imuno-

68 Jde o typizaci tzv. paraproteinů neboli M-komponenty popsané v elektroforeogramu.

69 Oproti klasické elektroforéze jde o metodu s desetinásobně vyšší senzitivitou (150–500 mg.l<sup>-1</sup> vs. cca. 1–3 g.l<sup>-1</sup>).

**Obr. 22** Imunofixace. Proužek č. 1 je elektroforeogram (ELFO) séra. Nález monoklonální komponenty (M proužek) vedl k provedení imunofixace (proužky č. 2–6), která prokázala paraprotein třídy IgM kappa (šipky).



globulinu. Relativní nevýhodou metody je kvalitativní charakter, pracnost provedení a jistá míra subjektivity při hodnocení intenzity a počtu zón (obr. 22).

#### 2.4.4.5 Imunoanalýzy se značenými reaktanty

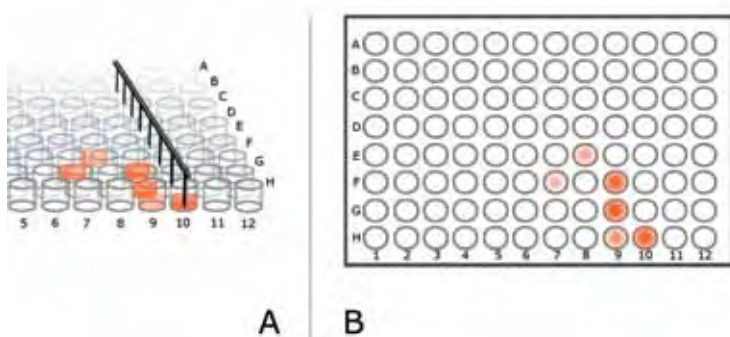
Jsou rychlé, citlivé, plně automatizované a cenově dostupné. Detekční limity se běžně pohybují v řádech mg až pg.l<sup>-1</sup>. Jde o metody radioimunoanalytické (izotopové), enzymové, fluorescenční a (v poslední době díky citlivosti stále častěji) luminiscenční.

#### Radioimunoanalytické (izotopové) metody

Jde o heterogenní analýzy využívající v rutinních medicínských aplikacích zejména **gama zářiče** (<sup>125</sup>I, <sup>57</sup>Co a další), výzkumně také **beta zářiče** (především <sup>3</sup>H a <sup>14</sup>C). Výhodou gama záření je pronikavost – snadno prochází stěnou zkumavky, takže vzorek nevyžaduje zvláštní úpravu. Značení těžkým radionuklidem však mění hmotnost molekuly a její vlastnosti. Navíc, poločas rozpadu se udává ve dnech. Pro měření se používají automatizované krystalové **gama-počítače**. Výhodou beta záření je větší bezpečnost při práci, delší poločas rozpadu látky (léta) a malý vliv na značené molekuly. Nevýhodou je nutnost příměsi scintilátorů<sup>70</sup>, které umožní v **scintilačních počítačích** detekci signálu pomocí fotonásobiče (viz kap. 2.1 a 2.5).

V metodě **RIA** (radioimunoanalýza, RadiolmmunoAssay) soutěží značený a neznačený antigen o omezené množství neznačené protilátky. Nekompetitivní, sendvičová metoda **IRMA** (imunoradiometrie, ImmunoRadioMetric Assay) využívá ke stanovení antigenu značenou protilátku. Ta se přidává v nadbytku po interakci antigenu s neznačenou protilátkou adsorbovanou na pevnou fázi (obr. 18A). Sendvičová metoda je citlivější a specifitější. RIA a IRMA se uplatnili jako první imunochemické diagnostické metody využívající gama záření. Lze je využít ke stanovení hormonů, léčiv, biomarkerů, vitaminů, koagulačních faktorů a (auto)protilátek. Z důvodu radiační zátěže, ceny

<sup>70</sup> Scintilátor je organická látka obsahující aromatická jádra schopná po excitaci beta zářením emitovat fotony.



**Obr. 23** ELISA. Procesy aplikace konjugátu, substrátu, promývání a odsávání mohou být automatizovány (A). Přítomnost analytu se projeví zbarvením roztoku v jamce mikrotitrační destičky (B).

a nestálosti radioizotopů, a také již překonané citlivosti popularita těchto metod v laboratorní diagnostice poklesla.

### Enzymová imunoanalýza (EIA, Enzyme ImmunoAssay)

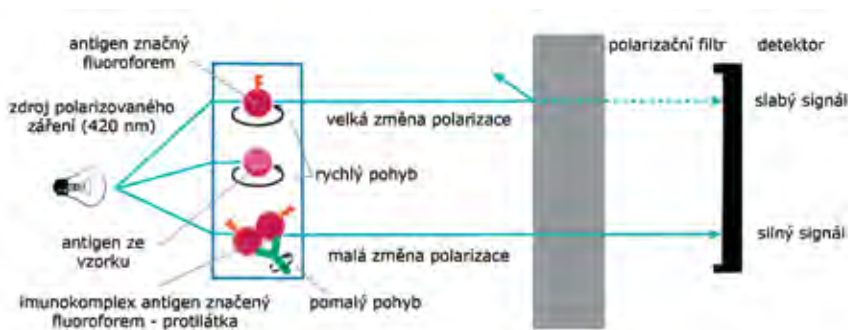
Metody EIA využívají kovalentní vazby enzymu na antigen nebo protilátku. Dle produktu je k měření využívána kolorimetrie (fotometrie), luminiscence, fluorimetrie, nebo nefelometrie<sup>71</sup>. Mezi **homogenní** EIA patří kompetitivní metoda **EMIT** (Enzyme-Multiplied ImmunoAssay, viz obr. 19). Ke značení nejčastěji využívá glukózo-6-fosfát dehydrogenázu. Odpověď je přímo úměrná koncentraci analytu. Používaná je vzácněji. Metody enzymové imunoanalýzy na pevné fázi, **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), jsou **heterogenní**. Jak název napovídá, využívají vazbu reaktantu na pevnou fázi. Indikátorem je obvykle křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. V kompetitivním provedení se o imobilizovanou monoklonální protilátku uchází značený antigen a neznačený analyt. Po přidání substrátu se měří intenzita signálu, která je nepřímo úměrná koncentraci analytu. Nekompetitivní uspořádání závisí na charakteru analytu. Stanovuje-li se antigen, jde o sendvičový test s protilátkou fixovanou na pevné fázi (obr. 18A). V případě stanovení protilátky je ukotven antigen (obr. 18B). Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci analytu (obr. 23) a lze ji dále zvýšit aplikací (strept)avidinu a biotinu (viz dále). Využití metod ELISA je obdobné, jako u metod izotopových. Na rozdíl od nich jsou však metody ELISA „zlatým standardem“ měření jednotlivých proteinů.

### Luminiscenční imunoanalýza a fluorescenční imunoanalýza

Přestože jsou oba typy analýz založené na luminiscenci, liší se zdrojem excitace (reakční teplo vs. foton). To má za následek jak jednodušší složení analyzátorů založených na chemiluminiscenci, tak obecně vyšší citlivost chemiluminiscenčních metod ve srovnání s metodami fotoluminiscenčními (viz kap. 2.1). Z těchto důvodů jsou metody uváděny odděleně. V **luminoimunoanalýze (LIA, LuminImmunoAssay)** je luminofor využit

71 Měří se buď rychlost úbytku substrátu anebo nárůst koncentrace produktu.





**Obr. 24** FPIA. Fluorofor je excitován polarizovaným monochromatickým světlem. Je-li fluorofor součástí malé, rychle rotující molekuly antigenu, emituje světlo s větší mírou stočení polarizace (detekce slabého signálu). V případě vzniku pomaleji rotujícího imunokomplexu se směr polarizace změní jen málo (silný signál).

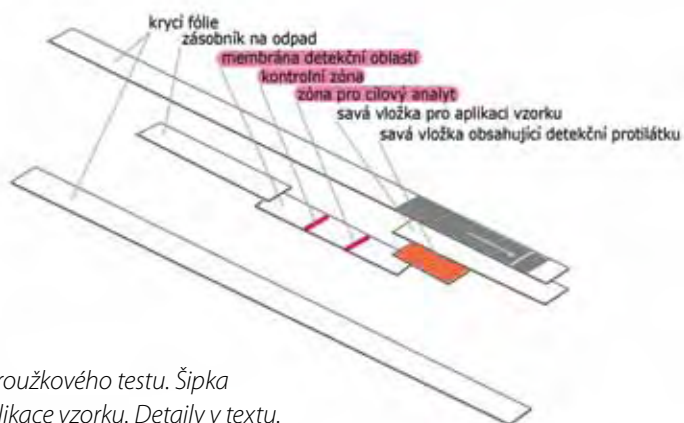
jakožto indikátor kovalentně vázaný s reaktantem v konjugátu. Metody **CLIA** (Chemiluminescent ImmunoAssay) a **ILMA** (ImmunoLuminoMetric Assay), jsou obdobou RIA a IRMA. Elektrochemiluminiscenční analýza (**ECLIA**, ElectroChemiluminescence ImmunoAssay) se vyznačuje nejenom využitím elektrického impulzu k oxidaci luminoforu na povrchu elektrody, ale i možností fixovat imunokomplexy k elektrodě pomocí magnetických kuliček. LIA je běžně využívána pro stanovení většiny látek vyžadujících imunoanalytický přístup.

U metod **fluorescenční imunoanalýzy (FIA, Fluorescence ImmunoAssay)** konjugát obsahuje fluorofor, běžně fluorescein. Vzhledem k potenciálně interferující fluorescenci pozadí<sup>72</sup> se jako fluorofory využívají i cheláty lantanoidů<sup>73</sup>, výhodou kterých je dlouhá fluorescence umožňující měření s odstupem desetin milisekund, tj. časově rozlišenou imunoanalýzu (**TR-FIA, Time-Resolved Fluorescence ImmunoAssay**). Výhodou heterogenních metod je dekantace supernatantu obsahujícího kromě nenavázaných reaktantů i interferenty. U metody **FPIA (Fluorescence Polarization ImmunoAssay)** jde o homogenní kompetitivní analýzu využívající značený antigen. Stanovují se jí malé molekuly. Odlišení nenavázaného značeného antigenu od značeného imunokomplexu je založeno na rozdílné rotaci molekul v roztoku. Rychle rotující malá značená molekula po ozáření emituje světlo, jehož vertikální polarizace je značně stočená vůči směru polarizace excitujícího záření (světlo se depolarizuje). Větší a pomaleji rotující molekula značeného imunokomplexu při emisi stáčí směr polarizace méně účinně (anizotropie fluorescence, viz kap. 2.1). Signál je nepřímo úměrný koncentraci analytu (obr. 24).

72 „Vnitřní“ fluorescence matrice se týká metaloporfyrinů (hemoglobinu), NAD(P)H, vitamínu A a bilirubinu.

73 Jde o  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  nebo  $\text{Sm}^{3+}$ .





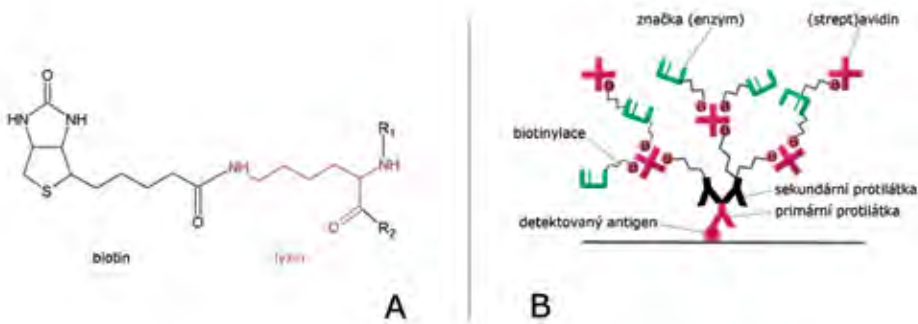
**Obr. 25** Schéma proužkového testu. Šipka ukazuje na místo aplikace vzorku. Detaily v textu.

#### 2.4.4.6 Plošná imunochromatografie

Jde o druh imunoafinitní chromatografie (viz kap. 3.5), tj. o modifikaci separačního procesu založeného na imobilizovaných protilátkách s funkcí stacionární fáze. Mobilní fází je vzorek obsahující vyšetřovaný analyt, který se na protilátkách zachytí. V klinice se využívají proužkové testy. Složení proužku ukazuje obr. 25. Po aplikaci se vzorek nasaje k detekční protilátce značené barevným latexem nebo koloidním zlatem. U analytu s více epitopy (např. lidský choriový gonadotropin) je vzniklý imunokomplex zachycen imobilizovanou protilátkou v zóně pro cílový analyt, kde je zodpovědný za vznik barevného proužku (nekompetitivní uspořádání, obr. 18A). Při stanovení haptenu (např. mykotoxin) je v membráně detekční oblasti imobilizovaný derivát analytu (kompetitivní uspořádání). Komplex analytu se značenou detekční protilátkou proto postupuje přes detekční zónu, což se projeví absencí barevné linie. Další, kontrolní zóna v případě kompetitivního i nekompetitivního uspořádání disponuje protilátkou proti detekční protilátce. Je-li test validní, vytváří se (druhá) barevná linie.

Simultánní detekce různých analytů je umožněna několika reakčními zónami nebo kombinací indikátorů. Dle způsobu vyšetření se proužek umístí do roztoku vzorku, anebo se vzorek aplikuje ve formě kapky do perforace v plastovém pouzdře. Hodnocení je většinou vizuální. Technika slouží pro orientační (zpravidla kvalitativní) vyšetření látek v terénu<sup>74</sup>, a to jak lékaři, tak laickou veřejností. Jde např. o hemoglobin ve stolici, lidský choriový gonadotropin (těhotenský test) a různé drogy v moči, nebo o C-reaktivní protein a kardiální markery v krvi. Proužky umožňují také rychlý záchyt kontaminantů, např. pesticidů, mykotoxinů nebo antibiotik v mléce.

<sup>74</sup> Řadí se tak mezi tzv. techniky POCT (Point Of Care Testing), tj. vyšetření v místě péče o pacienta.



**Obr. 26** Biotinylace proteinu (R<sub>1</sub> – lyzin – R<sub>2</sub>) na zbytku lyzinu (A). Schéma amplifikace signálu pomocí interakce (strept)avidin–biotin. Znáznorněn je jeden z mnoha přítomných antigenů (B).

#### 2.4.4.7 Využití interakce (strept)avidin–biotin v imunoanalýze

Jednou z funkcí biotinu<sup>75</sup> je vázat ve střevě avidin a bránit tak jeho absorpci<sup>76</sup>. Důvodů pro využití vazby (strept)avidin<sup>77</sup>–biotin je několik. Biotinylace látek (obr. 26A) je snadná a neovlivňuje jejich imunochemické vlastnosti. Z biotinu se tak stává indikátor namísto enzymu nebo luminoforu, které mohou tvořit obecně využitelný signál–generující konjugát se streptavidinem. Biotinylovaný antigen nebo protilátka se s takovým konjugátem pohotově asociuje.

Interakce (strept)avidin–biotin se využívá k amplifikaci signálu a ke zvýšení citlivosti imunoanalýz (obr. 26B). Konjugát se streptavidinem nahrazuje individualizované konjugační postupy pro protilátky, čím zjednodušuje vývoj nových imunochemických metod. Schopnost avidinu interagovat s biotinylovanými (proti)látkami rovněž usnadňuje jejich vazbu na pevnou fázi. Interakce avidin–biotin našla uplatnění v technikách ELISA, v afinitní chromatografii, v čipových platformách (viz kap. 2.3), v imunoblottingu, v průtokové cytometrii (viz kap. 3.6), či imunohistochemii<sup>78</sup>.

#### 2.4.4.8 Imunofluorescence

Imunofluorescence je založena na vizualizaci reakce antigen–protilátka pomocí fluorochromů<sup>79</sup>. **Přímá imunofluorescence** je jednostupňová metoda průkazu antigenů ve tkáni nebo sputu. Ke vzorku fixovanému na podložním sklíčku se přidá konjugát s fluorochromem. Přítomnost antigenu se projeví fluorescencí. **Nepřímá imunofluorescence** (dvoustupňová) se používá jako screeningová metoda průkazu autoproti-

75 Biotin je také známý pod pojmem vitamin H, vitamin B7 či koenzym R.

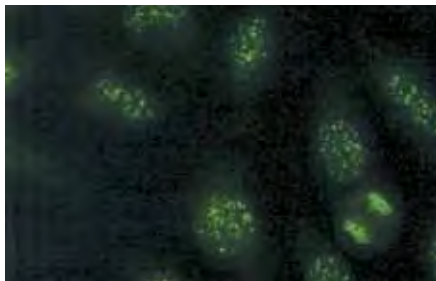
76 Avidin je protein vaječného bílku, který, pokud je v syrovém stavu vstřebán do cirkulace, má škodlivé účinky.

77 Streptavidin je protein bakterie *Streptomyces avidinii*. Má nižší tendenci k nespecifickým vazbám.

78 Jde o soubor histologických barvicích technik využívaných k charakterizaci tkání nebo buněčných populací.

79 Pojem fluorochrom se v biomedicínských vědách označuje chemická látka s vlastnostmi fluoroforu, jež slouží např. k barvení preparátů pro fluorescenční mikroskopii nebo pro značení buněk pro průtokovou cytometrii.

**Obr. 27** Průkaz anticentromerových protilátek (typ fluorescence ANA) na substrátu buněčné linie lidského nazofaryngeálního karcinomu (tzv. HEP2). Tento typ buněk nahradil dříve používané řezy potkaních jater. Jako fluorochrom byl využitý fluorescein, který má charakteristickou zelenou fluorescence. (zdroj: archiv autorů)



tek. K substrátu (kultura buněk, tkáňový řez) fixovanému na podložním sklíčku se přidá vyšetřovaný vzorek (sérum) a posléze konjugát s fluorochromem (obr. 18B). Pozitivita se ve fluorescenčním mikroskopu projeví u struktur exprimujících antigeny<sup>80</sup>, proti nimž jsou v séru přítomny protilátky. K indikacím patří podezření na autoimunitní poruchy, subfebrilie nejasné etiologie a plánovaná imunomodulační léčba. Protilátky ojedinele nacházíme i u zdravých, v postinfekčním období nebo po podání léků; u nemocných mohou v důsledku léčby vymizet. Interpretace proto vyžaduje zhodnocení všech údajů o nemocném. Příkladem vyšetření je detekce orgánově nespecifických antinukleárních (auto)protilátek (ANA) vykazujících různé typy fluorescence (obr. 27).

#### 2.4.4.9 Multiplexní imunoanalýza

Patří společně s hmotnostní spektrometrií (viz kap. 2.2) a některými separačními metodami (2D elektroforéza a chromatografie, viz kap. 3.4. a 3.5) k multiplexním technologiím, tj. analytickým postupům, jež se vyznačují možností současného stanovení mnoha analytů v tomtéž vzorku. Základní metodické principy vysokokapacitních imunochemických metod a spektrum detekčních principů se až na výjimky neliší od těch, které byly popsány výše. Nejčastěji se uplatňují nekompetitivní testy (obr. 18). Specifikem je složitější vyhodnocovací software. V multiplexní imunoanalýze rozlišujeme dvě hlavní uspořádání – **planární** a **suspenní**. První využívá technologie proteinových čipů a biosenzorů (viz kap. 2.3), druhé je založeno na polystyrénových nebo magnetických mikrokuličkách detektovaných pomocí průtokové cytometrie, přesněji fluorimetrie (viz kap. 3.6. a 2.1). Výhodou planárního uspořádání oproti suspennímu je analýza většího množství molekul. Průtoková cytometrie na druhou stranu častěji poskytuje kvantitativní informace.

Rozdělení **mikročipu** na mnoho oblastí „spotů“ umožňuje simultánní provedení tisíců miniaturizovaných analýz. Takto lze analyzovat množství alikvotů<sup>81</sup> jednoho vzorku, a stanovit v něm širokou paletu analytů – tzv. přímá technologie. Reverzní technologie naopak slouží ke stanovení jednoho konkrétního proteinu v množství různých vzorků. Další kategorií jsou čipy určené pro studium proteinových interakcí. **Imunosenzory** jsou nejnadějnější měřicí přístroje založené na imunochemickém principu. Nevyžadují

80 Rozeznávají se různé typy fluorescence jádra, dělicího aparátu buňky a cytoplazmy.

81 Alikvot je část materiálu odebraná z analytického vzorku za účelem provedení měření. Složení alikvotů a původního vzorku se neliší.

značení pomocí indikátorů – imunokomplex se stanovuje měřením elektrických nebo optických změn<sup>82</sup>, a to v reálném čase. Imunosenzory lze regenerovat a používat opakovaně ve formě čidel pro kontinuální měření. Lze je aplikovat jak pro stanovení biochemických markerů, léčiv či návykových látek, tak pro stanovení mikrobiálních agens, toxinů, pesticidů a jiných kontaminantů. Imunosenzory tak nacházejí uplatnění nejenom v klinické medicíně, ale i v dalších oblastech jako je potravinářství či vojenství. Tlak na miniaturizaci zařízení a minimalizaci spotřeby reagensů v rámci POCT diagnostiky vedl k tvorbě tzv. **laboratoří na čipu** (Lab-on-a-chip). Úplné integrace všech kroků stanovení je zde dosaženo pomocí pohybu kapaliny v tzv. mikrofluidických obvodech připomínajících obvody elektrické (viz kap. 2.3).

Imunochemické techniky usnadňují tvorbu panelů testů (tj. definovaných skupin biomarkerů, hormonů, cytokinů, autoprotilátek, adhezních molekul, infekčních agens, léčiv, alergenů či toxinů) – tato tzv. **multimarkerová strategie** má za cíl zefektivnit diagnostické algoritmy, prognostické modely a také populační screening nemocí. Rychlé implementaci multiplexní imunoanalýzy do rutinního laboratorního vyšetřování však zatím (kromě obtížné standardizace a často neuspokojivé reprodukovatelnosti metod) brání zejména vyšší ekonomická zátěž a nejasný přínos velkého množství nových dat pro pacienty.

Imunochemická analýza dosáhla širokého využití prakticky ve všech klinických laboratořích a blíží se prahu svého potenciálu. Dobře zavedené techniky včetně multiplexní imunoanalýzy na bázi průtokové cytometrie budou pravděpodobně do budoucna zastíněny bouřlivým rozvojem imunobiosenzorů využívajících nanotechnologie, a to zejména v oblasti POCT diagnostiky. Největší výzvou pro imunochemii bude další směřování výzkumu do oblasti neinvazivního vyšetřování.

## Literatura

- Chromý V. Imunochemické analýzy. In: Bioanalytika – analytická chemie v laboratorní medicíně (Ed.: Chromý V, Fischer J, Havel J, Votava M). Masarykova univerzita v Brně. Brno, 2002. p. 124–147.
- Kricka LJ and Wild D. Signal generation and detection systems (excluding homogeneous assays). In: The immunoassay handbook (Ed.: Wild D). Elsevier. Amsterdam, 2005. p. 205.
- Kricka LJ, Park JY. Principles of immunochemical techniques. In: Tietz textbook of clinical chemistry and laboratory diagnostics (Ed.: Burtis CA, Ashwood ER, Brunts DE). Elsevier. St. Louis, 2012. p. 379–399.
- Litzman J, Petřek M, Thon V. Vyšetřovací metody v klinické imunologii. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 1998. p. 3–21.
- Vašatová M, Tichý M, Vávrová J. Multiplexní analýza s využitím proteinových čipů. *Klin Biochem Metab* 2010; 18 (1): 4–7.

82 U křemenné mikrováhy QCM (Quartz Crystal Microbalance) se rezonanční frekvence krystalového oscilátoru lineárně mění s hmotností materiálu (imunokomplexů) navázaného na povrch křemenného krystalu. Technika založená na rezonanci povrchových plazmonů (SPR, Surface Plasmon Resonance) využívá optického jevu vznikajícího na tenké vrstvě nebo nanočásticích senzoru, který je úměrný hmotě navázané na jejich povrchu.

- Vostrý M. Multiplex immunoanalysis. *Klin Biochem Metab* 2010,18 (3): 175–177.
- Yates Ch. Immunological techniques. In: *Biomedical science practice – experimental and professional skills* (Ed.: Glencross H, Ahmed N, Wang Q). Oxford university press. Oxford, 2011. p. 377–409.
- Šigutová R, Lesňák M, Kušnierová P, Švagera Z, Šafarčík K. Využití metody Surface Plasmon Resonance imaging (SPRI) v praxi. *Informační bulletin FONS* 2013; 23 (2): 7–9.

### Otázky k přípravě

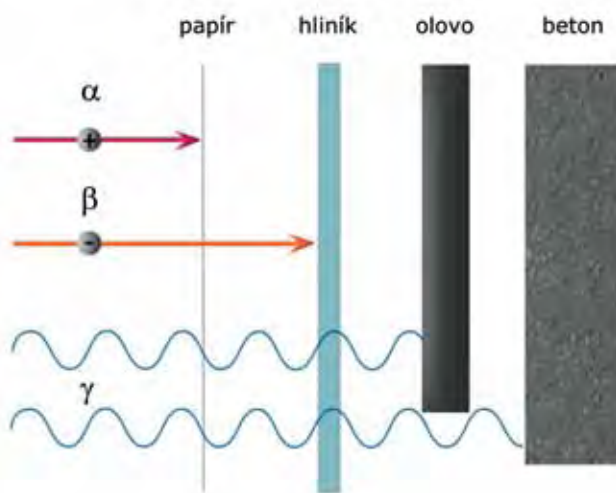
1. S využitím příslušné terminologie definujte interakci antigen – protilátka.
2. Popište význam precipitační křivky z analytického i interpretačního hlediska.
3. S využitím všech kritérií charakterizujte dělení imunochemických metod.
4. Uveďte různé způsoby značení používané v imunochemii, přiřadte k nim způsoby detekce a navrhněte možnosti amplifikace signálu.
5. Shrňte hlavní výhody a limitace imunochemických metod a jejich klinické využití.

## 2.5 Radioaktivita a detekce ionizujícího záření

N. Cibiček, H. Živná

Splnění vysokých nároků kladených v dnešní době na životní úroveň a standard lékařské péče si bez radioizotopů nelze představit. Radioizotopy celosvětově využívají tisíce nemocnic (z 90 % pro diagnostické a z 10 % pro léčebné účely), a to v desítkách milionů vyšetření ročně. Jde nejenom o rutinní radiodiagnostické postupy (např. skiografie), techniky nukleární medicíny (jako je scintigrafie a pozitronová emisní tomografie, PET) a rutinní laboratorní testy (RIA a dechové testy), ale také o nespočet experimentálních, preklinických a klinických výzkumných aplikací. Medicínský význam radioizotopů nespočívá jen v jejich širokém využití, ale i ve znečištění životního prostředí. U zdravotnických pracovníků máme na mysli zejména riziková pracoviště, ke kterým patří radioizotopové laboratoře. Přes zřejmá rizika a jistý pokles zájmu o radioizotopy v oblasti bioanalytiky lze konstatovat každoroční nárůst globálního využití radioizotopů (odhadem až o 10 %).

Základní poznatky o využití radioizotopů v klinicko-biochemické diagnostice jsme poskytli jinde (viz kap. 2.4). Zde charakterizujeme radioaktivitu a ionizující záření, uvedeme příklady aplikace radioizotopů jakožto indikátorů v biomedicínských oborech a popíšeme principy detekce ionizujícího záření. Informace o využití radioizotopů v zobrazovacích metodách, biologických účincích radiace, ochraně před ionizujícím zářením a uplatnění radioizotopů v léčbě nádorových onemocnění (v radioterapii), přenecháme na příslušnou literaturu.



**Obr. 28** Schematické srovnání pronikavosti tří druhů radioaktivního záření.

## 2.5.1 Radioaktivita

### 2.5.1.1 Radioaktivní přeměna

Z více než dvou tisíců známých nuklidů<sup>83</sup> je stabilních jen kolem 10 % (asi 256). Nestabilita atomových jader je způsobena počtem neutronů (neutronové číslo  $N$  atomu  $X^M$ ), který není v optimálním poměru k počtu protonů (protonové číslo  $Z$  atomu  ${}_Z X$ ). Taková jádra se spontánně přeměňují v jádra stabilnější s vhodnějším poměrem nukleonů (nukleonové číslo  $A$  atomu  ${}^A X$ ) Tato na vnějších podmínkách do značné míry nezávislá přeměna jádra se nazývá **radioaktivní přeměna** neboli radioaktivní transmutace. Během ní dochází k uvolnění energie v podobě **jaderného záření**. Jevu říkáme **radioaktivita**. Popisuje se několik druhů jaderného záření, z nichž nejčastější jsou tři.

- **Záření alfa ( $\alpha$ )** je proudem jader  ${}^4\text{He}$  (tj. částic  $\alpha$ ). Nese kladný elektrický náboj a má vzhledem ke ztátě energie při ionizaci okolních struktur nejkratší dosah. V plynech se jedná řádově o centimetry, v tuhých látkách i milimetry (obr. 28).
- **Záření beta ( $\beta$ )** je tokem elektronů nebo pozitronů. Dolet beta částic je ve vzduchu řádově v metrech, v tekutinách jde o centrimetry, v tuhých látkách o milimetry (obr. 28).
- **Záření gama ( $\gamma$ )** je představováno vysokoenergetickými fotony. Jde tedy o elektromagnetické záření vysoké frekvence, tj. krátkých vlnových délek ( $\lambda \leq 10^{-10}$  m, viz kap. 2.1). Nemá elektrický náboj. Jeho pronikavost je velmi vysoká (obr. 28).
- Při radioaktivní přeměně mohou být emitovány také těžší jádra, než je  ${}^4\text{He}$ , dále protony, neutrony, nebo jiné relativistické částice (viz níže).

83 **Nuklid** je skupina atomů, které mají stejné  $Z$  i  $A$ . **Izotopy** jsou nuklidy se stejným  $Z$ , ale různým  $A$  (např.  ${}^{235}\text{U}$  a  ${}^{238}\text{U}$ ). **Izobary** jsou nuklidy se stejným  $A$ , ale různým  $Z$  (např.  ${}^{40}\text{Ar}$  a  ${}^{40}\text{K}$ ). **Izotony** jsou nuklidy lišící se jak v  $A$  tak v  $Z$ , přičemž sdílí  $N$  (např.  ${}^{15}\text{N}^8$  a  ${}^{16}\text{O}^8$ ).

Látky, které podléhají radioaktivní přeměně, mají název radioaktivní nuklidy (**radionuklidy**). Některé prvky se vyskytují pouze ve formě radionuklidů. Označují se jako **radioaktivní prvky**. Všechny ostatní prvky existují nejenom ve formě nestabilních, ale i jednoho nebo více stabilních izotopů. Z hlediska vzniku radionuklidu lze rozlišovat mezi dvěma typy radioaktivity – tvoří-li se radionuklid spontánně ve volné přírodě, mluvíme o **přírozené radioaktivitě**<sup>84</sup>. Naproti tomu umělé radionuklidy jsou připraveny člověkem pomocí jaderných reakcí a jsou zodpovědné za **umělou radioaktivitu**. Z fyzikálního hlediska však toto dělení postrádá významu – chování všech radionuklidů podléhá stejným zákonitostem. V zásadě rozeznáváme tři **skupiny radioaktivních přeměn**.

- Přeměny, při nichž se mění jak  $Z$ , tak  $A$ . Patří sem:
  - **přeměna alfa**, charakterizovaná emisí záření  $\alpha$ , která mimo jiné snižuje náboj jádra o dvě jednotky,
  - přeměna s emisí těžších jader (např.  $^{14}\text{C}$ ), která je mnohem vzácnější než emise  $^4\text{He}$  a má také pomalejší kinetiku (viz níže),
  - samovolné štěpení těžkých jader (platí zejména pro jádra aktinoidů) za vzniku dvou menších jader a uvolnění dvou – tří neutronů,
  - samovolná přeměna jádra pomocí emise nukleonu (protonu nebo neutronu), která probíhá vzácně.
- Přeměny se změnou  $Z$  při zachování  $A$  se nazývají **přeměny beta**. Jde o:
  - skupinu přeměn  $\beta$  mínus, tj. přeměny (nadbytečného) neutronu na proton charakterizované emisí záření  $\beta$  mínus (elektronu),
  - pozitronovou přeměnu ( $\beta$  plus), která se vyskytuje zpravidla u umělých radionuklidů, vzniká přeměnou (nadbytečného) protonu na neutron a je charakterizovaná emisí záření  $\beta$  plus (pozitronu),
  - elektronový záchyt, čili pohlcení vlastního orbitálního elektronu slupky K nebo L jádrem<sup>85</sup>, které se tak zbaví (přebytečného) protonu jeho změnou na neutron. Vzniklá vakance je zaplněna elektronem z vyšší orbity (v případě vakance ve slupce K elektronem ze slupky L), což je spojeno s uvolněním energie fotonů rentgenového (RTG) záření.
- Přeměny, při nichž se mění pouze energetický obsah jádra ( $Z$  i  $A$  jsou konstantní, čili nejde o přeměny jádra *sensu stricto*, ale o tzv. **izomerní přechody**). Jsou způsobené **deexcitací jádra**, která samovolně probíhá v jádrech excitovaných předchozí „pravou“ radioaktivní přeměnou. Řadíme sem:
  - okamžitou emisí záření  $\gamma$  charakterizovanou současným průběhem procesů radioaktivní přeměny ( $\alpha$  nebo  $\beta$ ) a deexcitace, přičemž poločasy přeměn jsou totožné,
  - zpožděnou emisí záření  $\gamma$  charakterizovanou zpožděným průběhem procesu deexcitace za radioaktivní přeměnou ( $\alpha$  nebo  $\beta$ ), přičemž poločasy přeměn jsou na sobě nezávislé (nuklid v excitovaném jaderném stavu s delším poločasem

84 Sem patří skupina nuklidů s dlouhým  $T_{1/2}$  ( $>10^8$  let), které vznikly při syntéze prvků ve vesmíru (např.  $^{238}\text{U}$ ) a dále skupina nuklidů s kratším  $T_{1/2}$ , jež vznikají přeměnou mateřských nuklidů nebo jadernými reakcemi v zemské atmosféře působením kosmického záření (např.  $^3\text{H}$  nebo  $^{14}\text{C}$ ).

85 Uvolňuje se zde elektronové neutrino.

přeměny  $\gamma$  se označuje jako **jaderný izomer** písmenem  $m$  u nukleonového čísla, např.  $^{99m}\text{Tc}$ ),

- vnitřní konverzi, čili přímý, nezářivý přenos excitační energie jádra na orbitální elektron, který je jakožto „konvertovaný elektron“ následně z atomu uvolněn. Vzniklá vakance je zaplněna elektronem z vyšší orbity za emise fotonů podobně jako u elektronového záchytu.

Kromě uvedených typů přeměn existují rovněž tzv. „větvené“ přeměny, které zahrnují dva až tři paralelně probíhající typy radioaktivních přeměn (např.  $\alpha$  a elektronový záchyt) probíhající s různou pravděpodobností v rámci souboru atomů jednoho radionuklidu. Jako **radioaktivní řady** (řady radioaktivních přeměn nebo přeměnové řady) označujeme celkem čtyři soubory radionuklidů, které vycházejí z prvních, mateřských radionuklidů a sérií radioaktivních přeměn ( $\alpha$  nebo  $\beta$  mínus), spojených s poklesem  $Z$  a  $A$ , postupně vedou až k posledním, stabilním nuklidům. Ze čtyř radioaktivních řad jsou tři přirozené – vycházejí z uranu a končí u izotopů olova. Jejich biomedicínský význam spočívá v zejména v tvorbě radioizotopů radonu (jde především o  $^{222}\text{Rn}$ ), které jsou (společně s  $^{40}\text{K}$ ) jakožto přirozená a trvalá složka životního prostředí zodpovědné za zevní i vnitřní ozáření lidského organismu. Podíl  $^{222}\text{Rn}$  na vzniku nádorových onemocnění byl prokázán v případě rakoviny plic, o dalších se uvažuje.

### 2.5.1.2 Kinetika radioaktivních přeměn

Rychlost radioaktivní transmutace je charakterizovaná **aktivitou** (zářiče),  $A$ . Aktivita je při daném počtu nepřeměněných jader pro každý radionuklid jiná. Definuje se jako úbytek počtu nepřeměněných jader za jednotku času (jednotkou je Becquerel, značka  $\text{Bq}^{86}$ , rozměr v jednotkách SI je  $[\text{s}^{-1}]$ ). Samovolná přeměna nestabilních jader má statistický charakter<sup>87</sup> – jádra transmutují s určitou pravděpodobností, přičemž rychlost této transmutace je přímo úměrná počtu dosud nepřeměněných jader. Děj popisuje **zákon radioaktivní přeměny**:

$$A_{(t)} = \lambda N_{(t)} \quad (\text{vztah č. 7}),$$

kde  $A_{(t)}$  je aktivita v čase  $t$ ,  $\lambda$  je **konstanta radioaktivní přeměny** (neboli přeměnová konstanta s rozměrem  $[\text{s}^{-1}]$ ), která je specifická pro daný radionuklid a  $N_{(t)}$  je počet nepřeměněných jader v čase  $t$ . Exponenciální tvar tohoto zákona vyjadřuje rovnice:

$$N_{(t)} = N_{(0)} e^{-\lambda t} \quad (\text{vztah č. 8}),$$

neboli

$$\lambda t = \ln N_{(0)} / N_{(t)} \quad (\text{vztah č. 9}),$$

86 Starší jednotka aktivity byla Curie (1 Ci =  $3,7 \cdot 10^{10}$  Bq).

87 Z toho plyne nutnost mít pro analýzu jistou koncentraci nestabilních jader určující limit detekce metod.



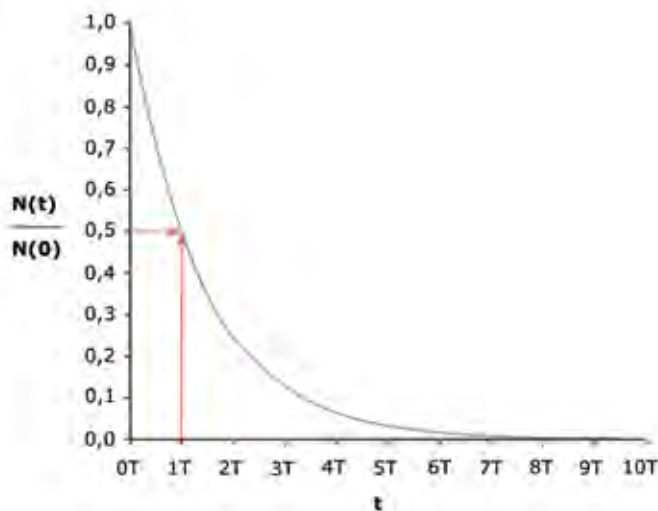
kde  $N_{(0)}$  je počet nepřeměněných jader na začátku sledování a  $t$  je doba sledování.  $N_{(t)}$  lze proto vnímat i jako předpokládaný počet nepřeměněných jader po uplynutí doby  $t$ . K charakterizaci radionuklidu se používá i tzv. **poločas přeměny** (přesněji čas polopřeměny),  $T$  ( $T_{1/2}$ , rozměrem je [s]). Je to doba, za níž se přemění polovina z počátečního počtu nepřeměněných jader (obr. 29), nebo doba, za kterou původní aktivita radionuklidu klesne na polovinu. Na základě vztahu č. 9 pak platí:

$$T = \ln 2 / \lambda \quad (\text{vztah č. 10}).$$

Poločas přeměny se, podobně jako hodnota  $\lambda$ , mezi radionuklidy výrazně liší – některé se přeměňují řádově v (mili)sekundách, jiné vyžadují tisíce let (tab. 6).

### 2.5.2 Ionizující záření (IZ)

Proud hmotných částic nebo fotonů, jejichž energie převyšuje ionizační energii atomů a molekul, vede při interakci s těmito atomy nebo molekulami nejenom k jejich excitaci, ale také k „vyražení“ volných elektronů z jaderného obalu, a tím k tvorbě kladných atomárních nebo molekulárních iontů, čili k ionizaci. Mluvíme pak o ionizujícím záření. Je-li generátorem IZ **radionuklidový zdroj**, jde o nepřetržité záření vznikající na základě radioaktivní přeměny, čili o jaderné záření. Na rozdíl od toho tzv. **aparaturní zdroj** emituje ionizující záření jen během svého provozu. Dle způsobu ionizačního procesu lze IZ rozdělit na **přímo ionizující** a **nepřímo ionizující**. Přímo ionizující záření se týká nabitých částic, např. elektronů nebo protonů. U nepřímo ionizujícího záření jde o nenabitě částice, jako jsou fotony nebo neutrony, které interakcí s okolním prostředím vedou ke vzniku (sekundárních) přímo ionizujících částic.



**Obr. 29** Exponenciální závislost relativního počtu nepřeměněných jader na čase, resp. na poločasu přeměny,  $T$ . Vysvětlení v textu.

### 2.5.2.1 Vybrané dozimetrické veličiny

Studium vlastností IZ, měření veličin popisujících jeho interakci s okolím, monitorování aktivit radioaktivních zářičů a usměrňování rizik spojených se zářením spadá do oboru dozimetrie. V rámci dozimetrie je k uvedeným účelům využíváno několik veličin, které si stručně charakterizujeme.

Interakcí s látkou se energie ionizující částice postupně zmenšuje až je nakonec částice látkou absorbována. Tloušťka vrstvy dané látky, která záření zcela pohltí, se nazývá **dosah záření**. Energii, kterou prostředí absorbuje záření získalo, označujeme jako **energie sdělená látce**. Na této energii jsou založeny jak metody měření, tak pozorovatelné účinky IZ. Velikost sdělené energie lze převést na jednotku hmotnosti ozářené látky, a to pomocí pojmu (absorbovaná) **dávka** (záření),  $D$ . Jednotkou absorbované dávky je Gray, značka Gy<sup>88</sup>, rozměrem v jednotkách SI je [J.kg<sup>-1</sup>]<sup>89</sup>. Biologické účinky IZ nezávisí jen na absorbované dávce, ale také na hustotě ionizace, kterou daný druh záření vytvoří. Vzhledem k této skutečnosti je každému druhu záření přidělen tzv. **jakostní faktor**,  $Q^{90}$  (bezrozměrná veličina), který udává, kolikrát je daný druh záření biologicky účinnější než záření gama<sup>91</sup>. Po vynásobení dávky  $D$  faktorem  $Q$  vzniká nová, korigovaná veličina – **dávkový ekvivalent** (ekvivalentní dávka),  $H$ .

$$H = DQ, \quad (\text{vztah č. 11}).$$

Jednotkou dávkového ekvivalentu je Sievert, Sv<sup>92</sup>, rozměrem v jednotkách SI je [J.kg<sup>-1</sup>]. Odlišnosti v citlivosti různých tkání na záření se analogicky zohledňují použitím tzv. tkáňového váhového faktoru. Suma všech ekvivalentních dávek vynásobených hodnotami jednotlivých tkáňových váhových faktorů se nazývá **efektivní dávka**. Udává se rovněž v Sv. **Expozice** je veličina, která vyjadřuje ionizaci vzduchu fotonovým zářením ( $\gamma$ , RTG). Hodnota expozice se získá sečtením nábojů obojího znaménka vytvořených sekundárními elektrony v jednotkovém množství suchého vzduchu. Její rozměr v jednotkách SI je [C.kg<sup>-1</sup>]<sup>93</sup> (obr. 30). Expozici sice lze měřit, z výsledků však nelze jednoznačně určit dávku, protože ta závisí jak na absorbujícím materiálu, tak na typu záření.

### 2.5.2.2 Detekce ionizujícího záření

K měření dozimetrických veličin byly vyvinuty speciální detektory, které můžeme dělit z několika hledisek.

- **Dle časového průběhu detekce** rozeznáváme dva typy detektorů. **Kumulativní** detektory postupně shromažďují hodnotu expozice, která zůstává v aparátu a může se vyhodnotit s odstupem času (tzv. integrální režim). Druhým typem jsou **konti-**

88 Dřívější jednotkou dávky byl 1 rad (1 rad = 0,01 Gy).

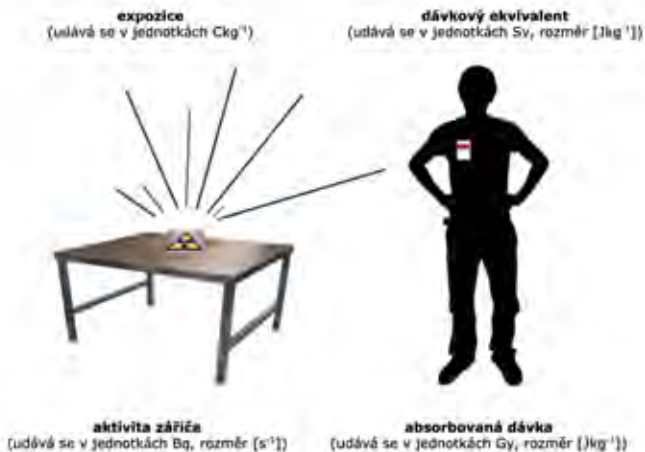
89 V praxi nabývají dávky ionizujícího záření širokého rozmezí hodnot – v řádech od 10<sup>-6</sup> (životní prostředí), přes 10<sup>1</sup> (léčba) až do 10<sup>3</sup> Gy (radiační technologie).

90 Jiný název je „radiační váhový faktor“, nebo „relativní biologická účinnost“.

91 Hodnoty  $Q$  jsou nezávislé na tkáni a druhu účinku. Jsou v rozmezí od 1 (záření  $\gamma$ ,  $\beta$ , rtg) do 20 (záření  $\alpha$ ).

92 Dříve se používala jednotka 1 rem (1 rem = 0,01 Sv).

93 Starší jednotkou expozice byl Rentgen, R (1 R  $\leftrightarrow$  258  $\mu$ C.kg<sup>-1</sup>).



**Obr. 30** Základní dozimetrické veličiny (vysvětlení v textu).

**nuální** „on-line“ detektory, jež průběžně informují o okamžité intenzitě záření. Při ukončení ozařování signál klesne na hodnotu pozadí.

- **Dle principu detekce** lze detektory dělit na materiálové a elektronické. První kategorie je založena na změnách složení, barvy, struktury nebo excitace látek působením IZ. Vzhledem k nízké citlivosti jsou použitelné pouze pro vysoké intenzity záření či dlouhodobou kumulativní detekci. Sem patří fotografické detektory (např. filmové dozimetry založené na fotochemických účincích záření, obr. 31), dále stopové detektory, termoluminiscenční detektory a jiné. Ve druhé skupině detektorů se část absorbované energie záření převádí na elektrické impulzy, které se po zesílení vyhodnocují. Zde řadíme plynové ionizační detektory (schéma Geiger-Müllerova počítáče je na obr. 32), scintilační detektory (obr. 33), polovodičové detektory, magnetické spektrometry a další. Jejich velkou výhodou je vysoká citlivost a možnost pracovat v kontinuálním režimu.

Mezi nejčastěji využívané detektory v biomedicínských oborech patří filmové dozimetry a scintilační detektory.

### Filmový dozimetr

Filmový dozimetr je zástupcem skupiny kumulativních materiálových dozimetrů. Dozimetry tohoto typu se využívají především pro osobní dozimetrii pracovníků s IZ, kteří je nosí na referenčním místě (kapsička na košili, obr. 30). Přístroj je pravidelně vyhodnocován k určení ekvivalentní dávky (obr. 31).

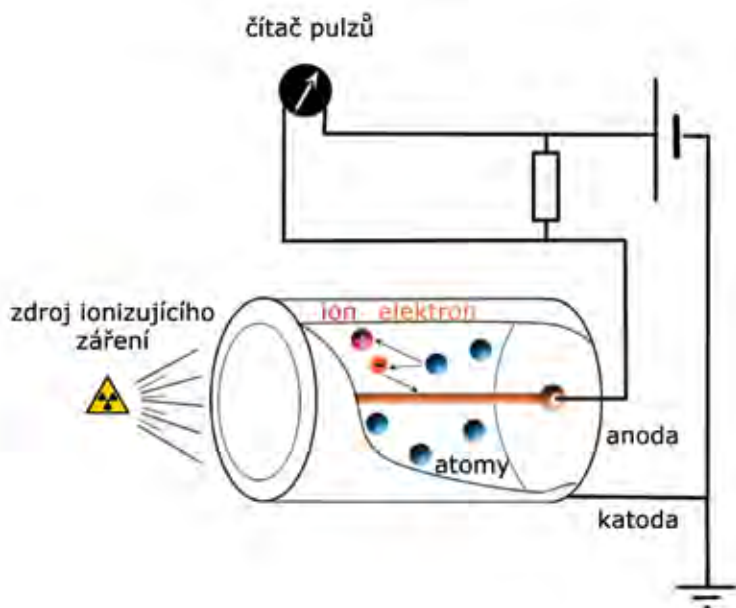
### Scintilační detektory

Scintilační detektory jsou v radioizotopových laboratořích rozšířené zejména pro svoji kompaktnost, provozní nenáročnost a cenovou dostupnost. Ve srovnání s Geiger-Müllerovými detektory mají několik předností:

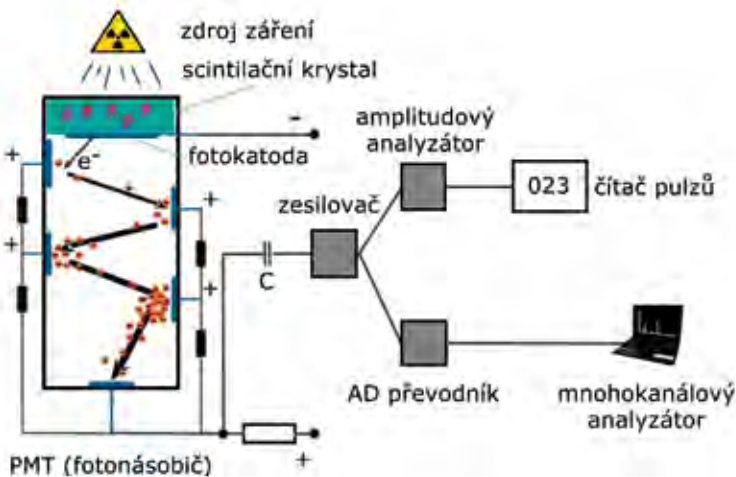
- vysokou detekční účinnost (nebo citlivost) blížící se (u záření  $\gamma$ ) 100 %,



**Obr. 31** Rozložený filmový dozimetr. Film je v kazetě kryt z obou stran filtry, zachycujícími jednotlivé typy záření. Plastický filtr a měděné filtry různých tlouštěk slouží k vyhodnocení  $\beta$  a RTG záření. Uprostřed je filtr z olova pro stanovení intenzity  $\gamma$  záření. Po vyvolání filmu se porovnává zatmavení jednotlivých nekrytých a krytých částí dozimetru.



**Obr. 32** Geiger-Müllerův počítač je válcový ionizační detektor, který obsahuje hermeticky uzavřenou ionizační komoru naplněnou zředěným plynem (směs Ar s parami etanolu nebo halogenu). Způsob zapojení elektrod do elektrického obvodu umožní procházení proudu až po ionizaci plynu zářením. Tento typ detektorů byl vůbec prvním, který byl schopen registrovat jednotlivá kvanta IZ.



**Obr. 33** Schéma scintilačního detektoru (PMT = PhotoMultiplier Tube, fotonásobič; AD převodník = Analogově-Digitální převodník).

- řádově kratší mrtvou dobu, po kterou detektor není schopen vyvolat signál (mrtvá doba je dnes u těchto detektorů určena scintilačním dosvitem),
- spektrometrické vlastnosti (analýzou amplitud výstupních impulzů lze provádět energetickou analýzu detektovaného záření, což umožní např. odlišit zdroj záření<sup>94</sup>).

Na rozdíl od většiny ostatních typů detektorů IZ se scintilační detektory vyznačují tím, že nevyužívají ionizační látky obsažené v detektoru, ale pouze jejich excitaci<sup>95</sup>. Excitace způsobená dopadem a pohlcením kvant IZ může být následovaná zářivou deexcitací s emisí fotonu v oblasti UV/VIS, tj. přeměnou excitační energie na energii světelnou (jde o luminiscenci, viz kap. 2.1). Deexcitace velkého množství atomů se souhrnně projeví jako světelný záblesk. Těmto zábleskům se říká **scintilace** a látkám, které scintilace generují, **scintilátory**. Vzniklé scintilace je možné detektovat např. pomocí fotonásobiče<sup>96</sup>, který je převádí na elektrické impulzy (obr. 33). Procesy probíhající v scintilačním detektoru lze zjednodušeně shrnout takto:

1. absorpce IZ scintilátorem,
2. vlastní scintilační proces,
3. přenos scintilačních fotonů na fotocitlivý prvek,
4. absorpce scintilačních fotonů fotocitlivým prvkem,
5. emise fotoelektronů,
6. vytvoření elektrických impulzů.

94 Lze pak najednou podat dvě i více látek (značených např.  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  a  $^{35}\text{S}$ ) jednomu zvířeti a paralelně tak sledovat v různých orgánech syntézu DNA, metabolismus proteinů, lipidů nebo sacharidů.

95 Význam pro detekci má výlučně excitace tzv.  $\pi$ -elektronů.

96 Dle platné normy se jako „scintilátor“ označuje materiál, z něhož je obráběním, úpravou povrchu a případným zapouzdřením vyroben „scintilační detektor“. Scintilační detektor ve spojení s fotonásobičem pak tvoří „scintilační detekční jednotku“.

Jako scintilátory se v biomedicínských aplikacích uplatňují anorganické krystaly a různé organické látky. Anorganické scintilátory jsou jako součást krystalových počítačů v převážné většině využívány k detekci záření  $\gamma$ . Ve větších zdravotnických zařízeních mají význam pro řadu rutinních metod, např. RIA (viz kap. 2.4). Naopak organické scintilátory se využívají u scintilačních počítačů především k detekci záření  $\beta$ . Scintilační počítače patří k běžné výbavě výzkumně zaměřených radioizotopových laboratoří. Nejčastější zdroje obou druhů záření a jejich praktické využití je uvedeno v tab. 6.

**Tab. 6** Charakteristika vybraných radionuklidů (v pořadí dle čísla A). Přeměny beta (sem patří i elektronový záchyt) mohou deexcitací vést i k emisi záření  $\gamma$  (detaily v textu). Pro přehlednost jsou uvedeny jen některé druhy emitovaného záření. Léčebné využití radionuklidů (s výjimkou terapeuticky nejdůležitějšího  $^{131}\text{I}$ ) jsme vynechali záměrně.

značka radioizotopu	typ přeměny (emise záření)	poločas přeměny	příklady diagnostických a experimentálních aplikací
<b>Rutinní využití v nukleární medicíně</b>			
$^{51}\text{Cr}$	elektronový záchyt ( $\gamma$ )	~28 dní	<ul style="list-style-type: none"> <li>stanovení přežívání erytrocytů a trombocytů, stanovení objemu krve</li> </ul>
$^{81\text{m}}\text{Kr}$	zpožděná emise gama záření ( $\gamma$ )	~13 sekund	<ul style="list-style-type: none"> <li>vyšetření plicní ventilace</li> </ul>
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	zpožděná emise gama záření ( $\gamma$ )	~6 hodin	<ul style="list-style-type: none"> <li>diagnosticky nejvíc využívaný nuklid</li> <li>nenavázaný: vyšetření štítné žlázy</li> <li>navázaný na chem. sloučeniny: funkční vyšetření orgánů (skeletu, srdce, mozku, plic, jater, ledvin, žlučníku)</li> </ul>
$^{111}\text{In}$	elektron. záchyt ( $\gamma$ )	~3 dny	<ul style="list-style-type: none"> <li>navázaný na sloučeniny nebo leukocyty – diagnostika infekčních a zánětlivých ložisek a nádorů</li> </ul>
$^{123}\text{I}$ $^{131}\text{I}$	elektron. záchyt ( $\gamma$ ) beta mínus ( $\beta^-$ , $\gamma$ )	~13 hodin ~8 dní	<ul style="list-style-type: none"> <li>vyšetření štítné žlázy</li> <li>léčba hyperfunkce a diferencovaných nádorů štítné žlázy</li> </ul>
$^{133}\text{Xe}$	beta mínus ( $\beta^-$ )	~5 dní	<ul style="list-style-type: none"> <li>vyšetření ventilace plic</li> </ul>
$^{201}\text{Tl}$	el. záchyt (RTG, $\gamma$ )	~72 hodin	<ul style="list-style-type: none"> <li>vyšetření perfúze myokardu</li> </ul>
<b>Využití v PET</b>			
$^{11}\text{C}$	beta plus ( $\beta^+$ )	~20 minut	<ul style="list-style-type: none"> <li>studium proteosyntézy</li> <li>diagnostika nádorů mozku</li> </ul>
$^{13}\text{N}$	beta plus ( $\beta^+$ )	~10 minut	<ul style="list-style-type: none"> <li>studium perfúze mozku a myokardu</li> </ul>
$^{15}\text{O}$	beta plus ( $\beta^+$ )	~2 minuty	<ul style="list-style-type: none"> <li>podobné jako v případě <math>^{13}\text{N}</math></li> </ul>
$^{18}\text{F}$	beta plus a také el. záchyt ( $\beta^+$ , $\gamma$ )	~110 minut	<ul style="list-style-type: none"> <li>diagnosticky nejvíc využívaný nuklid</li> <li>navázaný na různé látky (např. glukóza) – především onkologická diagnostika</li> </ul>
$^{82}\text{Rb}$	beta plus a také el. záchyt ( $\beta^+$ , $\gamma$ )	~80 sekund	<ul style="list-style-type: none"> <li>vyšetření perfúze myokardu</li> </ul>

značka radio-izotopu	typ přeměny (emise záření)	poločas přeměny	příklady diagnostických a experimentálních aplikací
<b>Využití v metabolickém a farmakologickém výzkumu a v <i>in vitro</i> diagnostice</b>			
<sup>3</sup> H	beta mínus (β <sup>-</sup> )	~12 let	▪ obecně biomedicínský výzkum, např. studium metabolismu nových léčiv
<sup>14</sup> C	beta mínus (β <sup>-</sup> )	~5 730 let	▪ podobné jako v případě <sup>3</sup> H ▪ gastroenterologická funkční diagnostika (dechové testy se značenými substráty)
<sup>24</sup> Na	beta mínus (β <sup>-</sup> )	~15 hodin	▪ studium metabolismu elektrolytů
<sup>32</sup> P <sup>33</sup> P	beta mínus (β <sup>-</sup> ) beta mínus (β <sup>-</sup> )	~14 dní ~25 dní	▪ výzkum v oblasti molekulární biologie a genetiky
<sup>35</sup> S	beta mínus (β <sup>-</sup> )	~87 dní	▪ podobné jako u <sup>32</sup> P, metabolické studie
<sup>42</sup> K	beta mínus (β <sup>-</sup> )	~12 hodin	▪ studium metabolismu elektrolytů
<sup>45</sup> Ca <sup>47</sup> Ca	beta mínus (β <sup>-</sup> ) beta mínus (β <sup>-</sup> )	~163 dní ~5 dní	▪ výzkum v oblasti buněčných funkcí a studium metabolismu kosti
<sup>51</sup> Cr	elektron. záchyt (γ)	~28 dní	▪ vyšetření střevní bariérové funkce
<sup>55</sup> Fe <sup>59</sup> Fe	elektron. záchyt (γ) beta mínus (β <sup>-</sup> )	~3 roky ~45 dní	▪ studium metabolismu železa
<sup>57</sup> Co	elektron. záchyt (γ)	~270 dní	▪ <i>in vitro</i> diagnostické kity
<sup>85</sup> Sr	elektron. záchyt (γ)	~65 dní	▪ studium tvorby kostní tkáně
<sup>125</sup> I	el. záchyt (RTG, γ)	~57 dní	▪ indikátor v imunochemických testech

**Anorganické scintilátory** jsou tvořeny krystaly některých látek, nejběžněji NaI. Vzhledem k tomu, že excitace samotného, čistého krystalu nevede při jeho deexcitaci k luminiscenci, je v krystalu nutná přítomnost malého množství vhodné příměsi (aktivátoru). Mezi takové látky patří thalium, které umožní v krystalu NaI<sup>97</sup> vznik diskrétních energetických hladin, ze kterých elektrony deexcitují za současné emise fotonu<sup>98</sup>. Uvedený krystal lze využít jak k detekci radionuklidů v lidském těle (tzv. celotělový počítač), tak pro měření kapalných vzorků. Nověji se využívají krystaly Bi<sub>4</sub>Ge<sub>3</sub>O<sub>12</sub> (BGO), které mají větší účinnost pro absorpci γ záření. Neutronové záření lze detekovat pomocí krystalů LiI:Eu. Využívá se přitom jaderná reakce, která vede ke vzniku částic α a jader <sup>3</sup>H, jež jsou následně zdrojem excitace a luminiscence. Pro měření α záření je vhodný krystal ZnS:Ag.

**Organické scintilátory** jsou zpravidla kapalné<sup>99</sup> – měřicí metoda se pak nazývá **kapalinová scintilační spektrometrie** (v anglosaské literatuře Liquid Scintillation Counting, LSC). Před samotným měřením je vzorek vždy promíchán s přibližně 10 ml roztoku scintilátoru ve skleněné nebo polyethylenové lahvičce. Přímý kontakt měřené látky se scintilátorem zvýší účinnost měření, znehodnotí však nejenom vzorek, ale

97 V tzv. „zakázaném“ energetickém pásu, který se nachází mezi pásem valenčním (základní stav krystalu) a vodivostním (excitovaný stav krystalu).

98 Popsaný scintilační detektor se označuje jako NaI:TI nebo z chemického hlediska méně vhodně NaI (TI).

99 Kromě kapalných existují i krystalické a plastové organické scintilátory.

i roztok scintilátoru, který nelze použít opakovaně. Na scintilátory jsou v kapalinových scintilačních detektorech kladeny určité nároky:

- scintilace má následovat bezprostředně po interakci scintilátoru s IZ,
- deexcitace má probíhat rychlým mechanismem fluorescence<sup>100</sup> (kap. 2.1),
- emitované světlo má mít vhodnou vlnovou délku,
- scintilátor má být opticky průhledný, optimálně bezbarvý (tj. dobře propustný pro emitované světlo),
- scintilátor má být mísitelný s vodou, event. s roztoky vzorků.

Dle počtu scintilačních složek dělíme organické scintilátory na jednosložkové, dvousložkové a tříložkové (první skupina se díky malé účinnosti dnes již nepoužívá). Dvě hlavní scintilační složky kapalného scintilačního „koktejlu“ jsou rozpouštědlo (R) a vlastní scintilační látka (S). Směs R – S, je někdy doplněna třetí složkou – posunovačem luminiscenčního spektra (P). Záření  $\beta$  nejdříve interaguje s molekulami R, které posléze excitují molekuly S. Vzniklé scintilace dopadají na fotokatodu fotonásobiče, z níž mohou (fotoelektrickým jevem) vyrážet elektrony. Úkolem molekul P je absorpce fotonů emitovaných látkou S a emise fotonů s (prodlouženou) vlnovou délkou, která je srovnatelná s maximem spektrální citlivosti fotokatody. Složení a nejdůležitější fyzikální vlastnosti vybraných kapalných organických scintilátorů jsou shrnuty v tab. 7.

Funkcí fotonásobiče je (bez ohledu na charakter scintilátoru) detekce scintilací a jejich převedení na elektrické impulzy (obr. 33). **Fotonásobič** je vakuová elektronka, jejíž princip fungování je následující: elektrony vyražené z fotokatody jsou urychleny kladným potenciálem, který v sérii tzv. dynod postupně narůstá. Napětím zvýšená kinetická energie elektronů má za následek uvolnění stále většího množství elektronů na další z dynod (násobení). Poslední z dynod (anoda) při dopadu velkého množství ( $\sim 10^8$ ) elektronů poskytne dobře měřitelný elektrický impulz.

Mezi možné **zdroje interference** a přístrojového šumu v kapalinové scintilační spektrometrii patří okolní světlo, temný proud fotonásobiče, zhášení a chemiluminiscence. Rušivý vliv okolního světla je eliminován umístěním scintilační detekční jednotky do světlotěsného krytu. Jako temný proud se označují proudové impulzy, které fotonásobič generuje následkem termoemise elektronů z neozářené fotokatody a prvních dynod. Tyto impulzy vznikají náhodně a označují se jako **pozadí** (šum). Pozadí je v novějších scintilačních detektorech redukováno pomocí tzv. koincidenčního obvodu, tj. spojení dvou paralelních fotonásobičů, které zaznamenávají pouze impulzy přicházející z obou detektorů současně. Přesto se s pozadím musí počítat a vždy ho odečíst od aktivit měřených vzorků. Tzv. zhášení je způsobeno látkami, které snižují světelný výtěžek luminiscence (tj. intenzitu signálu) a podmiňují závislost účinnosti měření na složení konkrétního vzorku. Rozeznáváme tři typy zhášení:

- **zhášení chemické**, primární, nezávislé na objemu vzorku (jde o nečistoty, které absorbují excitační energii a deexcitují neradiačně),

100 Scintilátor je *de facto* fluorofor.



**Tab. 7** Přehled nejdůležitějších parametrů vybraných kapalných organických scintilátorů (*R* = rozpouštědlo, *S* = scintilátor, *P* = posunovač, PPO = 2,5-difenyloxazol, POPOP = 1,4-di-(2-(5-fenyloxazolyl))-benzen, PBD = 2-fenyl-5-(4-bifenylyl)-1,3,4-oxadiazol). Luminiscenční výtěžnost kapalných scintilátorů je vztažena ke krystalu NaI: TI = 100 %. Popisuje podíl energie emitovaného světla a absorbované energie kvant IZ. Scintilační dosvit (čili doba trvání scintilace) negativně koreluje s délkou mrtvé doby detektoru.

složení scintilač. roztoku (R – S – P)	relat. luminiscenční výtěžnost (% NaI: TI)	scintilační dosvit	luminiscenční spektrum (max)
toluen – PBD	26	3,0 ns	365 nm
toluen – PPO – POPOP	30	3,7 ns	425 nm
xylén – PBD	28	3,0 ns	365 nm
xylén – PBD – POPOP	38	4,0 ns	425 nm
xylén – naftalen – POPOP	31	3,7 ns	425 nm
1,4-dioxan – PPO – POPOP	26	3,8 ns	425 nm

- **zhášení barevné**, sekundární, závislé na objemu vzorku (jde o nečistoty, které absorbují světlo),
- **zhášení radiací** (vznik excitovaných stavů a volných radikálů v důsledku interakce IZ s látkou negativně ovlivňuje přenos energie v této látce).

Některé chemické reakce mezi molekulami vzorku a scintilátoru mohou vést k emisi světla – chemiluminiscenci, která ve fotonásobiči vyvolává falešné impulzy nemající původ v detektovaném záření  $\beta$ . Chemiluminiscence má omezené trvání – měření s časovým odstupem (desítek hodin) proto zásadně neovlivní.

### 2.5.2.3 Využití ionizujícího záření

Využití radionuklidů je nesmírně široké, a to jak v oblasti rutinních vyšetřovacích postupů, tak ve výzkumné sféře (viz tab. 6). Pomineme-li zobrazovací a imunoanalytické metody, pak je velká část těchto látek využívána právě pro studium metabolismu, přičemž jde zejména o  $\beta$  zářiče (jako je  $^3\text{H}$  a  $^{14}\text{C}$ ). V rutinní gastroenterologické a hepatologické diagnostice nelze opomenout neinvazivní **dechové testy** se značenými substráty. Využívají se např. k průkazu infekce *Helicobacter pylori* (močovina), k testování exokrinní funkce pankreatu (škrob, triacylglyceroly), v diagnostice bakteriálního průrůstání (xylóza) nebo stanovení rychlosti evakuace žaludku (kyselina kaprylová/oktanová). Obecně lze konstatovat, že radioaktivní izotopy „soupeří“ s izotopy stabilními, jejichž hlavní výhodou je nepřítomnost radiace. Z těchto důvodů byl diagnostický význam  $^{14}\text{C}$  ve výše uvedených aplikacích v posledních dvou desetiletích zastíněn rovojem technik s neradioaktivním  $^{13}\text{C}$  (a také rozvojem technik s vodíkem,  $\text{H}_2$ ).

Základní výhodou značení látek pomocí radionuklidů je dostupnost kvalitních, a přitom kompaktních a nenáročných detekčních systémů. Detekce radioizotopů je totiž založená na prosté detekci záření. Měření aktivity záření  $\gamma$  navíc nevede ke znehodnocení vzorku, čímž umožní jeho další biochemické analýzy. Na druhé straně je

problematika analýzy látek značených stabilními izotopy obvykle mnohem složitější. Detekce sloučenin obsahujících stabilní izotopy vyžaduje jednak jejich separaci ze směsi a jednak sofistikovanou aparaturu na bázi hmotnostní spektrometrie (viz kap. 2.2), nukleární magnetické rezonanční spektrometrie nebo infračervené spektrometrie (viz kap. 2.1). V případě rutinně prováděných dechových testů jsou však dostupné i méně sofistikované technologie s přijatelnou analytickou citlivostí<sup>101</sup>.

Rozvoj technologií založených na ionizujícím záření nelze zastavit. Jeho jedinou limitací nadále zůstane kontaminace životního prostředí a dodržování zvláštních podmínek při práci s radionuklidy.

## Literatura

- Ullmann Vojtěch. Jaderná a radiační fyzika. Ostrava, 2009. ISBN 978-80-7368-668-7.
- Hála Jiří. Radioaktivita, ionizující záření, jaderná energie. Brno, 1998. ISBN 80-85615-56-58.
- Vladimír Krejčí: Scintilační detektory, České Budějovice, 2002, p. 14–15.
- Hyšpler R. Využití izotopů biogenních prvků v metabolickém výzkumu. In: Metodologie předklinického a klinického výzkumu (Ed.: Zadák Z, Květina J). Galén, Praha, 2011.

### Otázky k přípravě

1. Stručně charakterizujte typy radioaktivních přeměn.
2. Definujte základní dozimetrické veličiny.
3. Vysvětlete princip scintilačních detektorů.
4. Uveďte příklady radioizotopů využívaných v experimentu a klinice.
5. Popište možné zdroje interference v kapalinové scintilační spektrometrii.

<sup>101</sup> Jde zpravidla o jednodušší, menší analyzátoary pracující na bázi infračervené spektrometrie v režimu POCT.

# 3 Metody izolační, separační a amplifikační

## 3.1 Centrifugační techniky

J. Vostálová, N. Cibiček

Centrifugační techniky patří mezi základní analytické separační techniky. V laboratořích našly hojně a mnohostranně využití a mají nezastupitelné místo v celé řadě jednoduchých i velmi složitých postupů určených k oddělování složek heterogenních směsí (disperzních soustav). Techniky mohou být využity nejenom k přípravě vzorku pro další instrumentální analýzu, ale také k samotné analýze (velikosti a zastoupení částic ve vzorku), resp. k oddělení složek z biologického materiálu, které bude možné využít např. k léčebným účelům.

### 3.1.1 Sedimentace a centrifugace

Centrifugační techniky jsou založené na sedimentaci. Sedimentace, čili usazování rozptýlených (dispergovaných) částic, je proces vyvolaný silovým polem. Rychlost sedimentace určuje, kromě síly působící na částice, i velikost, tvar a hmotnost částic, dále hustota částic, viskozita prostředí (roztoku) a faktor tření. Pokud na částice působí pouze gravitační síla, proces sedimentace je relativně pomalý<sup>102</sup> nebo neprobíhá prakticky vůbec. Pokud se k urychlení sedimentačního procesu využije rotace vzorku kolem osy rotace, působí na složky směsi o několik řádů větší **setrvačná odstředivá síla**<sup>103</sup> a mluvíme o **centrifugaci** (odstředování). Zařízení pro centrifugaci se nazývá **centrifuga** (odstředivka). V průběhu centrifugace dochází k separaci komponent směsi většinou na dvě frakce – jedna z nich se nachází na dně centrifugační nádoby a označuje se jako **sediment** nebo **pelet**. Frakce nad sedimentem je **supernatant** a může obsahovat částice, které při centrifugaci zůstaly rozptýlené v roztoku, čili nesedimentovaly. Po separačním procesu je možné využít jak sediment, tak supernatant. Např. v sedimentu se mohou nacházet buňky, izolované z různých tělních tekutin, především z plné krve, ale i z likvoru, moči, spermatu nebo punktátů (viz kap. 1).

102 Tohoto jevu se v praxi běžně využívá v levném a nespécifickém, ale přesto v relativně přínosném vyšetření sedimentace červených krvinek v nesrážlivé krvi, čili vyšetření dle Fahrause a Westergrena (FW, v anglosaské literatuře známé spíše pod pojmem Erythrocyte Sedimentation Rate, ESR).

103 „Setrvačná odstředivá síla“ je pojem, který byl zaveden pro tzv. neinerciální vztažné soustavy (viz učebnice fyziky). Jedná se o setrvačné zrychlení tělesa, které není způsobeno žádnou skutečnou silou, ale pouze vlastním pohybem vztažné soustavy. Od „odstředivé síly“ se liší tím, že nejde o působení tělesa např. na stěnu zkumavky (ve smyslu reakce na dostředivou sílu), ale o zdánlivou sílu působící na samotné těleso. Velikost setrvačné odstředivé síly je identická s velikostí síly dostředivé (lze proto použít níže uvedené vztahy), jen má opačný směr.

Velikost setrvačné odstředivé síly ( $F$ , v jednotkách  $N$ ), působící při centrifugaci na částice v roztoku, je dána vztahem:

$$F = m\omega^2 r \quad (\text{vztah č. 12}),$$

kde  $m$  je hmotnost částice (v jednotkách  $g$ ),  $\omega$  je úhlová rychlost rotace ( $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a  $r$  je poloměr otáčení, čili vzdálenost částice (příp. dna centrifugační zkušavky) od osy rotace ( $\text{cm}$ ). Hodnota  $r$  bývá uvedena v dokumentaci rotoru (viz dále). Součin  $\omega^2 r$  vyjadřuje **setrvačné odstředivé zrychlení**  $a$  ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ ). Intenzita centrifugace se vyjadřuje jako **relativní setrvačné odstředivé zrychlení** (v anglosaské literatuře se užívá pojmu Relative Centrifugal Force, RCF) a udává, kolikrát je dostředivé zrychlení vyvinuté centrifugou větší, než je tíhové zrychlení  $g$  ( $g = 9,81 \text{ ms}^{-2}$ ). Platí:

$$\text{RCF} = \omega^2 r / g \quad (\text{vztah č. 13}).$$

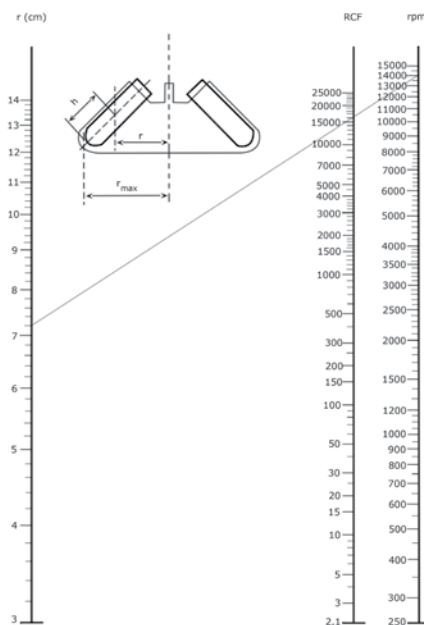
Setrvačné odstředivé zrychlení  $a$  se na základě tohoto vztahu velmi často vyjadřuje právě jako násobek  $g$ :

$$a = \text{RCF}g \quad (\text{vztah č. 14}).$$

Pokud do vztahu č. 12 za rychlost rotace  $\omega$  dosadíme vztah  $\omega = 2\pi f$ , kde  $f$  je frekvence otáček za minutu, neboli  $\text{rpm}$  (z angl. revolutions per minute, v jednotkách  $\text{min}^{-1}$ ) a  $r$  je poloměr otáčení ( $\text{cm}$ ), vznikne po úpravě vztah:

$$\text{RCF} = 1,12 \cdot 10^{-5} r \cdot (\text{rpm})^2 \quad (\text{vztah č. 15}).$$

Vztah mezi RCF,  $r$  a  $\text{rpm}$  lze demonstrovat i graficky a vzniklý nomogram využít ke snadnému odečtení hodnoty RCF (obr. 34).



**Obr. 34** Graf sloužící k odečtu hodnoty relativního setrvačného odstředivého zrychlení (RCF) s využitím znalosti počtu otáček rotoru za minutu ( $\text{rpm}$ ) a poloměru rotoru ( $r$ ).

### 3.1.2 Centrifugy (odstředivky)

Centrifugy lze dělit na základě několika kritérií.

Dle velikosti a kapacity rozeznáváme **mikrocentrifugy**, čili stolní nebo příruční centrifugy s kapacitou v řádu ml a **vysokoobjemové centrifugy**, tj. samostatně stojící přístroje s kapacitou měřitelnou ve stovkách ml až v litrech.

- Dle možnosti regulace teploty dělíme centrifugy na **nechlazené** a **chlazené**.
- Podle dosahovaného setrvačného odstředivého zrychlení rozlišujeme **nízkoobrátkové, středněobrátkové** a **vysokoobrátkové** centrifugy.

Rutinní klinicko-biochemické laboratoře si v běžném provozu (k oddělení buněk, bakterií, krystalů nebo krevní sraženiny z jejich suspenze) vystačí s nízkootáčkovými a středněotáčkovými centrifugami (RCF do  $20 \cdot 10^3$ ). K sedimentaci menších částic, buněčných organel, virů a biomakromolekul je však již nutné využití vysokoobrátkových ultracentrifug (RCF v hodnotách  $100$  až  $1000 \cdot 10^3$ ) včetně složitějších a časově náročnějších postupů odstředování.

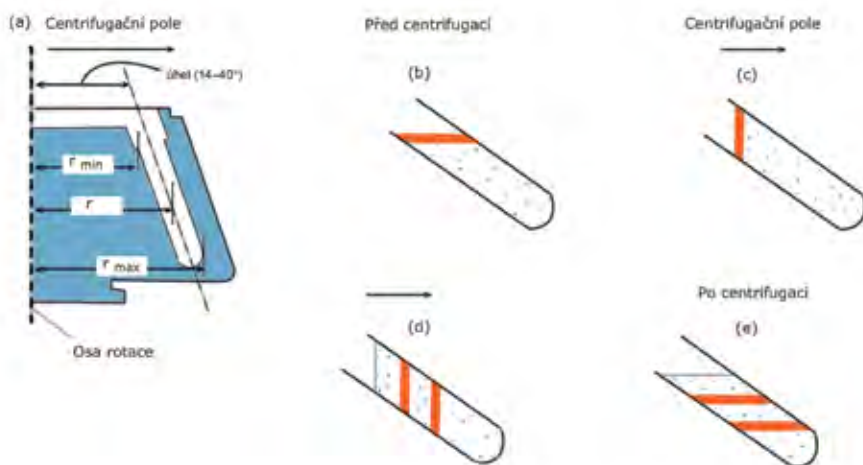
Každá centrifuga se skládá ze dvou základních částí – **rotoru** a **motoru**. Motor je hnací jednotkou, která uvádí do otáčivého pohybu rotor.

#### 3.1.2.1 Rotor

Rotor je kontejner (držák), do kterého jsou umístěny **centrifugační** nádobky se vzorky. Podle konstrukce rotoru a způsobu uložení centrifugačních nádobek rozlišujeme několik typů rotorů: úhlové (otvory pro umístění nádobek jsou pod fixním úhlem), **výkyvné** (s volně upevněnými pouzdry pro kyvety), dále **vertikální, zonální** a **průtokové**. V klinické biochemii se používají první tři typy (obr. 35–37). Otvory či držáky pro vzorky jsou v rotoru umístěny symetricky a jejich počet je obvykle sudý. Nádobky se vzorky, resp. vyvažovací nádobky jsou do rotoru vkládány rovněž symetricky (proti sobě). Rotory, resp. držáky nádobek, jsou vybaveny víčky, která chrání jak prostor centrifugy před potřísněním, tak samotný vzorek před kontaminací. Rotory jsou vyrobeny z odolných materiálů – nejčastěji jde o ocel a slitiny (např. hliníku a titanu). Rotory vyrobené z uhlíkových vláken mají menší hmotnost a vyšší odolnost vůči mechanickému opotřebení a vnějším faktorům. Jsou vhodné pro vysokorychlostní centrifugy a ultracentrifugy. Značná hmotnost (a hybnost) rotoru může v případě jeho uvolnění během centrifugace představovat potenciální nebezpečí nejen pro centrifugu, ale i obsluhující personál.

#### Úhlový rotor

Úhlový rotor má masivní konstrukci tvořenou jedním blokem s hladkým povrchem, ve kterém jsou pod určitým úhlem vyvrtány válcovité otvory pro centrifugační nádobky. Úhel, který svírají centrifugační nádobky s osou otáčení rotoru, se pohybuje v rozmezí od  $14^\circ$  do  $40^\circ$  a v průběhu centrifugace se nemění. To umožňuje dosahovat vysokých hodnot RCF spojených s kratší dobou dělení. Pozice zkumavky v rotoru určuje polohu sedimentovaných částic po centrifugaci – sediment se nachází částečně na dně a boční stěně nádobky, která je vzdálenější od osy rotace (obr. 35). Rotory se liší velikostí a po-



**Obr. 35** Průřez úhlovým rotorem (A). Uspořádání komponent směsi v průběhu centrifugace (B–E).

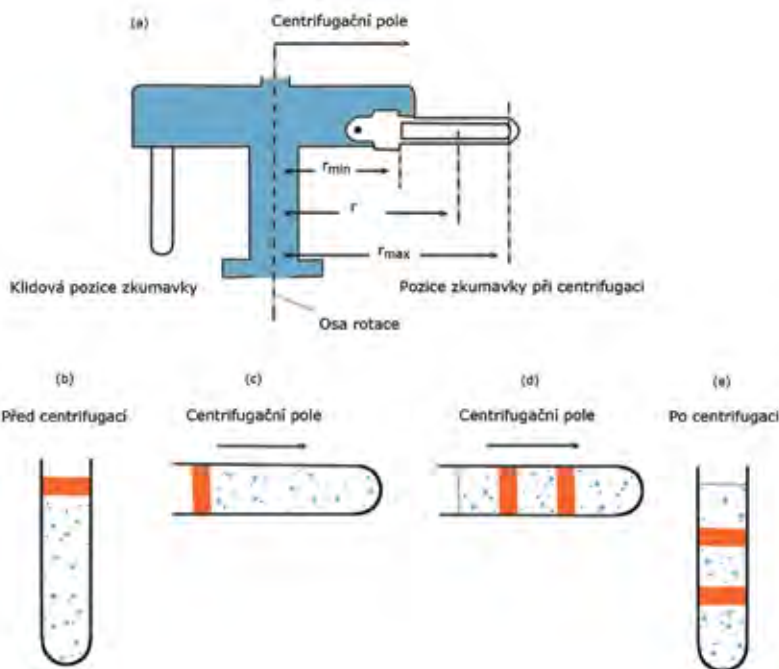
čtem otvorů pro centrifugační nádoby – některé mají otvory jen jedné velikosti, jiné jsou univerzálnější a disponují spektrem otvorů pro různé typy nádobek.

### Výkyvné rotory

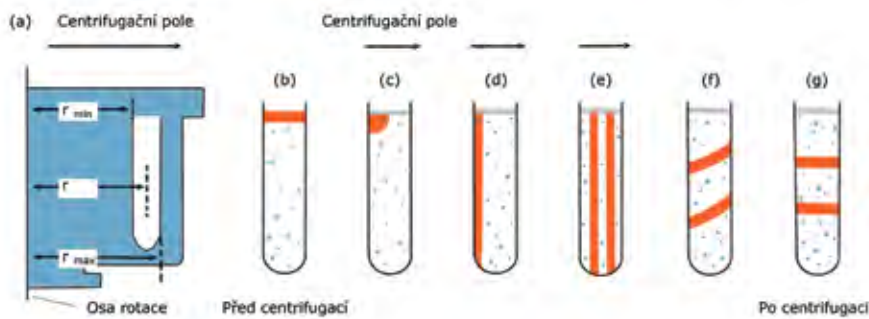
Výkyvné rotory jsou díky své konstrukci předurčeny pro použití nižšího centrifugačního pole. Centrifugační nádoby jsou zde umístěny ve dvou až šesti držácích zavěšených na těle rotoru. Toto uspořádání je spojeno s plynulou změnou úhlu v průběhu centrifugace, který centrifugační nádoby svírají s osou rotace rotoru. Na počátku centrifugace jsou zkumavky v poloze vertikální. Působením odstředivé síly dojde krátce po zahájení centrifugace ke změně polohy držáku téměř do polohy horizontální, tj. o cca 87°. Změny polohy centrifugačních nádobek v průběhu centrifugace se odráží na průběhu dělení směsi částic a na poloze sedimentu, který se po centrifugaci nachází na jejím dně (obr. 36). U většiny rotorů je možné měnit pouzdra v držáku v závislosti na velikosti centrifugačních nádobek. Výkyvné rotory mohou mít držáky také pro mikrojamkové (mikrotitrační) destičky, čehož se využívá např. v imunoanalýze (viz kap. 2.4).

### Vertikální rotory

Otvory pro centrifugační nádoby jsou v těle vertikálních rotorů umístěny vertikálně, tj. rovnoběžně s osou rotace. Úhel je v průběhu centrifugace fixní (obr. 37). Při použití tohoto typu rotorů dochází k rozdělení komponent vzorku do vertikálních zón, které po ukončení centrifugace vytvoří vrstvy horizontální. Otvory pro nádoby mají v rotorech zpravidla stejnou velikost. Existují však i univerzálnější rotory, u kterých je možné použít více typů centrifugačních nádobek.



**Obr. 36** Průřez výkyvným rotorem (A). Uspořádání komponent směsi v průběhu centrifugace (B–E).



**Obr. 37** Průřez horizontálním rotorem (A). Uspořádání komponent směsi v průběhu centrifugace (B–G).

### Zonální a průtokové rotory

Zonální a průtokové rotory se používají pro preparativní izolaci částic z velkých objemů. **Zonální rotor** umožňuje centrifugaci v hustotním gradientu (viz dále). Plnění i vyprazdňování rotoru probíhá během jeho otáčení, čímž se zabráňuje promíchání gradientu. Tyto rotory se používají např. pro přípravu vakcín. **Průtokový rotor** lze použít k zakoncentrování částic z roztoku. Kapalina prosta sedimentovanými částicemi nebo obsahující lehčí částice vytéká v průběhu centrifugace ven z rotoru zvláštním kanálkem

a těžší částice se zakoncentrovávají v rotoru. Konstrukce některých rotorů umožňuje odvádět z rotoru i usazené částice, které je možné dále zpracovávat.

### 3.1.2.2 Další součásti centrifug

Vzorky jsou uloženy v nádobkách pro centrifugaci, kterým se nejčastěji říká **centrifugační zkušavky** nebo kyvety. Obvykle jsou vyrobeny z různých polymerů (např. polykarbonátu, polypropylenu), skla, výjimečně i z nerezavějících slitin kovů. Centrifugační zkušavky mají různý tvar i velikost, na základě které jsou schopny pojmout od několika desetin mililitru až po několik litrů vzorku. Nádobky by měly mít stejný průměr, jako je průměr otvorů v rotoru nebo v držácích. Nádobky se plní asi do 2/3 objemu. Výjimkou jsou uzavíratelné nádobky, které se plní úplně. Nádobky na jedno použití lze uzavřít zatavením. Nádobky se vzorky, včetně víček, musí být před centrifugací řádně vyváženy, což platí především u ultracentrifug.

Během centrifugace dochází vlivem tření rotoru s molekulami vzduchu k vývinu tepla, které může ovlivnit kvalitu centrifugovaného materiálu. Biologické vzorky často vyžadují zpracování při nízkých teplotách. Z těchto důvodů jsou centrifugy vybaveny **chladicím zařízením**, které je součástí přístroje. Regulace teploty je velmi přesná, protože aktuální teplota rotoru je snímána čidly umístěnými přímo v rotoru. Chladicí zařízení je nezbytnou součástí všech ultracentrifug.

Centrifugy, které jsou schopny dosáhnout více než 50 000 rpm, musí být vybaveny **vakuovým systémem** (vývěvou), který efektivně redukuje tření, a tím i nežádoucí zahřívání.

Požadované parametry centrifugace (otáčky, teplotu, čas), správné vyvážení a umístění zkumavek v rotoru kontroluje a ovládá **řídící jednotka**.

### 3.1.3 Metody centrifugace

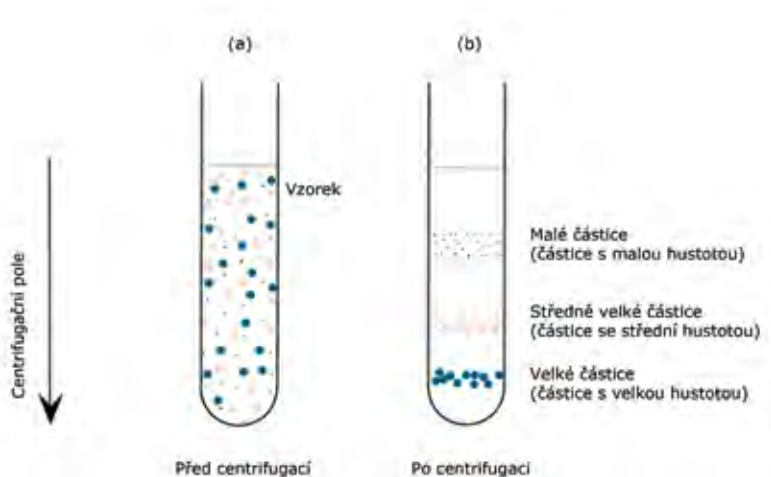
#### 3.1.3.1 Diferenciální (frakční) centrifugace

Diferenciální centrifugace se používá k rozdělení směsi částic, které se liší ve velikosti. K dělení částic v roztoku dochází nejenom v závislosti na jejich sedimentačním koeficientu, ale také na velikosti odstředivé síly a době centrifugace. Centrifugace probíhá v homogenním médiu, jehož hustota je výrazně nižší než hustota separovaných částic. Aby separace byla účinná, tj. vedla k tvorbě sedimentu obsahujícího částice jedné velikosti, měl by být rozdíl sedimentačních koeficientů částic alespoň desetinásobný (obr. 38). I v takovém případě však vytvořený sediment může obsahovat částice (kontaminanty) s menším sedimentačním koeficientem. Čistotu sedimentu můžeme zvýšit jeho izolací (odsátím supernatantu), promytím a opakovaným vystavením centrifugaci za stejných podmínek. Suspenzi částic můžeme také centrifugovat krokově použitím vzrůstající odstředivé síly. V každém kroku pak získáme sediment obsahující částice o vzrůstající hodnotě sedimentačního koeficientu. Diferenciální centrifugace se používá k izolaci buněk, organel, makromolekul, či k odstraňování sraženin.

Demonstrujme si uvedené metody na konkrétních příkladech.

- Izolace buněčných organel může probíhat následovně. Nejprve si připravíme tkáňový homogenát, který centrifugujeme 10 min při 100–300 g, abychom odstranili





**Obr. 38** Rozdělení komponent v průběhu diferenciální centrifugace. Umístění vzorku před centrifugací (A) a rozdělené části vzorku po centrifugaci (B).

kousky tkáně. Následuje centrifugace supernatantu po dobu 10 min při 600–1 000 g. Vzniklý sediment je tvořen hlavně jaderným materiálem (buněčná jádra). Při následné centrifugaci supernatantu při 3 000–4 000 g po dobu 10 min jsou separovány těžké mitochondrie, při centrifugaci supernatantu při 15 000–25 000 g po dobu 20 min jsou získány lehké mitochondrie a při následné centrifugaci (50 000–100 000 g; 45 min) získáme sediment bohatý na mikrosomy. Všechny kroky izolace organel se provádí při 4 °C. Pro potvrzení čistoty izolovaných frakcí se využívají proteiny, které jsou pro danou organelu charakteristické. Odlišnosti ve velikosti a hmotnosti organel jsou patrné z tab. 8.

- Dalším praktickým příkladem může být sekvenční ultracentrifugace lipoproteinů. Provádí se zvyšováním hustoty ( $\rho$ ) roztoku KBr v každém izolačním kroku (VLDL při  $\rho < 1,006 \text{ g.ml}^{-1}$ ; LDL při  $\rho < 1,063 \text{ g.ml}^{-1}$  a HDL při  $\rho < 1,125 \text{ g.ml}^{-1}$ ).

### 3.1.3.2 Centrifugace v hustotním gradientu (izopyknická, gradientová centrifugace)

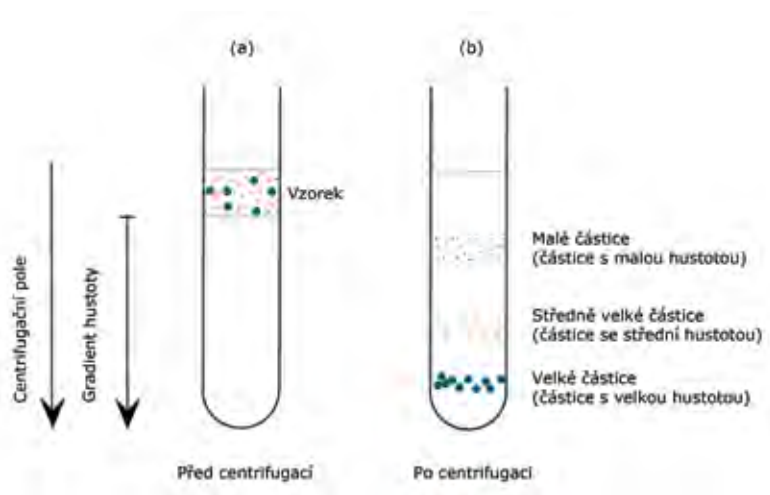
Pro dělení směsi částic, které se jen málo liší v hodnotě sedimentačního koeficientu, se používá hustotní gradient<sup>104</sup>. Rozsah hustot využitých v gradientu respektuje očekávané hustoty dělených částic. Částice při centrifugaci migrují v gradientu hustoty tak dlouho, dokud se nedostanou do prostředí o stejné hustotě, jakou mají samy (izopyknický bod). Centrifugační nádoby se plní roztokem, jehož hustota klesá od dna

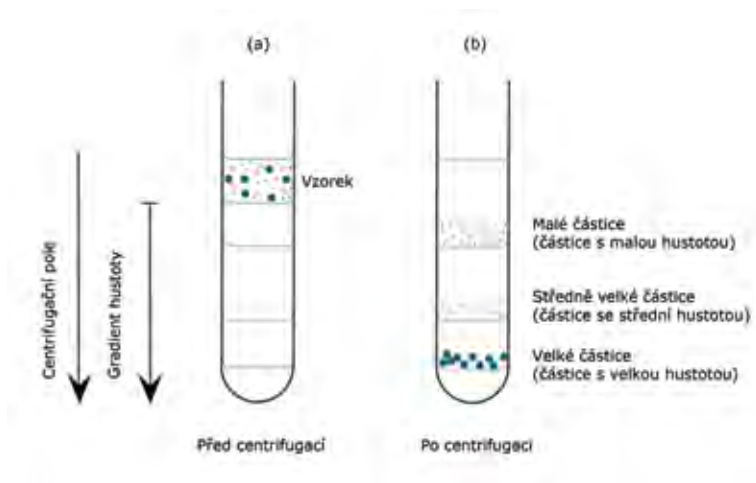
104 K přípravě gradientů se používá řada sloučenin. Roztoky solí kovů (CsCl, NaBr) vytváří gradient sponánně působením odstředivé síly. Gradienty solí se používají k izolaci různých biomakromolekul a virů. K separaci buněčných organel se používají roztoky sacharózy, dextransu a dalších látek. K izolaci celých buněk (krevních buněk, kmenových buněk, spermií, živých vs. mrtvých buněk), ale také virů, buněčných organel a biomakromolekul se namísto sacharózy začínají uplatňovat nejrůznější syntetické deriváty (rozvětvené kopolymery sacharózy, částice  $\text{SiO}_2$  potažené polymery nebo jodované deriváty kyseliny benzoové či glukózy).

**Tab. 8** Velikost a hustota vybraných buněčných komponent.

částice/struktura	velikost	hustota (g.ml <sup>-1</sup> )
hemoglobin	~ 8 nm	~ 1,35
nukleová kyselina	variabilní	~ 1,6
viry	20–50 nm	1,3–1,45
ribosomy	~25 nm	~ 1,6
mitochondrie	0,5–2 μm	1,19
lyzosomy	0,05–1,0 μm	1,21
peroxisomy	0,1–1,5 μm	1,23
jádro	4–12 μm	
plazmatická membrána	3–20 μm	
mikrosomy	0,05–0,3 μm	

směrem k hladině ve zkumavce. Hustotní gradient může být **spojitý** (kontinuální, plynule se měnící) nebo **nespojité** (diskontinuální, skokově se měnící). Spojitý gradient vzniká působením odstředivé síly nebo postupným mísením dvou roztoků o rozdílných hustotách, přičemž poměr obou roztoků se plynule mění (obr. 39). Spojitý gradient je možné připravit jako lineární, konvexní či konkávní. Nespojité gradient se připravuje postupným nanášením roztoků o klesající hustotě do nádobek. Dělené částice určité hustoty se soustředí na hranici mezi dvěma vrstvami o různé hustotě (obr. 40). Centrifugace v hustotním gradientu se používá k separaci buněk, izolaci buněčných organel, makromolekul (nukleových kyselin a bílkovin), nebo jiných částic. Časově může být náročnější než diferenciální centrifugace a vyžadovat i desítky hodin.

**Obr. 39** Gradientová centrifugace v kontinuálním gradientu. Umístění vzorku před centrifugací (A) a rozdělené části vzorku po centrifugaci (B).



**Obr. 40** Gradientová centrifugace v diskontinuálním gradientu. Umístění vzorku před centrifugací (A) a rozdělení části vzorku po centrifugaci (B).

Uvedme i zde několik příkladů.

- Izolaci různých typů buněk lze provést pomocí směsí syntetických látek<sup>105</sup>. Směsi se při vysokých otáčkách rozdělí a vytvoří spojitý gradient hustoty s maximem u dna nádoby a minimem u hladiny roztoku. Na takto rozdělenou směs se nanese dělečná suspenze buněk a provede se centrifugace při nižších otáčkách. Buňky klesnou v gradientu až do místa, kde je jejich hustota shodná s hustotou okolního média. Jednotlivé typy buněk se izolují postupným odebíráním částí sloupce.
- Jiným příkladem je rutinní izolace séra ve zkumavce s gelem, který je po odběru krve na dně zkumavky. Hustota gelu je navržena tak, aby se pohybovala mezi hustotou séra a hustotou sraženiny krevních buněk. Po centrifugaci se gel nachází nad sraženinou buněk a oddělí tak sérum, které je tím po dobu několika hodin až dnů chráněno před kontaminací látkami uvolňovanými krevními elementy (viz kap. 1).
- Příkladem izolace menších částic je jedнокroková izolace lipoproteinů, jež probíhá v hustotním gradientu KBr ( $\rho$  od 1,006 do 1,31 g.ml<sup>-1</sup>).

### 3.1.4 Využití centrifugace

V principu lze centrifugaci využít k dvojímu účelu – jednak k rozdělení vzorku na několik frakcí – **preparativní centrifugace** a jednak k analýze velikosti a procentuálního zastoupení různých částic ve vzorku – **analytická centrifugace**.

#### 3.1.4.1 Preparativní centrifugace

K izolaci buněk z biologického materiálu slouží **cytocentrifugy**. Vzorek je centrifugován při nízkých otáčkách a sediment buněk je nanášen přímo na mikroskopické sklíčko k cy-

<sup>105</sup> Příkladem jsou směsi s názvy Percoll® nebo Nycodenz®.

tologické analýze. Metoda je využívána např. pro diagnostiku nádorových onemocnění. Pro vyšetření hematokritu se používají centrifugy vybavené speciálními nástavci. **Aferéza** využívá rozdílné hustoty krevních komponent k jejich separaci (tab. 9). Krev se odebírá z žíly a odvádí se hadičkou do speciální odstředivky, ve které se oddělují jednotlivé komponenty na základě rozdílné hustoty. Potřebná krevní složka je odváděna do sběrného vaku. Na rozdíl od odběru plné krve se při aferéze odebírá pouze požadovaná krevní složka a nevyužité komponenty krve se vrací zpět. **Plazmaferéza** se využívá k získávání plazmy. Při **cytaferéze** se separují krevní buňky od plazmy, která se vrací zpět dárci. Takto můžeme získávat červené krvinky (**erythrocytaferéza**), leukocyty (**leukocytaferéza**), lymfocyty (**lymfocytaferéza**) a trombocyty (**trombocytaferéza**). Aferéza slouží nejen k získávání součástí krve (např. pro výrobu krevních derivátů), ale i k očistění krve od nežádoucích látek, jako jsou autoprotilátky nebo imunokomplexy. Aferézu lze využít (v kombinaci s jinými technikami) i k odstranění LDL částic při léčbě některých hyperlipoproteinémií, či k výměně červenýchrvinek (u pacientů trpících malárií nebo talasémií). Při **centrifugační elutriaci** se k získání složek krve využívá jiný přístup. Buňky se dělí na základě svých sedimentačních rychlostí (hustoty, objemu) působením vnější odstředivé síly, proti které je aplikován proud tekutiny. Tímto způsobem je možné separovat krevní buňky a buňky kostní dřeně, resp. izolovat různé typy jaterních buněk.

**Tab. 9** Hustota vybraných krevních komponent.

krevní komponenta	hustota (g.ml <sup>-1</sup> )	krevní komponenta	hustota (g.ml <sup>-1</sup> )
plazma	1,027	erythrocyty	1,095
trombocyty	1,040	monocyty	1,060
lymfocyty	1,05–1,07	blasty	1,070–1,080
myelocyty/promyelocyty	1,070	metamyelocyty	1,080
zralé granulocyty	1,090		

### 3.1.4.2 Analytická centrifugace

Základy analytické centrifugace položil v minulém století Theodor Svedberg. Při použití analytické centrifugy je možné sledovat průběh separace optickým systémem, jehož paprsky prochází centrifugační nádobkou. Pro každý vzorek je v rotoru centrifugy uložen kontrolní (slepý) vzorek tak, aby paprsky procházely oběma vzorky (slepým i pracovním) současně. V místě sedimentace částic dochází ke změně indexu lomu kapaliny oproti kontrolnímu vzorku, což se projeví změnou signálu. Konstrukce tohoto typu centrifug je technicky velmi náročná, protože paprsek prochází během rotace rotoru oběma vzorky najednou a současně se zpracovávají informace o více vzorcích. Analytickou centrifugu je možné použít ke studiu částic s molekulovou hmotností od 100 Da do 10 GDa při použití odstředivé síly od 60 do 300 000 g.

Přestože jde v principu o jednoduché techniky s dlouhou historií, techniky založené na sedimentaci, resp. centrifugaci patří a budou patřit mezi nepostradatelné techniky

všech klinických laboratořích. Centrifugace daleko přesahuje analytickou chemii – je využívána nejenom v teoretickém, experimentálním či klinickém výzkumu a v rutinních diagnostických procesech, ale i jako součást léčebných postupů. Právem si proto zaslouží, aby byla v povědomí u všech zdravotnických pracovníků.

## Literatura

- Vaněk O, Bezouška K. Analytická ultracentrifugace a její využití v biochemické laboratoři. *Chem Listy* 2009; 104: 1155–1162.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955; 34 (9): 1345–1353.
- Bonifacino J. S., Dasso M., Harford J. B., Lippincott-Schwartz J., Yamada K. M. ed. John Wiley & Sons, Inc. 2012.
- Ferenčík M, Škárka B, Ferenčík M. *Biochemické laboratorne metody*. Alfa, Bratislava, 1981.
- Pingoud A, Urbanke C, Hoggett J, Jeltsch A. *Biochemical Methods: A Concise Guide for Students and Researchers*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- *Methods in Enzymology: Plasma Lipoproteins Part A: Preparation, Structure, and Molecular Biology* Vol. 128 Edited by Segrest JP, Albers JJ: Academic Press, Inc., Orlando, 1986.
- Golijanin D, Sherman Y, Shapiro A, Pode D. Detection of bladder tumors by immunostaining of the Lewis X antigen in cells from voided urine. *Urology* 1995; 46 (2): 173–177.
- Smith JW. Apheresis techniques and cellular immunomodulation. *Ther Apher* 1997; 1 (3): 203–206.
- Malchesky PS, Nosè Y: Biomodulation effects of extracorporeal circulation in apheresis. *Semin Hematol* 1989; 26 (Suppl 1): 42–51.
- Julius U, Frind A, Tselmin S, Kopprasch S, Pobersch I, Siegert G: Comparison of different LDL apheresis methods. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008; 6 (5): 629–639.
- Kottke BA, Pineda AA, Case MT, Orsuzar AM, Brzys KA: Hypercholesterolemia and atherosclerosis: present and future therapy including LDL-apheresis. *J Clin Apher* 1988; 4 (1): 35–46.
- Bauer J. Advances in cell separation: recent developments in counterflow centrifugal elutriation and continuous flow cell separation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 722 (1–2): 55–69.
- Pretlow TG 2<sup>nd</sup>, Pretlow TP. Centrifugal elutriation (counterstreaming centrifugation) of cells. *Cell Biophys* 1979; 1 (2): 195–210.
- Zahlten RN, Rogoff TM, Steer CJ. Isolated Kupffer cells, endothelial cells and hepatocytes as investigative tools for liver research. *Fed Proc* 1981; 40 (10): 2460–8.
- Ford TC, Rickwood D. Formation of isotonic Nycodenz gradients for cell separations. *Anal Biochem* 1982; 124 (2): 293–298.
- Barber EJ. Calculation of density and viscosity of sucrose solutions as a function of concentration and temperature. *Natl. Cancer Inst. Monographs* 21, 219 (1966).

- Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clin Chem* 2003; 49 (11): 1865–1872.
- Hermens WT, ter Brake O, Dijkhuizen PA, Sonnemans MA, Grimm D, Kleinschmidt JA, Verhaagen J. Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Hum Gene Ther* 1999; 10 (11): 1885–1891.
- Claassens OE, Menkveld R, Harrison KL. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. *Hum Reprod* 1998; 13 (11): 3139–3143.
- Graham JM. Isolation of Golgi membranes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001 May; Chapter 3: Unit 3.9.
- Neves JS, Perez SA, Spencer LA, Melo RC, Weller PF. Subcellular fractionation of human eosinophils: isolation of functional specific granules on isoosmotic density gradients. *J Immunol Methods* 2009; 344 (1): 64–72.
- Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 44 (1–2): 1–30.
- Thompson GR, Catapano A, Saheb S, Atassi-Dumont M, Barbir M, Eriksson M, Paulweber B, Sijbrands E, Stalenhoef AF, Parhofer KG. Severe hypercholesterolaemia: therapeutic goals and eligibility criteria for LDL apheresis in Europe. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21 (6): 492–498.
- Okafor C, Ward DM, Mokrzycki MH, Weinstein R, Clark P, Balogun RA. Introduction and overview of therapeutic apheresis. *J Clin Apher* 2010; 25 (5): 240–249.
- Shelat SG: Practical considerations for planning a therapeutic apheresis procedure. *Am J Med* 2010; 123 (9): 777–784.
- Almici C, Donnenberg AD, Rizzoli V. Counterflow centrifugal elutriation: experimental and clinical applications. *J Hematother* 1992; 1 (3): 279–288.
- Weiskirchen R, Gressner AM: Isolation and culture of hepatic stellate cells. *Methods Mol Med* 2005; 117: 99–113.

### Otázky k přípravě

1. Uveďte faktory, které ovlivňují separaci částic při centrifugaci.
2. Definujte g, rpm a vztah mezi těmito veličinami.
3. Popište složení centrifugy s důrazem na rotor.
4. Shrňte princip a metody centrifugace.
5. Uveďte nejčastější aplikace centrifugace v klinické praxi.

## 3.2 Polymerázová řetězová reakce

M. Beránek

**Molekulární biologie** (MB) se zabývá makromolekulami, které se podílejí na uchování, expresi a reprodukci genetické informace, zejména nukleovými kyselinami a proteiny (bílkovinami). Poznatky z této oblasti se uplatňují v mnoha klinických oborech

při diagnostice dědičných i nedědičných chorob, volbě nejvhodnější strategie léčby a sledování její účinnosti. Vzhledem k charakteru této kapitoly se zaměřím především na problematiku analýzy nukleových kyselin (NA).

NA jsou makromolekuly, které slouží k uchování, expresi a reprodukci genetické informace. Podle struktury je dělíme na **deoxyribonukleovou kyselinu** (DNA) a **ribonukleovou kyselinu** (RNA). Primární struktura DNA tvoří polynukleotidové vlákno složené z deoxynukleotidů vzájemně spojených fosfodiesterovou vazbou. Deoxynukleotidy obsahují zbytek kyseliny fosforečné, deoxyribózu a jednu z nukleotidových bází (adenin, cytosin, guanin nebo thymin). Převážná většina molekul DNA se v přírodě vyskytuje v dvouřetězcovém uspořádání. Můžeme je izolovat z eukaryontních a prokaryontních chromozómů, mitochondrií, plastidů a virů.

V prokaryontní a eukaryontní buňce se nachází mnoho jednořetězcových molekul RNA. Obsahují ribózu, zbytek kyseliny fosforečné, nukleotidové báze (adenin, cytosin, guanin, uracil) a báze modifikované. Vyjma RNA virů vznikají tyto molekuly transkripcí genů v závislosti na typu, diferenciaci, stáří buňky, fázi buněčného cyklu a dalších faktorech. Je známo mnoho typů RNA, které se vzájemně liší strukturou i funkcí – např. mediátorová RNA (mRNA), transferová RNA (tRNA), ribozomální RNA (rRNA), mikroRNA (miRNA), malé interferující RNA (siRNA) nebo guide RNA (gRNA).

Molekulárně-biologické vyšetření, které je zaměřené na analýzu NA, se skládá z několika kroků:

- příprava vzorku NA,
- amplifikace vybraných úseků NA (většinou pomocí polymerázové řetězové reakce, PCR),
- identifikace hledané sekvence anebo kvantifikace NA,
- interpretace získaných dat.

Správná interpretace dat z oblasti NA vyžaduje kromě znalosti použité analytické metody také informace o konkrétní diagnóze a účelu vyšetření. V dalším textu se omezíme na popis prvních tří kroků.

## 3.2.1 Příprava vzorku k analýze nukleových kyselin

### 3.2.1.1 Izolace nukleových kyselin

Výchozím materiálem je vodný extrakt NA. K izolaci lze použít nativní či fixovanou tkáň, tělesné tekutiny nebo buněčné kultury. Po homogenizaci biologického vzorku se provádí rozrušení buněčných membrán a disociace nukleoproteinových komplexů v zásaditém pufru s detergenty. Uvolněné proteiny jsou rozštěpeny proteázami. V další fázi jsou NA izolovány z lyzační směsi některou z následujících procedur.

#### Fenol-chloroformová izolace

Přídavkem pufrovaného fenolu s chloroformem (obě látky se přidávají společně nebo odděleně) a následnou centrifugací dochází k separaci vodné fáze s NA od ostatních (balastních) látek. NA se poté precipituje z vodné fáze v přebytku ethanolu a octanu sodného. Je-li fenol pufrovaný na pH okolo 5, bude sediment (pelet) obsahovat zejména

RNA, při bazickém pH získáváme spíše molekuly DNA. Po centrifugaci a oddělení supernatantu se NA suší a rozpouští v demineralizované vodě nebo ve vhodném pufru.

### Vysolovací extrakční metoda

Po rozrušení membrán a působení proteázy se do lyzační směsi přidá koncentrovaný roztok NaCl a dojde k vysolení bílkovin, které při centrifugaci vytvoří sediment. NA přítomná v supernatantu se zpracuje podobně jako u předešlého postupu.

### Guanidinová extrakční metoda

Guanidinová<sup>106</sup> sůl přidávaná k biologickému vzorku v pufovaném fenolu umožňuje lýzu buněk a uvolnění NA bez působení proteáz. Následuje přidání chloroformu k vodné fázi. Další postup je stejný jako u fenol-chloroformové extrakce. Hodnota pH lyzační směsi určuje, zda budou přednostně izolovány molekuly DNA nebo RNA.

### Izolace NA pomocí separačních kolonek

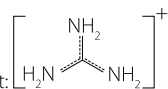
Několik desítek renomovaných výrobců nabízí pro izolaci NA soupravy obsahující plastové extrakční mikrokolonky. Díky působení **chaotropních**<sup>107</sup> solí se NA adsorbují na vrstvu modifikovaného silikagelu<sup>108</sup>. Působením promývacích pufrů je NA v kolonce přečištěna a poté uvolněna do velmi ředěného elučního pufru nebo demineralizované vody. Silikagel může uvnitř kolonek tvořit prstenec propustný pro balastní látky a k separaci dochází na principu chromatografie (viz kap. 3.5). Pohyb látek přes vrstvu silikagelu probíhá na základě centrifugace kolonek nebo pomocí vakua. Druhou možností je použití mikrokolonkových systémů se silikagelovými mikročásticemi vybavenými kovovým jádrem. V tomto případě se k separaci NA vázaných na povrch mikročástic využívá silného magnetu. Aplikací robotických podavačů lze tento proces plně automatizovat.

### Izolace pomocí separačních špiček

Novinkou posledních let jsou plastové špičky určené k nasazení na běžné laboratorní pipety. Vnitřní část špiček je potažena vrstvou modifikovaného silikagelu. K adsorpci a purifikaci NA dochází pomalým protahováním vzorku špičkou pomocí pístu pipety.

**Čistota DNA** a její přibližné **množství** v extraktech se určuje spektrofotometricky (obr. 41). NA mají v důsledku přítomnosti nukleotidových bází absorpční maximum okolo 260 nm. U vzorků s nízkou koncentrací NA (DNA v plazmě, parafinovém bločku, likvoru nebo slinách) se pro kvantifikaci využívá fluorimetrie (fluorescenční interkalační barviva, např. PicoGreen). Informaci o celistvosti izolované DNA lze získat pomocí

106 Guanidin je iminomočovina, tj. látka bazického charakteru tvořící kationt:

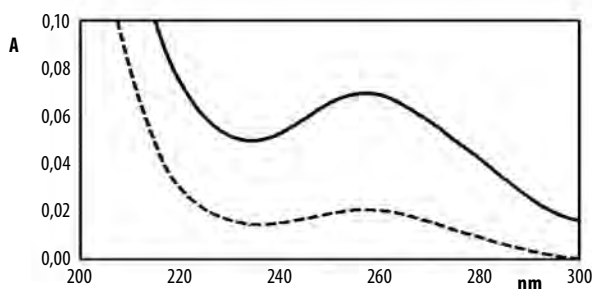


107 Chaotropní vlastnosti mají obecně látky (např. NaI, močovina, ethanol nebo guanidinhydrochlorid), které rozrušují vodíkové vazby mezi sousedními molekulami vody, čímž snižují její strukturovanost.

Ve vyšších koncentracích působí jako denaturační činidla (reverzibilní denaturace proteinů nebo NA).

108 Silikagel je látka složená z molekul SiO<sub>2</sub>. Je chemicky inertní a snadno absorbuje vodu (vlhkost).





**Obr. 41** Optické spektrum DNA molekul v UV oblasti s absorpčním maximem při 260 nm. DNA byla izolována mikrokolonkami z 200 µl krve (plná čára) a 70 µl krve (přerušovaná čára).

gelové nebo kapilární elektroforézy (viz kap. 3.4). Postupy používané při izolaci RNA se v principu neliší od izolace DNA, pokud pracujeme při nízkých teplotách (0–4 °C), v přítomnosti inhibitorů ribonukleáz a používáme sterilizované plasty. Pro separaci molekul mRNA lze použít speciální nosiče, které ve zkumavce hybridizují s polyadenylovými sekvencemi na 3'-koncích transkriptů a lze je tak separovat od zbývajících komponent.

### 3.2.1.2 Reverzní transkripce

RNA-dependentní DNA polymeráza (**reverzní transkriptáza**) je enzym schopný přepsat primární sekvenci nukleotidů RNA do struktury DNA. Výsledkem je jednovláknový řetězec označovaný jako **komplementární DNA (cDNA)**. Proces nazýváme **reverzní (zpětná) transkripce (RT)**. Získanou cDNA lze klonovat, amplifikovat, sekvenovat, zjišťovat její množství, využít jí k přípravě genové knihovny nebo provádět proteosyntézu. Mezi nejznámější a nejpoužívanější reverzní transkriptázy patří **AMV** (zdrojem je enzym viru ptačí myeloblastózy) a **M-MLV** (enzym viru Moloneyové vyvolávající myší leukémii), a telomerázy eukaryontních buněk. Tyto enzymy prodlužují vlákno krátkého oligonukleotidu (**primeru**) ve směru 5'→3' od místa jeho nasednutí na příslušný **RNA templát** (čili vlákno RNA, podle něhož se tvoří komplementární vlákno cDNA). Mimo polymerázovou aktivitu mohou mít tyto enzymy i aktivitu ribonukleázovou a mohou tak během RT degradovat RNA ve vznikajících hybridních molekulách RNA/cDNA. Existují také enzymy s vlastnostmi polymeráz a reverzních transkriptáz (**Tth** termostabilní polymeráza z bakterie *Thermus thermophilus*). RT probíhá obvykle při teplotách 37–42 °C po dobu desítek minut. Řetězce vznikající cDNA mívají délku okolo 1000 nukleotidů<sup>109</sup>. Jako primery se používají oligonukleotidy sekvencně specifické k RNA, oligo (dT) hybridizující k polyadenylovanému konci mRNA nebo směs náhodných hexamerů. V případě **Tth** polymerázy probíhá RT při 60–70 °C a bezprostředně na ni navazuje PCR. Toto spojení je výhodné svým jedнокrokovým charakterem, u ostatních reverzních transkriptáz se po RT musí připravit amplifikační směs k provedení PCR.

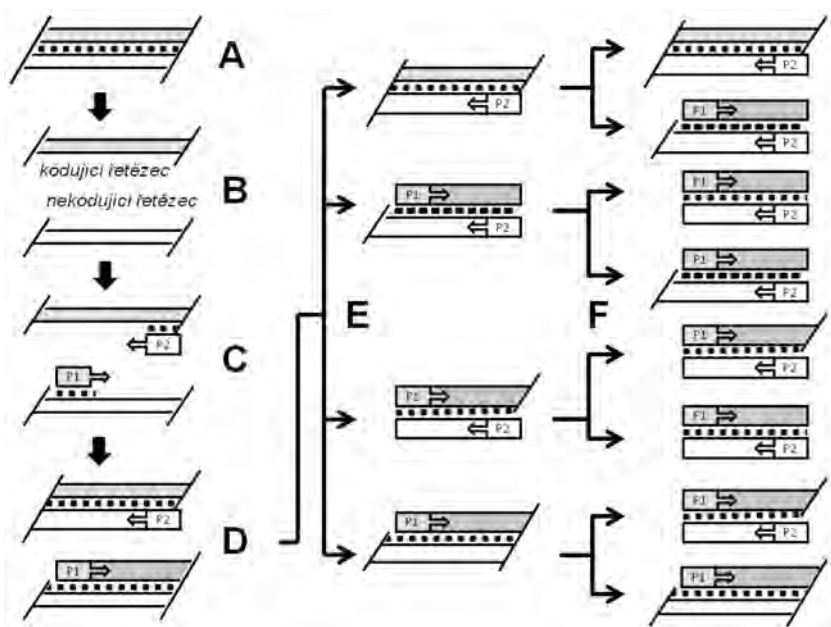
109 Délku (velikost) jednořetězcových molekul NA vyjadřujeme vždy počtem nukleotidů.

## 3.2.2 Amplifikace vybraných úseků NA

### 3.2.2.1 Princip PCR

Při buněčném dělení, resp. při zdvojování vláken DNA, hraje klíčovou úlohu prodlužování řetězce DNA polymerázou. Zásadním mezníkem pro rozvoj PCR na začátku 80. let 20. století byl nápad použít při polymeraci v *in vitro* podmínkách **dvojici primerů**, z nichž každý je komplementární vůči jednomu z DNA řetězců. **Kódující řetězec DNA** (řetězec označovaný též jako sense, forward neboli přímý) musí být při tomto procesu vždy komplementární s nekódujícím (antisense neboli reverzním) primerem. Naopak **nekódující řetězec DNA** je komplementární s forward (sense) primerem. Kódující řetězec DNA a forward primer musí být vzájemně homologní, stejně jako nekódující vlákno a reverzní primer.

Katalytickou aktivitou DNA polymeráz vznikají ve směru 5'→3' od míst nasednutí obou primerů nové řetězce, které jsou po tepelné denaturaci schopny hybridizace s druhým z páru použitých primerů. Opakováním denaturace dvouřetězců, hybridizace primerů (annealing) a polymerace získává reakce svůj cyklický charakter a je možno ji označit termínem **polymerázová řetězová reakce**. Nové řetězce se za optimálních podmínek amplifikují geometrickou řadou. Délku amplifikovaných produktů (**amplikonů**) vymezují pozice obou primerů, resp. jejich vzájemná vzdálenost na vznikajícím dvouřetězci DNA.



**Obr. 42** Princip polymerázové řetězové reakce. Chromozómová DNA (A) je tepelně denaturována (B), poté snížením teploty dojde k hybridizaci primerů P1 a P2 (C) a následuje polymerace (D). V průběhu 2. cyklu (E) a 3. cyklu (F) se počet produktů vždy zdvojnásobuje.

Při PCR s běžnými termolabilními polymerázami (např. z *E. coli* nebo z bakteriofágů T4 a T7) se pracuje v dvouteplotním režimu, tj. s denaturačním krokem (94–96 °C) a krokem, kdy dochází k hybridizaci primerů a polymeraci (37 °C). V každém cyklu je po denaturaci nutno přidat čerstvou polymerázu, protože polymeráza přítomná ve směsi nevratně denaturuje při 95 °C. Přidávání polymerázy není nutné, pokud se pracuje s **rekombinantními termostabilními polymerázami** (pocházejí z termofilních bakterií, např. *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus woese*, *Pyrococcus furiosus*, *Thermus thermophilus* a mnoha dalších), jejichž teplotní optimum pro polymeraci je okolo 72 °C. PCR tak získává **tříteplotní charakter** (denaturace při 95 °C, hybridizace primerů při 50–60 °C a polymerace při 72 °C, obr. 42). Obvyklé délky produktů se pohybují mezi 100 až 3000 párů bází (base pairs, bp). **Počet reakčních cyklů** bývá mezi 30 a 40. Výsledný počet ampliconů se při PCR zvýší až milionkrát.

### 3.2.2.2 Reakční směs pro PCR

Pro **standardní PCR** se dnes používají tyto komponenty: **DNA templát** (čili vlákno DNA, podle něhož se po navázání primeru tvoří činnost polymerázy vlákno komplementární), pár primerů, termostabilní polymeráza,  $Mg^{2+}$  (jako prostetická skupina DNA polymerázy), reakční pufr, voda a další látky (aditiva). PCR lze provést v roztoku (v plastových zkumavkách, mikrotitrační destičce, mikrofluidní kartě, skleněné kapiláře, na podložním sklíčku) nebo v kapce emulze (emulzní PCR). Obvyklé objemy jsou 15–100  $\mu$ l.

### 3.2.2.3 Modifikace PCR

Za dobu své existence prošla PCR desítkami modifikací. V dalším textu budou stručně zmíněny jen ty, které jsou klinicky nejpoužívanější.

#### Alelově specifická PCR

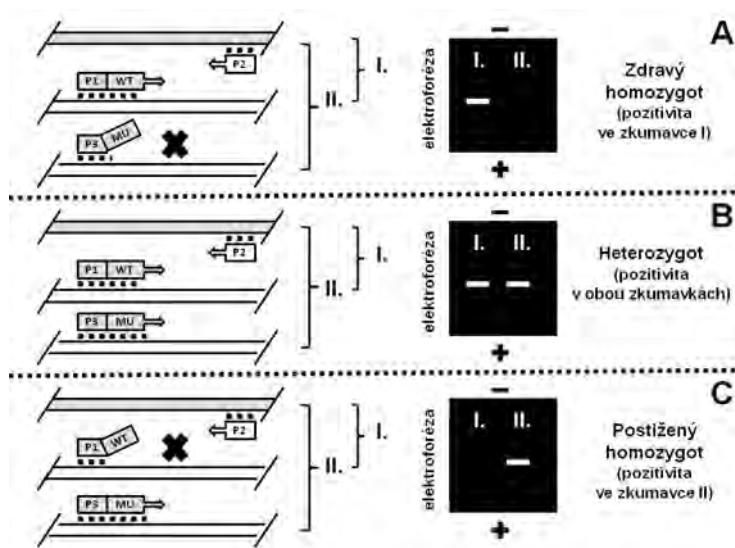
Tato modifikace umožňuje díky záměrnému nukleotidovému přesahu přes místo předpokládané mutace na 3'-konci jednoho z navržených primerů specifickou amplifikaci konkrétní alely genu (obr. 43). Alely nemutované nebo alely obsahující v místech vazby primeru nekomplementární sekvenci nejsou amplifikovány. Proto je tato metoda označována i jako **metoda alelické diskriminace** a používá se k analýze jednobodových mutačních změn a polymorfizmů.

#### Nested (hnízděná) PCR

Metoda tvoří svým uspořádáním dvoustupňový proces, kdy templátem pro druhé kolo amplifikace není sama vyšetřovaná NA, nýbrž PCR produkt z ní vzniklý v kole prvním. Důsledkem této „dvojité“ amplifikace je až o tři řády vyšší citlivost metody. Tato vlastnost předurčuje nested PCR ke kontrole úspěšnosti léčby infekčních i neinfekčních onemocnění, kdy během léčby dochází k poklesu NA související s danou chorobou (např. virové DNA).

#### Multiplexní PCR

Při této metodě je v reakční směsi přítomno několik párů primerů, čímž je generováno více typů ampliconů lišících se vzájemně v délce. To umožňuje identifikovat součas-



**Obr. 43:** Při alelově specifické amplifikaci je každý vzorek (A–C) amplifikován ve dvou zkumavkách obsahujících jiný pár primerů. Ve zkumavce I dochází k amplifikaci zdravé alely, protože primery P1 a P2 jsou plně komplementární vůči normální sekvenci (wt) DNA. Ve zkumavce II se amplifikují DNA templáty obsahující definovanou mutaci (mu), vůči níž je primer P3 komplementární svým 3' koncem. První vzorek neobsahuje produkt ve zkumavce II, jde o zdravého homozygota (A), druhý vzorek je heterozygot (B) a poslední vzorek homozygot pro danou mutaci (C).

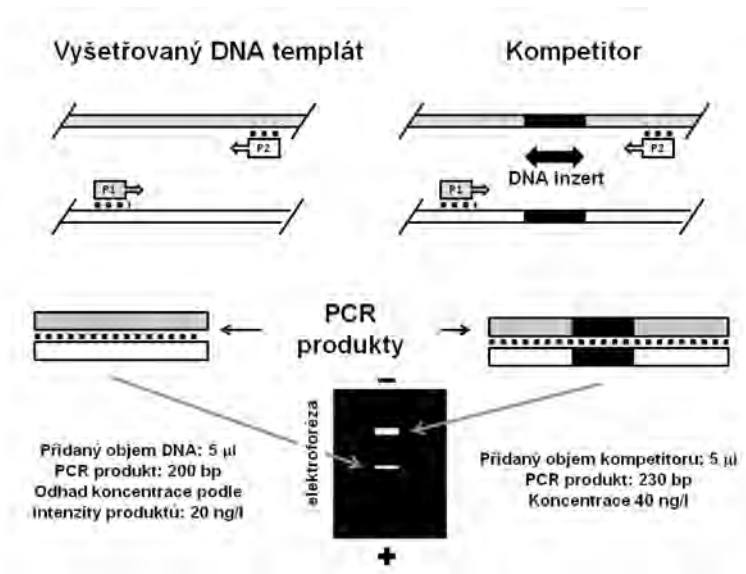
ně několik produktů (téhož genu nebo různých genů) v jedné zkumavce. Metoda se používá u genetických onemocnění, kde je známo několik různých mutací podmiňujících rozvoj choroby.

### Komparativní PCR

Jde o dvě různé amplifikační reakce specifické pro tentýž vyšetřovaný vzorek DNA. Reakce probíhají buď v jedné zkumavce jako multiplexní PCR nebo paralelně ve dvou zkumavkách za stejných analytických podmínek (kromě sekvencí použitých primerů). Účelem komparativní PCR je semikvantitativní odhad exprese sledovaného genu vůči genu referenčnímu – porovnáním intenzit fluorescence obou produktů na elektroforetickém gelu.

### Kompetitivní PCR

Kompetitivní metoda se vyznačuje tím, že se do reakce přidává ve známém množství cizorodá DNA, tzv. kompetitor. Kompetitor je sekvencně homologní s templátovou DNA v místech hybridizace obou primerů. Modifikovaná délka jeho vnitřní sekvence však podmiňuje odlišnou délku výsledného PCR produktu a rozdílnou elektroforetickou mobilitu, než má vyšetřovaný amplicon (obr. 44). Podobně jako v předchozím případě je i tato metoda využívána pro „normalizovaný“ odhad množství DNA přítomné ve vzorku.



**Obr. 44** PCR produkty vyšetřovaného vzorku DNA (vlevo) a kompetitoru připraveného rekombinantní technologií (vpravo) se liší v délce. Při známé koncentraci kompetitoru (40 ng/l) lze díky rozdílům v intenzitě obou proužků na gelu odhadnout koncentraci vyšetřované DNA (20 ng/l).

### Asymetrická PCR

Tato metoda umožňuje přednostní amplifikaci jednoho z řetězců DNA, a to na základě odlišné koncentrace použitých primerů. Metoda představuje jednu z možností, jak připravit dostatečné množství jednořetězcové hybridizační sondy.

### PCR se značeným primerem

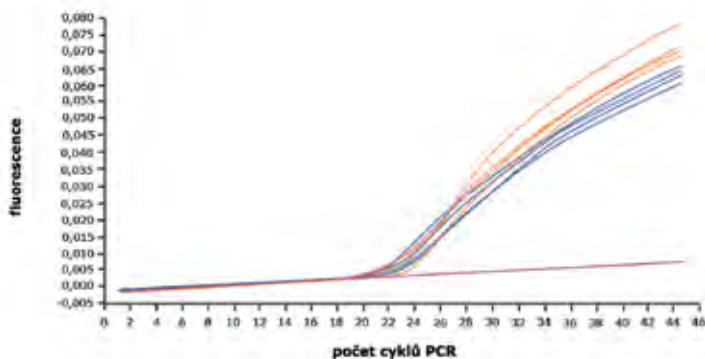
Jde o modifikaci PCR, která vytváří produkty obsahující na 5'-konci jednoho z primerů biotin, digoxigenin, radioaktivní značku ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) nebo fluorofor. Po amplifikaci následuje fáze vizualizace amplikonu pomocí hybridizační sondy (viz odstavec o hybridizačních metodách).

### *In situ* PCR

Jako *in situ* PCR označujeme amplifikaci specifických DNA sekvencí přímo v buňkách nebo tkáňových řezech. Vizualizace probíhá podobně jako při PCR se značeným primerem. Hodnocení se provádí mikroskopicky. Metoda je využívána v molekulární patologii.

### Real-time PCR

Zde je reakční směs obohacena o fluorescenční sondy, které během PCR hybridizují se vznikajícími jednořetězci. Systém je navržen tak, aby k emisi fluorescenčního záření docházelo jen v přítomnosti DNA templátu. V takovém případě má fluorescence v průběhu reakce esovitý charakter typický pro PCR amplifikaci (obr. 45). Metoda využívá



**Obr. 45** Amplifikační křivky při real-time PCR pro vzorky DNA izolované pomocí extrakce fenol/chloroformové (oranžové čáry) a mikrokolonkové metody (modré čáry). Fialová čára představuje negativní kontrolu.

**interkalační látky, hydrolytické fluorescenční sondy a hybridizační fluorescenční sondy**<sup>110</sup>. Široce se uplatňuje v diagnostice chorob, kde hrají vliv jednobodové změny. Další uplatnění nachází metoda při kvantifikaci NA v onkologii, při infekčních onemocněních apod.

### 3.2.2.4 Termocykléry

**Termocyklér** je přístroj, ve kterém se provádí PCR. Jsou na něj kladeny následující požadavky:

- programovatelný teplotní profil v rozsahu 4–100 °C,
- rychlý přechod mezi nadefinovanými teplotami (ramping),
- udržování teplot s přesností na desetiny °C.

Nejjednodušším zařízením pro amplifikaci *in vitro* byla pravděpodobně sestava několika vodních lázní, z nichž každá byla nastavena na jinou cílovou teplotu. Ve skutečném termocykléru jsou všechny operační kroky řízeny mikroprocesorem a vzorky jsou umístěny v kovových blocích pro zajištění rychlých teplotních změn. K těm dochází v průběhu PCR prouděním kapalin o různé teplotě, ohřevem topnou spirálou, prouděním vzduchu, zahříváním pomocí Jouleova tepla nebo změnou proudu v polovodičích (Peltierův jev). Do jednoho přístroje může být vestavěno i několik paralelně pracujících bloků. Termocyklér pro real-time PCR je navíc vybaven zdrojem excitačního záření (LED, halogenová žárovka, laser, viz kap. 2.1), fluorescenčním detektorem (fotobuňka, fotonásobič, CCD kamera, viz kap. 2.3. a 2.5), vyhodnocovací jednotkou s příslušným softwarem a paměťovým médiem. Při hodnocení není nutno používat gelovou elektroforézu.

<sup>110</sup> Příklady interkalačních látek – SYBR Green a SYBR Gold; hydrolytických fluorescenčních sond – klasické TaqMan sondy a Probe Library sondy; hybridizačních fluorescenčních sond – duální hybridizační sondy, Eclipse sondy, Light-up sondy a sondy Scorpions; příklady fluoroforů – Cy5,5, LC705, Texas Red a Yakima Yellow.

### 3.2.3 Identifikace hledané sekvence a kvantifikace NA

Popišme nyní techniky využívané k vyhodnocení produktů PCR a jejich klinické aplikace.

#### 3.2.3.1 Elektroforéza PCR produktů

Elektroforéza (viz kap. 3.4) je instrumentální technika, která provádí separaci, identifikaci a purifikaci NA na základě jejich rozdílné mobility ve stejnosměrném elektrickém poli. Vzhledem k jednotnému zápornému náboji NA je elektroforetická pohyblivost závislá na jejich délce a konformaci. Separace probíhá v agarózovém či polyakrylamidovém gelu s ethidiumbromidem. Moderní pojetí separace ampliconů představuje použití kapilární elektroforézy. Elektroforéza ampliconů se používá při identifikaci NA mikroorganismů vyvolávajících infekční onemocnění, pro určení přestaveb chromozómů, pohlaví jedince nebo pro vyšetření inserce či delece (PCR produkty zde mají atypickou délku oproti zdravé alele).

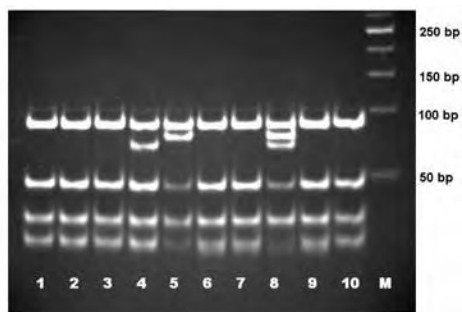
#### 3.2.3.2 Analýza délek restričních fragmentů (PCR-RFLP)

Pokud produkt PCR obsahuje rozpoznávací místa pro některou z restričních endonukleáz, vznikají působením tohoto enzymu **restriční fragmenty**. Součet délek všech fragmentů tvoří délku původního PCR produktu. V případě změny rozpoznávacího místa (např. bodovou mutací v této části DNA) k restrikci nedojde a délka fragmentu objevujícího se na elektroforetickém gelu je totožná s délkou PCR produktu. Metoda se používá při určování genotypu původce infekčních onemocnění – pro predikci vhodného typu léčby, při vyšetření genetického polymorfizmu (obr. 46), vyšetření mutací souvisejících s onemocněním a při nepřímé vazebné analýze (určení segregace chromozómů v rodině).

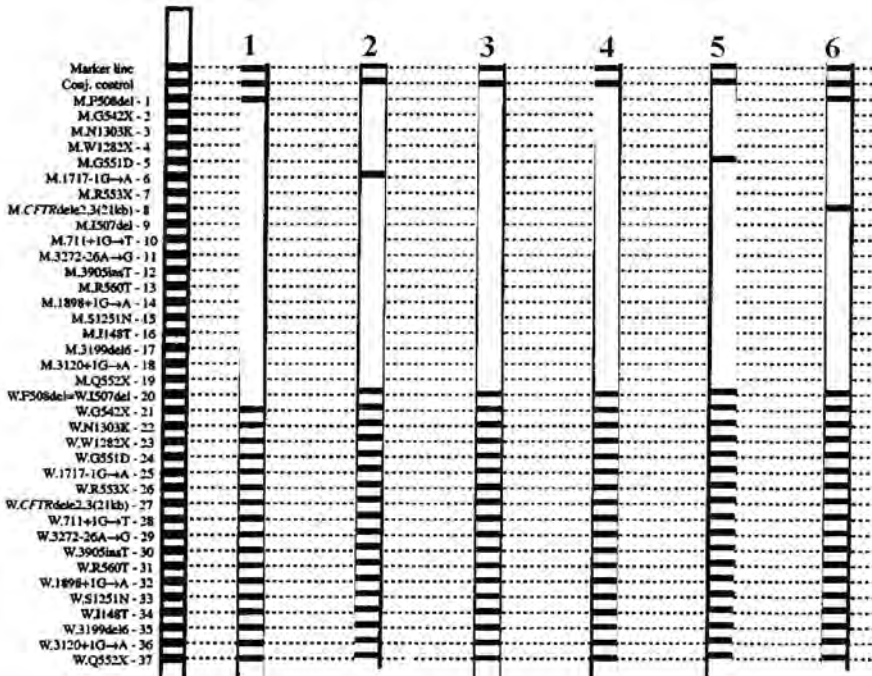
#### 3.2.3.3 Hybridizační metody

Při hybridizaci dochází k vytvoření komplementární vazby mezi jednořetězcovou NA a hybridizační sondou vybavenou příslušným typem značení. Může být značen i PCR produkt (viz PCR se značeným primerem). Pomocí hybridizace lze identifikovat specifický

**Obr. 46** Genotypizace apolipoproteinu E metodou PCR-RFLP. Vzorky 1–3, 6, 7, 9 a 10 představují nejběžnější evropský genotyp apoE 3/3 s fragmenty 91, 48, 38 a 35 bp. Vzorek 4 má genotyp apo E 4/3 (fragmenty 91, 72, 48, 38 a 35 bp), vzorek 5 genotyp apo E 2/3 (fragmenty 91, 83, 48, 38 a 35 bp) a vzorek 8 genotyp apo E 2/4 (fragmenty 91, 83, 72, 48, 38 a 35 bp). M je velikostní DNA marker.







**Obr. 47** Vyšetření mutací v genu *CFTR* pomocí hybridizační metody se značeným primerem (biotinem). Vzorek č. 1: pacient s cystickou fibrózou (homozygot pro mutaci *F508del*); vzorek č. 2: heterozygotní nosič mutace 1717–1G–A; vzorky č. 3 a 4: osoby bez prokázané mutace; vzorek č. 5: heterozygotní nosič mutace *G551D*; vzorek č. 6: pacient – smíšený heterozygot s mutacemi *F508del* a *dele2,3 (21kb)*.

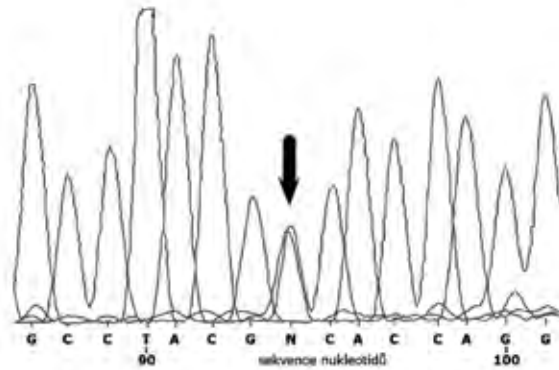
fragment NA přítomný na pevném nosiči<sup>111</sup>. Analýza se provádí manuálně nebo automaticky pomocí mikročipů (viz kap. 2.3). Hybridizační metody jsou vhodné pro identifikaci běžné a mutované sekvence genu (obr. 47), identifikaci NA mikroorganismů a pro cytogenetické vyšetření chromozómů (metoda fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH).

### 3.2.3.4 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA určuje **pořadí nukleotidů** v příslušném fragmentu NA, tedy primární strukturu polynukleotidového řetězce. Existuje několik sekvenačních technik (Sangerovo sekvenování, minisekvenování, pyrosekvenování, sekvenování nové generace, aj.). Analýza je dnes do značné míry automatizována a k dispozici je řada programů pro hodnocení získaných sekvencí (obr. 48). Metoda se používá pro identifikaci původců infekčních onemocnění, sekvenování molekul RNA, chromozómové či mitochondriální DNA, pro identifikaci mutací vzniklých *de novo* a mutací somatických (nádorová onemocnění). Mimo to se sekvenování používá také pro confirmaci výsledků získaných jinými molekulárně-biologickými metodami.

<sup>111</sup> Může jít o nylonovou nebo nitrocelulóзовou membránu, plastovou destičku, sklo nebo křemíkovou vrstvu.





**Obr. 48** Ukázka sekvenování DNA pomocí přístroje založeného na bázi kapilární elektroforézy (další detaily viz kap. 3.4). Šipkou je vyznačeno místo bodové mutace.

### 3.2.3.5 Analýza heteroduplexů

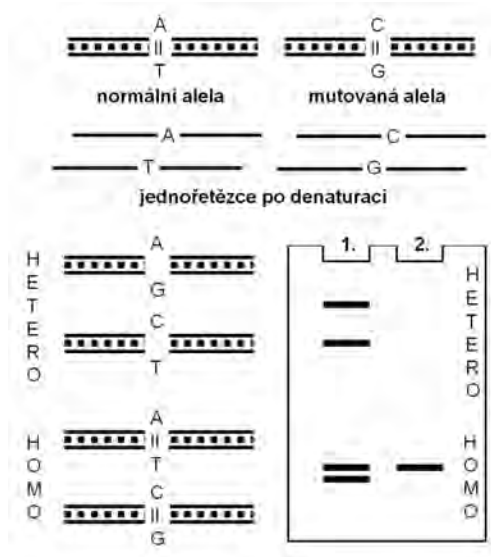
Analýza heteroduplexů patří mezi screeningové metody. Vychází z faktu, že pokud se dostanou do kontaktu dva **zčásti komplementární** řetězce PCR produktu, z nichž jeden bude mít normální sekvenci (wild-type, wt) a druhý bude mutovaný, nebudou při tvorbě dvouřetězce hybridizovat v celé své délce. K této situaci dochází nejčastěji při analýze DNA heterozygotů. Delece, inserce i nukleotidové substituce tak budou vytvářet **nespárované části**, které se budou projevovat jako „bublíny“ nebo „smyčky“. Takové struktury se označují jako **heteroduplexy**. Jejich rozvolněný charakter je příčinou změn pohyblivosti v nedenaturačním elektroforetickém gelu nebo v chromatografické koloně (denaturační HPLC, viz kap. 3.5) vůči plně komplementárním dvouřetězčům (**homoduplexům**) přítomným u homozygotů (obr. 49). Pomocí této metody lze prokázat zárodečné i somatické typy mutací a vyhledávat mutace **de novo** při screeningu geneticky podmíněných chorob. Konfirmační metodou pro potvrzení nálezu mutace je sekvenování DNA.

### 3.2.3.6 Analýza jednořetězcového konformačního polymorfizmu (SSCP)

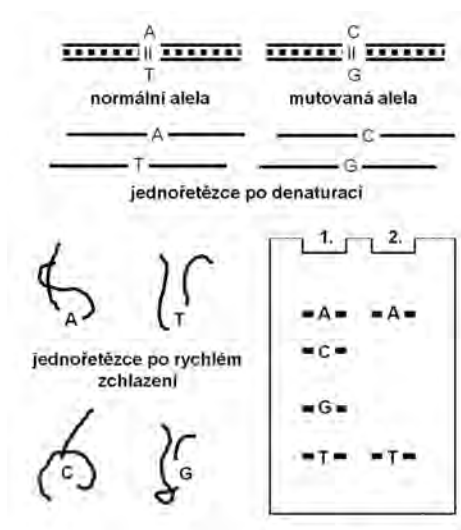
U této metody dochází k tepelné denaturaci PCR produktů na jednořetězce a následně k jejich rychlému ochlazení v ledové lázni. Tím se zabrání vytvoření dvouřetězců. Jednořetězce se aplikují do nedenaturačního polyakrylamidového gelu a zjišťuje se změna jejich pohyblivosti oproti jednořetězčům ve vzorku zdravé osoby. Jelikož mutace přítomná uvnitř jednořetězce může při elektroforéze měnit jeho prostorový tvar, mění se následně i jeho elektroforetická mobilita (obr. 50). Každý vzorek s atypickým nálezem je následně sekvenován. Klinické aplikace metody jsou podobné jako u analýzy heteroduplexů, jde o screeningovou metodu.

### 3.2.3.7 Analýza teploty tání PCR produktu s vysokým rozlišením (HRM)

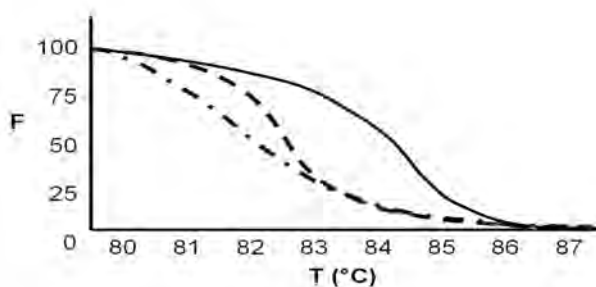
Jde o analýzu prováděnou v termocykléru bezprostředně po real-time PCR. Amplikony jsou v přítomnosti interkalačních fluorescenčních barviv velmi pomalu zahřívány k teplotě, při níž dojde k denaturaci dvouřetězce DNA a poklesu fluorescence. Různé hodnoty teploty tání heteroduplexů a homoduplexů, stejně jako homoduplexů s mutací a bez



**Obr. 49** Analýza heteroduplexů. Heterozygot tvoří při tepelné denaturaci dva typy kódujících a dva typy nekódujících řetězců amplikonů (horní část). Ochlazením vznikají ve zkumavce původní plně komplementární dvouřetězce – homoduplexy a zkrřížením vzniklé zčásti komplementární dvouřetězce – heteroduplexy (levá dolní část). Pravá dolní část ukazuje pohyblivost homoduplexů a heteroduplexů u heterozygota (dráha 1) v porovnání s homoduplexy homozygota (dráha 2).



**Obr. 50** SSCP analýza. Po tepelné denaturaci amplikonů (horní část) a rychlém ochlazení získávají jednořetězce specifický tvar v závislosti na jejich struktuře (dolní levá část). Prostorové uspořádání ovlivňuje mobilitu jednořetězců při elektroforéze v nedenačném gelu (dolní pravá část), dráha 1: heterozygot, dráha 2: zdravý homozygot.



**Obr. 51** Analýza teploty tání metodou HRM. Plná čára: zdravý homozygot; přerušovaná čára: heterozygot; čerchovaná čára: postižený homozygot.

mutace, umožňují využít tuto metodu pro screeningové účely (obr. 51). Metoda HRM je velmi citlivá a oproti ostatním screeningovým metodám také velmi rychlá, snadno proveditelná a levná. Na druhou stranu, změny teploty tání nemusí být vždy dostatečně informativní a výsledek vyšetření mnohdy závisí na typu mutace.

Objev PCR amplifikace svou odzbrojující jednoduchostí a univerzálností změnil pohled mnoha akademických a klinických pracovišť na molekulární biologii. Vysoká účinnost této reakce výrazně snížila požadavky na množství NA a objem biologického vzorku potřebného k analýze. Díky real-time PCR lze v mnoha případech vyšetření uzavřít bez nutnosti elektroforetické separace amplikonů. Real-time PCR také poprvé nastolila otázku vytvořit zcela automatickou molekulárně biologickou linku s extraktory NA, centrifugami, termocykléry, robotickými rameny či samoobslužnými mrazicími boxy. Velký boom PCR usnadnilo přenesení reakce ze zkumavek do mikrotitračních destiček umožňujících paralelní tvorbu amplikonů v 96 a 384 jamkách.

Novinkou, která brzy najde uplatnění v klinické praxi, je metoda **cold PCR** charakteristická sníženou teplotou denaturace, při níž se kompletně rozvolňují řetězce DNA molekul obsahujících díky mutacím nekomplementární páry bází. Výhradně u nich totiž následně dojde k nasednutí primerů a cílené amplifikaci.

Zajímavou technickou novinkou se slibnou perspektivou je **digitální PCR**, při které jsou veškeré amplikony jednotlivě distribuovány do kapek emulze, jamek mikrodestiček, kapilár, mikročipů nebo jsou adsorbovány na pevnou fázi. Úspěšnost amplifikace je hodnocena podle fluorescence každého kompartmentu (každé kapky, jamky, kapiláry, apod.), který by mohl obsahovat amplikony. Výsledkem je tedy určení absolutního počtu amplikonů příslušného typu v daném vzorku.

Z uvedeného výčtu zní až téměř neuvěřitelně, že by se v budoucnu přístrojová technika mohla obejít bez PCR. Přesto se myšlenky výrobců začínají ubírat i tímto směrem, například v souvislosti se sekvenačními technologiemi třetí a čtvrté generace, jejichž aplikace lze očekávat v následujících letech.

## Literatura

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A. a kol. Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky. 2. české vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005, 740 s., ISBN 80-902906-2-0.

- Křemen, J., Pohlreich, P., Stříbrná, J. Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998, 117 s., ISBN 80-8174-504-3.
- Mazura, I., Michalová, K., Brdička, R., Mácha, J. Speciální metody molekulární biologie. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2001, 101 s. ISBN 80-246-0258-X.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. Metody molekulární biologie. 1. dotisk 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

### Otázky k přípravě

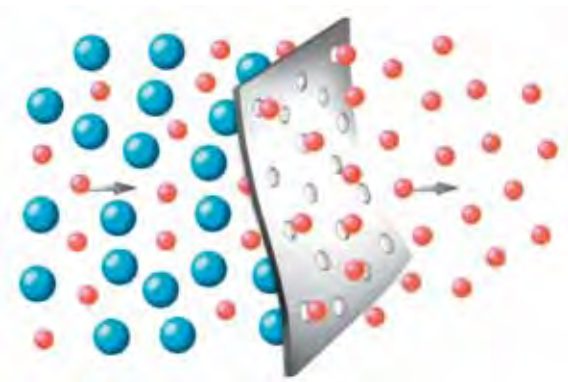
1. Charakterizujte rozdíly mezi molekulou DNA a RNA.
2. Popište princip PCR.
3. Jaké je složení reakční směsi při PCR?
4. Jaký význam má značení primerů?
5. Vysvětlete rozdíly mezi screeningovými metodami detekce mutací DNA.

## 3.3 Membránové separace

J. Vacek, N. Cibiček

Membránové separace, ačkoliv jsou založené na jednoduchém principu, mají v rutině i výzkumně zaměřené medicíně široké uplatnění. Řadí se sem nejenom řada bioanalytických technik využitelných v laboratorní diagnostice, ale i techniky léčebné. K oddělování složek směsí je využívána **polopropustná** (semipermeabilní, nebo lépe selektivně-permeabilní) **membrána**, která zajišťuje průchod nebo naopak zádrž (retenci) určitých látek. Plní tak funkci „filtru“ který selektivně propouští některé molekuly, a to na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, primárně molekulové hmotnosti (obr. 52). Mezi membránové separace řadíme dialýzu, elektrodialýzu, reverzní osmózu, ultrafiltraci, mikrofiltraci, mikrodialýzu a další techniky. Liší se především použitou hnací (eluční) silou separačního procesu.

**Obr. 52** Membránová separace – schematické znázornění separačního principu. Polopropustná membrána propouští nízkomolekulární frakci (vpravo), přičemž vysokomolekulární komponenta vzorku je zadržována (vlevo).



### 3.3.1 Membrány

K membránovým separacím jsou nejčastěji využívány **mikroporézní membrány** nebo tzv. **ultrafiltrační (anizotropní) membrány**, které jsou z hlediska nežádoucího zanášení pórů vhodnější (viz dále). Zdokonalení technologie výroby polymerů umožnilo zavést membrány i ve formě dutých vláken (hollow fibers). Každá membrána je charakterizována svým chemickým složením, fyzikálními vlastnostmi i rozměry. Dělicí rozsah je specifikován tzv. **cut off** hodnotou, jež udává nejmenší molekulovou hmotnost molekul, kterou je membrána schopna zadržet. Cut off hodnoty se obvykle uvádějí v (kilo)daltonech (Da, kDa); v případě nukleových kyselin může jít o počet nukleotidů v řetězci (base pairs, bp, viz kap. 3.2). Kromě dělicího rozsahu bývají membrány charakterizovány i max. hodnotou průtočnosti, rozsahem pracovních tlaků, teplot a pH. Významným parametrem je také odolnost membrány vůči dezinfekčním činidlům a organickým rozpouštědlům.

### 3.3.2 Dialýza, elektrodialýza a mikrodialýza

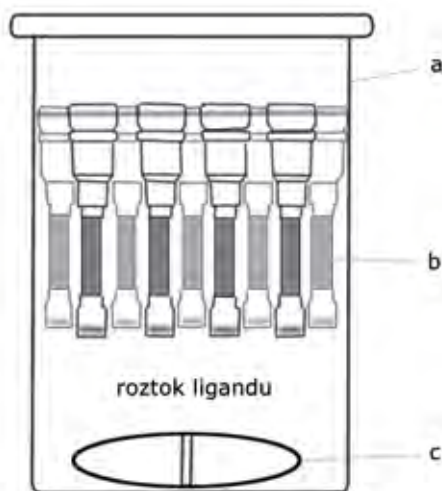
Techniky založené na membránové separaci lze považovat za modifikace výchozí techniky, jíž je **dialýza**. Princip dialýzy spočívá v prosté difúzi molekul z roztoku na jedné straně membrány do roztoku na straně druhé. Hnací silou procesu je **koncentrační gradient** (neboli spád) separované látky mezi vnitřní a vnější stranou membrány – difúze probíhá z místa s vyšší koncentrací dané látky do místa s nižší koncentrací této látky.

Mezi hlavní bioanalytická využití dialýzy patří odstraňování nízkomolekulárních látek ze vzorku s obsahem makromolekul. Nejznámějším příkladem je odsolování proteinů. Dialýza, jakožto metoda purifikační, nachází uplatnění napříč experimentálními obory. S výhodou ji lze využít při cíleném značení proteinů a DNA nízkomolekulárními látkami (sondami, viz kap. 3.2) – po proběhnutí reakce je nadbytek nezreagované sondy ze vzorku snadno odstraněn. Další oblastí aplikace dialýzy je studium interakcí proteinů a DNA s nízkomolekulárními ligandy (např. léčivy). Dialýza zde může sloužit jednak k odstranění nenavázaného léčiva, které by mohlo interferovat s analýzou produktů interakce a jednak jako prostředek v analýze typu Competition Dialysis Assay (CDA). Principem CDA je (po ustanovení rovnováhy) oddělení léčiva navázaného na DNA uvnitř dialyzačních trubic od volné frakce léčiva nacházející se v pracovním roztoku, do kterého jsou tyto trubice ponořeny. Stanovení léčiva jak v pracovním roztoku, tak uvnitř dialyzačních trubic umožní posoudit míru jeho interakce s DNA – interakce je tím větší, čím více koncentrace léčiva uvnitř dialyzačních trubic převyšuje jeho koncentraci v pracovním roztoku (obr. 53).

Vzhledem k tomu, že prostá difúze s ustalováním rovnováhy mezi roztoky je časově náročný děj, jsou k urychlení dialýzy využívány magnetické míchačky a průtokové systémy. V průtokovém systému může být výhodné využití protisměrného toku obou roztoků, což zajistí zachování koncentračního gradientu po celé délce dialyzační membrány. Průtokový systém má velký význam v klinice, a to při extrakorporálních eliminač-

**Obr. 53** Dialyzační souprava pro analýzu interakcí nízkomolekulárních látek s DNA.

a – kádinka,  
b – dialyzační patry obsahující DNA,  
c – magnetické míchadlo.



ních metodách (renal replacement therapy, RRT<sup>112</sup>) jako je **hemodialýza**. Při nastavení specifických podmínek jako je složení dialyzačního roztoku a jeho průtok umožňuje hemodialýza velmi efektivní léčebné odstranění nepotřebných, nežádoucích nebo toxických nízkomolekulárních látek<sup>113</sup> z plazmy pacienta s renálním selháním, případně obohacení plazmy o látky pro organismus důležité.

Jinou formou urychlení separačního procesu je aplikace stejnosměrného elektrického napětí. Technika **elektrodialýzy** kromě velikosti částic rozděluje látky i na základě jejich náboje. Typické elektrodialyzační zařízení je složeno ze dvou membrán s rozdílnou selektivitou ke kationtům a aniontům. Může být využito, podobně jako klasická dialýza, k odsolování proteinů, k purifikaci aminokyselin, nebo k izolaci enzymů.

Další modifikací dialýzy je **mikrodialýza**. Tato technika se v posledních desetiletích etablovala<sup>114</sup> jak v základním, tak v aplikovaném (experimentálním i klinickém) výzkumu. Nyní si intenzivně hledá místo i v rutinní laboratorní diagnostice. Klíčovým prvkem mikrodialyzační sestavy je miniaturní sonda (katetr), součástí které je polopropustná membrána (obr. 54). Sonda může být ponořena do analyzovaného vzorku (*in vitro*) anebo implantována do živé tkáně (*in vivo*). Poté je napojena na dávkovač (pumpu) a systém trubic, které přivádí do prostoru mikrodialyzační membrány nosné médium (perfuzát<sup>115</sup>). Po částečné výměně molekul perfuzátu s okolním prostředím vzniká dialyzát. V případě off-line přístupu je dialyzát jímán pomocí chlazeného kolektoru frakcí

112 Do skupiny technik RRT řadíme kromě hemodialýzy i hemofiltraci a hemodiafiltraci (viz dále). Techniky se dělí na intermitentní (probíhající s přestávkami) a kontinuální (bez přestávek). Zvláštní formou je peritoneální dialýza – dialyzační roztok se aplikuje do peritoneální dutiny, dialyzační membránu pak tvoří peritoneum.

113 Jde většinou o akumulované metabolity při selhání ledvin, látky uvolněné z tkání při traumatech, předávkovaná farmaka nebo absorbované jedy při intoxikacích.

114 Mikrodialýza byla úspěšně zavedena. Celosvětově ji využívají stovky odborných týmů, a to zejména ve Skandinávii a USA.

115 Jde obvykle o roztok elektrolytů imitující extracelulární tekutinu nebo o pufr o definované iontové síle a pH.

**Obr. 54** Mikrodialyzační sestava pro *in vivo* (off-line) mikrodialýzu a schematické znázornění funkce mikrodialyzační sondy (vložený obrázek) implantované do tkáně. Mikrodialyzační pumpa (A), plastová kapilára (vstup perfuzátu, B), aktivní, dialyzační část sondy (C), plastová kapilára (výstup dialyzátu, D), mikrodialyzační zkumavka (E), analyzátor (F). (Převzato z volně dostupných materiálů firmy CMA Microdialysis AB).



do mikrozkupek k pozdější analýze. On-line napojení přímo na chromatografickou kolonu (viz kap. 3.5) s detektorem nebo na elektrochemický detekční systém (viz kap. 2.3) umožňuje kontinuální sledování vývoje koncentrací s jen malou časovou prodlevou. Celý systém lze miniaturizovat do formy „lab on a chip“ (viz kap. 2.3).

Rozvoj mikrodialyzačních technik určených ke stanovení širokého spektra látek v extracelulární tekutině jednotlivých tkání a orgánů umožnil monitorování důležitých biochemických, fyziologických a farmakologických parametrů. Nejčastějšími a z hlediska rutinní praxe nejnadějnějšími *in vivo* aplikacemi mikrodialýzy jsou monitorace metabolitů, neurotransmiterů a/nebo volných (tj. účinných) frakcí farmak v mozkové tkáni, podkožním tuku, svalu, transplantovaných myokutánních lalocích a orgánech gastrointestinálního traktu. Za zmínku stojí také výzkum bariérové funkce, a to zejména v oblasti CNS (prostup látek přes hematoencefalickou bariéru). Mikrodialýza slouží především intenzivistům, chirurgům, (klinickým) farmakologům a výzkumníkům v oblasti neurověd.

### 3.3.3 Reverzní osmóza a membránové separace za zvýšeného tlaku

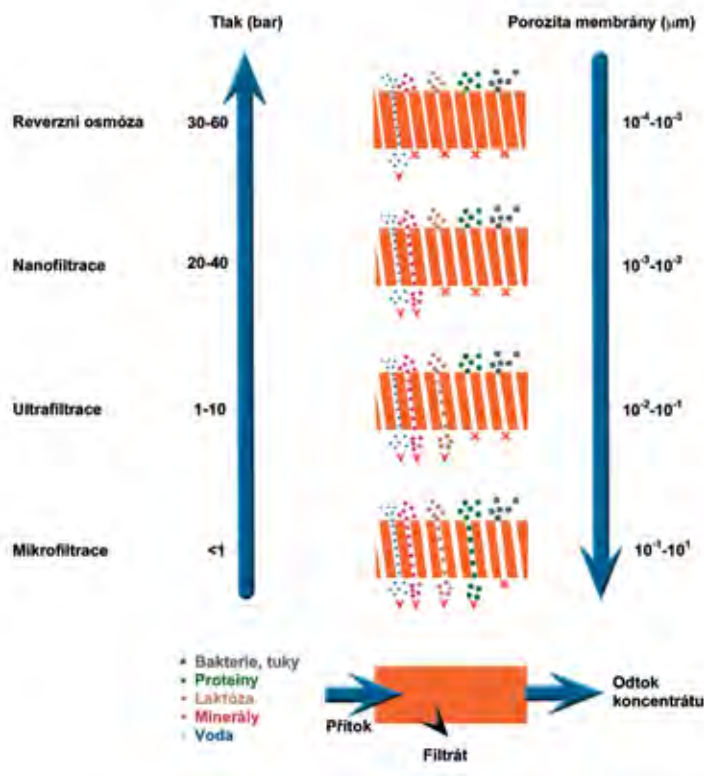
K urychlení separačního procesu se zde využívá rozdílných tlaků na obou stranách polopropustné membrány. Kromě reverzní osmózy<sup>116</sup> je zvýšeného tlaku využíváno i v případě **nanofiltrace**, **ultrafiltrace** a **mikrofiltrace**. Tlak nutný pro separaci se v daném pořadí snižuje, propustnost membrány naopak roste. Výsledkem je, že v případě reverzní osmózy prostupuje přes membránu pouze rozpouštědlo, naproti tomu mikrofiltrační membrány umožňují průnik širokého spektra látek od nízkomolekulárních analytů a jejich komplexů až po větší proteiny (obr. 55). V laboratorní praxi jsou membránové separace za zvýšeného tlaku využívány k odsolování vzorku, odstranění nevhodného média, ve kterém je vzorek rozpuštěn, zakoncentrování vzorku, odstranění interferujících látek (detergentů, denaturačních činidel) ze vzorku, purifikace nukleových kyselin

<sup>116</sup> Reverzní osmóza se od osmózy liší tím, že rozpouštědlo neprochází přes semipermeabilní membránu z méně koncentrovaného roztoku do roztoku koncentrovanějšího, ale díky tlaku vyvíjenému na koncentrovanější roztok, proudí směrem obráceným (velikost vyvíjeného tlaku přitom musí přesahovat velikost tlaku osmotického).



a proteinů a odstranění buněčných fragmentů nebo bakterií ze vzorku. Analogicky lze výše uvedené procesy využít i léčebně, a to v rámci dalších metod RRT – **hemofiltrace** a hemodiafiltrace. Hemofiltrace (ultrafiltrace) se liší od hemodialýzy – kromě typu membrány a velikosti hydrostatického tlaku – i tím, že na druhé straně membrány není přítomen dialyzační roztok. Rozpuštěné látky (solyty) tudíž prostupují přes membránu společně s molekulami rozpouštědla (solventu) na principu **konvekce** (proudění). Objem krve tím klesá a musí být pacientovi hrazen roztoky krystaloidů. Jestliže je hemofiltrace kombinována s hemodialýzou, mluvíme o hemodiafiltraci.

Experimentální aparatury pro separace za zvýšeného tlaku mohou být technicky/konstrukčně nenáročné. V případě mikrofiltrace je mikrofiltrační cela s nanoseným vzorkem umístěna do centrifugační zkumavky. Během centrifugace prochází část vzorku z mikrofiltrační cely do centrifugační zkumavky a část vzorku (obvykle vysokomolekulární frakce) zůstává na povrchu polopropustné membrány (viz kap. 3.1). Namísto odstředivé síly dosažené při centrifugaci mohou být použity injekční stříkačky nebo automatické perfuzory. Na rozdíl od klasických dialyzačních metod jsou metodické postupy založené na separacích za zvýšeného tlaku komplikovány častým ucpáváním membránových filtrů, což snižuje jejich účinnost. V průběhu filtrace totiž dochází k vytvoření vrstvy makromolekulárních látek na povrchu membrány, které blokují další transport vzorku přes membránu. Problém lze vyřešit umístěním magnetické míchač-



**Obr. 55** Membránové separace za zvýšeného tlaku a jejich aplikace.



ky přímo do filtrační cely nebo pomocí techniky filtrace za tangenciálního toku. Tato technika je založena na aplikaci čerpadla, které žene roztok vzorku ve směru rovnoběžném s membránou a nežádoucí vrstva tvořící se na jejím povrchu je tak kontinuálně narušována. V průběhu membránových separací může také docházet k zanášení membrány („membrane fouling“). Tento jev lze ovlivnit pouze volbou vhodné membrány a optimálním nastavením separačního postupu.

Podobně jako centrifugační techniky (viz kap. 3.1) i membránové separační techniky jsou nepostradatelnou součástí bioanalytických laboratoří, přičemž mají nezastupitelný terapeutický význam. Kromě již zmíněných diagnostických a léčebných aplikací plní membrány i řadu dalších funkcí. Uplatňují se jako cílový nosič pro přenos proteinů z matrice elektroforetického gelu (western blotting, viz kap. 3.4. a 2.4), plní důležitou funkci ochranných a permselektivních komponent chemických senzorů (viz kap. 2.3), jako filtry se využívají také pro dezinfekci roztoků. V rámci RRT mohou membrány sloužit i jako adsorbens (např. pro cytokiny). Další možnosti jejich využití otevírá příchod nových mikrofiltračních technik (mikrofiltrační kolony a cely) kombinovaných s technikami centrifugačními.

## Literatura

- Bílková K, Králová B. Izolace biomakromolekul. VŠCHT v Praze, Praha, 1997. p. 22–38.
- Cibiček N, Živný P. Mikrodialýza a její využití v experimentálním a klinickém výzkumu. In: Metodologie předklinického a klinického výzkumu (Ed.: Zadák Z, Květina J). Galén, Praha, 2011. p. 100–122.
- Opatrný K, Polakovič V. Mimetělní metody nahrazující funkci ledvin. In: Praktická nefrologie (Ed. Teplan V, et al.). Grada, Praha. 2006. p. 385–404.
- Shtilman Ml. Polymers for medicobiological use. Polymer Sc. – Series A. 2010; 52: 884–899.
- Strathmann H, Giorno L, Drioli E. An introduction to membrane science and technology. Institute on Membrane Technology, CNR-ITM at University of Calabria, Italy, 2006. p. 3–13.
- van Reis R, Zydney A. Membrane separations in biotechnology. Curr Opin Biotechnol. 2001; 12: 208–211.
- Walter JK, Jin Z, Jornitz MW, Gorrschalk U. Membrane separations. Methods of biochemical analysis, 2011; 54: 281–317.

## Otázky k přípravě

1. Popište rozdíly mezi dialýzou, osmózou a reverzní osmózou.
2. Stručně charakterizujte vlastnosti membrán používaných pro separaci látek.
3. Popište princip a využití mikrodialýzy.
4. Jaké funkce plní membránové separace v léčbě selhání ledvin?
5. Uveďte nejčastější problémy spojené se separacemi za zvýšeného tlaku.

## 3.4 Elektroforéza

J. Vávrová, N. Cibiček

Elektroforéza je analytickou metodou separace ionogenních látek v roztoku průchodem elektrického proudu na zřetelně ohraničené zóny. Obecně jsou modifikace elektroforetických metod nazývané **elektromigračními technikami**. V klinické praxi je častou a finančně nenáročnou aplikací využití zónové elektroforézy pro získání skriningového pohledu na základní skupiny sérových proteinů, patologické nálezy bývají poté upřesňovány např. při typizaci imunofixací (viz kap. 2.4).

### 3.4.1 Elektroforéza – teoretické základy

Každá volná elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem svého náboje a orientací elektrického pole. Je zřejmé, že méně objemné částice s větším nábojem se budou pohybovat rychleji než částice objemné nesoucí malý elektrický náboj. Vlastní elektroforetická separace je dána tím, že přenos elektrického náboje je zároveň přenosem hmoty, tj. pohybem dělených látek. Uspořádání klasické elektroforetické sestavy (obr. 56) předpokládá použití elektroforetické vany se dvěma oddělenými zásobníky separačního pufru. Katodický a anodický prostor obsahují elektrolyty, jež jsou vodivě spojeny s plochou, na které dělení probíhá. Do prostorů s elektrolytem jsou vloženy elektrody (katoda, anoda), na něž je ze zdroje vkládáno stejnosměrné elektrické napětí. Odvod tzv. Joulova tepla vznikajícího průtokem elektrického proudu elektrolytem bývá obvykle zajištěn chlazením spodní části desky se separačním médiem. Ohřev separačního gelu je limitujícím faktorem pro používání vysokých napětí a proudů, protože následkem vznikajícího tepla může dojít k destrukci separovaných látek, či deformacím získaných elektroforetických zón.



**Obr. 56** Schéma elektroforetického uspořádání pro zónovou elektroforézu na gelovém nosiči.

Dalšími efekty uplatňujícími se při elektroforéze, které je třeba zohlednit při definování elektroforetických podmínek analýzy, jsou **elektroendoosmóza**<sup>117</sup>, difúze, či gravitace. Elektroforéza v plošném uspořádání probíhá na gelových nosičích. Gely jsou obvykle komerčně dostupné, jsou umístěny na podložkách, především plastových, průhledných, méně často se již setkáváme s podložkami skleněnými. Gely samotné bývají tvořeny přírodními materiály – acetylcelulózou, agarem, či agarózou. Nejvýznamnějším hydrofilním gelem v elektroforézách je však **polyakrylamidový gel (PAG)**. Polymer tvoří většinou lineární řetězce zesíťované v určitých intervalech methylenovými můstky. Vytvoření gradientu koncentrace umožňuje separaci podle velikosti molekul. Nevýhodou přípravy tohoto gelu je však vysoká nebezpečnost monomeru, který je silným neurotoxinem.

Elektroforéza biologických tekutin se zabývá převážně **separací proteinů**. Identifikace rozdělených zón se provádí nejčastěji obarvením<sup>118</sup> proteinu, protože proteiny samotné většinou barvu nemají, čili nejsou chromofory. Další možností je např. radio-detekce (je-li protein před elektroforézou označen radioaktivním izotopem, viz kap. 2.5), aktivní barvení se substrátem, western blotting (viz dále), barvení stříbrem nebo vizualizace přísadou fluoreskující látky (viz kap. 2.1) do elektrodového pufru, či gelové matrice. Principem klasického barvení je zafixování proteinu v gelu, kde je poté obarven. Gel se po elektroforéze ponoří do roztoku barvy v alkoholu (metanolu) a slabé kyseliny (kyseliny octové), kde se určitou dobu ponechá mírně třepat. Po obarvení se vymyje barva nespecificky navázaná jako pozadí, na gelu zůstane barva jen v místech, kde se navázala na fixovaný protein. Kvantitativní hodnocení zastoupení jednotlivých zón na gelech se provádí **denzitometricky**. Jedná se o postup podobný fotometrickému měření, liší se však ve svém uspořádání. Nejpoužívanější variantou denzitometrie je měření intenzity záření procházejícího průhlednou plochou **elektroforeogramu**<sup>119</sup> po vybarvení a usušení gelu umístěného na průhledné podložce. Získává se grafický záznam fotometrovaného úseku, jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha píků připadajících jednotlivým frakcím je úměrná relativnímu zastoupení těchto frakcí v dělené směsi.

117 Pohyb kapaliny způsobený elektroendoosmózou působí rušivě na ostrost zónových rozhraní. Dochází k interakcím děleného vzorku s nabitými částicemi separačního prostředí. Jev je nežádoucí v plošném uspořádání elektroforézy, v kapilární elektroforéze (viz dále) může být naopak interakce s  $-SiO^-$  skupinami vnitřní stěny kapiláry využita ve prospěch rozdělení směsi. Vhodné materiály (plasty, chemicky upravený povrch skla, struktura gelu) využívají odstranění ionizovatelných skupin. Úprava se provádí např. silanizací, pokrytím filmem parafinového nebo silikonového oleje, metylací volných  $-OH$  skupin či modifikací povrchů se surfaktanty.

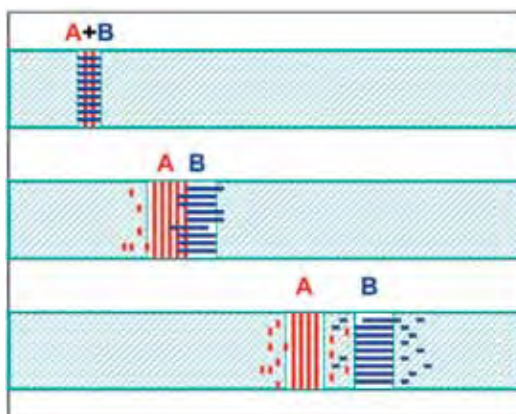
118 K tomuto účelu se používá např. Coomassie briliantová modř, Coomassie violet, nebo Sudanová černě.

119 Elektroforeogram je viditelný výstup elektroforetického rozdělení směsi. Gel po obarvení je kvalitativně hodnotitelný, hustotu zbarvení lze použitím optické metody denzitometrie převést na grafický záznam profilu rozdělených zón, z něhož se vyjadřuje procentuální zastoupení jednotlivých frakcí. V kapilární elektroforéze se snímá signál přímo (většinou opticky) při průchodu rozdělené frakce detekčním okénkem kapiláry.

### 3.4.2 Zónová elektroforéza

Základní charakteristikou zónové elektroforézy je to, že vzorek migruje v konstantním prostředí základního elektrolytu, který vede prakticky veškerý elektrický proud. Separace probíhá tak, že do daného místa (startu) na gelu se nanese vzorek (obr. 57, A+B) a po vložení elektrického pole začne systémem protékat elektrický proud.

Složky A a B mají odlišnou pohyblivost v elektrickém poli, proto migrují různými rychlostmi. Čím déle elektroforéza probíhá, tím více se separované zóny od sebe vzdalují a zároveň se vlivem difúze „rozmyývají“. Vzorky se dávkuje do jamek v gelu nebo se aplikují pomocí proužků filtračního papíru položených na gel. Dávkované objemy jsou 1–5  $\mu\text{l}$  vzorku. V praxi se zónová elektroforéza vyskytuje v různých modifikacích, kdy je zónová migrace látek kombinována s dalšími efekty – např. SDS elektroforéza (bílkoviny k separaci jsou modifikovány tvorbou komplexů se SDS<sup>120</sup>, které se elektroforeticky dělí podle molekulových hmotností), afinitní elektroforéza, imuno elektroforéza, nebo kapilární zónová elektroforéza.



**Obr. 57** Zónové elektroforetické dělení.

#### 3.4.2.1 Imuno elektroforetické techniky

Pro diagnostické aplikace má stěžejní význam využívání imuno elektroforetických metod (viz kap. 2.4). Imuno elektroforéza představuje jeden z postupů dvojité imunodifúze. V prvním kroku dochází k rozdělení bílkovin na jednotlivé frakce klasickým elektroforetickým postupem, ve druhém kroku je podél rozdělených frakcí aplikováno antisérum a při inkubaci se difúzně vytváří precipitační linie. Podle charakteru antiséra vzniká buď jedna (s monospecifickým<sup>121</sup>) nebo více prolínajících se linií (při aplikaci polyspecifického antiséra<sup>122</sup>). **Imunofixace** je laboratorní postup využívaný zejména pro typizaci patologických nálezů M-gradientu zjištěného elektroforézou sérových bílkovin. Základní kroky tohoto postupu spočívají ve třech fázích – v elektroforéze sérových proteinů, v aplikaci

120 SDS = laurylsíran sodný (Sodium Dodecyl Sulfate, viz kap. 2.4).

121 Monospecifické antisérum vzniká po imunizaci zvířete jedním antigenem. Obsahuje polyklonální protilátky namířené proti různým epitopům tohoto antigenu.

122 Polyspecifické antisérum vzniká po imunizaci zvířete směsí antigenů. Obsahuje polyklonální protilátky namířené proti různým epitopům různých antigenů.

antiséra a konečně v barvení precipitačních linií. **Imunoblotting/western blotting** je technika přenosu v gelu rozdělených bílkovin na nitrocelulóзовou membránu obvykle elektrickým proudem nebo kapilárním tokem. Strip nebo membrána reagují pak s činidlem obsahujícím protilátku. Metoda je vhodná pro detekci jednotlivých bílkovin ve směsi, je rovněž alternativním postupem pro typizaci paraproteinémií (viz kap. 2.4).

### 3.4.2.2 Izoelektrická fokusace

Technika izoelektrické fokusace (izoelektrického zaostřování) patří k rovnovážným technikám, kdy kinetický proces určuje pouze rychlost dosažení rovnováhy. Při separaci **amfolytů**<sup>123</sup> (bílkoviny, peptidy, aminokyseliny) je rovnovážným stavem dosažení **izoelektrického bodu**, kdy je pohyblivost iontu v elektrickém poli nulová. V oblasti  $\text{pH} = \text{pI}$  ( $\text{pI} = \text{pH}$  izoelektrického bodu) se separace zastaví, s časem se poté zóny už jen zaostřují. Izoelektrická fokusace se provádí většinou v gelu, v němž je prostřednictvím polymerů amfolytů a pufrů odlišného pH v katodické a anodické komoře vytvořen gradient pH. Používá se stejné či podobné zařízení jako pro zónovou elektroforézu (obr. 56).

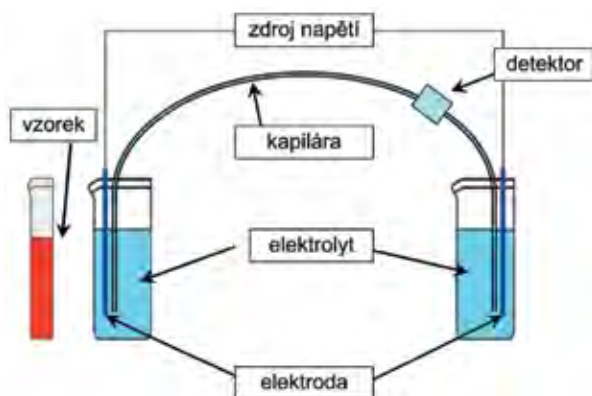
### 3.4.2.3 Dvojměrná elektroforéza

Dvojměrné elektroforetické dělení složitých směsí je kombinací dvou elektromigračních postupů provedených ve dvou krocích, kdy dělení prvního kroku je výchozím „startem“ pro dělení ve směru kolmém. Příkladem může být dvojměrná elektroforéza označovaná rovněž jako metoda ISO-DALT (ISO = izoelektrická fokusace, DALT = dělení dle molekulové hmotnosti). V prvním stupni tohoto postupu se dělená směs podrobí izoelektrické fokusaci na PAG (gel s velkými póry s přidáním amfolytem), ve směru kolmém je pak provedena zónová elektroforéza s přidávkem detergentu (SDS), který normalizuje rozdíly v efektivním náboji. Po provedeném elektroforetickém dělení se získá dvourozměrná mapa bílkovin přítomných ve směsi, které se detekují běžnými barvicími technikami. Vyhodnocování těchto map je obtížné, podmínkou je použití řádkovací denzitometrie v návaznosti na počítačové hodnocení dat. To je také důvodem, proč se technika uplatňuje především v oblasti experimentální.

### 3.4.3 Kapilární elektroforéza (CE)

Základní instrumentace v CE vždy obsahuje alespoň jednu separační kapiláru, zdroj napětí a detektor se záznamem analytického signálu (obr. 58). V principu toto zařízení odpovídá základnímu schématu uspořádání elektroforézy, kde prostor elektroforetické vany určený pro separační pufr je nahrazen malými nádobkami o objemu několika ml a namísto separačního gelu je umístěna kapilára ponořená svými konci do nádobek s elektrolytem. Kapiláry jsou obvykle křemenné. Pokryté bývají tenkou vrstvou polymeru, který jim dodává pružnost a odolnost vůči prasknutí. Vnitřní průměr kapiláry se pohybuje mezi 20–100  $\mu\text{m}$ , celková délka mezi 20–100 cm. Dělení malých molekul obvykle vystačí se separací v prostředí elektrolytu, kterým je kapilára před každou analýzou nově naplněna. Pro separace velkých molekul se i v CE využívají gely, ty se

123 Amfolyt je látka, která v molekule obsahuje jak kyselá, tak i bazická skupiny.



**Obr. 58** Schéma kapilární elektroforézy.

ovšem od klasických liší svými fyzikálními vlastnostmi. Trend modifikace kapilár pro gelovou kapilární elektroforézu a isoelektrickou fokusaci směřuje k používání roztoků lineárních polymerů, kde funkčnost kapiláry lze obnovit prostým promytím roztokem příslušného polymeru obsaženého v separačním elektrolytu.

CE využívá zdroj napětí v rozsahu 0–30 kV (jeho polarita se volí podle charakteru metody) a proudu 0–300 mA. Objem několika nl vzorku se dávkuje dočasou výměnou vstupní nádobky s elektrolytem za nádobku se vzorkem. Vzorek se aplikuje tlakem nebo krátkodobým vložením napětí mezi nádobku se vzorkem, kapiláru a nádobku s roztokem na konci kapiláry. Vlastní separace probíhá v prostředí vodných roztoků elektrolytů o obvyklých koncentracích 5–50 mmol.l<sup>-1</sup>. Vzhledem k profilu a objemu kapilár představuje denní spotřeba elektrolytů a tvorba odpadu chemikálií jen malé objemy. Zásadním rozdílem od zónové elektroforézy je přístup k identifikaci separovaných frakcí. Detekce rozdělených zón je zajištěna on-line snímáním signálu přímo v kapiláře, odpadá tedy interakce proteinů na matici gelu a následné barvení. Často je využívána univerzální UV detekce (viz kap. 2.1). Zvláštní místo při použití fotometrické detekce zaujímá tzv. **nepřímá detekce** umožňující vizualizaci zón látek, které nevykazují absorpci v UV oblasti. Podstatou této detekční metody je absorpce samotného elektrolytu a nastavení detektoru na tuto úroveň absorpce tak, aby přítomnost neabsorbujícího iontu v detekční cele vyvolala pokles absorbance (čili negativní pík). Příkladem je separace neabsorbujících aniontů v prostředí elektrolytu obsahujícího K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Pro velmi vysokou citlivost analýzy se v technice CE využívá detekce laserem indukovanou fluorescencí (LIF), pro speciální analýzy není výjimkou využití spojení CE s hmotnostně spektrometrickou detekcí (CE/MS). Největší význam pro tuto techniku má použití ionizace elektrosprejem, ESI (viz kap. 2.2).

### 3.4.3.1 Základní separační módy v kapilárních systémech

Současná instrumentace kapilárního uspořádání elektroforézy umožňuje řadu modifikací separačních podmínek.

## Kapilární zónová elektroforéza

Nejjednodušší a nejbližší plošnému uspořádání je kapilární zónová elektroforéza. Provádí se obvykle v tzv. otevřené kapiláře, což znamená v kapiláře naplněné elektrolytem. Tento režim vyhovuje širokému spektru látek dělených v biologických matricích, zejména malým molekulám. Separace velkých molekul (např. ampikonů využívané v molekulární biologii) pracují s kapilárami plněnými polymerními gely (viz kap. 3.2).

## Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Použitím aditivní složky v elektrolytu (např. SDS nebo Tritonu X-100) vznikají koloidní shluky (micely), které jsou na povrchu polární a uvnitř nepolární. Analyzovaná částice je vtažena do nitra micely a unášena vlivem elektroosmotického toku. Tento princip umožňuje separovat elektroforeticky i ionty s nízkou pohyblivostí nebo neionogenní sloučeniny bez vlastního náboje.

## Kapilární izotachoforéza (ITP)

Jedná se o elektromigrační separační techniku umožňující analýzu ionogenních látek v roztocích. Vzorek je dávkován na rozhraní dvou elektrolytů o rozdílných pohyblivostech iontů. Po rozdělení směsi do jednotlivých zón jsou tyto zóny sevřeny mezi vedoucím a zakončujícím elektrolytem, nevzdalují se od sebe a až k místu detekce se pohybují stále stejnou (izo-) rychlostí (tacho-). V podmínkách CE se ITP využívá především pro zakoncentrování vzorků před vlastní elektroforézou, detekce bývá poté pravidla fotometrická.

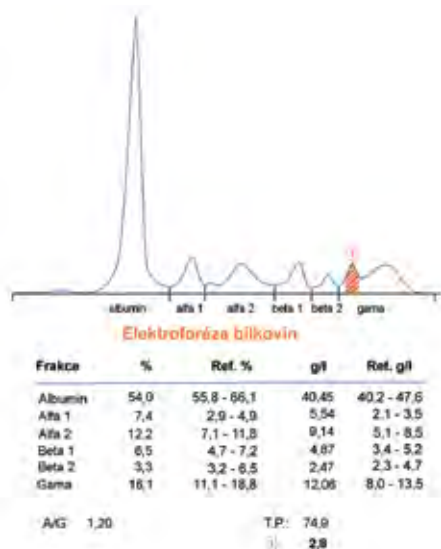
## 3.4.4 Diagnostické aplikace elektroforetických technik

### 3.4.4.1 Multikapilární systémy

Multikapilární elektroforetické systémy se v současné době stávají významným nástrojem rychlého, rutinního, vysokokapacitního a zcela automatizovaného měření základních proteinových frakcí krevního séra. Vysoká pracovní kapacita těchto zařízení pro kapilární zónovou elektroforézu komunikujících s laboratorním informačním systémem (LIS) představuje možnost zvýšení efektivity měření v režimu průběžného zpracování vzorků z primárních zkumavek<sup>124</sup> identifikovaných čárovými kódy. Matematický algoritmus pro analýzu elektroforeogramu zde umožňuje kromě semikvantitativního vyhodnocení jednotlivých frakcí bílkovin identifikovat také 99 % vzorků s paraproteinem a matematicky definovat kritéria pro oligoklonalitu<sup>125</sup>. Plná automatizace snižuje objem manuální práce na minimum, jsou rovněž eliminovány možné chyby způsobené postupem barvení a denzitometrickým hodnocením.

124 Primární zkumavka je ta zkumavka, která byla ošetřujícím personálem využita pro odběr (primárního) vzorku a doručena do laboratoře. Sekundární zkumavka pochází z laboratoře a obsahuje alikvot vzorku určený k analýze.

125 Oligoklonalita znamená přítomnost několika (2–5) oligoklonálních páسů v elektroforeogramu. Tyto pásy představují proteiny nebo jejich fragmenty, jež jsou secernovány plazmocytů. Vyskytují se kromě jiného i u řady neurologických onemocnění (typicky u roztroušené sklerózy), kde vyžadují současně vyšetření séra i likvoru.



**Obr. 59** Vyhodnocení elektroforetického vyšetření profilu sérových proteinů.

Současné možnosti instrumentace pro CE vedou k rychlé a účinné separaci s vysokým rozlišením, jehož důsledkem je pravděpodobně i vyšší záchyt patologických nálezů při elektroforetickém vyšetření sérových proteinů. Na obr. 59 je uveden záznam základních elektroforetických zón získaný multikapilárním analyzátozem s fotometrickou detekcí.

Přístroj vyhodnotí plochy pod křivkami jednotlivých frakcí jako jejich relativní (procentuální) zastoupení a porovná jejich hodnoty s referenčními údaji. Je-li dostupná informace o hodnotě celkové koncentrace bílkovin v séru, pak se frakce přepočítají také na absolutní (hmotnostní) koncentrace. To může přispět např. k detekci chorobného stavu, který postihuje všechny frakce zhruba stejnou měrou. Při posuzování číselných hodnot lze zohlednit také výpočet poměru albuminu ke globulinům (A/G). Důraz se klade i na vizuální hodnocení elektroforeogramu, které kromě zvětšení či zdvojení nebo poklesu až vymizení frakce může odhalit splynutí frakcí, případně frakci novou, s atypickou pohyblivostí.

Interpretaci nálezu komplikuje několik faktorů – frakce (s výjimkou albuminu) ne-representují jednotlivé bílkoviny, ale představují směsi různých, funkčně nesořodých bílkovin. Tyto molekuly se na velikosti frakcí podílí nestejnou měrou a navíc přesahují z jedné frakce do druhé. Elektroforeogram může být modifikován např. hemoglobinem (při hemolýze) či fibrinogenem (vyšetření plazmy namísto séra). Přestože je v řadě případů možné empiricky určit tzv. **elektroforetický typ**, který lze přiřadit k určité skupině chorob a chorobných stavů (tab. 10), v praxi se nezdívka setkáváme s nespecifickými nálezy. Při znalosti uvedených limitací lze toto vyšetření využít nejenom v detekci paraproteinémie, ale také k diagnostice a kontrole průběhu zánětlivých onemocnění, stavů spojených se ztrátou bílkovin, jaterních a revmatických chorob, či zhoubných nádorů. Na elektroforeogramu se projeví i těhotenství, anémie z nedostatku železa<sup>126</sup> a některé vzácnější dědičné choroby, např. deficit  $\alpha_1$ -antitrypsinu (snížení

126 Zvýšený transferin (transportní bílkovina pro železo) vede v tomto případě ke zvýšení beta 1 frakce.

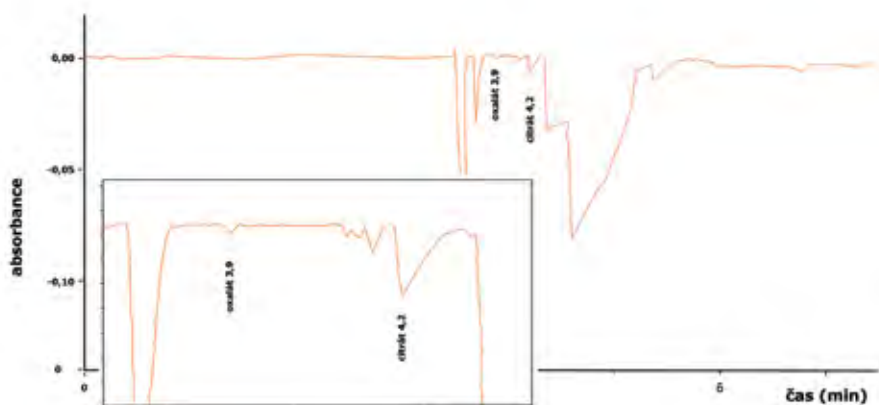


příslušné frakce), analbuminémie nebo atransferinémie (izolované chybění albuminu a jeho frakce nebo transferinu se snížením beta 1 frakce). Posouzení anomálií jednotlivých frakcí a jejich dynamiky patří do rukou erudovaného pracovníka. Laboratoř může hodnocení doplnit komentářem, případně ordinujícímu lékaři doporučit již konkrétní vyšetření specifických proteinů, nebo typizaci paraproteinu imunofixací (viz kap. 2.4). Na příkladu uvedeném na obr. 59 je šrafováním vyznačena evidentní patologie ve frakci gama, přestože numerické hodnocení této frakce se nachází v očekávaném rozmezí. Imunofixací byla potvrzena přítomnost IgM kappa, jehož množství  $2,8 \text{ g.l}^{-1}$  bylo odečteno z uvedeného elektroforeogramu.

CE se pro svou vysokou detekční citlivost s výhodou využívá při průkazu a stanovení velmi nízkých koncentrací proteinů nejenom v krvi, ale také v moči a v mozkomíšním moku. Výhodou je, že např. elektroforézu sérových proteinů v likvoru lze téměř vždy provést z minimálního objemu vzorku bez předchozího zahušťování biologického materiálu.

### 3.4.4.2 Další aplikace

Spektrum možností využití CE v klinické praxi je velmi široké. Použití různých separačních modů a příprava separačních elektrolytů s různými aditivami posouvá tuto techniku v rutinní praxi na úroveň analýz provedených chromatograficky. Varianta nepřímé detekce se využívá pro stanovení aniontů v krvi i v moči – v praxi jde o postupy pro kvantifikaci oxalátů a citrátů (obr. 60). Mezi další aplikace patří sledování koncentrace ve vodě rozpustných vitaminů v biologických tekutinách, možnost separace frakcí tzv. karbohydrát-deficientního transferinu, CDT<sup>127</sup> (obr. 61), stanovení glykovaného hemo-

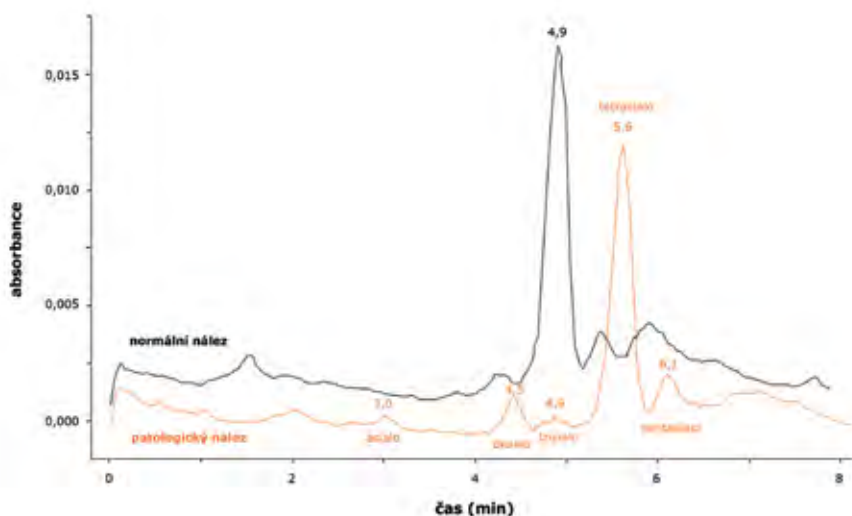


**Obr. 60** Stanovení oxalátů a citrátů kapilární elektroforézou (detekce negativních píků analytu).

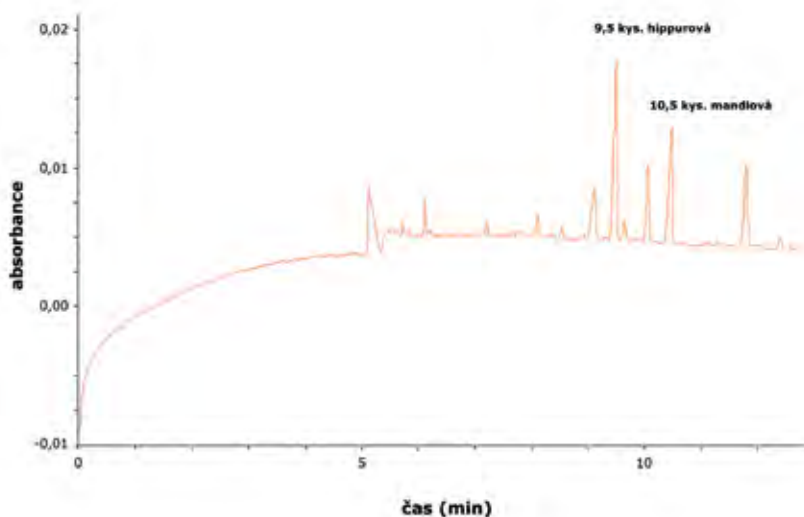
127 Transferin je plazmatický transportní glykoprotein pro  $\text{Fe}^{3+}$ , který je tvořen v játrech. Alkoholické poškození jater zapříčiňuje tvorbu molekuly transferinu, která obsahuje menší počet zbytků kyseliny sialové („karbohydrát-deficientní“ transferin obsahuje namísto 4–6 jen 0–2 zbytky kyseliny sialové).

**Tab. 10** Příklady kvalitativní interpretace elektroforetických zón (N – normální nález, ↓ snížení, ↑ zvýšení, není-li uvedeno jinak, je beta frakce sumou subfrakcí beta 1 a beta 2). Vyšetření se často využívá pouze k hrubé orientaci. Ke správné a úplné interpretaci nálezu je nutné doplnit informace o klinickém stavu pacienta včetně výsledků dalších testů.

Elektroforetický typ	albumin	alfa 1	alfa 2	beta	gama
<b>typ akutního zánětu (odpovědi akutní fáze)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>akutní fáze infekčních chorob (zejm. rozsáhlé, bakteriální)</li> <li>akutní tkáňová nekróza (ischemická, pooperační, posttraumatická)</li> <li>větší popáleniny</li> <li>rychle rostoucí zhoubné nádory</li> </ul>	↓	↑ (N v pozdní fázi)	↑	N (nebo ↑ beta 2)	N (↑ v pozdní fázi)
<b>typ chronického zánětu</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>chronická infekční, zánětlivá a autoimunitní onemocnění plic, jater, močového měchýře, žlučníku, endokardu apod.</li> <li>rekonvalescence po infekčních chorobách</li> <li>absces</li> <li>zhoubné novotvary</li> </ul>	N (↓ u aktivního zánětu)	N (↑ u aktivního zánětu)	N (↑ u aktivního zánětu)	N	↑ polyklonální hyperimmunoglobulinémie
<b>typ chronické hepatopatie (jaterní cirhózy)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>různé formy jaterní cirhózy a chronické hepatitidy</li> </ul>	↓↓	N, ↓	N, ↓	↓ beta 1 frakce (viz gama frakci)	↑↑ beta-gama můstek (široká frakce splývající s frakcemi beta)
<b>typ monoklonální hyperimmunoglobulinémie (gamapatie)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>mnohočetný myelom</li> <li>Waldenströmova choroba</li> <li>monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)</li> </ul>	N, ↓	N	N M-gradient (výjimečně)	N (↑) M-gradient (vzácně)	↑, N <b>M-gradient</b> (úzký proužek monoklon. imunoglobulinu)
<b>typ nefrotického syndromu (ztrát bílkovin)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>postížení ledvin (různé etiologie) s proteinurií &gt; 3 g.d<sup>-1</sup></li> <li>exsudativní enteropatie (onemocnění střev se ztrátou velkého množství bílkovin)</li> </ul>	↓↓	↓ (N, ↑)	↑↑	↑↑	↓
<b>typ malnutrice</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>poruchy příjmu potravy</li> </ul>	↓↓	N (↑)	N (↑)	↓ (beta 1 frakce, N při nedostatku Fe)	N
<b>typ hypogamaglobulinémie</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>primární nebo sekundární deficit tvorby protilátek</li> </ul>	N	N	N	N	↓↓↓



**Obr. 61** *Separace frakcí karbohydrát-deficientního transferinu.*



**Obr. 62** *Sledování kyseliny hippurové a kyseliny mandlové v moči.*

globinu, spektra aminokyselin i jednotlivých aminokyselin, nebo sledování metabolitů kyseliny hippurové a kyseliny mandlové v moči osob profesionálně exponovaných toxickým těkavým látkám (obr. 62).

Nabídka možností využití CE v laboratorní diagnostice je velmi široká – řadu dalších aplikací CE lze nalézt i v oblasti farmakologických, či toxikologických analýz. Přednosti CE před kapalinovou chromatografií (viz kap. 3.5) lze očekávat v situacích, kdy stanovení probíhá v malých sériích (obměna metody je u CE časově nenáročná), či tam, kde příprava vzorku pro CE je významně jednodušší.

## Literatura

- Burtis C.A., Ashwood E.R. (Eds): Tietz textbook of clinical chemistry. 4<sup>th</sup> edition, 2006. ISBN 0-7216-0189-8
- Masopust J.: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření II. Avicenum, Praha 1990. ISBN 80-85047-03-9
- Racek, J. et al: Klinická biochemie, 1. vydání. Galén, Praha, 1999. ISBN 80-7262-023-1. Karolinum, Praha, 1999. ISBN 80-7184-971-5
- Tichý M.: Laboratorní analýza monoklonálních imunoglobulinů. A. L. Instruments s.r.o., Český Těšín, 1997, ISBN 80-902022-1-7
- Vávrová J.: Separací techniky In: Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi, SEKK s.r.o. a KKB IPVZ Praha, 2009, ISBN 80-238-9775-6

### Otázky k přípravě

1. Co se rozumí pod pojmem elektromigrační technika?
2. Popište základní součásti elektroforetického zařízení.
3. Jaké jsou významné rozdíly mezi elektroforézou v plošném uspořádání a kapilární elektroforézou?
4. Jaký profil sérových proteinů svědčí pro jaterní cirhózu?
5. Uveďte příklad aplikace kapilární elektroforézy při dělení nebiłkoviných směsí.

## 3.5 Kolonové separace – chromatografie

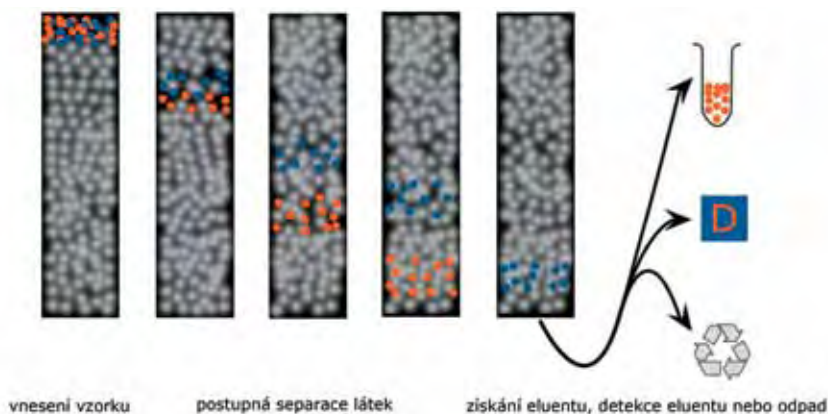
P. Kosina

Cílem chromatografického dělení je separace (tj. oddělení) sledovaného analytu (analytů) od dalších látek ve vzorku tak, aby za pomoci vhodné detekční techniky bylo v dalším kroku možné tento analyt jednoznačně identifikovat a kvantifikovat. Biomedicínské využití chromatografických metod je značné – ve větších klinických laboratořích se uplatňují v širokém spektru rutinních i „speciálních“ metod (např. pro stanovení léčiv a drog v tělesných tekutinách), jsou také nepostradatelnou součástí všech referenčních a výzkumně zaměřených biochemických pracovišť. Chromatografie<sup>128</sup> tvoří základ řady referenčních metod (viz kap. 2.2) a je výchozí technikou i pro vývoj metod nových.

### 3.5.1 Princip chromatografie

Podstatou chromatografických metod je interakce složek směsi se dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, a to fází pohyblivou (**mobilní fází**) a nepohyblivou (**stacionární fází**). Vzorek se po nástřiku do systému pohybuje společně s mobilní fází (obr. 63).

<sup>128</sup> Vedle metod s kolonovým uspořádáním zahrnuje tato skupina i plošné metody, např. tenkovrstevnou a vysokoučinnou tenkovrstevnou chromatografii, jejichž klinicko-biochemické využití je (na rozdíl od plošných elektromigračních metod, viz kap. 3.4) minimální. Příkladem je záchyt specifických sacharidů v moči při detekci dědičných poruch metabolismu sacharidů.



**Obr. 63** Princip separace v kolonových separačních technikách.

Dělené složky vzorku v různé míře interagují jak s fází mobilní, tak s fází stacionární, přičemž síla této interakce (afinita) se mezi jednotlivými látkami i fázemi liší. Látky, které se stacionární fází interagují silněji, jsou jí více zadržované (mluvíme o retenci) a v koloně setrvávají déle, nežli látky, u kterých je interakce s touto fází slabší. Větší retence látky vyústí v její pozdější výstup z kolony, čili látka má delší **retenční čas** (a obráceně). Závislost intenzity signálu na čase se vyjadřuje graficky a vzniklý **chromatogram** se posléze hodnotí. Kromě retenčního času, který je v daném systému za definovaných podmínek pro konkrétní analyt charakteristický a slouží k jeho identifikaci, se určuje i plocha respektive výška píku, které jsou funkcí koncentrace stanovené látky.

### 3.5.2 Dělení chromatografických technik

Separace stanovené látky nebo více látek (analytů) může probíhat na principu interakce kapalina – pevná látka (adsorpce), interakce kapalina – kapalina (rozdělování), na principu rozdílné afinity nabitých částic k opačně nabitým funkčním skupinám stacionární fáze (iontová výměna), na základě interakce protilátka – antigen (imunoafinita), na principu omezeného transportu látek materiálem s přesně definovanými póry u gelové permeační chromatografie. Při separaci analytů na konkrétní stacionární fázi s určitou mobilní fází je výsledná separace obvykle kombinací více výše uvedených principů.

Kolonové chromatografické separační metody lze třídit z různých hledisek.

- Dle cílů separace látek rozlišujeme **preparativní chromatografii**, která si klade za cíl izolaci látky a **analytickou chromatografii**, cílem které je stanovení koncentrace látky (kvantitativní analýza) a/nebo identifikace látky ve směsi (kvalitativní analýza).
- Podle skupenství mobilní fáze lze chromatografické techniky rozdělit na **kapalinovou (LC)** a **plynovou chromatografii (GC)**.

Níže popíšeme techniky, se kterými se v laboratorní medicíně můžeme setkat nejčastěji.

### 3.5.3 Chromatografické metody a jejich aplikace

#### 3.5.3.1 Nízkotlaká kolonová chromatografie

Tato technika obvykle slouží k preparativním účelům (izolace proteinů apod.). Může využívat různých principů separace, typické je využití gelové permeačního, afinitního a iontově výměnného principu.

#### 3.5.3.2 Vysokotlaká kolonová chromatografie

Technika existuje v provedení **vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC<sup>129</sup>) a plynové chromatografie**, obvykle slouží k separaci a následné detekci analytů při kvalitativní a kvantitativní analýze.

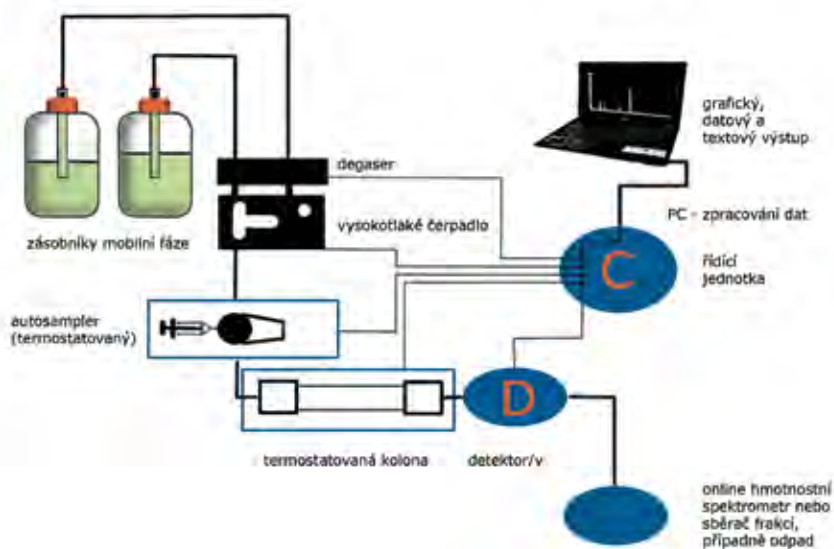
## HPLC

### Základní popis HPLC technik

Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy, se nazývá kapalinový **chromatograf**. Schéma kapalinového chromatografu prezentuje obr. 64.

Samotný **proces separace** probíhá následovně (obr. 64).

- Roztoky (v počtu 1 až 4) tvořící mobilní fázi jsou odplyněny v tzv. **degaseru**, smíchány a čerpány **vysokotlakou pumpou** (čerpádem). Využíváno je **izokratické a gradientové eluce**. Izokratická eluce je založená na konstantním složení mobilní



**Obr. 64** Schéma kapalinového chromatografu. Detaily separačního procesu jsou uvedeny v textu.

<sup>129</sup> Zkratka HPLC může být odvozena nejenom z názvu „High Performance Liquid Chromatography“ (vysokoučinná kapalinová chromatografie) – v odborné literatuře se lze také setkat s přijatelnou alternativou „High Pressure Liquid Chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie).

fáze v průběhu měření. Gradientová eluce umožňuje změnu ve složení mobilní fáze během separace obvykle s cílem zvýšení eluční síly. Výhodou izokratické eluce je možnost využití širšího spektra detektorů, stabilní základní linie chromatogramu, možnost nástřiku další analýzy ihned po ukončení té předchozí. Ovšem pro mnohé analyty a vzorky je použití gradientové eluce nutnost, aby došlo k separaci stanovených analytů. Další výhodou gradientové eluce je obvykle získání užších a ostřejších píků v chromatogramu, umožňujících vyšší citlivost měření.

- Mobilní fáze dále prochází přes **nástřikové zařízení** (autosampler nebo nástřikovací ventil), kde za pomoci smyčky o vhodném objemu (obvykle 10 až 100  $\mu\text{l}$ ) a vířecového ventilu dochází k vnášení vzorku do toku mobilní fáze.
- Takto obohacená mobilní fáze je tlačena na **termostatovanou kolonu** (často vybavenou ještě předkolonou nebo filtrem), kde probíhá vlastní separační proces. Z hlediska typu separovaných sloučenin se volí **uspořádání HPLC** metody. Může být „normální“ a „reverzní“ (čili obrácené). V prvním případě jsou metody založeny na větší polaritě stacionární fáze, než je polarita fáze mobilní<sup>130</sup>. Stacionární fázi bývá oxid křemičitý; jako mobilní fáze se pak uplatňují nepolární rozpouštědla (např. hexan). Tento způsob provedení usnadňuje separaci polárních látek, které ovšem v biomedicínských oborech tvoří jen určitou část analytů. Separace na normální fázi se proto využívá spíše výjimečně<sup>131</sup>. Druhá skupina, nazývaná „HPLC na reverzní fázi“ (angl. reversed-phase, **RP-HPLC**), je aplikována mnohem častěji. Toto uspořádání je vhodné k separaci málo polárních a nepolárních látek, mezi které patří většina bioanalytů včetně léčiv nebo drog. Vývoji této techniky bylo věnováno značné úsilí z čehož pramení vysoká variabilita a aplikační možnosti RP-HPLC. Stacionární fáze je navázána na povrchu nosiče, jako je silikagel nebo jiný pevný materiál. Funkci stacionární fáze pak plní film tvořený nepolárními alifatickými skupinami např. okta-decylovým ( $-\text{C}_{18}$ ), nebo méně často oktylovým uhlíkovým řetězcem ( $-\text{C}_8$ ), případně jde o skupiny  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NH}_2$  a další. Jako mobilní fáze se ujal směs vody nebo pufru s obsahem polárních organických rozpouštědel, jako je acetonitril či metanol<sup>132</sup>. V průběhu RP-HPLC se jako první eluují látky vysoce polárního charakteru. S klesající polaritou látek se začínají uplatňovat jejich interakce se stacionární fází, což je obvykle spojeno s přibývajícím retencí těchto látek v koloně<sup>133</sup>. Velikost kolony se pohybuje v délkách 5 až 25 cm, průměr 4,6 až 1 mm, velikost částic 10 až 1,8  $\mu\text{m}$ <sup>134</sup>.
- Po projití kolonou míří mobilní fáze se separovanými analyty co nejkratší cestou do **detektoru**. Kromě UV/VIS, fluorimetrických, elektrochemických nebo refraktometrických detektorů se často užívá on-line připojený hmotnostní spektrometr.

130 Název „normální“ vyplývá pouze z faktu, že toto uspořádání bylo historicky použito jako první.

131 Moderní alternativou separace na normální fázi je Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), jejíž využití pro analýzu polárních látek bude pravděpodobně vzrůstat.

132 Separaci proteinů bez nutnosti použít organických rozpouštědel v mobilní fázi způsobujících denaturaci proteinů umožňuje hydrofobní interakční chromatografie (HIC).

133 Kromě částicemi plněných separačních kolon jsou k dispozici i tzv. monolitické kolony, u kterých je stacionární fáze tvořena jedním blokem pórovitého materiálu o definovaných velikostech pórů. Výhodou je nízký odpor proti přenosu hmoty, což umožňuje použití vysokých průtoků mobilní fáze, ale za cenu nižší účinnosti oproti klasickým kolonám.

134 Perspektivním se v současnosti jeví využití poréznych částic s neporézním jádrem.

Nejprogresivnější zařízení využívají HPLC/MS/MS sestav (viz kap. 2.2). Pro určitý typ analytů se provádí **derivatizace vzorku**<sup>135</sup>. Provádí se z důvodu zlepšení separace, umožnění nebo zcitlivění detekce analytu nebo zamezení nežádoucí sorpce interferujících látek na koloně. Derivatizace představuje soubor reakcí vedoucích k tvorbě chemických derivátů analytů, které se vyznačují vlastnostmi výhodnými z hlediska separačního nebo detekčního systému.

- Jednotlivé charakteristiky (retenční čas, intenzita píků při dané vlnové délce, MS spektrum a intenzita při daném m/z atd.) jsou zaznamenány v **počítači**<sup>136</sup>. Celý proces je řízen **řídící jednotkou**. Speciálním případem separací jsou **chirální HPLC** separace, které umožňují separovat optické izomery buď derivatizačním převedením na diastereoizomery, použitím chirální mobilní fáze nebo využitím chirální stacionární fáze. Chirální separace se uplatňují převážně v oblasti analýzy léčiv, kdy optické izomery mohou mít jiné farmakologické vlastnosti. Pokud chromatografický systém umožňuje separaci analytů na dvou analytických kolonách ve dvou odlišných, ale mísitelných mobilních fázích nebo on-line v první části přechištění biologického materiálu na pevné fázi a v druhé části separaci analytů na analytické koloně, mluvíme o **2D-chromatografii**. **UPLC** (ultra performance liquid chromatography) využívá k separaci látek stejné principy jako HPLC, ovšem za použití menších částic v kolonách, menších rozměrů kolon, vyšší teploty (až 90°C) a hlavně velmi vysokých tlaků (i přes 100 MPa). Dosahuje lepší separace látek ve výrazně kratších časech. S minimálním průtokem mobilní fáze, malým průřezem a délkou kolon s vysokou separační účinností pracují kapilární a nanoLC systémy. Variantou nanoLC systémů je **chromatografie na čípech** (techniky Lab on a chip, viz kap 2.3) – celý chromatografický proces probíhá na čipu (včetně prekoncentračního kroku), ke kterému se připojuje periferní zařízení (nanopumpa, nástřik), výstup systému může být napojen na hmotnostní spektrometr.

### **Aplikace HPLC technik v medicíně**

Využití HPLC (HPLC/MS) v medicíně je široké a do budoucna se bude zřejmě dále rozšiřovat. Chromatografy se stávají běžným vybavením rutinních klinických laboratoří. Často se jedná o jednoúčelová zařízení, jako jsou např. analyzátory aminokyselin nebo jednoduše obsluhovaná zařízení pro stanovení glykovaného hemoglobinu. Složitější instrumentace s variabilním nastavením je hojně využívána v oblasti toxikologie, farmakologie a při analýzách analytů a metabolitů obsažených v biologických tekutinách.

Jde zejména o:

- stanovení látek tělu vlastních (biomarkerů) z diagnostických důvodů – zajímají nás **fyziologické a patologické koncentrace** katecholaminů, steroidů, glykovaného hemoglobinu, vitaminů a aminokyselin,

135 Dle způsobu derivatizace rozeznáváme derivatizaci předkolonovou, postkolonovou a derivatizaci na koloně. V případě předkolonové derivatizace a derivatizace na koloně je třeba optimalizovat separaci vznikajících derivátů analytů a ne původních analytů.

136 Ne vždy dochází k úplnému rozdělení analytů. V případě velmi selektivní detekce, např. zjišťováním „přesné hmoty“ v MS/MS, však kompletní separace není nezbytná.

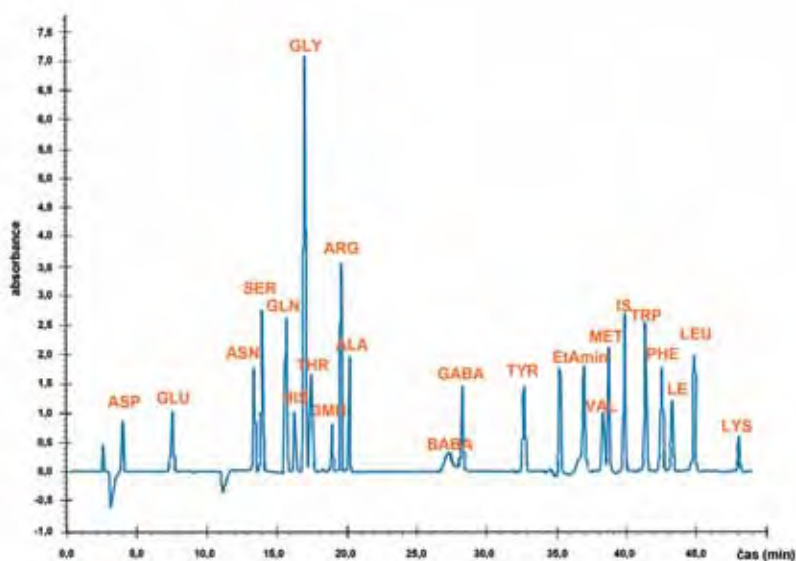


- stanovení látek (biomarkerů) **vznikajících za patologických stavů** – toto se týká např. purinů (při dědičných metabolických poruchách) nebo produktů působení volných radikálů v organismu,
- stanovení látek, podávaných jako **léciva**, pro nastavení správné terapeutické dávky – stanovuje se např. busulfan, cyklosporin A, doxorubicin, lamotrigin a vankomycin,
- stanovení prováděná **z forenzních důvodů** – týká se drog, zneužívaných léčiv, vyšetření otrav léky i toxiny a zneužití substancí k dopingu,
- stanovení prováděná **referenčními (LC-MS/MS) metodami** v rámci kalibrační návaznosti metod rutinně využívaných v laboratorní medicíně.

Ukažme si nyní některé z výše uvedených aplikací na několika konkrétních příkladech.

### A) Stanovení aminokyselin v biologických tekutinách

HPLC je pro kvantitativní stanovení jednotlivých aminokyselin preferovanou rutinně využívanou separační technikou. Využívá se obvykle derivatizačních postupů<sup>137</sup>, které je možné automatizovat s minimální spotřebou vzorku i reagensií pomocí programovatelných autosamplerů. Jednouúčelové aminoanalyzátoary často využívají HPLC sestavu pro separaci na iontoměničích. Mobilní fází je obvykle kombinace citrátových pufrů o různé iontové síle. Jednouúčelové analyzátoary často využívají postkolonový způsob derivatizace již separovaných aminokyselin (ninhydrinem, za varu). Jako vnitřní standard, ke kterému se vztahuje kvantifikace přítomných aminokyselin, se využívá aminokyselina fyziologicky nepřítomná v biologických materiálech (obvykle norleucin, či



**Obr. 65** Rozdělení sérových aminokyselin. Detaily viz text.

137 Derivatizačními činidly jsou např.: ninhydrin; o-ftaldialdehyd; 9-fluorenyl-methyloxycarbonyl chlorid; fluorescamin, dansylchlorid či fenyl-izotiokyanát.

norvalin). Pro identifikaci a kvantifikaci jednotlivých aminokyselin je rutinně využíváno detekce fotometrické nebo fluorescenční. Příklad separace spektra aminokyselin v krvi je znázorněn na obr. 65.

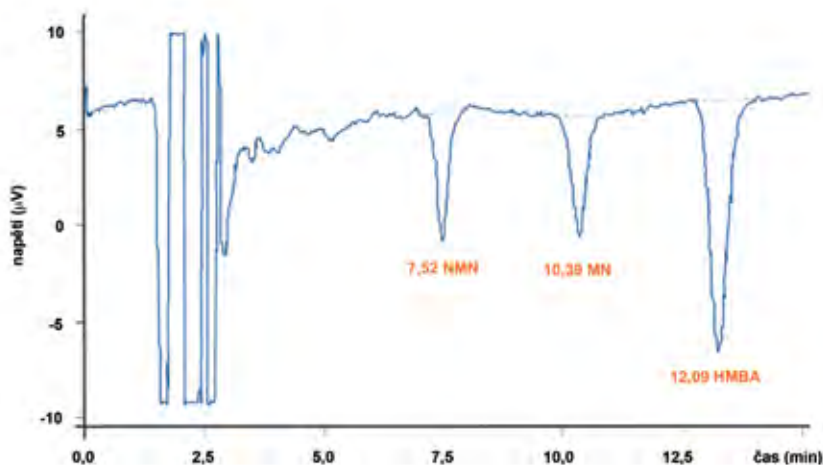
Instrumentace LC-MS/MS se v analýze aminokyselin využívá zejména v neonatální diagnostice metabolických poruch a např. při identifikaci genových mutací. V prvním hmotnostním detektoru je hledaná sloučenina selektivně ionizována a její charakteristické fragmentační ionty jsou dále identifikovány v druhém hmotnostním spektrometru (více viz kap. 2.2).

### **B) Stanovení katecholaminů a metanefrinů**

Stanovení katecholaminů a metanefrinů je důležitým doplňkovým vyšetřením pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu<sup>138</sup>. Díky stále se technicky zvyšující citlivosti elektrochemických detektorů je v současnosti možné získat cenné informace nejen ze sbírané moče, ale také z plazmy (Obr. 66). Samotné stanovení v biologickém materiálu je velmi závislé na precizně dodržovaných preanalytických postupech začínajících již u přípravy pacienta a profesionálně provedeného odběru krve (viz kap. 1).

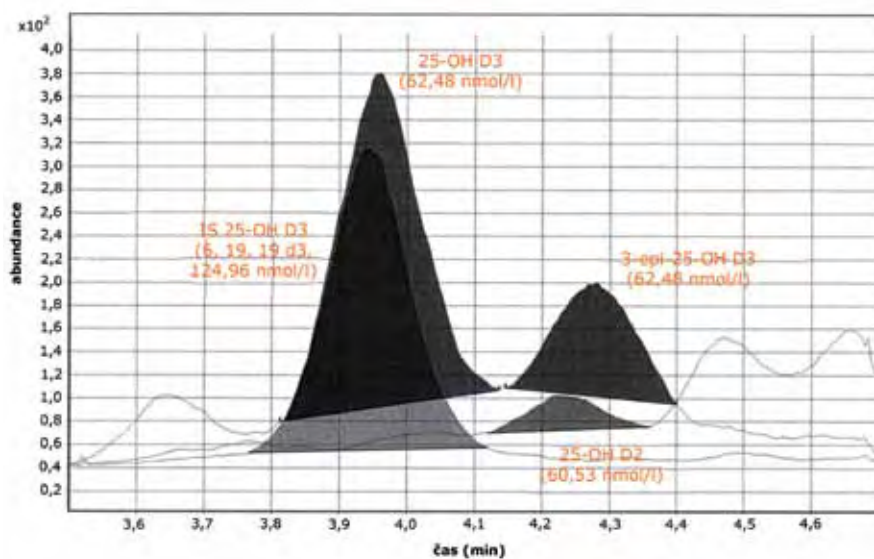
### **C) Využití LC-MS/MS při stanovení vitamínu D**

Nejnovější klinické studie ukazují, že v poslední době často žádané stanovení tohoto parametru má mnohá úskalí v metodách pracujících na principu imunoanalýzy (viz kap. 2.4). Použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (a pravděpodobně i postupné zavedení této techniky do rutinní praxe) se jeví jako jediná cesta



**Obr. 66** Ukázka elektrochemicky detektované separace normetanefrinu (NMN) a metanefrinu (MN) v plazmě s vnitřním standardem 4-hydroxy-3-methoxybenzylammoniumchloridem (HMBA).

<sup>138</sup> Feochromocytom je nádor dřeně nadledvin, který produkuje velká množství katecholaminů (adrenalinu nebo noradrenalinu).



**Obr. 67** Rozdělení frakcí vitamínu D.

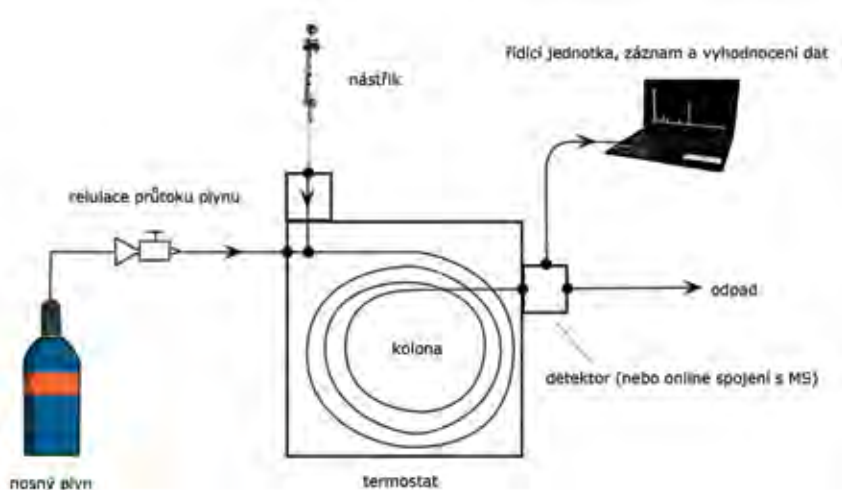
k získání potřebných informací o saturaci organismu vitamínem D. Na obr. 67 je znázorněna separace 25-hydroxy vitamínu D3, 25-hydroxy vitamínu D2, 3-epi-25-hydroxy vitamínu D3 a vnitřního standardu třikrát deuterovaného (čili třemi atomy deuteria značeného) 25-hydroxy vitamínu D3.

## GC

### Základní popis GC technik

GC je kolonová chromatografická metoda, která je vhodná k separaci, identifikaci a stanovení plyných nebo těkavých kapalných látek (s bodem varu do 400 °C bez rozkladu). Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na obr. 68.

Analyty jsou zde separovány a posléze analyzovány v plynném stavu. Mobilní fáze je (nosný) plyn, který unáší zóny analyzovaných látek separační kolonou za minimální interakce s těmito látkami. Jako **nosný plyn** je použit  $N_2$ ,  $H_2$  či He. Stacionární fáze je buď kapalina nanesená na inertním nosiči náplňové kolony, nebo na stěně kapilární kolony, případně tuhá látka naplněná do kolony. Mobilní fáze pouze unáší analyt, neinteraguje se stacionární fází. Látky, které nejsou těkavé, lze na těkavé převést vhodnou **derivatizací**, často převedením na trimethylsilylderiváty reakcí s trimethylchlorsilanem nebo převedením na methylestery (takto jsou typicky derivatizovány mastné kyseliny). Separace látek je ovlivňována programováním pracovních parametrů (teplotní gradient, změna průtokové rychlosti plynu, přepínání různých typů kolon, zpětné vypláchnutí kolony) s možností použití multidimenzionálních technik (2D, GCxGC). Kapilární GC je prováděna na kapilárních kolonách (průměru 0,1 až 0,5 mm), které jsou oproti HPLC velmi dlouhé – mohou dosahovat až 100 metrů. Běžně používanými detektory jsou plamenový ionizační detektor, plamenový ionizační detektor s alka-



**Obr. 68** Schéma plynového chromatografu

lickým kovem, tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu a další; velmi snadno je realizovatelné spojení GC s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), čehož je stále více využíváno.

### **Aplikace GC/MS technik v medicíně**

- Forenzní analýza (těkavé látky v krvi: methanol, ethanol, aceton, izo-propanol, ethylacetát),
- analýzy lipidů, steroidů a aminokyselin v tělních tekutinách,
- sledování množství anestetik v ovzduší (např. operační sály).

Kolonové separace sehrávají významnou roli při řešení aktuálních témat v oblasti biomedicínských rutinních analýz i výzkumu. Ve spojení s tandemovými MS metodami jsou součástí řady referenčních metod. Zejména v provedení UPLC-MS/MS mohou představovat do budoucna efektivní sofistikovaná řešení, jak v krátkém čase získávat relevantní informace o přítomnosti a koncentraci sledovaných látek v biologických vzorcích. V provedení např. kapalinové chromatografie na čípech mohou být tyto metody také předmětem značné miniaturizace, vedoucí k snadnějšímu propojení s moderními detekčními technikami a celkovému zjednodušení ovládnutí celé analytické sestavy až směrem k jednoúčelovým rutinním analyzátorům.

### **Literatura**

- Berthod A, Garcia-Alvarez-Cocque MC: Micellar Liquid Chromatography. Cazes, J. ed. Marcel Dekker, New York, 2000.
- De Jong WHA, de Vries EGE, Kema IP: Current status and future developments of LC-MS/MS in clinical chemistry for quantification of biogenic amines. Clin Biochem. 2011 Jan; 44: 95–103.

- Greiling H, Kock R.: HPLC in Clinical Chemistry: Selected Topics and Clinical Applications Mikrochim. Acta [Wien] 1991; 2: 135–143.
- Jiwan J-LH, Wallemacq P, Hérent M-F: HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory? Clin Biochem. 2011 Jan; 44: 136–147.
- Kushnir MM, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, Bergquist J, Meikle AW: Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories. Clin Biochem. 2011 Jan; 44: 77–88.
- Švec F: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií. Chem Listy 2009; 103: 266–270.
- Vogeser M, Seger C: A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments. Clin Biochem. 2008; 41: 649–662.
- Zima T: Klinická a toxikologická analýza. Štulík K a Zima T ed., VŠCHT, Praha 2008.

### Otázky k přípravě

1. Jaký je princip separace v chromatografických metodách?
2. Popište důležité části kapalinového chromatografu.
3. Uveďte instrumentální techniky, které jsou dnes často on-line spojeny s kapalinovou a plynovou chromatografií.
4. Proč je třeba sledovat hladiny určitých léčiv při podávání pacientům?
5. U kterých onemocnění se s výhodou používá LC-MS/MS instrumentace v analýze aminokyselin?

## 3.6 Průtoková cytometrie

M. Novák

Průtoková cytometrie je bioanalytická metoda založená na imunochemickém principu (viz kap. 2.4) a na interakcích mezi světlem a fluorochromy<sup>139</sup> značenými částicemi (viz kap. 2.4. a 2.1), která kombinuje jevy rozptylu a odrazu světla s detekcí fotonů emitovaných aktivovaným fluorochromem. Klinický význam průtokové cytometrie je v současnosti velmi velký a neustále se rozvíjející aplikační potenciál daleko přesahuje medicínské aplikace.

### 3.6.1 Technické principy průtokové cytometrie

Analyzované částice (nejčastěji jde o buňky) o velikosti v rozmezí 0,5 až 40  $\mu\text{m}$  jsou unášeny nosnou kapalinou k senzorům tak, aby měřícím bodem procházely v okamžiku analýzy jednotlivě. Zde protínají laserový paprsek, který indukuje jevy ohybu a rozptylu světla a zároveň excituje fluorochrom. Výsledek je syntézou údajů o velikosti

<sup>139</sup> Pojmem fluorochrom se v biomedicínských vědách označuje chemická látka s vlastnostmi fluoroforu, jež slouží např. k barvení preparátů pro fluorescenční mikroskopii nebo k značení buněk pro průtokovou cytometrii.

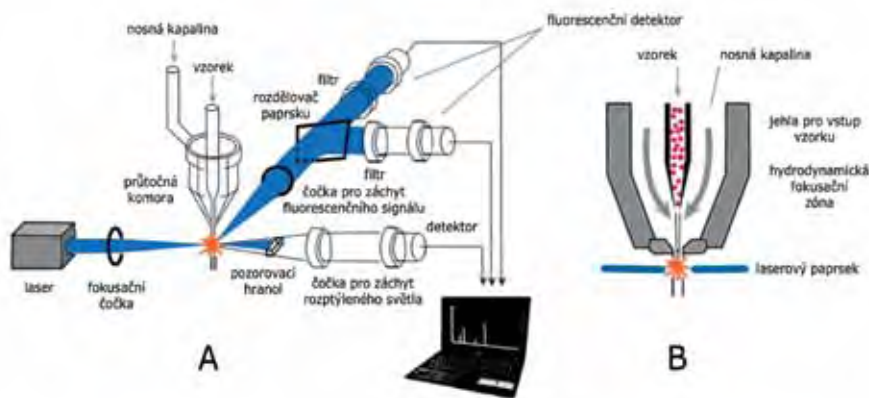
analyzované částice, denzité jejího vnitřního obsahu a intenzitě fluorescence značené protilátky, navázané na cílové struktury na povrchu nebo uvnitř částice. Po analýze jsou částicím přiřazeny naměřené hodnoty a tato data jsou uložena k dalšímu zpracování ve formě datového souboru („list mode“). Ten umožňuje naměřená data opakovaně analyzovat a kombinovat („gatování“).

Průtokový cytometr se skládá ze tří až čtyř technických celků (obr. 69):

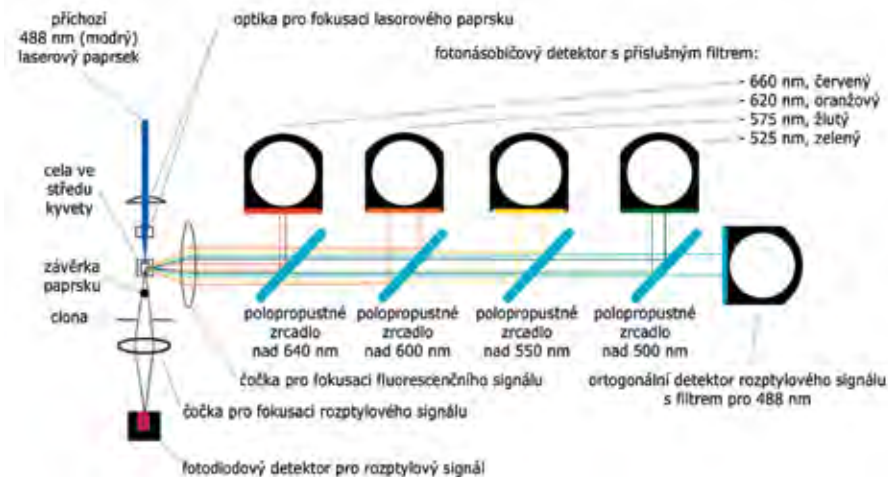
- **optického systému** sestávajícího ze zdroje záření (různé typy laserů, UV lampa) a optických cest vedoucích a rozdělujících signál na příslušné detektory,
- **systému fluidiky**, který definovaným a uživatelsky nastavitelným způsobem transportuje analyzované částice do měřicí (průtočné) komory,
- **výpočetního systému** umožňujícího měnit parametry měření, převádět světelný signál na signál elektrický (analogově digitálním převodníkem, Analog-to-Digital Converter, ACD), nastavovat modul zobrazení, analyzovat a archivovat naměřené hodnoty,
- **sortovací modulu**, který bývá součástí specializovaných cytometrů a umožňuje na základě prováděných měření v reálném čase oddělovat cílovou populaci z analyzovaného vzorku.

### 3.6.1.1 Optický systém

Principem vyšetření metodou průtokové cytometrie je záznam interakce mezi analyzovanými částicemi s excitovaným fluorochromem a světlem emitovaným laserem či UV lampou. Optický systém cytometru sestává z excitační optiky a sběrných optických cest. Excitační optiku tvoří zdroj světla a optické členy, které transportují a zaostřují paprsek do bodu měření. Naprostá většina komerčně dostupných cytometrů je vybavena laserem či lasery. Nejčastěji jde o vzduchem chlazený argonový laser o výkonu 10–25 W vyzařující světlo vlnové délky 488 nm jako základní zdroj záření. Výhodou Ar laseru je především skutečnost, že umožňuje excitaci několika důležitých fluorochromů současně. Další typy laserů a zejména jejich kombinace (např. Kr nebo He-Ne) disponují



**Obr. 69** Schéma průtokového cytometru (A), detail komory (B).



**Obr. 70** Schéma optické lavice cytometru. Detaily v textu.

schopností excitovat více fluorochromů, což je důležité především u cytometrů určených pro výzkumné aplikace. Zvláštním typem excitačního zdroje je rtuťová oblouková lampa. Sběrnou optiku tvoří jednak sestava čoček, které koncentrují fotony emisního a rozptýleného světla a jednak sada zrcadel a filtrů rozdělujících a usměřujících světlo různých vlnových délek na příslušné detektory (obr. 70).

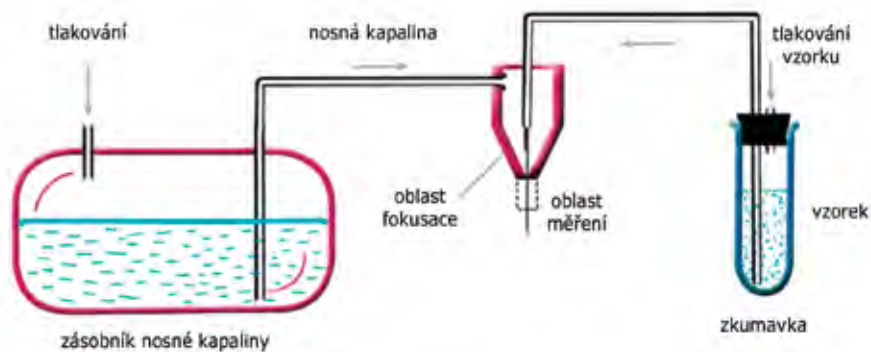
Při **vícebarevném měření** je u jednotlivých fluorochromů zásadní znalost hodnoty Stokesova posunu (viz kap. 2.1). Emisní spektra jednotlivých fluorochromů se totiž mohou výrazně překrývat, což vede k detekci emisního záření jednoho fluorochromu více detektory a tak k závažné chybě měření. Ve „vícebarevném“ experimentu je nutno tento překryv matematicky kompenzovat pomocí tzv. kompenzační matice. Výhodné je zde rovněž využití tzv. tandemových fluorochromů (tandemových konjugátů). Jedná se o dvojice fluorochromů, z nichž jeden slouží jako donor a druhý jako akceptor energie. Výsledkem je zvýšení hodnoty Stokesova posunu, což snižuje interferenci a umožňuje využít širší paletu fluorescenčních barviv. Paralelní detekce několika znaků na jedné částici (buňce) v jednom experimentu (tj. v jedné zkumavce) dramaticky zvyšuje výpovědní hodnotu analýzy. Bez „vícebarevné“ průtokové cytometrie si v dnešní době některá klinicky zásadní stanovení (např. sledování minimální reziduální nemoci, Minimal Residual Disease, MRD<sup>140</sup>) nelze vůbec představit.

### 3.6.1.2 Systém fluidiky

Většina měření na průtokovém cytometru je uskutečňována opticky, je tedy nutno dbát na správnou pozici částic vzorku v proudu nosné kapaliny. K tomu se využívá princip tzv. **hydrodynamické fokusace**, které je dosaženo zavedením „korového“ (obalujícího) proudu nosné kapaliny do měřicí komory (obr. 68B). Tento „obal“ má

<sup>140</sup> Jde o přítomnost malého množství nádorově změněných buněk, které přetrvávají v těle pacienta i po klinicky úspěšné léčbě, kdy je pacient bez známek nemoci.





**Obr. 71** Schéma systému fluidiky. Detaily v textu.

vyšší rychlost proudění (cca  $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) než vzorek (cca  $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ), čímž vzorek stlačuje a uzavírá jej v samotném centru proudu nosné kapaliny. Za podmínek laminárního proudění<sup>141</sup> se tekutina obsahující vzorek nemiesí s nosnou tekutinou, ale vytvoří tzv. koaxiální proudění. Kombinovaný proud tekutiny se vzorkem a nosné tekutiny poté prochází kónicky zúženou sekci, kde dojde ke zmenšení jeho průměru a k současnému zvýšení rychlosti proudění obou tekutin předtím, než dosáhnou oblasti senzorů (obr. 71). Uzavření částic do jádra proudění o velmi malém průměru umožní stabilizovat jejich dráhu při průchodu měřící oblasti. Uniformní osvit těchto částic laserem pak vede k vysoké konzistenci naměřených dat. Rychlost průtoku nosné kapaliny a tedy i počet analyzovaných částic za jednotku času lze uživatelsky upravovat. Při zkracování doby analýzy zvyšováním její rychlosti je však nutné počítat i s růstem nepřesnosti měření.

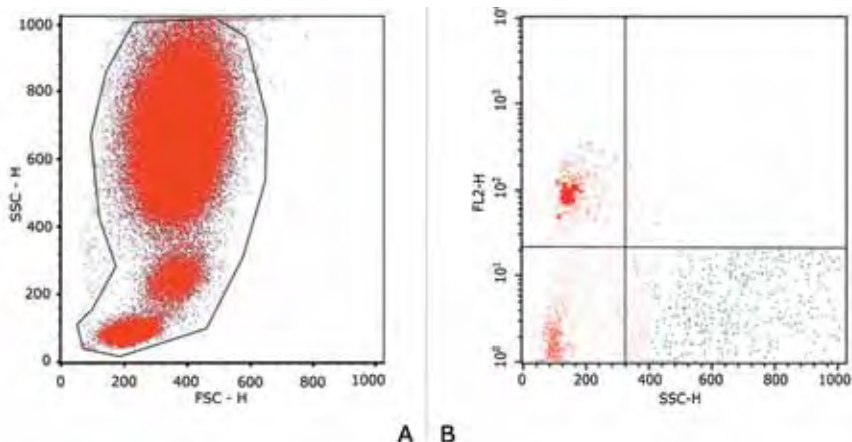
### 3.6.13 Výpočetní systém – detekce a zpracování signálu

V okamžiku měření dochází ke dvěma typům interakce mezi analyzovanými částicemi a světelným zářením, a to jak k interakci záření s fluorescenční značkou navázanou na protilátku, tak k ohybu, odrazu, rozptylu a absorpci světla (tzv. **light scatter**). Ze všech jevů, které provázejí interakci záření s fluorochromem, má pro praktickou cytometrii význam pouze fluorescence. Spojení imunochemického analytického principu s fluorescenčním značením umožňuje přesně definovat komplementární antigen, proti kterému byla značená protilátka namířena. Jevy souhrnně označované jako light scatter závisejí na fyzikálních parametrech částice (buňky), především na její velikosti, vnitřní komplexitě a densitě obsahu (která je daná parametry jádra, membránových organel a granulárního materiálu). Light scatter dále dělíme na dva typy:

- **forward scatter (FSC)**, jež označuje měření (fotodiodou) v rovině procházejícího světla a jeho velikost odpovídá povrchu analyzované částice (buňky),

<sup>141</sup> Laminární proudění je definováno jako proudění kapaliny, ve které trajektorie částic vytvářejí rovnoběžné a vzájemně se nemísící proudnice.





**Obr. 72** Scattergram FSC x SSC (A) a SSC x fluorescence (B).

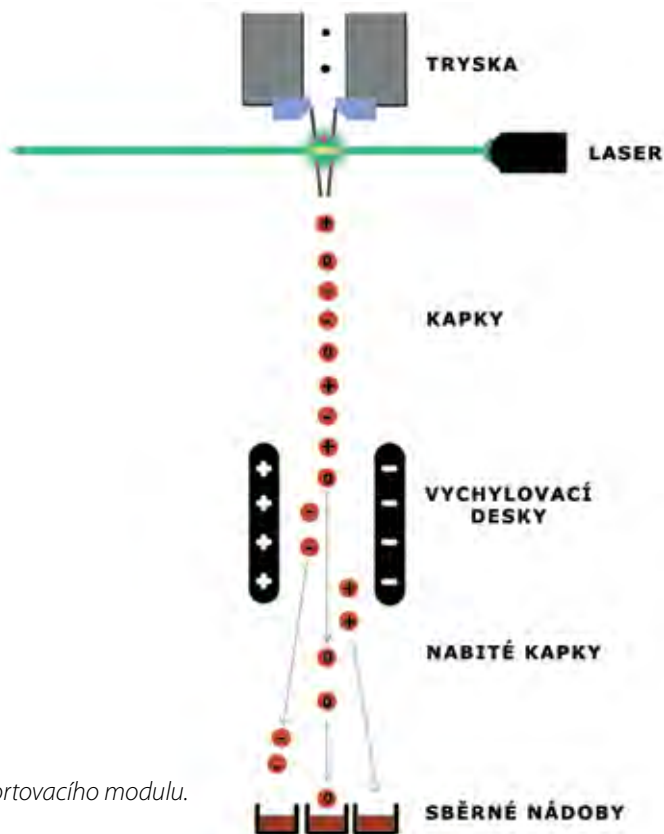
- **side scatter (SSC)**, který odpovídá měření interference světla s denzními strukturami uvnitř buňky. Jedná se zejména o jevy ohybu a odrazu světelného paprsku, díky kterým je SSC měřen detektorem umístěným v úhlu  $90^\circ$  od roviny procházejícího světla.

Sloučením hodnot FSC a SSC do prostoru definovaného osami  $x$  (FSC) a  $y$  (SSC) získáme dvojrozměrné uspořádání analyzovaných částic dle jejich velikosti a denzity vnitřního obsahu. V případě analýzy tělních tekutin se buňky rozdělí do tzv. třípopulačního diferenciálu, ve které je možno rozlišit populace lymfocytů, monocytů a granulocytů od případného debris (materiálu rozpadnutých buněk) (obr. 72).

Signál generovaný FSC je intenzivnější a bývá měřen fotodiodami. Méně intenzivní signály SSC a fotonů emitovaných fluorochromem jsou zpracovávány pomocí fotonásobičů. Fotony dopadající na detektor (fotodioda nebo fotonásobič) jsou převedeny na tok elektronů, signál je proporčně zesílen (vynásoben) na měřitelné hodnoty elektrického proudu, který je následně převeden v derivátoru na napěťový pulz (viz kap. 2.1. a 2.5). Amplituda tohoto pulzu pak odpovídá počtu detektovaných fotonů. Zesílení signálu lze provést zvýšením napětí mezi katodou a anodou fotonásobiče, a/nebo navýšením zisku zesilovače. Zesílení lze nastavit lineárně nebo logaritmsky. Lineární způsob je využíván k zesílení hodnot FSC, SSC a fluorescenčního signálu; logaritmský způsob je obvykle potřebný k odlišení slabého signálu od šumu pozadí. V následném kroku je v ADC převodníku přidělena napěťovému pulzu digitální proměnná tak, že pulzu o napětí 0–1000 mV je přidělen digitální kanál 0–1000. Číslo kanálu je posléze převedeno do počítače, graficky zobrazeno (v odpovídající poloze na tzv. data plotu) a uloženo do paměti. Uložená data pak mohou být zobrazena různými způsoby v závislosti na metodě analýzy.

### 3.6.1.4 Sortování

Pokročilou nadstavbou specializovaných cytometrů je možnost oddělit ze vzorku cílovou populaci částic pomocí sortování. Nejčastěji používanou metodou sortování je vychylování elektricky nabitých kapek obsahujících cílové buňky v elektrostatickém poli. Technické řešení obvykle spočívá v roztržení proudu nosné kapaliny kmitajícím piezoelektrickým krystalem do uniformních kapek, z nichž každá nese právě jednu buňku. Vlastní cytometrická analýza je provedena před tímto krokem a buňkám jsou přiřazeny naměřené hodnoty. Splňuje-li analyzovaná buňka předem nastavené parametry (a je tedy vybrána pro sortování), pak je kapka, jež danou buňku obsahuje, v okamžiku svého zformování nabita dle potřeby pozitivním či negativním elektrickým nábojem. Možnost výběru náboje umožňuje souběžné sortování dvou různých populací. V průběhu pádu se kapky dostávají mezi dvě vodivé, elektricky nabitě desky. Přítomnost elektrostatického pole vede v této fázi k vychýlení nabitých kapek do sběrných nádob. Kapky, které nenesou zájmovou populaci buněk, nejsou nabité a k vychýlení u nich tedy nedojde (obr. 73).



**Obr. 73** Schéma sortovacího modulu.  
Detaily v textu.

## 3.6.2 Biomedicínské aplikace průtokové cytometrie

Aplikační spektrum průtokové cytometrie je velmi široké (tab. 11). Technika zaujala významné postavení zejména v imunologických a onkologických oborech, kde v řadě případů získala statut diagnostického standardu. Stanovení lze provádět z mnoha různých kompartmentů. Pokud se analýze mají podrobit tuhé tkáně (solidní nádory či lymfatické uzliny), je nutné tyto nejprve rozmělnit na buněčnou suspenzi. Tím se ovšem ztrácí důležité diagnostické informace týkající se zejména charakteru postižení (nodulární vs. difúzní). Proto dosahuje technika nejlepších výsledků u tekutých tkání jako je krev, kostní dřev, mozkomíšni mok, ascites, nebo materiál získaný z tzv. bronchoalveolární laváže (BAL).

### 3.6.2.1 Aplikace v hematookologii

V hematookologii je průtoková cytometrie využívána především pro tzv. **imunofenotypizaci** buněk, tedy pro vyšetření kvalitativní i kvantitativní přítomnosti specifických markerů jak na povrchu buněk, tak v jejich cytoplazmě, či v jádře. Tyto markery jsou poté využity k identifikaci vyšetřovaných buněčných populací. V případě vyšetřování hematologických malignit se cytometrie zaměřuje na analýzu leukocytárních antigenů, pro které používáme souhrnné označení HLDA (Human Leucocyte Differentiation Antigens), resp. nově HCDM (Human Cell Differentiation Molecules). Lidské membránové antigeny zařazené v systému HCDM jsou definovány pomocí monoklonálních protilátek a pro přehlednost jsou zařazeny do klasifikačního systému, kde je jednotlivým antigenům přiděleno označení „**Cluster Designation**“ a pořadové číslo<sup>142</sup>. Klinicky významné CD markery jsou cílem komerčně vyráběných monoklonálních protilátek, často konjugovaných s různými fluorochromy pro sestavení „vícebarevného“ experimentu. Cílem imunofenotypizačního vyšetření je buď nález kombinace pozitivita a negativita běžně se vyskytujících znaků, které tvoří tzv. pattern typický pro konkrétní onemocnění, anebo jde o detekci nádorově specifických markerů. Interpretace nálezu je založena na srovnání výsledku měření se skórovacími tabulkami, na základě kterých lze zjištěný imunofenotyp přiřadit konkrétní nozologické jednotce. Známe-li z primodiagnózy imunofenotyp onemocnění, můžeme v průběhu léčby sledovat kvantitativní i kvalitativní změny v zastoupení nádorové populace a posuzovat tak léčebnou odpověď (**stanovení MRD**). Pomocí výše uvedených technik může cytometrická analýza poskytnout odpovědi na mnoho klinicky významných otázek:

- odlišení maligních lymfoproliferací od benigních,
- klasifikace onemocnění,
- určení prognózy nemocného,
- stanovení MRD a monitorování léčebné odpovědi,
- sledování kvality štěpu krvetvorných buněk.

142 Mimo CD nomenklaturu existuje mnoho dalších diagnosticky relevantních epitopů, proti kterým jsou k dispozici komerční protilátky (myeloperoxidáza, terminální deoxynukleotid transferáza, Ki-67 atd.).

### 3.6.2.2 Aplikace v imunologii

Imunologické analýzy se zaměřují na sledování aktivity lymfocytárních subpopulací, např. v rámci cytotoxických reakcí závislých na protilátkách (ADCC), zvláště pak ve vztahu k protinádorové imunitě a k tzv. biologické léčbě<sup>143</sup>. Dále jde o vyšetřování aktivace jednotlivých T-lymfocytárních populací (CD4+, CD8+, NK buňky, T-regulační lymfocyty), sledování produkce cytokinů a funkční analýzy imunokompetentních buněk (fagocytóza, oxidační vzplanutí).

### 3.6.2.3 Další aplikace

**Molekulární biologie, molekulární patologie a nádorová biologie** využívají cytometrických metod např. pro analýzu buněčného cyklu a kinetiky buněčného růstu, pro vyšetření a sortování chromozomů a pro výzkum mechanismů apoptózy (mitochondriální membránové potenciály, změny permeability membrán, aktivace apoptotických drah, degradace DNA atd.). Klinicky velmi významné je sledování vzniku lékových rezistencí u nádorových buněk, zvláště ve smyslu tzv. multidrug resistance, MDR. V hůmanní **andrologické i veterinární praxi** se metodami průtokové cytometrie rutinně vyšetřuje viabilita spermatu. Ve **vědecko-výzkumných** aplikacích se setkáváme např. s analýzou exprese a lokalizace proteinů v rámci proteomických studií nebo se stanovením fosforylace s využitím fluorescenčních proteinů.

Průtoková cytometrie hraje mezi moderními vyšetřovacími metodami významnou roli, zvláště pro svou rychlost, senzitivitu a vysokou diagnostickou hodnotu. Aplikovaný výzkum v oblasti laserových technologií a především praktické využití hybridomových buněk k produkci monoklonálních protilátek (viz kap. 2.4) významně přispěly k rozšíření možností cytometrických analýz. Mnohé vyšetřovací postupy postavené na multiparametrických analýzách buněčných populací se tak staly diagnostickým standardem, a to zejména v hematologii, imunologii, nádorové biologii a molekulární patologii.

### Literatura

- SHAPIRO, H.M., (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons, Inc.
- STOVEL, R., (2001) *Fluidics*. *Curr Protocol Cytom* 1.2.1–1.2.7
- DEAN, P. N., HOFFMAN, R. A. (1997) *Overview of Flow Cytometry Instrumentation* *Curr Protocol Cytom* 1.1.1.–1.1.8
- KLESSINGER, M AND MICHL, J., (1995) *Excited States and Photo-Chemistry of Organic Molecules*, John Wiley & Sons, Inc.
- MARINOV, I., (2008) *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*, Triton Praha
- ECKSCHLAGER, T., a kol. (1999) *Průtoková cytometrie v klinické praxi*, Grada Publishing Praha

143 Jde o využívání látek biologické povahy (např. monoklonální protilátky, rekombinantní peptidy a syntetické oligonukleotidy) k specifické modulaci imunitních a zánětlivých dějů provázejících vznik a vývoj nemocí.

**Tab. 11** Přehled typických aplikací průtokové cytometrie.

typ analýzy	příklady
povrchové antigeny	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ imunofenotypizace v ClusterDesignation systému</li><li>▪ receptory pro interleukiny</li><li>▪ HLA-typizace</li><li>▪ detekce MRD</li></ul>
intracelulární antigeny	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ cy Ig, cy CD3, cy CD22, MPO, TdT, Ki-67, gen <i>BCR/ABL</i>, FoxP3</li><li>▪ detekce MRD</li></ul>
DNA	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ stupeň ploidie</li><li>▪ kinetika buněčného cyklu</li><li>▪ sortování chromozomů</li></ul>
apoptóza	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ rhodamin 123, TRAIL, kaspázy</li></ul>
protilátky	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ stanovení autoprotilátek proti erytrocytům, trombocytům a granulocytům</li></ul>
funkční studie	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ funkce neutrofilů</li><li>▪ fagocytóza</li><li>▪ cytotoxické reakce</li><li>▪ markery zánětu</li><li>▪ cytokiny</li></ul>
buněčné prostředí	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ intracelulární <math>Ca^{2+}</math></li><li>▪ intracelulární pH</li><li>▪ membránový potenciál</li></ul>
průnik léčiv do buňky	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ adriamycin, antracyklin, metotrexát</li></ul>
testování alergií	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ test degranulace bazofilů</li></ul>
buněčná signalizace	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ fosforylace a defosforylace enzymů</li></ul>
ostatní	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ fetomaternální transfúze</li><li>▪ cirkadiánní periodicitu</li><li>▪ viabilita spermatu</li></ul>
nelékařská biologie	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ autofluorescence chlorofylu</li><li>▪ detekce mikroorganismů</li><li>▪ analýza planktonu</li><li>▪ rostlinné chromozomy</li></ul>

**Otázky k zopakování:**

1. K čemu slouží nosná kapalina?
2. Jakým způsobem stanovujeme velikost buněk?
3. Za jakých podmínek lze stanovovat více znaků na jedné buňce souběžně?
4. Jaká jsou omezení při cytometrické analýze solidních tkání?
5. Co je to imunofenotypizace a kde se používá?

## Seznam zkratek

- **ACD** – analogově digitální převodník (analog-to-digital convertor)
- **AGE** – konečné produkty pokročilé glykace (advanced glycation end-products)
- **AMV** – vir ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus)
- **BAL** – bronchoalveolární laváž (bronchoalveolar lavage), diagnostická metoda umožňující získat vzorek bronchoalveolární tekutiny z dolních dýchacích cest a alveolů
- **bp** – páry bází (base pairs), viz nukleové kyseliny
- **CCD** – elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace, resp. kamerový systém (charge-coupled device)
- **CD** – cirkulární dichroismus (circular dichroism)
- **CDA** – competition dialysis assay, *není český ekvivalent*
- **CDT** – karbohydrát-deficientní transferin (carbohydrate-deficient transferrin)
- **cDNA** – komplementární DNA (complementary DNA)
- **CE** – kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
- **CE/MS** – kapilární elektroforéza on-line spojená s MS detektorem (capillary electrophoresis/mass spectrometry)
- **CLIA** – chemiluminiscenční imunoanalýza (chemiluminescent immunoassay)
- **CGH** – comparative genome hybridization, *není ustálený český ekvivalent*
- **CNV** – copy number variations, *není český ekvivalent*
- **cRNA** – komplementární RNA (complementary RNA)
- **CSF** – mozkomíšní mok, likvor (cerebrospinal fluid)
- **DESI** – ionizace desorpčním elektrosprejem (desorption electrospray ionization)
- **DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
- **ECLIA** – elektrochemiluminiscenční imunoanalýza (electrochemiluminescent immunoassay)
- **EDTA** – kyselina etylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)
- **EI** – elektronová ionizace (electron ionization)
- **EIA** – enzymová imunoanalýza (enzyme immunoassay)
- **ELISA** – enzymová imunoanalýza na pevné fázi (enzyme-linked immunosorbent assay), *není ustálený český ekvivalent*
- **EMIT** – enzyme-multiplied immunoassay technique, *není český ekvivalent*
- **ESI** – ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
- **FAD** – flavinadenin dinukleotid (**FADH**, redukovaná forma)
- **FIA** – fluorescenční imunoanalýza (fluorescence immunoassay)
- **FISH** – fluorescenční *in situ* hybridizace (fluorescent in situ hybridization)
- **FPIA** – fluorescenční polarizační imunoanalýza (fluorescence polarization immunoassay), *není ustálený český ekvivalent*
- **FRET** – Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer)
- **FSC** – dopředný rozptyl (forward scatter), viz průtoková cytometrie
- **FT** – Fourierova transformace

- **FT-ICR** – iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance)
- **GC** – plynová chromatografie (gas chromatography)
- **GC/MS** – plynová chromatografie on-line spojená s hmotnostním spektrometrem (gas chromatography/mass spectrometry)
- **GIT** – gastrointestinální trakt (gastrointestinal tract)
- **gRNA** – řídicí RNA (guide RNA)
- **GST** – glutathion-S-transferáza (glutathione-S-transferase)
- **HAMA** – lidské protilátky proti myším protilátkám (human anti-mouse antibodies)
- **HCDM** – human cell differentiation molecules, *není český ekvivalent*
- **HDL** – lipoproteiny o vysoké hustotě (high-density lipoproteins)
- **HLDA** – human leucocyte differentiation antigens, *není český ekvivalent*
- **HPLC** – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
- **HPV** – lidský papilomavirus (human papillomavirus)
- **HRM** analýza – analýza křivek tání s vysokým rozlišením (high resolution melting)
- **IČ (IR)** – infračervená (infra red) oblast spektra
- **ILMA** – luminometrická imunoanalýza (immunoluminometric assay), *není ustálený český ekvivalent*
- **IRMA** – imunoradiometrická analýza (immunoradiometric assay), *není ustálený český ekvivalent*
- **ITP** – izotachofóréza (isotachopheresis)
- **ISO-DALT** – *není český ekvivalent*, jde o dvojrozměrnou elektroforézu: ISO = izoelektrická fokusace, DALT = dělení dle molekulové hmotnosti (isoelectric focusing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)
- **IT** – iontová past (ion trap)
- **IZ** – ionizující záření
- **kb** – počet párů bazí  $\times 10^3$ , viz nukleové kyseliny
- **LAIP** – aberantní/leukemický imunofenotyp (leukemia-associated aberrant immunophenotype)
- **LC** – kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
- **LC/MS** – kapalinová chromatografie on-line spojená s hmotnostním spektrometrem (liquid chromatography/mass spectrometry)
- **LC/MS/MS** – kapalinová chromatografie on-line spojená s dvěma hmotnostními spektrometry (liquid chromatography tandem mass spectrometry)
- **LDL** – lipoproteiny o nízké hustotě (low-density lipoproteins)
- **LED** – dioda emitující světlo (light emitting diode)
- **LIA** – luminiscenční imunoanalýza (luminoimmunoassay)
- **LIS** – laboratorní informační systém
- **LSC** – kapalinová scintilační spektrometrie (liquid scintillation counting)
- **M** – marker
- **MALDI** – laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization)
- **MB** – molekulární biologie (molecular biology)

- **MCP** – mikrokanálová destička (microchannel plate)
- **MEKC** – micelární elektrokinetická chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
- **miRNA** – microRNA, *není český ekvivalent*
- **M-MLV** – vir myši leukémie (moloney murine leukemia virus)
- **mRNA** – mediátorová RNA (messenger RNA)
- **MRD** – minimální reziduální nemoc (minimal residual disease)
- **MS** – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
- **MS/MS** – tandemová hmotnostní spektrometrie
- **NA** – nukleová kyselina (nucleic acid)
- **NAD<sup>+</sup>** – nikotinamidadenindinukleotid (**NADH**, redukováná forma)
- **NADP<sup>+</sup>** – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (**NADPH**, redukováná forma)
- **NIR** – blízká infračervená (near infra-red) oblast spektra
- **NIS** – nemocniční informační systém
- **OT** – orbitrap, *není ustálený český ekvivalent*
- **PAG** – polyakrylamidový gel (polyacrylamide gel)
- **PCR** – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
- **PCR-RFLP** – PCR-restriction fragment length polymorphism, *není český ekvivalent*
- **PDGF** – růstový faktor z destiček (platelet derived growth factor)
- **PET** – pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
- **PNA** – peptidová nukleová kyselina (peptide nucleic acid)
- **POCT** – laboratorní vyšetření v místě péče o pacienta (point of care testing)
- **POD** – peroxidáza (peroxidase), taktéž křenová peroxidáza, **HRP** (horseradish peroxidase)
- **Q** – kvadrupól (quadrupole)
- **QCM** – křemenné mikrováčky (quartz crystal microbalance)
- **RAP** – resonant acoustic profiling, *není český ekvivalent*
- **RCF** – relativní setrvačné odstředivé zrychlení (relative centrifugal force)
- **RIA** – radioimunoanalýza (radioimmunoassay)
- **RNA** – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
- **ROA** – Ramanova optická aktivita (Raman optical activity)
- **rpm** – počet otáček za minutu (revolutions per minute)
- **rRNA** – ribozómalní RNA (ribosomal RNA)
- **RRT** – náhrada funkce ledvin (renal replacement therapy)
- **RT** – reverzní transkripce (reverse transcription)
- **RTG** záření – rentgenové záření
- **SAW** – surface acoustic wave, *není český ekvivalent*
- **SDS** – dodecylsírán sodný/laurylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
- **SELDI** – laserová desorpce/ionizace s vylepšeným povrchem (surface-enhanced laser desorption ionization)
- **sFLC** analýza – serum free light chain analysis, *není český ekvivalent*
- **siRNA** – krátká interferující RNA (small interfering RNA)
- **SNP** – jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)



- **FT-IR** spektroskopie – infračervená spektroskopie s využitím Fourierovy transformace (Fourier transform infrared spectroscopy)
- **SPR** – rezonance povrchových plazmonů (surface plasmon resonance)
- **SSC** – boční rozptyl (side scatter), viz průtoková cytometrie
- **SSCP** – jednořetězcový konformační polymorfismus (single-strand conformation polymorphism)
- **TCR** – specifický receptor pro antigen na T-lymfocytech (T-cell receptor)
- **T<sub>m</sub>** – teplota tání (melting temperature)
- **TOF** – analyzátor doby letu (time-of-flight)
- **TR-FIA** – časově rozlišená (time-resolved) FIA
- **tRNA** – transferová RNA (transfer RNA)
- **Tth** – bakterie *Thermus thermophilus*, viz termostabilní polymeráza pro PCR
- **UPLC** – ultra performance liquid chromatography, *není český ekvivalent*
- **UV** – ultrafialová (ultra-violet) část spektra
- **VIS** – viditelná (visible) část spektra elektromagnetického záření
- **VLDL** – lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low-density lipoproteins)
- **wt** – wild-type; běžná populační – alela

## Terminologický slovník

- **absorbance** – veličina udávající jaké množství světla vzorek pohltí, kvantitativní údaj
- **absorpce** – pohlcení
- **absorpční spektrum** – závislost absorbance na vlnové délce
- **aditivum** – látka uměle přidávaná do systému
- **afinita** – schopnost látky vázat se k jiné látce (např. schopnost protilátky vázat se k antigenu, viz imunoanalýza)
- **aglutinace** – shlukování velkých nerozpustných částic (erytrocytů, latexových částic apod.) specifickými protilátkami, tzv. aglutininy
- **alikvot** – část materiálu odebraná z analytického vzorku za účelem provedení měření (složení alikvotu a původního vzorku je indentické)
- **analyt** – stanovovaná látka ve vzorku
- **analytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření zahrnující samotnou analýzu a získání (výpočet hodnoty) výsledku v laboratoři
- **antigen** – struktura interagující s protilátkou; může být kompletní, tj. vést k tvorbě specifických protilátek (imunogen) anebo nekompletní (hapten)
- **antisérum** – sérum zvířete obsahující (po imunizaci antigenem) polyklonální protilátky; jeden antigen vede k tvorbě *polyklonálního monospecifického antiséra*, směs antigenů navodí tvorbu *polyklonálních polyspecifických protilátek*
- **aptamer** – oligonukleotid nebo peptid schopný specifické vazby k cílové molekule
- **autofluorescence** – fluorescence vyzařovaná vzorkem samotným (bez značení)
- **biorekogniční prvek** – biologická komponenta tvořící s fyzikálně-chemickým převodníkem biosenzor
- **cut off hodnota** – pokud se týká membránových separací, pak jde o nejmenší molekulovou hmotnost separované substance v Daltonech (Da), kterou je membrána schopna zcela zadržet
- **cyklické variace** – pravidelně se opakující jevy s predikovatelnou periodou (u ultradiálních << 24 h, u cirkadiálních ~ 24 h, u infradiálních > 24 h, u cirkanuálních ~ 1 r), viz preanalytická fáze
- **derivatizace** – reakce analytu s vhodným činidlem za vzniku produktu, který je lépe separován či detektován
- **dialyzát** – roztok vzniklý při dialýze na opačné straně membrány nežli se nachází vzorek (při mikrodialýze však jde o vzorek samotný)
- **elektroendoosmóza** – nežádoucí jev, který působí rušivě na ostrost zónových rozhraní. Jeho výskyt se omezuje vhodnou volbou dělicího materiálu a modifikací elektroosmoticky aktivních povrchů se surfaktanty v dělicím gelu, viz elektroforéza.
- **emise** – vyzaření
- **emisní spektrum** – závislost intenzity emise světla na vlnové délce emise
- **epitop** – (antigenní determinanta) specifické místo antigenu interagující s protilátkou
- **excitační spektrum** – závislost intenzity emise světla na vlnové délce excitace

- **extinkční koeficient** – koeficient (závislý na vlnové délce světla), který charakterizuje s jakou účinností je molekula schopna pohlcovat světlo
- **fluorescence** – emise světla při přechodu mezi stavy se stejnou hodnotou spinu
- **fluorescenční sonda** – fluorofor, který podává informace o zkoumaném systému bez kovalentní vazby na některou z molekul ve vzorku
- **fluorescenční značka** – fluorofor, který je kovalentně navázaný na zkoumanou molekulu
- **fluorofor** – chemická sloučenina emitující fluorescenční záření
- **fluorochrom** – viz fluorofor (pojem je využíván zejm. v imunologické literatuře)
- **fosforescence** – emise světla při přechodu mezi stavy s různou hodnotou spinu
- **fotonásobič** – vakuová fotocitlivá součástka využívající zesilovacího efektu prostřednictvím sekundární emise na systému elektrod. Prvotní proud, iniciovaný dopadem světla na světlocitlivou vrstvu, fotokatodu, je tak mnohonásobně zesílen.
- **Fourierova transformace** – matematická úprava, která umožňuje např. převod časové závislosti na frekvenční závislost
- **gelové separátory** – gely oddělující supernatant ve zkumavce od (formovaných) krevních elementů a zvyšující tak jeho stabilitu
- **hapten** – (nízkomolekulární) sloučenina interagující se specifickou protilátkou; není imunogenní, tj. neindukuje její tvorbu (k tomu vyžaduje makromolekulární nosič)
- **hemolýza** – proces rozpadu erytrocytů, modifikující vzhled a složení (zejména) plazmy, významný zdroj preanalytické variability
- **heterofilní protilátky** – lidské protilátky, které interagují s bílkovinami jiného živočišného druhu; jsou přítomny v krvi pacientů, kteří byli v minulosti exponováni imunogenům z jiných živočišných druhů
- **heterozygot** – jedinec, v jehož somatické buňce se nacházejí v rámci dvou homologních chromozómů různé alely sledovaného genu
- **homologní řetězce** – jednořetězce s totožnou primární strukturou polynukleotidového řetězce, nejsou tedy vzájemně komplementární
- **homozygot** – jedinec, v jehož somatické buňce se nacházejí v rámci dvou homologních chromozómů dvě totožné alely sledovaného genu
- **hook efekt** – přítomnost relativního přebytku antigenu k množství diagnostické protilátky vedoucí k falešně nízké hodnotě koncentrace antigenu, viz imunoanalýza
- **hybridom** – klon imortalizovaných (nesmrtelných) buněk vzniklých fúzí plazmocytů (ze sleziny imunizovaného zvířete) s myelomovými buňkami
- **chromatograf** – zařízení sloužící k chromatografické separaci složek vzorku
- **chromatogram** – grafický výstup z detektoru vznikající během chromatografického procesu vyjadřující závislost signálu (osa  $y$ ) na elučním čase nebo objemu (osa  $x$ )
- **imobilizovaná vrstva** – vrstva molekul nanesená na povrch senzoru nebo matrice čipu
- **impedimetrie** – elektrochemická metoda založená na měření odporu
- **imunoblotting** – technika otisku, čili přenosu elektroforeticky rozdělených molekul z mobilní fáze vázané v gelu do fáze pevné, jejíž detekční koncovka je založená na enzymem značených specifických protilátkách

- **imunofixace** – metoda využívaná k detekci a typizaci monoklonálních imunoglobulinů a jejich frakcí, založená na elektroforetickém rozdělení bílkovin v gelu, fixaci těžkých a lehkých řetězců pomocí specifických protilátek a následném barvení
- **imunogen** – (kompletní) antigen se schopností navodit specifickou imunitní odpověď (imunogenicita) a specificky interagovat s produkty této odpovědi
- **imunoglobulin** – glykoprotein s funkcí protilátky složený ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců
- **imunokomplex** – produkt interakce antigenu a protilátky
- **(analytická) interference** – nežádoucí ovlivnění analýzy (analytickým) interferentem, které vede ke vzniku systematické chyby měření. V optice se pod pojmem interference rozumí skládání světelných vln.
- **(analytický) interferent** – složka vzorku, která má (nežádoucí) vliv na měřenou veličinu
- **intraindividuální variabilita** – variabilita podmíněná genetickým pozadím a aktuálními změnami, které se týkají individua, viz preanalytická fáze
- **izoelektrický bod (*pI*)** – odpovídá hodnotě pH, při které v roztoku převládá dipolární forma aminokyseliny, dipolární ion při  $pH = pI$  v elektrickém poli nemigruje
- **izotopy** – nuklidy téhož prvku se stejným atomovým číslem  $Z$
- **komplementární řetězce** – v dvouřetězci DNA jsou obě vlákna vzájemně poutána vodíkovými vazbami mezi nukleotidovými bázemi; cytosin tvoří s guaninem tři vodíkové vazby, adenin s thyminem dvě vazby (Watson-Crickovo párování bází). Jako komplementarita se nazývá schopnost nukleotidových bází tvořit vodíkové vazby v rámci vznikajícího dvouřetězce DNA.
- **konduktometrie** – elektrochemická metoda založená na sledování vodivosti
- **konjugát** – molekula protilátky nebo antigenu s navázanou značící látkou, viz imunoanalýza
- **kontinuální zdroj světla** – zdroj, jehož intenzita vyzařování se v čase nemění
- **kyveta** – nádoba, v optických spektroskopiích většinou pravoúhlá, do které umístíme vzorek při měření
- **laboratorní komplement** – nemocniční oddělení provádějící laboratorní vyšetření (klinická biochemie, mikrobiologie, hematologie, imunologie, patologie, nukleární medicína a další)
- **matrice** – nosič zkoumaného analytu neboli všechny složky analyzovaného vzorku kromě stanovovaného analytu
- **mikrodialyzační sonda** – miniaturizované kovové nebo plastové zařízení tvaru jehly nebo vlákna disponující semipermeabilní membránou
- **mikrodialýza** – proces odebírání molekul extracelulární tekutiny (nebo naopak obohacování tkáňového moku o jiné molekuly) využívající implantovanou mikrodialyzační sondu a založený na difúzi látek přes semipermeabilní membránu
- **minimální reziduální nemoc** – subklinická úroveň nádorového onemocnění, kdy maligní buňky již nejsou běžnými cytologickými metodami detekovatelné
- **mobilní fáze** – kapalina nebo plyn, které unášejí složky dělené směsi přes stacionární fázi, viz separační techniky

- **monochromátor** – prvek, který z polychromatického světla vybere pouze úzkou část spektra
- **monoklonální protilátka** – specifická protilátka tvořena jedním klonem plazmatických buněk
- **nosič** – v separačních technikách jde o pevnou, z hlediska dělení pokud možno inertní látku, se kterou je spojena zakotvená fáze. Díky tomu je stacionární fáze nepohyblivá.
- **optoda** – sensor na bázi optických vláken
- **paratop** – specifické vazebné místo protilátky interagující s epitopem
- **perfuzát** – roztok, který vtéká do mikrodialyzační sondy (a umožňuje tak vznik dialyzátu)
- **perianalytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření probíhající paralelně s analýzou a zahrnující konzultaci lékaře při znalosti dílčích výsledků
- **permeát** – roztok, který při membránové separaci za zvýšeného tlaku (reverzní osmóze) prochází membránou
- **plazma** – supernatant získaný centrifugací zkumavky s nesraženou krví
- **polarizátor** – optický prvek, který propouští lineárně polarizované světlo, tzn., že vektor elektrického pole kmitá jen v jednom směru
- **polyklonální protilátky** – různé protilátky tvořeny různými klony plazmatických buněk v odpovědi na imunogen (s více epitopy)
- **postanalytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření následující po analýze vzorku a zahrnující archivaci vzorku, potvrzení dat, jejich klinicko-biochemickou interpretaci a přenos do informačních systémů (odeslání ošetřujícímu lékaři)
- **postpostanalytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření obsahující klinickou interpretaci laboratorních dat a volbu léčebné strategie založenou na této interpretaci
- **potenciometrie** – elektrochemická metoda založená na měření rovnovážného napětí článku, který je složen z pracovní (indikační) a srovnávací (referentní) elektrody
- **preanalytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření počínaje příjmem vzorku v laboratoři a konče vložením vzorku do analytického měřicího systému. Zahrnuje skladování vzorku a jeho přípravu k analýze.
- **prepreanalytická fáze** – fáze laboratorního vyšetření sestávající ze souboru postupů od indikace vyšetření až po transport vzorku do laboratoře (včetně). Zahrnuje vyplnění žádanky, odběr, identifikaci, zpracování a uchovávání vzorku.
- **preanalytická variabilita** – variabilita výsledků daná preanalytickými faktory
- **precipitace** – vznik nerozpustného konglomerátu molekul na základě interakcí (ekvivalentních koncentrací) rozpuštěného antigenu a rozpuštěné protilátky
- **primer** – (zpravidla) oligonukleotidový řetězec, který slouží jako počáteční místo replikace nukleových kyselin
- **protilátka** – glykoprotein produkovaný aktivovanými B-lymfocyty (plazmatickými buňkami) v odpovědi na imunogen, který (podobně jako haptenu) specificky váže
- **protisrážlivá činidla** – aditiva bránící krevnímu srážení; potenciální zdroj analytických interferencí
- **referenční gen** – gen, jehož exprese v buňce není ovlivněna aktuálním stavem buňky ani vnějšími podmínkami; je nazýván také *house-keeping* genem nebo ge-

nem normalizačním. V molekulární biologii se používá pro vyjádření relativního množství studovaného genu (výsledek se udává zpravidla v procentech).

- **refrakce** – lom
- **rekombinantní termostabilní polymerázy** – termostabilní polymerázy, které si zachovávají katalytickou aktivitu při vysokých teplotách (70–90 °C). Byly izolovány z bakteriálních kmenů žijících v oblastech sopečného původu (gejzíry, sopečné průduchy). Pro polymerázovou řetězovou reakci se dnes používají enzymy uměle produkované v *E. coli* s upravenou genetickou informací.
- **retentát** – roztok, který při membránové separaci za zvýšeného tlaku (reverzní osmóze) neprochází membránou
- **rozptyl** – změna směru šíření světla
- **rozptyl elastický** – jev, při kterém dochází pouze ke změně směru šíření světla beze změny jeho vlnové délky
- **rozptyl neelastický** – jev, při kterém dochází ke změně směru šíření světla a současně ke změně jeho vlnové délky
- **screeningové metody** – metody určené k vyhledávání chorob. V molekulárně-biologické diagnostice jde o metody schopné najít známé i neznámé typy alelických variant v daném úseku DNA řetězce.
- **sérum** – supernatant získaný centrifugací zkumavky se sraženou krví
- **spektroskopie** – metoda založená na měření spekter
- **spektrum** – závislost měřeného signálu na energii světla. Vzhledem k tomu, že energie světelného kvanta (fotonu) je svázána s vlnovou délkou světla, bývá často spektrum prezentováno jako závislost na vlnové délce světla.
- **stacionární fáze** – pevná látka nebo s ní nepohyblivě spojený povlak kapaliny, která je vlastní účinnou složkou chromatografického zařízení
- **supernatant** – centrifugační oddělený materiál, který se nachází blíže k ústí zkumavky (blíže ke dnu se nachází infranatant)
- **templát** – vlákno DNA, podle něhož se po navázání primeru tvoří činností polymerázy vlákno komplementární
- **turniket** – gumové škrtidlo usnadňující venepunkci; významný zdroj preanalytické variability (v důsledku hemolýzy, hypoxie)
- **uzavřený odběrový systém** – systém neumožňující přímou manipulaci pracovníka se vzorkem krve (opakem je systém otevřený)
- **valence** – pojem popisující počet vazebných míst látky (protilátky, antigenu apod.)
- **venepunkce** – odběr žilní krve
- **vnitřní standard** – látka o známé koncentraci, která se přidává k biologickému vzorku na počátku přípravy vzorku před analýzou. K její koncentraci se vztahují stanovované složky. Obvykle se jedná o sloučeninu strukturou blízkou stanovované látce, která není fyziologicky přítomna v biologických materiálech. Smyslem použití vnitřního standardu je eliminovat ztráty způsobené úpravou vzorku před vlastní analýzou.
- **voltametrie** – taktéž „voltampérometrie“, je elektrochemická metoda založená na sledování proudových změn jakožto funkce potenciálu
- **zkřížená reaktivita** – reakce mezi protilátkou a antigenem, který její tvorbu nevyvolal

# Rejstřík

## A

absorbance 24  
absorbovaná dávka 72  
absorpci 21  
absorpční spektroskopie, UV/VIS 24  
aferéza 90  
afinitní značka 49  
aglutinace 53  
aglutinační metody 57  
aglutinát 53  
aglutinogen 53  
aktivita zářiče 70  
amfolyt 115  
amperometrie 44  
amplikon 96  
analyt 8  
analytická centrifugace 89  
analytická fáze 7  
analýza proteomu 42  
analyzátor doby letu 39  
anizotropie fluorescence 27  
antigen 52  
antigenní determinant 53  
aptamer 45  
autofluorescence 29  
autoprotilátky 56  
avidin 49

## B

beta-zářič 60  
biomarker 42  
biomarkerové studie 42  
biorekogniční prvek 45  
biosenzor 45  
biotin 49  
biuretová reakce 26

## C

centrifuga 81  
centrifugace 81  
cirkulární dichroizmus 31

Coombsův test 57  
coulometrie 44  
cytaferéza 90

## Č

čip 43, 47

## D

dávka záření 72  
denaturace 96  
denzitometrie 113  
deoxyribonukleová kyselina 93  
derivatizace vzorku 126  
desorpční elektrosprej 38  
detektor 40  
detektor materiálový, elektronický 73  
detektor, optický 23  
dialýza 107  
diferenciální centrifugace 86  
dioda 22  
DNA aptamer 47  
DNA čip 47  
DNA templát 97

## E

efektivní dávka 72  
elektroanalytické metody 44  
elektroda 44  
elektrodialýza 108  
elektroendoosmóza 113  
elektroforeogram 113  
elektroforetický typ 118  
elektroforéza 112  
elektrogravimetrie 44  
elektromagnetické vlnění 20  
elektromigrační techniky 112  
elektronová ionizace 35  
elektronový násobič 40  
elektrosprej 35  
eluce  
– gradientová 124

- izokratická 124
- emise 21
- emisní spektrum 27
- energie fotonu 20
- epitop 53
- excitační spektrum 27
- expozice 72
- expresní profilování 42
- extinkční koeficient 24

## F

- fenol-chloroformová izolace nukleových kyselin 93
- fluorescence 26
- fluorescenční imunoanalýza 61
- fluorescenční mikroskopie 28
- fluorescenční protein 28
- fluorescenční sonda – hydrolytická, hybridizační 100
- fluorescenční značka, sonda 28
- fluorofor 26
- fluorochrom 64
- forward scatter 134
- fosforescence 26
- fotodioda 23
- fotoelektrický jev 23
- fotokatoda 23
- fotoluminiscence 26
- fotometrie 24
- fotonásobič 23
- fyzikálně-chemický převodník 45

## G

- gama-zářič 60
- gatování 132
- glukózaoxidáza 45
- glukózový senzor 45
- gradientová centrifugace 87

## H

- HAMA protilátky 56
- haptén 53
- Heidelberger-Kendalova precipitační křivka 57

- hemodialýza 108
- hemofiltrace 110
- hemolýza 14
- heteroduplex 103
- heterofilní protilátky 56
- heterogenní metoda 54
- hmotnostní analyzátor 39
- hmotnostní spektrometr 34
- hmotnostní spektrometrie 34
- hmotnostní spektrum 40
- homoduplex 103
- homogenní metoda 54
- hook efekt 56
- hybridizace 96, 101
- hybridom 53
- hydrodynamická fokusace 133

## Ch

- chaotropní látky 94
- choriové klky 17
- chromatografie
  - analytická 123
  - kapalinová 123
  - plynová 123
  - preparativní 123
- chromatogram 123

## I

- ikterita 14
- imunoafinitní chromatografie 63
- imunoblotting 59, 115
- imunofenotypizace 137
- imunofixace 59, 114
- imunofixační elektroforéza 59
- imunogen 53
- imunokomplex 52
- imunometrická analýza 55
- imunonefelometrie 58
- imunoradiometrie 60
- imunoturbidimetrie 58
- infračervená spektroskopie 31
- interferent 56
- interferometrie 31
- ionizující záření 71



iontová past 39  
iontový zdroj 35  
izoelektrická fokusace 115  
izoelektrický bod 115  
izolace nukleových kyselin 93  
izotachoforéza 117

## J

Jabloňského diagram 27  
jaderné záření 68  
jaderný izomer 70

## K

kapalinová scintilační spektrometrie 77  
kódující řetězec DNA 96  
kompetitivní metoda 55  
komplementární DNA 95  
komplement-fixační test 58  
koncentrační gradient 107  
konduktometrie 45  
konjugát 53  
konstanta radioaktivní přeměny 70  
kontinuální detektory 72  
konvekce 110  
krev 10  
krystalový počítač, gama-počítač 60  
kumulativní detektory 72  
kvadrupól 39  
kyslíková elektroda 45

## L

laboratorní komplement 8  
laboratoř na čipu 66  
Lambert-Beerův zákon 24  
laser 22, 37  
laserová desorpce/ionizace s vylepšeným povrchem 38  
ligand 52  
lipémie 14  
luminiscenční imunoanalýza 61  
luminofor 26

## M

matrice 14, 37

membrána  
– mikroporózní 107  
– polopropustná (semipermeabilní) 106  
– ultrafiltrační (anizotropní) 107  
membránové separace 106  
metoda Bradfordové 26  
metoda jedнокroková, dvoukroková 55  
mikrodialýza 108  
mikrofiltrace 109  
mikrojamková destička 24, 61  
mobilní fáze 122  
moč 15  
močový konkrement 18  
molekulární biologie 92  
monochromátor 23  
monoklonální protilátky 53  
multimarkerová strategie 66  
multiplexní technologie 65

## N

nanofiltrace 109  
nefelometrie 30  
nekódující řetězec DNA 96  
nekompetitivní metoda 55  
nepřímá imunofluorescence 64  
nosný plyn 129

## O

odběr kapilární krve 13  
odběr krve 12  
odběrová stříkačka 12  
optická detekce 20  
optoda 45  
orbitrap 39

## P

pelet 81  
personalizovaná medicína 51  
pevné tkáně 18  
plazma 10  
plazmaferéza 90  
plodová voda 17  
POCT 8

poločas přeměny 71  
polyakrylamidový gel 113  
polyklonální protilátky 53  
polymerace 96  
postanalytická fáze 7  
postpostanalytická fáze 7  
pot 17  
potenciometre 44  
preanalytická fáze 7  
precipitace 53  
precipitát 53  
preparativní centrifugace 89  
prepreanalytická fáze 7  
primer 95  
proteinový čip 47  
protilátka 52  
přímá imunofluorescence 64  
punkce tepny 13

## R

radioaktivita 68  
radioaktivita přirozená, umělá 69  
radioaktivní přeměna 68  
radioaktivní řada 70  
radioimunoanalytické (izotopové)  
metody 60  
radioimunoanalýza 60  
radionuklid 69  
Ramanova spektroskopie 31  
Ramanův rozptyl 31  
reflexní spektroskopie 25  
refraktometrie 31  
rekombinantní termostabilní  
polymeráza 97  
relativní setrvačné odstředivé  
zrychlení 82  
rentgenové záření 69  
restrikční fragment 101  
retenční čas 123  
reverzní osmóza 109  
reverzní transkripce 95  
reverzní transkriptáza 95  
ribonukleová kyselina 93  
RNA templát 95

rotor 83  
rozptyl 21

## S

scintilace 75  
scintilační detektor 73  
scintilační počítač 60, 75  
scintilátor 75  
sediment 81  
sekvenování DNA 102  
sendvičový test 54  
senzor 43  
separační zkumavka 12  
sérum 10  
setrvačná odstředivá síla 81  
side scatter 135  
sliny 17  
Snellův zákon 32  
spektroskopie 21  
spot 49  
stacionární fáze 122  
standardizace 57  
stolice 16  
streptavidin 49  
supernatant 81  
synoviální tekutina 17

## T

tandemová hmotnostní  
spektrometrie 39  
Taylorův kužel 35  
termocyklér 100  
test přímý, nepřímý 54  
titr protilátky 58  
toxikologie 42  
translační výzkum 50  
turbidimetrie 30

## U

ultrafiltrace 109  
umělá radioaktivita 69

## V

vazebný reagent 52

venepunkce 11  
vlnočet 21  
vlnová délka 21  
vlnově-korpuskulární dualizmus 20  
voltmetrie 44  
výpotek 17  
vysokoúčinná kapalinová  
chromatografie 124

## **W**

western blotting 115

## **X**

xenobiotikum 29

## **Z**

zákon radioaktivní přeměny 70  
záření alfa 68  
záření beta 68  
záření gama 68  
zdroje světla 22  
zkřížená reakce 56  
zónová elektroforéza 114

# Poznámky













MUDr. Norbert Cibiček, Ph.D.  
Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D., a kolektiv

**PRINCIPY A VYUŽITÍ VYBRANÝCH ANALYTICKÝCH METOD  
V LABORATORNÍ MEDICÍNĚ**

Určeno pro pregraduální a postgraduální studenty medicíny a přírodovědných oborů

Výkonný redaktor prof. RNDr. Hana Kolářová, CSc.  
Odpovědná redaktorka Mgr. Jana Kreiselová  
Technická redakce Michal Muzikant, Milan Matoušek  
Obrazová dokumentace Jan Hubert  
Dílo neprošlo jazykovou úpravou

Vydala a vytiskla Univerzita Palackého v Olomouci  
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc  
[www.vydavatelstvi.upol.cz](http://www.vydavatelstvi.upol.cz)  
[www.e-shop.upol.cz](http://www.e-shop.upol.cz)  
[vup@upol.cz](mailto:vup@upol.cz)

1. vydání  
Olomouc 2014  
Edice – Skripta

**ISBN 978-80-244-3951-8**

Neprodejná publikace  
VUP 2014/018



Předkládaná skripta poskytují přehledné informace o nejdůležitějších moderních instrumentálních metodách, jejich principech a současném využití nejenom v klinické praxi, ale i v biomedicíně či farmaceutickém výzkumu. Při jejich tvorbě autoři vycházeli z konceptu laboratorní medicíny. Obsah studijního textu byl z edukačních důvodů rozdělen na preanalytickou fázi laboratorního vyšetření, na skupinu metod detekčních a skupinu metod izolačních, separačních a amplifikačních se zaměřením na analýzu v kapalinách. Učební text seznamuje nejenom se základními principy a spektrem možností využití analytických metod, ale vede čtenáře i k pochopení jejich praktických limitací. Rozsahem a zaměřením jde o studijní materiál, který nevybočuje z kontextu vzdělávání lékařů. Interdisciplinární charakter díla však umožňuje jeho využití i v řadě jiných přírodovědně zaměřených oborů.