



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



# Aplikované analytické a instrumentální techniky v laboratorní medicíně

**LF MU bakalářský obor Zdravotní laborant**  
**PřF MU bakalářský obor Aplikovaná biochemie**

Kolektiv autorů

2017

**Redakce:**

doc. MUDr. Milan Dastych, CSc., MBA

**Autorský kolektiv:**

RNDr. Miroslava Beňovská, Ph.D.

RNDr. Petr Breinek

MUDr. Dana Bučková, Ph.D.

doc. MUDr. Milan Dastych, CSc., MBA

Mgr. Jana Gottwaldová

RNDr. Alena Mikušková

Předkládaný učební text je určen pro technicky zaměřené bakalářské studijní programy. Obsahuje popis principů základních analytických a instrumentálních technologií používaných v medicínských laboratořích. Značný prostor je věnován praktickým aplikacím uvedených principů. Jsou uvedena jednotlivá, často unikátní řešení různých výrobců. Obsah učebního textu poskytuje přehled o aktuální situaci v používání laboratorní techniky v rutinních medicínských laboratořích.

Učební text vznikl jako součást řešení projektu Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, jehož řešitelem je Masarykova univerzita.

Milan Dastych

## OBSAH

<b>1. Analytická a perianalytická automatizace a robotizace .....</b>	<b>8</b>
1.1. Automatické biochemické analyzátoři .....	8
1.1.1. Princip analyzátoři .....	9
1.1.2. Součásti automatického analyzátoři – hardware a software .....	10
1.1.3. Přínos zavedení automatických analyzátoři .....	14
1.1.4. Integrované a modulární systémy .....	15
1.1.5. Praktické aplikace .....	15
1.1.6. Znaky moderních analyzátoři .....	17
1.1.7. Moderní laboratorní provozy .....	18
1.1.8. Klinický význam .....	18
1.2. Perianalytická automatizace a robotizace .....	19
1.2.1. Funkce perianalytických systémů .....	19
1.2.2. Základní části robotizovaných perianalytických systémů .....	19
1.2.3. Jednotlivé kroky robotizovaného preanalytického procesu: .....	20
1.2.4. Typy perianalytické automatizace .....	20
1.2.5. Příklady automatických perianalytických systémů na trhu .....	21
1.2.6. Robotický chlazený sklad .....	22
1.2.7. Postup při automatizaci perianalytické a analytické fáze .....	23
1.2.8. Význam a výhody perianalytické automatizace .....	23
1.3. LIS a informační technologie v klinických laboratořích .....	23
1.3.1. Elektronická žádanka, požadavek zaslaný v elektronické podobě .....	24
1.3.2. LIS .....	24
1.3.3. Data manager, middleware .....	25
1.3.4. Datové standardy .....	25
1.4. Automatizace vyšetření moče .....	25
1.4.1. Chemická analýza moče .....	25
1.4.2. Automatizace morfologického vyšetření moče .....	26
1.4.3. Klinický význam močové analýzy .....	27
<b>2. POCT – testování v místě ošetření pacienta .....</b>	<b>29</b>
2.1. Charakteristiky POCT .....	29
2.2. Výhody POCT .....	29
2.3. Klasifikace POCT zařízení a přístrojů .....	30
2.3.1. Jednorázová POCT zařízení .....	30
2.3.2. Stolní POCT přístroje a POCT přístroje do dlaně k opakovanému měření .....	31
2.3.3. In vivo POCT .....	33
2.4. Dálková správa – centrální software .....	33
2.4.1. Výhody softwarově řízených POCT systémů: .....	34
2.5. Organizace a zajištění POCT .....	34
2.6. Klinický přínos POCT .....	35
<b>3. Elektroforéza .....</b>	<b>36</b>
3.1. Princip elektroforézy .....	36
3.1.1. Popis základního technického uspořádání elektroforetické aparatury .....	36
3.2. Rozdělení elektroforetických technik .....	38
3.2.1. Volná elektroforéza .....	38
3.3. Hlavní typy gelové elektroforézy .....	40
3.3.1. Gelová nedenaturační elektroforéza .....	40
3.3.2. Gelová denaturační elektroforéza .....	40
3.3.3. Kontinuální zónová elektroforéza .....	41
3.3.4. Diskontinuální zónová elektroforéza .....	41

3.4. Zpracování gelu po separaci - barvení gelů.....	42
3.5. Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace.....	43
3.6. Základní elektroforetické techniky.....	43
3.6.1. Izoelektrická fokuzace (IEF).....	43
3.6.2. Izotachoforéza.....	44
3.6.3. Dvojměrná elektroforéza (2-DE).....	45
3.6.4. Kapilární elektroforéza.....	47
3.7. Praktické využití elektroforetických technik v klinické zdravotnické laboratoři.....	49
3.7.1. Elektroforéza bílkovin krevního séra.....	49
3.7.2. Elektroforéza bílkovin moče.....	58
3.7.3. Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku.....	60
3.8. Výrobci elektroforetických zařízení.....	62
3.8.1. Automatizované systémy pro gelovou elektroforézu bílkovin.....	62
3.8.2. Automatizované systémy pro kapilární zónovou elektroforézu.....	63
<b>4. Chromatografie.....</b>	<b>65</b>
4.1. Princip chromatografie:.....	65
4.2. Klasifikace chromatografických metod.....	65
4.2.1. Chromatografie podle uspořádání systému.....	65
4.2.2. Chromatografie podle skupenství mobilní fáze.....	66
4.2.3. Chromatografie podle separačního mechanismu.....	66
4.2.4. Chromatografie podle složení mobilní fáze.....	68
4.2.5. Chromatografie podle účelu.....	69
4.2.6. Přehled chromatografických technik.....	69
4.3. Planární chromatografie.....	69
4.4. Kolonová chromatografie.....	70
4.4.1. Termodynamika a kinetika separace.....	71
4.4.2. Plynová chromatografie, GC.....	74
4.4.3. Kapalinová chromatografie.....	77
4.4.4. Kvantitativní analýza.....	81
4.5. Příklady praktických aplikací chromatografických technik v klinické biochemii.....	81
4.5.1. Planární techniky.....	82
4.5.2. Ionexová chromatografie.....	82
4.5.3. HPLC.....	83
4.5.4. Plynová chromatografie.....	85
<b>5. Hmotnostní spektrometrie.....</b>	<b>86</b>
5.1. Definice hmotnostní spektrometrie.....	86
5.2. Hmotnostní spektrum.....	86
5.3. Hmotnostní spektrometr.....	86
5.3.1. Iontový zdroj a základní ionizační techniky.....	87
5.3.2. Iontové separátory.....	92
5.3.3. Detektor.....	96
5.4. Parametry hmotnostního analyzátoru.....	97
5.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS, MS <sup>n</sup> .....	98
5.6. Kvantita v hmotnostní spektrometrii.....	99
5.7. Praktické aplikace MS, MS/MS v klinické biochemii.....	99
5.7.1. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS).....	99
5.7.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS, LC/MS/MS)..	100
5.7.3. Tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS (bez separační techniky).....	101
5.7.4. SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption Ionization.....	101
5.7.5. Indukčně vázaná plazma (ICP-MS).....	102

<b>6. Atomová absorpční .....</b>	<b>103</b>
6.1. Historie AAS .....	103
6.2. Atomová spektra .....	103
6.3. Měření absorpce; Lambertův-Beerův zákon .....	103
6.3.1. Citlivost .....	104
6.3.2. Mez detekce.....	104
6.3.3. Mez stanovitelnosti .....	104
6.4. Atomový absorpční spektrometr .....	104
6.5. Zdroje primárního záření.....	106
6.5.1. Výbojky s dutou katodou (Halow Catode Lamp... HCL) .....	106
6.5.2. Bezelektrodové výbojky (EDL) .....	107
6.5.3. Laditelný barvivový laser.....	107
6.5.4. Speciální zdroje .....	107
6.6. Atomizátor.....	107
6.6.1. Plamenová technika.....	107
6.6.2. Elektrotermické atomizátory ...ETA .....	110
6.6.3. Hydridová technika .....	114
6.7. Disperzní systém .....	114
6.7.1. Reflexní difrakční mřížka.....	114
6.7.2. Optický hranol.....	114
6.8. Detektory; fotonásobič .....	114
6.9. Korekce pozadí.....	115
6.9.1. Sekvenční korekce pozadí .....	115
6.9.2. Simultánní korekce pozadí .....	115
6.10. Interference.....	118
6.10.1. Spektrální interference .....	119
6.10.2. Nespektrální interference .....	119
6.11. Analytické aplikace .....	119
<b>7. Imunoanalytické metody .....</b>	<b>121</b>
7.1. Antigeny .....	121
7.2. Protilátky .....	121
7.3. Interakce antigen – protilátka .....	122
7.4. Rozdělení imunoanalytických metod z různých hledisek .....	122
7.5. Kompetitivní (soutěživé) metody .....	123
7.6. Nekompetitivní (nesoutěživé) metody (sendvičová technika) .....	123
7.7. Heterogenní imunoanalýza.....	124
7.8. Homogenní imunoanalýza.....	124
<b>8. Využití luminiscence v imunoanalýze.....</b>	<b>125</b>
8.1. Luminiscence .....	125
8.1.1. Druhy luminiscence.....	125
8.2. Fotoluminiscence .....	125
8.2.1. Fluorescence.....	126
8.2.2. Fosforescence .....	127
8.3. Chemiluminiscence .....	127
8.4. Luminofory, Fluorofory .....	128
8.5. Využití luminiscence.....	128
8.6. Využití luminiscence na automatických imunochemických analyzátoch.....	129
8.6.1. Imunochemické analyzátory .....	129
8.7. Chemiluminiscenční techniky na imunochemických analyzátoch – heterogenní imunoanalýza .....	130

8.7.1. Chemiluminiscence s využitím akridinium esteru .....	130
8.7.2. Enzymově zesílená chemiluminiscence .....	131
8.7.3. Elektrochemiluminiscence .....	132
8.8. Chemiluminiscenční techniky na imunochemických analyzátoch – homogenní imunoanalýza .....	133
8.8.1. Technologie LOCI.....	133
8.9. Fluorescenční techniky na imunochemických analyzátoch - heterogenní imunoanalýza .....	134
8.9.1. MEIA.....	134
8.9.2. Technologie “Pegasus” .....	135
8.10. Fluorescenční techniky na imunochemických analyzátoch - homogenní imunoanalýza .....	135
8.10.1. TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) - Kryptor (Brahms)...	135
8.10.2. FPIA .....	135
8.11. Diagnostický přínos.....	136
<b>9. ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay .....</b>	<b>138</b>
9.1. ELISA stanovení .....	138
9.1.1. Rozdělení ELISA technik podle typu reakce antigen –protilátka .....	140
9.1.2. Využití ELISA metod.....	142
9.1.3. Technická instrumentace .....	142
<b>10. DELFIA .....</b>	<b>145</b>
10.1. Princip metody: .....	145
10.1.1. Chelátové značení protilátek .....	145
10.1.2. Imunochemická reakce.....	146
10.1.3. Disociace lanthanidu z komplexu, vznik fluorescenčních chelátů.....	147
10.1.4. Časově modulované měření fluorescence (time-resolved fluorometry), TRF..	148
10.1.5. Současné stanovení více analytů: .....	149
10.2. Praktické provedení metody DELFIA: .....	149
10.3. Příklady využití metody DELFIA: .....	151
10.3.1. Proteiny, hormony .....	151
10.3.2. Novorozenecký screening .....	151
10.3.3. Další možné aplikace .....	152
<b>11. Potenciometrie, konduktometrie , polarografie, coulometrie .....</b>	<b>153</b>
11.1. Potenciometrie.....	153
11.1.1. Srovnávací (referenční) elektrody .....	153
11.1.2. Měrné (indikační) elektrody .....	154
11.2. Konduktometrie.....	156
11.3. Polarografie (voltametrie) .....	157
11.3.1. Klasická polarografie .....	157
11.3.2. Polarografie na tuhých elektrodách.....	159
11.3.3. Amperometrie.....	159
<b>12. Iontově selektivní elektrody (ISE), biosenzory .....</b>	<b>162</b>
12.1. Stanovení sodného kationu.....	164
12.2. Stanovení draselného kationu.....	165
12.3. Stanovení chloridového anionu .....	166
12.4. Stanovení vápenatého kationu (Ionizovaný vápník) .....	166
12.5. Stanovení hořečnatého kationu (Ionizovaný hořčík) .....	167
12.6. Stanovení laktátu .....	167
12.7. Stanovení glukózy .....	168
12.8. Stanovení kreatininu.....	172

12.9. Stanovení močoviny .....	173
<b>13. Analyzátoary acidobazické rovnováhy (ABR) a krevních plynů.....</b>	<b>176</b>
13.1. Stanovení pH .....	177
13.2. Stanovení pO <sub>2</sub> .....	179
13.2.1. Polarografie (ampérometrie) .....	179
13.2.2. Fluorimetrie .....	181
13.3. Stanovení pCO <sub>2</sub> .....	181
13.4. Stanovení saturace hemoglobinu kyslíkem .....	186
<b>14. Průtoková cytometrie (FLOW CYTOMETRY) .....</b>	<b>188</b>
14.1. Princip průtokové cytometrie .....	188
14.1.1. Fluidní systém .....	189
14.1.2. Optický systém .....	189
14.1.3. Vyhodnocovací systém .....	190
14.2. Zobrazování dat z flow cytometrické analýzy .....	191
14.3. Využití flow cytometrie: .....	192
14.3.1. Historie .....	192
14.3.2. Hematologické systémy pro počítání krevních buněk .....	192
14.3.3. Flow cytometrie v močové analýze.....	194
14.3.4. Buněčná imunologická vyšetření .....	196
14.3.5. Multiplexové metody .....	199
<b>15. Osmometrie.....</b>	<b>201</b>
15.1. Princip .....	201
15.1.1. Osmotický tlak .....	201
15.1.2. Osmolární koncentrace.....	202
15.2. Měření osmotického tlaku .....	202
15.2.1. Kryoskopie .....	202
15.2.2. Ebulioskopie.....	203
15.2.3. Koloidní osmometr.....	203
15.3. Stanovení osmolality v biologickém materiálu .....	204
15.3.1. Osmolalita séra .....	204
15.3.2. Osmolální okno (osmolal gap) .....	204
15.3.3. Osmolalita moče.....	205
15.4. Diagnostický význam stanovení osmolality.....	205
15.4.1. Osmolalita séra .....	205
15.5. Technická řešení výrobců - nejvíce používané kryoskopické osmometry.....	205
<b>16. Molekulárně biologické vyšetřovací techniky.....</b>	<b>207</b>
16.1. Metody průkazu specifické nukleové kyseliny .....	207
16.1.1. Hybridizační techniky .....	207
16.2. Metody pro stanovení pořadí nukleotidů .....	208
16.2.1. Sekvenování .....	208
16.3. Metody založené na amplifikaci nukleové kyseliny .....	211
16.3.1. PCR (polymerázová řetězová reakce) .....	211
16.3.2. LCR (ligázová řetězová reakce) .....	214
16.4. Metody detekce mutací a polymorfizmů.....	215
16.4.1. RFLP + ELFO .....	215
16.4.2. Analýza DNA pomocí Southernova blottingu .....	216
16.4.3. SSCP.....	217
16.4.4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) .....	217

## 1. Analytická a perianalytická automatizace a robotizace

Analytická a perianalytická automatizace laboratorních provozů ovlivňuje celý proces zabývající se zpracováním klinických vzorků (**laboratorní** a částečně i **mimolaboratorní**). V současnosti je využíván vysoký stupeň automatizace a robotizace. Mnohé operace, které se dříve prováděly ručně, jsou prováděny bez lidského zásahu.

**Mimolaboratorní** proces zahrnuje přípravu pacienta, odběr biologického materiálu, transport vzorku a požadavků do laboratoře a cestu výsledku z laboratoře k ordinujícímu lékaři. Patří sem také označení vzorků, případně elektronické zadání požadavků. Nejvyšší stupeň automatizace byl dosažen v oblasti transportu vzorků, kdy se s výhodou využívá potrubní pošta, ale v poslední době také elektrická vozítka na kolejích, či roboti.

**Laboratorní** proces tvoří část

- **preanalytická** - příprava vzorku k analýze: příjem a identifikace biologického vzorku, kontrola požadavků a správnosti odběru, jejich zadání či převedení do laboratorního informačního systému, označení vzorků čárovým kódem, centrifugace, odzátkování, rozpipetování materiálu na díly pro jednotlivé analyzátoři a označení těchto alikvotů štítky s čárovým kódem, roztřídění primárních a sekundárních vzorků, u on-line připojení přímý vstup do dopravníkového systému analytické části
- **analytická** - stanovení jednotlivých parametrů obvykle na automatických analyzátořích a analytická kontrola správnosti výsledku
- **postanalytická** – archivace primárních případně alikvotních vzorků, elektronický přenos výsledků do laboratorního informačního systému, validace a interpretace výsledků a jejich odeslání ošetřujícímu lékaři

### 1.1. Automatické biochemické analyzátoři

Analýzy na automatických analyzátořích tvoří klíčovou část analytického laboratorního procesu. Do klinické laboratorní praxe tyto analyzátoři vstoupily v 60. - 70. letech minulého století jako pokračování procesu mechanizace laboratorních činností. První analyzátoři - Technicon - byl vyroben v roce 1957.

Automatické analyzátoři jsou schopny bez zásahu obsluhy provádět jednotlivé kroky analýzy podle předem naprogramovaného algoritmu. Jedná se o transport analytického vzorku, pipetování, dávkování reagentů, promíchání, inkubaci, měření změny signálu, výpočet koncentrace za použití kalibračních standardů, zobrazení a tisk výsledku analýzy a jeho přenesení v elektronické podobě do laboratorního informačního systému.

První automatické analyzátoři se využívaly v klinické biochemii, kde se stále uplatňují nejvíce ze všech laboratorních oborů. V této kapitole se budeme zabývat **automatickými biochemickými analyzátoři**, které jsou v literatuře často popisovány jako **analyzátoři na klinickou chemii**. Jsou na nich zpracovávány vzorky séra, plazmy, moče a mozkomíšního moku.

Automatické biochemické analyzátoři pracují na principu **spektrofotometrie a turbidimetrie** (většinou imunoturbidimetrie). Jejich standardní součástí je **modul s iontově selektivními elektrodami** (ISE) ke stanovení  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$ . Fotometrických i iontově selektivních stanovení se v laboratořích běžně provádí několik tisíc denně. Příkladem



spektrofotometrického testu je stanovení glukózy, cholesterolu a enzymů (průměrná cena vyšetření 2-5 Kč/ test); příkladem imunoturbidimetrických testů je stanovení transferinu, imunoglobulinů a specifických bílkovin (cena 15-25 Kč/test).

Někteří výrobci jako součást automatických biochemických analyzátorů zařazují modul s biosenzory, které umožňují analýzu z plné krve. To vede k výraznému zkrácení běžné doby stanovení z 10 minut na 1 minutu. Další redukce času při použití této techniky je dosažena tím, že vzorek není před měřením třeba centrifugovat.

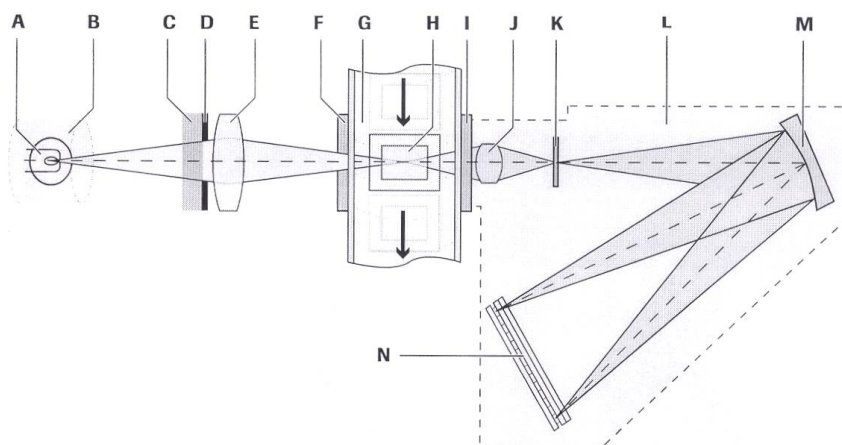
O imunochemických analyzátoch, které využívají chemiluminiscenční a fluorescenční techniky, je pojednáno ve speciálních kapitolách.

Současné automatické biochemické analyzátory patří do generace **selektivních „random access“ analyzátorů**, které umožňují u jednoho vzorku volný výběr z desítek metod. Výkon jednotlivých typů analyzátorů se pohybuje od 100 do několika tisíc analýz za hodinu. Pro rychlost je důležitý tzv. **takt analyzátoru**, tj. čas v sekundách, po kterém se pravidelně pozastavuje reakční kyvetor a umožňuje tak pipetovat další vzorek. Při taktu 4 s je to 15 testů za minutu a 900 testů za hodinu. Pravidelnou funkcí analyzátorů je možnost přednostního provedení analýz v tzv. **statimovém (akutním) vzorku**. Časová odezva na tyto vzorky, kdy na výsledku závisí léčba pacienta, se počítá v minutách. Popsané úkony jsou jednotlivými výrobci řešeny standardně nebo unikátně za použití patentovaných postupů. S vědomím určitého zjednodušení se v dalším textu omezíme na popis příkladu běžného řešení.

### 1.1.1. Princip analyzátoru

Jako **zdroj světelného záření** se většinou používá halogenová wolframová žárovka nebo xenonová výbojka, světelný paprsek spojitého spektra je po průchodu absorpčním prostředím (**kyvetou**) rozložen **monochromátorem** (difrakční reflexní optickou mřížkou) na paprsky s definovanou vlnovou délkou (monochromatické záření), které dopadají na **detektor diodového pole** (diode array). Změny absorbance reakční směsi v kyvetě jsou monitorovány (zaznamenávány) při každém průchodu kyvetou paprskem optického systému – viz obr.1

K transportu světelných signálů z místa, kde je měřena reakční směs, do detekční jednotky se využívají optická vlákna.



Obr.1 Optická dráha fotometru modulu c501 systému Cobas 6000, Roche

Vysvětlivky:

A Lampa fotometru

F Štěrbina (vstupní)

K Štěrbina

**B** Vodní plášť  
**C** Filtr k eliminaci infračervené složky  
**D** Maska  
**E** Čočky kondenzoru

**G** Reakční lázeň  
**H** Reakční kyveta s obsahem  
**I** Štěrbina (výstupní)  
**J** Zobrazovací čočka

**L** Fotometr  
**M** Mřížka  
**N** Detektor

Při vstupu světelného paprsku do fotometru se paprsek odráží od reflexní difrakční mřížky, která jej rozkládá na jednotlivé vlnové délky, které pak dopadají na příslušná místa pevného pole 12 fotodiód. Každá fotodióda je trvale nastavena na detekci světla určité vlnové délky. K odečtu absorbance dochází v okamžiku, kdy otáčející se reakční kyveta prochází před fotometrem. Při průchodu reakční kyvety světelným paprskem spektrofotometru je změřeno pro každé stanovení najednou všech 12 vlnových délek.

Většina fotometrických testů využívá při výpočtu výsledků hodnot dvou vlnových délek tzv. bichromatickou analýzu. Jedna vlnová délka v blízkosti vrcholu absorbance chromogenu, vytvářeného při reakci, a druhou vlnová délka v oblasti, ve které daný chromogen vykazuje malou nebo žádnou absorbanci. Použitím rozdílu mezi odečty dvou vlnových délek (bichromatický systém) může být eliminován vliv interferencí a šumu fotometru, čímž se zlepšuje citlivost fotometru.

### 1.1.2. Součásti automatického analyzátoru – hardware a software

**Transportní systém** dopravuje analytické vzorky ze vstupu analyzátoru do pracovního prostoru pipetoru a po napipetování na výstup z analyzátoru. Nejčastěji je zajištěn posunem stojánků se vzorky lineárním nebo otáčivým pohybem. Na vstupu analyzátoru je umístěna laserová čtečka čárových kódů. Čárový kód jednoznačně identifikuje vzorek pro spojení s údaji pacienta v laboratorním informačním systému a současně informuje analyzátor o typu analyzovaného materiálu (sérum, plazma, moč, likvor aj.).

**Vzorkový pipetor** zajišťuje pipetování vzorku do reakční kyvety. Pipetovací jehla je vyrobena z inertního materiálu a je opatřena hladinovým senzorem (vodivostní, kapacitní, radiofrekvenční systém), který při kontaktu jehly s povrchem vzorku zastaví vertikální pohyb pipetoru a nasátí vzorku se tak uskuteční těsně pod hladinou. Pipetovací objemy se pohybují v rozsahu 1–20  $\mu\text{l}$ . Aby se zabránilo kontaminaci přenosem (carry over), je pipetovací jehla při přechodu na další vzorek zevně i vnitřně omyta v mycí stanici. Tam, kde se měří velmi nízké koncentrace, měřený analyt se vyskytuje v širokém koncentračním rozmezí a existuje potenciální nebezpečí kontaminace s falešně pozitivním výsledkem, pracují analyzátor s pipetovacími špičkami na jedno použití. Některé analyzátor jsou vybaveny zdvojenými (duálními) pipetory ke zvýšení celkového výkonu.

Přesné odměřování objemu vzorku pipetorem a jeho dávkování zajišťují pístové dávkovače, které jsou s koncovými pipetory spojeny hadičkami. Nasávání vzorku je tak řízeno pohybem teflonových pístů.

V současné generaci analyzátorů již ke standardní funkci pipetoru patří **detekce sraženiny** a pěny na principu sledování hodnoty podtlaku nutného k nasátí vzorku.

**Dávkovače reagensů** pracují na stejném principu včetně odměřování objemu, hladinových senzorů a mycí stanice k zabránění vzájemné kontaminace reagensů. Dávkované objemy jsou programovatelné v rozsahu odpovídajícím objemu reakční kyvety, např. 20–300  $\mu\text{l}$ .

**Reakční kyvety** se liší podle použitého materiálu, tvaru, objemu a způsobu použití buď jako jednorázové, které se po použití odstraní do odpadu, nebo opakovaně používané po automatickém vymytí a vysušení. Základním požadavkem je propustnost materiálu kyvet pro

UV záření, což splňují plastové materiály a křemenné sklo. Postupná miniaturizace vedla ke kyvetám o objemu 100  $\mu$ l a menším.

V analyzátorech pro klinickou chemii je v reakčním kruhu umístěno několik stovek kyvet. Kyvety se otáčejí a absorbance se měří vždy v kyvetě, kterou prochází světelné záření ze zdroje.

**Součásti optické dráhy fotometru:** Zdroj světelného záření, monochromátor, absorpční prostředí a detektor.

**Inkubační lázeň** je prostředí, ve kterém jsou umístěny reakční kyvety. Inkubační teplota, důležitá především pro stanovení katalytické koncentrace enzymů, je udržována na 37 °C s přesností  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Homogenní teplotní prostředí zajišťuje v inkubační lázni cirkulující voda, olej nebo vzduch.

**Míchání** zajišťuje promíchání reakční směsi v kyvetě s využitím ultrazvuku, vibrací, probubláním vzduchem nebo u rotačním pohybem lopatky míchadla ponořeného krátce do reakční kyvety (piezoelektrické míchání).

**Mycí stanice** odsává po skončení měření reakční směs z jednotlivých kyvet. Potom kyvety opakovaně propláchne vodou, alkalickým detergentem či po určitých metodách zředěnou kyselinou a vysušením je připraví k dalšímu použití.

**Reagencie.** Automatické biochemické analyzátory standardně umožňují použití dvou reagiemi na jednu metodu, možné jsou i 3-4 reagenty. V současné době je někteří výrobci dodávají ve formě kazet, které obsahují všechny potřebné reagenty v tekuté podobě připravené přímo k měření (ready to use). V analyzátoru jsou uloženy v chlazených prostorách pro zvýšení jejich stability a snížení odparu. Kazety s reagenty jsou označeny čárovým kódem, který analyzátor registruje a nezáleží tak na poloze jejich uložení v reagentním prostoru. Před dávkováním reagenty do kyvety se příslušná nádobka otáčením kruhu s reagenty automaticky nastaví do pipetovací polohy příslušného dávkovače.

**Definice parametrů metod.** Každá stanovovaná metoda má definované parametry - způsob měření (end point, kineticky), vlnové délky, objem pipetovaného vzorku a dávkovaných reagenty, optimální body reakčního průběhu používané pro výpočet koncentrace, měření vzestupu nebo poklesu absorbance, mezní hodnoty pro opakování analýzy s větším nebo menším objemem vzorku při příliš vysoké nebo naopak příliš nízké koncentraci.

**Zobrazení a přenos výsledků.** Výsledky analýz jsou průběžně znázorňovány na obrazovce analyzátoru, softwarově ukládány, přenášeny do laboratorního informačního systému, dále v elektronické formě do nemocničního informačního systému do dokumentace pacienta.

**Průběh reakce.** Změny absorbance reakční směsi v kyvetě jsou průběžně monitorovány a graficky zaznamenány. Grafický záznam se provádí po celou dobu reakce (inkubace trvá většinou deset minut a během ní je změřena absorbance až 70x) a je důležitý zvláště u stanovení katalytické koncentrace enzymů, kdy umožňuje odhalit vyčerpání substrátu při vysoké aktivitě enzymu a nelinearitě reakce – viz. obr.3.

**Chybová hlášení, autodiagnostika.** Všechny činnosti a funkce analyzátoru jsou naprogramované v softwaru řídicího počítače. Pohyb pohyblivých součástí analyzátoru zajišťují většinou přesné krokové motory. Správná funkce pohyblivých součástí je trvale

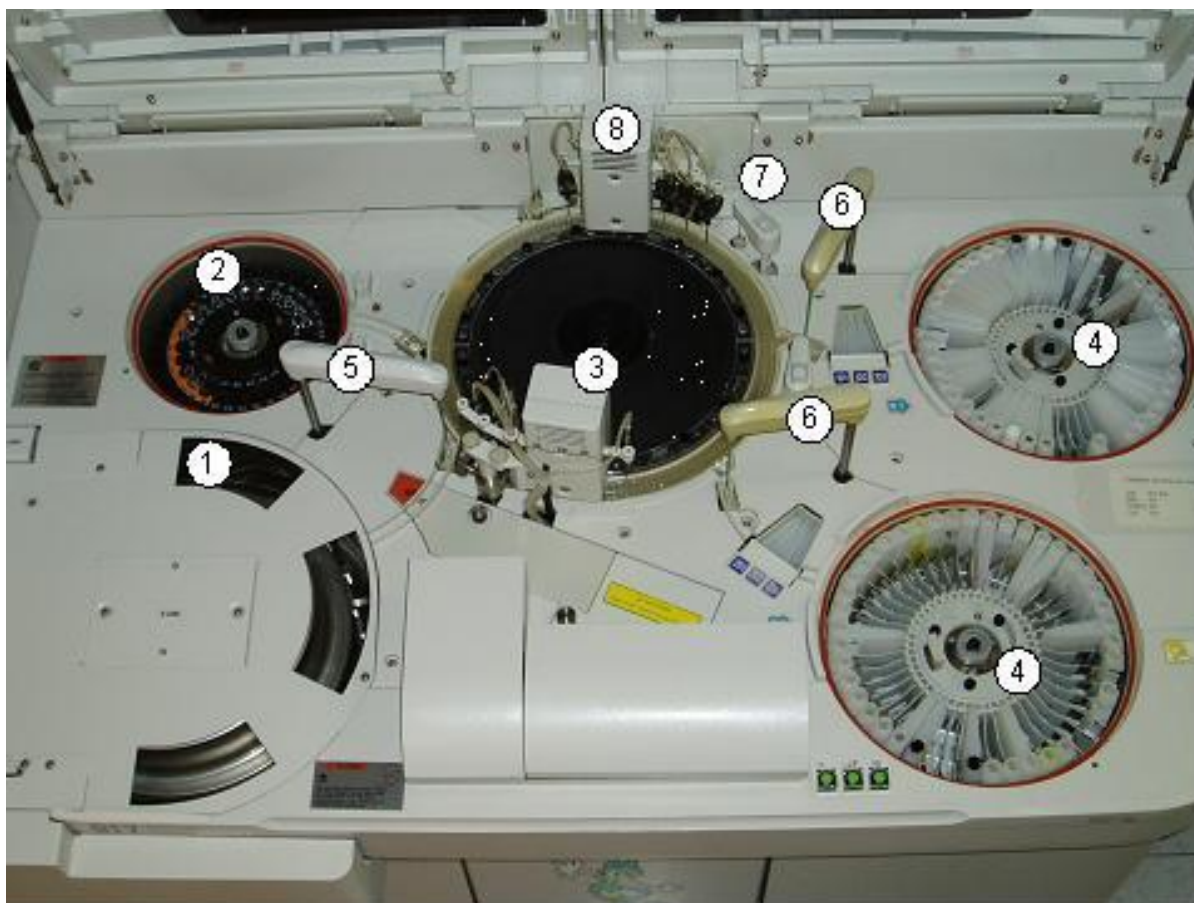
monitorována pomocí speciálních čidel, které kontrolují koncovou polohu i čas potřebný k jejímu dosažení. Při nedodržení nastavených poloh a časových limitů se analyzátor zastaví s příslušným chybovým hlášením. Voda je v analyzátoru poháněna pomocí čerpadel a odsávána vakuem, které je řízeno magnetickými ventily.

Současné elektronicky řízené automatické biochemické analyzátory mají často značně sofistikovaný software. Běžné je statistické vyhodnocování kontrolních analýz v číselné i přehledné grafické podobě a nástroje vnitřní kontroly kvality umožňující výběr a kombinací **Westgardových pravidel**. Jinou softwarovou aplikací je např. tzv. **reflex mode**, který umožňuje automatické provedení doplňkových analýz až na základě získaných výsledků.

**Software k vyhodnocení interní kontroly kvality:** Správnost prováděných analýz je kontrolována v pravidelných intervalech pomocí kontrolních vzorků s deklarovanou hodnotou stanovovaných analytů. Používají se kontroly na dvou hladinách; jedna hladina je v oblasti referenčních hodnot, druhá v patologické oblasti. Za vyhovující jsou považovány výsledky kontrolních analýz v rozmezí  $\pm 2$  SD. Výsledky kontrol se kromě číselné hodnoty zobrazují také ve formě Levey-Jenningsova grafu – viz. obr. 4. Většina analyzátorů má ve svých řídicích programech zabudovaná také Westgardova pravidla ke snadnějšímu posouzení, zda na základě interní kontroly kvality mohou být výsledky uvolněny nebo musí být série odmítnuta.

**Funkce měření sérových indexů:** Sérové indexy určují stupeň potenciální interference způsobené bilirubinem, hemoglobinem nebo lipémií. Test je založen na měření naředěných vzorků při různých vlnových délkách a v současné době, zejména pro kompletně automatizované laboratoře je nezbytností.

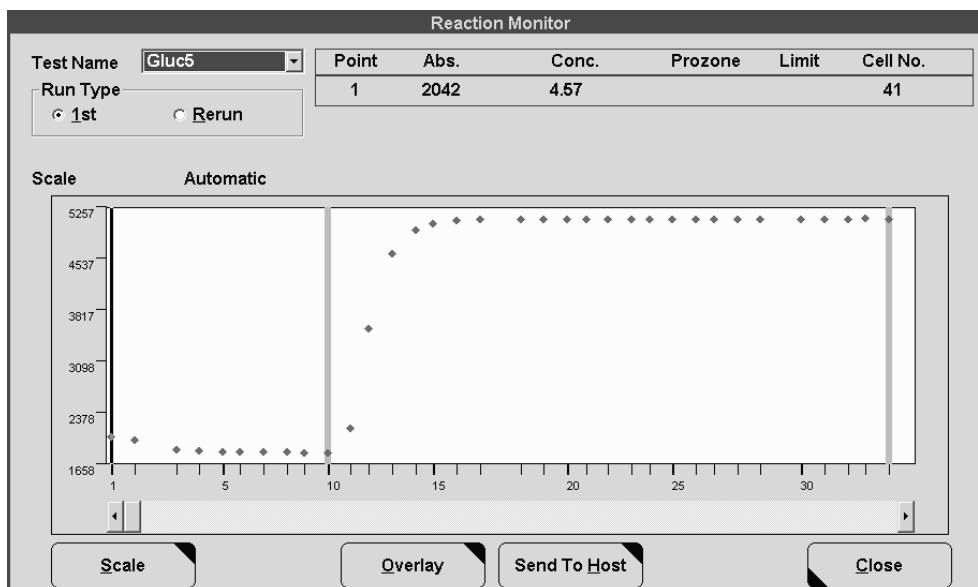
Ukázka základních částí analyzátoru je na obr.2.



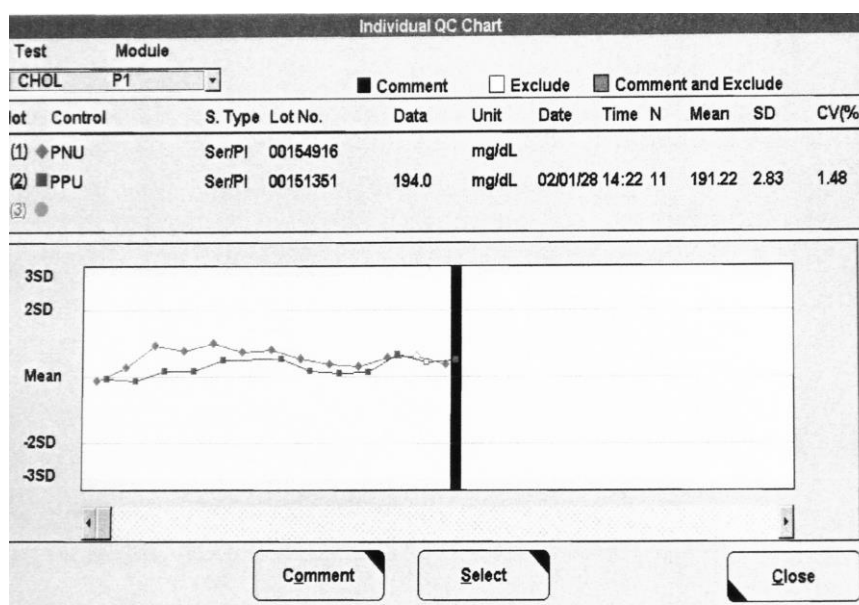
Obr.2 Horní plocha analyzátoru Hitachi 917, firma Roche

Vysvětlivky:

1. transportní systém dopravující vzorky ve stojáncích k sérovému pipetoru
2. rotor v chlazeném prostoru pro kalibrátory, kontroly a statimové vzorky
3. rotor s reakčními kyvetami uložený ve vodní lázni temperované na 37 °C
4. reagentie (R1, R2) v nádobkách značených čárovým kódem; chlazený prostor je za provozu uzavřen víkem (v současnosti je běžnější umístění reagentie 1 a 2 v jedné kazetě)
5. sérový pipetor
6. reagenční pipetor – dávkovač
7. rotační míchadlo
8. mycí stanice reakčních kyvet



Obr.3 Grafické znázornění průběhu reakce včetně bodů použitých pro výpočet koncentrace (vertikální vyznačení)



Obr.4 Levey-Jennings graf

Slouží k přehlednému sledování výsledků kontrolních analýz. Zobrazuje graficky hodnoty kontrol na dvou hladinách s deklarovanou (správnou) hodnotou ve středu.

### 1.1.3. Přínos zavedení automatických analyzátorů

- zvládnoutí enormního nárůstu požadavků kliniků
- zkrácení časové odezvy (TAT) - statim desítky minut, vysoce speciální metody hodiny
- zajištění vyhovující přesnosti a správnosti analýz
- snížení spotřeby reagentů - zavedení mikrometod snižuje náklady a je šetrnější k životnímu prostředí

- snížení potřeby biologického materiálu
- zvýšení hygienického standardu
- elektronické zpracování získaných dat

#### 1.1.4. Integrované a modulární systémy

Charakteristickým znakem vývoje automatizovaných analytických přístrojů v posledních letech byla konstrukce integrovaných systémů spojujících analyzátory pracující na různém principu. Jedná se o pracovní stanice či modulární systémy **spojující klinickou chemii a imunochemii**. Z jedné zkumavky tak může být provedeno v jednom přístroji velké množství různých typů testů a výsledky jsou soustředěny v jednom řídicím počítači. V případě modulárních systémů mohou být při nárůstu požadavků jednotlivé moduly přidávány bez nároků na výměnu celého systému.

Jeden systém tak využívá i **několik různých analytických principů – fotometrii, turbidimetrii, luminescenci, ISE** (v ojedinelém případě i nefelometrii).

Prvním přístrojem tohoto typu byl Dimension RxL vyrobený firmou Dade Behring v roce 1997. Širší uplatnění pro spojení modulů na klinickou chemii a modulů na imunochemii však našly tyto systémy až od roku 2004 – Modular Analytics, Roche.

Pod pojmem integrované systémy rozumíme i spojení analytické a preanalytické techniky. Tato problematika je diskutována v další části této kapitoly.

#### 1.1.5. Praktické aplikace

Významní výrobci automatických analyzátorů nabízejí přístroje s nízkým, středním a vysokým výkonem, což umožňuje zákazníkovi výběr dle kapacity laboratoře.

##### a) Příklady biochemických analyzátorů pro střední a velké laboratoře

Analyzátory řady Beckman Coulter **UniCel DxC**, Danaher - kromě fotometrie a ISE jsou vybaveny biosenzory k analýze glukózy, kreatininu, vápníku, celkové bílkoviny a CO<sub>2</sub>

**ADVIA 2400**, Siemens - 2400 testů/hod., předředění vzorků 1:5

**Olympus AU5400**, Danaher - nový vysokokapacitní biochemický systém:

- výkon až 4 800 fotometrických testů/hod., jednotka ISE až 1 800 testů/hod.
- pracuje jako konsolidovaná pracovní stanice s kapacitou stanovení až 99 různých analytů
- široké spektrum testů včetně léků, drog a hormonů
- křemenné kyvety



*Vanaher*

Charakteristiky: data manager Remisol 2000  
nevyžaduje denní údržbu, nemění se lampy  
detekce a odstranění sraženiny  
65 metod na palubě s výkonem 990 testů za hodinu

### **b) Příklady biochemických analyzátorů pro malé laboratoře**

**Alcyon**, Abbott - stolní analyzátor, 300 fotometrických a 450 ISE testů/ hod.

**BS-300**, MINDRAY - dodává firma Medusa; 300 fotometrických testů/hod., 180 ISE testů/hod.; 50 pozic na reagentie; na ISE modulu lze **stanovit i Li+**

### **c) Příklady integrovaných a modulárních analytických systémů**

**Cobas 8000**, Roche

- kombinace chemických a imunochemických testů
- flexibilní pohyb vzorků mezi moduly
- software detailně plní akreditační požadavky
- kazetové reagentie
- až 70 kazet na palubě fotometrického modulu

**Systém Architect**, Abbott

Umožňuje integraci modulu pro klinickou chemii **Architect c 16000** s imunoanalytickým modulem **Architect i2000 SR**.

**Architect c 16000** - systém s výkonem až 1800 klinických testů/hod.

- otevřený pro reagentie jiných firem
- unikátní technologie mytí vzorkové jehly – deklarován přenos vzorku do 0,1 ppm
- rozšířená linearita FlexRate pro fotometrii - vlnové délky (od 340 do 804 nm)
- kyvety z křemenného skla
- integrovaný ISE Chip modul pro Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>
- smart Wash - technologie pro 8krokové mytí kyvet a dávkovacích jehel
- 65 reagentií na palubě

**Dimension Vista 1500** - Inteligentní Lab Systém, Siemens



Integrovaný systém, který kombinuje princip spektrofotometrie, turbidimetrie, nefelometrie, integrované multisenzorové technologie a LOCI (moderní homogenní chemiluminiscence). Poskytuje možnost provádět prakticky všechny testy v jednom systému. Výkon je 1500 testů/hod., při spojení dvou systémů 3000 testů/hod.



Obr.6 Cobas 8000, Roche



Obr.7 Cobas 8000, Roche

Detail modulu c 701 na klinickou chemii:  
zdvojené vzorkové a reagenční pipety  
zajišťují vysoký výkon 2000 testů/hod

### c) Příklad analyzátorů pracujících se suchou chemií

Analyzátorů řady **Vitros**, Ortho

Pracují bez kapalných reagentů. Reakční zónu tvoří tzv. „slide“, na kterém je zabudována suchá reagenční multivrstva na podložce z polystyrenu.

#### 1.1.6. Znamky moderních analyzátorů

- detekce sraženiny
- výměna reagentů bez zastavení přístroje
- integrovaná chemie a imunochemie
- efektivní distribuce vzorků – rychle získané výsledky, krátký TAT

- malý objem květy, malý mrtvý objem - u pacientů v kritickém stavu nebo u novorozenců je biologickým materiálem třeba šetřit
- kazetové reagentie bez přípravy
- minimální doba údržby
- široká nabídka vyšetření
- instalace metod s využitím webu
- možnost nainstalovat metodu jiného výrobce
- měření sérových indexů

### **1.1.7. Moderní laboratorní provozy**

Automatizace a později integrace analyzátorů umožnila vznik centralizovaných laboratoří a vytvořila vhodné podmínky pro konsolidaci pracovišť.

Zajistila zvýšenou efektivitu práce, redukovala variabilitu výsledků, zvýšila reprodukovatelnost a omezila počet chyb.

#### **Konsolidace**

Konsolidace laboratoří ve zdravotnictví představuje proces spojování laboratoří pracujících v různých oborech do jednoho celku. Takto lze často spojit oddělení biochemie, hematologie a mikrobiologie-serologie.

#### **Centralizace**

Centralizace zajišťuje spojování pracovišť stejného oboru a dochází při ní k vytvoření většího laboratorního celku s možností efektivně provádět široké spektrum laboratorních vyšetření. Systém využívá svozu biologických vzorků z větší oblasti.

### **1.1.8. Klinický význam**

Klinický význam parametrů stanovených na biochemických analyzátořech je obrovský. Přesto, že náklady klinických laboratoří ve zdravotnictví představují pouze 7 %, hrají laboratoře zásadní roli (až v 70%) při rozhodování kliniků. Biochemické analyzátoř přitom mají klíčovou úlohu.

Uvádíme několik příkladů patologických výsledků ve vazbě na diagnózu:

- zvýšený bilirubin a enzymy ALT, AST při jaterních chorobách
- snížená bílkovina u popálenin, zvýšená bílkovina u mnohočetného myelomu
- zvýšené enzymy amyláza a lipáza u pankreatitidy
- zvýšená urea a kreatinin při zhoršené funkci ledvin
- zvýšený C-reaktivní protein při bakteriálních zánětech
- snížené železo, feritin a zvýšený transferin u anémie z nedostatku železa

## 1.2. Perianalytická automatizace a robotizace

Preanalytické zpracování biologických vzorků v laboratoři je nezbytnou a důležitou částí laboratorní práce. Představuje celou řadu manuálních, často stereotypních činností, k jejichž provedení není třeba speciálních znalostí a dovedností, ale jsou náročné na pozornost, vyžadují zachování standardního postupu a je při nich důležité zabránit možnosti vzniku chyb. Nejzávažnější a také nejobávanější chybou je záměna vzorků nebo chyba v identifikaci, které mohou v konečném důsledku ohrozit pacienta. Jednotlivé pracovní kroky se ve velkých klinických laboratořích opakují ve stonásobcích.

Uvedená charakteristika preanalytické laboratorní fáze ukazuje, že celý preanalytický laboratorní proces je předurčen k automatizaci a robotizaci. Zařízení, která preanalytickou automatizaci zajišťují, jsou současně využívána k automatizaci a robotizaci fáze postanalytické. Nahrazují tak manipulaci s biologickými vzorky předcházející analýze a jejich uložení po analýze.

Pojmy **preanalytický** a **postanalytický** souhrnně zahrnuje termín **perianalytický**.

Cílem perianalytické automatizace je odstranění stereotypní nekvalifikované práce, zabránění možnosti vzniku chyb, zrychlení provozu a zvýšení kapacity při zachování precizního provedení všech potřebných operací.

První perianalytické systémy byly realizovány již v 80. letech v Japonsku. V klinických laboratořích se však rozšířily až v posledních letech. **Celková laboratorní automatizace** se tak stala reálnou a relativně dostupnou.

### 1.2.1. Funkce perianalytických systémů

**a) preanalytická část** - načtení jednoznačně identifikovaného materiálu, předtřídění vzorků, centrifugace, odzátkování zkumavek, rozpipetování vzorku na potřebné díly (alíkvotace), označení alíkvótů vygenerovaným čárovým kódem, zátkování vybraných alíkvótů či primárních vzorků a roztřídění materiálu pro jednotlivé přístroje, které nejsou s perianalytickým systémem spojené on-line

**b) postanalytická část** – archivace a skladování vzorků včetně jejich likvidace v naprogramovanou dobu, vytřídění a návrat vzorků k provedení doordínovaných vyšetření

Po příchodu do laboratoře tak může být vzorek vložen do automatického systému a bez dalšího dotyku lidské ruky analyzován a uložen. Popsána je dokonce možnost vzorek při odběru na klinice označit čárovým kódem a poté vložit na dopravníkový pás, který vede do laboratoře a je přímo spojen s preanalytickou částí automatického systému.

Podmínkou pro takové zpracování vzorků je využití odběrových zkumavek se separačním gelem, který po centrifugaci oddělí krevní elementy od séra či plazmy a zabrání průniku látek, které se nacházejí v krevních elementech ve vyšší koncentraci (např.  $K^+$ ). Odstraňuje tak nutnost sérum nebo plazmu po centrifugaci přenést do jiné zkumavky.

### 1.2.2. Základní části robotizovaných perianalytických systémů

- Vstup – místo pro vkládání primárních zkumavek s biologickým materiálem.

- Dopravníkový systém, který zajišťuje transport zkumavek mezi jednotlivými funkčními jednotkami.
- Laserová čtečka k identifikaci vzorku načtením čárového kódu.
- Robotizovaná centrifuga.
- Zařízení, které provede odzátkování odběrové nádoby.
- Zásobník zkumavek pro aliquoty.
- Tisk a nalepení štítků s čárovým kódem.
- Alikvotační modul a pipetorem, který je vybaven detekcí sraženiny, měřením výšky hladiny a někdy i měřením kvality séra (hemolýza, lipémie, ikterus).
- Robotizované rameno zajišťující rozřídění primárních zkumavek a aliquotů do stojánek pro cílové analyzátory.
- Chlazený sklad pro uložení vzorků.

### 1.2.3. Jednotlivé kroky robotizovaného preanalytického procesu:

Primární zkumavky s plnou krví jsou na vstupu vloženy do transportního systému.

Laserová čtečka identifikuje jejich čárový kód.

Zkumavky jsou vloženy do centrifugy.

Po skončení centrifugace jsou zkumavky vráceny zpět do transportního systému.

Následuje optické ověření kvality séra nebo plazmy a posunutí zkumavky do místa, kde dojde k odzátkování.

Je-li třeba požadovaná vyšetření provádět na více přístrojích, provede pipetor rozpipetování vzorku z primární zkumavky do alikvotačních zkumavek a označí je totožným čárovým kódem, jaký má původní zkumavka.

Systém aliquoty rozřídí do stojánek pro cílové analyzátory.

Primární zkumavky jsou uloženy pro archivaci.

### 1.2.4. Typy perianalytické automatizace

Perianalytickou automatizaci lze rozdělit na celkovou a diskrétní:

**Automatizace celková** představuje integrované nebo modulární automatické perianalytické systémy, které jsou přímo napojeny na analyzátory. Výrobci nabízejí připojení k analyzátorům pro klinickou chemii i imunochemii a někdy také interfece pro hematologické, koagulační a močové analyzátory. Jedná se o tzv. „on-line“ systémy.

Dělí se na dva typy:

a) **kruhové uspořádání** – na vodící dráhu jsou připojena perianalytická zařízení i jednotlivé analyzátory – viz obr.8.

b) **moduly uspořádané stavebnicově za sebou** – na zařízení sloužící k preanalytickým a postanalytickým funkcím přímo navazují jedna nebo více větví analytických konsolidovaných jednotek – viz obr.9.

**Automatizace diskrétní** tvoří alternativu pro laboratoře střední velikosti. Jedná se o samostatně stojící pracovní stanice. V jednom přístroji jsou spojené funkce jako kontrola integrity vzorku, rozřídění, centrifugace, alikvotace a oštitkování alikvotů. Připravené alikvoty a vzorky pak personál roznáší k analýze do jednotlivých samostatně stojících přístrojů. Výhodou je, že laboratoř může neomezeně využívat přístroje od různých výrobců – viz obr.10.

### 1.2.5. Příklady automatických perianalytických systémů na trhu

Většina světových firem, které vyrábí a nabízí automatizované analytické systémy, vyvinula i automatizované a robotizované preanalytické linky. Hlavní dodavatelé preanalytických technologií jsou firmy Siemens, Roche, Danaher, Ortho, Thermo Electron Corporation a Abbott.

Příkladem systémů s kruhovým uspořádáním je:

**ADVIA LabCell**, Siemens  
**Beckman Coulter Power Processor**, Danaher  
**ACCELERATOR**, Abbott



Obr.8 Systém ADVIA LabCell, spojený s dvěma automatickými analyzátory Advia 1600 a imunochemickým analyzátorem Advia Centaur, firma Siemens

Příkladem modulárního systému je:

**Modular Preanalytics**, Roche  
**TCAutomation**, Thermo Electron Corporation (Ortho)



### Obr.9 Modular Preanalytics, firma Roche

Představuje modulární linku, která se přímo spojuje s analytickým systémem Cobas 6000 nebo Cobas 8000. Nabízí různé varianty v počtu modulů i v prostorovém uspořádání.

Vysvětlivky: ACU-1,2	robotizované centrifugy
DSP	decaper (odzátkování)
AQN	aliquoter (rozpipetování)
BCL	bar code laber (označení alikvotů čárovým kódem)
RSP	recaper (zazátkování alikvotů k uložení)
FSS	flexible sample sorter (roztřídění alikvotů)

Příkladem diskrétní automatizace jsou systémy:

**OLA 2000**, Danaher

**Genesis FE 500**, Abbott

**RSA Pro**, Roche



Obr.10 Samostatně stojící systém OLA 2000, firma Danaher

### 1.2.6. Robotický chlazený sklad

Součástí perianalytické automatizace je robotický sklad. Jedná se o zařízení, které se dostalo na trh jako poslední. Slouží ke skladování analyzovaných vzorků, které se v laboratoři uchovávají několik dnů a po uplynutí skladovací doby je likviduje (př. modul p501 systému Modular Preanalytics, Roche – viz obr.11). Automaticky posílá vzorky zpět do analyzátorů k analýze doordinovaných testů (např. sklad systému Power Processor, Danaher).



Obr.11 *Skladový modul p501 ze systému Modular Preanalytics, Roche*  
Funkce: ukládá 400 zkumavek/hod.  
automaticky zátkuje a odzátkovává  
likviduje vzorky po uplynutí expirace  
kapacita 13500 zkumavek

### **1.2.7. Postup při automatizaci perianalytické a analytické fáze**

Po rozhodnutí, že laboratoř bude automatizována, probíhá přípravná fáze celého procesu. Je nutno podrobně specifikovat požadavky, provést podrobnou časovou a množství analýzu laboratorních procesů (workflow analýza), detailně se seznámit s perianalytickými systémy na trhu a instalaci technicky i finančně připravit.

Cílem je zajištění vyváženého systému, kde průchodnost jednotlivých perianalytických i analytických částí odpovídá denním maximům včetně rezervy pro budoucí rozvoj laboratoře. Pokud to situace vyžaduje, po instalaci se provede změna toku vzorků a následná optimalizace provozu. Nikdy by se neměl automatizovat špatný proces.

### **1.2.8. Význam a výhody perianalytické automatizace**

Perianalytické systémy zvyšují produktivitu práce, zlepšují plynulost zpracování a rychlost vydávání výsledků, snižují počet chyb, omezují práci s infekčním materiálem a nahrazují nezáživnou stereotypní práci. V současnosti jich ve světě v klinických laboratořích pracuje několik tisíc a instalace každým rokem rychle přibývají.

## **1.3. LIS a informační technologie v klinických laboratořích**

Automatizace laboratorních procesů je pevně spojena s informačními technologiemi. Způsob jakým se pohybují zdravotnická data – požadavky kliniků a naměřené výsledky - je pro laboratorní provoz zcela klíčový. Pro moderní klinickou laboratoř je charakteristická poměrně komplikovaná počítačová síť s řadou uživatelských stanic spojující několik klíčových softwarů.

Základní cesta toku dat je následující: Požadavky od kliniků přicházejí ve formě elektronické žádanky z nemocničního informačního systému (NIS) do laboratoře do laboratorního

informačního systému (LIS). K LIS jsou připojeny jednotlivé analyzátory. Po ukončení analýzy vzorků se výsledky automaticky přenášejí z analyzátorů do LIS a po validaci do nemocničního informačního systému k lékaři, který vyšetření původně ordinoval. Takový přenos dat již není omezen na jedno pracoviště, ale může spojovat zařízení v různých lokalitách. Jedná se o oboustrannou komunikaci.

### 1.3.1. Elektronická žádanka, požadavek zasláný v elektronické podobě

Identifikační údaje pacienta i požadavky na vyšetření jsou zadány do informačního systému na klinických pracovištích. Poté se zde vygenerují jednoznačné čárové kódy a nádobky s odebraným biologickým materiálem se jimi označí.

Při příjmu materiálu v laboratoři se načte čárový kód na zkumavce laserovou čtečkou. Identifikační údaje i požadavky na biochemická vyšetření se tak automaticky přenesou do LIS.

### 1.3.2. LIS

Základní software laboratoře tvoří **laboratorní informační systém**. Zajišťuje komplexní zpracování dat v laboratoři od příjmu požadavku na vyšetření, přes jeho zpracování ve všech fázích laboratorní práce, technickou a lékařskou validaci výsledků, jejich vydání objednateli a vyúčtování provedených výkonů.

V LIS se sdružují výsledky z jednotlivých přístrojů v laboratoři a mohou tak být posuzovány v širších souvislostech. Tyto základní činnosti laboratorního informačního systému mohou být pak doplněny škálou různých tiskových sestav, statistik a přehledů a nadstavbovými programy pro další zpracování uložených dat. Veškeré údaje přicházející do systému z nejrůznějších zdrojů, ať už ručně zadané nebo přijaté elektronickou cestou od jiných počítačových systémů či laboratorních analyzátorů, zůstávají trvale uloženy v systému a lze s nimi kdykoliv zpětně pracovat.

V ČR nabízí LIS asi patnáct firem. K největším patří firma STAPRO se systémem OpenLIMS, MP Program s produktem Infolab a firma LIRS se stejnojmenným LIS.

#### Významné charakteristiky moderních laboratorních informačních systémů

- kompletnost ( pro všechny typy klinických laboratoří)
- vhodnost pro řetězce laboratoří, podpora detašovaných pracovišť
- přizpůsobitelnost provozním podmínkám např. automatizaci
- dokonalé sledování nákladů
- údržba a upgrade prostřednictvím internetu
- podpora akreditace
- databázová nezávislost
- části nastavitelné uživatelem
- grafická prezentace výsledků
- prohlížení výsledků přes web na základě nastavených práv
- možnost generování elektronické žádanky



## Trendy LIS

- snaha otevřít informační systémy do okolí, podpořit komunikaci s lékaři
- kvalitní statistika a mezioborové využívání dat (např. získání souvislosti laboratorních údajů s právě aplikovaným léčivem a demografickými údaji)
- automatické účtování pro pojišťovny
- schopnost přijímat data z programů zajišťujících napojení POCT přístrojů (systém umožní denní kontrolu glukometrů, ABR analyzátorů a koagulometrů, možnost jednotné archivace výsledků, vyúčtování testů v pojišťovně)

Moderní systémy využívají web klient (na PC je pouze web rozhraní). Tyto systémy mají mnohvrstevnou strukturu, jsou mnohem flexibilnější, lze u nich postupně měnit jednotlivé vrstvy a snadněji s nimi mohou pracovat také jiní programátoři než autor.

### 1.3.3. Data manager, middleware

V automatizovaných laboratořích přímé spojení LIS se softwarem analyzátoru již v dnešní době mnohdy nestačí. Mezi analytickým systémem, LIS a softwarem perianalytického systému bývá ještě začleněn **middleware (MW)** zajišťující vzájemnou oboustrannou komunikaci, umožňuje kontrolu a řízení pohybu vzorku po laboratoři včetně jeho archivace, kontrolu kvality, případně validaci výsledků. Dalším softwarem, který může být zařazen mezi jednotlivé laboratorní přístroje a LIS je **data manager (DM)**, který umožňuje řídit více přístrojů z jedné stanice a představuje tzv. centrální kontrolní modul. V některých případech plní funkce, které LIS neumožňuje (např. definace různých pravidel a podmínek).

Datová cesta od požadavku lékaře po obdržení výsledku lékařem vypadá v komunikační síti následovně:

NIS – LIS – MW – Analyzátor – DM – MW – LIS - NIS

### 1.3.4. Datové standardy

Přenášení dat mezi jednotlivými informačními systémy umožňují tzv. datové standardy. Jedná se o několikamístné číselné kódy, z nichž každý odpovídá určitému analytu. Standardy byly akceptovány naprostou většinou odborných společností. Ve světovém měřítku však jednotný systém neexistuje.

Pro komunikaci mezi informačními systémy užívanými ve zdravotnictví v ČR byla vytvořena první verze takového datového standardu v r. 1997 (ing. Zámečník). Jedná se o Národní číselník laboratorních položek (NČLP).

#### **NČLP zajišťuje:**

- předávání informací o pacientech mezi zdravotnickými informačními systémy
- objednávání požadavků směrem do LIS, sdělování výsledků z LIS

## 1.4. Automatizace vyšetření moče

Močové analyzátoři využívají podobné prvky automatizace jako dříve popsané analyzátoři na klinickou chemii – pipetory, transportní mechanismy, míchání pomocí vzduchové bubliny.

### 1.4.1. Chemická analýza moče

Automatizace v oblasti chemické analýzy moče probíhala od 80. let minulého století.

V současnosti jsou na trhu plně automatizované přístroje s integrovanou čtečkou čárového kódu k identifikaci vzorků. Na přístrojích se semikvantitativně stanovuje bilirubin, urobilinogen, bílkoviny, ketony, hemoglobin, leukocyty, dusitany, pH, glukosa a specifická hmotnost. Analýza využívá diagnostické proužky (suchá chemie). Celá procedura je standardizovaná, takže se vyhodnocení provádí až po uplynutí inkubační doby. Na přístrojích současné generace se diagnostické proužky do moče nenamáčejí, ale moč je napipetována na jednotlivé reakční zóny. Přístroj pracuje na principu reflektanční fotometrie.

### **Reflektanční fotometrie**

**Princip stanovení:** Zdrojem světla jsou světlo emitující diody, které emitují záření o různých přesně definovaných vlnových délkách. Světlo dopadá v různých úhlech na reagenční zóny diagnostického proužku a je odraženo na fotodiodu, která slouží jako detektor. Intenzita odraženého světla závisí na vybarvení reakční zóny (od bílé zóny se odráží prakticky 100%, čím tmavší zóna, tím víc světla je absorbováno).

#### **Praktické aplikace:**

##### *a) vysokokapacitní analyzátoři*

**Urisys 2400**, firma Roche (kazety se 400 diagnostickými proužky, minimální objem vzorku 1.5ml)

**iChem VELOCITY**, firma IRIS (může pracovat samostatně, ale výhodně je využíván ve spojení s přístroji řady IQ200 na automatickou mikroskopii)

**UriSed**, dodává firma DOT (využívá se v přímém propojení s přístrojem LabUMat)

##### *b) přístroje pro malé laboratoře*

**Miditron Junior a Urisys 1800**, firma Roche

**Aution Mini**, firma Arkray

### **1.4.2. Automatizace morfologického vyšetření moče**

Automatizace v oblasti morfologického vyšetření moče se na trhu objevila později, až kolem roku 1995. Z tohoto období pochází přístroj UF 100 firmy Sysmex pracující na principu průtokové cytometrie. V současné době tuto metodiku zastupuje přístroj **UF 1000**, který je popsán v kapitole Flow cytometrie.

V roce 2004 vyvinula firma Iris první přístroj pracující na principu automatizované mikroskopie, který získal dominantní postavení na trhu. Dřívější aplikace této i jiných společností měly jen omezené uplatnění. Jednalo se o přístroj IQ 200.

### **Automatizovaná mikroskopie**

**Princip analýzy:** Po nasátí vzorku je v mikroskopu přístroje automaticky vytvořena tenká vrstvička moče sendvičovitě uzavřená mezi vrstvy suspendované tekutiny. Mikroskop je spojen s digitální kamerou, která s využitím stroboskopu zachytí 500 obrázků z jednoho vzorku. Výsledný záznam je digitalizován, jednotlivé obrazy částic jsou izolovány do rámečků – každá částice zvlášť. Přístroj rozlišuje 12 základních kategorií částic. Software umožňuje jejich prohlížení, případně přeřazení do jiné kategorie nebo podkategorie vytvořené zákazníkem.

#### **Praktické aplikace:**

Analýzátory řady IQ 200 – např. **IQ 200 SPRINT** (100 vzorků/hod.)

**IQ 200 ELITE** (70 vzorků/hod.).

Charakteristiky přístrojů:

- stanovení počtu erytrocytů, leukocytů, epitelíí, válců na 1 ul moče
- identifikace a kvantifikace krystalů, bakterií a hlenu
- možnost prohlížení částic na obrazovce a přeřazování je do jiné kategorie
- archivace nálezů
- možnost provádět mikroskopické vyšetření pouze u pozitivních vzorků dle nastavených kritérií (výběr se provádí na základě výsledků chemické analýzy)

Přístroje řady IQ 200 lze zakoupit propojené s analyzátozem na chemickou analýzu moče iChem VELOCITY. Komplet od firmy IRIS se dodává jako **iRICELL Workcell**. Toto spojení umožňuje kompletní automatizaci močové analýzy – viz obr.12. Je v současnosti na trhu nejrozšířenější.



Obr.12 iRICELL Workcell, firma IRIS

### **Automatizace močového sedimentu**

Princip analýzy: Metodika využívá automatickou mikroskopii, ale příprava vzorku kopíruje klasický způsob provedení močového sedimentu v miniaturním měřítku (součást přístroje je centrifuga a postup využívá desetinásobné zakoncentrování vzorku).

### **Praktická aplikace:**

Přístroj **LabUMat and UriSed**, dodává firma DOT

Charakteristika přístroje:

- není potřeba žádných drahých reagentů, pro provoz stačí pouze destilovaná voda k promývání pipety
- každý vzorek je prohlížen v jednorázové kyvetě
- výsledkem jsou jasné, ostré obrázky jednotlivých částic močového sedimentu
- lze prohlížet obrázek jednotlivé částice nebo celého zorného pole
- všechny obrázky jsou pak uloženy v databázi, odtud mohou být kdykoli vyvolány

### **1.4.3. Klinický význam močové analýzy**

Zvýšení parametrů močové analýzy způsobují četné chorobné stavy. Jedná se zejména o záněty ledvin a močových cest, kdy se projevují patologicky zvýšené hodnoty bílkoviny, erytrocytů, leukocytů, epitelíí a válců. U pacientů s diabetem melitus nacházíme zvýšenou glukózu a ketony. Různé patologie se mohou objevit také u fyziologických stavů např. v těhotenství nebo po velké fyzické námaze.

## Literatura:

Beňovská M.: Automatizace a robotizace perianalytických procesů v klinické laboratoři – projekt pro velkou biochemickou laboratoř, disertační práce 2009.

1. Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff L.E.: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation. 2010, ISBN 978-0-7817-9045-1.
2. Burtis C:A., ASHWOOD E:R., Bruns D.E.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 2008, ISBN 978-0-7216-3865-2.
3. Compendium of Background Information firmy Roche. 2011.
4. Dastych M.: Instrumentální technika. 2007, ISBN 978-80-210-4226-1.
5. Dastych M., Breinek P. a kol.: Klinická biochemie. 2008, ISBN 978-80-210-4572-9.
6. [www.abbott.com](http://www.abbott.com) – převzato 16.2.2011.
7. [www.beckmancoulter.eu](http://www.beckmancoulter.eu) – převzato 3.5.2011.
8. [www.roche-diagnostic.cz](http://www.roche-diagnostic.cz) – převzato 9.7.2011.
9. [www.wikiskripta.eu](http://www.wikiskripta.eu) – převzato 6.4.2011.

## 2. POCT – testování v místě ošetření pacienta

V současné době se vedle biochemických analyzátorů využívaných v provozu klinických biochemických laboratoří používají mimo laboratoře také malé přenosné a stolní analyzátory. Jedná se o tzv. **Point of care testing** (POCT), který zajišťuje provádění měření a testů in vitro v místě péče o pacienta. Využívají se diagnostické přístroje s jednoduchým ovládáním. Slouží pro rychlá stanovení přímo u lůžka pacienta (centrální příjem, jednotky intenzivní péče), v malých laboratorních provozech, ordinacích praktických lékařů a specialistů nebo pro sebetestování chronicky nemocných pacientů doma – tzv. Near patient testing. Jedná se o zařízení do ruky, stolní analyzátory či zařízení na jedno použití. Jsou konstruována tak, aby je mohli úspěšně obsluhovat pracovníci bez specializovaného laboratorního vzdělání na klinických odděleních nebo sám pacient. Výsledky POCT urychlují rozhodovací proces o dalším postupu léčby a péče o pacienta. Některé POCT přístroje jsou vhodnější pro screening než pro stanovení diagnózy.

Specifickým rysem POCT analyzátorů je jejich jednoduchý způsob obsluhy, vysoce rozvinutý systém autodiagnostiky s minimálním požadavkem na kalibraci, kontrolu a údržbu ze strany laboratorně neškoleného zdravotnického personálu.

Ke vzniku POCT zařízení vedla miniaturizace v klinické diagnostice, která je dlouhodobým trendem. Využívá se rovněž možnosti výroby stabilních reagensů na suché vrstvě využívané u diagnostických proužků a kazet na jedno použití. Většina POCT zařízení pracuje na bázi senzorové technologie. Obvyklým řešením je tzv. kazetový systém (cartridge), kdy vložená kazeta obsahuje všechny potřebné reagensy, kalibrační a kontrolní materiály, případně další potřebné jednorázové součásti jako např. měřicí elektrody.

POCT tvoří nedílnou součást laboratorní diagnostiky a má pevné místo v uspořádání konsolidované laboratorní medicíny. POCT je důležitým prvkem v péči o pacienta a optimálním zaváděním POCT do praxe je jeho řízený proces a efektivní využívání jak z hlediska péče o pacienta tak i z hlediska ekonomického. POCT představuje významný podíl na diagnostickém trhu a jeho objem roste každým rokem.

### 2.1. Charakteristiky POCT

- Jednoduchá obsluha nevyžadující obsluhu s laboratorním vzděláním
- Kvantitativní výsledky s přesností a správností podobné jako v klinické laboratoři
- Zabudované kalibrátory a kontroly kvality vedoucí k automatické periodické kalibraci i automatickému měření kontrolních vzorků
- Nízká cena přístroje, vyšší cena za jedno vyšetření
- Servis výměnou přístroje
- Softwarové uložení výsledků
- Čtečka čárového kódu
- On-line přenos výsledků měření do LIS/NIS
- Dálková správa a supervize laboratoře

### 2.2. Výhody POCT

- rychlá analýza z plné žilní nebo kapilární krve (malý objem vzorku)
- získání výsledku v době, kdy se lékař plně věnuje pacientovi
- zkrácení analytického času odezvy (krátká doba čekání pacienta)

- cílená změna péče v případě časného získání výsledku (rychlost může zachránit život)
- možnost zlepšení kvality života pacienta
- malá velikost, snadný transport, snadná instalace, snadná obsluha, minimální údržba
- možnost využití v terénu

Nevýhodou POCT je omezené spektrum prováděných testů a to, že většinou nelze vybrat jednotlivé testy, ale je třeba provádět celý panel vyšetření.

### 2.3. Klasifikace POCT zařízení a přístrojů

POCT technologií se analyzují analyty, u kterých je významný požadavek na co nejkratší dobu odezvy. V současné době je již k dispozici několik desítek POCT testů. Analýza se provádí z plně venózní a kapilární heparinizované krve nebo moče.

Nejčastěji měříme parametry acidobazické rovnováhy, glukózu a ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cl}^-$ ), ale také kardiální markery (troponin T, myoglobin, NT-proBNP) a D-dimer, dále pak enzymy, *Helicobacter pylori* nebo albumin v moči.

POCT zařízení a přístroje mohou být

- **jednorázové** - kvalitativní nebo kvantitativní
- **k opakovanému měření**

#### 2.3.1. Jednorázová POCT zařízení

Jedná se o diagnostické použky (k chemickému vyšetření moče) pro jeden nebo více analytů nebo imunoanalytické kazety.

Imunoanalytické kazety obsahují biosenzory. Detekce je založena na měření reflektance, fluorescence či optického signálu. Princip měření je sendvičový.

**Příklad stanovení:** Analýza se provádí z plné krve, takže na matrici ze skleněných vláken je nejdříve třeba oddělit plazmu. Jedna protilátka s obsahem biotinu je navázaná na povrch porózní matrice. Druhá je značená zlatou vrstvičkou nebo barveným latexem. Vytvořený komplex se pohybuje po celulózové vrstvě, dokud nedoputuje k záchytné zóně, kde je ukotven streptavidin, na který se komplex naváže. Výsledek reakce je buď přímo viditelný okem nebo je vyhodnocen v readeru reflektanční fotometrií.

Jedná-li se o kvantitativní test, využívá se CCD kamera (zařízení s vázaným nábojem – charge coupled device). Takto pracuje např. kardiální reader firmy Roche, sloužící ke stanovení troponinu T, myoglobinu a D-dimeru.

Nejčastěji se jednorázový POCT využívá k měření glukózy. Glukometry mají zabudované biosenzory využívající glukózoxidázu nebo hexokinázu s fotometrickou nebo elektrochemickou detekcí. V poslední době u nich podařilo omezit vliv interference způsobované jinými redukčními činidly. K tomu se jako mediátor využívá ferrocen.

Velký význam mají multitestové kazety ke screeningovému stanovení drog (obr.13), z nichž některé je možno zakoupit v lékárnách.



Obr.13 Kazety ke stanovení přítomnosti drog,  
dodává firma Inlab Medical

Na trhu jsou rovněž k dispozici kazety na screening karcinomu tlustého střeva.

Ke stanovení glykovaného hemoglobinu se využívá light – scattering imunostanovení, v koagulační terapii optické senzory.

Jednorázovým zařízením lze stanovovat také kreatinin, alergeny a fertilitní hormony.

Některá zařízení ke stanovení většího počtu parametrů mají v sobě zabudovanou centrifugu.

### **2.3.2. Stolní POCT přístroje a POCT přístroje do dlaně k opakovanému měření**

Využívají se na jednotkách intenzivní péče, urgentním příjmu, operačních sálech. Pracují na podobném principu jako jednorázová zařízení – využívají senzory nebo diagnostické proužky. Nejčastěji měří glukózu, laktát, ureu, krevní plyny. Senzory bývají umístěny společně s kalibrátory a reagensy do jedné kazety.

#### **Nejčastěji využívané POCT přístroje k opakovanému měření – příklady:**

- **Stanovení kapilární glukózy**

Nejzastoupenější ze všech POCT testů je stanovení kapilární glukózy. Glukometrů, na kterých se měření provádí jsou v nemocnicích desítky. Přístroj se pohodlně vejde do dlaně. Příkladem je bezdrátové zařízení AccuChek Inform II od firmy Roche. Výsledky naměřené glukózy jsou elektronicky dokumentovány. POCT na glukózu jsou často využívány také v domácím monitorování.



Obr.14 Glukometr AccuChek Inform II, firma Roche

- **Stanovení krevních plynů, derivátů hemoglobinu a elektrolytů**

Příkladem je Gem Premiér 3000 od firmy Instrumentation Laboratory.

Nevyužívanější princip při stanovení krevních plynů a elektrolytů je potenciometrie, amperometrie nebo konduktometrie s využitím senzorů.

Analýza derivátů hemoglobinu je v současnosti založena na spektrofotometrii s měřením multivlnové délky (60 a více vlnových délek).

- **Koagulace**

Provádí se měření ACT (aktivační srážecí čas). Vyšetření monitoruje heparinovou terapii. Je velmi důležité mít pod kontrolou homeostázu po operačních výkonech. Předávkování heparinem může vést ke krvácení, nedostatečná dávka pak ke tvorbě sraženiny způsobující embolii.

- **Stanovení kardiálních (srdečních) markerů**

POCT stanovení založená na imunochemických metodách často využívají reagentie na tenké vrstvě a time-resolved fluorescenci k detekci.

Jedním z nejnovějších přístrojů ke stanovení srdečních markerů je v současné době analyzátor firmy Radiometer AQT 90 Flex (obr. 15). Jedná se o stolní analyzátor, ke kterému jsou kromě testovacích souprav pro kardiální markery vč. NT-proBNP k dispozici též soupravy pro stanovení  $\beta$ hCG, CRP a D-dimeru.

Principem stanovení na analyzátoru AQT 90 Flex je jedнокroková heterogenní sendvičová imunoanalýza.

Stanovení na AQT 90 Flex: Biotinylované monoklonální protilátky imobilizované na streptavidinovém vnitřním povrchu testovacího kalíšku tvoří se stanovovaným analytem a protilátkami značenými europiem sendvičový komplex. Výsledná koncentrace je kvantifikována porovnáním intenzity signálu vzorku získaného principem časově rozložené fluorometrie (time-resolved fluorescence - FTR) a kalibrační křivky uložené v softwaru analyzátoru. Doba stanovení jednoho testu je přibližně 20 minut, u více požadovaných testů v jednom vzorku se celková doba stanovení prodlužuje o 2 minuty za každý test. U libovolného vzorku lze provést maximálně 5 testů.





Obr.15 Analyzátor AQT 90 Flex, firma Radiometer

- V praxi je využíván také stolní POCT analyzátor k měření krevního obrazu
- Na trhu lze zakoupit také přenosné POCT přístroje určené pro veterinární medicínu. Příkladem je přístroj VetScan i-Stat dodávaný firmou Inlab Medical na kterém lze stanovit dle volby 1-8 parametrů. Stanovení trvá pouze 2 minuty.

### 2.3.3. In vivo POCT

POCT in vivo je prozatím nepříliš rozšířený. Lze takto stanovit krevní plyny nebo glukózu. Zařízení je umístěno v krevním řečišti a pracuje na principu optické technologie nebo elektrochemických senzorů.

Popsaná je také mimotělní - ex vivo aplikace. Zařízením protéká uzavřená smyčka krevního řečiště. Slouží ke stanovení glukózy nebo bilirubinu.

### 2.4. Dálková správa – centrální software

POCT analyzátoři v současnosti podléhají tzv. supervizní činnosti laboratorních pracovníků. Ta je usnadněna jejich on-line zapojením do nemocničních sítí, což umožňuje dálkovou správu, monitorování jejich funkce, vyhodnocování automaticky prováděných kontrolních analýz a přenos naměřených dat do laboratorních a nemocničních informačních systémů.

Systémy umožňují laboratoři prohlížet výsledky testů, kontroly kvality, přístroje a operátory z jedné pracovní stanice. Po supervizi ze strany laboratoře se pak data dostávají do nemocničního informačního systému (NIS), tedy zpět na oddělení, kde byla naměřena. Transfer dat umožňuje existence POCT standardů.

Řada POCT software je specifických pro jednoho výrobce. Moderní systémy jsou však schopny integrace a soustřeďují a přenášejí data z POCT různých výrobců.

Cenou za rychlou dostupnost a jednoduchou obsluhu jsou výrazně vyšší finanční náklady ve srovnání s klasickým laboratorním vyšetřením.

Software pro nemocniční síť POCT glukometrů nabízí již delší dobu např. firmy Abbott, Roche a Johnson and Johnson.

Příkladem takového softwaru je systém **cobas IT 1000**. Cobas IT 1000 je systémem rozhraní pro data pacientů naměřená v místě ošetření, který lze používat ve spojení s glukometry, koagulometry, readerem na srdeční markery a močovými analyzátory firmy Roche, vybranými acidobazickými analyzátory firmy Roche, Radiometr a IL, močovým analyzátozem Sysmex atd. Systém umožňuje centrální management desítek přístrojů a dat a zajišťuje oboustrannou komunikaci.

Umožňuje koordinátorovi POCT na místě ošetření sledovat a řídit činnost vzdálených testovacích míst a zajišťovat řádné shromažďování, ověřování a schvalování všech dat před jejich odesláním do LIS a do lékařských záznamů NIS. Výsledky kontrolních měření je možné dále analyzovat, exportovat a zobrazovat pomocí Levey-Jennings a kumulativních grafů.

Systémy na stanovení glukózy Accu-chek Inform a Accu-Chek Inform II obousměrně komunikují se systémem cobas IT 1000. Umožňují přenos výsledků měření pacientů a kontroly kvality do cobas IT 1000. Do glukometrů je pak možné odesílat demografické údaje pacientů, seznam oprávněných operátorů a centrálně spravovat nastavení konfigurace všech připojených glukometrů.

Systém je možné dále rozšířit o e-learningový modul cobas academy, který je plně integrován s cobas IT 1000. Operátoři pak mohou absolvovat pravidelná školení na svém počítači a po úspěšném složení zkoušky získávají automaticky certifikát pro daný typ analyzátoru na další období.

#### **2.4.1. Výhody softwarově řízených POCT systémů:**

- Snížení počtu chyb způsobených nesprávným měřením, seřizením přístroje či opisováním dat
- Dokumentace a archivace výsledků - permanentní zdravotní záznam
- Možnost účtovat testy zdravotní pojišťovně
- Standardizace konfigurace jednotlivých přístrojů
- Zachování rychlého získání výsledků a současně poskytnutí vysoké kvality výsledků
- Zajištění dodržení správného postupu
- Možnost centrální laboratoře monitorovat přístroje v oddělených lokalitách, provádět určité servisní procedury, případně vypnout přístroj
- V data manageru je uložena kalibrační křivka, limity pro kontrolu kvality
- Splnění legislativních požadavků pro in vitro diagnostiku

#### **2.5. Organizace a zajištění POCT**

K zajištění efektivního systému POCT je vhodné, aby jednotlivá zdravotnická zařízení jmenovala koordinátora POCT, který zajistí dobrou komunikaci a vztahy mezi dodavatelem POCT techniky, laboratoří a jednotlivými klinikami. Každá klinika či oddělení dále potřebuje osobu odpovědnou za POCT včetně zaškolování, která komunikuje s POCT koordinátorem. Je nezbytné, aby tento pracovník obdržel detailní návod, který při zaškolování nového personálu průběžně využívá.

System POCT by měl být standardizován a zajišťovat, aby výsledky z jednotlivých oddělení byly srovnatelné. Výhodou je, že jednotný systém vede k množstevním slevám a tedy nižší ceně za test.

**Před umístěním POCT analyzátoru je vhodné zodpovědět následující otázky:**

Jak se liší časová odezva (doba, za kterou lékař obdrží výsledek) a cena/test provedená pomocí POCT analyzátoru a v klinické laboratoři?

Sníží využití POCT dobu čekání v ambulanci či délku hospitalizace?

Neřeší problematiku efektivněji využití vhodného transportu vzorků do laboratoře?

Bude POCT systém na daném oddělení finančně efektivní (při malém počtu testů se nevyplatí zaškolování personálu, tvorba dokumentace atd.) ?

V dnešní době POCT splňují klinické požadavky po analytické i operační stránce. Existují velmi dobré přístroje, které dávají vysoce kvalitní výsledky v reálném čase.

Je doporučováno, aby akreditace POCT byla součástí akreditace laboratoře a aby pro POCT bylo využíváno stejné či podobné dokumentace jako v laboratoři – správné operační postupy, závazek operátorů, systém interní i externí kontroly kvality, srovnání s laboratorní metodikou, záznam poruch a nápravných opatření.

U systémů POCT na jedno použití může být obtížné dosáhnout takových požadavků. Projevuje se zde silná závislost na schopnosti výrobce pracovat reprodukovatelně.

## **2.6. Klinický přínos POCT**

Vzhledem k pestrosti měřených testů je i přínos jednotlivých vyšetření různorodý. Screeningové testy mohou vyloučit či potvrdit těhotenství (stanovení hCG) nebo prokázat např. požití drog. Stanovení koncentrace glukózy pomáhá monitorovat diabetes v domácí péči a u pacientů v nemocnicích sledovat aktuální glykémii. Stanovení parametrů acidobazické rovnováhy ( pH, PO<sub>2</sub> a pCO<sub>2</sub> ), iontů (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup>) a urey při příjmu pacienta přispívá ke stanovení rychlé a správné diagnózy.

### **Literatura:**

10. Beňovská M.: Automatizace a robotizace perianalytických procesů v klinické laboratoři – projekt pro velkou biochemickou laboratoř, disertační práce 2009.
11. Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff L.E.: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation. 2010, ISBN 978-0-7817-9045-1.
12. Burtis C:A., ASHWOOD E:R., Bruns D.E.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 2008, ISBN 978-0-7216-3865-2.
13. www.roche-diagnostic.cz – převzato 15.5.2011.
14. www.wikiskripta.eu – převzato 24.6.2011.
15. www.vzorova-ordinace.cz – převzato 24.6.2011

### 3. Elektroforéza

Elektroforéza je analytická metoda, která se řadí mezi elektromigrační separační metody. Principem této metody je využití rozdílné pohyblivosti (migrace) nabitých částic (iontů) v elektrickém poli. Při elektroforéze se jedná o mechanický přenos hmoty vlivem působení elektrického pole.

#### 3.1. Princip elektroforézy

Elektroforéza využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli. Toto elektrické pole je vytvořeno vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi dvě elektrody.

Na nabitou částici o náboji  $Q$  působí v elektrickém poli o intenzitě  $E$  dvě síly:

- Elektrostatická síla  $F_1$ , která jí uvádí do pohybu :

$$F_1 = QE$$

kde:

$E$  = intenzita elektrického pole:  $E = U / l$  [Volt/cm]

$U$  = napětí mezi elektrodami [Volt]

$l$  = vzdálenost elektrod [cm]

$Q$  = náboj iontu

- Odpor viskózního prostředí  $F_2$ , který jí brzdí :

$$F_2 = kv$$

kde:

$v$  - je rychlost pohybu iontu [cm/s]

koeficient  $k$  - závisí na velikosti a tvaru částice (iontovém poloměru rozpuštěné látky) a na viskozitě prostředí ( $\eta$ ):

$$k = 6\pi r\eta$$

kde:

$r$  = poloměr iontu [cm],  $\eta$  = vizkozita,  $\pi$  = Ludolfovo číslo

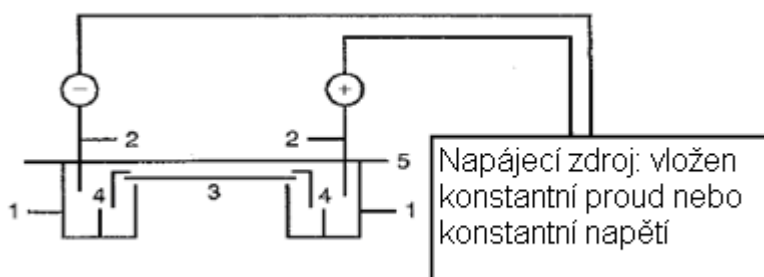
Hnací silou pohybu částice je rozdíl mezi elektrostatickou silou  $F_1$  a odporem prostředí  $F_2$ . V počátečním okamžiku je rychlost  $v$  nulová, částice je uvedena do pohybu elektrostatickou silou  $F_1$ . S rostoucí rychlostí  $v$  roste síla  $F_2$  (odpor prostředí) tak dlouho, až se obě síly působící na částici vyrovnají a nastane stacionární stav:  $F_1 = F_2$ ;  $QE = kv$

Rychlost pohybu určité částice v elektrickém poli o jednotkové intenzitě je definována jako elektroforetická pohyblivost (mobilita) -  $\mu$  [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ ]:

$$\mu = v/E = Q/k = Q/6\pi r\eta$$

Každá elektricky nabitá částice se v elektrickém poli pohybuje ve směru daném znaménkem svého náboje a orientací elektrického pole. Záporně nabitá částice putují k anodě, kladně nabitá částice putují ke katodě. Menší částice s větším nábojem se pohybují rychleji než částice objemné, které nesou malý elektrický náboj.

##### 3.1.1. Popis základního technického uspořádání elektroforetické aparatury



Obr.16 Schéma elektroforetické aparatury

1. prostory pro pufry (anodický a katodický)
2. elektrody – vyrobeny z platiny nebo karbonu, polarita každé z nich je dána připojením k napájecímu zdroji
3. elektroforetický nosič, kde probíhá vlastní separace – může být přímo v kontaktu s pufrem, nebo je s pufry spojen prostřednictvím knotů (pufrovaných houbiček)
4. knoty – pufrované houbičky
5. kryt – zabraňuje vypařování, chrání systém během elektroforézy

### 3.1.1.1. Napájecí zdroj

Funkcí napájecího zdroje při elektroforéze je dodání elektrické energie. Komerčně dostupné napájecí zdroje umožňují provoz v podmínkách konstantního proudu, napětí nebo výkonu, které jsou nastavitelné. Při průtoku proudu elektrolytem vzniká tzv. *Joulovo teplo*

$$H(\text{heat}) = (E)(I)(t)$$

kde:

E = napětí (V)

I = proud (A)

t = čas (s)

Teplo vyvinuté během elektroforézy zvyšuje vodivost systému (snižuje odpor). Při konstantním napětí je výsledný nárůst proudu příčinou zvýšení tepelného rozrušení rozpuštěných iontů, způsobuje zvýšení míry migrace proteinů a zvýšení vypařování vody z nosného média. Ztráta vody je příčinou zvýšení iontové koncentrace a snížení odporu (R, rovnice č.6). K minimalizaci těchto vlivů na míru migrace je nejlepší použití konstantního proudu (vloženého na napájecí zdroj).

Podle Ohmova zákona:  $E = (I)(R)$

Pokud se sníží odpor (R), vložené napětí se také sníží (proud zůstává konstantní). To na druhé straně se sníží tepelný efekt a udrží se relativně konstantní rychlost migrace.

Použití zdrojů :

Izoelektrická fokuzace (IEF) – používá se zdroj s konstantním výkonem, během separace dochází ke změně proudu a napětí. Kapilární elektroforéza (CE) – využívá vysokonapěťové zdroje.

### 3.1.1.2. Funkce pufry při elektroforéze

Při elektroforetické separaci slouží pufry jako multifunkční komponenta.

### ***Funkce pufru:***

- nese vložený proud
- stanoví pH, při kterém probíhá elektroforetické dělení
- určuje výsledný elektrický náboj rozpuštěné látky

### ***Iontová síla pufru ovlivňuje :***

- vodivost nosného média
- tloušťku iontové atmosféry okolního náboje molekuly
- rychlost migrace
- ostrost elektroforetických zón

Čím vyšší je koncentrace pufru, tím větší je iontová atmosféra molekuly a molekula se stává méně pohyblivou.

Vysoká iontová síla roztoku způsobí ostřejší separaci jednotlivých frakcí, ale dochází také k větší produkci Joulova tepla a tento efekt vede k denaturaci proteinů.

Iontová síla (značená jako  $I$ ) se počítá podle rovnice

$$I = 0,5 \sum c_i z_i^2$$

$c_i$  = koncentrace iontu [mol/l]

$z_i$  = náboj iontu

Iontová síla elektrolytu (pufru), který se skládá z monovalentních iontů, je přímo úměrná jeho molaritě [mol/l].

## **3.2. Rozdělení elektroforetických technik**

### **3.2.1. Volná elektroforéza**

Při této technice se elektroforéza provádí ve vodných roztocích (elektrolytech), kde částice s nábojem putují směrem k elektrodě s opačnou polaritou. Rychlost migrace a vzájemné oddělování částic je dáno velikostí náboje částice a použitým gradientem napětí. Separaci ruší konvenční proudy a difúze v kapalině, které vznikají vlivem tepla (Joulovo teplo). Tato technika se již téměř nepoužívá.

### **2.2. Zónová (zonální) elektroforéza na nosičích**

Pro zónovou elektroforézu se využívají hydrofilní (nerozpustné ve vodě) porézní nosiče, které mají co nejmenší absorpční schopnosti. Prvními použitými nosiči byly neklížený (chromatografický) papír, acetát celulózy, škrob a celulóza. V současné době se jako nosiče používají hlavně gely – nejčastěji agarózový (AGE) a polyakrylamidový gel (PAGE). Při přípravě PAGE gelu je možné ovlivňovat stupeň polymerace (zesíťování) - tedy velikost pórů. Rychlost migrace proteinů závisí na těchto faktorech:

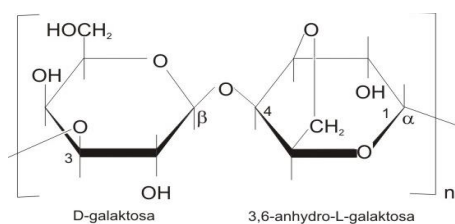
- Elektrický náboj molekuly
- Velikost a tvar molekuly
- Síla elektrického pole
- Vlastnosti nosného média
- Teplota

Proteiny s rozdílnou pohyblivostí migrují v gelu jako pásy (bandy).

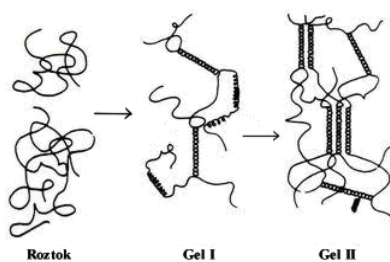
### 3.2.1.1. Elektroforéza v agarózovém gelu - Agarose Gel Electrophoresis (AGE)

Agaróza je získávána z mořských řas. Je to lineární polysacharid, jehož základní strukturní jednotka je složena z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktosy (viz obr.č.17 ). Průměrná velikost molekuly agarózy činí 300-400 základních jednotek.

Agarózový gel se připravuje tzv. gelifikací agarózy. Agaróza má za nižších teplot podobu gelu, gelifikuje (viz obr. č. 18) působením vyšší teploty ve vodném roztoku taje. Bod tání závisí na koncentraci a typu agarózy. Pro přípravu běžných agarózových gelů se používají agarózy, které tají při teplotách 85-100 ° C a gelifikují při poklesu teploty pod 45-50 ° C. Velikost pórů v gelu závisí na koncentraci agarózy, typicky se pohybuje mezi 100 a 300 nm. Pro elektroforézu na agarózovém gelu se nejčastěji používá 1-2 % gel agarózy. Používá se pro dělení částic na základě jejich rozdílného náboje.



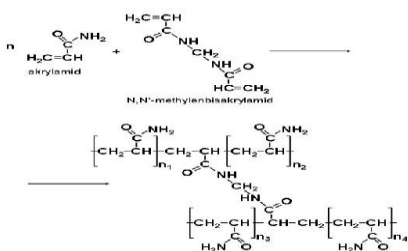
Obrázek č.17



Obrázek č.18

### 3.2.1.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis)

Polymerací akrylamidu ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) vznikají lineární molekuly polyakrylamidu. Ty se spojují příčnými můstky, které vznikají kopolymerací s N,N'-metylenbisakrylamidem ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Akrylamid i metylenbisakrylamid jsou poměrně stabilní látky; polymerace probíhá v nepřítomnosti vzdušného kyslíku (odstraní se odvdoušením pomocí vakua) a zahajuje se přidáním katalyzátorů peroxydisíranu amonného ( persíran amonný, APS) a N,N,N',N'-tetramethyldiaminu (TEMED). APS ve vodném roztoku s TEMED uvolňuje volné kyslíkové radikály, které atakují molekuly akrylamidu a bisakrylamidu a spouštějí tak jejich polymeraci (viz obr.č.19,20). Fyzikální vlastnosti gelu a velikost pórů jsou dány podílem polyakrylamidu v gelu a stupněm jeho zesíťování. Nejčastěji používané koncentrace polyakrylamidu jsou 5-15%, přičemž koncentrace N, N'-methylebisakrylamidu je obvykle 5% celkového množství akrylamidu. Nevýhodou je vysoká toxicita akrylamidu N,N'-metylenbisakrylamidu. ***Používá se pro dělení částic nejen na základě jejich rozdílného náboje, ale i na základě velikosti molekuly (tzv. síťový efekt).***



Obrázek č. 19



Obrázek č.20

### 3.3. Hlavní typy gelové elektroforézy

#### 3.3.1. Gelová nedenaturační elektroforéza

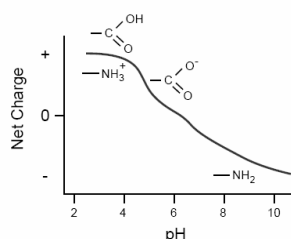
##### 3.3.1.1. Nativní gelová elektroforéza (nedenaturační)

Probíhá bez denaturačních činidel (někdy jsou používány relativně vysoké, nebo nízké hodnoty pH). Migrace proteinů gelem závisí na jejich náboji, velikosti a tvaru. Citlivost elektroforézy je dána charakterem póru gelu.

Mobilitu proteinů v nativním gelu ovlivňují tyto faktory:

- Náboj proteinu
- sekvence aminokyselin – relativní počet kyselých a bazických zbytků
- pH roztoku
- trojrozměrná struktura proteinu
- Velikost a tvar proteinu
- Koncentrace a stupeň zesíťování gelu
- gel obecně snižuje mobilitu proteinů, v závislosti na jejich volné pohyblivosti (bez přítomnosti gelu)
- větší molekuly jsou gelem ovlivněny více než menší molekuly
- složení gelu může být ovlivněno tak, že dělení probíhá na základě rozdílné velikosti molekul

Podmínky při elektroforéze musí být optimalizovány pro určitý protein.



Obrázek č.21 Vliv pH na celkový náboj proteinu

Tvar křivky na obr.č. 21 je závislý na sekvenci aminokyselin a vlastní struktuře proteinu. Pro každý protein existuje pH při kterém je pozitivní a negativní náboj v rovnováze a molekula nemá žádný náboj. Tato hodnota pH se nazývá izoelektrický bod – pI. Pokud je  $\text{pH} > \text{pI}$ , protein má negativní náboj ( $\text{AA} \square \text{COO}^-$ ), pokud je  $\text{pH} < \text{pI}$ , protein má pozitivní náboj ( $\text{AA} \square \text{NH}_3^+$ ).

#### 3.3.2. Gelová denaturační elektroforéza

##### 3.3.2.1. SDS gelová elektroforéza (denaturační)

Proteiny jsou denaturovány dodecylsíránem sodným (SDS) a  $\beta$ -merkaptóetánolem (zruší disulfidické vazby). Mobilita proteinů závisí na jejich molekulové hmotnosti.

SDS je anionaktivní detergent, který nese poměrně vysoký náboj, a proto ve vazbě na bílkovinu vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin, které se potom pohybují v gelu jen podle velikosti. Všechny bílkoviny váží SDS v konstantním poměru, asi 1,4g SDS na 1g bílkoviny, a tím charakteristicky mění svou konformaci. Výsledné komplexy SDS-bílkovina pak mají stejnou hodnotu povrchového náboje a jejich konformace se do té míry unifikuje, že relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS (viz obr.č.22).

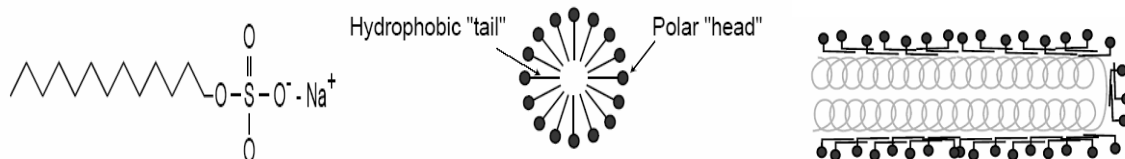


Obrázek č.22

dodecyl sulfát sodný

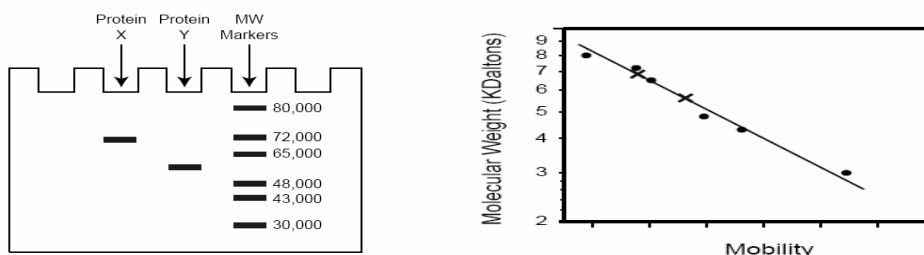
micela SDS ve vodě

struktura komplexu SDS - bílkovina



Vzorek proteinu se zpracuje s tzv. vzorkovým pufrům („sample buffer“), který mimo SDS obsahuje i redukční činidlo dithiothreitol nebo  $\beta$ -merkptoethanol. Působením těchto látek dojde k rozrušení kvarterní, terciární a do značné míry i sekundární struktury. Experimentálně byla prokázána lineární závislost mezi log molekulové hmotnosti a elektroforetickou mobilitou komplexů SDS - bílkovina.

Pro vlastní odhad molekulové hmotnosti neznámého proteinového vzorku se používají komerční směsi proteinů - standardy (viz obr.č.23). Tato metoda je vhodná pro analýzu makromolekulárních komplexů.



Obrázek č.23 Určení molekulové hmotnosti SDS-PAGE

### 3.3.2.2. Denaturační gelová elektroforéza s močovinou

Vlastností močoviny je její schopnost rozpouštět některé typy proteinů a také štěpit polymerní proteiny na polypeptidové složky. Při použití močoviny jsou proteiny separovány podle svého náboje. V tomto případě se používají výhradně polyakrylamidové gely.

### 3.3.3. Kontinuální zónová elektroforéza

Jde o nejběžnější typ elektroforézy, kdy vlastní separace probíhá v jednom médiu a většinou v jediném typu pufru.

Při kontinuálním uspořádání proteiny migrují v zóně, která je minimálně tak široká jako je výška vzorku v gelové jamce při nanesení. Z toho důvodu jsou pak proteinové pásy v konečném výsledku hůře rozlišené.

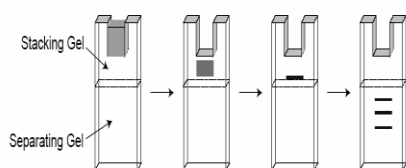
Složení elektrodového a gelového pufru je stejné. Tuto techniku nelze použít pro velmi zředěné vzorky. Kontinuální elektroforéza může probíhat na ktrémkoliv typu gelu, je však typická především pro agarózové gely.

### 3.3.4. Diskontinuální zónová elektroforéza

Diskontinuita může být jak v koncentracích gelu, tak především v pH a iontové síle. Je dnes hlavní elektroforetickou technikou pro analýzu proteinů. Byla vytvořena Ornsteinem a

Davísem (1964), zdokonalena Laemmli (1970). Oproti kontinuální elektroforéze má vysoké rozlišení a citlivost.

Používá se dvou gelů tzv. koncentrujícího („stacking“) gelu nahoře a separačního („running“) gelu dole (obr.č. 24).



Obrázek č. 24 *Vrstvení a separace v diskontinuálním gelu*

Vzorek se nanáší mezi dva elektrolyty s rozlišnou pohyblivostí iontů - mezi vodící (vedoucí) elektrolyt ve stacking gelu, jehož ionty mají vyšší pohyblivost, a koncový elektrolyt (terminátor) s nižší pohyblivostí než kterýkoliv iont (kationt nebo aniont v roztoku) v katodovém pufru. Vzorky nejprve volně prochází gelem s většími póry a poté se na rozhraní s gelem o malé velikosti pórů koncentrují do úzké zóny („stack“=kupa, hromada) mezi vedoucím a koncovým iontem.

V tomto uskupení migrují tak dlouho, dokud se nedostanou do separačního gelu - izotachofórze.

(dále viz Izotachofórze)

### 3.4. Zpracování gelu po separaci - barvení gelů

Po proběhnutí elektroforéze je nutné gel rychle sušit nebo fixovat fixačním roztokem (obsahuje kyselinu, např. kys. octovou). Tím dojde k denuraci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu, aby se zabránilo difúzi jednotlivých zón. Dále je nutné gel obarvit, aby došlo k vizualizaci jednotlivých proteinových frakcí. Po promytí přebytku barviva se gel suší. Barvy, které se používají k vizualizaci se liší podle typu použití a jsou uvedeny v tabulce 1. Množství barviva, které se během barvení váže na proteiny záleží na mnoha faktorech. Je ovlivněno typem proteinu nebo stupněm denaturace při fixaci.

Barva	použití	$A_{\max}$ [nm]
Amidočern 10B	barvení proteinů	620
Coomassie Brilliant Blue R-250		590
Coomassie Brilliant Blue G-250		595
Fast Green		610
Acid violet	Imunoelektroforéza	
Alcian Blue	glykoproteiny	630
Basic Fuchsin	Glykoproteiny, glykoproteiny bohaté na sialovou kys., nukleové kys.	550
Methyl Green	DNA	635
Ethidium Bromide (Fluorimetrická detekce)		

Bromcresol Green		
Methylene Blue	RNA	665
Pyrimin Y		510
Toluidine Blu O		620

Tabulka 1 *Přehled používaných barviv*

### 3.5. Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace

Po elektroforetické separaci a barvení je možné kvantifikovat jednotlivé zóny jako procentuální podíl přímou *denzitometrii*.

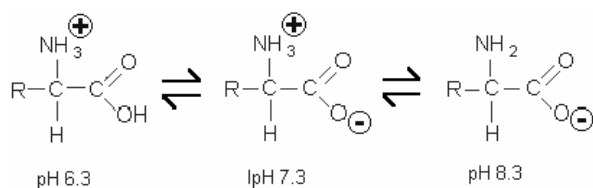
Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Jedná se o postup, který je podobný fotometrickému stanovení (liší se v uspořádání), zaznamenává měnící se hodnotu absorbance v závislosti na intenzitě zbarvení.

Při denzitometrii se měří intenzita záření procházejícího průsvitnou plochou nebo odraženého záření při neprůsvitné podložce a získává se tak grafický záznam, elektroforeogram. Jednotlivé frakce dělené směsi tvoří na záznamu v ideálním případě souměrné křivky zvonovitého tvaru. Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí v dělené směsi. Elektroforeogram se automaticky posunuje nad štěrbinou, kterou prochází světlo zvolené vlnové délky (400 – 700 nm, tabulka 1), v místě frakcí dochází k částečné absorpci záření to se projeví při dopadu na detektor. Po zpracování signálu integrátorem získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí. Na jedné podložce je současně vyhodnocováno až 30 elektroforetických drah.

### 3.6. Základní elektroforetické techniky

#### 3.6.1. Izoelektrická fokuzace (IEF)

Metoda IEF se používá k separaci amfoterních látek (aminokyseliny, peptidy a proteiny). V závislosti na pH mají amfoterní molekuly kladný nebo záporný celkový náboj („net charge“). (obr.č. 25) Pro posouzení tohoto náboje při různých hodnotách pH je důležitá hodnota izoelektrického bodu (pI).



Obrázek č. 25 *IEF*

Tato metoda využívá gely s velkými póry, které obsahují směs syntetických alifatických polyamino-polykarboxylových skupin, které se označují jako nosné amfolyty. Ty jsou voleny tak, že pokrývají široký rozsah izoelektrických bodů. Jakmile gel připojíme ke zdroji elektrického napětí, amfolyty vytvoří stabilní lineární gradient pH s nejnižší hodnotou pH při anodě a nejvyšší při katodě. Stabilita amfolytů v gelu je zajišťována silnou kyselinou (anoda) a silnou zásadou (katoda).

Proteiny se po nanesení na gel budou pohybovat pH gradientem až do míst, kde se pH gelu vyrovná s jejich izoelektrickým bodem (pI). V tomto bodě je protein elektricky neutrální –

jakmile by se z této polohy vychýlil na jakoukoli stranu, získal by kladný nebo záporný náboj a vrátil by se zpět. Výsledkem jsou velmi úzké zóny na gelu (odtud název „fokuzace“ - „zaostřování“). Proto je rozlišovací schopnost této metody vysoká a lze jí oddělit i proteiny, lišící se o 0,01 jednotky svých pI.

Proteiny, které se liší nábojem, ale mají prakticky stejnou molekulovou hmotnost (např. izoenzymy), lze separovat pouze IEF.

IEF se obvykle provádí v 3-4% polyakrylamidových gelech, nebo v agaroze. Do roztoku pro přípravu gelu se přidávají 2-2,5% amfolyty. Jedná se o směs nízkomolekulárních oligoamino-oligokarboxylových kyselin, které mají rozdílné pI hodnoty. Gradienty se tvoří nejčastěji v rozmezí pH 3-10 nebo v užším. Nadměrně dlouhým průběhem IEF se působením proudu gradient zhroutí (amfolyty se začnou pohybovat).

Jinou možností tvorby gradientu je použití immobilinů. Gradient je v tomto případě imobilizován v gelu, čehož se dosahuje použitím akrylamidových derivátů obsahujících ionizovatelné skupiny s pufrujícími vlastnostmi.

Anodový roztok je kyselý (k. fosforečná, k. octová, kyselý pufr), katodový roztok je bazický (NaOH, triethylamin, bazický pufr).

Izoelektická fokuzace se provádí ve vertikálním uspořádání. Hotové IEF gely s amfolyty nebo immobiliny se dodávají komerčně spolu s přístroji pro automatizovanou IEF.

Vzorky se obvykle nanášejí na katodové straně. Denaturující podmínky při IEF jsou docíleny použitím 9 M močoviny nebo neionogenních detergentů (Triton X-100).

### 3.6.2. Izotachoforéza

Jde o diskontinuální zónovou elektroforézu.

Používá se dvou gelů tzv. koncentrujícího („stacking“) gelu nahoře a separačního („running“) gelu dole. (obr.č.24). Každý z těchto gelů se připravuje s jiným pufrům (liší se hodnoty pH), elektrodový pufr se pak liší od obou gelových pufrů.

Vzorek se nanáší mezi dva elektrolyty s rozlišnou pohyblivostí iontů - mezi vodící (vedoucí) elektrolyt, jehož ionty mají vyšší pohyblivost, a koncový elektrolyt (terminátor) s nižší pohyblivostí než kterýkoliv iont ( kationt nebo aniont v roztoku). Vodící elektrolyt je na začátku izotachoforézy obsažen v katodovém prostoru koncový elektrolyt v anodovém prostoru. Po připojení stejnosměrného napětí se udržuje konstantní proud (asi  $10^2 \mu\text{A}$ ) a vzorek se začne dělit podle pohyblivosti jeho složek. Rychlejší ionty se dostávají dopředu a pomalejší se opožďují. Po určité době se ustaví stacionární stav, v němž tvoří jednotlivé kationty zóny seřazené za sebou podle klesající pohyblivosti iontů. Ve stacionárním stavu se zóny pohybují stálou a všechny stejnou rychlostí (odtud název izo-tachoforéza). Koncentrace iontu uvnitř zóny je konstantní, závisí na jeho pohyblivosti a na koncentraci a druhu vodícího elektrolytu.

O koncentraci v zóně dané látky vždy rozhoduje koncentrace látky v předcházející zóně, počínaje vodícím elektrolytem. To, že se méně pohyblivé ionty ve stacionárním stavu pohybují stejně rychle jako ionty pohyblivější, je způsobeno tím, že v každé zóně je jiný (potenciálový) spád. Gradient potenciálu je tím vyšší, čím méně pohyblivé ionty se zóně nacházejí (na méně pohyblivé ionty působí větší hnací síla).

Jednotlivé zóny jsou ve stacionárním stavu velmi ostré, protože zde působí tzv. samozaostřující efekt - opustí-li iont vlivem difúze svoji zónu a dostane se do zóny méně pohyblivých iontů (působí na něj větší gradient potenciálu), je zvýšením hnací síly popoháněn zpět do své zóny.

Základní rozdíly:

- pracujeme s konstantním proudem

- jednotlivé zóny se liší potenciálovým spádem - který závisí na pohyblivosti daných iontů
- rychlost pohybu zón je ve stacionárním stavu konstantní
- zóny na sebe navazují
- nedochází promísení zón díky samozaostřujícímu efektu

### 3.6.3. Dvojměrná elektroforéza (2-DE)

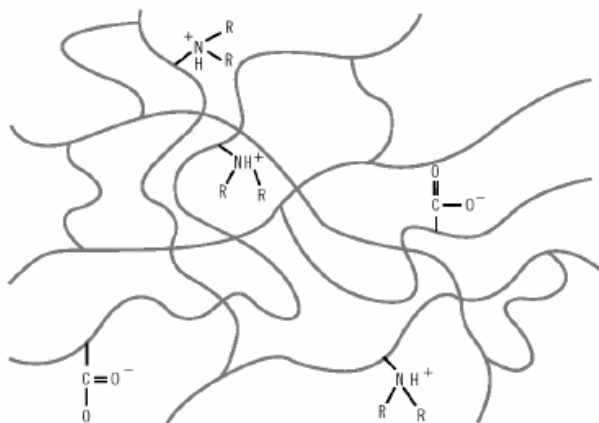
Dvojměrná elektroforéza (2-DE) je analytická a preparativní technika, která je schopná účinně separovat komplexní směsi bílkovin. 2-DE je klíčovou technikou *proteomiky*. Poprvé byla popsána již v r. 1975 (O'Farrellem a Klosem), rozšířena byla až s rozvojem proteomiky v posledních letech. Proteomika je obor, který se zabývá globálním hodnocením exprese genetické informace na úrovni bílkovin (proteomem), rovněž však zkoumá strukturu a interakce proteinů. Cíle proteomiky formulovala v roce 2001 Human Proteome Organization – HUPO :

- *expresní proteomika* - identifikace všech proteinů kódovaných lidským genomem s následným stanovením jejich exprese v různých buňkách daného organismu
- *strukturní proteomika* zahrnuje subcelulární lokalizaci proteinů v různých organelách, jejich posttranslační modifikaci a jejich vzájemnou interakci
- *funkční proteomika* - vztah mezi strukturou a funkcí proteinů

Podstatou 2-DE je využití dvou odlišných fyzikálně chemických vlastností proteinů: nejdříve jsou proteiny rozděleny podle jejich izoelektrického bodu (pI) v prvním rozměru - pomocí izoelektrické fokuzace (IFE) a dále v druhém rozměru se proteiny dělí v závislosti na jejich molekulové hmotnosti použitím elektroforézy v polyakrylamidovém gelu a SDS (SDS - PAGE).

#### **První rozměr: izoelektrická fokuzace (IFE)**

Provádí se na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu s malými póry s imobilizovanými gradienty pH (Immobilized pH gradients = IPG (obr. č. 26); pH nejčastěji v rozsahu 3-10). Proteiny migrují ke katodě či anodě dle svého celkového náboje až do chvíle, kdy pH místa v gelu odpovídá pI proteinu. Podle zvoleného rozsahu pH můžeme měnit škálu proteinů, které rozdělíme.



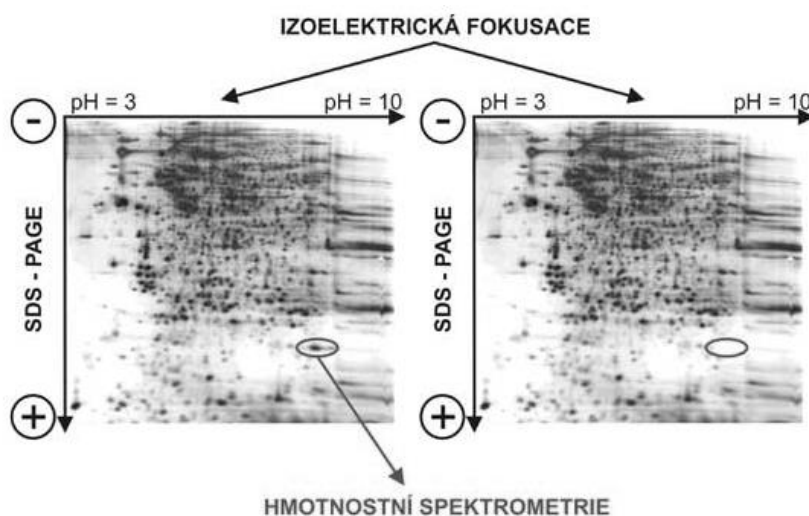
Obrázek č. 26 Imobilizovaný pH gradient v polyakrylamidovém gelu s disociovatelnými karboxy- a aminoskupinami, R= kyselá nebo bazická pufrující skupina

### ***Druhý rozměr: elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS PAGE)***

Po separaci v prvním rozměru je provedena běžná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (PAGE), kdy napětí aplikujeme kolmo vzhledem k původní orientaci elektrod. Proužek gelu obsahující proteiny po prvním dělení izoelektrickou fokuzací je po ekvilibraci v ekvilibračním pufru umístěn na vrch deskového gelu, který obsahuje SDS dávající proteinům uniformní náboj, tj. náboj vztažený na jednotku relativní molekulové hmotnosti. Cílem ekvilibrace je převést bílkoviny do pufrů vhodných pro SDS separaci a maximalizovat přenos bílkovin z gelového stripu po prvním dělení. Proteiny poté migrují v druhém rozměru gelem čistě v závislosti na jejich velikosti.

### ***Vizualizace: barvení 2-DE gelů***

Po proběhnutí obou fází 2D elektroforézy je třeba proteiny vizualizovat některou z barvicích či značících metod (chemických nebo radioaktivních). Výsledné "mapy" proteinů lze porovnávat např. mezi experimentálním a kontrolním vzorkem nebo mezi vzorky odebranými od pacientů s konkrétním onemocněním oproti zdravým kontrolám a identifikovat tak odlišně exprimované proteiny, které mohou mít souvislost s patogenezi daného onemocnění. Proto je třeba ověřit identitu těchto odlišně exprimovaných proteinů, nejčastěji pomocí "vyříznutí" oblasti gelu vykazující odlišnost a jeho následnou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. (obr. č. 27)



Obrázek č. 27  
2DE gely

### ***Identifikace proteinů: Hmotnostní spektrometrie***

Hmotnostní spektrometrie je metoda, která umožňuje přesné měření molekulární hmotnosti široké škály látek. Jelikož zkoumaná látka musí být převedena jako intaktní do plynné fáze, využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu proteinů (ale i polysacharidů či oligonukleotidů) bylo umožněno vývojem "měkkých" ionizačních technik hmotnostní spektrometrie, kam se řadí desorpce/ionizace za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Identifikace proteinu se provádí v zásadě dvěma základními způsoby: Protein je naštěpen trypsinem nebo jiným proteolytickým enzymem na menší peptidy, jejichž přesné hmotnosti jsou pomocí MS změřeny. Spektrum těchto hmotností je pak porovnáno s

teoretickými spektry, která jsou vypočítána ze sekvencí proteinů v dostupných databázích (pomocí bioinformatických metod).

Tandemová MS umožňuje zvolit peptid, který je následně fragmentován kolizí s inertním plynem. Profil výsledků fragmentace (fragmentation pattern) poskytuje částečnou či úplnou informaci o sekvenci proteinu, která je vodítkem pro hledání shody s daty uloženými v databázích.

Mimo samotnou identifikaci proteinů je MS neocenitelným nástrojem pro analýzu postranslačních modifikací proteinů, protože umožňuje lokalizaci dané modifikace uvnitř proteinu a napomáhá rovněž zjištění charakteru takové modifikace.

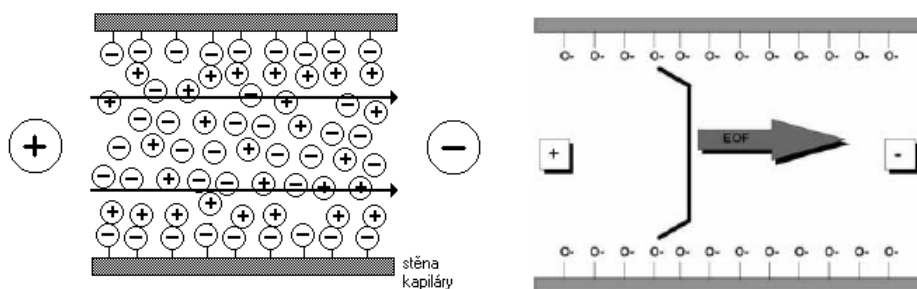
Metoda 2D elektroforézy má samozřejmě i své nevýhody - patří mezi ně omezená reprezentativnost vzorku (problematické jsou velmi zásadité proteiny, proteiny málo rozpustné ve vodné fázi a membránové proteiny), senzitivita (proteiny přítomné ve velmi nízkých koncentracích vyžadují speciální typy barvení), reproducibilita a ve srovnání s obdobnými technikami pro nukleové kyseliny špatná automatizovatelnost.

### 3.6.4. Kapilární elektroforéza - Capillary Electrophoresis (CE)

Zvláštním způsobem elektroforézy je tzv. kapilární elektroforéza, která využívá elektrokinetických principů elektroforézy a *elektroosmózy* k separaci látek uvnitř kapiláry.

#### 3.6.4.1. Elektroosmotický tok (EOF)

Povrch křemenné kapiláry obsahuje negativně nabitě funkční skupiny, které přitahují pozitivně nabitě ionty. Pozitivně nabitě ionty migrují k negativní elektrodě a unášejí molekuly rozpouštědla stejným směrem. Tento celkový pohyb kapaliny je nazýván elektroosmotický tok. (obrázek č. 28) Během separace se neutrální molekuly pohybují stejným směrem jako elektroosmotický tok (s nepatrnou vzájemnou separací). Pozitivně nabitě ionty jsou elektroosmotickým tokem urychlovány, negativně nabitě naopak zpomalovány.



Obrázek č. 28

*Elektroosmotický tok-schematicky*

Velikost elektroosmotického toku je závislá na náboji kapiláry, viskozitě elektrolytu a elektrické permitivitě elektrolytu :

$$\mu(\text{eo}) = \varepsilon \zeta / \eta r$$

$\mu(\text{eo})$  = "EOF mobilita" (rychlost EOF)

$\eta$  = viskozita

$\zeta$  = zeta potenciál (elektrostatický potenciál vzniklý v důsledku náboje na povrchu kapiláry)

$r$  = poloměr kapiláry

$\varepsilon$  – permitivita elektrolytu

$\varepsilon * \zeta$  je náboj (v Coulombech) podobně jako  $\mu=q/6\pi\eta r$

Velikost EOF je značně závislá na pH elektrolytu, protože zeta potenciál je řízen ionizací silanolových skupin. Do pH=4 je ionizace malá, nad pH=9 jsou prakticky všechny skupiny ionizované.

Jedním z důsledků existence EOF je možnost detekce kationtů a aniontů v jednom experimentu v případech, kdy velikost EOF je vyšší než elektroforetická mobilita aniontů (např. při pH>7), protože tok kapaliny unáší všechny látky ke katodě, kde je detektor.

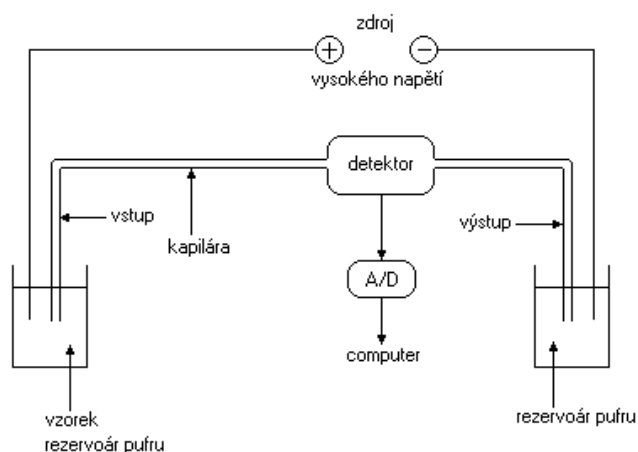
Nejdůležitější praktické důsledky EOF:

- mohou být detekovány i separovány pozitivní, negativní i neutrální molekuly
- elektrolyt je pumpován od anody ke katodě

Různě nabitě molekuly v separovaném vzorku se pohybují různými směry podle náboje, ale všechny jsou nesené ve směru katody díky elektroosmóze. Kladně nabitě molekuly dosáhnou katody jako první, neboť elektroforetická migrace i elektroosmotický tok mají stejný směr. Jestliže se za podmínek volné kapilární elektroforézy separují anionty, pak elektroosmotický tok elektrolytu a elektroforetická migrace mají opačný směr (obr.č. A) Směr elektroosmotického toku však může být změněn přidáním povrchově aktivních chemických aditiv do elektrolytu.

### 3.6.4.2. Technické uspořádání

Kapilární elektroforéza je prováděná v křemenných kapilárách (čistý oxid křemičitý) s malým průměrem, které jsou vně potažené tenkou vrstvou polyimidu (jiná možnost je teflonová kapilára nebo skleněná kapilára), případně v kapilárách plněných gelem (CGE). Hydroxylové skupiny křemene mohou disociovat a nabíjet tak vnitřní stěnu kapiláry. Vnější průměr je obvykle 180 – 375  $\mu\text{m}$ , vnitřní průměr se pohybuje mezi 20 -180  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry je 20 cm až několik metrů. Kapiláry slouží jako elektroforetická komora, která je terminálním koncem připojena na detektor a přes rezervoár s pufrům je napojena na vysokonapěťový zdroj (viz obr.č. 29).



Obrázek č.29

#### *Kapilární elektroforéza-technické uspořádání*

Největší výhodou CE oproti tradičním elektroforetickým technikám je možnost účinného odvodu tepla během separace. To umožňuje použití vysokého napětí v rozmezí 25 – 30 kV, což vede ke zvýšení separační účinnosti a redukci doby separace, v některých případech až pod 1 min..



### ***Pufry pro CE***

Stejně jako při konvenční elektroforéze je pro úspěšné provedení CE kritickým bodem výběr vhodného pufru. Vybraný pufr nesmí interferovat při detekci stanovovaného analytu, analyt v něm musí být dokonale rozpustný, během analýzy musí mít vysokou pufráčnou kapacitu a musí zaručit požadovanou efektivitu při separaci. Bežně používané pufry s nízkou hodnotou pH jsou např. fosfátový, acetátový nebo citrátový pufr. Nejvíce používané pufry pro alkalickou oblast pH jsou např. TRIS, borátový pufr nebo CAPS (N-cyklohexyl-3-aminopropansulfonová kys.). Intová síla pufru je dalším důležitým variabilním faktorem, který má efekt (pozitivní i negativní) na elektroforetickou separaci, hlavně proto, že vysoká iontová síla pufru generuje nadměrné množství Joulova tepla.

### ***Objem vzorku***

Množství vzorku musí být přizpůsobeno velikosti separační kapiláry. Typický objem kapiláry je 1-10  $\mu\text{l}$  a objemy vzorků nepřesahují 0,1-1% této hodnoty (1-10 nl).

### ***Detekce***

Většina CE systémů používá on –line detektory (on –column), které musí být citlivé, vzhledem k malému množství aplikovaného vzorku. Pro detekci se nejběžněji používá optický UV – VIS detektor. Více citlivé optické systémy používané při detekci jsou např. detektory fluorescenční, chemiluminiscenční nebo vodivostní.

### **3.6.4.3. Základní rozdělení CE technik**

CE elektroforéza se provádí několika způsoby - jako zónová elektroforéza, gelová elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), izoelektrická fokusace nebo izotachoforéza.

## **3.7. Praktické využití elektroforetických technik v klinické zdravotnické laboratoři**

Běžně používanou elektroforetickou separační technikou je gelová elektroforéza, elektroforéza s následnou imunofixací, kapilární elektroforéza, izoelektrická fokusace. Využívají se pro separaci proteinů krevního séra, moče, mozkomíšního moku nebo jiných biologických tekutin. Dále se používají pro separaci a kvantifikaci izoenzymů (ALP, LDH, CK), lipoproteinů, frakcí hemoglobinu nebo transferinu.

### **3.7.1. Elektroforéza bílkovin krevního séra - Serum Protein Electrophoresis (SPE)**

Elektroforéza bílkovin krevního séra je běžnou technikou používanou klinickými laboratořemi k vyhledávání abnormalit ve spektru bílkovin.

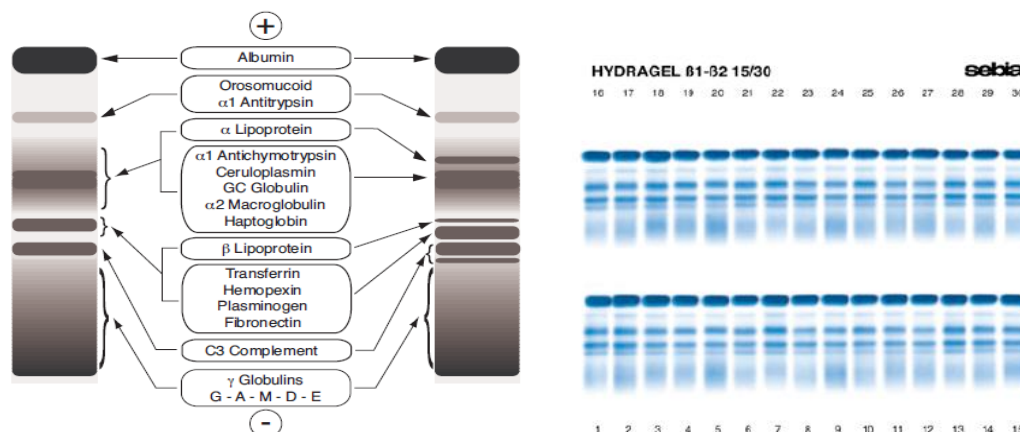
### **Přehled nejvíce používaných elektroforetických technik**

#### ***Gelová elektroforéza***

Při standartní SPE jsou vzorky nanášeny v blízkosti katodického konce nosného média, které je saturováno alkalickým pufrem (pH 8,6) s nízkou iontovou silou (asi 0,05). Jako nosné médium se nejčastěji používá agarózový gel (méně často acetát celulóza).

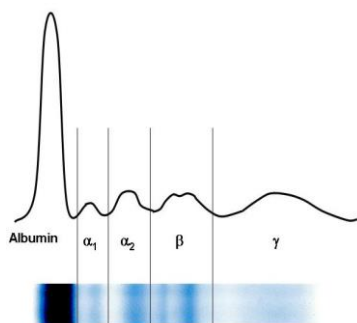
Nosné médium je spojeno s dvěma elektrodami a proud prochází nosným médiem k separovaným proteinům. Typické parametry při elektroforetické migraci jsou: proud 10 mA na 1 cm šířky gelu s časem migrace asi 10 min. (napětí 240 V, teploty 20 °). Všechny hlavní sérové proteiny nesou při pH 8,6 negativní náboj a migrují k anodě. Při standartní používané SPE se sérové proteiny dílí na 5-6 proteinových frakcí.

Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů. Nejvíce anodicky putuje albumin, následují  $\alpha_1$ -globuliny  $\alpha_2$ -globuliny,  $\beta_1$ -globuliny,  $\beta_2$ -globuliny a gamaglobuliny. Každá zóna obsahuje jeden a více sérových proteinů (obr. č.30 ). Šířka proteinového bandu frakce závisí na počtu proteinů, které jsou ve frakci přítomny.



Obrázek č. 30

Po elektroforetické separaci jsou proteinové frakce zafixovány v nosném médiu ponořením do kyselého fixačního média (např. kys. octová), dojde k denaturaci proteinů a jejich imobilizaci v nosném médiu. V dalším kroku jsou proteiny vizualizovány barvením. Nejčastěji se jako barvivo používá Amidočern 10B nebo Coomassie blue. Vyhodnocení elektroforeogramu je buď vizuální nebo denzitometrické (viz Vyhodnocení elektroforeogramů – detekce a kvantifikace). Po zpracování signálu integrátorem PC získáme číselné výsledky jednotlivých frakcí v %. Koncentrace je vypočítána jako % z hodnoty celkové bílkoviny, která byla stanovena kvantitativně (např. nejvíce používanou Biuretovou metodou).



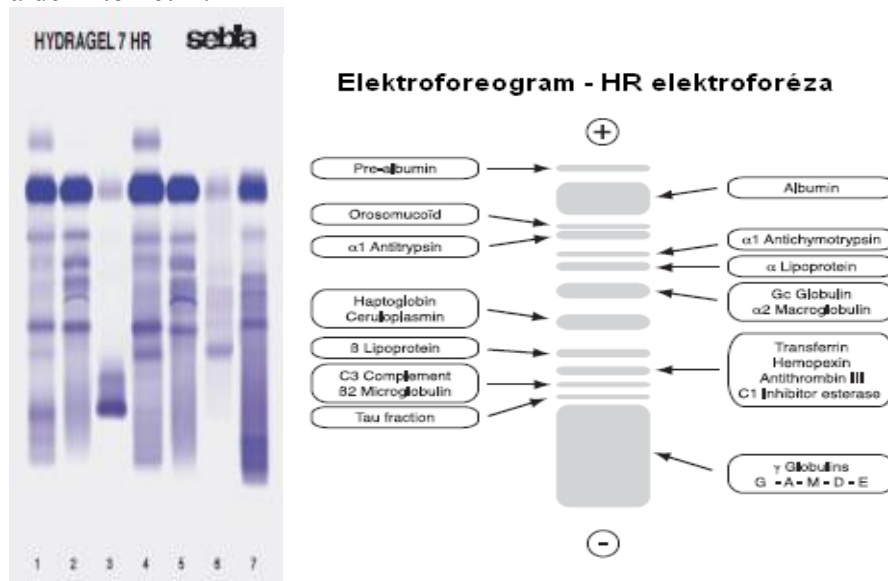
Obrázek č. 31

### **Vysokorozlišovací elektroforéza – High Resolution electrophoresis (HR)**

HR elektroforéza je určena k elektroforetickému rozdělení bílkovin lidského séra (dalších biologických tekutin jako jsou moč a likvor) na alkalicky pufrovaných agarózových gelech o pH 8.6. Vyhodnocení je buď vizuální nebo denzitometrické (relativní kvantifikace jednotlivých zón).

V principu jde o zónovou elektroforézu prováděnou na agaróze. Většina laboratoří používá tradiční pětizónovou (nebo šesti-zónovou) elektroforézu, HR elektroforéza však přináší další diagnostické informace. Bílkoviny séra dělí na přibližně 10 frakcí. Každá frakce obsahuje jeden a více sérových proteinů. Složení gelu, podmínky elektroforézy a volba barvičky dovoluje vynikající rozlišení a vysokou senzitivitu zvláště v gama zóně. ( obr.č.32) Gely je

možné obarvit amidočerní nebo kyselou violetí. Obarvené elfogramy lze vyhodnotit vizuálně a denzitometrií.



Obrázek č. 32 HR elektroforéza

### **Kapilární elektroforéza**

Další technikou ve zdravotnických laboratořích pro elektroforézu proteinů krevního séra je kapilární elektroforéza. (viz výše) Povrch křemenné kapiláry obsahuje negativně nabitě funkční skupiny, které přitahují pozitivně nabitě ionty. Pozitivně nabitě ionty migrují k negativní elektrodě a unášejí molekuly rozpouštědla stejným směrem. Tento celkový pohyb kapaliny je nazýván elektroosmotický tok. Během separace se proteiny pohybují stejným směrem jako elektroosmotický tok. Elektroforetické dělení proteinů probíhá v silikonových kapilárách o délce 30 -50 cm s vnitřním průměrem 25-100  $\mu\text{m}$ . Detekce se provádí v oblasti vlnových délek 200-600 nm.

### **Elektroforéza s následnou imunofixací - serum immunofixacion electrophoresis (sIFE)**

IFE je určena k detekci monoklonálních proteinů v lidském séru a v moči. Proteiny separované elektroforézou na alkalicky pufovaných agarózových gelech jsou inkubovány se specifickými antiséry proti těžkým řetězcům Ig G, Ig A, Ig M a lehkým volným i vázaným kappa a lambda řetězcům. Po odstranění nezreagovaných bílkovin jsou precipitáty obarveny kyselou violetí nebo amidočerní. Elektroforeogramy se hodnotí vizuálně a pátrá se po přítomnosti monoklonálních bílkovin.

Atypické proužky zjištěné elektroforézou v zóně alfa2 až gamaglobulinů mohou vyvolávat podezření na výskyt monoklonálních proteinů (M-proteiny, paraproteiny, monoklonální imunoglobuliny) a tím gamapatie. K identifikaci těchto abnormálních proužků slouží imunofixace. Imunofixační elektroforéza umožní zafixování proteinů in situ, kde tvoří nerozpustné komplexy s odpovídajícími protilátkami.

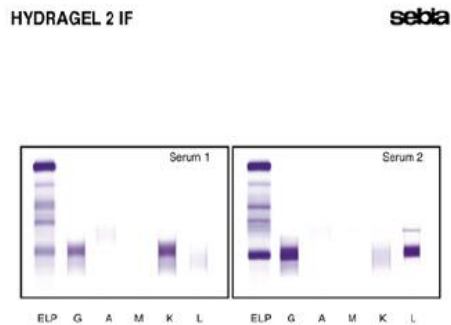
### **Provádí se ve čtyřech krocích**

1. Separace proteinů elektroforézou na agarózovém gelu.
2. Imunofixace (imunoprecipitace) proteinů rozdělených elektroforézou – příslušné migrační stopy jsou překryty jednotlivými antiséry. Antiséra difundují do gelu a precipitují přítomné antigeny. Proteiny v referenční stopě jsou fixovány fixačním roztokem.

3. Neprecipitované, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny odsátím a promytím. Komplex antigen-protilátka zůstává v gelové matrix.
4. Precipitované proteiny jsou vizualizovány obarvením.

Elektroforetické dělení vzorku probíhá simultánně v šesti stopách. Po elektroforéze – první stopa (ELP) slouží jako referenční. Zbývajících 5 stop je použito k nanesení specifických antisér – trivalentní proti těžkým řetězcům (G, A, M) a anti-kappa a anti-lambda volným a vázaným lehkým řetězcům (Obr. č.33).

Imunofixační proužky jsou porovnány s odpovídajícími frakcemi referenčního vzorku – odpovídající proužek by měl mít stejnou migrační pozici.



Obrázek č. 33 *Imunofixace séra: Sérum 1 – typ mIg : IgG kappa, sérum 2 – typ mIg: IgG lambda*

### 3.7.1.1. Klinický význam stanovení

Vyšetření slouží k diagnostice a monitorování mnohočetného myelomu a dalších patologických stavů spojených s absorpcí, nadměrnou produkcí bílkovin, popř. stavů spojených se zvýšenými ztrátami bílkovin následkem orgánového postižení nebo změnou nutričních návyků.

Elektroforéza sérových bílkovin se provádí zejména, zjistíme-li patologický výsledek celkové bílkoviny, nebo potřebujeme-li podrobnější informaci o sérových bílkovinách. Zvláště cenná je pro průkaz dysproteinemie – změna koncentrace a kvalitativního složení jednotlivých bílkovin v séru, paraproteinemie – charakterizována přítomností monoklonálních imunoglobulinů.

Referenční hodnoty jednotlivých bílkovinných frakcí pro dospělé osoby jsou uvedeny v tabulce č. 2

(zdroj: Clinical guide to laboratory tests, Tietz, fourth edition)

Frakce	%
Albumin	39-51
$\alpha_1$ -globuliny	2 - 4
$\alpha_2$ -globuliny	4- 8
$\beta_1$ -globuliny	5-10
$\beta_2$ -globuliny	
gamaglobuliny	6-12

Tabulka č.2

Velkou předností elektroforézy ve srovnání s kvantifikací specifických proteinů je přehled, který poskytuje. Elektroforeogram nám dává informace o relativním zvýšení, snížení nebo homogenitě jednotlivých proteinových frakcí.

Proteiny tvoří velkou skupinu látek přítomných v plazmě (séru), jejich celková koncentrace se pohybuje v rozmezí 60 - 80 g/l. Tyto proteiny plní řadu funkcí, nacházíme zde transportní proteiny, protilátky, inhibitory enzymů, srážecí faktory, aj. Pro vyšetření spektra krevních proteinů je nejvhodnějším sérum: na rozdíl od plazmy neobsahuje fibrinogen (faktor I koagulační kaskády), jehož fyziologická koncentrace je kolem 3 g/l. V případě vyšetření plazmy se fibrinogen nachází v místech, kde se za patologických situací mohou vyskytovat tzv. monoklonální imunoglobuliny (viz dále). Během různých onemocnění se mění relativní zastoupení jednotlivých proteinů v séru a tím i elektroforeogram (výsledek elektroforézy), který tak může sloužit k orientačnímu zhodnocení zastoupení výše uvedených frakcí proteinů.

### ***Hlavní proteiny jednotlivých elektroforetických frakcí***

Přehled v tabulce č.3 uvádí proteiny jednotlivých frakcí i proteiny vyskytující se mezi uvedenými frakcemi, v tzv. interzónách. Za fyziologických podmínek je koncentrace těchto proteinů nízká, proto netvoří samostatné frakce (píky v elektroferogramu).

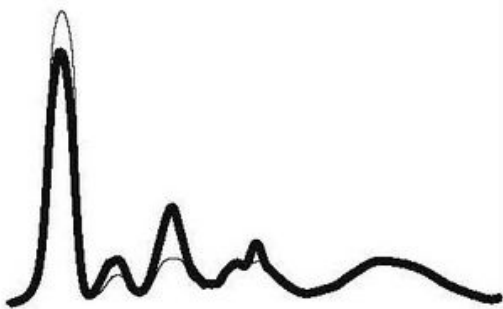
<b>frakce</b>	<b>bílkovina</b>	<b>význam</b>	<b>komentář</b>
<b>Albumin</b>	Albumin	Albumin je syntetizován v játrech. Jeho koncentrace v séru je 35 - 50 g/L a biologický poločas činí 20 dní. Albumin je velmi významný transportní protein - váže a přenáší mnohé látky (mastné kyseliny, hormony, bilirubin, léky, kovy). Dále se podílí na udržení vodní rovnováhy mezi intravaskulárním a extravaskulárním prostorem (udržování onkotického tlaku krevní plazmy) a pufruje tělní tekutiny	- zvýšení: dehydratace - snížení: poškození jater, chronická infekce, onemocnění ledvin, podvýživa, monoklonální gamapatie
<b>Interzóna albumin /alfa-1</b>	Alfa1-lipoproteiny Alfa1-fetoprotein Alfa1-kyselý glykoprotein (orozomukoid)	Alfa1-lipoproteiny (= lipoproteiny o vysoké hustotě, HDL) se účastní transportu cholesterolu a vitamínů rozpustných v tucích.	- zvýšení: hyperlipidemie - snížení: onemocnění jater
		Alfa1-fetoprotein je onkofetální antigen syntetizovaný během vývoje zárodku	zvýšení: karcinom jater

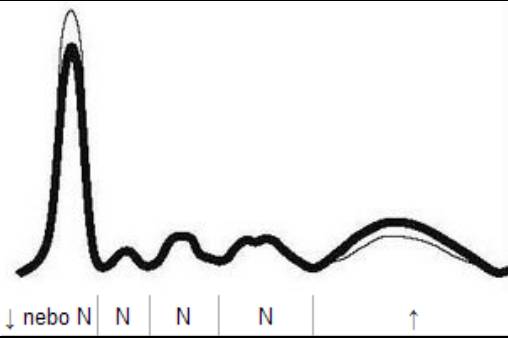
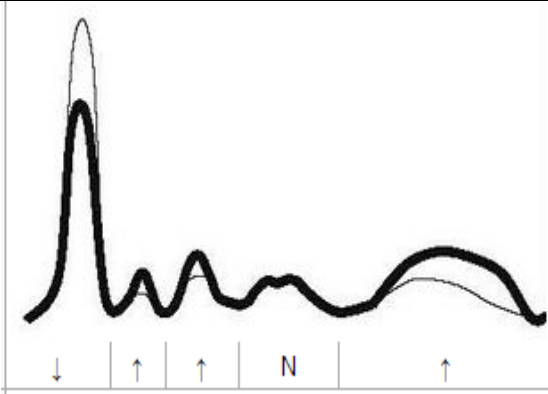
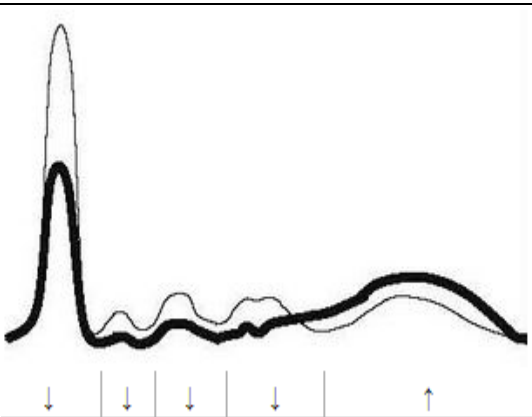
		Alfa1-kyselý glykoprotein (orozomukoid) je glykoprotein syntetizovaný v játrech	- zvýšení: jako odpověď na různá akutní a chronická zánětlivá onemocnění - snížení: při poruše proteosyntézy v játrech
<b>Alfa-1 globuliny</b>	Alfa1-antitrypsin (= alfa-1-inhibitor proteáz; API)	<i>Alfa1-antitrypsin (= alfa-1-inhibitor proteáz; API) patří mezi inhibitory proteolytických enzymů (např. elastázy, kolagenázy) produkovaných leukocyty nebo bakteriemi. Řadí se mezi tzv. „proteiny (reaktanty) akutní fáze“</i>	zvýšení: akutní zánětlivé reakce - snížení: těžké hepatopatie, hypoproteinemie, vrozený defekt tvorby API
<b>Interzóna alfa-1 / alfa-2</b>	Alfa1-antichymotrypsin	Alfa1-antichymotrypsin je inhibitor proteolytických enzymů.	-zvýšení: akutní zánětlivé reakce
<b>Alfa-2 globuliny</b>	Alfa-2-makroglobulin Haptoglobiny	Alfa-2-makroglobulin je také inhibitorem proteolytických enzymů. Jeho koncentrace jsou závislé na věku (vyšší v dětství).	-zvýšení: nefrotický syndrom - snížení: reumatoidní artritida, myelom, akutní pankreatitidy
		Haptoglobiny tvoří skupinu proteinů vázajících volný hemoglobin (Hb) za tvorby hemoglobin-haptoglobinového komplexu, který je rychle z krve vychytáván buňkami retikuloendoteliálního systému, kde je metabolizován; Hb-haptoglobinový komplex tak zabraňuje ztrátám železa močí.	-zvýšení: akutní a chronické záněty - snížení: onemocnění jater, hemolytická anemie
<b>Beta-1 globuliny</b>	Transferin	Transferin je hlavní transportní protein pro železo; přenáší železo ze střeva a mezi místy syntézy a odbourávání hemoglobinu.	- zvýšení: anemie způsobené nedostatkem železa - snížení: onemocnění jater,

			podvýživa, zánětlivá onemocnění, malignity
<b>Interzóna beta-1 / beta-2</b>	Beta-lipoproteiny	Beta-lipoproteiny (= lipoproteiny o nízké hustotě, LDL) se podílí na transportu cholesterolu.	- zvýšení: hyperlipidemie - snížení: hladovění
<b>Beta-2 globuliny</b>	C3 složka komplementu	C3 složka komplementu je jeden z proteinů systému komplementu, podílejícího se na zánětlivé reakci. -	- zvýšení: akutní zátěž organismu - snížení: autoimunitní onemocnění (tvorba imunokomplexů)
<b>Gamaglobuliny</b>	<i>Imunoglobuliny</i>	Gamaglobuliny jsou imunoglobuliny (protilátky) syntetizované plazmatickými buňkami. Kvantitativně je nejvýznamnější IgG. Normální rozsah migrace polyklonálního IgG je celá katodická část počínaje zónou b1, IgM – migruje v anodické zóně gama, IgA – migruje v interzóně b1 a b2- globulinů. -	- zvýšení: polyklonální (nebo monoklonální) gamaglobulinemie, jaterní onemocnění, chronické infekce - snížení: fyziologicky u malých dětí, hypoimunitní syndrom

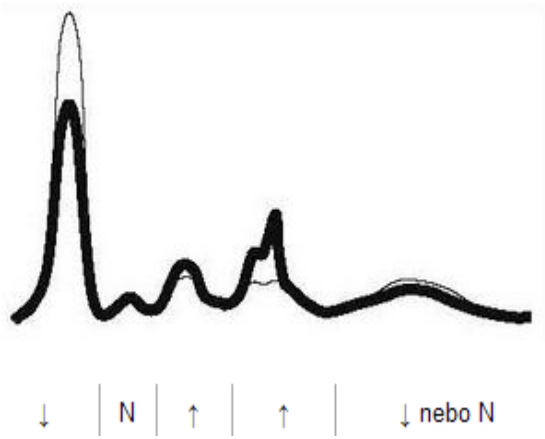
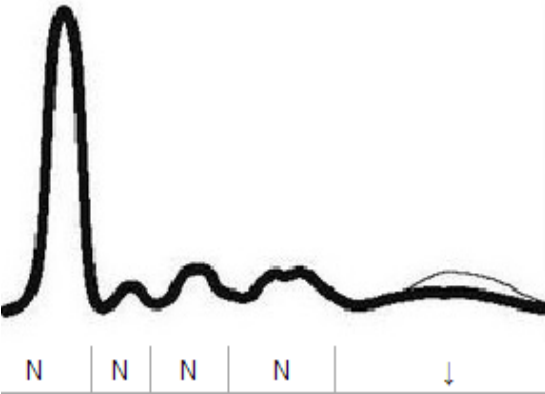
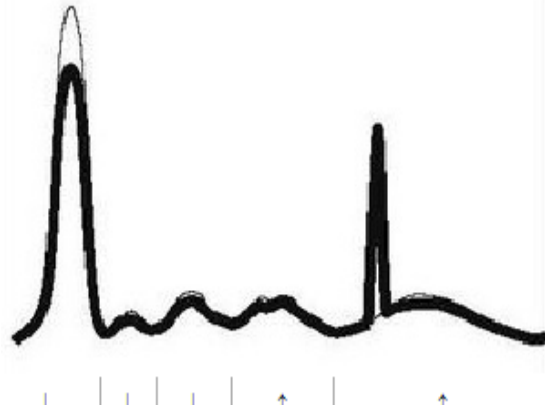
Tabulka č.3

Jednotlivé elektroforetické typy jsou v tabulce č.4:

Typ elektroforeogramu	kometář						Výskyt (příklad)
		Alb	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$	
<b>Typ akutního zánětu</b>	zvýšení pozitivních reaktantů akutní fáze ( $\alpha_1$ -antitrypsinu, orosomukoidu, haptoglobinu, ceruloplazminu, CRP, C3) pokles						akutní fáze infekčních onemocnění, akutní poškození tkáně (infarkt myokardu, chirurgický výkon), větší
		↓ nebo N	↑	↑		N	

	negativních reaktantů akutní fáze		popáleniny
<b>Typ chronického zánětu</b>	polyklonální zmnožení imunoglobulinů		rekonvalescence po infekčním onemocnění některá revmatická onemocnění
<b>Chronický aktivní zánět</b>	zvýšení $\alpha$ -globulinů svědčí o reaktivaci procesu		chronická aktivní revmatoidní artritida
<b>Typ hepatopatie</b>	vážne proteosyntéza v hepatocytech jater nadměrná tvorba imunoglobulinů někdy se neoddělí $\beta$ a $\gamma$ frakce (tzv. $\beta$ - $\gamma$ můstek – při zvýšení IgA)		chronická jaterní onemocnění – jaterní fibróza a cirhóza



<p><b>Typ nefrotického syndromu</b></p>	<p>výrazné ztráty bílkovin moči (převládají renální ztráty albuminu)</p> <p>zvýšení bílkovin s největší Mr – <math>\alpha_2</math>-makroglobulinu a <math>\beta</math>-lipoproteinu</p> <p>nadměrná tvorba imunoglobulinů</p> <p>někdy se neoddělí <math>\beta</math> a <math>\gamma</math> frakce (tzv. <math>\beta</math>-<math>\gamma</math> můstek – při zvýšení IgA)</p>		<p>nefrotický syndrom</p>
<p><b>Hypogamaglobulinemie</b></p>	<p>pokles v oblasti <math>\gamma</math> globulinů</p>		<p>primární deficit tvorby protilátek</p> <p>sekundární deficit tvorby protilátek</p> <p>ztráty imunoglobulinů</p>
<p><b>Monoklonální gamapatie</b></p>	<p>homogenní vrchol kdekoliv v oblasti <math>\alpha_2</math> až <math>\gamma</math></p> <p>deficit polyklonálních Ig</p>		<p>benigní monoklonální gamapatie</p> <p>maligní monoklonální gamapatie (mnohočetný myelom)</p>

Tabulka č.4

SPE s následnou denzitometrií má klíčový význam při diagnostice monoklonálních gamapatií (MG). Monoklonální gamapatie jsou definovány jako skupina onemocnění, které jsou charakterizovány proliferací jednoho klonu plazmatických buněk produkujících homogenní imunoglobulin. Toto onemocnění má maligní nebo potenciálně maligní charakter (*např. mnohočetný myelom*). V elektroforeogramu pátráme vizuálně po atypické zóně – proužek monoklonálního imunoglobulinu.

Při elektroforéze séra mohou monoklonální imunoglobuliny migrovat v širokém rozsahu od oblasti alfa<sub>2</sub>-globulinů až po katodický konec zóny gama-globulinů. Pro typizaci monoklonálního imunoglobulinu se používá elektroforéza s následnou imunofixací.

### 3.7.2. Elektroforéza bílkovin moče - Urine Protein Electrophoresis (UPE)

Elektroseparační techniky pro analýzu moče poskytují kvalitativní pohled na proteinurii. Zjištění a identifikace proteinurie je užitečnou informací při diagnostikování onemocnění ledvin. Proteinurie může být důsledkem mnoha patologických stavů. Identifikace hlavních bílkovin v moči pomáhá přesně určit typ poškození ledvin (tubulární, glomerulární nebo smíšený) a dále pomáhá při identifikaci monoklonálních gamapatií (Bence- Jonesovy bílkoviny).

UPE poskytuje informaci o přítomnosti některých vylučovaných proteinů – albuminu, transferinu, IgG,  $\alpha$ 1- mikroglobulinu, hemoglobinu, event. monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinů (tzv. Bence - Jonesova bílkovina) v závislosti na jejich koncentraci v séru a funkcích ledvin. Elektroforeogram bílkovin moče je podobný rozdělení bílkovin v séru, avšak intenzita frakcí závisí na filtrační schopnosti ledvin. K analýze používáme zahuštěné nebo nezahuštěné vzorky moče. Zahuštění se provádí na koncentraci bílkoviny asi 15 - 20 g/l pomocí koncentračních zkumavek (Vivaspine 2, Santorius). Tyto zkumavky obsahují speciální hydrofilní membránu, což znesnadňuje vazbu proteinů. Membrána je vyrobena z polyethersulfonátu (PES), triacetátu celulózy (CTA) nebo ze stabilizované celulózy (Hydrostat), má cut-off hodnotu podle molekulové hmotnosti, pro kterou je nepropustná (5,10 a 30 kDa). Stabilita moče pro vyšetření elektroforézy je minimálně 1 týden při teplotě 2 – 8 °C, není doporučeno vzorky mrazit.

#### 3.7.2.1. Přehled nejvíce používaných elektroforetických technik

Elektroforéza v zahuštěné moči se provádí za stejných elektroforetických podmínek jako SPE a SIFE.

#### ***Gelová elektroforéza na agarózovém gelu v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům***

Bílkoviny jsou rozděleny na zásaditě pufovaných agarózových gelech (pH 9.1) a imunofixovány pomocí specifických antisér bílkovin, které představují různé typy proteinurie. Imunofixační elektroforéza umožňuje ukotvení bílkovin in situ po elektroforéze vytvořením nerozpustných komplexů s odpovídajícím antisérem. Tento postup umožňuje v jednom kroku charakterizovat různé proteinurie a detekci Bence Jonesových bílkovin jako kvantitativní pomůcka při identifikaci monoklonálních gamapatií.

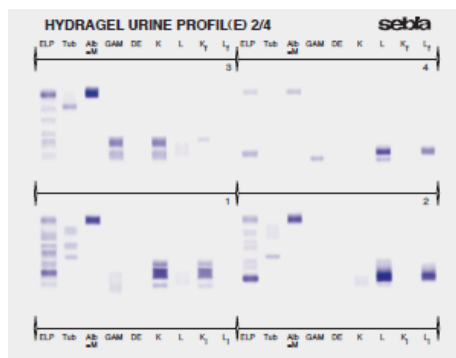
Vzorek zahuštěné moče je současně podroben elektroforéze v devíti stopách na alkalicky pufovaném agarózovém gelu. Po elektroforéze slouží jedna stopa (ELP) jako referenční pro znázornění elektroforetického uspořádání bílkovin ve vzorku. Zbývajících osm stop je imunofixováno příslušným antisérem. Nevysrážené, rozpustné proteiny jsou z gelu odstraněny pomocí odsávání a promývání. Precipitovaný komplex antigen-protilátka je

zachycen v matici gelu. Vysrážené bílkoviny jsou vizualizovány barvením kyselou violetí. Přebytečné barvivo se odstraňuje kyselým roztokem.

Následuje imunofixace specifickými antiséry proti různým bílkovinám.

- tubulární proteiny  $\beta_2$  mikroglobulin, Protein vázající Retinol (RBP) a  $\alpha_1$  mikroglobulin,
- glomerulární proteiny (Albumin a  $\alpha_2$  makroglobulin),
- těžké řetězce gama, alfa a mí (s trivalentním antisérem)
- lehké řetězce kappa, volné i vázané
- lehké řetězce lambda, volní i vázané
- lehké volné řetězce kappa
- lehké volné řetězce lambda

Imunoprecipitované frakce jsou potom porovnány s odpovídajícími abnormálními frakcemi v elektroforetickém záznamu vzorku a identifikovány podle reakce nebo nepřítomnosti reakce s jednotlivými antiséry (obrázek č. 34).



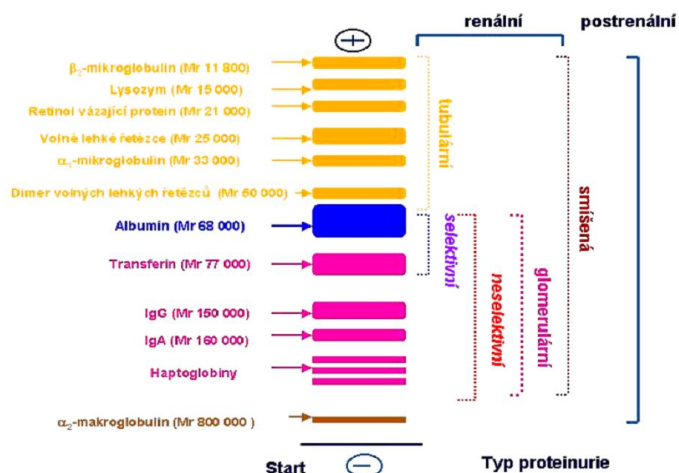
Obrázek č. 34

### ***SDS – elektroforéza na agarózovém (SDS AGE) nebo polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)***

Pokud je nutné provést typizaci proteinů moče, je možné provést elektroforézu na neutrálně pufrovaných SDS gelech, které separují močové bílkoviny podle jejich molekulové hmotnosti a zcela jasně odlišují bílkoviny tubulární od bílkovin glomerulárního původu. Výsledek elektroforetického dělení proteinů obarvených kyselou violetí je vizuálně porovnáván s proteinovými markery v referenční stopě. Tímto způsobem lze identifikovat jednotlivé bílkoviny a proteinurii správně klasifikovat. Elektroforéza ke klasifikaci proteinurie se provádí v nezahuštěné moči.

V přebytku anionického detergentu SDS (Sodium Dodecyl Sulfate – laurylsíran sodný) jsou bílkoviny změněny v komplexy obsahující SDS. V těchto komplexech dochází k rozrušení nativní struktury bílkovin a zaujetí uniformní struktury o stejném negativním elektrickém náboji na jednotku hmotnosti.

Při elektroforéze na mediu s prosívacími vlastnostmi (gely s vysokou koncentrací) dochází k rozdělení močových bílkovin dle jejich molekulární hmotnosti (obr.č.35). Jednotlivé bílkoviny tubulárního původu (M.V. < 65 - 70 kDa) jsou jasně odlišeny od glomerulárních (M.V. > 65 - 70 kDa). Dle detekovaných bílkovin lze proteinurii klasifikovat jako tubulární, glomerulární a smíšenou. Nastavení parametrů procedury a citlivost barvení kyselou violetí umožňuje detekci proteinů bez předchozího zahuštění moče. Minimální detekční hladina je 15 mg/L na frakci.



Obrázek č. 35

### 3.7.2.2. Klinický význam stanovení

Vyšetření močových bílkovin stále zůstává jedním ze základních vyšetření v nefrologii.

Toto vyšetření má nezastupitelné místo v časně diagnostice nemocí ledvin. Současná diagnostika je založena na vyšetření celkové bílkoviny a albuminu v moči, méně často je vyšetřována močová exkrece jednotlivých dalších močových proteinů.

Glomerulární kapilární stěna ledviny efektivně brání průniku bílkovin v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (velikosti), náboji a tvaru. Bílkoviny s molekulovou hmotností větší než albumin (69 kD) pronikají do moči velmi omezeně. Nízkomolekulární bílkoviny, které jsou volně filtrovány v glomerulech, jsou účinně resorbovány a následně katabolizovány v proximálním tubulu a jejich koncentrace v moči jsou minimální. Nejvýznamnější součástí tzv. fyziologické proteinurie je tzv. Tamm-Horsfallův protein (uromodulin) – mukoprotein. Dalšími složkami jsou albumin (do 10 mg/24 h), IgG a sekreční IgA (do 10 – 15 mg/24 h) a volné lehké řetězce imunoglobulinů (do 10 – 15 mg/24 h).

Při běžné svalové aktivitě nepřesáhne fyziologická proteinurie 50 – 80 mg/24 h, při větší svalové aktivitě, prolongované ortostáze a sníženém příjmu tekutin může být vyšší – horní hranice fyziologické proteinurie je arbitrárně definována na 150 mg/24 h.

Podle velikosti ztrát bílkovin do moči za 24 h se proteinurie dělí na malou (0,15 – 1,5 g/24 h), střední (1,5 – 3,5 g/24 h) a velkou (> 3,5 g/24 h).

### 3.7.3. Elektroforéza bílkovin mozkomíšního moku

Vyšetření mozkomíšního moku (Cerebrospinal fluid-CSF) je důležitou součástí diagnostiky onemocnění centrálního nervového systému (CNS).

Celá řada onemocnění CNS se vyznačuje zvýšením proteinů v mozkomíšním moku v důsledku zvýšené permeability hemato-encefalické bariéry nebo zvýšené syntézy imunoglobulinů - v první řadě imunoglobulinu (Ig) ve třídě IgG v CNS. Přítomnost intratékálního Ig G je významnou informací vedoucí k dg. zánětlivého onemocnění CNS jehož příčinou je např. skleróza multiplex. Ačkoliv oligoklonální proužkování není ani diagnostické ani specifické pro toto onemocnění, je široce používáno jako podpůrná informace a považováno za základní vyšetření dle konsenzu "Evropské komise pro sklerózu multiplex". Potvrzuje diagnózu u pacientů s klinickými příznaky choroby a pomáhá při diagnostice případů s nepřesvědčivými klinickými znaky.

### ***Kritéria pro detekci Ig G oligoklonálních pásů v CSF***

- metoda s největší rozlišovací schopností a citlivostí pro detekci oligoklonálních pásů je izoelektrická fokusace
- oligoklonální Ig G musí být detekováno specifickým antisérem
- pro potvrzení intrathekální syntézy musí být vzorek séra a CSF pacienta analyzován paralelně, pro demonstraci rozdílů v Ig G distribuci
- koncentrace Ig G v CSF i séru musí být nastavena na stejnou hladinu
- mělo by se předejít zahušťování CSF.

### **3.7.3.1. Nejvíce používaná elektroforetická technika**

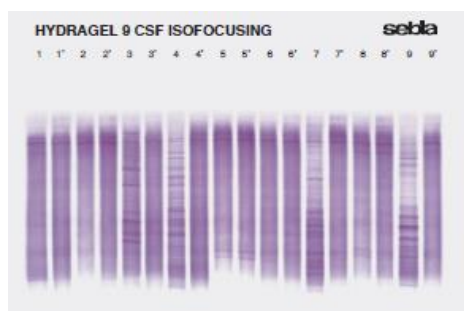
#### ***Izoelektrická fokuzace s imunofixací***

Procedura zahrnuje izoelektrofokuzaci na agarózovém gelu, následovanou imunofixací s anti-IgG antisérem. IgG imunofixační vzorky CSF a séra od téhož pacienta jsou pak vizuálně porovnány. Citlivost metody dovoluje analýzu CSF bez předchozího zahušťování.

#### *Test se provádí ve dvou stupních*

- Izoelektrofokuzace na agarózovém gelu k rozdělení proteinů ve vzorcích CSF a séra.
- Imunofixace anti Ig G antisérem značeným enzymem (peroxidáza) určeným k detekci Ig G oligoklonálních proužků a demonstrace rozdílů nebo nepřítomnosti Ig G v CSF a v séru.

Při koncentraci IgG 10 mg/L (a více), může být jeho rozdělení detekováno bez zahuštění CSF vzorku. K potvrzení intrathekální syntézy Ig je nutno analyzovat sérum a mozkomíšní mok paralelně ve stejných koncentracích, aby byl demonstrován rozdíl v distribuci IgG.



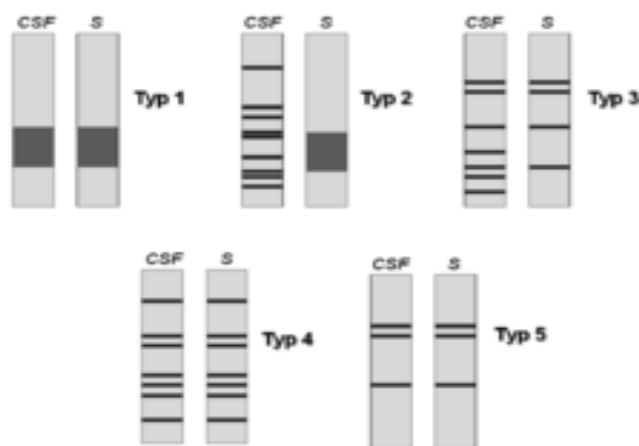
1 CSF, 1' sérum, 2 CSF, 2' sérum .....pacientů

### **7.3.2. Klinický význam stanovení**

Nejcitlivější metodou pro průkaz intrathekální syntézy protilátek je stanovení oligoklonálních imunoglobulinů metodou izoelektrické fokuzace s následným barvením nebo immunofixací. Fyziologicky mají imunoglobuliny v séru i mozkomíšním moku polyklonální charakter a vyjadřují heterogenitu individuálních protilátek produkovaných jako odpověď na nejrůznější antigeny, s nimiž se jedinec setkal.

Předpokládá se, že do CNS vstupuje pouze omezený počet B-lymfocytů, které se po aktivaci antigenem (např. určitým mikroorganizmem nebo autoantigenem) diferencují v plazmatické buňky secernující protilátky. Intrathekálně produkované protilátky se vyznačují pouze omezenou (oligoklonální) heterogenitou, což se při izoelektrické fokusaci projeví jako izolované proužky, které nejsou patrné při analýze séra. Z toho vyplývá nutnost provádět současně analýzu imunoglobulinů likvoru i séra. Srovnává se přítomnost či nepřítomnost identických pruhů IgG v séru a moku; počet a lokalizace proužků nemá diferenciálně diagnostický význam.

Popisuje se pět různých typů izoelektroforegramů (obr. 36):



Orázek č. 36

Základní typy izoelektroforegramů mozkomíšního moku (obr. )

**Typ 1** – v séru i v moku pouze polyklonální IgG – normální nález;

**Typ 2** – oligoklonální proužky pouze v likvoru – lokální syntéza IgG (např. u roztroušené míšní sklerózy)

**Typ 3** – oligoklonální proužky v likvoru a další oligoklonální proužky v likvoru i v séru – lokální syntéza IgG a produkce protilátek v organismu (např. chronická infekce CNS, roztroušená skleróza);

**Typ 4** – identické oligoklonální proužky v séru i moku (tzv. „zrcadlový“ obraz proužků v séru a v likvoru – dochází k průniku protilátek z krve do likvoru) – systémová imunitní aktivace bez lokální syntézy IgG v CNS;

**Typ 5** – identické monoklonální proužky v séru i moku v krátkém úseku pH gradientu, jde o přítomnost monoklonálního paraproteinu v likvoru sérového původu; myelom; monoklonální gamapatie

### 3.8. Výrobci elektroforetických zařízení

Vzhledem k vysokému počtu analyzovaných vzorků, hlavně vzorků séra, většina zdravotnických laboratoří používá pro elektroforézu automatické systémy. Plná automatizace snižuje objem manuální práce na minimum. Tyto systémy provádí automatickou aplikaci vzorku a reagensů (např. promývací roztoky, antiséra) na gel, elektroforetickou separaci, fixaci barvení, promytí a sušení gelu.

#### 3.8.1. Automatizované systémy pro gelovou elektroforézu bílkovin

##### *Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor HYDRASYS*

Poloautomatické systémy HYDRASYS jsou nejrošířenější elektroforetické systémy v klinických laboratořích. Tyto systémy jsou určeny pro elektroforézu bílkovin na agaróze (AGE). Lze provést až 145 elektroforéz bílkovin krevního séra za hodinu. Na jednom gelu je možné separovat až 54 vzorků séra v jednotlivých elektroforetických stopách. Analyzátor Hydrasys se skládá z modulu migračního (aplikace vzorku, elektroforetická migrace atd.) a barvicího (fixace, barvení a sušení gelu). Provádí všechny fáze elektroforézy. Migrační model je vybaven systémem pro kontrolu teploty (Peltierův efekt), který během migrace zajistí konstantní teplotu. Druhá generace přístrojů má zabudovaný skenovací modul pro následné

denzitometrické vyhodnocení elektroforeogramů. Skenovací modul umožňuje snímání s vysokým rozlišením obrazu a kvantifikaci gelu za méně než jednu minutu. Tento přístroj má také modul pro izoelektrickou fokuzaci.

Sebia poskytuje velmi širokou nabídku diagnostických souprav pro elektroforetickou separaci proteinů krevního séra, moče mozkomíšního moku nebo jiných biologických tekutin. Diagnostické kity umožňují provedení SPE, UPE, imunofixace séra a moče, izoelektrickou fokuzaci, separaci a kvantifikaci izoenzymů (ALP, LDH, CK), lipoproteinů, frakcí hemoglobinu nebo transferinu.

### ***Výrobce Helena Biosciences Europe (Anglie) – analyzátor SAS1-4, SPIFE 4000***

#### ***Analyzátor SAS 1-4***

Tento výrobce nabízí poloautomatické systémy SAS 1 – 4 (dle kapacity přístroje) pro gelovou elektroforézu na agaróze. Lze provést až 100 elektroforéz bílkovin krevního séra za hodinu.

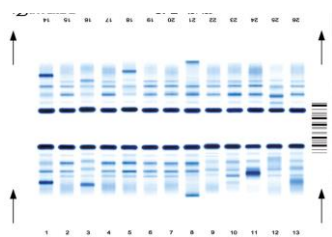
Přístroj má obdobné uspořádání a poskytuje stejnou nabídku vyšetřovaných parametrů jako výrobce SEBIA.

#### ***SPIFE 4000 analyzátor pro elektroforézu (SPE) a imunofixaci (IFE) bílkovin krevního séra***

Je plně automatizovaný systém pro elektroforézu a imunofixaci séra. Tento automat má kapacitu 560 SPE a 80 IFE během 8 hodin. Analyzátor provádí vše automaticky včetně aplikace antiséra (pro IFE), která jsou umístěny na palubě. Po usušení je gel automaticky přenesen do skanovacího modulu.

#### ***Výrobce Interlab (Itálie)-Analyzátor Microgel, analyzátor G26***

Je plně automatizovaný elektroforetický systém pro elektroforézu na agaróze. Jeho kapacita je 150 vzorků za hodinu. Systém má 4 držáky na gel, do každého lze umístit 1-2 gely. Na jednom gelu je možné současně analyzovat 26 vzorků. Obsahuje také modul pro izoelektrickou fokuzaci. Unikátní dvojité aplikátor umožňuje současně aplikovat vzorky v 1 nebo 2 řadách na každý gel. Migrační modul má 3 elektrody, což umožní zrcadlové dělení vzorků, při 2-řadové aplikaci vzorků na gel (obr. č.37).



Obrázek č. 37

Tento systém je plně automatizovaný (včetně pipetování vzorků) pro elektroforézu bílkovin séra, moče, lipoproteiny, izoenzymy alkalické fosfatázy, kreatinkinázy, laktátdehydrogenázy. <http://www.interlab-srl.com/img08/hr/microgel/3.jpg>

### **3.8.2. Automatizované systémy pro kapilární zónovou elektroforézu**

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 multikapilárních zařízení pro

kapilární zónovou elektroforézu (CZE) komunikujících s laboratorním informačním systémem představuje možnost zvýšení efektivity měření v režimu průběžného zpracování vzorků z primárních zkumavek identifikovaných čárovými kódy. Jsou eliminovány možné chyby způsobené postupem barvení a denzitometrickým hodnocením. Současné možnosti instrumentace pro kapilární elektroforézu vedou k rychlé a účinné separaci s vysokým rozlišením.

***Výrobce Sebia (Francie) – analyzátor CAPILLARYS***

Plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu CAPILLARYS 2 provádí elektroforetickou separaci současně na osmi kapilárách a je schopen analyzovat 80 vzorků za hodinu. Životnost kapiláry je 3000 vzorků/1 kapiláru, tzn. 24 000 vzorků pro celý systém. Pro detekci se používá optický UV – VIS detektor s detekcí vlnové délky v závislosti na stanovovaných parametrech (při elektroforéze sérových proteinů je měřena absorbance při 200 nm). Systém Capillarys 2 umožňuje rozdělení bílkovin krevního séra na 6 frakcí - frakce betaglobulinů se dělí na beta-1 a beta-2 frakci .

Přístroj je vybaven čtečkou čárového kódu, což umožňuje identifikaci vzorků. Na tomto systému je možné provádět elektroforézu séra a moče, imunofixaci, dělení frakcí hemoglobinu a transferinu.

***Výrobce Helena Biosciences Europe (Anglie) – analyzátor V8***

Analyzátor V8 – plně automatizovaný systém pro kapilární elektroforézu. Přístroj má 8 kapilár, je vybaven UV-VIS detektorem a čtečkou čárového kódu. Spektrum prováděných vyšetření je stejné jako u výrobce Sebia - elektroforéza séra a moče, imunofixace, dělení frakcí hemoglobinu a transferinu.



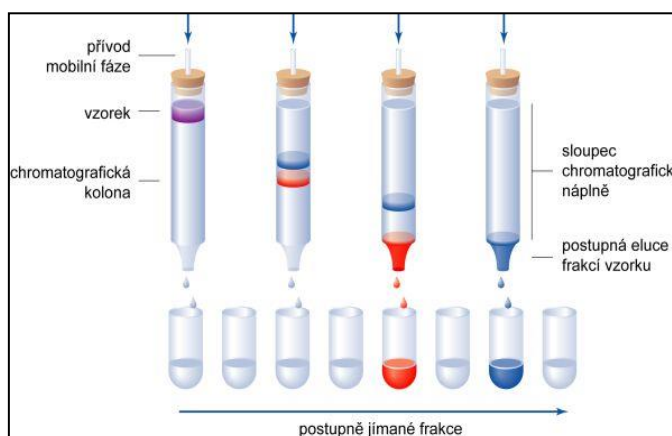
## 4. Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, založená na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní (pohyblivé) fázi. Chromatografické metody patří k nejdůležitějším metodám, které umožňují analyzovat složité směsi biologických molekul nebo vybrané složky směsi izolovat.

Metoda byla poprvé použita v roce 1901 ruským botanikem Michaiem Cvěttem pro izolaci rostlinných barviv na sloupci uhličitanu vápenatého (proto se v názvu metody vyskytuje řecké slovo *chromos* – barva).

### 4.1. Princip chromatografie:

Mobilní fáze proudí přes nosič nebo kolonu, obsahující stacionární fázi. Během pohybu mobilní fáze dochází k distribuci komponent směsi mezi obě fáze: látky s vyšší afinitou ke stacionární fázi migrují pomaleji než látky s nižší afinitou ke stacionární fázi (tyto zůstávají přednostně v mobilní fázi a migrují rychleji); jednotlivé složky směsi tedy procházejí systémem různou rychlostí.



Obr.38: *Princip chromatografie*

### 4.2. Klasifikace chromatografických metod

Chromatografické metody lze je rozdělit podle různých kritérií a níže uvedené způsoby se mohou při jednom chromatografickém uspořádání různě kombinovat (podrobnější vysvětlení bude uvedeno u konkrétních příkladů).

#### 4.2.1. Chromatografie podle uspořádání systému

Rozeznáváme chromatografii **plošnou** (planární) a **kolonovou** (sloupcovou). Při plošné chromatografii je stac. fáze zakotvena na papíru (papírová chromatografie) nebo je rozprostřená na inertní podložce (chromatografie na tenké vrstvě, angl. *thin-layer chromatography*, TLC). Při papírové chromatografii je stacionární fáze voda nebo polární rozpouštědlo zakotvené na vláknech papíru, při TLC je stacionární fáze tenká vrstva částic materiálu (silikagel, alumina, celulóza, aj.) rovnoměrně rozložená na skleněné desce, plastu nebo hliníkové fólii a zpevněná pojivem. Pokud tenká vrstva sestává z částic o malém průměru (4,5  $\mu\text{m}$ ), technika se nazývá HPTLC – high performance thin layer chromatography. Uspořádání plošných technik může být vzestupné nebo sestupné podle směru pohybu mobilní fáze.

V kolonové chromatografii může být stacionární fáze silikagel, polymer; fáze může být nanášena nebo chemicky navázána na nosné částice (př. uhlovodíkové řetězce zakotvené na nosných částicích silikagelu); může tvořit náplň kolony nebo být nanášena na její vnitřní povrch.

#### 4.2.2. Chromatografie podle skupenství mobilní fáze

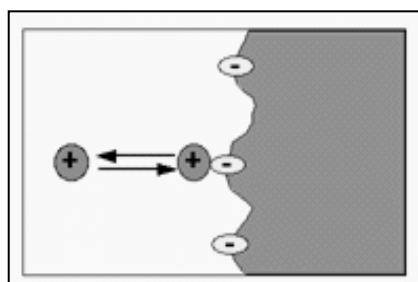
Kolonovou chromatografii dále rozdělit na **plynovou** (gas chromatography, GC) a **kapalinovou** (liquid chromatography, LC). Pokud je stacionární fáze pro LC tvořena částicemi malého průměru, technika se nazývá HPLC (high performance LC).

#### 4.2.3. Chromatografie podle separačního mechanismu

Rozeznáváme chromatografii

1. iontoměničovou
2. rozdělovací
3. adsorpční
4. gelovou permeační
5. afinitní.

**Iontoměničová chromatografie** (ionexová, angl. ion-exchange) je založena na výměně iontů elektrostaticky vázaných na nabitém povrchu stacionární fáze a ionty v roztoku. Stacionární fází je iontoměnič (ionex), tvořený částicemi gelu (syntetické pryskyřice) s navázanými nabitými funkčními skupinami. Na těchto skupinách je kvůli zachování elektroneutrálnosti vázán opačně nabitý ion a tento je na začátku analýzy vyměněn za ionty analytů ze vzorku. Složky dělené směsi jsou pak z kolony eluovány postupně změnou pH a/nebo iontové síly mobilní fáze.



Obr.39: Ionexová chromatografie skupiny.

Ionexy umožňující výměnu kationtů (katexy) mají na nosných částicích navázané silně kyselé sulfonové skupiny  $-\text{SO}_3\text{H}^+$  nebo slabě kyselé skupiny, např. karboxy-, karboxymethyl-, sulfomethyl-, sulfoethyl-, sulfopropyl- nebo fosfo- skupiny. Ionexy umožňující výměnu aniontů (anexy) mají na povrchu navázané silně bazické triethylaminoethylové skupiny nebo slabě bazické aminoethyl-, diethylaminoethyl-, guanidoethyl- apod. skupiny.

Ionexová chromatografie má v klinické biochemii široké využití, umožňuje dělit biologické nízkomolekulární (např. aminokyseliny, nukleotidy) i vysokomolekulární ionty (peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny).

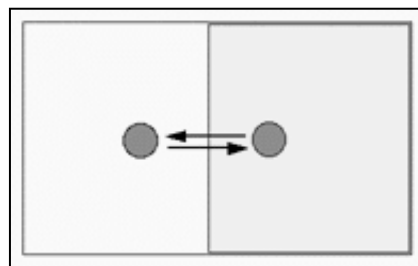
**Rozdělovací chromatografie** je založena na distribuci látek mezi dvě nemísitelné tekutiny, tedy na rozdílech v rozpustnosti složek vzorku v mobilní a stacionární fázi (platí pro kapalinovou chromatografii - LLC) nebo na rozdílu hodnot rozpustnosti složek vzorku ve stacionární fázi (pro plynovou chromatografii - GLC). Jako fáze stacionární slouží kapalina, která může být naadsorbována nebo chemicky navázána na pevném nosiči (např. na vlákněch papíru u papírové chromatografie nebo na nosných částicích u HPLC) nebo nanášena na vnitřním povrchu kapilární kolony (u plynové chromatografie). O pohyblivosti jednotlivých složek dělené směsi rozhoduje rozdělovací koeficient dělených látek mezi oběma fázemi:

$$K = c_{\text{org}} / c_{\text{vod}}$$

K ... rozdělovací koeficient

$c_{\text{org}}$  ... koncentrace rozpuštěné látky v organické fázi

$c_{\text{vod}}$  ... koncentrace rozpuštěné látky ve vodné fázi



Obr.40: Rozdělovací chromatografie

Rozdělovací chromatografie může být plynová (gas-liquid, GLC, zjednodušeně GC) nebo kapalinová (liquid-liquid, LLC, zjednodušeně LC) podle charakteru mobilní fáze. LLC může být ve dvou provedeních – LLC s normální fází (polární tekutina je fází stacionární, méně polární rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel je fází mobilní) nebo s obrácenou (reverzní) fází (stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární – častěji používané provedení).

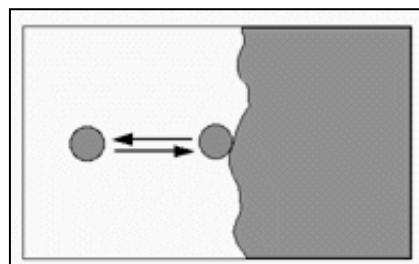
**Adsorpční chromatografie:** Dělení je založeno na rozdílech v adsorpci a desorpci látek analyzované směsi na pevný povrch sorbentu elektrostatickými silami, vodíkovými můstky nebo disperzními silami. Adsorpci popisuje tzv. Langmuirova adsorpční izoterma, vyjadřující závislost množství analytu ve stacionární fázi na koncentraci v mobilní fázi:

$$C_S = w \cdot z \cdot C_M / (1 + w \cdot C_M)$$

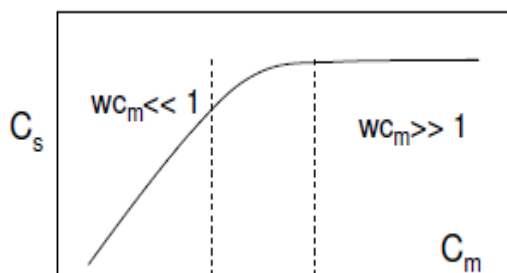
w ... adsorpční koeficient pro daný analyt

z ... počet volných interakčních míst na povrchu

$C_S$ ,  $C_M$ ... koncentrace analytu v obou fázích



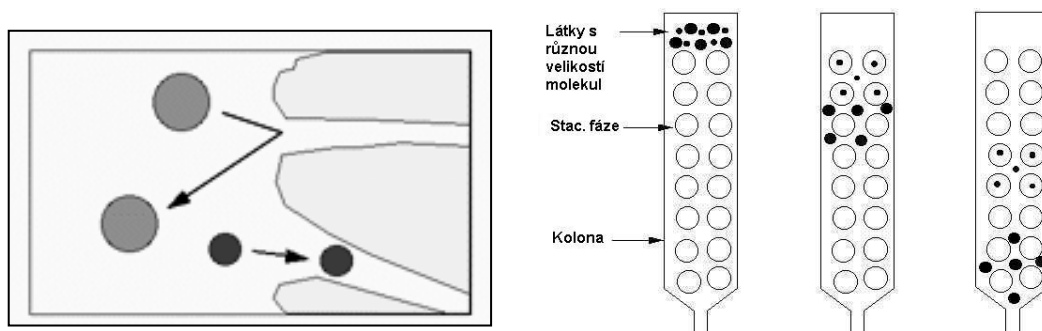
Obr. 41: Adsorpční chromatografie



Obr.42: Grafické znázornění Langmuirovy izotermy:

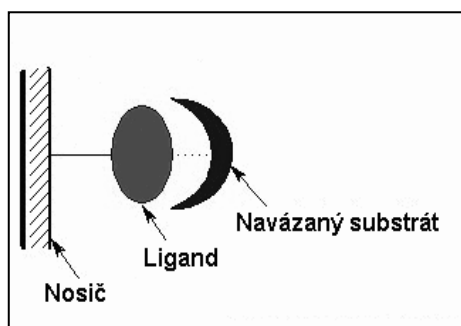
Při nízkých koncentracích analytu v mobil. fázi je závislost  $C_S$  na  $C_M$  lineární, při vysokých koncentracích  $C_M$  dojde k vysycení interakčních míst na povrchu sorbentu a závislost se zakřivuje.

**Gelová permeační chromatografie** umožňuje dělit molekuly podle jejich velikosti a tvaru. Stacionární fázi tvoří gelové částice kulovitěho tvaru, nejčastěji na bázi polysacharidů nebo polyakrylamidu, s póry pokud možno definovaných rozměrů. V mobilní fázi, která protéká kolem těchto kuliček, jsou rozpuštěny dělené látky. Molekuly, jejichž průměr je menší než průměr pórů, difusním pohybem vnikají do vnitřních prostor gelových částic, čímž jsou na koloně zadržovány déle než velké molekuly, které jsou unášeny proudem mobilní fáze a vytékají z kolony dříve.



Obr. 43, 44: *Gelová permeační chromatografie*

**Afinitní chromatografie** využívá specifické interakce molekul. Tyto interakce mohou být biologické povahy (enzym - substrát, enzym - inhibitor, antigen - protilátka, receptor - hormon apod.) nebo biologickou interakcí napodobující (bílkovina - triazinové barvivo, bílkovina - kovové ionty apod.). Jeden z partnerů (tzv. ligand) je pevně navázán na nosič, kterým je naplněna chromatografická kolona. V dělené směsi (mobilní fázi) je přítomna řada molekul, z nichž jen některé mají afinitu k ligandu, naváží se na něj a ostatní složky směsi se z kolony vymyjí. Po promytí kolony se změní složení mobilní fáze tak, aby se oslabila interakce ligand – navázaná molekula, ta se takto z kolony uvolní a získá se v relativně čisté podobě. Bioafinitní chromatografii lze použít k separaci, izolaci a k čištění složek vzorku.



Obr.45: *Afinitní chromatografie*

Pro dělení bílkovin byla vyvinuta moderní chromatografická kolonová technika **Chromatografie s hydrofobní interakcí** (HIC, angl. Hydrophobic Interaction Chromatography). Jako stacionární fáze slouží speciální nosiče nesoucí hydrofobní skupiny, na něž se bílkoviny váží, aniž by byly (na rozdíl od chromatografie s obrácenými fázemi) denaturovány. Při vysoké iontové síle mobilní fáze na začátku chromatografie se bílkoviny váží na stacionární fázi; postupným snižováním iontové síly (sestupný solný gradient) dochází k oslabování hydrofobních interakcí bílkovin s nosičem a k jejich postupné eluci z kolony.

#### 4.2.4. Chromatografie podle složení mobilní fáze

Podle složení mobilní fáze rozeznáváme **izokratické dělení**, kdy mobilní fáze má po celou dobu dělení konstantní složení, a **gradientové dělení** s proměnlivým složením mobilní fáze, kdy se některé složky dělené směsi nejdříve pevně zachytí na stacionární fázi, ostatní složky

se mobilní fází vymyjí, poté se náhle nebo postupně (gradientem) mění složení mobilní fáze a zachycené látky se postupně z kolony vymývají).

#### 4.2.5. Chromatografie podle účelu

**Preparativní chromatografie** je používána pro přípravu většího množství čistých molekul (např. příprava proteinů nebo protilátek afinitní chromatografií atd.).

**Analytická chromatografie** slouží pro určení identity a koncentrace látek ve směsi. Následující text se týká chromatografie analytické.

#### 4.2.6. Přehled chromatografických technik

planární	papírová	rozdělovací
	tenkovrstvá TLC	tenkovrstvá rozdělovací (SF kapalina) tenkovrstvá adsorpční (SF pevná látka)
kolonová	plynová GC	plynová rozdělovací GLC (SF kapalina) plynová adsorpční GSC (SF pevná látka)
		kapalinová LC

SF...stac.fáze

#### 4.3. Planární chromatografie

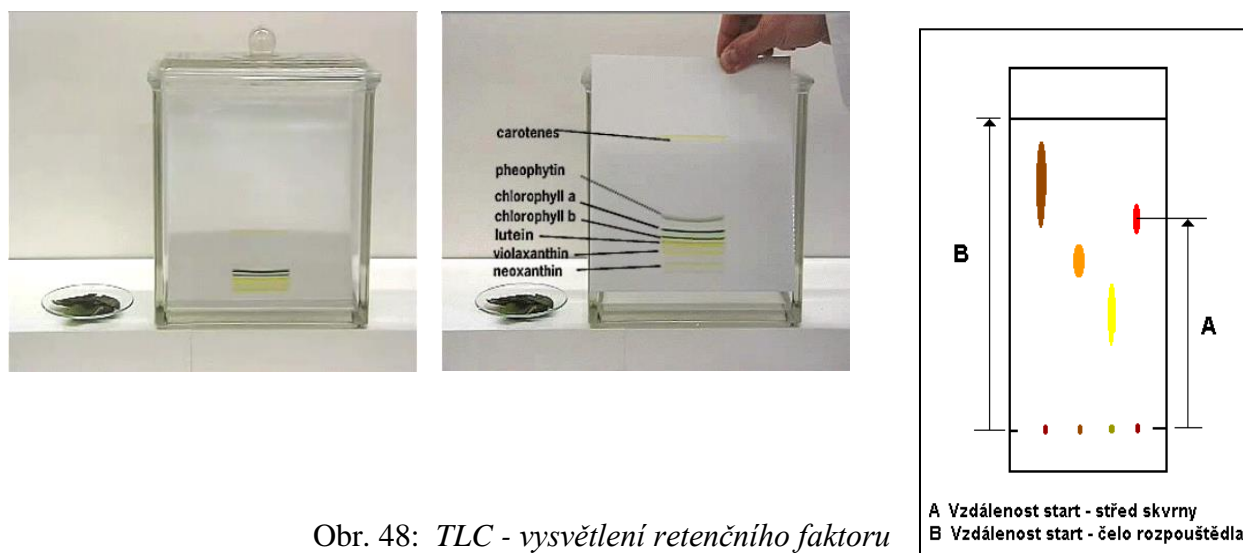
Dělení látek probíhá na plošném povrchu stacionární fáze. Vzorky jsou nasazeny na startovací pozici blízko okraje pruhu papíru nebo TLC destičky ve formě malých kapek nebo tenkých čar. Papír nebo destička jsou pak umístěny do uzavřené skleněné nádoby (chromatografické vany) tak, aby spodní konec nosiče byl ponořen do mobilní fáze pod úroveň startovací linie (papírová chromatografie umožňuje i sestupné uspořádání, kdy je papír v chromatografické vaně zavěšen ve žlábků s mobilní fází). Mobilní fáze v důsledku kapilárních sil migruje přes stacionární fázi a unáší s sebou složky směsi v závislosti na jejich afinitě ke stacionární fázi. Až mobilní fáze doputuje do požadované vzdálenosti, chromatogram je vyjmut z nádoby a usušen. Skvrny separovaných složek jsou pak podle potřeby různým způsobem vizualizovány, např. osvětlením UV světlem (pokud byla stacionární fáze „obarvena“ fluorescenčním indikátorem, projeví se UV absorbující látky jako tmavé skvrny na svítícím pozadí), fluorescenčně nebo nejčastěji přestříkáním chromatogramu vhodným barvotvorným činidlem. Charakteristikou látky je **retenční faktor  $R_f$** , jehož hodnota je pro dané uspořádání experimentu stálá:

$$R_f = A / B \quad A \dots \text{vzdálenost start – střed skvrny} \quad B \dots \text{vzdálenost start – čelo rozpouštědla}$$

V praxi jsou planární techniky používány většinou jako metody kvalitativní nebo semikvantitativní s vizuálním hodnocením, skvrny dělených látek se hodnotí srovnáním se skvrnami standardů chromatografovaných na témže nosiči. U HPTLC připadá v úvahu kvantitativní hodnocení pomocí denzitometru.

Dokonalejší separace lze dosáhnout pomocí dvourozměrné TLC: Vzorek na TLC desce se vyvíjí první mobilní fází, po usušení se destička otočí o  $90^\circ$  a vyvíjí druhou mobilní fází. Výsledkem je dvourozměrný obrázek rozložení skvrn.

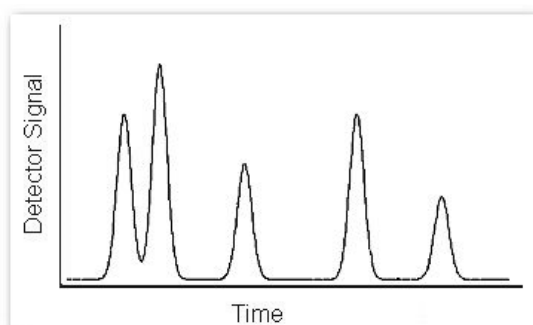
Obr.46, 47: TLC – dělení barviv (<http://www.demochem.de/Grafik/TLC2.gif>)



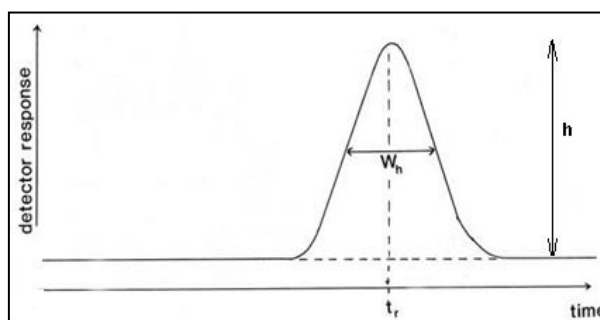
Obr. 48: TLC - vysvětlení retenčního faktoru

#### 4.4. Kolonová chromatografie

V GC a LC mobilní fáze s eluovanými látkami opouští kolonu a prochází přes vhodný detektor, kde produkuje elektronický signál. Signál je graficky zaznamenán jako funkce času, případně objemu, eluované analyty jsou graficky znázorněny jako série vrcholů (píků). Takovýto výstup se nazývá **chromatogram**, data reprezentovaná chromatogramem slouží k identifikaci a kvantifikaci analytů.



Obr. 49: Vzor chromatogramu



Obr. 50: Popis chromatografického vrcholu:  
 $t_r$ ...retenční čas,  $w_h$ ...šířka píku v polovině výšky,  
 $h$ ...výška

Kvalitativní charakteristikou analytu je retenční čas  $t_r$  (doba, za kterou analyt projde z dávkovače přes kolonu do detektoru), kvantifikace analytu probíhá na základě plochy případně výšky píku.

#### 4.4.1. Termodynamika a kinetika separace

Při postupu vzorku kolonou se jednotlivé složky vzorku (analyty) separují, tj. dospějí do detektoru v různých retenčních časech. Zároveň se zóny jednotlivých analytů postupně rozšiřují.

**Termodynamika separace** se zabývá vlivy, které ovlivňují velikost interakce mezi stacionární fází a analytem, zadržování (retenci) a zpoždování (retardaci) analytů, rychlost migrace analytů kolonou, rozdíl v retenčních časech analytů a dělení analytů od sebe navzájem. **Kinetika separace** studuje vlivy, které ovlivňují rozmývání zón analytů během postupu kolonou, tj. šířky píků na chromatogramu. Termodynamika a kinetika spolu úzce souvisí a obě určují, jak dokonale budou zóny sousedních analytů odděleny.

##### Základní pojmy a vztahy:

$V_s$  (ml)...objem stacionární fáze kolony

$V_m$  (ml)...objem mobilní fáze v koloně

$L$  (cm)...délka kolony

$F_m$  (ml/min)...objemový průtok mobilní fáze

$u$  (cm/min)...lineární rychlost mobilní fáze při průtoku kolonou;  $u = L / t_M$

$V_{R,i}$  (ml)...retenční objem i-tého analytu (objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony);  $V_{R,i} = F_m \cdot t_{R,i}$

$t_{R,i}$  (min)...retenční čas i-tého analytu (celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně)

$V_M$  (ml)...mrtvý objem kolony (objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony)

$t_M$  (ml)...mrtvý čas kolony (retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze)

$V'_{R,i}$  (ml)...redukovaný retenční objem i-tého analytu;  $V'_{R,i} = V_{R,i} - V_M$

$t'_{R,i}$  (min)...redukovaný retenční čas i-tého analytu (čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi);  $t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$

Pozn.: Všechny analyty stráví v mobilní fázi stejný čas – mrtvý čas kolony

**Distribuční (rozdělovací) konstanta  $K_{D,i}$**  vyjadřuje poměr koncentrací složky ve dvou fázích:

$$K_{D,i} = \frac{(c_i)_s}{(c_i)_m} = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s}$$

$(c_i)_s, (c_i)_m$ ...koncentrace i-tého analytu ve stacionární a mobilní fázi ( $c = n / V$ )

$(n_i)_s, (n_i)_m$ ...látkové množství i-tého analytu ve stacionární a mobilní fázi

**Kapacitní faktor (retenční faktor, kapacitní poměr)  $k_i$**  vyjadřuje poměr látkového množství složky ve stacionární a mobilní fázi:

$$k_i = \frac{(n_i)_s}{(n_i)_m} = K_{D,i} \cdot \frac{V_s}{V_m}$$

Kapacitní faktor  $k_i$  lze zjistit přímo z chromatogramu jako poměr doby, kterou stráví složka vzorku ve stacionární fázi, k době, kterou stráví v mobilní fázi (kolikrát déle je složka vzorku zadržována stacionární fází, než by byla doba jejího transportu kolonou rychlostí toku mobilní fáze):

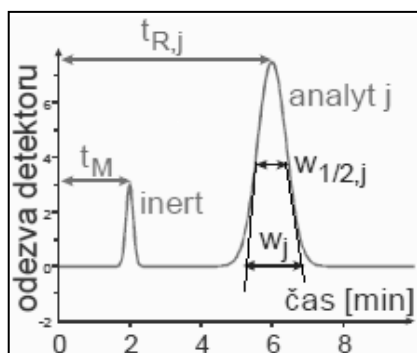
$$k_i = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} = \frac{t'_{R,i}}{t_M} \qquad k_i = \frac{V_{R,i} - V_M}{V_M} = \frac{V'_{R,i}}{V_M}$$

Distribuční (rozdělovací) konstanta a kapacitní faktor (kapacitní poměr) jsou pojmy termodynamické a charakterizují **selektivitu kolony**, tj. jak se analyty na koloně zadržují a zpožďují.

Základní rovnice chromatografie (platí hlavně pro chromatografii rozdělovací):

$$V_{R,i} = V_M + K_{D,i} \cdot V_S \qquad V'_{R,i} = K_{D,i} \cdot V_s$$

$$t_{R,i} = \frac{V_{R,i}}{F_m} = \frac{V_m + K_{D,i} \cdot V_s}{F_m} \qquad t'_{R,i} = \frac{V'_{R,i}}{F_m} = \frac{K_{D,i} \cdot V_s}{F_m}$$



Obr.51: Popis chromatografického píku

$t_{R,j}$ ...retenční čas j-tého analytu

$t_M$ ...mrtvý čas kolony (retenční čas nezadržovaného analytu)

$w_{1/2,j}$ ...šířka píku j-tého analytu v polovině výšky

$w_j$ ...šířka píku j-tého analytu při základně (vytyčená oběma tangentami v inflexních bodech)

Pozn. Šířka píku se udává v délkových nebo časových jednotkách

Zóny dělených analytů se během postupu kolonou rozšiřují v důsledku difúze. **Účinnost kolony** charakterizuje, jak moc se zóny separovaných látek rozšiřují. Mírou účinnosti kolony je

a) **počet teoretických pater** dané kolony - **n**

$$n = 16 \cdot \left( \frac{t_{R,j}}{w_j} \right)^2 \qquad w_j \dots \text{šířka píku analytu při základně}$$

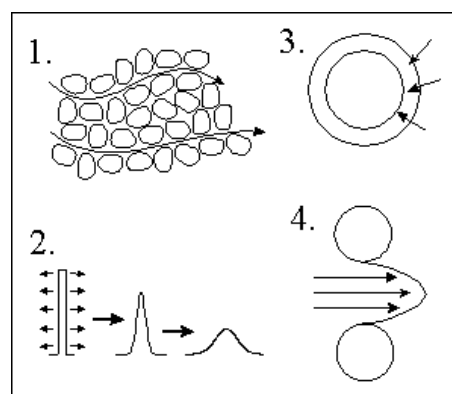
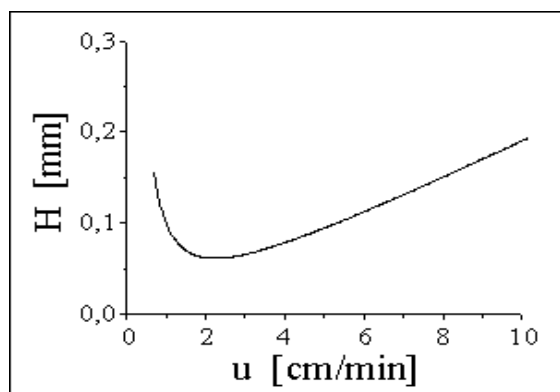
b) **výškový ekvivalent teoretického patra** – **H** (mm)

$$H = \frac{L}{n} = \frac{L}{16} \cdot \left( \frac{w_j}{t_{R,j}} \right)^2 \qquad L \dots \text{délka kolony}$$

Výškový ekvivalent teoretického patra (H) závisí na lineární rychlosti mobilní fáze (u). Závislost vyjadřuje **Van Deemterova rovnice**:

$$H = A + B / u + C \cdot u$$

**A**...vířivá difúze, **B**...podélná molekulární difúze, **C**...odpor proti přenosu hmoty ve stac. a mobilní fázi



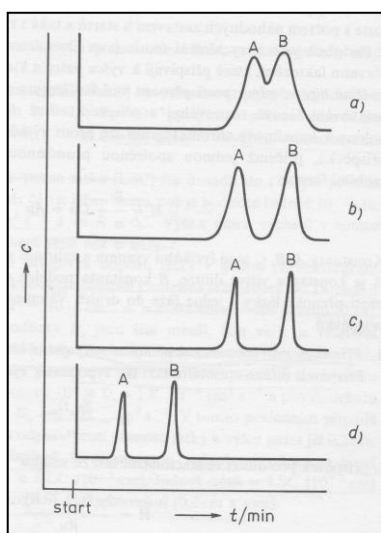
Obr.52: Grafické znázornění Van Deemterovy rovnice Obr.53: Vysvětlení difúze



Pozn. k obrázku 53:

1. Vířivá difúze – efekt toho, že různé molekuly urazí při pohybu kolonou různé vzdálenosti. Vířivá difúze (tj. člen A ve Van Deemterově rovnici) je úměrná velikosti částic stac.fáze, projevuje se hlavně u HPLC
2. Podélná molekulární difúze - molekuly putují z místa o vyšší koncentraci do místa s nižší koncentrací
3. Odpor proti přenosu hmoty ve stac. fázi (různé molekuly difundují různě hluboko do stacionární fáze) – závisí na typu stac.fáze, projevuje se hlavně u plynové chromatografie
4. Odpor proti přenosu hmoty v mobilní fázi (rychlostní profil mobilní fáze uvnitř kanálku je parabolický)

Cílem je dosáhnout minimální hodnoty H, tedy maximálního počtu teoretických pater dané kolony a tím její maximální účinnosti. Minimum Deemterovy křivky tedy odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které daná kolona vykazuje největší účinnost a tedy minimálně rozšiřuje zóny analytů.



Obr.54: *Optimalizace rozlišení látek A, B* (přejato ze Zýka a kol.:

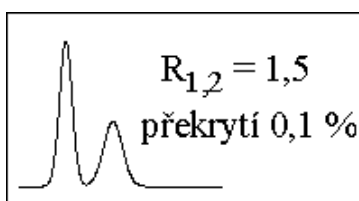
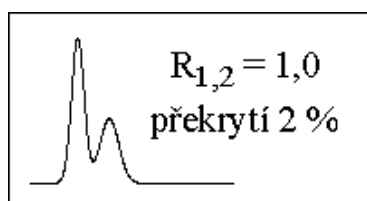
Analytická příručka 1.díl, 3.vydání, Praha 1979, SNTL)

- a) Špatné rozlišení
- b) Dobré rozlišení změnou termodynamických faktorů (př. změna mobilní fáze)
- c) Zlepšení účinnosti kolony oproti b) změnou kinetických faktorů (př. použití delší kolony tj. zvýšení počtu teoretických pater, nebo kolonu s menším průměrem částic apod.)
- d) Téměř stejné rozlišení jako u c), ale v kratší době (zvýšení průtokové rychlosti mobilní fáze)

**Rozlišení R** je mírou chromatografické separace. Pro dobré rozdělení dvou sousedních analytů (pro minimalizaci jejich překryvu) je nutné, aby analyty měly dostatečně rozdílné retenční časy a aby byly jejich zóny dostatečně úzké.

$$R_{i,j} = \frac{2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})}{w_i + w_j} = \frac{2 \cdot \Delta t_R}{w_i + w_j} \quad R_{i,j} \dots \text{rozlišení } i\text{-tého a } j\text{-tého analytu}$$

V případě hodnoty rozlišení menší než 0,8 je separace nedostatečná, zatímco dobré separace až na základní linii je dosaženo při hodnotách rozlišení nad 1,25.



Obr.55: *Rozlišení píků*

Rozlišení lze vyjádřit i pomocí termodynamických ( $\alpha_{j,i}$ ,  $k_j$ ) a kinetických ( $n$ ) parametrů:

$$R_{i,j} = \frac{\sqrt{n}}{4} \cdot \frac{\alpha_{j,i} - 1}{\alpha_{j,i}} \cdot \frac{k_j}{1 + k_j}$$

$R_{i,j}$ ...rozlišení dvou sousedních analytů,  $n$ ...počet teoretických pater kolony,  
 $k_j$ ...kapacitní (retenční) faktor j-tého analytu,  $\alpha_{j,i}$ ...separační faktor:  $\alpha_{j,i} = k_j / k_i = K_{D,j} / K_{D,i}$   
 Počet teoretických pater  $n$  lze ovlivnit změnou rychlosti mobilní fáze, délkou kolony nebo velikostí částic náplně. Separací faktor  $\alpha$  lze ovlivnit změnou mobilní a/nebo stac. fáze. Kapacitní (retenční) faktor ovlivní změna množství stacionární fáze, teplota nebo změna mobilní a/nebo stacionární fáze.

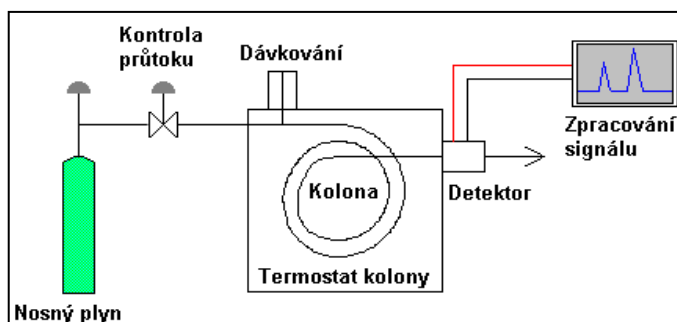
#### 4.4.2. Plynová chromatografie, GC

Mobilní fází unášející směs těkavých analytů přes stacionární fází v koloně je tzv. nosný plyn (nejčastěji inertní plyn - dusík, helium, argon). Separace u GC je založena na rozdílech tlaku par analytů a interakcích se stacionární fází; těkavější analyty se tedy pohybují kolonou rychleji než analyty méně těkavé a navíc analyty interagující se stacionární fází procházejí kolonou pomaleji než analyty se slabší interakcí. U GSC chromatografie je touto interakcí adsorpce analytů na pevný povrch náplně kolony. GLC používá jako stacionární fází netěkavou kapalinu zakotvenou na částicích náplně nebo přímo na vnitřním povrchu kapilární kolony a separace probíhá na základě rozdělení mezi plynnou mobilní fází a kapalnou stacionární fází.

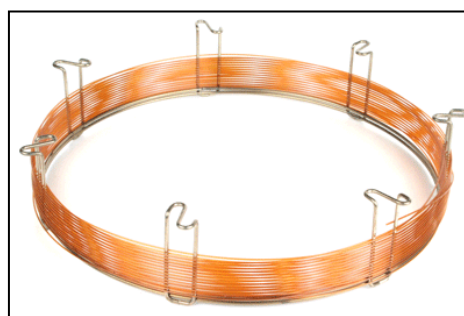
Nosný plyn unáší separované analyty z kolony do detektoru. Analyty jsou identifikovány podle retenčního času (v případě GC s hmotnostní spektrometrií i podle hmotnostního spektra), kvantifikace se provádí na základě velikosti chromatografického píku (plochy, případně výšky), která je úměrná množství detegovaného analytu.

##### 4.4.2.1. Plynový chromatograf

Plynový chromatograf se skládá z několika základních částí - chromatografické kolony pro separaci analytů, zdroje mobilní fáze a zařízení pro kontrolu průtoku nosného plynu systémem, dávkovače pro nanesení analytu (nebo chemicky derivatizovaného analytu) na kolonu, termostatu (pece) pro regulaci teploty kolony, on-line detektoru pro detekci separovaných analytů vycházejících z kolony a PC pro kontrolu systému a vyhodnocení dat.



Obr.56: Plynový chromatograf



Obr.57: GC kapilární kolona

#### Chromatografická kolona

Pro GC se používají dva hlavní typy kolon - náplňové a kapilární. Starším typem jsou **náplňové kolony**. Mají podobu trubice naplněné nosnými částicemi, které jsou samy o sobě stacionární fází (GSC - modifikovaný silikagel, aktivní uhlí, alumina, molekulové síto) nebo

jsou stacionární fázi potaženy (GLC). Vnitřní průměr náplňových kolon je 1 - 4 mm, délka 1 m a více, jsou vyrobeny ze skla nebo nerez oceli. Užší kolony jsou účinnější, mají však menší kapacitu pro vzorek. Účinnost kolony se zvyšuje i s její délkou; delší kolony však vyžadují zvýšené tlaky nosného plynu. V dnešní době je používání náplňových kolon téměř minulostí a přednost dostávají kolony kapilární.

**Kapilární kolony** známé i jako WCOT (wall-coated open tubular column) jsou připraveny potažením vnitřního povrchu kapiláry z křemenného skla tenkým filmem stacionární fáze. Kapiláry čistě z křemenného skla by byly velmi křehké, proto jsou na povrchu potaženy polyimidem, což jim dodává pevnost a pružnost (je možné je svinout do cívky). Vnitřní průměr kapilárních kolon je obvykle 0,1 - 0,5 mm, délka 10 - 150 m. Kapilární kolony jsou velmi účinné, mají však malou kapacitu vzorku. Dostupné jsou i GC mikrokolony na bázi silikonového čipu (např. firma Agilent). Existuje velký výběr stacionárních fází pro GLC - methylsilikonové polymery, substituované silikonové polymery, silikonové polyestery apod. Tyto materiály jsou nanášeny nebo chemicky navázány na vnitřním povrchu kapilární kolony.

### **Zdroj nosného plynu a systém kontroly průtoku**

Jako nosný plyn může sloužit např. helium, argon, dusík, vodík. Volba nosného plynu závisí na typu kolony a detektoru; např. pro kapilární kolony ve spojení s hmotnostním detektorem se dává přednost heliu, pro náplňové kolony a starší typy detektorů (plamenově ionizační, termovodivostní atd.) se často používal dusík. Nosný plyn musí být velmi čistý a suchý, protože nečistoty poškozují kolonu a snižují citlivost některých detektorů. Z tohoto důvodu se za zdroj plynu umísťují trubice plněné molekulovým sítem pro odstranění vlhkosti, uhlovodíků a kyslíku z nosného plynu.

Pro získání reprodukovatelných retenčních časů je nutná řízená rychlost průtoku nosného plynu. Regulace průtoku plynu z tlakové nádoby se provádí různými způsoby, od jednoduchých zařízení typu jehlového ventilu u starších přístrojů po programovatelné elektronické regulační systémy. Analýzy mohou probíhat za konstantního průtoku nebo konstantního tlaku. Rychlost průtoku nosného plynu závisí na typu kolony (náplňové kolony využívají průtok 10 - 60 ml/min, kapilární kolony pouze 1 - 2 ml/min s velkými nároky na stabilitu)

### **Dávkovač**

Úkolem dávkovacího zařízení je vnést alikvot vzorku (objem řádově v  $\mu\text{l}$ ) do kolony tak, aby byl co nejméně narušen průtok nosného plynu kolonou. V praxi jsou vzorky rozpuštěny v organickém rozpouštědle a dávkovány injekční jehlou přes tzv. septum (těsnění, které slouží jako interface mezi dávkovačem a chromatografickým systémem). Injekční jehla propíchně septum a pronikne do vyhřívaného prostoru, kde jsou těkavé analyty i rozpouštědlo ihned převedeny do plynné fáze a vneseny do kolony nosným plynem.

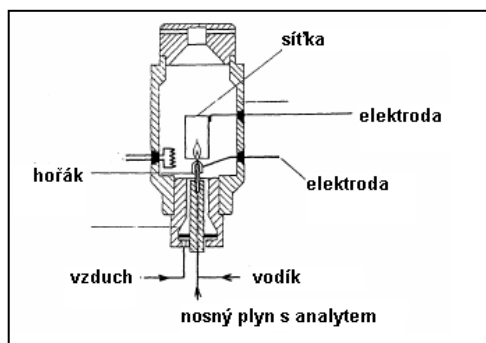
Pro kapilární kolony, které mají na rozdíl od náplňových kolon nízkou kapacitu pro vzorek, se používá split - splitless technika dávkování vzorku na kolonu. Při split módu vstupuje do kolony pouze malá část zplyněného vzorku, zatímco při splitless módu vstupuje do kolony většina vzorku. Split mód se používá pro vzorky, které obsahují relativně vysoké koncentrace sledovaných analytů.

### **Kontrola teploty**

Náplňové i kapilární kolony vyžadují přesnou regulaci teploty; té se dosahuje umístěním kolony do pece s odporovým vyhříváním. Kolona může mít během celé analýzy konstantní nastavenou teplotu, nebo teplota může programovatelně stoupat v závislosti na čase. Pro většinu klinických aplikací se používá druhý způsob, což výrazně zkracuje dobu analýzy.

## Detektory

Pro GC je možné použít řadu detektorů, od univerzálních, které detegují většinu analytů, po detektory selektivní, často se kombinují dva a více detektorů.



**Plamenově ionizační detektor** (flame ionization detector, FID) je univerzálním detektorem pro GC. Efluent z kolony je smísen s vodíkem a vzduchem a eluované analyty jsou spáleny v plameni. V plameni dochází k ionizaci a vzniklé ionty zvyšují vodivost plamene. Velikost produkovaného signálu je úměrná množství organické látky procházející detektorem.

Obr.58: *Schema plamenově ionizačního detektoru*

**NPD (nitrogen – phosphorus detector)** je modifikací FID, kdy je nad plamen umístěna elektricky vyhřívaná kulička soli alkalického kovu (Rb nebo Cs). Přítomnost iontů alkalického kovu v plameni zvyšuje signál pro analyty obsahující dusík a fosfor.

**Fotoionizační detektor** (photoionization detector, PID) je rovněž modifikací FID, kdy ionizace je namísto plamene dosahováno intenzivním UV zářením. Detektor má nízké meze detekce pro UV absorbující látky.

**Termovodivostní detektor** (thermal conductivity detector, TCD) je založen na tom, že v přítomnosti analytu v nosném plynu se zvyšuje tepelná vodivost plynu. Jedná se o univerzální jednoduchý detektor, ovšem s horší citlivostí.

**Detektor elektronového záchytu** (electron capture detector, ECD) je selektivní detektor pro organické sloučeniny obsahující elektronegativní skupiny. Dochází v něm ke snížení ionizace nosného plynu (radioaktivním  $\beta$ -zářičem) v důsledku vychytávání elektronů z  $\beta$ -zářiče elektronegativními skupinami.

Před uvedenými detektory se v současné době pro klinické analýzy dává přednost detekci **hmotnostní spektrometrií**, které bude věnována následující kapitola.

## Počítač

Celý chromatografický proces (složení a průtok mobilní fáze, tlak, teplota jednotlivých kompartmentů, dávkování) je řízen počítačem, který zároveň monitoruje signál generovaný detektorem, ukládá data, vyhodnocuje koncentrace analytů na základě plochy (výšky) odpovídajících píků na chromatogramu, případně vytváří reporty chromatografických analýz.

Pozn.: Mezi největší **výrobce přístrojů pro GC** patří např. Agilent Technologies, Thermo Fischer, Perkin-Elmer, Shimadzu, Analytical Science, Sigma-Aldrich Supelco, SRI Instruments, DANI Instrument a další.

### 4.4.2.2. Příprava vzorků pro GC analýzu

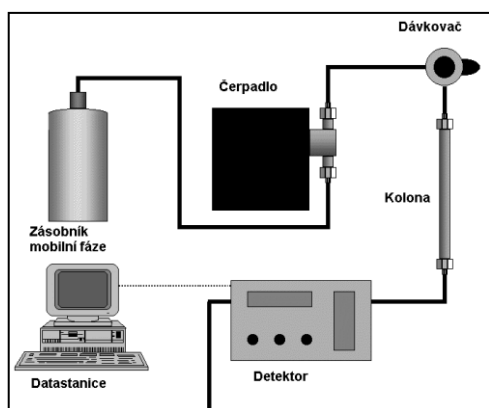
Před GC analýzou je často nutné sledované analyty ze vzorku biologického materiálu vyextrahovat do organického rozpouštědla a poté chemicky derivatizovat - mnoho klinicky významných látek je totiž netěkavých a chemická modifikace nebo derivatizace zvýší jejich těkavost pro GC analýzu. Zvýšení jejich těkavosti lze dosáhnout acylací, silylací, esterifikací nebo oximací.

### 4.4.3. Kapalinová chromatografie

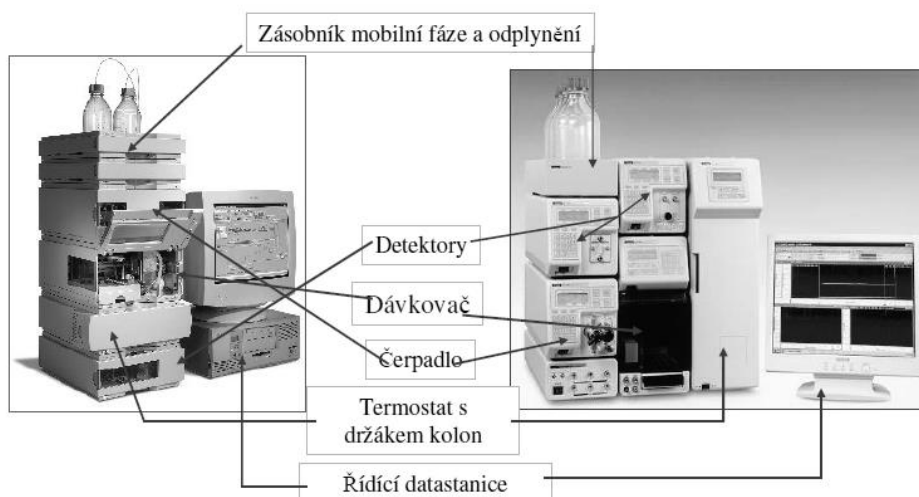
Separace při LC je založena na rozdělení látek mezi kapalnou mobilní fází a fází stacionární. Pokud jsou jako nosič použity částice malého průměru (5  $\mu\text{m}$ ), technika se nazývá high performance liquid chromatography (HPLC). Protože tato technika vyžaduje relativně vysoké tlaky v systému kvůli zajištění dostatečného průtoku mobilní fáze kolonou naplněnou malými částicemi, někdy se o HPLC mluví jako o vysokotlaké chromatografii (high pressure liquid chromatography). HPLC je v klinické laboratoři nejrozšířenější formou LC.

#### 4.4.3.1. Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf obsahuje několik základních částí: kolonu pro separaci analytů, zásobníky rozpouštědel (mobilní fáze), čerpadla pro zajištění průtoku mobilní fáze systémem, dávkovač pro nanesení vzorku na kolonu, on-line detektor pro detekci separovaných analytů eluovaných z kolony, PC pro kontrolu systému, sběr a vyhodnocení dat.



Obr.59: *Schema kapalinového chromatografu*



Obr.60 : *HPLC*

Na rozdíl od přístrojů pro GC mohou být HPLC přístroje nejen kompletně integrované, ale i modulární (viz obr. 60), kdy uživatel může kombinovat jednotlivé moduly, a to i od různých výrobců, pokud jsou kompatibilní a je možné je ovládat softwarově jako jednotný systém.

### **Chromatografické kolony:**

Pro HPLC se používají náplňové i kapilární kolony.

Moderní **náplňové kolony** se vyrábějí v různých rozměrech, s tendencí ke kolonám s malým vnitřním průměrem a malým vnitřním objemem, protože tyto mají vyšší účinnost, nižší limit detekce a vyžadují malé objemy mobilní fáze. Analytické HPLC kolony pro klinické aplikace jsou většinou trubice z nerez oceli s vnitřním průměrem 0,1 - 5 mm o délce 50 - 250 mm, vrstva náplně (částice kulovitěho tvaru o různé velikosti a pórovitosti) je na obou koncích udržována vloženou fritou. Vyrábí se i tzv. nanobore kolony s vnitřními průměry 25 - 100  $\mu\text{m}$  nebo open-tubular kolony s průměry pod 25  $\mu\text{m}$ , dostupné jsou i analytické HPLC čipy.

**Částice náplně** mají průměr 1,8 - 10  $\mu\text{m}$ ; obecně čím menší jsou částice náplně, tím větší je účinnost kolony (ale tím větší je i odpor vrstvy náplně proti pohybu mobilní fáze - zpětný tlak LC kolony je nepřímo úměrný druhé mocnině průměru částic náplně). Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze takovou kolonou jsou třeba relativně vysoké tlaky v systému, proto se používají spíše kratší kolony, u nichž se nedosahuje kritických hodnot zpětných tlaků.

Částicových náplní LC kolon je několik typů: náplně s navázanou fází, polymerní, chirální nebo tzv. restricted access.

U **náplní s navázanou fází** (bonded phase packing) je stacionární fáze chemicky navázána na povrch částic silikagelu. Tento typ náplně je dostupný pro IEC a pro HPLC s normální i obrácenou (reverzní) fází. Pro HPLC s normální fází jsou funkční skupiny stacionární fáze relativně polární (např. silanol-, amino- nebo nitrilové skupiny), mobilní fáze je nepolární rozpouštědlo (typicky hexan). Častěji používaná HPLC s reverzní fází vyžaduje nepolární stacionární fázi. Nejpoužívanější je tzv. C18 fáze (oktadecylsilanové skupiny navázané na částicích silikagelu), mobilní fází jsou často vodné pufrů ve směsi s polárním organickým rozpouštědlem (metanol, acetonitril). Náplně na bázi silikagelu mají nižší pH odolnost (pH 2 - 8).

Dalším typem náplní jsou **polymerní náplně**, kdy jsou na povrchu částic grafitizovaného uhlíku nebo smíšeného kopolymeru (polystyren - divinylbenzen) navázány skupiny C4, C8, C18 (uhlovodíkové zbytky) nebo ionexové skupiny. Chromatografické charakteristiky polymerních náplní jsou zcela srovnatelné s náplněmi na bázi silikagelu, jsou však odolnější v širším rozmezí pH (pH 2 - 13).

**Chirální náplně** se používají pro separaci enantiomerů (dvojic optických izomerů se zrcadlovým uspořádáním molekuly), např. enantiomerů léků.

**Restricted-access náplně** (s omezeným přístupem) umožňují přímou analýzu biologických směsí s vysokým obsahem proteinů, což výrazně usnadňuje přípravu vzorku. Vnější povrch nosných částic náplní je opatřen hydrofilní vrstvou, kterou mohou pronikat menší molekuly (např. léky) do pórů částice. Póry jsou potaženy hydrofobní stacionární fází, na které probíhá vlastní dělení. Velké molekuly proteinů neprocházejí do vnitřních pórů a obtékají částice náplně.

Kromě kolon s částicovou náplní existují i tzv. **monolitické kolony**. Taková kolona je zcela vyplněna polymerem o definované pórovitosti organického původu (styren - divinylbenzen, metakrylát aj.), nebo anorganického původu (na bázi silikagelu). Materiál kolony je zpravidla vytvořen polymerací přímo v trubici (monomer + porogenní složka + iniciátor polymerace), obsahuje dva typy pórů - mikropóry pro zajištění permeability kolony a větší póry tvořící velký povrch pro interakci s analyty. Monolitické kolony mají vysokou účinnost a nízké zpětné tlaky.

**Kapilární kolony pro LC** se připravují jako kapiláry z křemičitého skla s vnějším povrchem potaženým polyimidem (pro dostatečnou pevnost a pružnost kolony) a tenkým filmem

stacionární fáze na jejich vnitřním povrchu. Jejich rozměry se pohybují mezi 0,1 - 1 mm vnitřního průměru a 10 - 50 cm délky.

K ochraně kolony před ireverzibilní adsorpcí proteinů ze vzorku, která snižuje rozlišení a životnost kolony, se mezi dávkovač a kolonu vřazuje **předkolona**. Předkolona je naplněna stejnou nebo podobnou stacionární fází jako analytická kolona, váže na sebe proteiny a tak prodlužuje životnost analytické kolony. Po určitém počtu analýz se předkolona vyměňuje.

### **Zásobníky s mobilními fází**

Jako zásobník mobilní fáze slouží v nejjednodušší formě skleněné lahve s přívodními hadičkami k čerpadlům, opatřené filtry pro odstranění nečistot.

Mobilní fáze musí být připraveny z čistých rozpouštědel určených pro chromatografii (HPLC grade) a před použitím musí být přefiltrovány přes membránový filtr pro odstranění případných pevných částic. Mobilní fáze musí být také zbaveny rozpuštěných plynů, neboť tyto by se uvolňovaly při přechodu mobilní fáze z natlakované kolony do prostředí s normálním tlakem za kolonou a působily nestabilní signál detektoru. Za zásobníky fází v přístrojích jsou za tímto účelem vřazeny vakuové degassery (odplyňovače).

### **Čerpadla**

Čerpadla zajišťují reprodukovatelný konstantní a bezpulzní průtok mobilní fáze chromatografickým systémem. Pro dosažení optimálních průtoků (0,5 – 2 ml/min pro běžné náplňové kolony) je nutno v systému vyvinout vysoké tlaky 200 – 250 bar (1 bar =  $10^5$  Pa = 1,02 atm = 14,5 psi), protože kolony s velikostí částic 10  $\mu$ m a menší kladou velký odpor.

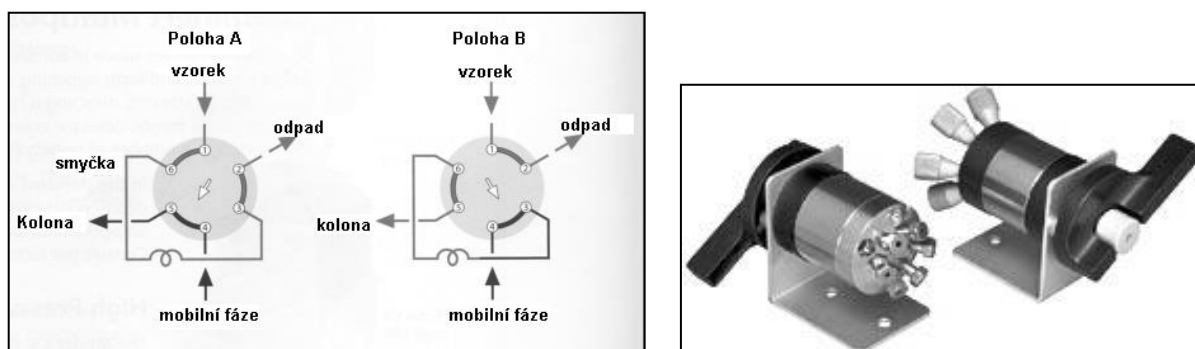
Pro malé průtoky lze použít tzv. lineární dávkovač – bezpulzní čerpadlo, které pracuje podobně jako velká rovnoměrně vyprazdňovaná injekční stříkačka. Nejčastěji se však používají pulzní pístová dvojjúčinná (reciproká) čerpadla, jejichž činnost je fázově posunutá pro minimalizaci pulzů. Příslušenstvím těchto pulzních čerpadel je tlumič pulzů na principu svinuté odporové kapiláry nebo jsou pulzy redukovány změnou rychlosti pohybu pístů čerpadla v počáteční a závěrečné fázi sání a výtlačky.

HPLC čerpadla mohou pracovat v módu izokratickém (složení mobilní fáze zůstává konstantní během celé analýzy) nebo gradientovém (složení mobilní fáze se s časem mění), kdy jsou až čtyři složky mobilní fáze programovatelně směřovány pomocí gradientového dávkovacího ventilu.

### **Dávkovací zařízení**

Nejčastěji používaným dávkovacím zařízením je šesticečný ventil s vyměnitelnou smyčkou, která může mít objem od desítek nanolitřů po mililitry. V plnicí pozici (poloha A) se nasaje vzorek ze vzorkové nádoby (tzv. vialky) dávkovací injekční stříkačkou do smyčky, otočením ventilu do polohy B je obsah smyčky vnesen do proudu mobilní fáze. Dávkovací ventil je přesný, pracuje při vysokých tlacích a jeho činnost je možné programovat při použití v samplerech automatických systémů.

Používají se i dávkovače s děličem (obdobu splitovacího zařízení v GC) nebo dávkovače s možností smísení vzorku s derivatizačním činidlem před nadávkováním na kolonu.



Obr. 61, 62: Šesticestný dávkovací ventil

## Detektory

Pro HPLC se používají detektory pracující na různých principech. Každý typ detektoru (s výjimkou hmotnostního, jehož princip bude uveden v kapitole o hmotnostní spektrometrii) obsahuje průtokovou celu, kterou protéká eluát z kolony. Separované analyty obsažené v eluátu jsou zde detegovány a generovaný elektronický signál je zaznamenán ve formě chromatogramu.

**Fotometry a spektrofotometry** měří absorpenci UV a VIS záření látkami vycházejícími z kolony. Jsou široce využívány, protože většina organických látek vykazuje absorpci UV záření (některé absorbují dokonce i ve viditelné oblasti).

**Detektory s fixní vlnovou délkou** využívají intenzivní linii rtuťové výbojky o vlnové délce 254 nm, tyto detektory jsou velmi citlivé. U fotometrů se dvěma vlnovými délkami (254 nm a 280 nm) se mezi Hg výbojku a průtokovou komoru vkládá fosforová destička, která po excitaci světlem 254 nm emituje fluorescenční záření s vlnovou délkou 280 nm jako druhý zdroj světla.

**Detektory s variabilní vlnovou délkou** mohou měřit při zvolené vlnové délce z rozmezí již od 190 nm do 400 nm (případně 600 nm). V krátkovlnné oblasti spektra absorbuje i mnoho rozpouštědel, které tedy nelze použít jako mobilní fázi. V HPLC s reverzní fází často používaná rozpouštědla acetonitril a metanol však absorbují při 200 nm pouze minimálně.

**Detektory diodového pole** jsou schopné měřit v celé oblasti 190 – 600 nm. U tohoto typu detektoru prochází průtokovou kvyetou polychromatické světlo. Prošlé světlo je za kvyetou rozděleno difrakční mřížkou a nasměrováno na diodové pole, které registruje intenzitu světla všech vlnových délek (každá dioda registruje jednu vlnovou délku).

**Fluorometry** se používají pro detekci fluorescenčních látek. Pro vznik fluorescenčních sloučenin je často nutná před- nebo postkolonová derivatizace stanovovaných analytů (např. předkolonová derivatizace aminokyselin a jiných primárních aminů). HPLC fluorometry jsou přístroje poměrně jednoduché, ale citlivé a selektivní. Jako zdroje excitačního záření se využívají deuteriové nebo xenonové lampy nebo lasery.

**Elektrochemické detektory:** V amperometrických el.-chem. detektorech prochází elektroaktivní analyt průtokovou celou, kde je oxidován nebo redukován na povrchu elektrody s konstantním potenciálem a je zaznamenán vzniklý elektrický proud. Příkladem využití je analýza katecholaminů v moči. Podobně pracují coulometrické detektory (měření elektrického náboje), v klinické laboratoři používané pro stanovení metanefrinů, vanilmandlové kyseliny, homovanilové kyseliny nebo 5-hydroxy-indolactové kyseliny v moči.

**Refraktometrický detektor** měří změny indexu lomu eluátu v závislosti na koncentraci analytu.



## Počítač

Podobně jako u GC je celá analýza, sběr a zpracování dat řízeny počítačem.

K největším světovým výrobcům HPLC systémů patří např. firmy Waters, Agilent Technologies, Thermo, PerkinElmer, Shimadzu, Varian, Amersham Pharmacia, Dionex, Jasco, Gilson, Hitachi, BioRad a další.

Současným trendem je nejen zmenšování vnitřního průměru a délky kolon nebo zmenšování velikosti částic náplně, ale i využívání ultravysokých tlaků v chromatografii (100 MPa). Technika se nazývá UPLC nebo UHPLC (ultra high-performance liquid chromatography), má vyšší separační účinnost než klasická HPLC. UHPLC využívá chromatografické kolony s částicemi  $<2\mu\text{m}$  v přístrojích schopných pracovat s vysokými tlaky, což umožňuje práci s širokým rozsahem průtoků a významně zkracuje dobu analýzy. Přístroje pro UPLC dodává např. firma Waters, Thermo, Perkin-Elmer, Dionex, BioRad a další.

### 4.4.3.2. Příprava vzorků pro HPLC analýzu

Příprava vzorku je důležitým krokem, který předchází chromatografické analýze a zahrnuje např. zakoncentrování analytu, jeho purifikaci nebo derivatizaci.

Zakoncentrování analytů a čištění vzorku se provádí extrakčními technikami. Často používaná je technika extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE), která přípravu vzorku podstatně zjednodušuje a je možné ji automatizovat.

Derivatizace analytů se provádí z důvodů umožnění nebo usnadnění jejich detekce. Například u analyzátorů aminokyselin jsou eluované aminokyseliny postkolonově derivatizovány ninhydrinem a výsledné barevné sloučeniny jsou detegovány fotometricky. Jiným příkladem je předkolonová derivatizace aminokyselin a jiných primárních aminů za vzniku fluorescenčních sloučenin a následná detekce fluorometrem.

### 4.4.4. Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní chromatografickou analýzu se používá kalibrační technika s vnějším nebo vnitřním standardem.

Při externí kalibraci se provádí analýza referenčních vzorků se známým obsahem analytů. Pro každý analyt se sestaví kalibrační závislost jako velikost ploch píků (výšky píků) v závislosti na koncentraci analytu a tato závislost se používá pro vyhodnocení koncentrací analytů v reálných vzorcích.

Při vnitřní kalibraci se do referenčních vzorků se známým obsahem analytů přidává konstantní množství vnitřního standardu. Vnitřní standard je sloučenina, která má podobné vlastnosti jako stanovované analyty, ale nevyskytuje se v reálných vzorcích (např. syntetická aminokyselina norleucin nebo norvalin pro stanovení aminokyselin v biologickém materiálu). Do kalibrační křivky se pak vynáší poměr plochy (výšky) píku analytu a plochy (výšky) píku vnitřního standardu v závislosti na koncentraci analytu. Do reálných vzorků se přidává interní standard ve stejném množství jako byl přidán do referenčních roztoků a koncentrace analytu se vyhodnocuje na základě poměru plochy (výšky) odpovídajícího píku a píku vnitřního standardu.

## 4.5. Příklady praktických aplikací chromatografických technik v klinické biochemii

V klinické biochemii mají chromatografické techniky velmi široké využití, uplatňují se hlavně TLC, HPLC a GC; obě poslední zvláště ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS).

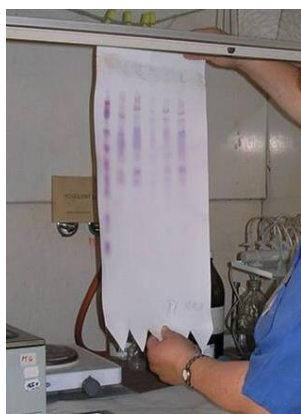
#### 4.5.1. Planární techniky

Obr. 63 ukazuje využití jednoduché, dnes již málo používané techniky **papírové chromatografie** pro screening aminokyselin v moči: Analýza je provedena na chromatografickém papíře Whatman, skvrny aminokyselin se po sestupném vyvíjení chromatogramu a usušení detegují ninhydrinem a srovnávají se standardem (1.dráha vlevo).

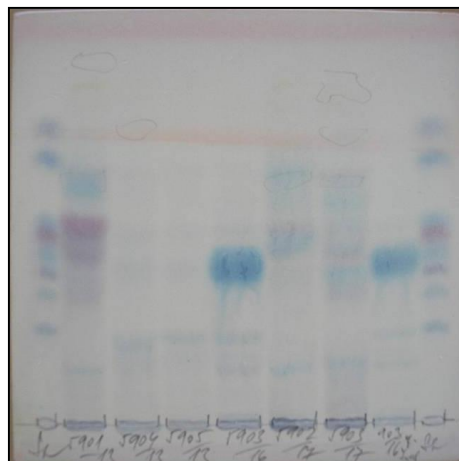
**Tenkovrstvá chromatografie** se používá pro kvalitativní, případně semikvantitativní analýzu. Přestože metoda TLC se dá ve spojení s denzitometrem použít i ke kvantitativní analýze, je přesnější toto provést metodou HPLC, GC.

Tenkovrstvá chromatografie jako velmi flexibilní levná separační metoda, umožňující souběžně analyzovat více vzorků bez náročné přípravy a bez potřeby sofistikovaných nástrojů, nachází velmi časté využití v toxikologii pro cílené průkazy nejrůznějších tox a pro orientační screening léků a drog. Konfirmace pozitivních výsledků z toxikologického screeningu se provádí dalšími chromatografickými metodami (př. HPLC, často ve spojení s hmotnostní spektrometrií).

Obr. 64 prezentuje jiné využití TLC – analýzu mono- a disacharidů v močových vzorcích na tenké vrstvě silikagelu pro účely diagnostiky dědičných metabolických poruch. Skvrny odpovídající jednotlivým mono- a disacharidům jsou po vyvinutí chromatogramu a usušení vizualizovány barvotvorným činidlem a srovnávány se standardem na krajních drahách chromatogramu (na 5. a 8. dráze zleva pozitivní výsledek pro galaktózu).



Obr.63: *Papírová chromatografie aminokyselin*

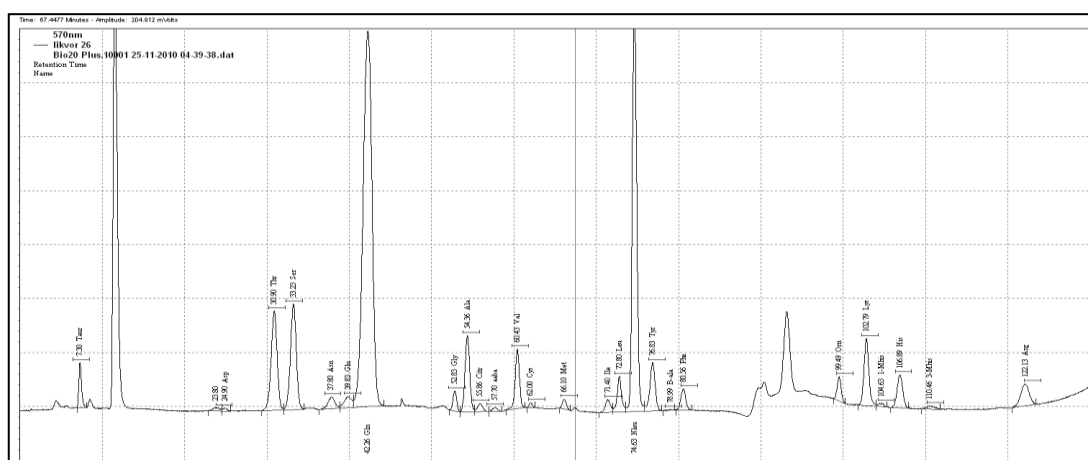


Obr.64: *TLC analýza sacharidů v moči na silikagelové vrstvě (komerčně dodávané - Merck)*

#### 4.5.2. Ionexová chromatografie

IEC se uplatňuje např. při analýze aminokyselin. Vzorek (deproteinovaná plazma) představuje směs aminokyselin, které jsou svými vlastnostmi navzájem velmi podobné. Jsou vneseny na chromatografickou kolonu s katexem ve formě kationtů (při nízkém pH) pak postupně eluovány z kolony pufrů o zvyšující se eluční síle (rostoucí pH a iontová síla). Eluát z kolony se mísí s roztokem ninhydrinu (postkolonová derivatizace), který dává s primárními aminokyselinami modré zbarvení, se sekundárními aminokyselinami žluté zbarvení. Signál fotometrického detektoru (570 a 440 nm) se zaznamenává jako chromatogram (Obr.č. 65), jehož vyhodnocením se zjistí koncentrace jednotlivých aminokyselin ve vzorku na základě

vyhodnocení ploch píků. Kvantitativní vyhodnocení se provádí pomocí vnitřního standardu (syntetické aminokyseliny norleucinu), který se přidává do standardní kalibrační směsi aminokyselin při kalibraci přístroje i do každého analyzovaného vzorku.



Obr.65: IEC aminokyselin na automatickém analyzátoru Biochrom (PerkinElmer)

### 4.5.3. HPLC

HPLC má z chromatografických metod v klinické biochemii nejširší uplatnění, lze ji aplikovat na široké spektrum analytů v závislosti na způsobu detekce – sacharidy, karboxylové kyseliny, aminokyseliny, lipidy, steroidy, katecholaminy, léky, drogy, homocystein, pteriny, atd.

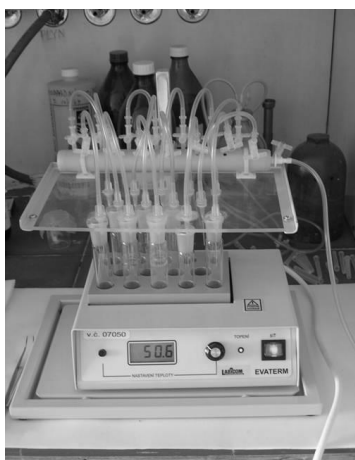
HPLC se uplatňuje jako standardní metoda v toxikologii, hlavně v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. (Praktické aplikace LC/MS nebo LC/MS/MS budou diskutovány v další kapitole).

Na chromatografickou kolonu často nelze přímo dávkovat biologický materiál a je tedy nutné vzorek nejprve upravit. V klinické biochemii se používají hlavně techniky extrakční a ultrafiltrační.

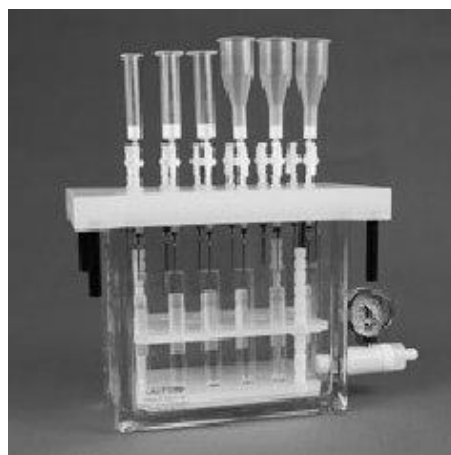
**Ultrafiltrace** je metoda úpravy roztoků pomocí polopropustných membrán. Hustota membrány limituje velikost molekul, které jsou separovány. Technika je vhodná pro deproteinaci vzorků.

**Kapalinovou extrakcí** analytů do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou lze vzorek přečistit i zakoncentrovat: organický extrakt se zpravidla odpařuje v proudu inertního plynu (dusíku) a odparek se rozpustí před aplikací na chromatografickou kolonu v nezbytném objemu mobilní fáze (Obr. 66).

**Extrakce pevnou látkou** (solid phase extraction, SPE) je technika izolace, čištění nebo obohacování stanovované složky na malých kolonkách (např. velikosti injekční stříkačky) naplněných sorbentem, iontoměničem, gelem nebo jiným dělicím médiem dle charakteru izolované látky. Vzorek v roztoku se touto kolonkou prolévá podtlakem, zachycené složky se po promytí uvolní vhodným rozpouštědlem (Obr.č. 67).

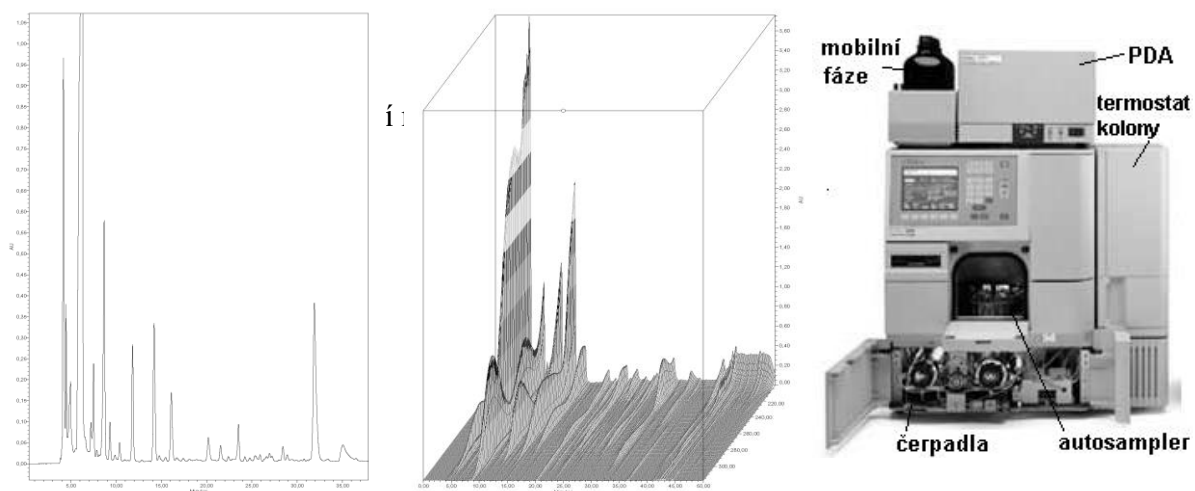


Obr.66: *Odpařování org. extraktů ve vyhříváném termobloku pod proudem dusíku*

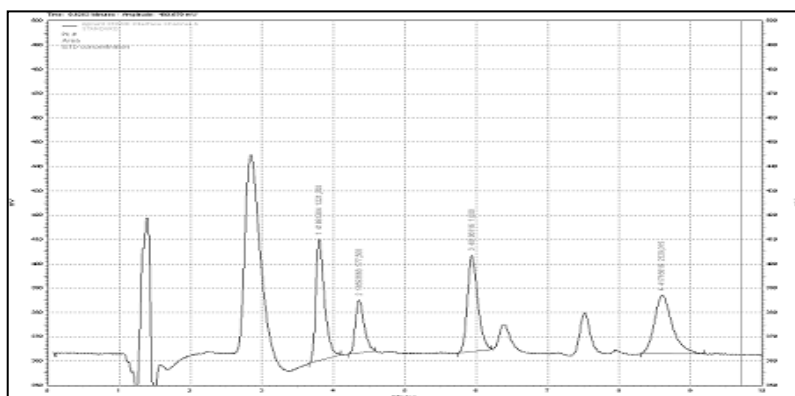


Obr.67: *SPE extrakce*

Obr.67: Příklad záznamu HPLC analýzy purinů a pyrimidinů v moči: Detekce při jedné vlnové délce ve srovnání se záznamem analýzy z PDA - detektoru diodového pole - ve zvoleném rozmezí vlnových délek na HPLC s PDA detektorem – Waters)



Obr. 68: *Integrovaný separační modul Alliance s PDA detektorem – Waters*



Obr. 69, 70: Záznam analýzy katecholaminů v moči z HPLC Agilent série 1200, elektrochemický detektor Coulochem

Pozn.: Separční modul Alliance - Waters je plně **integrováný**, HPLC Agilent série 1200 je příklad systému **modulárního**.

#### 4.5.4. Plynová chromatografie

GC je nepostradatelná technika v kvalitativních i kvantitativních analýzách v toxikologii. Plynové chromatografy v toxikologických laboratořích bývají vybaveny různými detektory a tak určeny k různým typům analýz, např. GC s plamenovým ionizačním detektorem se používá pro stanovení alkoholu a těkavých látek v krvi, NPD detektor je díky zvýšené citlivosti k látkám obsahujícím dusík ideálním pro screening většiny léčiv či drog, detektor elektronového záchytu se uplatňuje v analýze benzodiazepinů nebo halogenovaných látek. Nejširší využití má plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, ať už v toxikologii pro cílený průkaz a stanovení noxy, nebo při diagnostice dědičných metabolických poruch (viz kapitola Hmotnostní spektrometrie).

## 5. Hmotnostní spektrometrie (MASS SPECTROMETRY, MS)

### 5.1. Definice hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda pro kvalitativní i kvantitativní analýzu širokého spektra klinicky významných analytů, případně pro stanovení elementárního složení a struktury molekul, využívá separace urychlených ionizovaných částic ve vakuu **podle jejich hmotností** při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli.

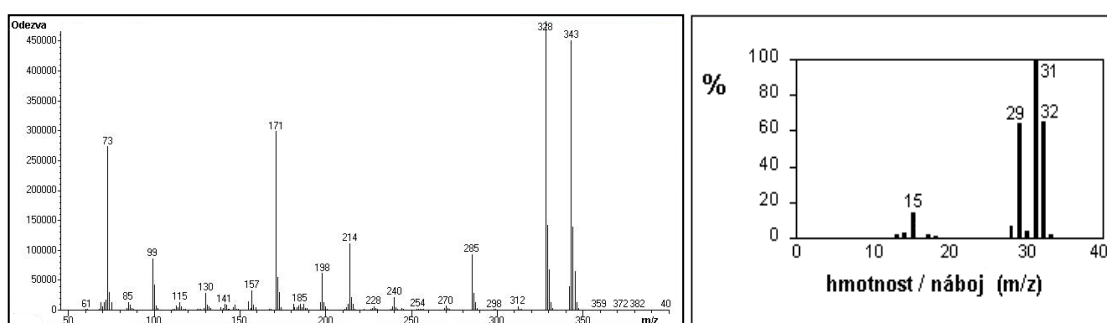
MS byla vyvinuta počátkem 20.století, v klinické biochemii se užívá již několik desetiletí pro identifikaci a stanovení nízkomolekulárních látek na základě měření hmotnosti jejich molekul (detekce látek ve spojení s plynovou chromatografií). V první polovině 90. let 20.století byly vyvinuty nové techniky, které umožnily využívat metodu ve spojení s LC a to i pro vysokomolekulární látky.

MS se stala vedle metod molekulové genetiky nejdynamičtěji se rozvíjející metodikou současné biochemie.

### 5.2. Hmotnostní spektrum

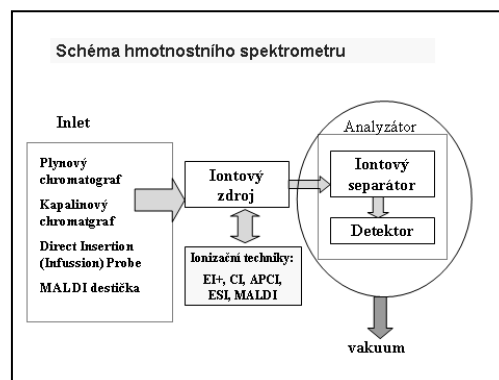
Výstupem MS je hmotnostní spektrum – čarový diagram, na jehož vodorovné ose je hodnota  $m/z$  (hmotnost / náboj iontu) a na svislé ose odezva detektoru nebo relativní zastoupení daného iontu (ion má obvykle náboj  $z = 1$ , potom poměr  $m/z$  je roven přímo hmotnosti iontu).

Obr. 71,72: Příklady hmotnostního spektra jako závislost odezvy detektoru resp. relativního zastoupení na  $m/z$  (užitím relativních zastoupení fragmentů se minimalizuje variabilita výsledků získaných na různých přístrojích a spektra z různých přístrojů lze srovnávat)



### 5.3. Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je analytický přístroj, který nejprve ionizuje molekuly sledovaného analytu a po separaci měří hmotnost této molekuly nebo jejich fragmentů. Pokud je spojen s kapalinovým či plynovým chromatografem, stává se univerzálním detektorem, poskytujícím informace o struktuře analytů eluovaných z kolony. Přístroj obsahuje tři funkční celky:



Obr.73: Schema hmotnostního spektrometru

**Iontový zdroj** – v iontovém zdroji dochází k ionizaci neutrálních molekul měřené směsi; molekula analytu je převedena do plynné fáze (do vysokého vakua), přičemž získává charakteristický náboj.

**Iontový separátor** – v separátoru probíhá rozdělení iontů různých hmotností. Ion je urychlen a z charakteru jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje  $m/z$ .

**Detektor** je nutný pro detekci iontů po jejich separaci podle hodnoty  $m/z$  a určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů.

Protože vzniklé ionty musí od zdroje do detektoru urazit poměrně dlouhé dráhy, je prostor iontového separátoru, detektoru a případně i iontového zdroje hluboce evakuován, aby nedocházelo ke kolizím analyzovaných iontů s molekulami plynu. Vakuum v hmotnostních spektrometrech se pohybuje v hodnotách  $10^{-3}$  až  $10^{-9}$  torr podle typu iontového separátoru, těchto hodnot se dosahuje kombinací rotační olejové pumpy a turbomolekulární pumpy.

### 5.3.1. Iontový zdroj a základní ionizační techniky

Pro MS byla vyvinuta celá řada ionizačních technik; cílem je vždy vytvořit nabitou částici, která je následně analyzována. Použitá ionizační technika záleží na charakteru analyzovaných látek a také na tom, zda a na jakou separační techniku je hmotnostní spektrometr napojen - zda se jedná o kombinaci GC/MS (plynová chromatografie - MS), LC/MS (kapalinová chromatografie - MS), CE/MS (kapilární elektroforéza - MS) nebo o MS bez napojení na jakoukoli separační techniku.

Pro GC/MS připadá v úvahu technika elektronové ionizace (electron ionization, EI) nebo chemické ionizace (chemical ionization, CI).

Pro LC/MS, CE/MS nebo MS s přímým nástřikem vzorku je vhodná ionizace elektrosprejem (electrospray ionization, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, atmospheric pressure photoionization).

Z dalších možností jsou to technika MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization), příp. technika indukčně vázané plazmy (inductively coupled plasma, ICP),

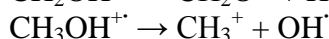
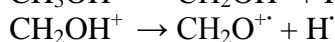
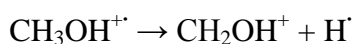
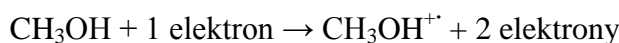
#### 5.3.1.1. Elektronová ionizace, EI

V iontovém zdroji tohoto typu dochází k ionizaci molekul analytu v plynném stavu (přímo z plynového chromatografu) pomocí proudu elektronů ze žhaveného vlákna ve vakuu: Z molekuly je při srážce s paprskem rychlých elektronů odtržen elektron (molekula získává kladný náboj - stává se kation-radikálem), následně dochází k fragmentaci (rozpadu) molekuly přebytkem energie. EI je tzv. tvrdá ionizační technika, protože při ní dochází k fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou z ionizační komory přitaženy elektrickým polem, elektrostaticky fokuzovány a vstupují do další části spektrometru – iontového separátoru.

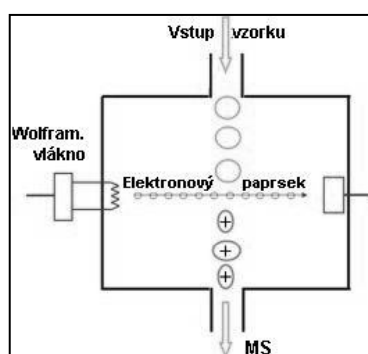
Tento typ ionizace je vhodný pouze pro teplotně stálé nízkomolekulární látky o hmotnosti molekuly 50 – 800 Da, tedy takové, které je možno analyzovat plynovou chromatografií.

Pozn.: Da = Dalton – jednotka molekulové hmotnosti, nazývaná též amu (atomic mass unit)

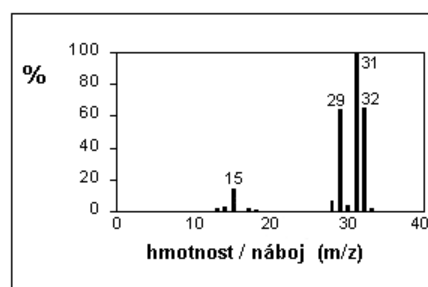
Příklad: **Schema fragmentace** při elektronové ionizaci a vznik hmotnostního spektra metanolu:



Ve zdroji vzniká nefragmentovaný ion  $\text{CH}_3\text{OH}^+$  o hmotnosti 32 Da, který částečně fragmentuje na ionty o hmotnosti 31 ( $\text{H}_2\text{C}=\text{OH}^+$ ), 29 ( $\text{HC}=\text{O}^+$ ) a 15 ( $\text{H}_3\text{C}^+$ ) Daltonů. Všechny ionty se objeví v hmotnostním spektru. Nefragmentovaný ion původní molekuly se nazývá molekulový ion, iontu s nejvyšším zastoupením v hmotnostním spektru je přiřazena relativní hodnota 100 % a nazývá se základní ion.



Obr.74: Hmotnostní spektrum metanolu

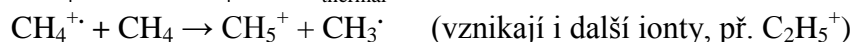


Obr.75: Schema EI zdroje

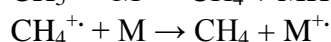
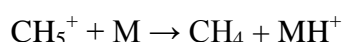
### 5.3.1.2. Chemická ionizace CI

Chemická ionizace je „měkčí“ variantou elektronové ionizace: Do iontového zdroje je přiváděn reakční plyn, nejčastěji metan, amoniak, izobutan případně oxid uhličitý pro negativní CI. Proud rychlých elektronů ionizuje nejdříve molekuly reakčního plynu, protože jsou v iontovém zdroji v nadbytku vzhledem k molekulám vzorku. Ionizované molekuly spolu reagují navzájem, ale také předávají energii molekule analytu a ionizují ji. Takováto ionizace analytu je podstatně šetrnější, nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci a v hmotnostním spektru se vyskytuje molekulový ion s vysokým zastoupením, což je výhodné pro stanovení hmotnosti molekuly a kvantifikaci analytu. Podle charakteru analytu se používá pozitivní nebo negativní chemická ionizace. Elektronovou i chemickou ionizaci je možné provádět po malé úpravě na jednom přístroji.

Při **pozitivní chemické ionizaci** (PCI) se jako reakční plyn nejčastěji používá metan. V iontovém zdroji probíhají následující reakce:



Ionty  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{CH}_4^+$  reagují s molekulami analytů M a vzniklé kationty jsou pak dále analyzovány iontovým separátorem:



nebo př.  $\text{CH}_5^+ + \text{C}_{10}\text{H}_{22} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{C}_{10}\text{H}_{21}^+ + \text{H}_2$  pro látky s nízkou afinitou k protonu (př. alkany)

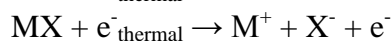
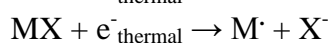


V hmotnostním spektru se pak podle charakteru látky vyskytují píky odpovídající hmotnostem M+1, M-1, případně hmotnosti odpovídající aduktům  $MC_2H_5^+$  a další.

Při **negativní chemické ionizaci (NCI)** se na rozdíl od EI nebo PCI sledují záporně nabitě ionty; hmotnostní spektrometr pracuje v záporném módu, což znamená, že musí dojít k přepólování celého hmotnostního spektrometru. V iontovém zdroji probíhají následující reakce:

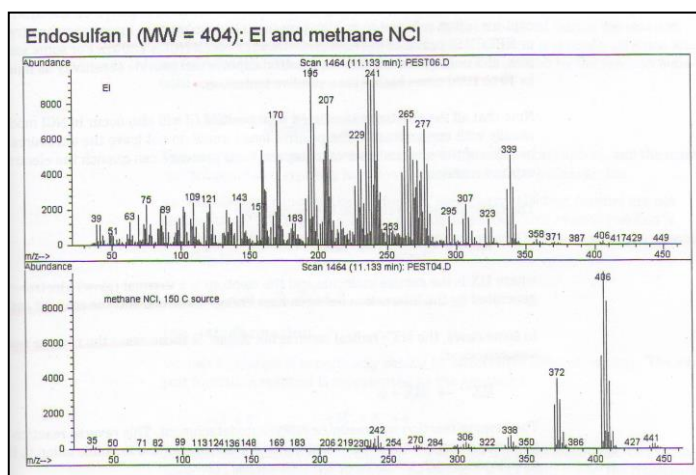


Elektrony produkované touto reakcí mají nižší energii než elektrony z vlákna zdroje a pokud interagují s molekulami analytů, nepůsobí výraznou fragmentaci; dochází pouze k záchytu elektronu případně jednoduché disociaci. Záporně nabitě ionty pak dále pokračují do iontového separátoru.



Během těchto reakcí nevznikají žádné záporně nabitě ionty reakčního plynu a kladně nabitě ionty reakčního plynu se v důsledku přepólování přístroje dále do analyzátoru nedostanou. Tím se výrazně snižuje šum (na rozdíl od PCI) a NCI má proto velkou citlivost a nízké meze detekce analytů.

Negativní chemická ionizace lze použít pro látky obsahující elektronegativní substituent (zvláště halogen) nebo heterocyklus s elektronegativním atomem. NCI se používá např. pro analýzu benzodiazepinů, mastných kyselin po derivatizaci pentafluoro-benzyl-bromidem atd.



Obr.76: Srovnání hmotnostního spektra získaného elektronovou ionizací a chemickou ionizací

### 5.3.1.3. Elektrosprej ionizace, ESI

Ionizace elektrosprejem probíhá při atmosférickém tlaku. Roztok vzorku (typicky eluát z HPLC kolony) protéká kovovou nebo křemennou kapilárou, na niž je vloženo vysoké napětí, čímž se za pomoci zmlžujícího plynu vytváří sprej vysoce nabitých kapiček. Odpařováním rozpouštědla z kapiček dochází k jejich zmenšování a tím ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. coulombické explozi, tj. rozpadu na

ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů; opakování tohoto procesu vede až k uvolnění molekulových iontů. Vznikají ionty (i vícenásobně nabitě), které jsou dále separovány iontovým analyzátozem (Obr.č. 77).

Objev ESI znamenal revoluci v hmotnostní spektrometrii, protože umožnil analýzu polárních netěkavých látek, i vysokomolekulárních, např. proteinů, nukleových kyselin, peptidů, sacharidů)

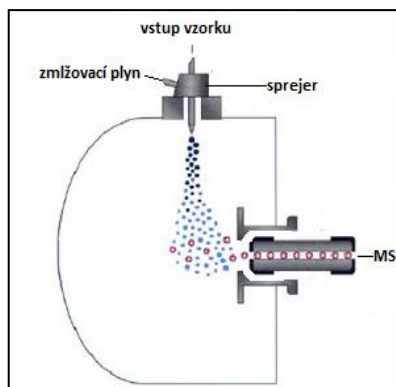
Analýza vysokomolekulárních látek je umožněna právě tvorbou vícenásobně nabitých iontů, protože iontové separátory dělí ionty podle hodnoty  $m/z$  (např. i velká molekula o hmotnosti 20 000 může nést 20 nábojů a tím být detegována už při hodnotě  $m/z = 1000$ ), což obrovským způsobem zvyšuje rozsah měřitelných hmot přístroje.

ESI je měkká ionizační technika (tj. bez následné fragmentace vzniklých molekulových iontů). vhodná pro nízkomolekulární i vysokomolekulární látky.

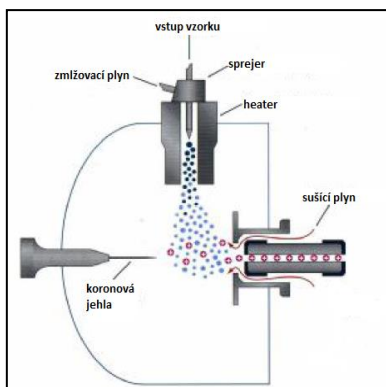
#### 5.3.1.4. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

APCI je obdobná technika jako ESI, využívá podobné uspořádání, rozdíl je však ve způsobu ionizace. Vysoké napětí se vkládá nikoli na ústí kapiláry, ale na výbojovou elektrodu (jehlu), čímž vzniká koronový výboj, kterým jsou nejdříve ionizovány molekuly mobilní fáze (protože jsou v obrovském přebytku) a následně jsou ion-molekulárními reakcemi ionizovaných molekul mobilní fáze ionizovány molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrněny do analyzátoru, protiproud sušícího plynu (dusík) slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů (aduktů analytu s rozpouštědlem) Obr.č. 78.

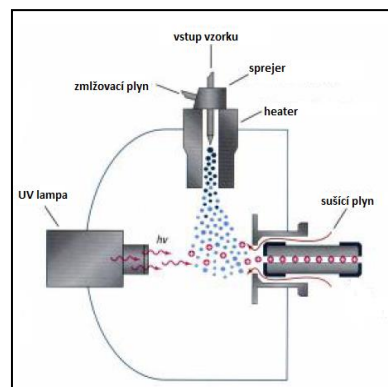
APCI je rovněž měkká ionizační technika, kombinuje se s HPLC, na rozdíl od ESI však není vhodná na iontové nebo vysokomolekulární látky.



Obr.77: Schema ESI



Obr.78: Schema APCI



Obr.79: Schema APPI

#### 5.3.1.5. Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

APPI je technika velmi podobná APCI, ale lze ji použít i pro velmi nepolární nebo labilní sloučeniny. Koronová jehla je zde nahrazena zdrojem UV záření (kryptonová výbojka). Energie záření je menší než ionizační energie složek mobilní fáze (metanol, acetonitril, voda), proto se do zdroje přidává reakční snadno ionizovatelný plyn, zpravidla toluen. Primární ionty vznikají fotoionizací z toluenu a tyto následně ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu (Obr.č. 79).

Pozn: **Porovnání ESI, APCI a APPI:**

ESI je vhodná pro středně polární až iontové sloučeniny, pro biopolymery, je to nejšetrnější ionizační technika. ESI je méně vhodná pro bezvodé mobilní fáze a systémy s normálními fázemi. APCI se používá pro málo až středně polární sloučeniny cca do hmotnosti 1000 až 1500, má větší toleranci k obsahu solí v eluentu a méně aduktových iontů. APPI umožňuje analyzovat i zcela nepolární látky nebo labilní látky (např. cukry), použití vhodného typu reakčního plynu (dopantu) umožňuje selektivní analýzu, je ideální pro systém s normálními fázemi.

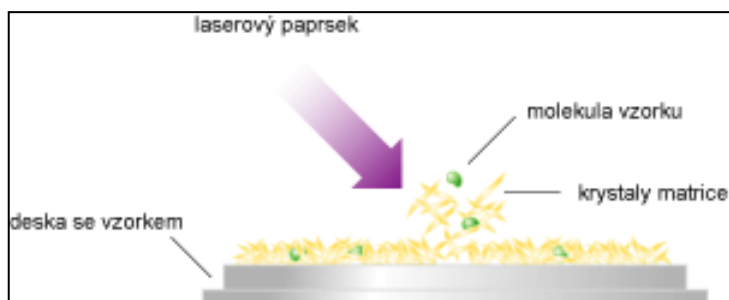
### 5.3.1.6. MALDI - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

MALDI je spolu s ESI nejvhodnější ionizací pro analýzu biopolymerů a syntetických polymerů (desítky až stovky tisíc Da, existují aplikace i přes milión Daltonů).

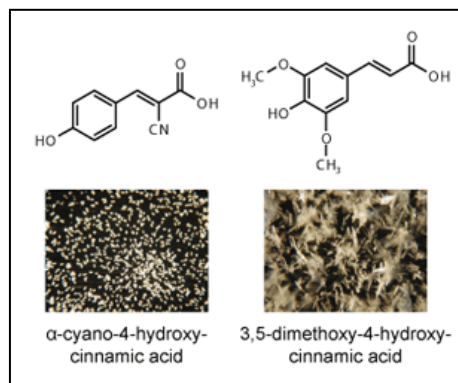
Vzorek je v roztoku smíchán s vhodnou matricí, která může absorbovat energii laserového záření ve viditelné nebo blízké ultrafialové oblasti, je nakápnut a vysušen (vykrytalizován) na MALDI destičce ve formě spotu. Spot na destičce je vystaven krátkému laserovému pulzu. Energie laseru je absorbována matricí, látky se prudce odpaří do vakua a ionizovaná matrice s sebou strhne molekulu analytu. Následně dojde k ion-molekulárním reakcím analytů ze vzorku s ionizovanou matricí a tím k šetrné ionizaci molekul analytu (obr.č. 80). Ionty studovaných analytů (nejčastěji kladné ionty  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ), se pak již pohybují samostatně, urychleny stejnosměrným elektrickým polem do analyzátoru, kterým bývá téměř výhradně TOF analyzátor, schopný separovat pulzně produkované ionty.

Pro analýzu je důležitá správná příprava vzorku, volba vhodné matrice a rozpouštědla vzorku. Jako matrice se používají deriváty nízkomolekulárních aromatických kyselin (obr.č. 81).

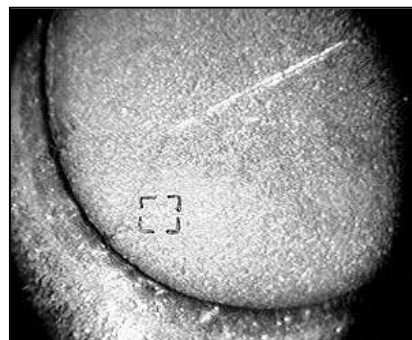
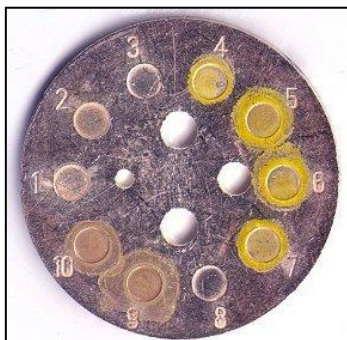
Pozn.: Technika **SELDI** (Surface Enhanced Laser Desorption / Ionization) využívá kombinace afinitního principu a ionizace MALDI (více v kapitole týkající se praktických aplikací MS).



Obr.80: *Schema MALDI*



Obr.81: *Matrice*



Obr.82, 83: Čistá MALDI destička a destička se spoty

Obr.84: Zvětšený spot na obrazovce monitoru přístroje (kurzor ukazuje místo dopadu laserového paprsku)

### 5.3.1.7. Porovnání EI a šetrnějších ionizačních technik:

Ionizační techniky lze orientačně seřadit podle přebytku vnitřní energie ionizované molekuly analytu vedoucí k její fragmentaci (hovorově řečeno podle jejich „tvrdosti“). Pořadí je orientační, může se lišit pro různé třídy látek a také silně závisí na experimentálních podmínkách: ESI (nejšetrnější) < MALDI ~ APPI < APCI < CI < EI.

### 5.3.1.8. Indukčně vázaná plazma (ICP)

ICP je ionizační technika za atmosferického tlaku. Vzorek je dodáván pomocí zmlžovače do zdroje, ve kterém je vysokoteplotní plazma generovaná působením vysokofrekvenčního elektromagnetického pole na argon. V plazmatu pak dojde k ionizaci analytu a jeho kompletní atomizaci. Tato velmi tvrdá ionizační technika může být v klinické laboratoři částečně využita pro analýzu stopových prvků nebo těžkých kovů e vzorcích tělních tekutin nebo tkání.

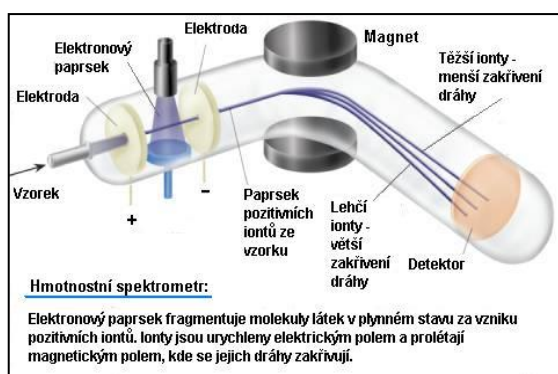
### 5.3.2. Iontové separátory

V iontovém separátoru (iontovém analyzátoru) probíhá rozdělení iontů podle hodnoty  $m/z$ . Ionty jsou urychleny a z charakteru jejich pohybu evakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ .

Iontové analyzátoary mohou být paprskové, kdy ionty během mikrosekund až milisekund prolétají přístrojem a dopadají na detektor (k takovým analyzátorům patří magnetický sektorový analyzátor, kvadrupól a TOF) nebo analyzátoary typu iontové pasti, ve kterých se ionty vlivem kombinace elektrických a magnetických pohybují v určitém prostoru po určitý čas (řádově sekundy) po drahách, které dovolují určit jejich hodnotu  $m/z$ .

#### 5.3.2.1. Magnetický sektorový analyzátor

Magnetický sektor je historicky prvním iontovým analyzátoarem, využívá skutečnosti, že dráha nabitě částice se v magnetickém poli zakřívuje tím více, čím má vyšší náboj a nižší hmotnost (obr.č. 85). Analyzátor je velmi přesný s vysokým rozlišením, stále se vyvíjí ale ve své moderní verzi je velmi nákladný, objemný, v klinických laboratořích se nepoužívá (obr.č. 86).



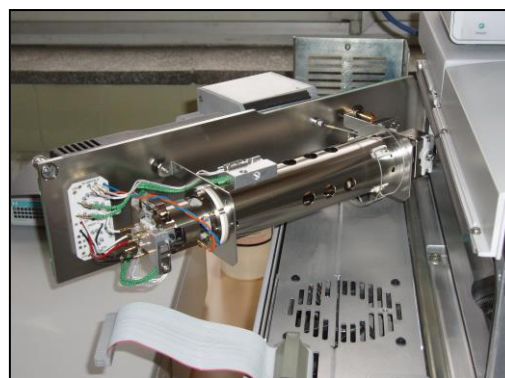
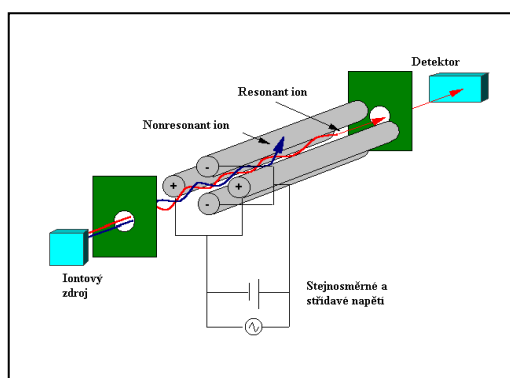
Obr.85, 86: *Magnetický sektorový analyzátor*

### 5.3.2.2. Kvadrupól

Kvadrupóly známé i jako kvadrupólové hmotnostní filtry jsou nejpoužívanějším typem iontového analyzátoru. Nedosahují sice takové citlivosti, přesnosti a rozlišení jako magnetický sektor, ale jsou flexibilní, levné a prostorově nenáročné. Konstrukčně se jedná o 4 rovnoběžné kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu připojené ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, začnou oscilovat. Při vhodné kombinaci obou složek napětí projdou kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru  $m/z$ . Plynulou změnou vkládaných napětí je možné během krátkého okamžiku nechat projít kvadrupolem postupně ionty v celém rozsahu  $m/z$ , (tzn. přístroj pracuje v tzv. skenovacím módu - scan mode), ale je možné pracovat i v tzv. SIM módu (selected ion mode), kdy přístroj sleduje pouze jeden nebo několik vybraných iontů, což výrazně zvýší citlivost pro tyto vybrané ionty.

Kvadrupóly mají rozlišení řádově několik tisíc (rozlišení je míra schopnosti analyzátoru rozlišit blízké hodnoty  $m/z$ . Podrobněji bude popsáno v dalším textu), což postačuje pro rozlišení izotopů a využívá se pro kvantifikaci analytů tzv. izotopovou dilucí.

Kvadrupóly se používají pro GC/MS i LC/MS (v kombinaci s EI, CI, ESI, APCI, APPI).



Obr.87,88: *Schema kvadrupólu a reálný pohled na kvadrupól v kombinaci s EI zdrojem a detektorem*

### 5.3.2.3. TOF – analyzátor „Time of Flight“ (průletový)

TOF analyzátor deteguje hmotnosti ionizovaných molekul na základě doby jejich letu evakuovanou trubicí - rychlosti letu závisí na hodnotách efektivní hmotnosti  $m/z$ , kdy lehčí molekula letí rychleji. TOF analyzátoři mají téměř neomezený rozsah hodnot  $m/z$ , vysokou citlivost, dobré rozlišení a dokáží pracovat s pulzním iontovým zdrojem, proto se používají v aplikacích zvláště v kombinaci s MALDI a podobnými technikami.

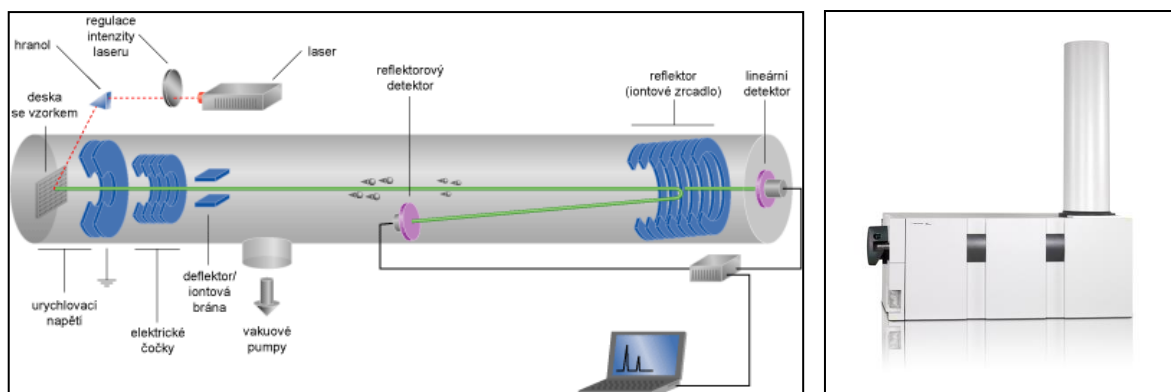
Analyzátor má tvar evakuované trubice. Ionty ze zdrojové části trubice jsou elektricky urychleny a dopadají na detektor na opačném konci, měří se čas průletu analyzátořem.

$$t = L \left( \frac{m}{2E} \right)^{1/2}$$

$t$ ...čas,  $L$ ...délka dráhy,  $m$ ...hmotnost iontu,  $E$ ...kinetická energie

Pro dobré rozlišení musí analyzátor měřit čas s přesností 1 nanosekunda. Pro další zlepšení rozlišení se používá reflektorný mód, kdy ion nedopadá na lineární detektor na konci trubice, ale dráha jeho letu je obrácena reflektorem a ion pak dopadá na reflektorový detektor. Při tomto způsobu se prodlouží dráha a čas letu (obr.č. 89;90).

MALDI - TOF (SELDI - TOF) hmotnostní spektrometry se používají hlavně pro analýzu proteinů, mohou analyzovat molekuly s hmotností přesahující až 100 000 Da. TOF v kombinaci s EI nebo ESI lze použít i pro menší molekuly, ovšem v poněkud jiném provedení - TOF analyzátoři bývají zpravidla "jednoučelové".

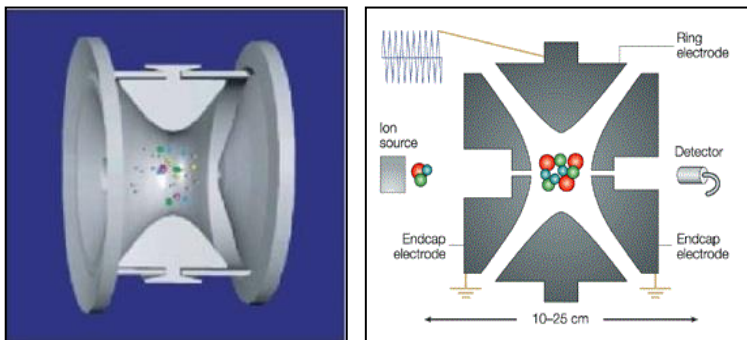


Obr.89,90: *Schema TOF analyzátoru a MS firmy Agilent (TOF analyzátoři mohou být díky dlouhé svisle nebo vodorovně uložené letové trubicí poněkud prostorově náročnější)*

### 5.3.2.4. Iontové pasti

Iontové pasti jsou trojrozměrnou obdobou kvadrupólu, pracují na stejných fyzikálních principech jako kvadrupól - oba typy analyzátořů používají elektrická pole pro regulaci pohybu iontu v určitém prostoru.

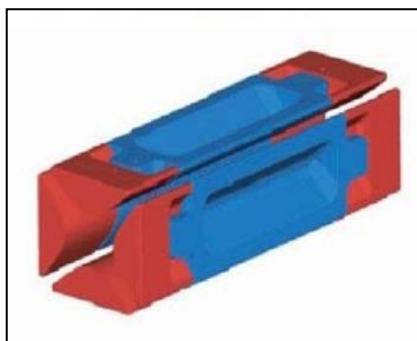
**Sférická iontová** past se používá jako alternativa kvadrupólu v GC a LC detektorech. Na rozdíl od kvadrupólu, který omezuje pohyb iontu ve dvou směrech, je past navržena tak, že omezuje pohyb iontu ve všech třech směrech. Ionty se tak pohybují po určitou dobu v prostoru iontové pasti a mohou z ní být vypuzovány selektivně podle hodnoty  $m/z$  (obr.č. 91;92).



Obr.91,92

*Sférická iontová past a průřez sférickou iontovou pastí:* na středovou prstencovou (ring) elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Krajní elektrody jsou uzemněny. Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách.

**Lineární iontová past** má podobný tvar jako kvadrupól, pouze na oba její konce je vkládáno elektrostatické pole, které zabraňuje iontům opustit vnitřní prostor. Výhodou lineární pasti oproti sférické je větší pracovní rozsah.



Obr.93: *Lineární iontová past*

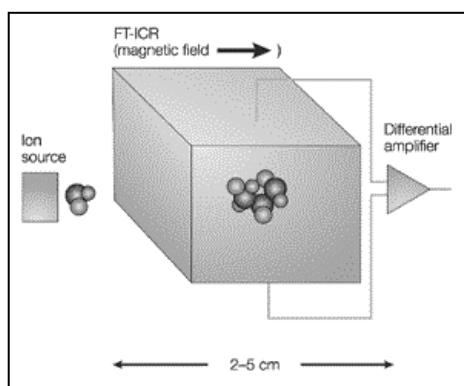
**Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT - ICR)** je založena na principu pohybu iontu v magnetickém poli: jestliže se ion dostane do silného magnetického pole, začne se pohybovat po kruhové trajektorii s frekvencí  $\omega$ :

$$\omega = \mathbf{B} \cdot \mathbf{z} / m \quad \text{B...intenzita magnetického pole}$$

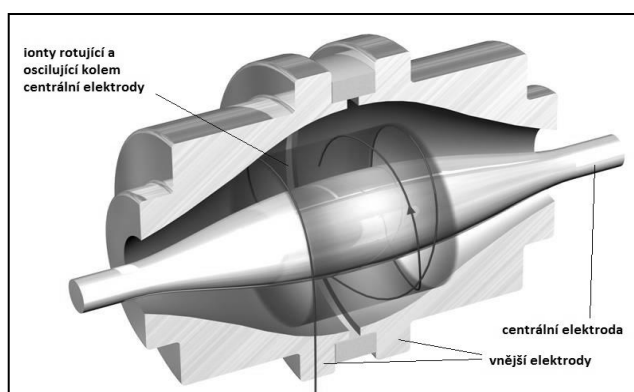
Každá hodnota  $m/z$  má tedy charakteristickou frekvenci, Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do škály  $m/z$  a tím se získá hmotnostní spektrum. ICR se vyznačuje extrémně vysokým rozlišením a velmi přesným měřením hmotnosti (obr.č. 94).

**Orbitrap** je nejnovějším iontovým analyzátozem, který se rovněž vyznačuje vysokým rozlišením. V Orbitrapu ionty vlivem elektrických polí obíhají okolo centrální elektrody a současně oscilují podél této elektrody s frekvencí závislou na jejich  $m/z$ . Oscilace snímají vnější detekční elektrody. Fourierovou transformací jsou získány frekvence iontů o různé  $m/z$  a tyto frekvence jsou následně překonvertovány na klasické hmotnostní spektrum (obr.č. 95).

Obě poslední techniky by díky vysokému rozlišení mohly najít uplatnění při analýzách složitých matic - biologických vzorků bez náročných úprav.



Obr.94: *FT-ICR* - do hlubokého vakua a magnetického pole je umístěna cela ze šesti elektrod, které tvoří stěny krychle, ionty se v cele pohybují po cyklických drahách.



Obr.95: *Orbitrap* - ionty rotují a zároveň oscilují kolem centrální elektrody

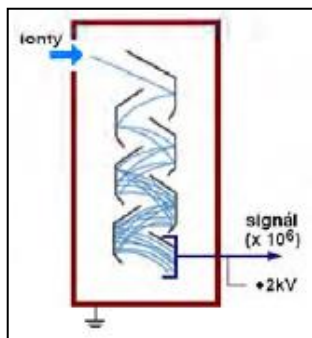
### 5.3.3. Detektor

Poslední částí hmotnostního spektrometru je zařízení, které deteguje ionty po jejich separaci podle hodnoty  $m/z$  a určuje relativní intenzitu (četnost) jednotlivých iontů. Data jsou počítačově zpracována.

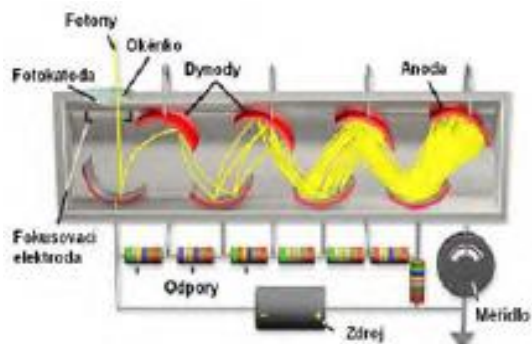
**Elektronový násobič** obsahuje sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Ion narazí na povrch první dynody, dojde k emisi elektronu. Po jeho dopadu na další dynodu dojde k vícenásobné emisi. Kaskádovitým efektem vznikne velké množství elektronů, které jsou detekovány (obr.č. 96).

**Fotonásobič:** Před vlastním fotonásobičem je umístěna fosforová destička, na ni dopadají částice z konverzní dynody a dochází k emisi fotonů. Fotony dopadají na fotokatodu, kde fotoelektrickým jevem dojde k emisi elektronů. Ty jsou dále zmnoženy stejně jako v elektronovém násobiči (obr.č. 97).





Obr.97: Fotonásobič



Obr.96. Elektronový násobič

#### 5.4. Parametry hmotnostního analyzátoru

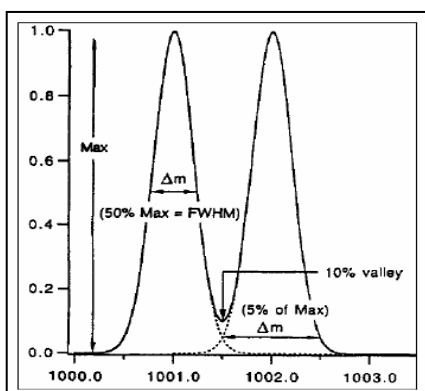
Základním parametrem hmotnostního analyzátoru je rozlišení **R**, které vyjadřuje schopnost analyzátoru rozlišit blízké hodnoty  $m/z$ . Jeho reciproká hodnota  $1/R$  může být  $10^3 - 10^6$ .

Může být vyjádřeno jako RP (resolving power) - rozlišení pro 2 ionty, které mají 10% překryv při stejné výšce:

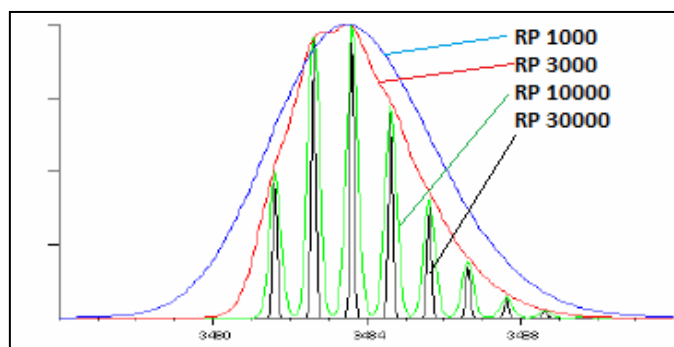
$$RP = m_1 / (m_1 - m_2) \quad m_1, m_2 \dots \text{hmotnosti 1. a 2. iontu (náboje } z_1, z_2 \text{ se rovnají jedné)}$$

Pro 1 ion může být rozlišení vyjádřeno jako FWHM (full width at half maximum):

$$FWHM = m/\Delta m \text{ nebo } t/2\Delta t \text{ (pro TOF)} \quad m \dots \text{hmotnost iontu, } t \dots \text{doba letu (pro TOF)}$$



Obr.98: Vysvětlení rozlišení



Obr.99: Konkrétní hodnoty RP - modelový příklad

Analyzátor	RP (FVHM)	Rozsah m/z	Rychlost skenu	Cena (mil.Kč)
Magnetický sektor	$10^5$	$10^4$	Nízká	10 - 15
Kvadrupol - přímý	$10^3$	$10^3$	Střední	2 - 4
Kvadrupol - past	$10^3$	$10^4$	Vysoká	3 - 6
Průletový	$10^4$	$10^3 - 10^6$	Velmi vysoká	6 - 8
FT - ICR	$10^6$	$10^8$	Vysoká	30

Tab.6: Srovnání iontových analyzátorů

### 5.5. Tandemová hmotnostní spektrometrie, MS/MS, MS<sup>n</sup>

Tandemová hmotnostní spektrometrie je citlivá a vysoce selektivní metoda, která umožňuje rychlou analýzu i ve složité matici ve spojení se separační metodou (GC, LC), nebo i bez použití separační metody. Při MS/MS jsou ionty podrobeny dvěma (nebo více) hmotnostním analýzám. V tandemových hmotnostních spektrometrech jsou v sérii zapojeny dva (nebo více) iontových separátorů v tandemu, mezi ně je zařazena kolizní cela. První analyzátor vybírá ionty s určitou hodnotou m/z (prekurzorové ionty nebo též mateřské ionty). Prekurzorové ionty přechází do kolizní cely, kde probíhá jejich fragmentace kolizí s atomy inertního plynu. Vzniklé produktové (dceřinné) ionty vstupují do druhého iontového analyzátoru, kde jsou zaznamenány jako spektrum.

U tandemové hmotnostní spektrometrie se využívají různé režimy práce. Například při skenu produktových iontů je první hmotnostní analyzátor MS1 nastaven tak, aby vybíral pouze ion s danou hodnotou m/z a druhý analyzátor skenuje celé spektrum produktových iontů - tento režim se často používá pro charakterizaci struktury látky. Při skenu prekurzorových iontů je vztah obrácený - MS1 skenuje celé spektrum a MS2 vybírá specifický produktový ion (pro vybraný fragmentový ion se tedy zjišťuje původní prekurzorový ion, ze kterého vznikl) - režim se často používá pro analýzu určitých skupin látek.

Nejčastější používanou kombinací iontových analyzátorů je tzv. trojitý kvadrupól QqQ, kdy první kvadrupól slouží jako MS1, třetí kvadrupól jako MS2 a mezi ně je vřazen kvadrupól, který funguje jako kolizní cela. Další možností je např. tandemový TOF/TOF hmotnostní

spektrometr, který je ve spojení s MALDI účinným nástrojem pro proteomiku. Tzv. hybridní analyzátoři jsou kombinací dvou různých typů analyzátořů, např. Q/TOF.

Pozn.: Mezi známé výrobce MS patří například Agilent Technologies (GC/MS, LC/MS, MS/MS, EI, CI, ESI, Q, TOF), Bruker Daltonic (FT-ICR, MALDI-TOF, iontové pasti, ESI-TOF, ESI-QTOF), Ciphergen Biosystems (MALDI-TOF, SELDI-TOF), Thermo Fischer Scientific (kvadrupólové GC/MS a LC/MS, magnetické sektory, kvadrupoly, iontové pasti, Orbitrap™, FT-ICR, ICP/MS), Varian (GC/MS, MS/MS a MS<sup>n</sup> s iontovými pastmi), Waters (HPLC/MS, kvadrupoly, TOF, magnetické sektory, MS/MS, ICP/MS) a mnozí další.

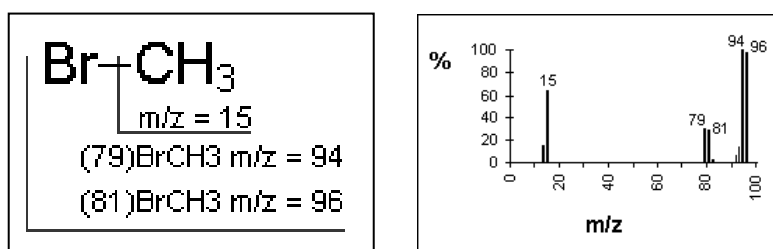
## 5.6. Kvantita v hmotnostní spektrometrii

Pro kvantifikaci látek v MS se převážně používá metoda vnitřního (interního) standardu: Interní standard (IST) pro stanovení určité látky je analogická sloučenina nebo homolog, aby IST měl co nejpodobnější chemicko-fyzikální vlastnosti jako stanovovaná látka, ale musí to být látka, která se ve zkoumaném vzorku nevyskytuje (např. pro analýzu mastných kyselin lze použít kyselinu pentadekanovou - má lichý počet atomů uhlíku, tedy nevyskytuje se v biologických vzorcích).

IST se přidává do vzorku již na začátku zpracování - pro potlačení vlivu matrice či kontaminace na účinnost ionizace analytu - do všech vzorků ve stejné známé koncentraci. Z MS spektra se po analýze vyhodnocuje poměr intenzit fragmentů typických pro stanovovanou látku a IST.

Pozn.: Pro kvantifikaci je vhodné použití selektivního záznamu iontů (SIM – Selection Ion Monitoring) – způsob, kdy přístroj registruje pouze několik zvolených fragmentů, což má za následek výrazné zvýšení citlivosti.

Nejpřesnějším postupem je metoda izotopového zředování (isotopic dilution MS, ID/MS), kde IST je izotopicky značený standard stanovované látky - má identické chemicko-fyzikální vlastnosti jako stanovovaná látka. Izotopický standard bývá nejčastěji deuterovaný.



Obr.100, 101: Příklad analýzy methylbromidu s IST (izotopově značený methylbromid). Z MS spektra se po analýze vyhodnocuje poměr intenzit odpovídajících fragmentů (79-81 a 94-96).

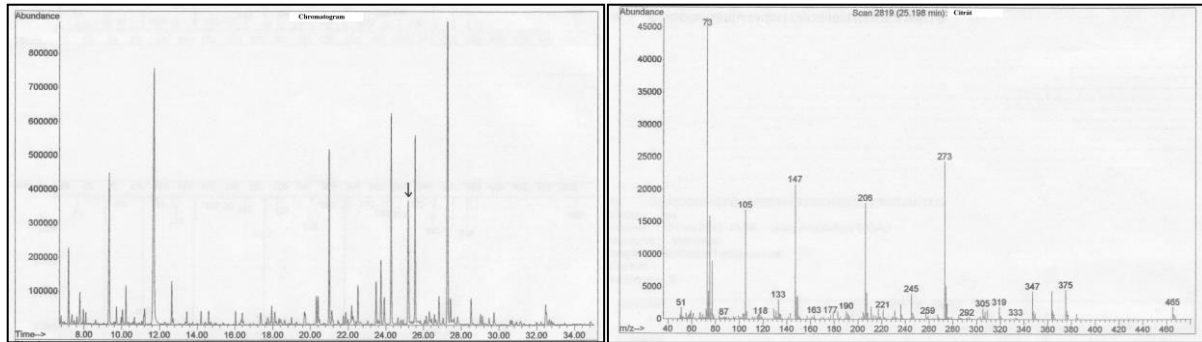
## 5.7. Praktické aplikace MS, MS/MS v klinické biochemii

### 5.7.1. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)

Hmotnostní spektrometrie se využívá např. pro analýzu neznámých složek směsi: složitá směs analytů je separována plynovou chromatografií a pro každou složku směsi (tj. pro každý pík chromatogramu) se získá hmotnostní spektrum v reálném čase. Identifikace složek (píků chromatogramu) se provádí na základě porovnání s databází spekter v počítači (k dispozici je

několik komerčně dostupných PC "knihooven" hmotnostních spekter, pro účel detekce neznámé složky směsi např. Wiley Registry of Mass Spectral Data).

GC/MS může dále sloužit k potvrzení či vyloučení určitých metabolitů, které svědčí pro určité metabolické onemocnění, případně jejich kvantifikaci. GC/MS techniky se staly standardem ve vyhledávání a potvrzování nox v toxikologické praxi (léky, drogy, anabolické steroidy), opět s využitím databází spekter (př. Pfleger Drug Library).



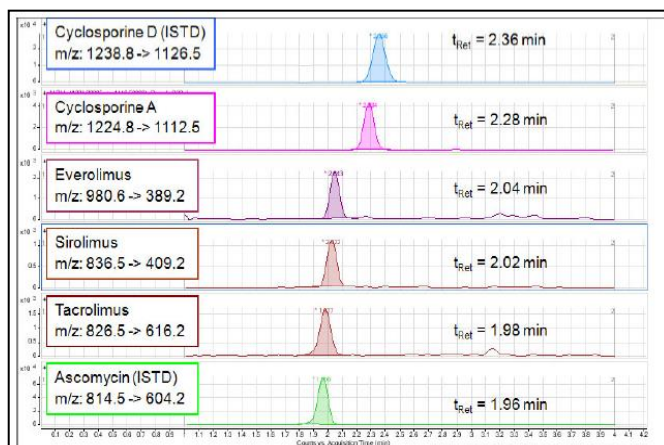
Obr.102, 103: Příklad analýzy organických kyselin v moči: Organické kyseliny byly ze vzorku moči extrahovány do ethylacetátu a po odpaření rozpouštědla derivatizovány silylací. Analýza byla provedena na GC/MS Agilent. Na obr.102 je plynový chromatogram, na obr. 103 je hmotnostní spektrum šipkou označeného píku na chromatogramu. Podle spektra byl pík identifikován jako citrát (s použitím Wiley databáze).

### 5.7.2. Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS, LC/MS/MS)

LC/MS, případně LC/MS/MS jsou považovány za toxikologický standard nejen při screeningu neznámých nox, ale i při potvrzení a kvantifikaci speciálních nox termolabilních a polárních látek nebo látek o vyšší molekulové hmotnosti (látky, které není možné analyzovat technikou GC/MS).

V klinické laboratoři se uvedené techniky uplatňují při stanovení léků, farmakokinetických studiích. Techniky LC/MS/MS umožnily rozvoj proteomiky a metabolomiky.

Na obrázku č.104 je příklad stanovení léků LC/MS (LC/MS/MS): jak je vidět z chromatogramu, analyzovaná imunosupresiva nelze za daných podmínek kapalinovou chromatografií dobře rozdělit - píky jednotlivých léčiv by se vzájemně překrývaly. Při napojení separace na hmotnostní spektrometrii je přístroj schopen registrovat fragmenty typické pro dané léčivo a tak rozlišit a stanovit i koeluované látky.



Obr. 104: Stanovení léků LC/MS (LC/MS/MS)

Obr. 105: LC/MS/MS - TSQ Quantum Access MAX firmy Thermo, uspořádání ESI - QqQ

### 5.7.3. Tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS (bez separační techniky)

#### 5.7.3.1. Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu

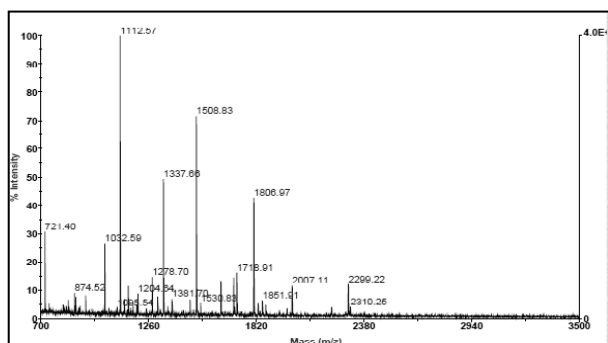
Tandemová hmotnostní spektrometrie jako samostatná metoda bez separační techniky se využívá např. při novorozeneckém screeningu dědičných metabolických poruch při stanovení koncentrací aminokyselin a acylkarnitinů ve výluhu ze suché krevní kapky na filtračním papíře (v ČR se touto metodou provádí screening 10-ti různých metabolických poruch, mezi nimi např. fenylketonurie).

Sledované látky jsou vyextrahovány do metanolu, derivatizovány butylací a analyzovány MS/MS na přístroji s uspořádáním ESI - trojitý kvadrupól (ESI-QqQ). Kvantifikace se provádí pomocí deuterovaných vnitřních standardů.

QqQ tandemové hmotnostní spektrometry by do budoucna měly umožnit multikomponentní analýzu - profily sacharidů, lipidů, fosfolipidů, organických kyselin a aminokyselin, stanovení skupin léků v jedné analýze, stanovení nízkomolekulárních markerů na úrovni referenčních metod (př. glukóza, kreatinin, kyselina močová)

#### 5.7.3.2. MALDI - TOF/TOF

Technika MALDI - TOF/TOF se používá pro proteinovou analýzu, např. analýzu neznámého proteinu: Protein (vyseparovaný ze směsi např. dvourozměrnou elektroforézou) se rozštěpí enzymem (např. trypsinem) na směs peptidů. Tato směs peptidů se nechá vykristalizovat s maticí na MALDI destičce a je podrobena analýze na přístroji s uspořádáním MALDI - TOF - kolizní cela - TOF. První TOF analyzátor vybírá prekursorový ion (peptid), který vstupuje do kolizní cely. V kolizní cele dojde k fragmentaci iontu - peptidu na jednotlivé aminokyseliny (srážkou iontu s atomy inertního plynu) a spektrum fragmentů je měřeno druhým TOF analyzátozem.



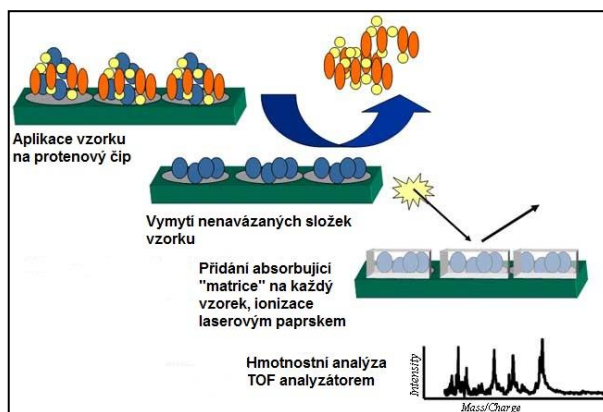
Obr.106: *Spektrum peptidů z TOF/TOF*

Obr.107: *MALDI-TOF/TOF analyzátor*

### 5.7.4. SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption Ionization

SELDI je technika analýzy proteinů pomocí vazby na předpřipravený povrch pevné fáze proteinového čipu, kombinuje afinitní princip a MALDI. Povrch proteinového čipu může být tvořený protilátkou, receptorem, ligandem, může být chemickým způsobem upravený, takže po nanesení vzorku na čip se proteiny ze vzorku (sérum, moč, mozkomíšni mok) navážou k povrchu adsorpcí, elektrostatickou interakcí, na afinitním principu apod. Nenavázané složky směsi se odstraní promytím čipu a následuje stejná analýza jako v případě MALDI-TOF. Čipy mohou být vyrobeny dle požadavku zákazníka (CIPHERGEN Biosystems)

Vzorek komplexní směsi proteinů může být analyzován současně na několika různých typech povrchů tak, aby byly navázané a analyzovány veškeré proteiny ve vzorku. Výsledkem analýzy pak není stanovení pouze jednoho proteinového markeru určité choroby, ale celý proteinový profil související s určitou chorobou.



Obr.108: *Princip SELDI*



Obr.109: *SELDI - TOF (CIPHERGEN)*

### 5.7.5. Indukčně vázaná plazma (ICP-MS)

ICP-MS se používá pro analýzy stopových prvků nebo těžkých kovů. Toxicita nebo biologické účinky těchto prvků však závisí na formě, ve které jsou prvky v organismu přítomny a je důležité znát spíše koncentraci toxických forem těchto prvků, nikoli jejich celkovou koncentraci. Za tímto účelem se ICP-MS kombinuje s GC nebo LC za účelem separace sloučenin obsahujících daný prvek před MS analýzou.

## 6. Atomová absorpční

### 6.1. Historie AAS

První pozorování a objevy směřující k AAS pocházejí z počátku 19. století.

Původ tmavých čar nalezených při pozorování slunečního spektra (Fraunhofer 1815) byl vysvětlen absorpcí ze spojitého záření sluneční atmosférou (Brewster 1820). Vztah mezi emisí a absorpcí vyjádřil **Kirchhoffův zákon, podle kterého atom emitující určité záření může při téže vlnové délce toto záření absorbovat**. Objev AAS jako analytické metody se přisuzuje Walshovi, který v roce 1955 vystavoval poprvé atomový absorpční spektrometr v Melbourne.

U nás se komerční přístroje začaly používat v roce 1962 (Techtron). Ke zdokonalování a vývoji systémů AAS významným způsobem přispěl ruský vědec L'vov. Největší přínos pro vývoj a praktickou aplikaci AAS s ETA je spojen se jménem Hans Massmann.

### 6.2. Atomová spektra

Atomy mohou elektromagnetické záření určité energie pohlcovat (absorbovat) nebo vysílat (emitovat). Energie atomů v různých stavech jsou určeny především výskytem elektronů v určitých energetických hladinách. Při absorpci nebo emisi záření dochází k přechodu elektronů mezi energetickými hladinami. Jednotlivé stavy atomů se liší energií podle toho, na kterou hladinu byl elektron excitován. Při přechodu mezi jednotlivými stavy atomu může atom absorbovat nebo emitovat foton, jehož energie je rovna úbytku nebo přírůstku energie atomu  $E$  podle Planckova vztahu

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu$$

kde:  $E_2$ ;  $E_1$  jsou energie atomu ve vyšším a nižším energetickém stavu

$h$  Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34}$  J s)

$\nu$  frekvence vyzařeného nebo absorbovaného záření

K excitaci může dojít buď absorpcí elektromagnetického záření, předáním energie elektrickým výbojem nebo zahřátím na vysokou teplotu apod. V excitovaném stavu zůstává atom jen velmi krátce;  $10^{-8}$  s.

Při termické excitaci za teploty pod  $2700^\circ\text{C}$  a pro  $\lambda < 500$  nm je počet excitovaných atomů zanedbatelný k počtu atomů v základním stavu. Pro AAS z toho vyplývá, že počet atomů v základním stavu je téměř identický s celkovým počtem volných atomů. Za teplot využívaných v AAS je tedy hlavním stavem atomů základní stav.

### 6.3. Měření absorpce; Lambertův-Beerův zákon

Různé atomy absorbují záření ve velmi úzkém spektrálním intervalu. V tomto intervalu 0,0005-0,005 musí primární zdroj záření emitovat vysokou zářivou energii. Proto se používá emitovaného záření téhož prvku, který stanovujeme.

Mezi původním (primárním) tokem záření  $\Phi_0$  a absorpcí atomů oslabeným zářením  $\Phi$  platí Lambertův-Beerův zákon

$$\Phi = \Phi_0 \cdot e^{-\kappa \cdot N \cdot l}$$

kde  $\kappa$  je atomový absorpční koeficient;  $l$  délka absorpčního prostředí a  $N$  počet atomů v základním stavu v jednotce objemu

Po úpravě

$$A = \log \Phi_0 / \Phi = 0,434 \kappa \cdot N \cdot l$$

kde  $A$  je absorbance.

AAS je metodou relativní. Hodnoty absorbance pro vzorek jsou porovnávány s hodnotami absorbance standardů formou kalibrační křivky.

Důležitými parametry pro hodnocení metody AAS jsou **citlivost, mez detekce a mez stanovitelnosti**.

### 6.3.1. Citlivost

se posuzuje podle směrnice kalibrační křivky. V AAS se navíc udává „charakteristická koncentrace“, což je koncentrace vyvolávající absorpční 0,0044. Charakteristická koncentrace je jednou z cenných ukazatelů správné funkce a nastavení spektrometru i správné přípravy kalibračních roztoků.

### 6.3.2. Mez detekce

určuje nejmenší koncentrace analytu ve vzorku, kterou můžeme detekovat. Mezi detekce odpovídá signál rovný trojnásobku směrodatné odchylky ( $3 \cdot SD_0$ ) signálu nulového vzorku (blanku).

### 6.3.3. Mez stanovitelnosti

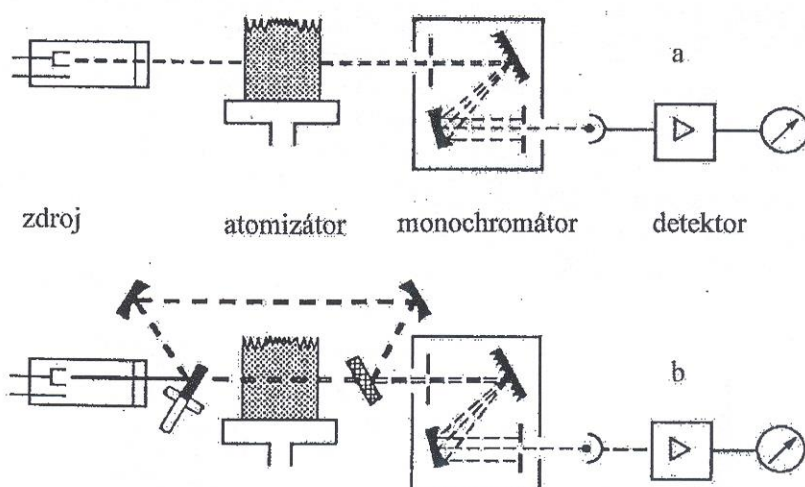
se používá pro reálné vzorky, které odpovídá signál rovný desetinasobku směrodatné odchylky ( $10 \cdot SD_0$ ) signálu nulového vzorku (blanku).

## 6.4. Atomový absorpční spektrometr

Atomový absorpční spektrometr je přístroj, který měří absorpci primárního záření volnými atomy v základním stavu. Rozlišujeme jednopaprskové a dvouprskové přístroje.

**Jednopaprskový systém (a)** má větší optickou propustnost a tím i nižší šum signálu a lepší meze detekce. Má však nižší stabilitu systému a nelze eliminovat kolísání intenzity primárního zdroje záření (obr. .

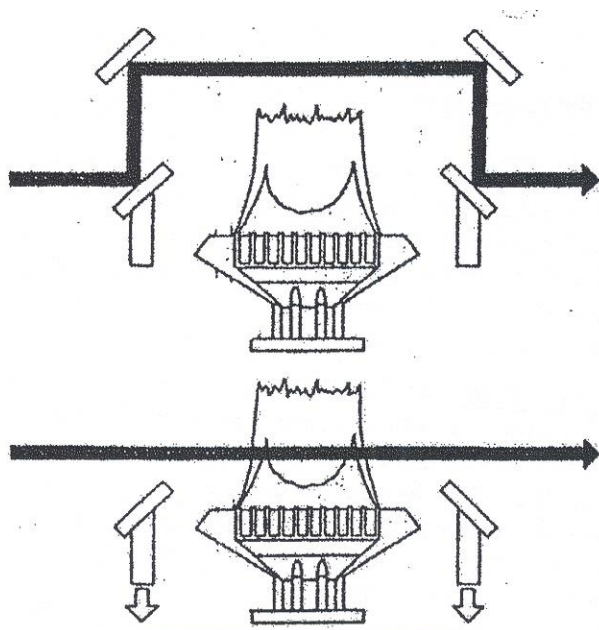
**Dvouprskový systém (b)** má naopak vysokou stabilitu, avšak dochází k větší ztrátě primárního záření . Paprsek z primárního zdroje se střídavě propouští přes atomizér (absorpční prostředí) a mimo (referenční paprsek) a to pomocí dalších optických prvků, zrcadlových přerušovačů nebo děličů.





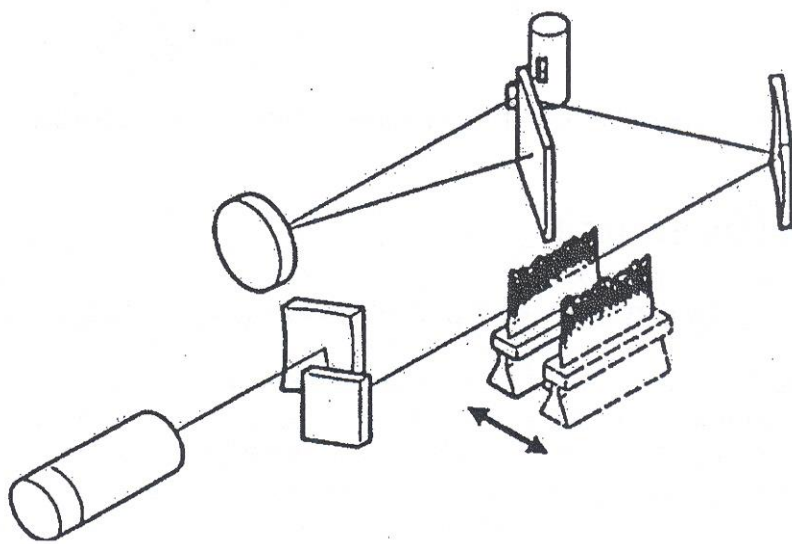
Vedle těchto klasických systémů byly také vyvinuty systémy s dvoupraskovou charakteristikou. Např. s využitím tzv. **Stockdalovy optiky**, t.j. vychýlení měrného paprsku pohyblivými vychylovacími zrcadly před měřicí periodou mimo absorpční prostředí ke změření referenčního signálu. Během vlastního měření se pracuje v jednopaprskovém režimu.

Obr. č. 110



Obdobný systém používá pohyblivého hořáku a jeho vysunutí nebo zasunutí do optické dráhy jednopaprskového spektrometru.

Obr. č. 111



## 6.5. Zdroje primárního záření

Primární záření, které má být atomy sledovaného prvku absorbováno, musí mít vysokou zářivou energii soustředěnou do úzkého spektrálního intervalu, dlouhodobě stabilní zářivý tok  $\Phi_0$ , čáry nesmí být deformovány samoabsorpcí a pozadí musí být minimální.

Toto nejlépe splňují čarové zdroje realizované spektrálními výbojkami s parami kovů a zejména výbojky s dutou (HCL) katodou nebo vysokofrekvenční bezelektrodové výbojky (EDL).

Použití zdroje spojitého spektra ve spojení s monochromátorem s vysokou rozlišovací schopností je rovněž možné, ale méně běžné.

Lasery zejména laditelné, mají řadu přesností, jejich vysoká zářivá energie pak nachází uplatnění v AFS.

### 6.5.1. Výbojky s dutou katodou (Halow Catode Lamp...HCL)

Výbojky s dutou katodou jsou nejpoužívanějšími zdroji primárního záření, emitují čarové spektrum s pološířkou čar obvykle  $<0,002$  nm (obr.1). Výstupní okénka jsou z optického křemene pro  $\lambda < 240$  nm, z UV skla pro  $\lambda = 240-300$  nm a z optického skla pro  $\lambda > 300$  nm.

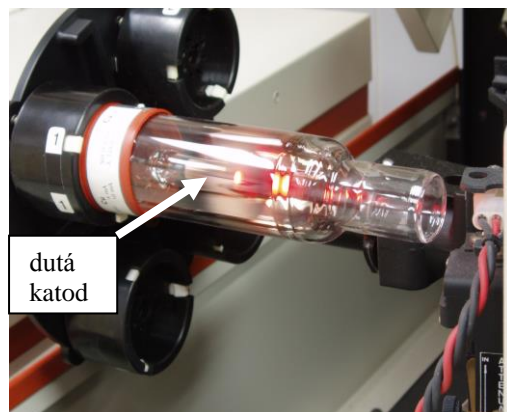
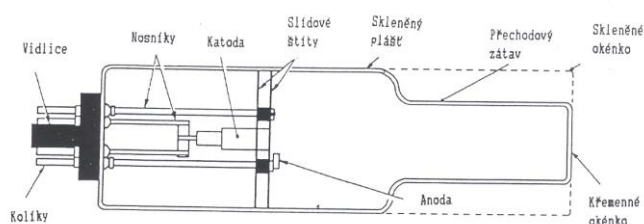
Dutá katoda je buď vyrobena přímo z vysoce čistého sledovaného prvku, nebo je na nosné katodě, vyrobené z kovu s relativně chudým emisním spektrem (Al, Cu) upevněna fólie ze stanovovaného prvku.

obr.112

*Výbojka s dutou katodou*

Anoda je vyrobena z kovu s vysokou teplotou tání (Zr, Ti, Ta).

Výbojky jsou plněny čistým monoatomickým plynem (neon, argon) na tlak 100-500 Pa.



Mezi katodu a anodu je vložen potenciálový rozdíl stovek voltů (200-600 V) a výbojka je napájena proudem jednotek miliampérů (3-10 mA). Ve výbojce probíhá nízkotlaký doutnavý výboj, při kterém dochází k ionizaci vzácného plynu srážkami s urychlenými

elektrony. Kladně nabitě ionty vzácného plynu bombardují povrch katody a vyrážejí odtud atomy kovu. Dochází tak ke katodickému rozprašování materiálu katody. Atomy kovu jsou excitovány srážkami s ionty a elektrony plazmatu a vyzářením fotonů se vracejí do základního stavu.

U výbojek s vysokou zářivou energií (např. Superlampy f. Photron) se využívá zvýšení intenzity jejich záření dalším výbojem mezi dvěma pomocnými elektrodami před ústím katody. Tyto výbojky se vyznačují vyšší intenzitou záření a tedy lepším poměrem signál/šum a tím i nižší hodnotou dosaženého detekčního limitu.

### **6.5.2. Bezelektrodové výbojky (EDL)**

Jsou opět skleněné baňky s křemenným výstupním okénkem plněné vhodným množstvím prvku ve směsi jako kov a těkavá sloučenina (např. halogenid kovu) s inertním plynem. Výbojky jsou umístěny v cívce radiofrekvenčního generátoru nebo v rezonanční dutině mikrovlnného generátoru; oba tyto generátory dodávají energii k vytvoření stabilního elektrického výboje. Bezelektrodové výbojky emitují velmi úzké čáry s intenzitou až o řád vyšší než výbojky s dutou katodou. Toto zvýšení intenzity záření je důležité především u prvků, které mají rezonanční linie pod 200 nm (As, Se, Pb..), kdy se podstatně uplatňuje absorpce záření okolní atmosférou, plamenem a optickým systémem.

### **6.5.3. Laditelný barvivový laser.**

Je ideálním zdrojem primárního záření pro vlnové délky nad 300 nm. Jeho záření je vysoce monochromatické, dokonale koherentní (umožňuje velmi dlouhé optické dráhy) a dosahuje vysoké hustoty zářivého toku. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady.

### **6.5.4. Speciální zdroje.**

Vysokovýkonné zdroje kontinuálního primárního záření, jako vysokotlaké xenonové obloukové výbojky a polovodičové laserové diody. Výbojky mohou být využity jen ve spojení s vysokorozlišovacím optickým systémem, např. Echelle polychromátorem.

## **6.6. Atomizátor**

Atomizátor je zařízení schopné s dostatečnou účinností přeměnit stanovovaný prvek (analyt) na atomovou páru atomů v základním stavu.

Základním požadavkem na atomizér je, aby poskytoval co nejvyšší koncentraci volných atomů v základním energetickém stavu, a aby byla zajištěna úměrnost mezi touto koncentrací atomu a koncentrací stanovovaného prvku ve vzorku.

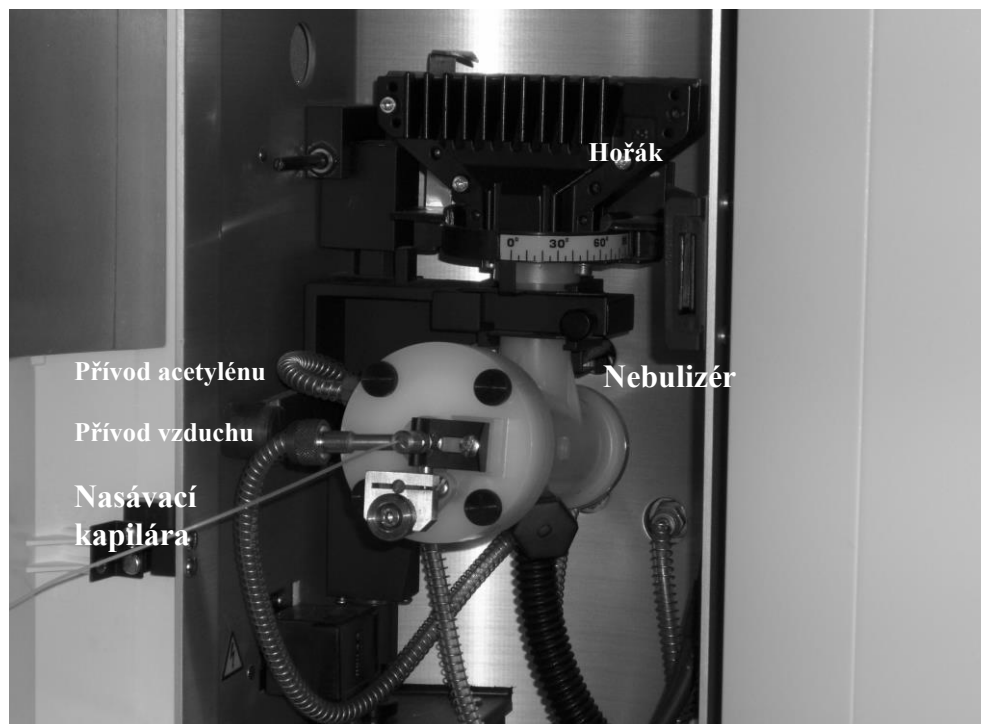
Atomizaci je možné provádět v plameni, elektricky nebo v křemenných atomizátorech.

Jednotlivé způsoby se liší jak provedením, tak citlivostí a časovou závislostí měřeného signálu.

### **6.6.1. Plamenová technika**

Při plamenové technice se používá plamenů realizovaných směsí paliva a okysličovadla. Palivem je nejčastěji acetylén a oxidovadlem vzduch ( $T_{\max} = 2500^{\circ} \text{K}$ ) nebo oxid dusný ( $T_{\max} = 2900^{\circ} \text{K}$ ).

V AAS se převážně používá laminárních předmíchaných plamenů; tzn. že do hořáku je vedena předem promíchaná směs paliva a okysličovadla. Používá-li se místo okysličovadla inertní plyn, označují se plameny jako difuzní (k hoření dochází difuzí kyslíku z okolní atmosféry). Zavádění kapalného vzorku do plamene se provádí nejčastěji pomocí pneumatických zmlžovačů, kde dochází k vytvoření aerosolu drobných kapek zkoumaného roztoku.



Obr. 113 Nebulizér s nasávací kapilárou, přívody plynů a hořákem

Vzorek je přiváděn nasávací kapilárou do mlžné (míchací) komory, kde dochází na tříštivé kuličce k roztržení větších kapiček na menší. Jemný aerosol (velikost částic 2 až 5  $\mu\text{m}$ ) se v proudu oxidantu smísí s topným plynem a je unášen do ústí hořáku. Účinnost pneumatických zmlžovačů je velmi nízká (okolo 10 %), pouze malá část vzorku se zmlží na aerosol, velká část vzorku odkape do odpadu. Účinnost zmlžovače závisí na rychlosti proudění oxidantu, který strhává roztok od ústí kapiláry a je ovlivněna i fyzikálními vlastnostmi použitého rozpouštědla (viskozita, povrchové napětí). Nevýhodou pneumatických zmlžovačů je také poměrně značná spotřeba vzorku ( $\sim 5 \text{ ml/min}$ ).

Tuto spotřebu lze značně snížit, pracujeme-li technikou průtokové injekční analýzy, kdy je do proudu nosného rozpouštědla (voda, kyselina) dávkován pomocí ventilu malý objem vzorku (100  $\mu\text{l}$ ), signál pak není konstantní v čase, ale má tvar píku.

Účinnost zmlžování je možné zvýšit pouze použitím jiného typu zmlžovače. V technice AAS nachází uplatnění vysokotlaký hydraulický nebulizér. Jedná se o velmi tenkou kapiláru, kterou proudí nosný proud (voda, kyselina), do které je dávkován vzorek. Nosný proud je čerpán HPLC pumpou. Lineární rychlost proudění v této úzké kapiláře, je natolik velká, že na jejím konci se ve styku s tříšticí kuličkou přímo tvoří velmi jemná mlha aerosolu s velmi malým průměrem částic. Účinnost tohoto typu zmlžovače může dosáhnout až 90 %.

#### 6.6.1.1. Hořák

Hořáky se používají štěrbinové (délka absorpčního prostředí 5-10 cm), šířka štěrby 0,5 mm; materiál ocel a titan, nebo s řadou otvorů umístěných v několika řadách.

Po vstupu aerosolu do plamene dochází k řadě pochodů. V řadě případů atomizace neprobíhá úplně, protože některé sloučeniny kovů tvoří disociující molekuly (např. křemičitany, oxidy). Schopnost disociace sloučenin je posuzována podle hodnoty jejich disociační energie, je-li nižší než asi 3,5 eV, stačí pro atomizaci použití plamene o nižší teplotě (směs acetylén-vzduch). Disociace řady prvků lze též podpořit přísadky tzv. uvolňovacích činidel (spektrochemických pufrů).

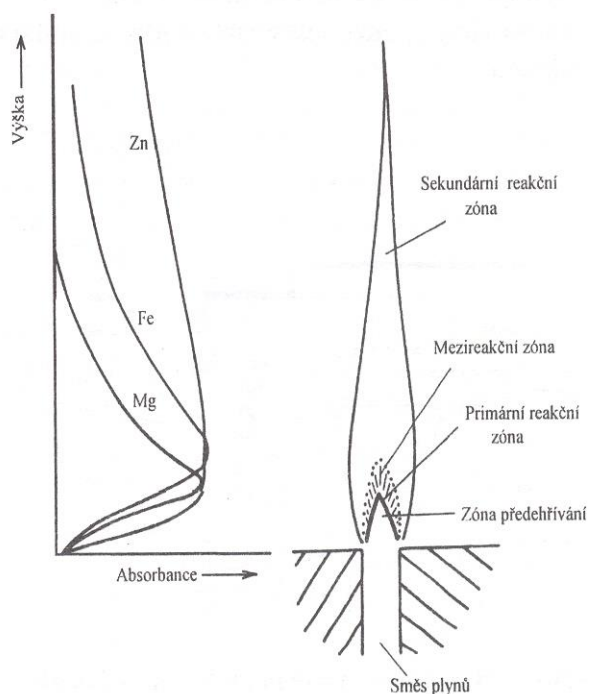


Obr. 114 Atomizér s hořákem

Koncentrace volných atomů není ve všech částech plamene stejná. Proto je nutné znát tzv. plamenový profil, což představuje rozložení velikosti měřeného signálu prvku (za jinak konstatních experimentálních podmínek) v závislosti na výšce měření nad hořákem.

### 6.6.1.2. Struktura plamane

Nejdůležitější oblastí plamene využívanou pro měření je oblast nad primární reakční zónou a mezireakční zóna, kde je dosahováno nejvyšší koncentrace volných atomů. Touto částí plamene pak musí procházet optická dráha spektrometru (obr.č. 115)



V zóně předehřívání se topné plyny zahřívají na zápalnou teplotu (šířka 0,01-0,1 mm). Na tuto zónu navazuje primární reakční zóny v níž se velmi složitými reakcemi tvoří silně reaktivní radikály, které jsou základem procesu hoření. Tato zóna je zdrojem intenzivního molekulárního záření, je velmi tenká (0,1 mm) a její velikost lze ovlivnit změnou průtoku paliva. Nad touto zónou se pak nachází sekundární reakční zóna, kde dochází k difuznímu hoření. V redukčních plamenech se mezi primární a sekundární reakční zónou vyskytuje mezireakční

zóna, která vykazuje velmi nízkou koncentraci kyslíku, a která je zvláště patrná u plamene acetylén-oxid dusný.

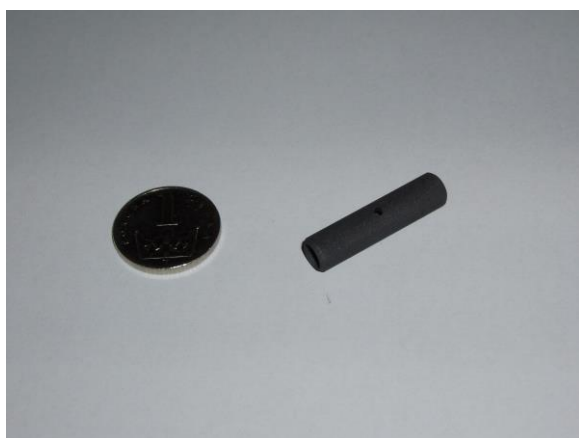
Obr. 115 *Struktura plamene-acetlén/vzduch*

Hlavním nedostatkem plamenových atomizátorů je fakt, že se vzorek silně naředí spalnými plyny (200-400 tisíckrát), a že se pouze nepatrný podíl analyzovaného vzorku skutečně využije pro analýzu.

Plamenové analyzátoary se používají při analýzách větších obsahu analytu ve vzorku, kdy se využije vysoká rychlost měření (integrační čas odečtu ustáleného signálu bývá 5s) a menší vliv interferencí matrice vzorku na rozdíl od ETA. Konstrukční uspořádání s plamenovým atomizátorem je také jednodušší a tedy levnější.

### 6.6.2. Elektrotermické atomizátory ....ETA

Při ETA se dávkuje velmi malé množství vzorku (3-20  $\mu$ l) do speciální miniaturní odporově vyhřívané kyvety. (obr. 116)

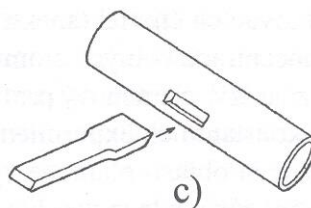
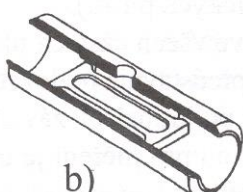
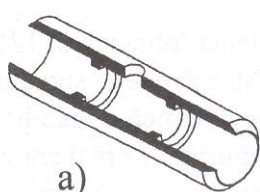


Hlavní výhodou bezplamenových atomizátorů je fakt, že se celé nadávkované množství vzorku podílí na absorpci primárního záření; dosáhneme tedy mnohem vyšší okamžitou koncentraci volných atomů v plynné fázi ve velmi malém objemu atomizátoru. Kyvety musí být vyrobeny z elektricky a teplotně vodivého materiálu, který musí být mechanicky odolný a chemicky netečný i při vysokých teplotách. Ze všech dostupných materiálů se těmto požadavkům nejvíce přibližuje grafit. Tzv. elektrografický uhlík

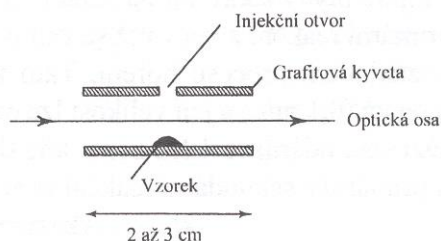
má však některá nevýhody. Největší nevýhodou je jeho pórovitost a reaktivita, která se projevuje tvorbou karbidů s některými prvky. Tyto nevýhody byly z největší části odstraněny vytvořením povlaku pyrolytického grafitu na stěnách kyvety. Tento postup je nyní používán všemi významnými výrobci grafitových kyvet.

Vzorek můžeme dávkovat (obr. č. 117)

- a) na stěnu kyvety
- b) na platformu



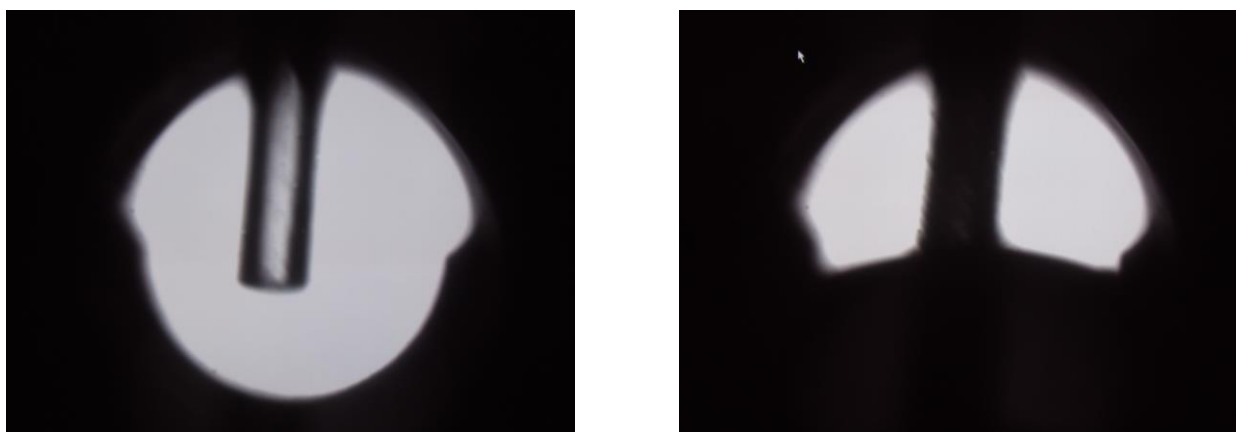
c) na  
sondu



K atomizaci nadávkovaného vzorku dochází postupným ohřevem kyvety průchodem elektrického proudu (kyveta se chová jako elektrický odpor). Grafitová kyveta je umístěna v absorpčním spektrometru. Elektrotermický ohřev kyvety probíhá v atmosféře velmi čistého argonu (zevně i uvnitř kyvety), aby se zabránilo přístupu kyslíku ze vzduchu k rozžhavenému grafitu a volným atomům analytu. Druhou funkcí proudícího inertního plynu je usnadnění odvětrání vnitřního prostoru kyvety (horním dávkovacím otvorem) od rozpouštědla ve fázi sušení a zplodin mineralizace ve fázi zpopelnění.

Vzorek je do kyvety dávkován buď pomocí mikrodávkače nebo dnes již standardně programovým dávkovačem, který je příslušenstvím elektrotermického atomizátoru.

Autosampler řízený mikroprocesorem umožňuje naprogramovat a standardně provádět pipetování mikrolitrových objemů vzorku, diluentu a modifikátorů. Jednotlivé komponenty jsou postupně nasávány do teflonové kapiláry odděleny vzduchovými bublinkami, aby ke smíchání došlo až při jejich vydávování na stěnu kyvety nebo na platformu. Zásadně nutným požadavkem je správné vycentrování dávkovací kapiláry a její výška nade dnem kyvety s ohledem na dávkovaný objem. Adjustaci kapiláry usnadňuje u některých přístrojů mikrokamera zavedená do kyvety. Ta umožňuje rovněž sledování průběhu dávkování, sušení a mineralizace uvnitř kyvety (obr.118)



Obr. 118 *Centrování dávkovací kapiláry v kyvetě; sledování procesu dávkování na stěnu kyvety*

### 6.6.2.1. Teplotní program kyvety (ETA)

Po nadávkování vzorku je teplota kyvety zvyšována v několika krocích – podle teplotního programu (Tab. 7).

*Tento program je složen z několika stupňů,*

- 1) ohřev kyvety pod teplotu varu rozpouštědla - dojde k vysušení vzorku
- 2) ohřev kyvety na teplotu pyrolýzy - v této fázi dojde k odstranění co největší části matrice vzorku, anorganických solí a nerozložených organických zbytků matrice
- 3) ohřev kyvety na teplotu atomizace - v této fázi dochází k vytvoření oblaku plynných atomů sledovaného analytu v základním energetickém stavu a absorpci primárního záření těmito atomy
- 4) krátkodobé zahřátí kyvety nad teplotu atomizace - v této fázi dojde k vyčištění kyvety
- 5) ochlazení kyvety na hodnotu počáteční teploty a kyveta je připravena pro nový cyklus

Fáze		teplota [°C]	čas [s]	rampa [°C/s]	inert.plyn průtok [l/min]
sušení	1	95	45	10	0,2
	2	110	20	5	0,2
	3	130	15	10	0,2
mineralizace	4	1100	20	150	0,2
atomizace	5	2300	3	0	0
vypálení kyvety	6	2700	3	0	0,2

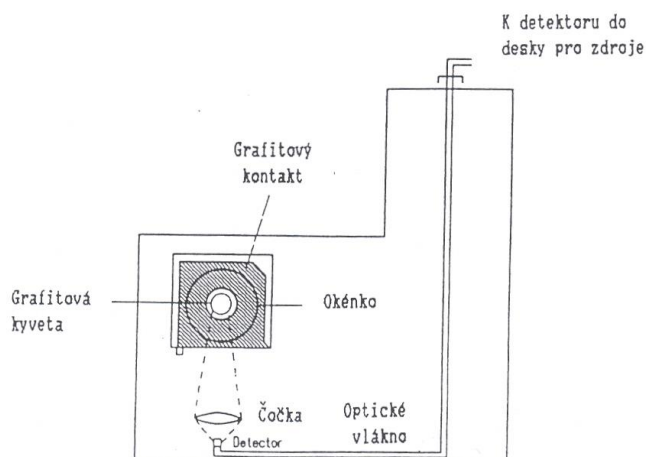
Tab 7.

*Příklad teplotního programu; rampa vyjadřuje rychlost nárůstu teploty k dosažení teploty dalšího stupně*

Pro mechanismus atomizace v ETA platí v podstatě analogické úvahy i procesy, jako při atomizaci v plameni. Analytický signál registrujeme ve třetí fázi teplotního programu – po dobu ohřevu na teplotu atomizace a vlastní atomizace ( asi 5 s). Teplotní program pro stanovení daného prvku v dané matrici vzorku je individuální a musí být vždy pro daný přístroj optimalizován. K tomu slouží konstrukce tzv. rozkladné atomizační křivky, která určí optimální rozkladnou a atomizační teplotu s ohledem na stanovovaný prvek a charakter vzorku (matrici).

### 6.6.2.2. Monitorování a řízení teploty v kyvetě

Exaktně stanovený optimální teplotní program kyvety při ETA je rozhodující pro správný analytický výsledek. Z toho důvodu je nutné nastavené teplotní průběhy monitorovat. Do 600°C je teplota v kyvetě odvozována od procházejícího proudu. Pro teplotní rozsah 600-3000°C se používá optický pyrometr realizovaný křemíkovou fotodiodou, která má extrémně rychlou odezvu a je schopna zpětnovazebně regulovat hodnotu procházejícího proudu a tím i teplotu kyvety. Schematické znázornění tohoto systému je na obr. 119.



Obr. 119

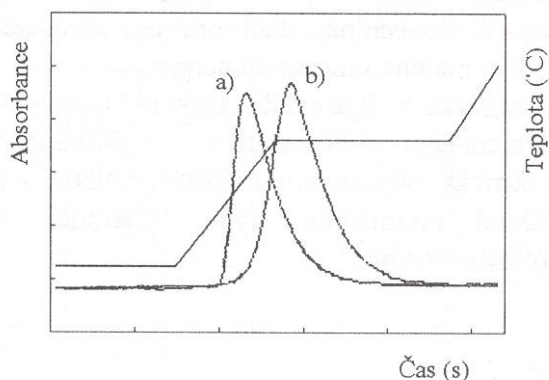


Radiace z grafitové kyvety (červený až bílý žár) se fokusuje čočkou umístěnou pod kyvetou na jeden konec optického vlákna. Optické vlákno je vedeno ke křemíkové fotodiodě.

Výsledný signál má tvar píku; kvantitu posuzujeme měřením výšky nebo plochy píku. Vzestupná část absorpčního píku je funkcí vstupu plynného analytu z podložky do objemu analyzátoru a sestupná část je funkcí výstupu plynného analytu z kyvety. Aby bylo dosaženo co největší citlivosti, probíhá atomizace (a tím i měření píku) v modu zastavení průtoku inertního plynu. V tomto případě není uvolněný plynný analyt ihned odnášen inertním plynem mimo malý objem měřicí kyvety. Ze stejného důvodu je také nutné, aby k uvolňování analytu z podložky ve fázi atomizace došlo až tehdy, kdy se již nemění teplota plynné fáze a tedy, kdy již nedochází k rozpínání plynů. Při splnění těchto podmínek mluvíme o tzv. izotermické atomizaci. Podmínek izotermické atomizace můžeme nejlépe dosáhnout atomizací analytu z platformy.

### 6.6.2.3. Izotermické podmínky.

Platforma je malá tenká destička, která je vložena do kyvety a její styčná plocha se stěnami kyvety je velmi malá (pouze bodová). Energetický přenos z vnitřní stěny kyvety na platformu se děje především zářením; tím je aktuální teplota platformy nižší ve srovnání s aktuální teplotou kyvety a analyt přechází do plynné fáze později (a za izotermických podmínek) než při atomizaci ze stěny kyvety (Obr. 120)



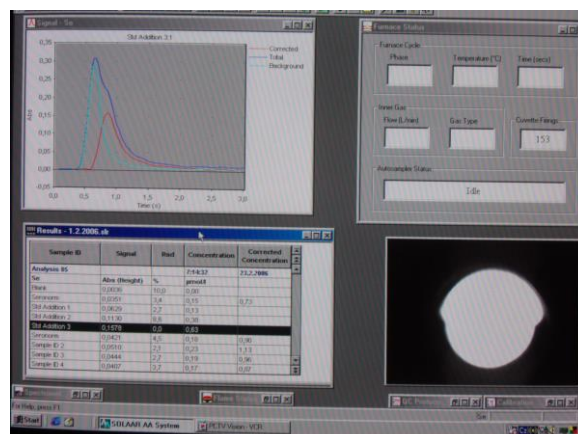
Obr. 120

Časový posun nárůstu a maxima atomizační teploty s použitím platformy; **b**).

Na napájecí zdroj elektrotermického atomizátoru jsou kladeny značné nároky. Grafitovou kyvetou prochází ve fázi ohřevu na atomizační teplotu (nárůst teploty až 2000 °C.s

<sup>-1</sup>) proud 500-1500 A při napětí mezi grafitovými elektrodami 3 -10 V.

Dnes je celý proces dávkování vzorku, nárůst teploty a monitorování signálu řízen počítačovým softwarem obr. 121.



Obr. 121

*Obrázovka řídicího počítače.*

V horní polovině grafický záznam měřeného signálu a monitorování probíhajícího teplotního programu.

V dolní části číselné výsledky měření a video-pohled do nitra grafitové kyvety

Hlavní výhodou Elektrotermického atomizátoru ve srovnání s plamenový atomizátorem je značné zvýšení citlivosti měření a snížení detekčního limitu. S ETA můžeme pro daný prvek dosáhnout až o 3 řády nižší detekční limit. Při práci s grafitovou kyvetou se však na rozdíl od plamene mnohem více projeví možné interference matrice a nutnost kompenzace pozadí.

### 6.6.3. Hydridová technika

Při technice generování a atomizace těkavých sloučenin se nejdříve chemickou reakcí převede stanovovaný analyt na těkavou sloučeninu. Tato sloučenina, nejčastěji hydrid, se oddělí od matrice vzorku a je atomizována ve speciálním křemenném atomizátoru, který je umístěn v optické ose AAS. Generace těkavých hydridů je omezena jen na hydridotvorné prvky (As, Se, Te, Ge, Bi, Sn, Sb, Pb). Pro převedení analytu na hydrid je nejčastěji používáno redukční činidlo tetrahydridoboritan sodný  $\text{NaBH}_4$  (stabilizovaný roztokem NaOH v prostředí různé koncentrované kyseliny (nejčastěji HCl).

## 6.7. Disperzní systém

### 6.7.1. Reflexní difrakční mřížka

Jako monochromátoru, sloužícího k izolaci spektrálního intervalu, ve kterém se nachází příslušná absorpční rezonanční čára sledovaného prvku, se většinou užívá interferometricky zhotovených (holografických) mřížek pro rozsah vlnových délek 190 až 900 nm. Mřížkové monochromátory se v AAS užívají téměř výhradně konstrukce *Czerny-Turner*

Nároky na jejich rozlišovací schopnost nejsou příliš veliké, protože zdroj primárního záření emituje dostatečně úzké čára.

### 6.7.2. Optický hranol

Nejstarší disperzní prvek, optický hranol, využívající rozdílného lomu různých vlnových délek se pro svoji malou účinnost již nepoužívá. Svoje uplatnění však nachází v současné době v tzv. *Echelleho* uspořádání, které kombinuje optický hranol jako vstupní člen a za něj se umísťuje optická mřížka, která primárně rozložené světlo ještě dále jemně disperguje.

Štěrbiny (vstupní a výstupní) monochromátoru jsou zpravidla zpřažené. Spektrální interval je nutné volit tak, aby byl zajištěn dostatečně velký tok záření a současně, aby na detektor neprocházelo záření blízkých (neabsorbovaných) čar spektra z primárního zdroje. Volba spektrálního intervalu je u přístroje pro AAS zpravidla v rozmezí 0,1-2,0 nm.

## 6.8. Detektory; fotonásobič

Pro detekci záření se využívá především fotonásobič. Výhodou fotonásobiče je vysoká citlivost a velmi nízká časová konstanta ( $10^{-8}$  -  $10^{-9}$  s). Závislost výstupního proudu na intenzitě zářivého toku je lineární přes 5-6 řádů. Celkový registrovaný proud fotonásobiče je součtem těchto složek

a) temného proudu fotonásobiče;

- b) proudu odpovídajícího záření emitovaného atomizátorem (plamen, stěny kyvety);
- c) vlastního proudu vyvolaného dopadem primárního záření.

Užitečnou informaci nese pouze třetí složka a je proto snaha oddělit ji od ostatních. Z toho důvodu se primární záření moduluje obdélníkovými pulsy (moduluje se napájecí proud výbojek – frekvence cca 500 Hz); střídavá složka je pak oddělena v synchronním demodulátoru, který je ovládán řídicími signály modulátoru. Řídicí signály ovládají tyto demodulační obvody tak, že jsou zesíleny pouze signály s frekvencí shodnou s modulační správnou fází. Tak se dosáhne odlišení signálů nesoucích potřebnou informaci od parazitních stejnosměrných signálů a zároveň se potlačí veškeré složky šumu, kromě šumu o frekvenci shodné s modulační. Výsledný signál je registrován buď analogovým zařízením nebo se převádí na digitální formu umožňující další matematické zpracování.

## **6.9. Korekce pozadí**

Primární záření může být při průchodu absorpčním prostředím zeslabeno nejen volnými atomy sledovaného prvku, ale i nespecifickou absorpcí (absorpcí pozadí). Absorpce pozadí je způsobena rozptylem světla na nevypařených pevných částicích a molekulární absorpcí. Rozptyl světla je velmi závislý na vlnové délce a projevuje se především v oblasti krátkých vlnových délek; molekulární absorpce se projevuje v celém rozsahu používaných vlnových délek. Molekulární absorpce je způsobena hlavně přítomností nedisociovaných molekul anorganických solí z rozloženého vzorku v optické cestě. Nespecifická absorpce se při měření přičítá k signálu analytu a vyvolává tak vždy pozitivní chybu, která může být značná zvláště při práci s ETA a malou koncentrací analytu ve vzorku. Vzhledem k aditivním vlastnostem absorpce můžeme pro získání správného výsledku odečíst od celkové absorpce signál pozadí.

**Korekci pozadí můžeme provádět sekvenčně nebo simultánně.**

### **6.9.1. Sekvenční korekce pozadí**

Sekvenční korekce pozadí se provádí dvojitým odečtem absorpce; při prvním měření se zjistí celková absorpce na vlnové délce analytu; při druhém měření se zjistí absorpce pozadí na jiné vlnové délce blízké čáře analytu (třeba i pomocí výbojky pro jiný prvek).

### **6.9.2. Simultánní korekce pozadí**

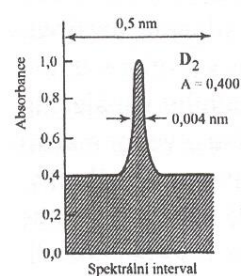
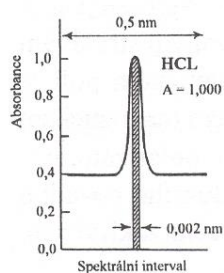
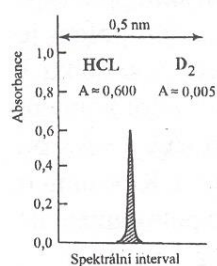
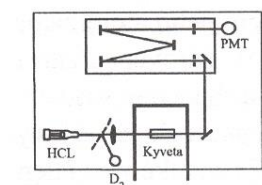
Simultánní korekce pozadí se u dnešních přístrojů provádí třemi způsoby:

- a) *pomocí kontinuálního záření s deuteriovou  $D_2$  výbojkou*
- b) *použití Zeemanova jevu přímého a inverzního*
- c) *metodou Smith-Hieftje*

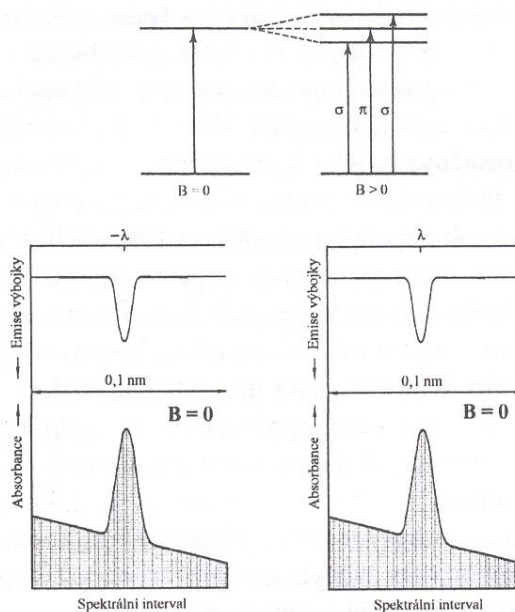
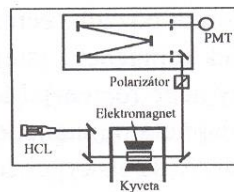
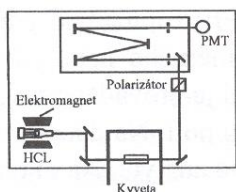
Schematické vysvětlení uvedených způsobů korekce pozadí je na obr. 123

## Kompence pozadí

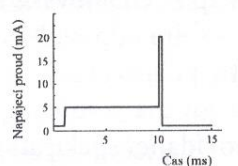
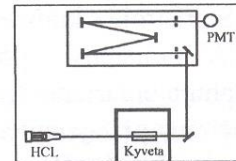
Systém s  $D_2$  výbojkou



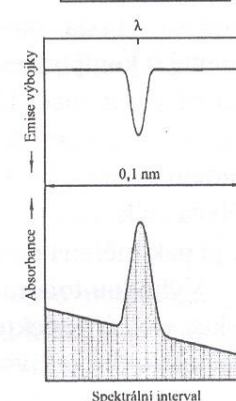
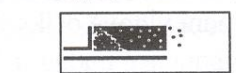
Systém Zeeman



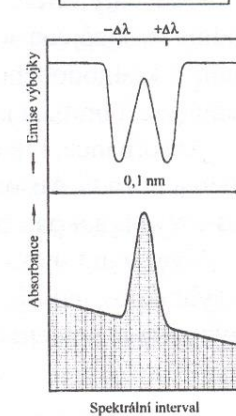
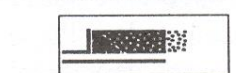
Systém Smith-Hieftje



Napájecí proud HCL: ≈ 5 mA



Napájecí proud HCL: ≈ 20 mA



### 6.9.2.1. Systém s deuteriovou výbojkou

Kompence pozadí se zdrojem kontinuálního záření je nejdéle používanou metodou a stále patří k nejpoužívanějším. Měření je prováděno tak, že absorpční prostředí je střídavě ozařováno (přes polopropustné zrcadlo s posunutím fáze modulace napájecího proudu obou

výbojek) výbojkou s dutou katodou a deuteriovou výbojkou. Na detektoru je registrován rozdílový absorpční signál, který odpovídá absorpci čistého analytu.

Na obr. Je také vysvětlen princip „deuteriové korekce“. Výstupní štěrbinou monochromátoru je izolován spektrální interval  $\Delta\lambda=0,5$ , kterým je z emisního spektra výbojky s dutou katodou vybrána rezonanční čára analytu  $\lambda$  a z kontinuální spektra deuteriové výbojky je izolován pás, odpovídající šířce spektrálního intervalu. Na počátku měření je upravena intenzita záření výbojky s dutou katodou a  $D_2$  výbojky na stejnou hodnotu.

Měříme-li signál analytu bez pozadí, pomocí výbojky s dutou katodou naměříme absorptanci  $A=0,600$ , která odpovídá skutečné koncentraci analytu. Měříme-li nyní signál tohoto analytu pomocí deuteriové výbojky naměříme pouze zanedbatelnou absorptanci  $A=0,005$  (tj.  $0,6 \cdot 0,004/0,5$ ). Získaná absorptance je menší než 1 % absorptance získané pomocí výbojky s dutou katodou a můžeme ji tedy zanedbat.

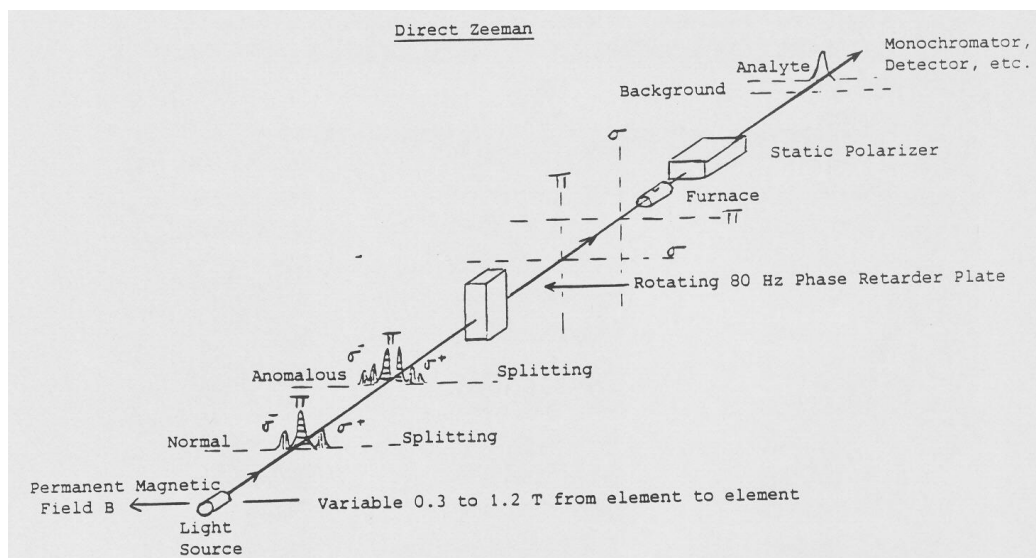
Měříme-li signál analytu s pozadím, pomocí výbojky s dutou katodou naměříme absorptanci  $A=1,000$ , která odpovídá součtu absorptance analytu  $0,600$  a absorptance pozadí  $A=0,400$ . Měříme-li nyní tento signál deuteriovou výbojkou, naměříme absorptanci  $A=0,405$ .  $A=0,400$ , tedy pouze absorpci pozadí. Rozdílový signál těchto absorptancí dává výslednou absorptanci čistého analytu  $A=1,000-0,400=0,600$ .

Deuteriová korekce pozadí je použitelná pouze pro vlnové délky  $\lambda < 350$  nm, pro větší  $\lambda$  je potřeba použít halogenovou výbojku. Korekce pozadí s  $D_2$  výbojkou dává správné výsledky pouze tehdy, není-li pozadí výrazně strukturální (není výskyt ostrých pásů odpovídající rotačním nebo vybračným přechodům).

### 6.9.2.2. Systém Zeeman

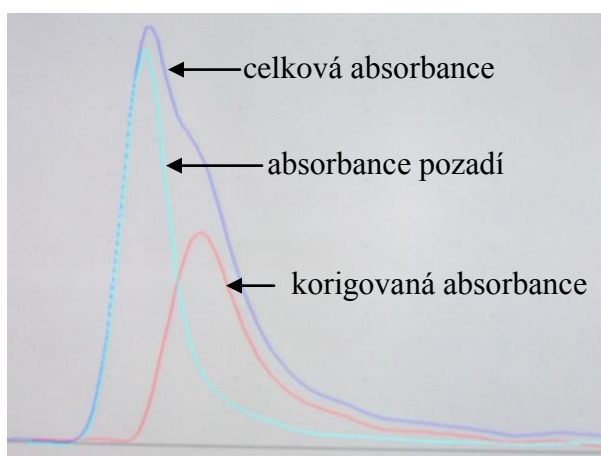
Kompenzace pozadí „systému Zeeman“ je založena na Zeemanově jevu, kdy v silném magnetickém poli dochází ke štěpení energetických hladin atomu.

Přístroj má umístěn v poli elektromagnetu buď zdroj primárního záření (přímý Zeeman) nebo atomizátor (inverzní Zeeman); zároveň přístroj obsahuje polarizátor (pevný nebo rotační). Měření je prováděno tak, že absorptance je střídavě odečítána při vypnutém a zapnutém magnetickém poli. Na detektoru je registrován rozdílový absorpční signál, který odpovídá absorpci čistého analytu.



Čára odpovídající přechodu singletové série  $1s_0 - 1p_1$  se v silném magnetickém poli štěpí na tři komponenty. Složka polarizovaná rovnoběžně s magnetickým polem je označována jako komponenta  $\pi$  a má zachovanou stejnou frekvenci a tedy i vlnovou délku  $\lambda$  odpovídající

spektrální čáře a zůstává neposunuta. Dvě složky polarizované ve směru kolmém k magnetickému poli jsou označovány jako komponenty  $\sigma$  a jsou posunuty o  $-\Delta\lambda$  a  $+\Delta\lambda$  od původní vlnové délky. Posun těchto složek je úměrný síle magnetického pole. **Neposunuté  $\pi$  komponenty použijeme pro měření celkové absorpce a posunuté  $\sigma$  komponenty použijeme pro měření pozadí. K rozlišení složek  $\pi$  a  $\sigma$  se využívá jejich rozdílné polarizace.** Konkrétní způsob měření závisí na konstrukci přístroje. Nejčastěji je v komerčních přístrojích používán elektromagnet s magnetickým polem modulovaným střídavým proudem a kolmým k optické ose a pevný polarizátor. Při vypnutém magnetickém poli je změřena celková absorpce odpovídající absorpci analytu a pozadí. Při zapnutém magnetickém poli je pak měřena pouze absorpce pozadí pomocí  $\sigma$  komponent, které projdou polarizátorem. Rozdílem těchto signálů získáme korigovaných signál odpovídající stanovovanému prvku obr. 124.



Výhodou tohoto způsobu kompenzace pozadí je nejlepší korekce strukturního pozadí a korekce v celém spektrálním intervalu. Nevýhodou je výskyt maxim na kalibračních křivkách, částečný pokles citlivosti a instrumentální a cenová náročnost.

### 6.9.2.3. Systém Smith-Hieftje

Kompenzace pozadí „systémem Smith-Hieftje“ je založena na rozšíření profylu čáry výbojky s dutou katodou. Při zvyšování napájecího proudu výbojky dochází totiž k silnému rozšíření emitované čáry, která přejde až k samozvratu. Měření je prováděno tak, že výbojka s dutou katodou je napájena v určitém cyklu. Tento cyklus se skládá z pulzu normálního napájecího proudu, z krátkého pulzu vysokého napájecího proudu a z relaxačního pulzu o velmi malém proudu. Použitím tohoto cyklu nedojde prakticky ke snížení životnosti výbojky.

Absorpce, kterou odečteme při normálním napájecím proudu odpovídá součtu absorpce analytu a pozadí. Absorpce při vysokoproudovém pulzu pak odpovídá pouze absorpci pozadí. Rozdílový signál pak odpovídá absorpci záření atomy analytu.

Výhodou tohoto způsobu korekce je lepší kompenzace strukturního pozadí (ve srovnání s  $D_2$  výbojkou), jediný zdroj záření a kompenzace v celém intervalu používaných vlnových délek. Nevýhodou je snížení citlivosti (40 %).

### 6.10. Interference

O tom, jak se bude chovat signál měřeného vzorku a standardu o stejné koncentraci může rozhodovat řada různých tzv. interferencí, rušivých vlivů, které mohou velmi zásadně ovlivnit výsledek a správnost měření. Interferencí v AAS obecně rozumíme vliv, který způsobí systematické odchylky velikosti signálu při analýze.

Lze rozlišovat spektrální a nespektrální interference.

### 6.10.1. Spektrální interference

Spektrální interferencí, které jsou způsobeny nedokonalou izolací měřené spektrální čáry od záření, absorbovaného ostatními složkami vzorku nebo absorpcí pozadí, se lze vyhnout volbou jiných čar pro analýzu a korekci pozadí.

### 6.10.2. Nespektrální interference

Nespektrální interference lze zpravidla přisoudit vlastnostem vzorku a přítomnosti doprovodných složek, tj. rušivých prvků matrice. Ve svých důsledcích se poněkud liší pro plamenovou atomizaci a ETA.

*V plameni* se mohou uplatnit rušivé vlivy transportu, které souvisejí se změnami rychlosti sání vzorku, účinností zmlžování a množstvím desolvovaného podílu. Dále jsou to rušivé vlivy vypařování, které jsou ovlivněny rychlostí vypařování (tzn. že méně těkavé sloučeniny prvku snižují signál proti těkavějším sloučeninám téhož prvku). Rozptýlením sledované složky v těkavější rušící složce se signál prvku sledované složky zvyšuje; vázáním prvku např. do komplexu se signál prvku snižuje aj). Interference v plynné fázi ovlivňují disociaci nebo ionizaci (např. u alkalických kovů v plameni acetylén-vzduch), případně se týkají prostorového rozložení volných atomů v plameni. Odstranění rušivých vlivů vypařování lze dosáhnout shodou těkavosti měřených roztoků, častěji se však využívá tzv. uvolňovacího efektu: přidá se další složka, která rušivou složku přednostně převede na těžko těkavou sloučeninu. Ionizačním interferencím v plynné fázi lze zabránit přidávkem snadno ionizovatelného prvku, tzv. ionizačního pufru, např. roztok cesia.

*Při použití ETA* může docházet k interferencím ztrátami ve fázi tepelného zpracování vzorku při nevhodném teplotním režimu, interference v plynné fázi lze přičíst změnám v disociaci či ionizaci nebo kinetice procesu atomizace. Při použití ETA jsou v pracovních návodech údaje o teplotním režimu zpravidla jen přibližné, protože velmi záleží na složení analyzovaného vzorku. Proto je potřeba podmínky pro různé materiály znovu ověřit.

Při přípravě vhodných srovnávacích roztoků je nutné vliv interferencí posoudit a případně zahrnout do kalibračního procesu. Podle přípravy použitých srovnávacích roztoků pak lze rozlišovat kalibraci na **čisté roztoky** stanovovaného prvku obsahující prvek stejné sloučeniny ve stejném rozpouštědle, a za přítomnosti stejných kyselin, solí atd.; na **pufrované srovnávací roztoky**, které podobně jako roztok vzorku obsahuje stejné množství uvolňovacího nebo ionizačního pufru a na **modelové srovnávací roztoky**, které se chemickým složením co nejvíce blíží složením roztoku vzorku.

## 6.11. Analytické aplikace

Pomocí techniky AAS lze analyzovat velice různorodé vzorky, její výhodou je vysoká specifická stanovení a to jak kovů, tak některých nekovů (celkem asi 70 prvků). Lze proto stanovovat prvky bez předcházející separace. Řada prvků, které se snadno atomizují, se stanovuje v plameni přibližně od  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Při ultrastopové analýze s ETA se pak tato mez snižuje o 3 řády. Citlivost stanovení, zpravidla vyjadřovaná jako směrnice závislosti absorbance na koncentraci prvku v roztoku, se v AAS u jednotlivých prvků častěji vyjadřuje jako koncentrace prvku v měřeném roztoku, která za uvedených podmínek způsobí signál velikosti 1 % absorpce ( $0,0044$  jednotek absorbance) a nazývá se charakteristická koncentrace (v jednotkách  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , rozměr ppm/1 % absorpce). Pro daný prvek se zjišťuje při zvolené rezonanční čáře za optimálních podmínek atomizace čistých standardních roztoků prvku.

AAS jako analytická metoda je metodou relativní, srovnávací, tzn. Že výsledek získáme porovnáním signálu rozotku vzorku se signálem rozotku standardů, které se musí složením blížit analyzovanému vzorku (zejména pro eliminaci rušivých vlivů transportu).

V medicínské laboratoři se nejčastěji používá pro stanovení koncentrace esenciálních stopových prvků (zinek, měď, selen) v séru a moči a železa v moči. Z toxických stopových prvků je rozšířené použití AAS při stanovení olova, rtuti a hliníku.

Při analýze se příprava roztoků vzorků neomezuje jenom na vodné roztoky, ale lze použít i nevodných rozpouštědel; např. při extrakčním zakoncentrování analytu. Podobně je možné při ETA dávkovat do kyvety suspenze pevných látek nebo přímo pevný vzorek.

### **Literatura:**

Welz B., Sperling M: Atomis Absorption Spectrometry. Third, Compl. Revised Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2005

Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody I. Vydala Univerzita Karlova, Praha 1997, ISBN 80-7184-365-2

Komárek J.: Atomová absorpční spektrometrie. Masarykova Univerzita 2000, ISBN 802-102-500X

Atomová absorpční spektrometrie; UNICAME; Manuál metod; Chromspec s r.o.; 1991

An Introduction to Background Correction in Atomic Absorption Spektrometry; Sigurds Skujins; Varian AG; 1992

Dastych M.: Instrumentální technika obor Zdravotní laborant. Masarykova univerzita 2007, ISBN 978-80-210-4226-1



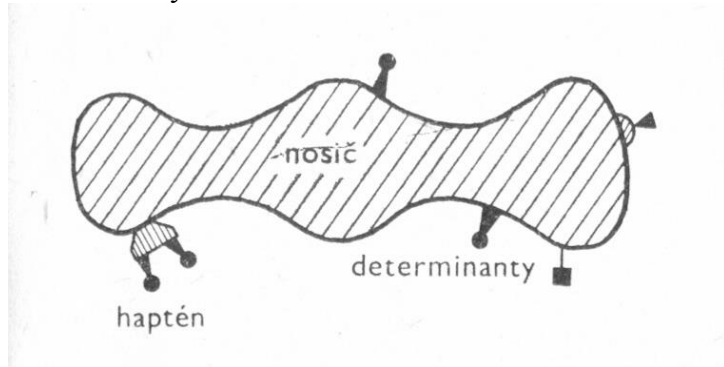
## 7. Imunoanalytické metody

Imunoanalytické metody jsou založeny na **reakci antigenu a specifické protilátky za vzniku imunokomplexu**. U typické imunoanalytické metody antigen tvoří stanovovaný analyt a jako protilátka je využívána reagensie.

### 7.1. Antigeny

Antigeny jsou makromolekuly přirozeného nebo umělého původu. Po chemické stránce se jedná o proteiny, karbohydráty, nukleové kyseliny, lipidy aj. Na vlastní reakci antigenu s protilátkou se neúčastní celá molekula antigenu, pouze některé její povrchové skupiny, tzv. *determinantní skupiny* neboli *epitopy*. Antigenní determinantu představuje určitá skupina atomů (část struktury, funkční skupiny) na povrchu molekuly antigenu a charakterizuje jeho specifitu a schopnost reagovat s vazebným místem protilátky. Antigenní molekula musí mít dostatečně velkou molekulovou hmotnost ( $M_r > 5000$  Da) - velikost a musí mít kompletní strukturu. Jedna molekula antigenu může na svém povrchu nést různé množství antigenních determinantů. Počet epitopů reagujících s vazebným místem protilátek udává valenci antigenů.

Antigeny vyvolávají v živém organismu tvorbu specifických protilátek. Imunitní odpověď může vyvolat pouze kompletní antigen. Nekompletní antigen – haptén (např. léky, nízkomolekulární peptidy, hormony aj.) – vyvolá tvorbu protilátek pouze tehdy, je-li navázán na bílkovinný nosič.



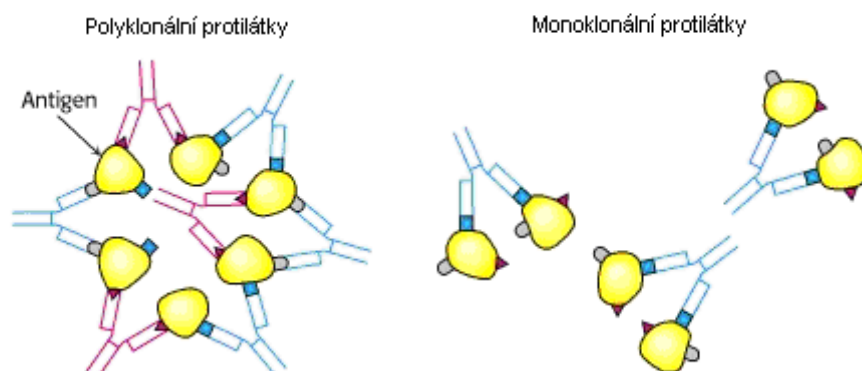
Obr. 125 Antigeny – haptén, nosič, determinanty

### 7.2. Protilátky

Protilátky jsou bílkoviny vznikající v organismu jako jeho odpověď na přítomnost antigenů. Vykazují specifickou vazebnou aktivitu k antigenu, proti kterému byly připraveny. Jsou to imunoglobuliny, v laboratorní praxi jsou obsaženy v tzv. antisérech. Z analytického pohledu je převládající imunochemickou reagensií imunoglobulin G. Specifita a senzitivita imunoanalytických metod je ovlivněna používanou protilátkou. **Polyklonální protilátky** (viz obr.126) se připravují imunizací zvířat, obvykle opakovaným intravenózním podáváním antigenu (nejčastěji lidské sérum). Potom je odebrána krev a získáno sérum bohaté na protilátky, které nazýváme antisérum. Jsou vždy směsí různých protilátek proti jednotlivým vazebným místům nebo epitopům antigenu. Komerční antiséra proti lidským sérovým bílkovinám jsou buď monovalentní (obsahují protilátky proti jedné stanovované bílkovině) nebo polyvalentní (obsahují protilátky proti mnoha bílkovinám).

**Monoklonální protilátky** (viz obr.126) jsou produkovány technologií buněčných hybridomů, vytvořených z lymfocytů a nádorových buněk, které po vyčištění a selekci produkují stejné imunoglobulinové molekuly protilátky. Představují homogenní směs protilátek proti jedné

antigenní determinantě (jednomu epitopu multivalentního antigenu). S monoklonální protilátkou se dosahuje vyšší specificity stanovení.



Ob. 126 Polyklonální a monoklonální protilátky

### 7.3. Interakce antigen – protilátka

Síla interakce mezi protilátkou a antigenem je popsána jako *afinita* a *avidita*.

*Afinita* vyjadřuje intenzitu s jakou se uskutečňuje interakce mezi vazebným místem protilátky a epitopem antigenu. Antigeny obsahují několik epitopů, proto byl zaveden pojem *avidita*.

*Avidita* je síla, se kterou polyvalentní protilátka interaguje s polyvalentním antigenem. *Avidita* vzrůstá s *afinitou* jednoho vazebného místa pro jeden antigen a s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst (suma všech interakcí mezi protilátkou a antigenem). *Avidita* zahrnuje *afinitu*, která je dána příspěvkem všech vzniklých vazeb mezi antigenem a protilátkou a další nespecifické faktory, které ovlivňují vazbu mezi antigenem a protilátkou. Na vazbě antigen – protilátka se podílí několik vazebných sil. Jedná se o nekovalentní interakce jako elektrostatická interakce, vodíkové můstky, Van der Waalovy síly, hydrofobní síly a iontové interakce hlavně mezi  $\text{COO}^-$  a  $\text{NH}_4^+$  skupinami antigenu a protilátky.

### 7.4. Rozdělení imunoanalytických metod z různých hledisek

#### *Podle uspořádání reakce*

- **Kompetitivní (soutěživá) imunoanalýza**
- **Nekompetitivní (nesoutěživá, sendvičová) imunoanalýza**

#### *Podle prostředí*

- **Homogenní imunoanalýza**
- **Heterogenní imunoanalýza**

#### *Podle techniky použité k měření signálu*

- **Luminiscenční imunoanalýza**
- **Fluoroimunoanalýza**
- **Enzymoimunoanalýza**
- **Radioimunoanalýza**

#### *Podle použité značky*

- **Luminofory**
- **Fluorofory**
- **Enzymy**
- **Substráty**
- **Radioizotopy**

### ***Bez značení***

- **Imunoturbidimetrie**
- **Imunonefelometrie**

### ***Podle způsobu provedení***

- **Automatizované analýzy**
- **Manuální analýzy**

## **7.5. Kompetitivní (soutěživé) metody**

Stanovovaný antigen soutěží se stejným značeným antigenem, ve vazbě na specifickou protilátku proti stanovovanému antigenu, která je v limitovaném množství. Vzniknou imunokomplexy obsahující značku a imunokomplexy bez značky. Čím je koncentrace stanovovaného antigenu vyšší, tím více vznikne imunokomplexů bez značky.

Po ukončené reakci měříme signál u imunokomplexů se značkou. Velikost odezvy je nepřímo závislá na koncentraci stanovovaného analytu. Dle typu značky měříme luminiscenci, fluorescenci, případně další veličiny.

Kalibrační křivka má hyperbolický tvar.

Metoda je vhodná pro nízkomolekulární analyty s malou molekulou, které mají pouze jednu antigenní determinantu (např. T3, steroidní hormony, vitamín B12, folát, teofylin, fenytoin).

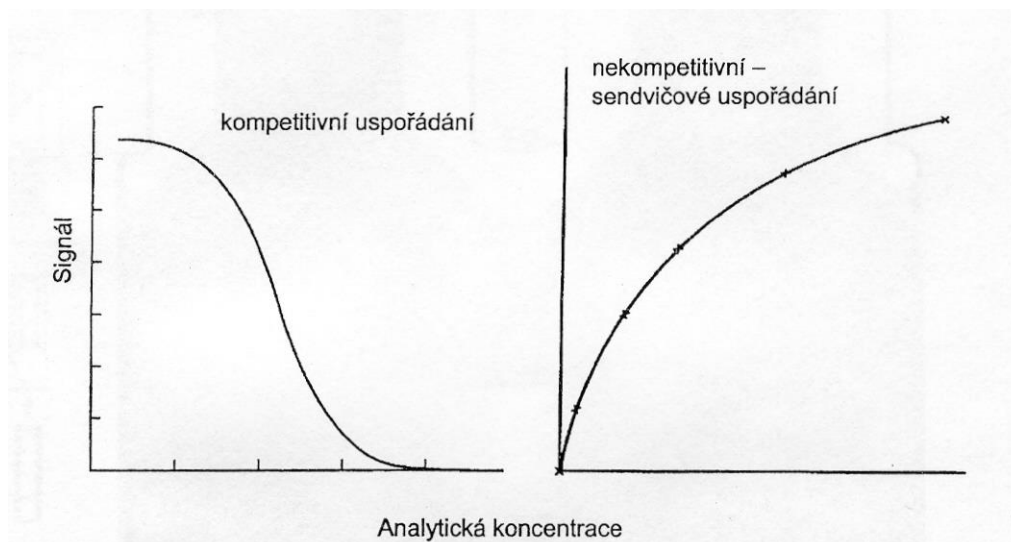
## **7.6. Nekompetitivní (nesoutěživé) metody (sendvičová technika)**

Stanovovaný antigen ze vzorku reaguje se dvěma protilátkami, které jsou v reakční směsi v přebytku. Jedna protilátka bývá značená, funkce druhé protilátky závisí na použité technologii (u heterogenní imunoanalýzy je navázána na pevnou fázi a umožňuje separaci imunokomplexu). Ve vzniklém imunokomplexu je analyt (antigen) vázán mezi dvěma protilátkami (sendvič).

Velikost měřeného signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (parabolický tvar kalibrační křivky).

Metoda se používá pro větší molekuly (molekuly s vyšší molekulovou hmotností), které umožňují vazbu protilátek na dvě determinanty - např. TSH, ferritin, nádorové antigeny, PSA, S100, srdeční troponiny, osteomarkery aj. Používají se dvě monoklonální nebo jedna monoklonální a jedna polyklonální protilátka.

Jestliže se při reakci využívají monoklonální protilátky specifické pro určitý epitop, je možné provádět simultánní inkubaci vzorku a konjugátu s ukotvenou protilátkou, což stanovení zjednodušuje. Nekompetitivní imunostanovení se provádí jak v simultánním tak v sekvenčním módu. Je-li při simultánní analýze přítomna vysoká koncentrace stanovovaného analytu, může tento reagovat současně se značenou i ukotvenou protilátkou. Koncentrace tvořeného komplexu je pak falešně snížena – projeví se tzv. Hook – efekt. U automatizovaných metod je však tomuto problému softwarově zabráněno pomocí chybového hlášení.



Obr. 127 Kalibrační závislosti u kompetitivního a nekompetitivního uspořádání

### 7.7. Heterogenní imunoanalýza

U této techniky se z reakční směsi odstraňují různými způsoby (např. magnetickou separací nebo ukotvením na pevném nosiči a promytím) nepotřebné reaktanty nebo imunokomplexy. Separuje se značka volná od značky vázané. Reakce s detekcí proběhne až po této separaci. Stanovení obecně probíhá v následujících krocích – **smíchání komponent, inkubace** (vznik komplexu antigen-protilátka), **separace a detekce**.

### 7.8. Homogenní imunoanalýza

Homogenní stanovení nevyžadují separaci vázané a volné značené protilátky nebo antigenu. U této techniky není tedy třeba odstraňovat reaktanty, stanovení a detekce probíhá přímo v reakční směsi. V těchto případech je aktivita značky navázané na antigen modulovaná přímo navázáním protilátky. Reakční postupy jsou tak jednodušší a rychlejší. (O neznáčených imunoanalytických metodách je pojednáno v kapitole Analytická a perianalytická automatizace a robotizace.)

### Literatura:

16. Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff L.E.: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation. 2010, ISBN 978-0-7817-9045-1.
17. Burtis C:A., ASHWOOD E:R., Bruns D.E.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 2008, ISBN 978-0-7216-3865-2.
18. Dastych M., Breinek P. a kol.: Klinická biochemie. 2008, ISBN 978-80-210-4572-9.

## 8. Využití luminiscence v imunoanalýze

### 8.1. Luminiscence

je jev představující vyzařování přebytečné energie ve formě fotonů, ke kterému dochází při návratu excitovaných elektronů na základní hladiny. Tato produkce (emise) světla vzniká následně po excitaci atomů působením jiného záření, elektronů nebo při chemické reakci apod. a po jejich návratu do základního stavu.

Lze také říci, že luminiscence je děj, při němž záření o kratší vlnové délce (větší frekvenci) vyvolává v látce určitého složení vznik záření o delší vlnové délce (nižší frekvenci) a část energie se vyzáří ve formě tepla (nesvítivé deexcitační procesy).

Existují excitované energetické hladiny, na nichž může atom setrvávat relativně dlouho ( $10^{-8}$ s a déle). Tyto hladiny se nazývají **metastabilní hladiny**. Nahromadí-li se na takové hladině atomy a pak postupně, nahodile, spontánně vyzařují, pozorujeme jev zvaný **luminiscence**.

#### 8.1.1. Druhy luminiscence

Ke vzniku luminiscence je třeba dodat látce energii v různé podobě. Podle druhu energie, která se přeměňuje na „studené světlo“, rozlišujeme několik druhů luminiscence:

- **Fotoluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektromagnetickým zářením (zářivky) - do této kategorie patří **fluorescence** a **fosforescence**.
- **Chemiluminiscence** – luminiscence je vyvolána chemickou reakcí (sem patří také bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organismy – světlušky, medúzy).
- **Elektroluminiscence** – luminiscence je vyvolána elektrickým polem (reklamní panely, nouzové osvětlení).
- **Katodoluminiscence** – luminiscence je vyvolána dopadajícími elektrony (stínítka televizní obrazovky).
- **Termoluminiscence** – luminiscence je vyvolána vzrůstem teploty po předchozím dodání energie.
- **Radioluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením radioaktivního záření.
- **Triboluminiscence** – luminiscence je vyvolána působením tlaku (při deformaci tělesa).
- **Sonoluminiscence** - vyvolána dopadem ultrazvuku.

V laboratorní medicíně je využívána **chemiluminiscence** a **fluorescence**.

### 8.2. Fotoluminiscence

Fotoluminiscence se dělí podle délky trvání na **fluorescenci** a **fosforescenci**. Dochází k ní vlivem absorpce energie dopadajícího světelného záření. Pokud po odstranění zdroje ozařování látky luminiscence rychle vymizí, hovoříme o fluorescenci. Pokud luminiscence přetrvává (doznívá) i po odstranění zdroje ozařování, jedná se o fosforescenci.

Proces fotoluminiscence může být vyjádřen vztahem:



kde  $X$  a  $X^*$  je základní a excitovaný stav molekuly,  $h\nu$  a  $h\nu'$  vyjadřuje dopadající a emitovanou světelnou energii.

Emitovaná energie záření je nižší než energie dopadajícího (primárního) záření, proto má emitované (sekundární) záření nižší frekvenci a tudíž i delší vlnovou délku než světelné záření primární.

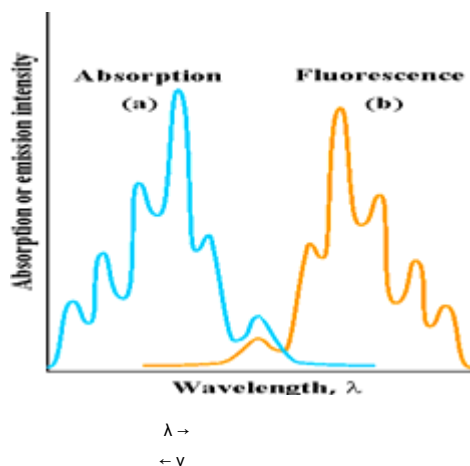
Rozdíl mezi vlnovou délkou excitačního a emitujícího záření se označuje jako **Stokesův posun**.

### 8.2.1. Fluorescence

Fluorescence je přechod mezi tzv. povolenými stavy atomu a k vyzáření fotonů dojde již za pár nanosekund (krátkodobé světélkování -  $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s). Fluorescence tedy představuje sekundární záření po absorpci elektromagnetického záření. Od fosforescence se liší dobou, po kterou trvá sekundární záření, když přestalo působit záření primární, tzv. **dosvitem**.

U anorganických látek se fluorescence projevuje poměrně zřídka (např. u solí vzácných zemin, uranu, thallia). U organických látek se fluorescence objevuje častěji. Nejintenzivnější a analyticky nejvíce využitelná je u sloučenin s aromatickými cykly. Intenzita emitovaného fluorescenčního záření je proporcionální počtu fluoreskujících molekul, tj. jejich koncentrací. Tento vztah však platí pouze pro zředěné roztoky.

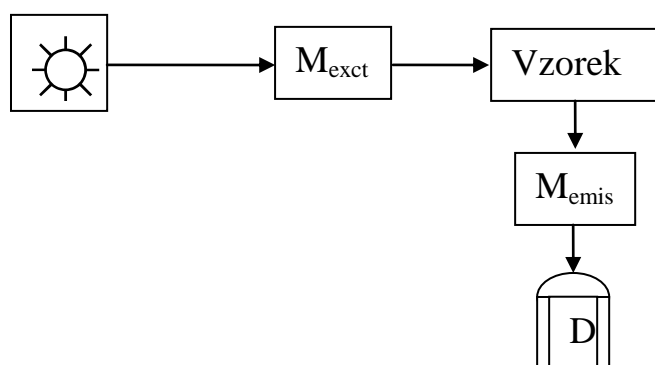
Fluorescenční spektrum je posunuto k delším vlnovým délkám než původní absorpční spektrum (**Stokesův posun**) a zaujímá zrcadlovou pozici – viz obr.128.



Obr.128 Absorpční a fluorescenční spektrum

## Fluorimetr

Fluorimetr má mnohé společné součásti s UV/VIS spektrofotometrem - viz obr. 129.



- zdroj světelného záření
- monochromátor pro výběr excitačního záření
- kyveta/vzorek
- monochromátor pro sekundární (emisní) záření
- detektor

Obr.129 Schéma a hlavní součásti spektrofluorimetru

Jako zdroj světelného záření se většinou používá xenonová nebo xenonová-rtuťová oblouková výbojka.

Kyvety jsou vyrobeny z křemenného skla nebo z čistého křemene.

Detektor, většinou fotonásobič, je umístěn v pravém úhlu, kolmo ke směru dopadajícího primárního světelného záření.

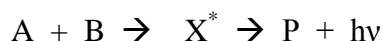
### 8.2.2. Fosforescence

Fosforescence proti tomu je přechod tzv. zakázaný. Také při fosforescenci se fotony vyzáří, ale trvá to déle, často několik minut (dlouhodobé světélkování -  $10^{-2}$ s až několik dní). Fosforescence nemá v klinické laboratoři praktické využití.

### 8.3. Chemiluminiscence

Chemiluminiscence je druh luminiscence vyvolaný energií chemické reakce. Vzniká vyzářením fotonu z molekuly luminoforu po jeho chemické oxidaci působením oxidantů ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,...). Při chemiluminiscenci dochází k produkci světelného záření excitovanými molekulami v průběhu chemické reakce. Přírozenou formou chemiluminiscence v přírodě je bioluminiscence označující chemiluminiscenci v živých organismech.

Chemiluminiscence může být vyjádřena vztahem:



Kde **A** a **B** jsou reaktanty, **X\*** je excitovaný meziprodukt, **P** je produkt v základním stavu a  $h\nu$  je energie emitovaného světelného záření. Chemiluminiscenční reakce většinou zahrnuje oxidaci organické sloučeniny produkující nestabilní excitovaný meziprodukt. Některé chemiluminiscenční reaktanty produkují světlo v podobě záblesků („flash“) jiné vyzařují světlo po delší dobu („glow“).

Jako chemiluminiscenční značka se často používá akridinium ester. Akridinium ester je při chemiluminiscenční reakci v alkalickém prostředí oxidován peroxidem vodíku.

## Luminometr

Zařízení pro měření chemiluminiscence je poměrně jednoduché. Skládá se z měrné komůrky a detektoru, nejčastěji fotonásobiče. Měrná komůrka se vzorkem a ostatními reaktanty obsahuje systém zrcadel, která soustřeďují co nejvíce světelného záření na detektor. Jestliže při chemiluminiscenční reakci vznikají záblesky světla, využívá se počítání fotonů. Počet fotonů zachycený citlivým fotonásobičem s velmi rychlou odezvou je proporcionální produktu chemiluminiscenční reakce.

Hlavní výhodou chemiluminiscence je její extrémní citlivost. Množství produkovaného světla je úměrné počtu molekul, které emitují světelné záblesky.

#### 8.4. Luminofory, Fluorofory

Látky, u nichž dochází k luminiscenci, se označují jako luminofory.

Z organických látek jsou to převážně pevné látky s příměsí vytvářející tzv. **luminiscenční centra** (např. ZnS, CdS s příměsí Ag, Cu, Mg aj.).

Většina fluoreskujících organických molekul obsahuje konjugované dvojně vazby. Spontánně fluoreskuje jen málo biologických molekul - např. tryptofan a některé porfyriny. Spontánně nefluoreskující molekuly mohou být převedeny na fluoreskující produkty. Lze také využít látky, které při určitých chemických reakcích produkují chemiluminiscenční záření.

Při imunoanalytických reakcích jsou fluorofory a luminofory navázány jako značka na protilátky či antigeny nebo tvoří substrát, eventuálně vznikají až po jeho rozštěpení.

Využívají se následující látky:

- Akridin a jeho estery
- Adamantyl dioxetan
- Methylumbelliferon (MU)
- Cheláty platinových kovů (ruténium)
- Cheláty lanthanidů (europium)
- Luminol, isoluminol
- Fluorescein

#### 8.5. Využití luminiscence

Luminiscence našla široké využití zejména v optoelektronice (luminiscenční diody, stínítka obrazovek apod.), v **lékařství** (luminiscenční značky, luminiscenční sondy), v chemii (ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení látek).

Imunoanalytické metody s fluorescenční nebo luminiscenční detekcí jsou citlivější a specifitější než absorpční nebo turbidimetrické metody, zvláště v případě velmi nízkých koncentrací.

U fluorimetrických metod při nízké koncentraci stanovovaného analytu je zaznamenána nízká absorbance, tj. velmi malý rozdíl mezi dopadajícím a vycházejícím zářením ( $I$  je téměř stejně vysoké jako  $I_0$ ). Při fluorimetrickém měření se zaznamenává pouze emitované záření proti velmi slabému pozadí, proto je měření mnohem přesnější. Fluorescence je také



specifičtější, protože existuje jen málo přirozených fluoroforů, které by mohly působit interferenci.

## 8.6. Využití luminiscence na automatických imunochemických analyzátořech

Spojení luminiscenčních technik a imunoanalýzy představují **automatické imunochemické analyzátořy**, na kterých se v současnosti provádí většina imunoanalytických metod v laboratorní medicíně. Takové analyzátořy jsou na trhu značně rozšířené. Vyznačují se vysokou citlivostí, takže jsou pro stanovení analytů obsažených v biologických materiálech v nízkých koncentracích velmi vhodné. Nejrozšířenější jsou analyzátořy využívající detekci na principu chemiluminiscence případně fluorescence. Luminofory používané ke značení nemají interference v biologických materiálech (sérum, plasma), které se na imunochemických analyzátořech analyzují.

Velkou výhodou automatizace v klinické biochemii je možnost provedení klinických a imunoanalytických metod z jedné zkumavky. Imunochemické analyzátořy našly uplatnění také v sérologických laboratořích a na transfuzních stanicích.

### 8.6.1. Imunochemické analyzátořy

Automatické imunochemické analyzátořy se na trhu objevily koncem 80. let. Uplatňují se pro analyty přítomné v biologických materiálech v nízké koncentraci (nmol/l, pmol/l), jako jsou **hormony, vitamíny, tumormarkery, kardiomarkery** apod.

Analyzátořy využívají **reakce antigen – protilátka** založené jak na **kompetitivním** tak i **nekompetitivním principu**. Rozšířenější než homogenní je heterogenní imunoanalýza, která pracuje se značenou protilátkou či antigenem.

Detekce využívá vysoce citlivých reakcí jako chemiluminiscence, elektrochemiluminiscence, fluorescence..

Doba analýzy se nejčastěji pohybuje mezi 15 – 30 minutami.

Přístroje využívají výhradně plastové **reakční nádobky na jedno použití**.

Analyzátořy jsou opatřeny čtečkou čárového kódu, umožňují tak jednoznačnou identifikaci pacienta. Požadavky pro jednotlivé analýzy jsou přijímány z laboratorního informačního systému (LIS) a analýza pak probíhá automaticky bez zásahu obsluhy.

Jedná se výhradně o uzavřené systémy, tzn. mohou pracovat výhradně s reagensy výrobce (dodavatele) přístroje a v naprosté většině případů jsou dodávány reagensy kazetové. Detekce sraženiny, kapaliny a pěny patří ke standardní výbavě.

Cena imunoanalytických vyšetření je poměrně vysoká. Pohybuje se mezi 50 – 200 Kč/vyšetření, ale nové testy na trhu mohou stát až 1000 Kč.

Principy využívané jednotlivými firmami se liší typem **značky, separace a detekce**.

Oddělení komplexu antigen - protilátka se nejčastěji provádí **separací na paramagnetických mikročásticích**. Jedná se o oxidy železa, které vykazují magnetické vlastnosti. Na svém povrchu, který je mnohonásobně větší než stěny reakční nádobky, mají mikročástice vazebná místa pro navázání stanovovaných a značených analytů. Po proběhlé imunoanalytické reakci je třeba z reakční směsi odstranit pro detekci nepotřebné součásti. Působením magnetu se mikročástice s navázaným imunokomplexem během promývání přidržují na stěně reakční nádobky.

### Kalibrace

K výpočtu koncentrace stanovovaných analytů na imunoanalytických analyzátoch slouží nelineární kalibrační závislosti využívající kubické polynomy. Výrobce většinou dodává tzv. master křivku a zákazník ji při kalibraci pouze koriguje na aktuální podmínky.

### Detekční limit

Chemiluminiscenční a fluorescenční techniky patří k nejcitlivějším metodikám. Detekční limit se pohybuje v řádech fento až zeptomolů ( $10^{-15}$  až  $10^{-21}$  molu).

## 8.7. Chemiluminiscenční techniky na imunochemických analyzátoch – heterogenní imunoanalýza

### 8.7.1. Chemiluminiscence s využitím akridinium esteru

**Princip měření:** systém měří kvantitativní množství světla emitované během chemiluminiscenční reakce, pevnou fází tvoří paramagnetické částice, značkou je akridinium ester - chemiluminiscenční látka, která emituje světlo při oxidaci  $H_2O_2$  v alkalickém prostředí v přítomnosti detergentu (Triton X-100). Reakce probíhá během jedné sekundy a je velice citlivá ( $10^{-15}$ ).

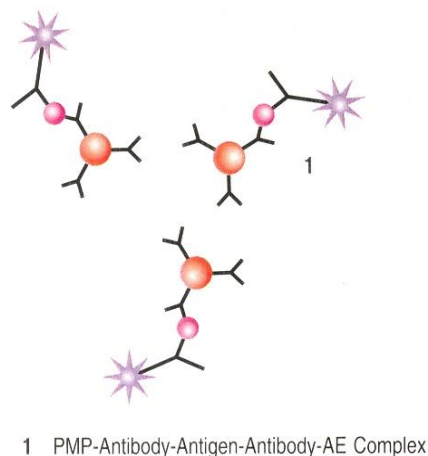
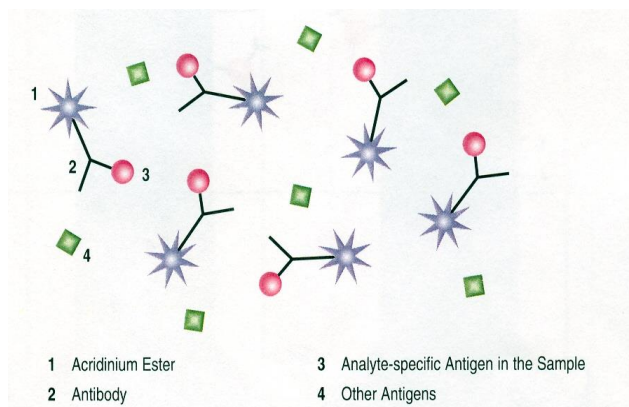


Obr. 130 Advia Centaur, firma Siemens

Přístroj pracující na tomto principu je Advia **Centaur** (obr.6) od firmy Siemens (doba analýzy 15 minut, výměna reagensů za chodu) nebo imunochemický modul **Architect i2000SR** firmy Abbott (technologie ChemicFlex CMIA, velikost reagenčních souprav 100 a 500 testů).

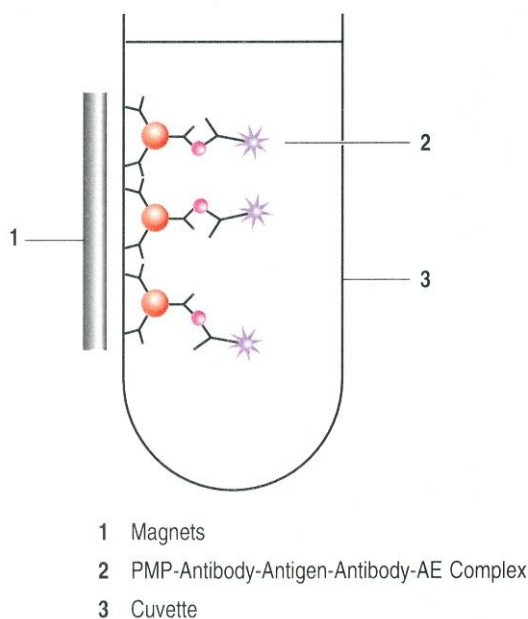
Příklad: Stanovení hCG sendvičovou metodou

Používá se konstantní množství dvou protilátek. První je polyklonální koží protilátka proti hCG, označená akridinium esterem. Druhá, monoklonální myší protilátka proti hCG je kovalentně vázaná na paramagnetické částice. Tyto dvě protilátky jsou specifické pro odlišné přítomné epitopy, free beta subjednotku a beta subjednotku intaktní molekuly. Po smíchání složek reakce probíhá inkubace a tvorba imunokomplexu – viz obr.131.



Obr. 131 *Tvorba imunokomplexu na systému Advia Centaur*

Po inkubaci systém magneticky odseparuje komplex antigen – protilátky s paramagnetickými částicemi a promyje částice – viz obr.132.

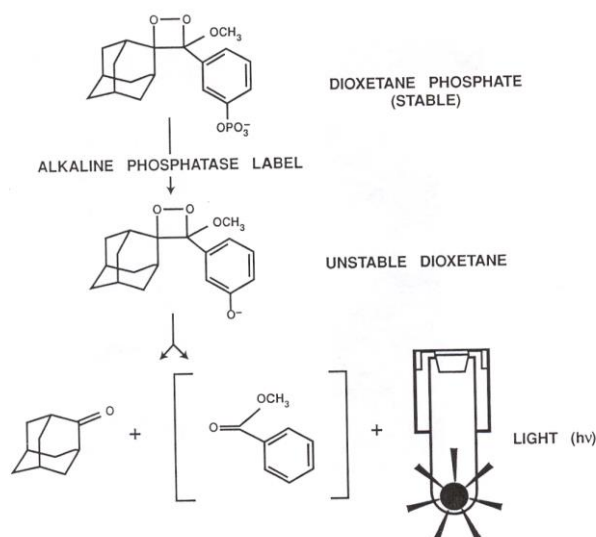


Obr. 132 *Magnetická separace komplexu na systému Advia Centaur*

Po separaci, odsátí a promytí se přidá peroxid vodíku a v luminometru NaOH, který inicializuje chemiluminiscenční reakci.

### 8.7.2. Enzymově zesílená chemiluminiscence

**Princip měření:** Ke konjugátu navázanému na reakční kuličce nebo paramagnetických mikročásticích a značenému alkalickou fosfatázou je přidán luminogenní substrát dioxetan fosfát. Účinkem alkalické fosfatázy se odštěpí fosfát a dioxetanfosfát se přemění na dioxetan. Ze substrátu vzniká nestabilní anion, při jehož rozkladu dojde k emisi fotonů (chemiluminiscenční reakce) – viz obr.133.



Obr.133 Vznik chemiluminiscence při rozkladu dioxetan fosfátu

Na tomto principu pracují přístroje **Immulite 2000** (Immulite 2500) od firmy Siemens (velmi obsáhlá nabídka stanovení, dlouhá doba inkubace – 35 nebo 70 minut, pevnou fází tvoří jedna velká kulička) nebo Beckman Coulter **Unicel Dxl 800** (obr.134), firma Danaher (vysoký výkon – 400 testů/hodinu, doplňování reagensů a spotřebního materiálu za plného provozu).



Obr.134 Unicel Dxl 800, firma Danaher

### 8.7.3. Elektrochemiluminiscence

**Princip měření:** Metodika využívá protilátky (případně antigeny) značené ruténium(II) tris-bipyridylovým komplexem a další protilátky či antigen s navázaným biotinem. Paramagnetické kuličky jsou potažené streptavidinem. Afinita biotin-avidin je extrémně vysoká, takže dojde k navázání imunochemického komplexu na mikročástice.

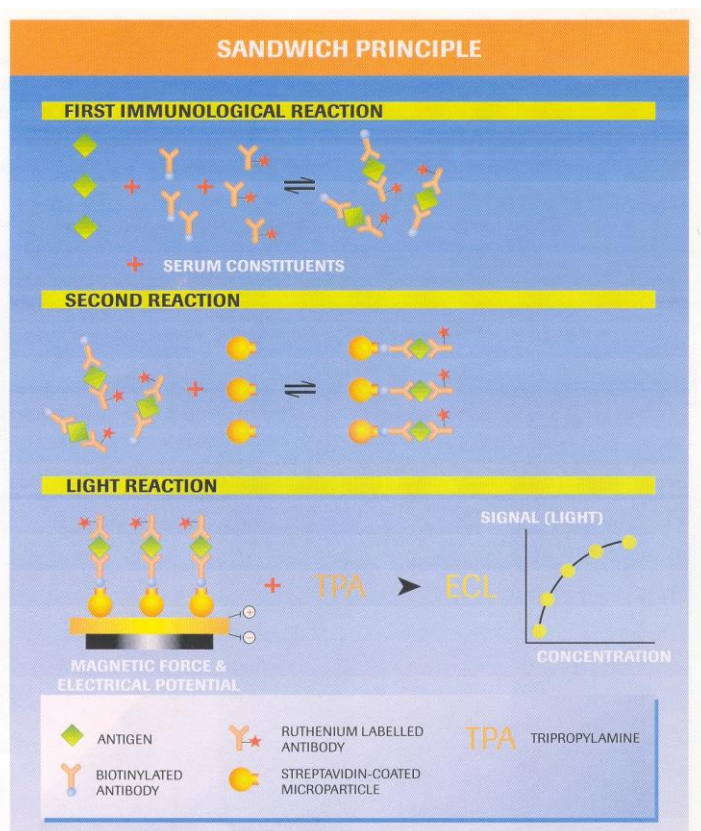
Elektrochemiluminiscence vzniká v průtokové měřicí cele po reakci imunokomplexu značeného chelátem ruthenia s tripropylaminem na povrchu elektrody a po vložení napětí na platinovou elektrodu (oxidace na anodě). Magnetické kuličky zajistí zachycení

imunokomplexu na povrchu elektrody, nenávané reagentie i značka jsou odstraněny promytím.

Na tomto principu pracují imunochemické přístroje nebo imunochemické moduly firmy Roche – např. **modul e 601 systému Cobas 6000** nebo **modul e602 systému Cobas 8000** (délka inkubace – 9 , 18 nebo 27 minut).

Příklad: Sendvičové uspořádání - viz obr.135

- Protilátky reagují s antigenem ve vzorku (např. TSH) za tvorby sendvičového komplexu.
- Firma využívá většinou monoklonální protilátky.
- Po přidání mikročástic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi interakcí biotinu se streptavidinem.
- Mikročástice se zachycují magnetickým polem na povrchu elektrody.
- Po přidání substrátu tripropylaminu a přivedení napětí na elektrody vzniká elektrochemiluminiscenční emise – ruthéniový komplex uvolní na elektrodě elektron za vzniku  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  kationu.
- Ruthéniový marker se po luminiscenční reakci regeneruje.



Obr. 135 Elektroluminiscence, firma Roche – nekompetitivní princip – např. stanovení TSH

## 8.8. Chemiluminiscenční techniky na imunochemických analyzátozech – homogenní imunoanalýza

### 8.8.1. Technologie LOCI

Jedná se o vysoce citlivou **první homogenní** imunoanalytickou metodu s chemiluminiscenční detekcí, která je založena na přenosu kyslíku.

**Princip měření:** Technologie pracuje s dvěma latexovými kuličkami – jedna obsahuje olefinové barvivo a protilátku specifickou pro analyzovanou metodu (chemibead), druhá je potažená streptavidinem a obsahuje barvivo, které generuje singletový kyslík (sensibead). Do reakce kromě stanovovaného analytu vstupuje také biotinylovaná protilátka specifická pro analyt. Dojde k vytvoření imunokomplexu ze všech popsaných komponent. Po osvětlení komplexu se z sensibead uvolní singletový kyslík, pronikne do chemibead a uvolní chemiluminiscenční záření.

Technologie LOCI byla představena na přístroji **Dimension Vista 1500 Intelligent Lab Systém** od firmy Siemens (integrováný systém využívající mimo fotometrii, ISE a chemiluminiscence také nefelometrii, první homogenní imunoanalýza s chemiluminiscenční detekcí – na trhu od r. 2011).

## **8.9. Fluorescenční techniky na imunochemických analyzátoch - heterogenní imunoanalýza**

### **8.9.1. MEIA**

(Enzymová imunoanalýza na mikročásticích - Microparticle Enzyme Immunoassay)

**Princip měření:** Tato technika patří mezi heterogenní enzymovou imunoanalýzu na mikročásticích, ve které je imunokomplex značený enzymem alkalickou fosfatázou.

Jako fluorogenní substrát se používá 4-metylbumbelliferylfosfát (MUP), s kterým reaguje enzym alkalická fosfatáza z imunokomplexu. Při defosforylaci substrátu vzniká 4-metylbumbelliferon (MU) a po jeho excitaci vzniká fluorescenční záření.

Jako světelný zdroj se používá Hg-výbojka ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ), MU emituje fluorescenční záření ( $\lambda = 448 \text{ nm}$ ).

Jedná se o jeden z principů, který využívá na trhu stále rozšířený analyzátor **AxSYM** od firmy Abbott (robustnost, měřící principy – MEIA, FPIA) – viz obr.136.

#### **Postup stanovení:**

- Vzorek se dávkuje k reagenii s mikročásticemi a inkubuje se
- Separace od nepotřebné matrice a reagenií probíhá na válečku s inertními skleněnými vlákny
- Přidá se konjugát s alkalickou fosfatázou
- Přidá se substrát 4-metylbumbelliferylfosfát (MUP)
- Změří se fluorescenční záření



Obr.136 Axsym, firma Abbott

### 8.9.2. Technologie “Pegasus”

**Princip měření:** Heterogenní imunochemická technika, která jako pevou fází využívá mikročástice ze železitanu potaženého zirkoniem, které mají silnou vazebnou kapacitu k biologicky aktivním molekulám. Metodika disponuje rychlou a efektivní separací a fluorescenční detekcí při 450 nm.

Jedná se o technologii, kterou disponuje na trhu nepříliš rozšířený analyzátor **Rad 120**, firma Radim.

## 8.10. Fluorescenční techniky na imunochemických analyzátoch - homogenní imunoanalýza

### 8.10.1. TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission) - Kryptor (Brahms)

Problémem fluoroimunoanalýzy bylo v minulosti fluorescenční pozadí vzorku. Problém vyřešili time-resolved imunoanalytické techniky, které využívají chláty vzácných zemin – lantanidy. Jsou založeny na faktu, že fluorescenční záření chláty lantanidu (např. europia) vydrží déle ve srovnání s fluorescencí pozadí.

**Princip měření:** Metoda je založena na neradioaktivním přenosu energie z donoru (kryptátová struktura s iontem europia v centru) na akceptor (chemicky modifikovaný protein). Měření signálu emitovaného z imunokomplexu probíhá s časovým zpožděním. Měřený vzorek je ozářen dusíkovým laserem, následně donor (kryptát) emituje fluorescenční signál, po něm emituje signál akceptor.

Na principu TRACE technologie pracují přístroje řady **Kryptor** firmy Brahms (za technologii s krátkou inkubační dobou, kde odpadají promývací a separační kroky, firma získala Nobelovu cenu).

### 8.10.2. FPIA

(Fluorescenční polarizační imunoanalýza - Fluorescence Polarization Immunoassay)

**Princip měření:** Tato technika patří mezi homogenní kompetitivní imunoanalýzu, při které

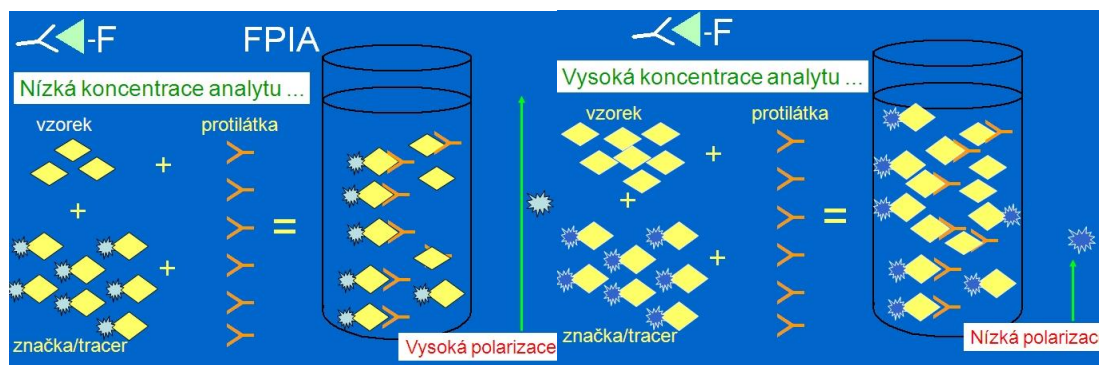
soutěží stanovovaný analyt a analyt značený fluoresceinem o vazebná místa na specifické protilátce. K excitaci se používá lineárně polarizované světlo ( $\lambda = 485 \text{ nm}$  - zdroj wolframová lampa a polarizační filtr). Při návratu molekuly fluoroforu do základní stavu se měří emise zeleného světla při 525-550 nm přes polarizační filtr a detekce se provádí fotonásobičem. Měření se provádí ve dvou polarizačních rovinách vektikální a horizontální, výsledná intenzita polarizovaného světla je nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu.

Využívá se různé rychlosti rotace velkých a malých molekul (imunokomplexu a antigenu), které vedou ke změně polarizace.

Malé molekuly (stanovovaný analyt a značený analyt) se otáčejí velkou rychlostí, po excitaci polarizovaným světlem značený analyt emituje fluorescenční záření do mnoha směrů. Při detekci polarizovaného světla se naměří pouze nízká intenzita tohoto záření. Je-li značený analyt vázán na protilátku (imunokomplex: značený antigen-protilátka), dojde ke snížení rychlosti rotace této velké molekuly, emitované světlo kmitá ve stejné rovině jako excitující – při detekci se naměří vysoká intenzita záření. Čím vyšší koncentrace stanovovaného analytu, tím více bude tohoto analytu navázáno na protilátku a tedy tím méně bude navázáno značeného analytu, takže naměřené hodnoty fluorescence budou nízké a naopak při nízké koncentraci naměříme hodnoty vysoké.

Stanovení je možné pouze v případě, že je významný rozdíl v rychlosti rotace malé molekuly antigenu a velké molekuly imunokomplexu a lze použít pouze pro stanovení koncentrace malých antigenů (např. léků) – viz obr.137.

Fluorescenční polarizace se měří na přístroji podobném fluorimetru. Navíc jsou do optické osy přístroje mezi dopadající (primární, excitační) záření a vycházející (sekundární, emisní) záření vloženy polarizátory. Excitační polarizátor musí být schopen velmi rychle měnit polarizaci světla ve dvou na sebe kolmých osách. Tuto funkci zastává polarizátor z tekutých krystalů.



Obr.137 FPIA – zjednodušené schéma měření

Jedná se o jeden z principů, který využívá na trhu stále rozšířený analyzátor **AxSYM** od firmy Abbott.

Pozn.: Fluorescenční detekci využívají rovněž tzv. multiplexové metody popsané v kapitole o flow cytometrii.

## 8.11. Diagnostický přínos



Diagnostický přínos imunoanalytických metod založených na principu chemiluminiscence a fluorescence je vzhledem k velkému počtu takto stanovovaných analytů velmi různorodý. Stanovení hormonů lze využít např. při monitorování funkce štítné žlázy (hormony TSH, T4, T3); stanovení tumorových markerů při sledování vývoje, vlivu léčby a případné remise nádorového onemocnění (např. PSA); stanovení kardiomarkerů (zejména troponinu T nebo I) k potvrzení infarktu myokardu a zjištění jeho rozsahu; stanovení hladiny léků k ověření, že aplikovaná dávka je pro daného pacienta v terapeutickém rozmezí atd.

### **Literatura:**

19. Bishop M.L., Fody E.P., Schoeff L.E.: Clinical Chemistry Techniques, Principles, Correlation. 2010, ISBN 978-0-7817-9045-1.
20. Burtis C:A., ASHWOOD E:R., Bruns D.E.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. 2008, ISBN 978-0-7216-3865-2.
21. Dastych M.: Instrumentální technika. 2007, ISBN 978-80-210-4226-1.
22. [www.abbott.com](http://www.abbott.com) – převzato 16.2.2011.
23. [www.beckmancoulter.eu](http://www.beckmancoulter.eu) – převzato 3.5.2011.
24. [www.lacomed.cz](http://www.lacomed.cz) – převzato 4.7.2011.
25. [www.roche-diagnostic.cz](http://www.roche-diagnostic.cz) – převzato 9.1.2011.
26. [www.medical.siemens.com](http://www.medical.siemens.com) – převzato 6.7.2011.

## 9. ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

ELISA je imunochemická analytická metoda určená ke kvantitativnímu stanovení analytu v neznámém vzorku. Imunochemické reakce tvoří základ pro kvantitativní analýzu, která má vysokou citlivost a specifitu. ELISA patří do skupiny metod EIA (enzyme immunoassay), které používají enzym ke značení protilátky nebo antigenu. U ELISA stanovení, enzym po přidání substrátu do reakční směsi katalyzuje reakci, na jejímž konci je barevný produkt vhodný k fotometrické detekci.

### 9.1. ELISA stanovení

ELISA techniky patří mezi heterogenní imunochemické stanovení. ELISA používá ke značkování komplexu antigen-protilátka enzymy. Stanovení probíhá na pevné fázi, kde buď antigen nebo protilátky jsou absorbovány na povrch pevného nosiče.

Pro správné provedení ELISA techniky je nutné splnit řadu předpokladů:

antigen nebo protilátka musí být navázán na povrch nosiče bez ztráty imunoreaktivity.

stabilita enzymů a také imunologická reaktivita konjugátu (komplex AbAg\*) musí být během reakce stabilní.

aktivita enzymů, které jsou použity při značkování, se nemůže přirozeně vyskytovat v analyzovaných biologických tekutinách.

použité enzymy musí mít vysokou specifickou aktivitu, tj. přeměňují velká množství substrátu na detekovaný produkt.

#### *Protilátky*

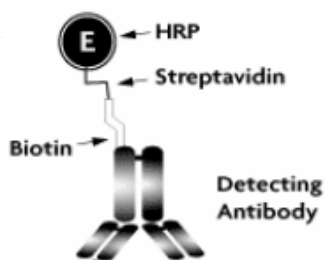
Protilátky používané při ELISA metodách mohou být monoklonální i polyklonální. Mohou být použity ve formě roztoku nebo imobilizované na pevném nosiči. Při technikách ELISA mohou protilátky vystupovat v neznačené podobě nebo ve formě konjugátů (značené enzymem).

#### *Antigeny*

Antigeny jsou získávány purifikací z přírodního materiálu nebo rekombinantní technologií. Jsou používány jako enzymové konjugáty (značené enzymem) buď v rozpustné nebo imobilizované formě.

#### *Enzymové konjugáty*

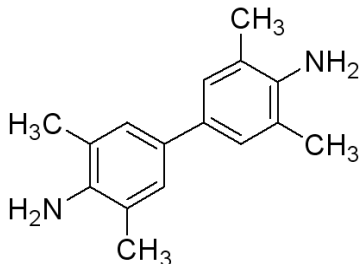
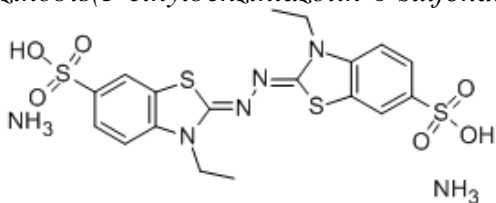
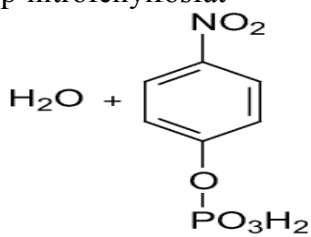
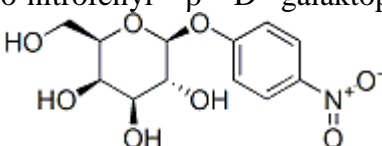
Enzymové konjugáty jsou buď antigeny nebo protilátky kovalentně navázané na vybraný enzym. Při přípravě konjugátu lze postupovat tak, že protilátky a enzymy jsou nekovalentně značkovány biotinem a pak se využívá jeho silné vazebné afinity k streptavidinu. Streptavidin má pro biotin čtyři vazebná místa a jen některé reagují s biotinylovanou protilátkou, zbylá vazebná místa mohou sloužit jako receptory pro biotinem značený enzym. Celý postup tak může být zkrácen použitím biotinem značené protilátky a enzymem značeného streptavidinu (obrázek č.138).



**Enzymy používané ke značení protilátky (antigenu)**

Je nutné vybrat co nejvhodnější enzym pro účely značení protilátky nebo antigenu. Enzym musí být stabilní, struktura enzymu musí umožnit vytvoření kovalentní vazby s protilátkou či antigenem, nesmí dojít k výraznému ovlivnění katalytické aktivity enzymu. Enzym by měl mít co nejnižší molekulovou hmotnost, aby velikost molekuly neovlivňovala imunochemické reakce. Produkt enzymové reakce musí být snadno detekovatelný i ve velmi nízkých koncentracích. Enzym by měl mít co nejvyšší katalytickou aktivitu a měl by být dostupný v potřebné čistotě.

Pro značení se při ELISA metodách používají nejčastěji tyto enzymy a substráty (tab.č.1):

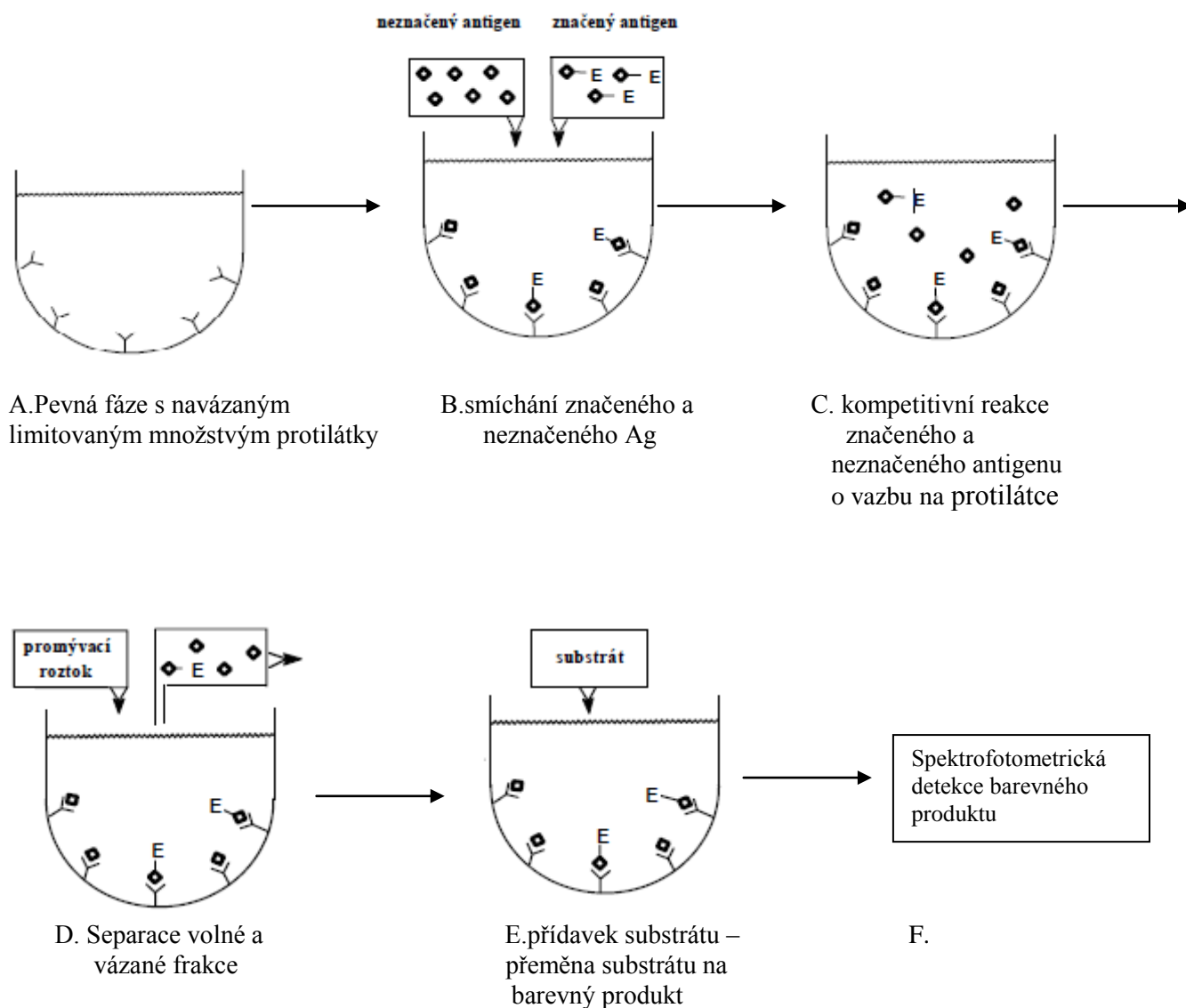
Enzym	substrát	produkt
Křenová peroxidáza (HRP – peroxidáse, EC 1.11.1.7) – v přítomnosti substrátu peroxidu vodíku oxiduje chromogenní látky	<p>3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB)</p> 	Je možné měřit přímo výsledný produkt, který má modré zbarvení, spektrofotometrická detekce při 370 nm, nebo lze reakci zastavit pomocí stop činidla (1M kys. sírová), tím se změní zbarvení na žluté a detekce je při 450 nm
	<p>2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonát)</p>  <p>ABTS</p>	Výsledný produkt reakce má zelené zbarvení, detekce při 405 nm
alkalická fosfatáza (EC 3.1.3.1)	<p>p-nitrofenylfosfát</p>  <p>H<sub>2</sub>O +</p>	Výsledný produkt má žluté zbarvení, detekce při 405 (410) nm
β - D - galaktosidáza (EC 3.2.1.23)	<p>o-nitrofenyl - β - D - galaktopyranosid</p> 	Výsledný ortonitrofenolový produkt má žluté zbarvení, detekce při 420 nm

Tabulka 1

### 9.1.1. Rozdělení ELISA technik podle typu reakce antigen –protilátka

#### **Kompetitivní heterogenní imunoanalýza**

Protilátka je pevně vázána na stěnu jamky mikrotitrační destičky (obrázek č.139 A). Po přidání stanovovaného vzorku probíhá inkubace, kdy o vazebné místo na protilátce soutěží značený antigen a neznačený antigen (analyt) ze vzorku (C). Zastoupení obou forem antigenu na protilátce odpovídá jejich relativním koncentracím. Přebytek nenavázaného antigenu (značeného i neznačeného – tzv. volná frakce), který nezreagoval, se vymyje pomocí promývacího roztoku (D). Po přidání substrátu se změří intenzita barevného zbarvení vytvořeného barevného produktu (F). Platí zde nepřímá úměra: čím vyšší koncentrace analytu (neznačeného antigenu), tím nižší intenzita zbarvení (tím méně navázaného značeného antigenu).

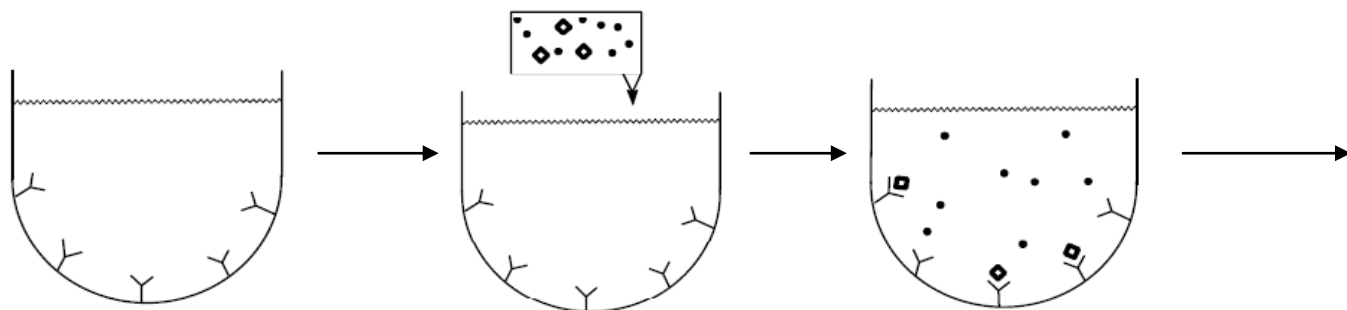


Obrázek: 139 Schéma kompetitivní heterogenní ELISA metody

Kompetitivní ELISA metodu lze použít i ke stanovení protilátek. Na povrchu jamky mikrotitrační destičky je ukotven antigen a v tomto případě soutěží nezařazené protilátky z analyzovaného vzorku se značenými protilátkami (z reagentie, o známé koncentraci) o vazbu na antigen. Opět zde platí nepřímá úměra.

### ***Nekompetitivní heterogenní imunoanalýza (sendvičová)***

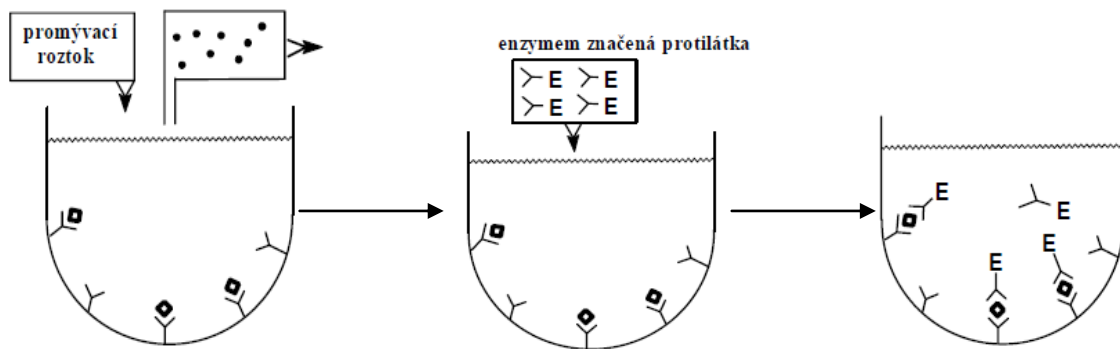
Je to nejvíce používaná ELISA metoda. Na první protilátku navázanou na stěně jamky mikrotitrační destičky (obrázek č.140 A) se naváže antigen (analyt) ze vzorku (B,C). Proběhne první inkubace. Po vytvoření imunokomplexu (antigen – 1. protilátka) se z reakční směsi promytím odstraní nenavázaná frakce (D). Poté se přidá druhá protilátka značená enzymem (tzv. konjugát), která je namířena proti druhé antigenní determinantě na stejném antigenu (E). Po druhé inkubaci je vytvořen „sendvičový“ komplex (F). Dále je provedeno druhé promytí, kdy dojde k separaci nadbytečného nenavázaného konjugátu (G). Po přidání substrátu se změří intenzita barevného zbarvení vytvořeného barevného produktu (H,I). Platí zde přímá úměra: čím vyšší koncentrace analytu, tím vyšší intenzita zbarvení.



A. pevná fáze s navázanou 1. protilátkou v nadbytku

B. přidání vzorku obsahujícího antigen

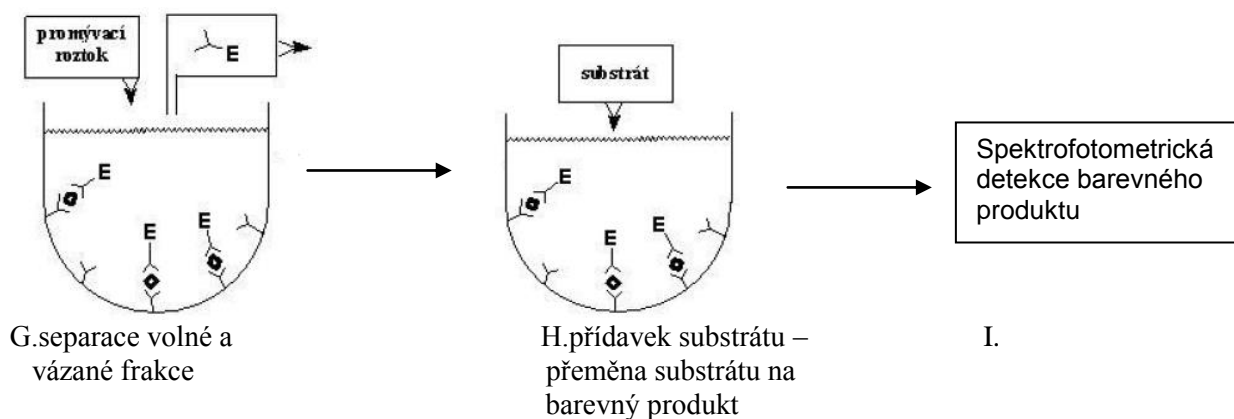
C. reakce antigenu s 1. protilátkou



D. separace volné a vázané frakce

E. přidání 2. protilátky značené enzymem v nadbytku

F. vznik „sendvičového“ komplexu



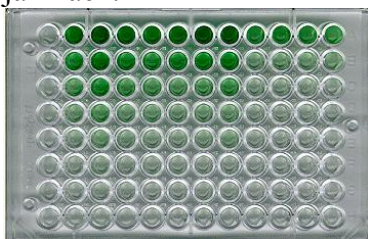
Obrázek 140 Schéma nekompetitivní heterogenní ELISA metody

### 9.1.2. Využití ELISA metod

Výhodou ELISA metod je, že jsou citlivé, specifické a mají nízké pořizovací náklady na technickou instrumentaci. Nevýhodou je analýza vzorků pouze v sériích, časová náročnost (doba jedné inkubace je více než 30 min., obvykle 1-2 hod.), manuální pipetování. Vzorky nelze ředit během analyzované série. ELISA metody lze použít pro stanovení nízkomolekulárních látek, jako jsou proteiny, karbohydráty, nukleové kyseliny, lipidy aj., v různých typech biologického materiálu. Nejčastěji jsou analyzovány vzorky séra, plazmy, moče, mozkomíšního moku, tkáně nebo lyzáty buněk. ELISA metody mají široké uplatnění ve zdravotnických laboratořích hlavně v imunologii a mikrobiologii (méně v biochemii nebo hematologii), kde se používají pro stanovení např. infekčních agens nebo protilátek.

### 9.1.3. Technická instrumentace

ELISA metody se provádí ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. mikrotitračních destiček. (obrázek č.141). Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.



Obrázek: 141 Mikrotitrační destička

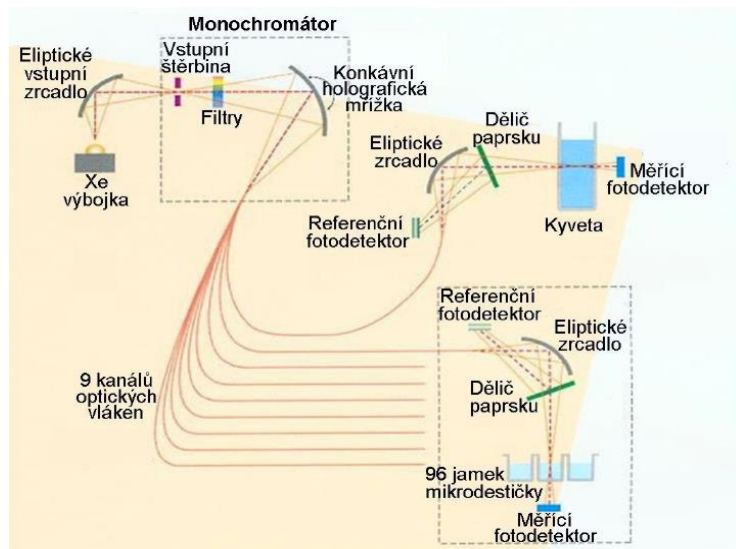
Mikrotitrační destičky vyžadují při promývání použití speciálních osmikanálových pipet nebo automatických ELISA promývaček. Pokud to metoda vyžaduje, lze během inkubace mikrotitrační destičku umístit do třepačky s možností nastavení intenzity třepání a inkubační teploty. Pro měření výsledného produktu detekční reakce se používají speciální vertikální spektrofotometry - ELISA readry mikrotitračních destiček.

#### 9.1.3.1. ELISA reader (vertikální spektrofotometr)

Spektrofotometr je uspořádán tak, že světelný paprsek prochází optickým prostředím ve vertikálním směru. ELISA reader měří absorbanci světelného záření v jamkách mikrotitračních destiček.

Princip

Světelný paprsek ze zdroje prochází přes zvolený interferenční filtr (podle požadované vlnové délky) do optických kabelů, které zabezpečují distribuci do 9 oddělených kanálů. 8 z nich vedou přes jamky mikrotitrační destičky a dopadají na pole fotodiod, které detekují intenzitu světla. Devátý optický kabel je použit na kontrolu intenzity záření vycházejícího ze zdroje (obrázek č.142). Ve zlomku vteřiny se změní celá řada jamek (8), mikrotitrační destička se posune a může se měřit řada následující.



Obrázek: 142 *Uspořádání vertikálního spektrofotometru*

### Součásti vertikálního fotometru:

Jako zdroj záření se nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka. Interferenční filtry jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro  $\lambda$  400-800 nm). Optický systém se skládá z 9 optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky). Jako detektor se používají fotodiody. Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička - 96 jamek).

Vztah mezi změřeným signálem (absorbací) a koncentrací se určuje kalibrací. Obvykle se změní absorbance 6-ti standardních roztoků o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce. Při ELISA metodě se vyžaduje měření všech vzorků v duplikátech. Poté software přístroje sestrojí kalibrační křivku (naměřené hodnoty absorbance standardů na ose y, hodnoty koncentrace na ose x), ze které odečte hodnoty koncentrací neznámých vzorků.

Při vertikální fotometrii závisí dosažené výsledky měření pouze na přesnosti pipetování kalibrátorů, kontrolních materiálů a vzorků. Jamka mikrotitrační destičky určená k měření má vždy konstantní plochu kruhové základny a pro stejnou koncentraci je konstantní součin absorbance a délky optické dráhy roztokem.

### Lambertův-Beerův-Bouguerův zákon pro absorpční fotometrii ( $A = \epsilon cl$ ) :

$$A_1 l_1 = A_2 l_2 = \frac{c}{\epsilon}$$

kde: A = absorbance, l = délka optické dráhy, c = koncentrace analytu,  $\epsilon$  = molární absorpční koeficient pro danou vlnovou délku

Když napipetujeme např. ke stejnému množství vzorku méně činidla, zkrátí se optická dráha roztokem (tj. tloušťka vrstvy roztoku), ale měřený roztok bude mít větší absorbanci a výsledná koncentrace bude stejná jako v prvním případě. Tato výhoda vertikální fotometrie v

praxi znamená to, že i při poměrně krátké optické dráze ( $\gg 3$  mm) a i s nepřesným ručním pipetováním vzorků a reagensů, kde je běžná chyba 10 %, získáme solidní výsledky.

Kromě možnosti použití samostatného ELISA readeru, promývačky mikrotitračních destiček a třepačky laboratoře s velkým množstvím vzorků využívají ELISA automatické linky.

#### **9.1.3.2. ELISA automatická linka**

Automatická linka provádí automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému (2, 4, 8 jehel). Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje pozitivní identifikaci patientských vzorků. Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček. Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků), promývačky a readeru mikrotitračních destiček. Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene. Systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.

Velkou výhodou automatické linky je použití čárových kódů, a tím zabránění záměny mezi vzorky. Dále je to přesnost pipetování vzorků a reagensů, vysoká kapacita přístroje. Nevýhodou je vyšší spotřeba používaných reagensů.



## 10. DELFIA

### Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent ImmunoAssay

DELFIA patří mezi fluoroimunoanalytické metody, byla vyvinula finskou firmou Wallac Oy (nyní Perkin-Elmer)

DELFIA je velmi citlivá a specifická metoda pro stanovení nízko- i vysokomolekulárních analytů, využívá časově modulované měření fluorescence chelátu lanthanidů (europium, terbium, samarium, příp. dysprosium).

#### 10.1. Princip metody:

Principem DELFIA je imunochemická reakce, v níž jsou buď protilátka nebo antigen označeny fluorescenční sondou – stabilním chelátem lanthanidu, nejčastěji europia.

Po proběhlé imunochemické reakci je stabilní chelát, kterým je vzniklý komplex označen, přeměněn na sloučeninu s intenzivní fluorescencí (opět chelát lanthanidu, ale s odlišnými vlastnostmi). Tato fluorescence je dlouhodobá (řádově stovky mikrosekund) s velkým rozdílem mezi vlnovou délkou excitace a fluorescence (tzv. Stokesův posun).

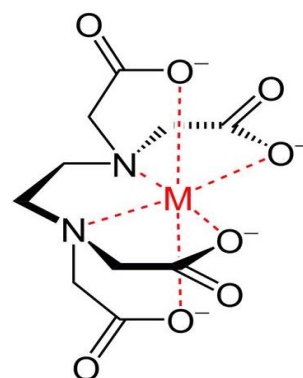
##### 10.1.1. Chelátové značení protilátek

Cheláty jsou komplexní (koordinační) sloučeniny centrálního atomu (v tomto případě lanthanidu) a dvoj- nebo vícevazných ligandů, které mohou s centrálním atomem uzavřít cyklická uspořádání (vykazují tzv. chelátový efekt, tj. významné zvýšení stability komplexů ve srovnání s jednovaznými ligandy).

Označení protilátky chelátem nesmí ovlivnit důležité vlastnosti protilátky – afinitu, specifitu a rozpustnost; použitý chelát musí být hydrofilní, stabilní a snadno navázatelný.

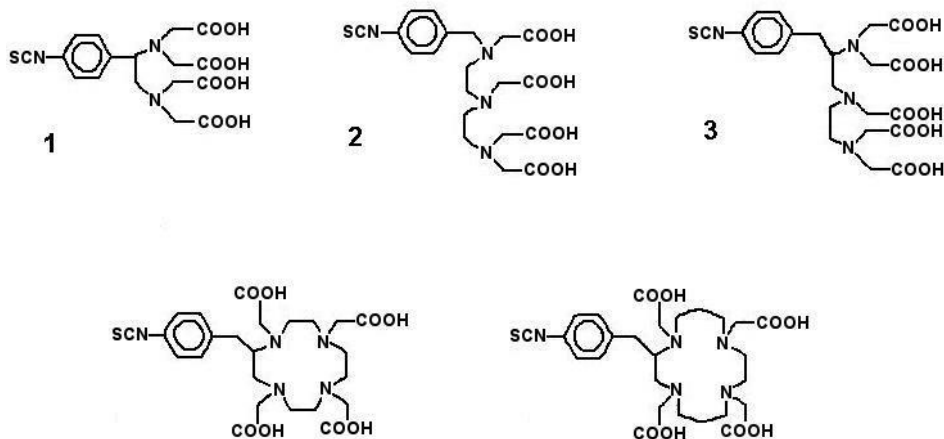
Pro značení protilátek nebo antigenů se používají nejčastěji cheláty lanthanidu s polyaminopolyoctovými kyselinami jako vícevaznými ligandy, obsahujícími i vhodnou funkční skupinu pro navázání na protilátku nebo antigen.

Obr.: Chelát

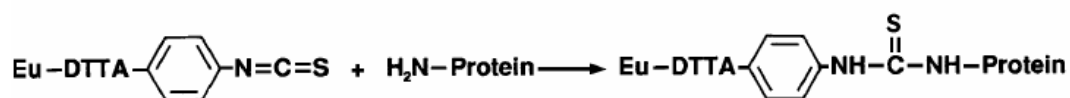


Obr.: Příklady vhodných chelatačních činidel: izothiokyanátový derivát kyseliny

- 1) EDTA (etylendiamintetraoctová kyselina), 2) DTTA (dietyltriainintetraoctová kys.), 3) DTPA (dietyltriaininpentaoctová kys.) apod.

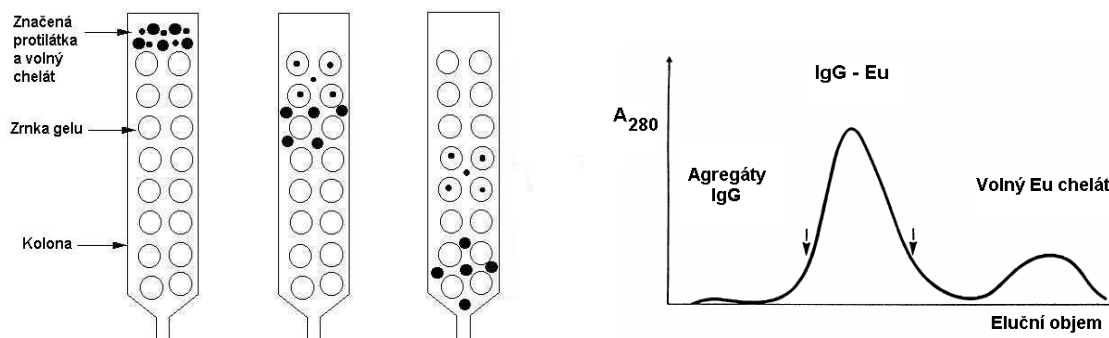


Značení protilátky chelátem – příklad reakce izothiokyanátové skupiny chelátu a aminoskupiny lysinu v proteinovém řetězci protilátky při alkalickém pH uhličitanového pufru:



Po proběhlé reakci je značená protilátka od nadbytku nenavázaného chelátu oddělena gelovou filtrací na koloně se Sephadexem: velké molekuly značené protilátky nepronikají do pórů v kuličkách gelu a protékají tedy kolonou rychleji, malé molekuly chelátu jsou zadržovány v pórech. Eluát vytékající z gelové kolony je monitorován při 280 nm a jímá se odpovídající frakce.

Obr. : Separace značené protilátky a volného chelátu gelovou filtrací



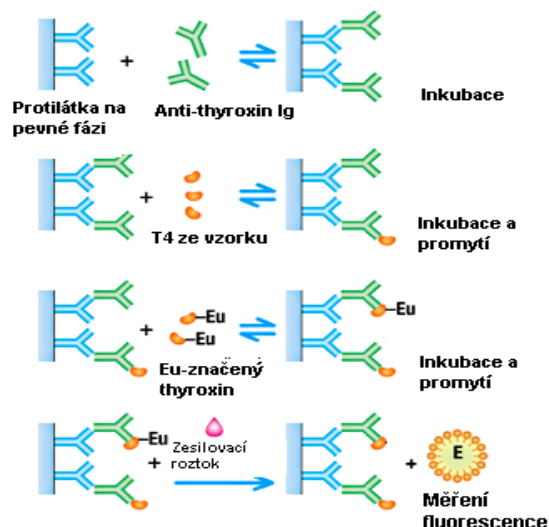
Vzniklý značený protein nevykazuje fluorescenci, je dostatečně termodynamicky stabilní, aby bylo možné jej dlouhodobě skladovat a natolik kineticky stabilní, aby bylo možné jej použít i v prostředí s nadbytkem jiných iontů a chelatačních činidel.

Pro malé molekuly (značené antigeny) se místo gelové filtrace používá technika HPLC.

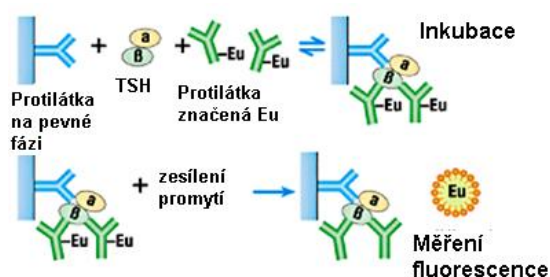
### 10.1.2. Imunochemická reakce

Vlastní imunochemická reakce může mít kompetitivní i nekompetitivní uspořádání. V prvním případě je fluorescenční sondou značen antigen, v druhém případě protilátka.

Obr.: Příklad reakce v kompetitivním uspořádání (fluorescence nepřímo úměrná koncentraci analytu)



Obr.: Příklad imunoreakce v nekompetitivním uspořádání (intenzita fluorescence přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku)



Pozn.: Pracuje se většinou v mikrotitračních destičkách s jednou specifickou protilátkou (obvykle monoklonální) vázanou na pevné fázi.

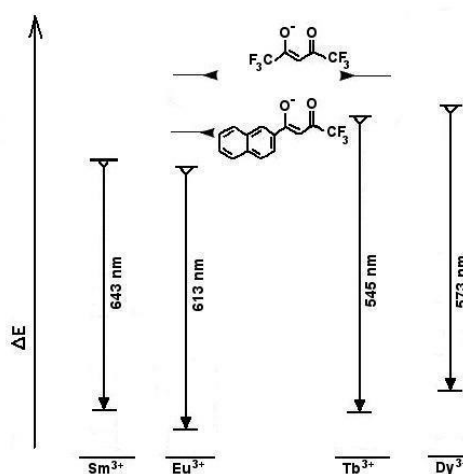
### 10.1.3. Disociace lanthanidu z komplexu, vznik fluorescenčních chelátů

Ion lanthanidu je z komplexu odtržen vlivem kyselého pH (hodnota pH méně než 4) a přeměněn na vysoce fluorescenční chelát přidáním přebytku vhodného luminogenního ligandu (při kyselém pH neinterferují původní ligandy).

Vhodnými ligandy jsou  $\beta$ -diketony obecného vzorce  $R_1-C(=O)-CH_2-C(=O)-R_2$ , kde  $R_1$  je nejčastěji světlo absorbující aromatická skupina, např. naftyl-, benzofuryl-, furyl-, thienyl-, atd. a  $R_2$  je fluorovaný uhlovodíkový zbytek, který v molekule zajišťuje optimální rozložení elektronové hustoty pro tvorbu komplexu. Ligand se váže na koordinační místo lanthanidu svými dvěma ketoskupinami. Výběr luminogenního ligandu závisí na energetických požadavcích konkrétního lanthanidu – excitovaná energetická (tripletová) hladina ligandu musí ležet mírně výše než emisní hladina iontu, aby mohlo dojít k optimálnímu přenosu energie z ligandu na centrální ion.

Obr.: Emisní energetické hladiny lanthanidů Sm, Eu, Tb a Dy ve srovnání s excitovanou tripletovou hladinou aromatického (naftoyltrifluoro-aceton) a alifatického (hexafluoroacetyl-aceton)  $\beta$ -diketonu:

Je patrné, že v důsledku rozdílu emisních hladin  $Eu^{3+}$  a  $Sm^{3+}$  ve srovnání s  $Tb^{3+}$  a  $Dy^{3+}$  je problematické najít univerzální ligand, např. naftoyltrifluoro-aceton optimální pro  $Eu^{3+}$  neexcituje  $Tb^{3+}$  a  $Dy^{3+}$  a naopak hexafluoroacetyl-aceton optimální pro  $Tb^{3+}$  je méně vhodný pro  $Eu^{3+}$  a  $Sm^{3+}$ .



Pozn.: Mezi energií a vlnovou délkou emitovaného záření je nepřímá úměra:  $\Delta E = (h \cdot c) / \lambda$  h...Planckova konstanta, c...rychlost světla,  $\lambda$ ...vlnová délka  
Fluorescence chelátů Eu a Sm má větší vlnovou délku než je tomu v případě Tb a Dy.

Kyselý reakční roztok kromě luminogenních ligandů obsahuje detergent a pomocnou reagensii TOPO (tri-n-oktylfosfinoxid), která spolu s detergentem udržuje výsledný chelát ve formě micel a tím jej chrání před molekulami vody, které by zhasly fluorescence.

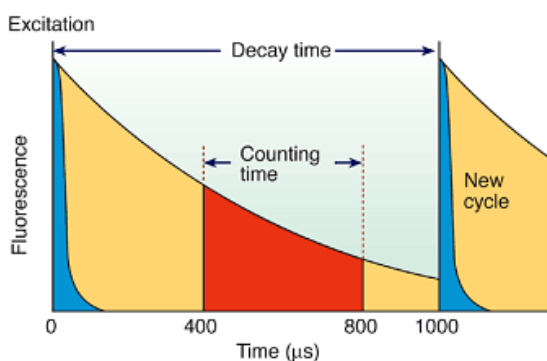
#### 10.1.4. Časově modulované měření fluorescence (time-resolved fluorometry), TRF:

Fluorescence nového chelátu je intenzivní a dlouhodobá - doba emise (decay time) je řádově stovky mikrosekund, tedy mnohem delší než u běžných fluoroforů, což umožňuje využití časově modulovaného měření fluorescence: Vzorek je pulzně excitován určitou vlnovou délkou světelného záření (např. 340 nm) s frekvencí okolo 1 milisekundy. Detekce fluorescenčního záření se pomocí složité elektroniky začne měřit se zpožděním stovek mikrosekund (v době, kdy už vyhasla fluorescence pozadí, která je podstatně kratší – řádově nanosekundy) a vlastní měření trvá také řádově stovky mikrosekund. Měření se provádí opakovaně a načítá se za vybraný časový interval 1000 a vícekrát (za jednu sekundu se dá načítat 1000 měření při frekvenci excitace 1 milisekunda).

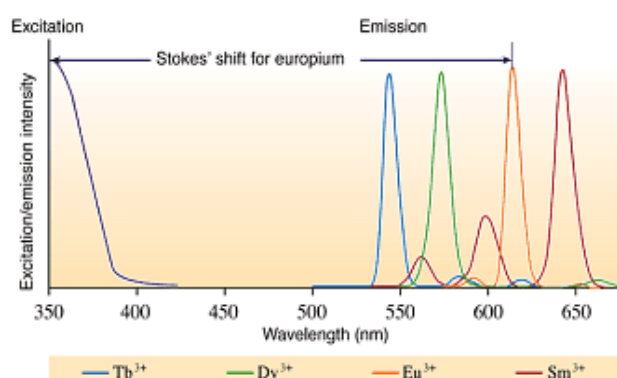
Pro praktické aplikace se dává přednost chelátům europia, protože jejich fluorescence přetrvává nejdéle ve srovnání s ostatními lanthanidy (Eu – až 1 ms, Tb – stovky  $\mu$ s, Sm a Dy – desítky  $\mu$ s).

Fluorescenční spektrum chelátů lanthanidů vykazuje intenzivní úzké emisní píky a velký Stokesův posun: vzorek je excitován při 340 nm a fluorescence se měří v dlouhovlnné oblasti spektra, např. v případě Eu v červené oblasti – 620 nm (zde už není interference pozadí).

Obr.: časový průběh fluorescence chelátu Eu



Obr.: Stokesův posun

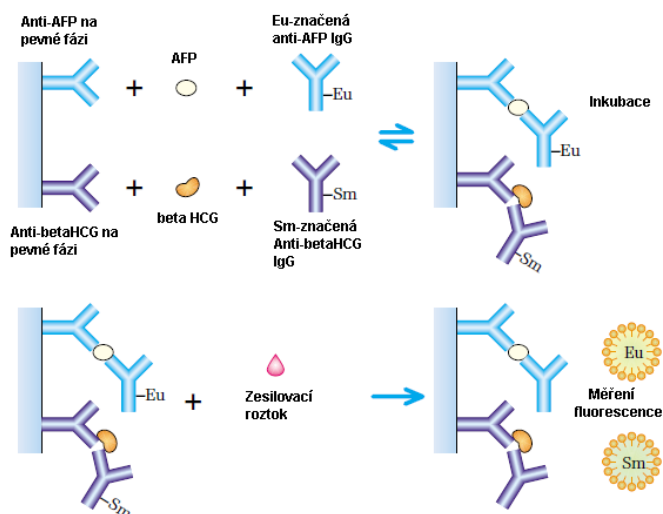


Převzato z [http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73257FLY\\_DELFIAApplicationsOfTRF.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73257FLY_DELFIAApplicationsOfTRF.pdf)

Díky specifickým vlastnostem fluorescence chelátů lanthanidů, které umožňují spektrální i časové odfiltrování pozadí, je DELFIA metodou velmi specifickou a citlivou - detekční limit 10 attomol ( $10^{-17}$  mol) europia v jamce mikrotitrační destičky, tj. koncentrace Eu  $10^{-14}$  –  $10^{-15}$  mol/l.

### 10.1.5. Současné stanovení více analytů:

Vlastnosti fluorescence umožňují i současné stanovení více analytů:



Obr.: Příklad současného stanovení více analytů:

Protilátka proti AFP je označena chelátem Eu, protilátka proti  $\beta$ -HCG je označena chelátem Sm. Díky úzkým emisním pikům při různých vlnových délkách (Eu 613 nm, Sm 643 nm) a různé době trvání fluorescence Eu a Sm se nepřekrývají ani vlnové délky, ani časy odečtu jejich fluorescence, je tedy možné je měřit paralelně.

Pozn.: Obrázky převzaty z:

[http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73257FLY\\_DELFIAApplicationsOfTRF.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-73257FLY_DELFIAApplicationsOfTRF.pdf)

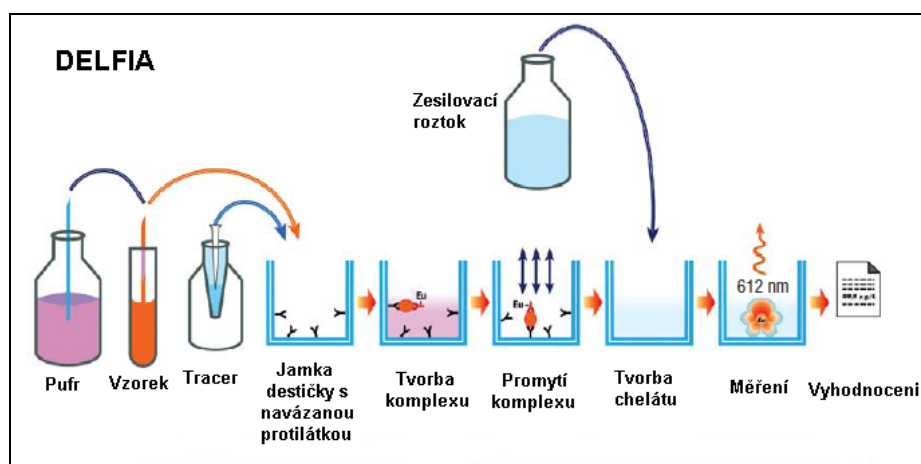
Značení protilátek cheláty lanthanidů umožňuje paralelní stanovení až čtyř různých analytů. Při použití chelátu Tb a Dy jako třetí a čtvrté fluorescenční značky vedle Eu a Sm je nutno použít v reakční směsi ještě další luminogenní ligand (viz Obr.).

Měření fluorescence při současném stanovení více analytů se provádí na velmi kvalitních citlivých fluorometrech s možností TRF a automatickou korekcí překryvu pro zachování maximální citlivosti a specifičnosti stanovení (např. EnVision, VICTOR, WiewLux Multilabel Counters – Perkin-Elmer), přesto stanovení čtvrtého analytu (využívající cheláty dysprosia) má o několik řádů horší citlivost.

### 10.2. Praktické provedení metody DELFIA:

Pracuje se nejčastěji v mikrotitračních destičkách v uspořádání 8x12 jamek s navázanou specifickou protilátkou (obvykle monoklonální). Imunochemická reakce probíhá přímo v jamce mikrotitrační destičky, vzniká komplex značený chelátem lanthanidu. K promytému komplexu se přidává tzv. Enhancement Solution (zesilovací roztok) obsahující luminogenní ligand v silně kyselém pufru s přídavkem detergentního činidla. Stabilní chelát lanthanidu je jím odtržen z komplexu a přeměněn na nový intenzivně fluoreskující chelát. Fluorescence se proměřuje pomocí fluorometru umožňujícího časově modulované měření. Do prvních jamek destičky se dávkuje kalibrátory. Pomocí těchto kalibrátorů se sestrojí kalibrační křivka, podle které se odečítají jednotlivé analyzované vzorky.

Obr.: Praktické provedení metody DELFIA



Celý postup lze provádět „manuálně“ na přístrojové lince, metodu však lze plně automatizovat:

Obr.: Přístrojová linka DELFIA:

Razička terčů - pro práci se suchou krevní skvrnou (1),  
dávkovač činidel (2), třepačka pro mikrotitrační destičky  
(3), odsávačka (4), promývačka (5), TRF fluorometr (6)



Obr.: AutoDELFLIA:

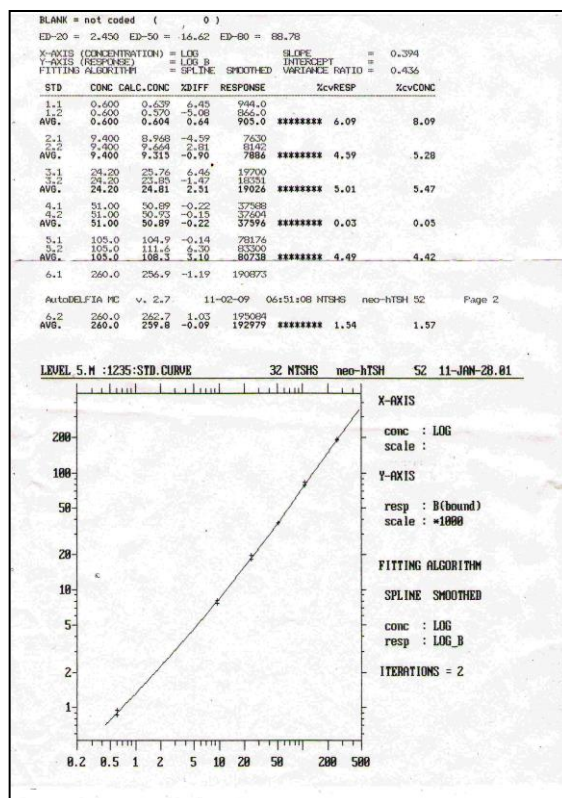
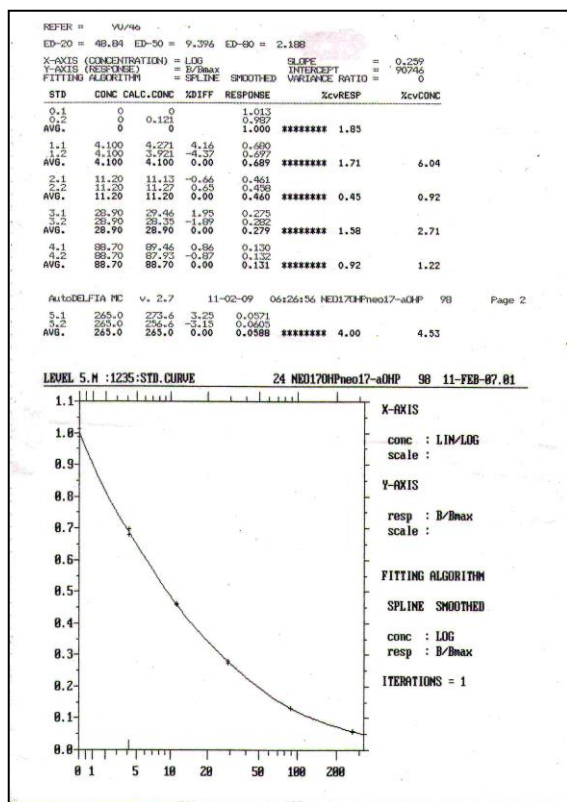
Zde v uspořádání pro práci se suchou krevní skvrnou (bez dávkovacího modulu kapalných vzorků)



Obr.: Softwarově zpracovaná kalibrační křivka DELFIA

kompetitivní uspořádání (17-OH-P):  
osa x...koncentrace nmol/l (logaritmická stupnice)  
osa y...odezva  $B/B_{max}$   
B...počet záblesků za sekundu  
 $B_{max}$ ...maximální počet záblesků za sekundu  
6 kalibračních hladin, měřeno v dubletu

sendvičové uspořádání (TSH):  
osa x...koncentrace mIU/l (logaritmická stupnice)  
osa y...odezva  $B/1000$  (logaritmická stupnice)  
B...počet záblesků za sekundu  
6 kalibračních hladin, měřeno v dubletu



### 10.3. Příklady využití metody DELFLIA:

Metodu DELFLIA lze použít pro široké spektrum analytů. V principu lze chelátem lanthanidu označit každou stabilní sloučeninu obsahující amino- nebo karboxyskupinu, která není esenciální pro následnou tvorbu imunokomplexu. Pokud daná molekula takovou skupinu nemá, je možné připravit synteticky její vhodný derivát.

Chelátem lanthanidu lze označit proteiny, peptidy, hormony, oligonukleotidy i malé organické molekuly (steroidy, aminokyseliny, léky,...). Analytické postupy je možné vypracovat přímo v laboratoři (včetně přípravy mikrotitračních destiček nebo chelátového značení protilátek pomocí materiálu a reagentů dodávaných firmou Perkin-Elmer), pro některé analyty jsou dostupné diagnostické sady a automatizované uzavřené analytické systémy.

#### 10.3.1. Proteiny, hormony

Ve formě komerčně dodávaných kitů je dostupný např. kompletní tyroidní panel (TSH, T3, T4, fT3, fT4, TBG včetně kitu pro stanovení protilátek proti tyroidní peroxidáze a tyreoglobulinu), panel reprodukčních hormonů (HCG, FSH, LH, estradiol, progesteron, prolaktin, testosteron, SHBG), panel pro screening v těhotenství (free-βHCG, HCG, estriol, AFP, PAPP-A), PSA, inzulin, růstový hormon, cytokiny a další.

#### 10.3.2. Novorozenecký screening

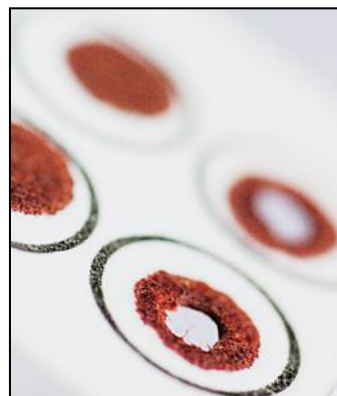
DELFLIA je metoda vhodná pro stanovení analytů nejen v kapalném materiálu (sérum, plazma), ale díky její citlivosti je možno ji použít i pro práci se suchou krevní skvrnou.

Pozn.: Suchá krevní skvrna (suchá krevní kapka, dry blood spot) je alternativní způsob odběru biologického materiálu, vhodný zvláště pro odběry novorozenců. Jedná se o malé množství kapilární krve nasáklé do odběrové kartičky ze speciálního filtračního papíru. Ze suché krevní kapky se vyráží terčik (nejlépe ze středu skvrny), ze kterého se krev může vyextrahovat vhodným rozpouštědlem nebo pufrům a extrakt použít k analýze. Kalibrační

a kontrolní materiály pro stanovení analytů metodou DELFIA jsou rovněž ve formě suché krevní skvrny.

Obr.: Odběrový systém pro novorozenecký screening

Obr.15: Krevní skvrna po vyražení terčíku



DELFIA ve spojení s technikou suché krevní skvrny se stala ideálním řešením pro zavedení celoplošného novorozeneckého screeningu některých dědičných chorob. V ČR se touto technikou provádí screening kongenitální hypotyreózy (stanovení TSH), kongenitální adrenální hyperplázie (stanovení 17-hydroxy-progesteronu, 17-OH-P) a cystické fibrózy (stanovení IRT - imunoreaktivního trypsinogenu).

Pozn.: Metodu DELFIA lze plně automatizovat při práci s kapalným materiálem (plasma, sérum). Při práci se suchou krevní skvrnou není dosud běžná automatizace prvního kroku (vyražení terčíků).

### 10.3.3. Další možné aplikace

**Stanovení aktivity kináz:** Enzymy proteinkinázy fosforylují určité aminokyseliny v peptidickém řetězci. Pomocí Eu-značených protilátek proti fosforylovaným aminokyselinám lze posoudit úroveň fosforylace.

**Metody s Eu-značenými oligonukleotidy:** Eu-oligonukleotidy mohou být využity pro detekci a kvantifikaci amplifikačních produktů např. pro detekci genových mutací, virů atd.

**Metody založené na sledování syntézy DNA** (např. studium buněčné proliferace): Do nově syntetizovaných řetězců DNA je místo thymidinu zabudován pyrimidinový analog 5-bromo-2'-deoxyuridine, který je detegován imunochemicky Eu-značenými monoklonálními protilátkami.

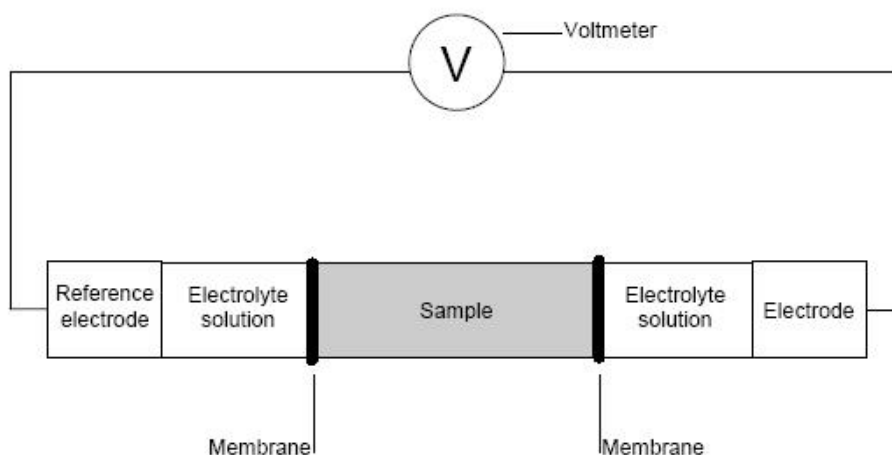
**Sledování interakcí ligand – receptor,** je-li jeden z dvojice pomocí streptavidinu – biotinu fixován na mikrotitrační destičce.



# 11. Potenciometrie, konduktometrie , polarografie, coulometrie

## 11.1. Potenciometrie

Princip: Potenciometrie je elektrochemická metoda, při které se měří rozdíl potenciálů (napětí) při nulovém proudu mezi dvěma elektrodami, ponořenými do analyzovaného roztoku. Jedna elektroda je měrná (indikační) a druhá srovnávací (referenční). Potenciál měrné elektrody závisí na aktivitě (koncentraci) měřeného analytu ve zkoumaném vzorku, potenciál srovnávací elektrody je konstantní, nezávislý na složení analyzovaného vzorku. Rozdíl potenciálů se měří voltmetrem v milivoltech (mV) s velmi vysokým vstupním odporem (více jak  $10^{12} \Omega$ ). Vysoký vstupní odpor je nutný pro zajištění nulového proudu.



Obr. Potenciometrie – schéma uspořádání měřicího systému

## Druhy elektrod

### 11.1.1. Srovnávací (referenční) elektrody

#### a) Vodíková elektroda

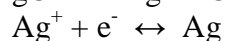
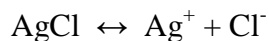
Referenční elektroda s nulovým potenciálem je standardní vodíková elektroda (skládá se z kovové platiny potažené elektrolyticky vyloučenou houbovitou platinou (platinová čern) nasycenou plynným vodíkem, který je přiváděn pod tlakem 101.325 Pa. Elektroda je ponořena do roztoku s jednotkovou aktivitou vodíkových iontů). Práce s vodíkovou elektrodou je velmi komplikovaná a nepohodlná. Proto bylo zavedeno používání referenčních elektrod, které sice nemají nulový potenciál, ale jejich potenciál je konstantní a známý. Jsou složeny z kovu, který je potažen tenkou vrstvičkou jejich vlastní nerozpustné sloučeniny.

#### b) Kalomelová elektroda

Je tvořena rtuť, která je pokryta málo rozpustným chloridem rtuťným  $Hg_2Cl_2$  (kalomelem) a je ponořena do nasyceného roztoku KCl. Elektroda je ponořena do zkoumaného roztoku. Na konci elektrody je tzv. elektrolytický spoj, který neumožňuje míchání zkoumaného roztoku s roztokem KCl, ale je vhodný pro přenesení elektrických nábojů. Z Nernstovy rovnice lze odvodit, že potenciál kalomelové elektrody je závislý na aktivitě chloridových iontů. Jestliže je koncentrace KCl uvnitř kalomelové elektrody stálá (např. nasycený roztok KCl) je i potenciál kalomelové elektrody stálý ( $E = 0,2412 \text{ V}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), nezávisle na tom, do jakého měřeného roztoku je elektroda ponořena.

### c) Argentchloridová (chloridostříbrná) elektroda

Je tvořena stříbrným drátkem potaženým vrstvou nerozpustného AgCl v roztoku 3 mol/l KCl. Na elektrodě probíhají následující rovnovážné reakce:

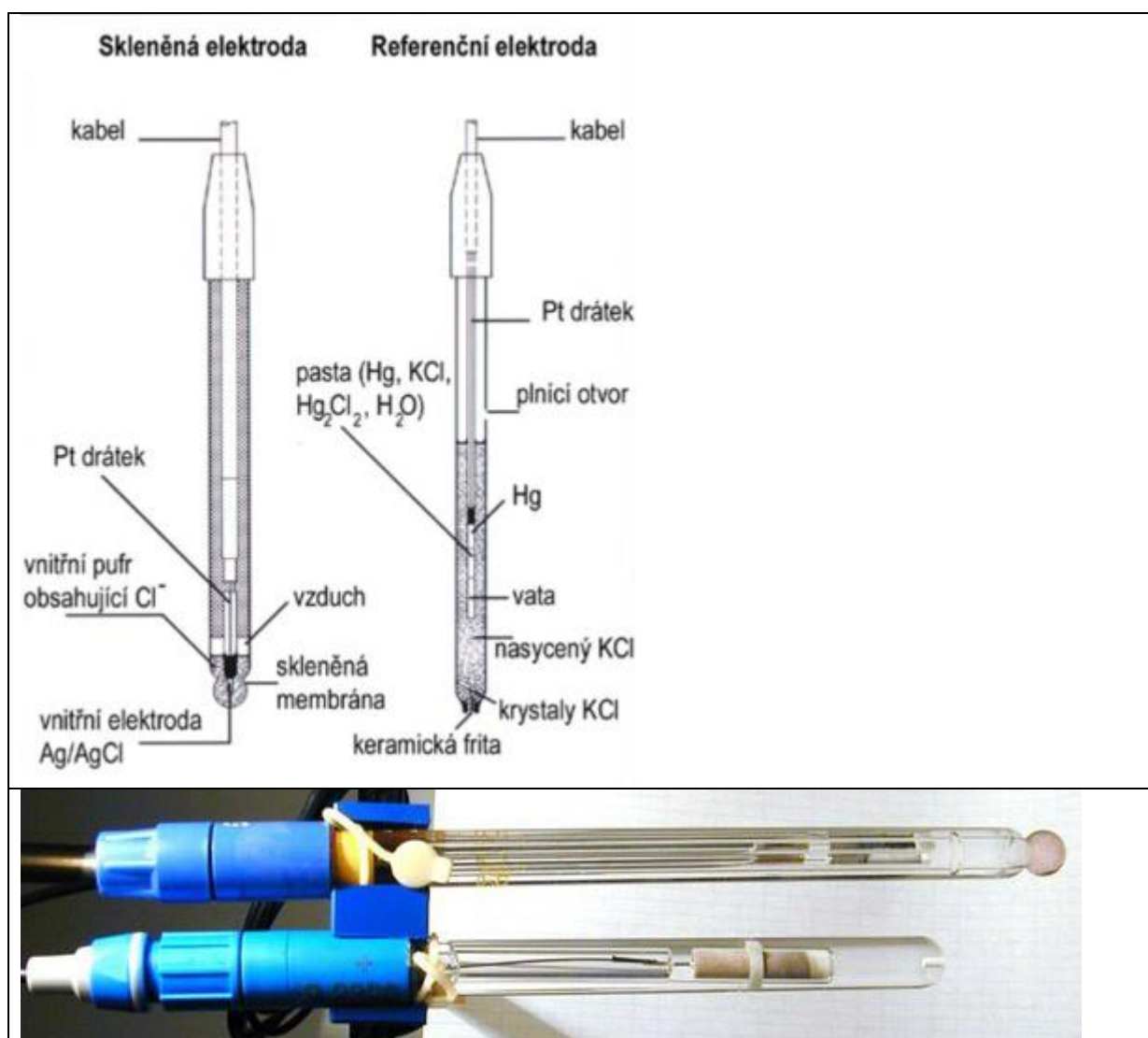


Potenciál argentchloridové elektrody je stálý ( $E = 0,2042 \text{ V}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ),

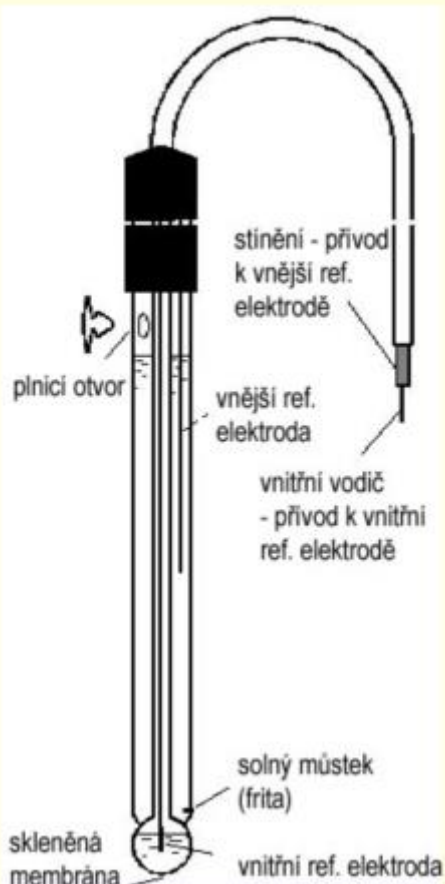
### 11.1.2. Měrné (indikační) elektrody

#### a) Skleněná elektroda – viz také kapitola analyzátorů ABR

Patří mezi elektrody se skleněnou membránou, je naplněna roztokem HCl nebo puforem (tedy prostředím o konstantním pH), do které zasahuje stříbrný drátek. Potenciál vzniká na povrchu skleněné membrány, výměnou  $\text{H}^+$  iontů z roztoku, do kterého je elektroda ponořena, za sodné ionty z povrchu skla. Tato elektroda je někdy součástí tzv. kombinované elektrody, která kromě této měrné elektrody obsahuje i elektrodu srovnávací. Elektrody mají skleněnou membránu a zabudovaný externí referenční systém. (Ag/AgCl nebo  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ). Vnější referenční elektroda je většinou plněna nasyceným roztokem KCl.



## Skleněná (měrná) a kalomelová referenční elektroda



## Kombinovaná elektroda

Před vlastním měřením se na měřicím přístroji (pH-metr) musí zjistit teplota měřeného roztoku a provést kalibraci přístroje pomocí standardních pufrů při zjištěné teplotě.

Příklady standardních pufrů

Pufr	pH(+25°C)
Hydrogenvínan draselný, nasycený roztok	3,557
0,05 mol/kg hydrogenftalan draselný	4,008
0,025 mol/kg $\text{KH}_2\text{O}_4$ + 0,025 mol/kg $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6,865
0,01 mol/kg tetraboritan sodný	9,180

Následuje vlastní měření pH. Po měření se elektroda uchovává nejčastěji v pufru. V současné době má v klinické biochemii praktické využití skleněná elektroda pouze pro výše uvedená měření  $\text{H}^+$  a  $\text{Na}^+$  vzhledem k dostatečné selektivitě v přítomnosti ostatních interferujících iontů.

Životnost pH a  $\text{Na}^+$  skleněných elektrod v analyzátoch dosahuje 12 i více měsíců.

**b) Severinghausova elektroda ( $pCO_2$ )** – viz kapitola Analyzátoary ABR

Elektroda je příkladem aplikace použití skleněné pH-elektrody. Aktivita  $H^+$  měřená pH elektrodou je úměrná parciálnímu tlaku  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) ve zkoumaném vzorku.

**c) ISE elektrody** – viz kapitola ISE a biosenzory

Názvem iontově selektivní elektrody (ISE) jsou obvykle označována elektrochemická čidla, která umožňují potenciometrická měření aktivity iontů ve vodných nebo smíšených prostředích, případně parciálních tlaků plynů rozpuštěných v kapalinách.

Poločlánek, který představuje ISE ponořená do zkoumaného roztoku, sestává obvykle z iontově selektivní membrány, vnitřního elektrolytu a vnitřní referentní elektrody, může být schematicky zapsán např. pro konstrukci čidla primárně reagujícího na změny aktivity iontu  $Q^+$  ve zkoumaném roztoku:

$Ag | AgCl | \text{ vnitřní elektrolyt } (Q^+, Cl^-) | \text{ membrána selektivní k iontům } Q^+ | \text{ vzorek}$   
Druhým poločlánkem je vnější srovnávací elektroda (kalomelová, argentschloridová apod.). Hlavním požadavkem je, aby iontově selektivní membrána měrné elektrody dokonale oddělovala zkoumaný roztok od vnitřního elektrolytu čidla a aby byla co nejméně atakována rozpouštědly, s nimiž při měření přichází do styku.

## 11.2. Konduktometrie

Konduktometrie je založena na měření vodivosti analyzovaného elektrolytu, tedy na schopnosti roztoku elektrolytu vést elektrický proud. Vodivost roztoku závisí především na koncentraci iontů v roztoku. Elektrická vodivost ( $G$ ) je převrácená hodnota odporu ( $R$ ).

$$G = 1/R$$

Jednotkou vodivosti je siemens ( $S$ ), jednotkou elektrického odporu je 1 Ohm.

Podle Ohmova zákona je proud ( $I$ ) přímo úměrný napětí ( $U$ ) a nepřímo úměrný odporu ( $R$ )

$$I = U / R$$

Odpor vodiče je přímo úměrný jeho délce  $l$  (vzdálenost elektrod) a nepřímo úměrný průřezu  $q$  (plocha elektrod),  $p$  je měrný nebo-li specifický odpor.

$$R = p \cdot l / q$$

Převrácená hodnota měrného odporu se nazývá měrná vodivost. Jednotkou měrné vodivosti je siemens/m ( $S \cdot m^{-1}$ ).



Měření vodivosti se provádí pomocí konduktometrů. vzdálenost elektrod i jejich plocha jsou konstantní.

**Princip.** Na rozdíl od kovů, kde proud vedou elektrony, vedou v roztocích proud ionty. Do měřeného roztoku se ponoří dvě elektrody ve formě platinových plíšků. Elektrody jsou obklopené skleněným válečkem, který je zespodu otevřený; toto uspořádání se nazývá vodivostní nádobka. Vlivem elektrického pole migrují kationty ke katodě a anionty k anodě. Aby nedocházelo k polarizaci elektrod a k elektrolyze (k narušení povrchu elektrod) používá se při měření střídavé napětí. V přítomnosti iontů v roztoku klesá odpor a roste vodivost, tj. větší proud probíhá mezi elektrodami. Elektrický proud je potom proporcionální vodivosti roztoku.

**Využití.**

- V klinické biochemii se principu měření vodivosti používá především při sledování kvality vody pro analytické účely. Vodivost vody, používané automatickými biochemickými analyzátoary nesmí překročit hodnotu  $1 \mu S \cdot m^{-1}$ , pro potřeby HPLC hodnotu  $0,1 \mu S \cdot m^{-1}$ . Úpravny vody v laboratořích jsou vybaveny průtokovými konduktometry, sloužící ke kontinuálnímu měření vodivosti protékající vody.

- Konduktometrii lze využít i v analytických metodách, pokud je výsledkem chemické reakce vznik iontů, které vedou k proporcionálnímu zvýšení vodivosti. Příkladem je enzymatické stanovení močoviny v séru. Ureáza v reakční směsi působí přeměnu močoviny na ionty  $\text{NH}_4^+$ , které úměrně koncentraci močoviny zvýší vodivost (Urea Analyser Beckman).
- Nižší vodivosti erytrocytů proti plazmě se využívá při konduktometrickém měření hematokritu krve. Takto změřená hodnota hematokritu je jen orientační, protože ji ovlivňuje celá řada dalších okolností. Přes tato omezení je konduktometrické měření hematokritu častou součástí analyzátorů ABR parametrů, iontů a krevních plynů pro svoji jednoduchost.
- Dalším využitím konduktometrie je použití vodivostních detektorů u kapalinové nebo plynové chromatografie(LC, GC).

	
Laboratorní konduktometr	Průtokový konduktometr pro měření vodivosti protékající vody v úpravnách vody



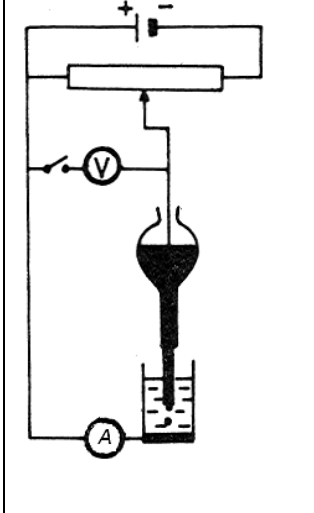
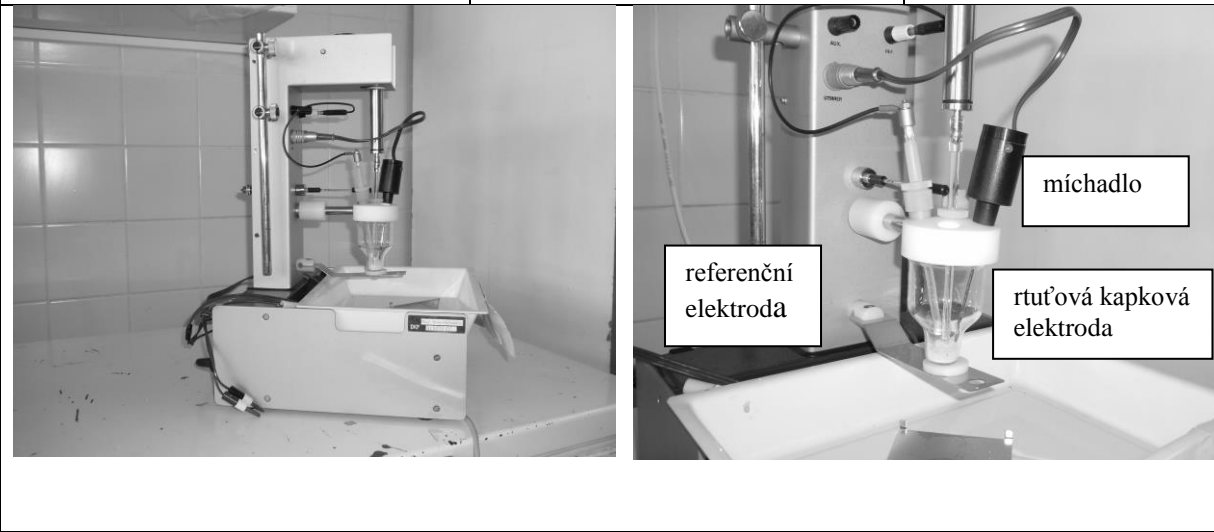
### 11.3. Polarografie (voltametrie)

Objevitelem polarografie je Prof. Jaroslav Heyrovský, který za svůj objev z roku 1922 obdržel v roce 1959 jako dosud jediný český vědec Nobelovu cenu.

#### 11.3.1. Klasická polarografie

Při polarografii sledujeme závislost proudu procházejícího analyzovaným roztokem na plynule měnícím se stejnosměrném polarizačním napětí, vloženém na dvě rtuťové elektrody. Jedna elektroda (katoda) je polarizovatelná (mění svůj potenciál), druhá elektroda (anoda) je nepolarizovatelná (její potenciál se nemění). Použití polarografie je orientováno na stanovení látek, které lze oxidovat či redukovat.

Stanovení se provádí na přístroji, nazývaném polarograf.

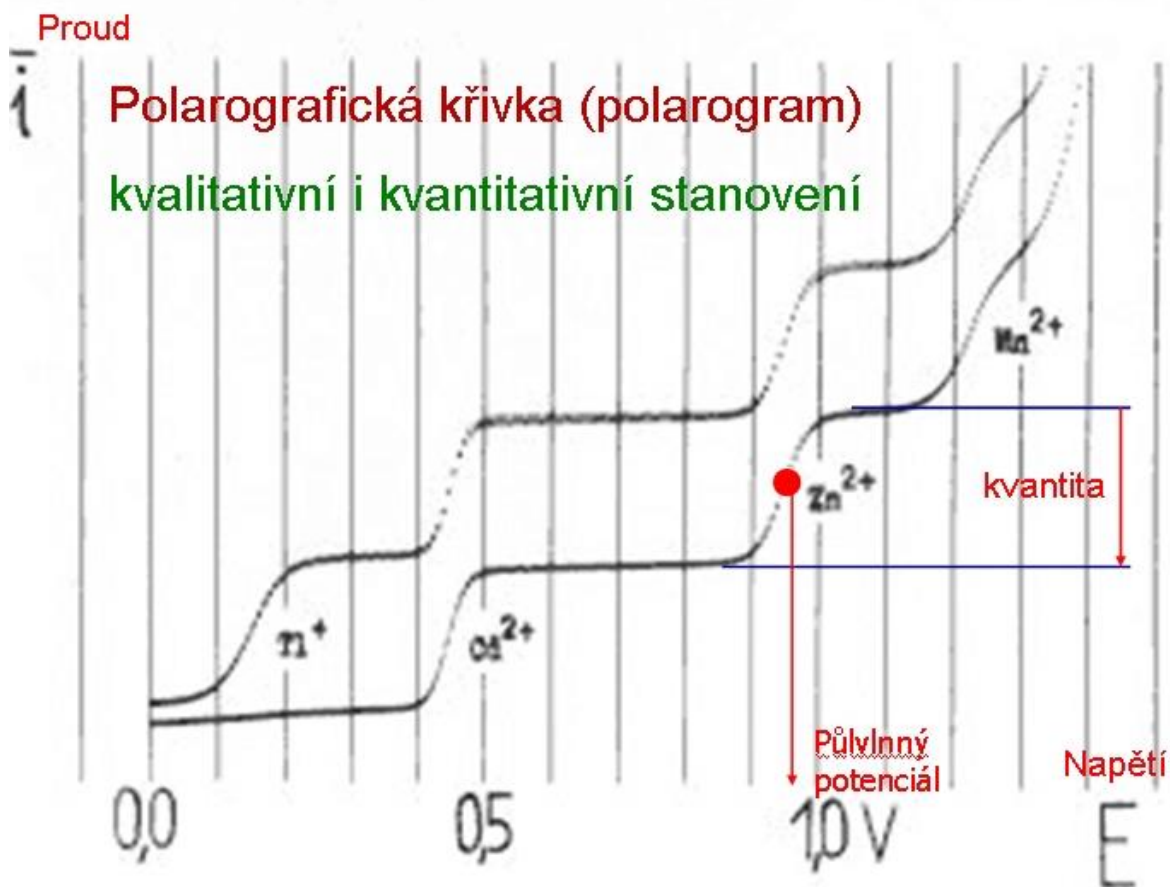
		
<p>Prof. Ing. Jaroslav Heyrovský (1890-1967)</p>	<p>Jeden z prvních polarografů prof. Heyrovského</p>	<p>Schéma polarografu</p>
		
<p>Polarograf s detailem na měřící nádobku</p>		

Katodu tvoří rtuťová kapka, odkapávající z kapiláry (tím se neustále regeneruje, není ovlivněna produkty elektrolýzy) anodu tvoří rtuť na dně polarografické nádobky (slouží jako referenční/srovnávací elektroda). K analyzovanému vzorku se přidává roztok základního elektrolytu, jehož ionty ve sledovaném rozmezí napětí nesmí na elektrodách reagovat, tento elektrolyt slouží především ke zvýšení vodivosti.

Na počátku analýzy je napětí nulové, při zvyšování napětí dochází k polarizaci rtuťové elektrody. Při určitém napětí dojde k rozkladu elektrolytu, toto napětí se nazývá rozkladné. Analyt přítomný v analyzovaném vzorku schopný oxidace nebo redukce se začne při svém rozkladném napětí vylučovat na povrchu rtuťové kapkové elektrody. Pokud se analyt vylučuje dochází k náhlému vzrůstu intenzity proudu. Tento proud je tím vyšší, čím je vyšší koncentrace stanovovaného analytu. Tento proud se potom ustálí i při dalším zvyšování napětí. Ustálená hodnota tohoto proudu se nazývá limitní difuzní proud. Potenciál rtuťové kapkové elektrody se dále plynule zvyšuje až při dosažení dalšího určitého potenciálu se začne na elektrodě vylučovat další druh iontů přítomných v měřeném vzorku.

Závislost proudu na zvyšujícím se napětí se dá znázornit graficky jako polarografická křivka. Při spuštění kolmice z inflexního bodu vlny na osu x (hodnota potenciálu) se určí tzv. půlvlnový potenciál, který charakterizuje druh analytu (kvalita). Výška vlny je úměrná

kocentraci analytu v analyzovaném vzorku (kvantita). Polarografie je metoda kvantitativní i kvalitativní.



### 11.3.2. Polarografie na tuhých elektrodách

Elektrody bývají zhotoveny z platiny, zlata, stříbra, aj. (tvoří katodu) a jako referenční elektrody (tvoří anodu) se používají např. chloridostříbrná nebo kalomelová elektroda. Příklad: Clarkova kyslíková elektroda – viz kapitola analyzátorů ABR

### 11.3.3. Amperometrie

je metoda, při níž je na pracovní elektrodu vložen konstantní potenciál a měří se změny proudu mezi indikační (polarizovatelnou) a referenční (nepolarizovatelnou) elektrodou v závislosti na čase. Velikost tohoto proudu v přítomnosti analytu (depolarizátoru) je mírou jeho koncentrace. Jde o metodu odvozenou od metod a polarografických, lze při ní použít stejné instrumentace.

### 11.4. Coulometrie

Coulometrie je elektroanalytická metoda, při které se měří velikost elektrického náboje (coulomb) procházející mezi dvěma elektrodami potřebného k elektrochemické přeměně (oxidaci nebo redukci) stanovovaného analytu. Velikost elektrického náboje procházejícího mezi elektrodami je přímo úměrná oxidaci nebo redukci elektroaktivní látky na jedné z elektrod. Náboj přenesený v tomto procesu je podle Faradayova zákona úměrný množství elektroaktivní látky.

$$Q = z \cdot a \cdot F$$

Q – množství elektrického náboje prošlého měřicí komůrkou

z – počet elektronů přenesených při oxidační nebo redukční reakci

a – množství elektroaktivní látky v molech

F - Faradayův náboj (96 500 coulombů)

Metoda využívá **II. Faradayův zákon**, který říká, že k vyloučení nebo rozložení jednoho molu chemických ekvivalentů látky je nutné, aby roztokem prošel jeden mol elektronů (t.j. Faradayův náboj (F), který je roven 96 500 coulombů).

$$A = M_r / z \cdot F$$

A – elektrochemický ekvivalent

$M_r$  – relativní molekulová hmotnost vylučované nebo rozkládané látky

F – Faradayův náboj (96 500 coulombů)

z – počet elektronů, které se vymění s elektrodou

Při této metodě se měří množství elektrického náboje (měření coulombů) prošlého analyzovaným roztokem. Do roztoku jsou vloženy dvě elektrody, pracovní a pomocná. Měření se provádí na přístrojích nazývaných coulometry. Při elektrolýze se zaznamenává závislost proudu na čase. Z velikosti prošlého náboje se vypočítá množství stanovované látky.

### Rozlišujeme

**Coulometrii prováděnou při konstantním potenciálu** pracovní elektrody (potenciostatická coulometrie)

Při této metodě proud neustále klesá až do bodu ekvivalence. Měří se množství prošlé elektřiny.

**Coulometrii prováděnou při konstantním proudu** pracovní elektrody (coulometrická titrace)

Při této metodě vzniká titrační činidlo elektrolyticky na pracovní elektrodě průchodem konstantního stejnosměrného proudu. Takto vzniklé titrační činidlo potom reaguje se stanovovanou látkou v analyzovaném roztoku. Měří se čas od počátku elektrolýzy do dosažení bodu ekvivalence, který zjistíme nejčastěji potenciometricky nebo ampérmetricky pomocí pomocných elektrod.

Analyzovaným roztokem prochází proud (I) o konstantní velikosti, elektrický náboj (Q) prošlý analyzovaným roztokem do bodu ekvivalence vypočítáme jako součin doby (t) elektrolýzy a velikosti prošlého proudu (I) pomocí vztahu:

$$Q = I \cdot t$$

Množství stanovované látky (m) potom vypočítáme z **I. Faradayova zákona**: Hmotnost látky vyloučené nebo rozložené při elektrolýze je přímo úměrné velikosti elektrického náboje prošlého elektrolytem

$$M = Q \cdot A$$

### Stanovení chloridů coulometricky

Přístroje se nazývají coulometrické titrátory (v našem příkladu chloridometry). Skládají se z titrační nádobky obsahující stanovovaný analyt (v tomto případě chloridy,  $Cl^-$ ), stříbrné anody (+) a pomocné stříbrné katody (-), děle z míchadla a pomocných elektrod pro stanovení bodu ekvivalence (konec titrace) připojených na potenciometr. Mezi stříbrnou anodu a platinovou katodu je veden konstantní elektrický proud

Stříbrné kationty vznikají elektrolyticky na stříbrné anodě:  $Ag \rightarrow Ag^+ + e^-$

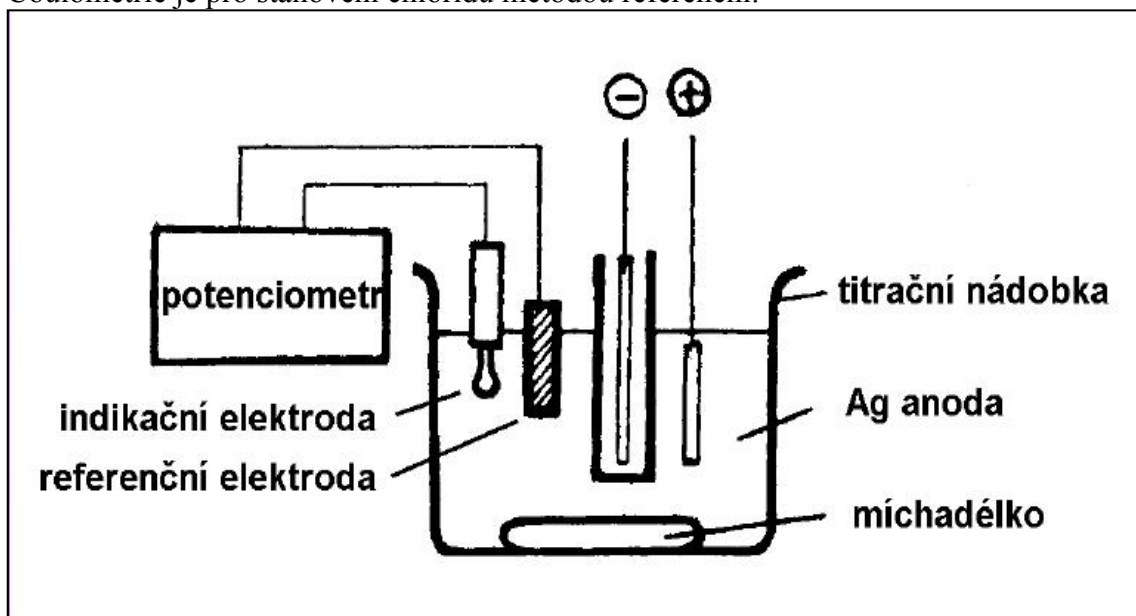
Na katodě je redukován  $H^+$  na plynný vodík.

Stříbrné kationty reagují se stanovovanými chloridovými anionty přítomnými v analyzovaném vzorku za vzniku nerozpustného chloridu stříbrného:  $Ag^+ + Cl^- \rightarrow AgCl$   
V bodě ekvivalence, tj. okamžik kdy jsou všechny chloridové ionty vázány se stříbrnými kationty, dojde k prudkému nárůstu koncentrace  $Ag^+$  a tím i náhlé změně vodivosti.

Chloridový titrátor měří čas potřebný k dosažení bodu ekvivalence. Elektrický náboj se vypočítá jako součin tohoto času a velikosti konstantního proudu. Množství stanovovaného analytu (m) se vypočítá z Faradayových zákonů (viz výše). Přístroje se v bodě ekvivalence vypínají automaticky. Zjednodušeně: měří se časy k dosažení bodu ekvivalence, přístroj se kalibruje pomocí kalibrátorů se známou koncentrací chloridů, zjištěné časy se porovnají



s časy analyzovaných vzorků, naměřené časy jsou přímo úměrné koncentraci chloridů .  
Coulometrie je pro stanovení chloridů metodou referenční.



Obr. Schéma coulometru



Coulometr typ Sherwood 926S



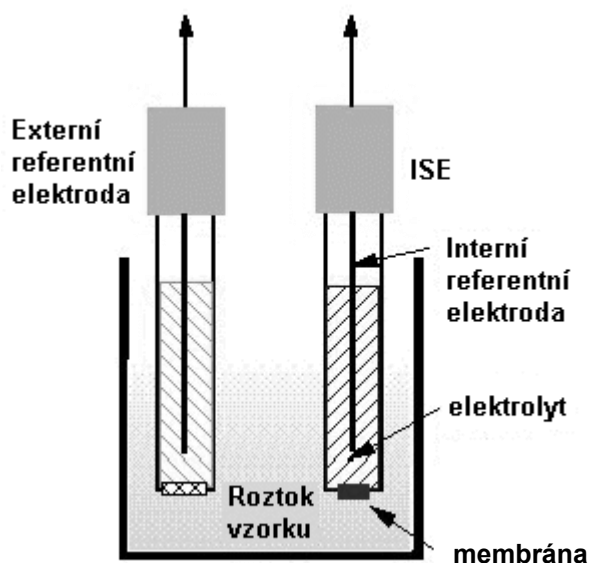
Coulometr typ Karl Fischer

## 12. Iontově selektivní elektrody (ISE), biosenzory

Názvem iontově selektivní elektrody (ISE) jsou obvykle označována elektrochemická čidla, která umožňují potenciometrická měření aktivity iontů ve vodných nebo smíšených prostředích, případně parciálních tlaků plynů rozpuštěných v kapalinách.

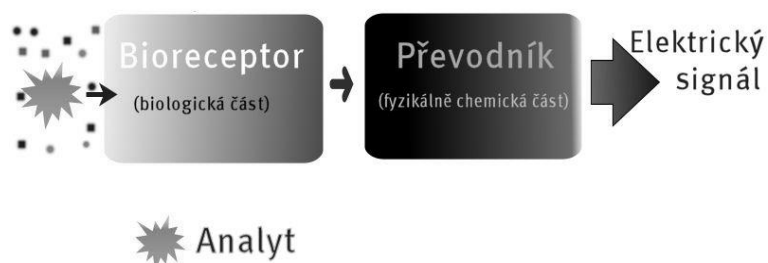
ISE ponořená do zkoumaného roztoku, sestává obvykle z iontově selektivní membrány, vnitřního elektrolytu a vnitřní referenční elektrody.

Druhou částí měřicího systému je vnější srovnávací (referenční) elektroda (kalomelová, argentchloridová).



Obr. 145 Měřicí systém pomocí ISE

**Biosenzor** je analytický přístroj, v principu ISE, obsahující bioreceptor a fyzikálně-chemický převodník.



**Bioreceptory** jsou molekuly, často enzymy, které rozpoznávají analytický cíl, tj. látku, která má být analyzována.

Můžeme je rozdělit na:

- Biokatalytické (stanovování látka je enzymem přeměňována v průběhu chemické reakce, stanovovaná látka obvykle vstupuje do reakce jako substrát)
- Bioafinitní (imunosenzory, stanovovaná látka je specificky vázána protilátkou)

**Převodník** převádí analytický cíl na měřitelný signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika chemických látek ve vyšetřovaném vzorku.

Převodníky mohou být:

- Elektrochemické
- Optické

Důležitou částí je i nosič bioreceptoru.

Prvním biosenzorem byla enzymová elektroda na stanovení glukózy (1972). V roce 1987 byly zkonstruovány první osobní glukometry. Biokatalyzátor (enzym) v imobilizované nebo insolubilizované podobě je umístěn na konvenční ISE, kterou se měří úbytek reaktantu nebo přírůstek produktu biochemické reakce. Změny v koncentracích produktů bývají často indikovány potenciometricky, ale také ampérometricky, jak tomu je např. u enzymové elektrody pro stanovení glukózy nebo alkoholu, využívá se také konduktometrie. V potenciometrických biosenzorech se nejvíce uplatňují ISE se skleněnou, pevnou nebo plastickou membránou.

Klasifikace ISE:

- **Skleněné elektrody** mají membránu tvořenou různými vícesložkovými skly. Tyto elektrody patří mezi elektrody s pevnou homogenní membránou, k jejich samostatnému řazení přispívá dlouholetá tradice a způsob využití (především pro měření pH)
- **Elektrody s vhodnými přídavnými membránami**, jejichž potenciometrická detekční jednotka je založena na konvenčních elektrodách. Patří mezi ně tzv. plynové elektrody a elektrody s biokatalytickými membránami (biosenzory)
- **Elektrody s kapalnou membránou** mají membrány zhotoveny z kapalných elektroaktivních sloučenin nebo z elektroaktivních pevných materiálů rozpuštěných ve vhodném organickém rozpouštědle (tzv. mediátoru) nemísitelném s vodou. Elektroaktivní látkou v kapalinových membránách může být buď iontoměnič (hydrofobní kyseliny, zásady nebo soli), nebo ionofor (valinomycin, nonactin, cyklické ethery atp.). Mezi elektrody s kapalnou membránou patří také ty, jejichž membrána je tvořena měkkými plasty, v málo těkavém plastifikátoru je současně rozpuštěna vhodná elektroaktivní látka. Elektrody, u nichž je plastickou membránou přímo potažen vnitřní kovový vodič jsou známy jako elektrody typu "coated-wire".
- **Elektrody s pevnou membránou** ("solid-state"), tj. membránou tvořenou pevnými, málo rozpustnými solemi, které mohou být založeny na monokrystalech, ztuhlých taveninách nebo polykrystalických tabletách lisovaných z práškových solí. Vnitřní elektrolyt se u tohoto typu elektrod obvykle nahrazuje kovovým kontaktem ("all-solid-state"). Membrány mohou být zhotoveny také z heterogenních směsí sraženin zabudovaných do polymerní matrice.
- **Elektrody připravené sítotiskovou technikou** – na jednu matrici lze vytisknout i více senzorů najednou

Nejrozšířenějším principem měření je potenciometrie při které se ze změřené hodnoty napětí elektrochemického článku zjišťuje koncentrace (nebo aktivita) iontu v roztoku. Při předpokladu lineárního průběhu kalibrace se běžně používá jednoduchá kalibrační metoda založená na měření napětí článku ve dvou standardních roztocích ve zvoleném koncentračním rozmezí (dvoubodová kalibrace).

## 12.1. Stanovení sodného kationu (Sodík, Natrium, Na<sup>+</sup>)

Jako indikační se používá elektroda s iontově-výměnnou membránou, lze použít i skleněnou elektrodu; jako referenční elektroda se používá téměř výhradně Ag/AgCl elektroda, ojediněle i jiné, např. kalomelová elektroda. Napětí mezi indikační a referenční elektrodou se měří citlivým digitálním voltmetrem (změna aktivity o řád odpovídá změně potenciálu o 0,059 mV) s vysokým vstupním odporem (proto je během měření bezproudový stav).

ISE jsou konstruovány jako *ponorné, průtokové* nebo *suché elektrodové systémy*. Průtokový systém může používat buď okénko s indikační elektrodou (elektroda se snadněji vyměňuje, ale styková plocha elektrody a tím i její citlivost je menší) nebo indikační elektrodu ve formě trubky (výměna elektrody je o něco složitější, ale styková plocha se vzorkem a tím i citlivost měření je větší). Příklady použitých ionoforů v iontově-výměnné elektrodě jsou ETH 227 (N,N',N''-triheptyl-N,N',N''-trimetyl-4,4',4''-propylidintris(3-oxabutynamide), makrocyclické crown-etry oblíbené u japonských výrobců jako DD-16-C-5, 2,3:11,12-didekalino-16-crown-5.

Přestože je mez detekce sodných elektrod s kapalnou membránou asi 1000-krát vyšší než u skleněné elektrody, používají se v současných analyzátoch prakticky výhradně indikační elektrody s kapalnou membránou, které jsou schopné sledovat aktivity sodných iontů od 1 mmol/l. Skleněné elektrody totiž nelze konstruovat tak malé jako elektrody s kapalnou membránou a bylo nutné poskytnout alespoň 100 µl materiálu k měření. Obvyklé složení měrného skla skleněné elektrody je 11 % Na<sub>2</sub>O, 18 % Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 71 % SiO<sub>2</sub>. Měřený potenciál iontově selektivní elektrody *E* určuje Nernstova rovnice.

Měření probíhá v neředěných vzorcích (*přímá metoda ISE, direct ISE*) nebo v ředěných vzorcích (*nepřímá metoda ISE, indirect ISE*).

Přímá metoda umožňuje měřit aktivitu sodných iontů v plné krvi, případně v plazmě nebo séru. Elektrochemické analyzátory používané v POCT měří výhradně v plné krvi, protože tento postup umožňuje za 1 – 2 min po odběru získat výsledek. Navíc tato metoda poskytuje správné výsledky i v případě tzv. pseudohyponatremie, kdy se v důsledku vysoké koncentrace lipidů případně bílkovin významně snižuje podíl vody v plazmě (ionty jsou vysoce polární a tedy rozpustné jen ve vodě!). Protože aktivitu měříme přímou metodou jen ve vodném podílu, není zastoupení iontů změnou velikosti vodného podílu ovlivněno. Pokud uvažujeme celkovou koncentraci včetně nevodného podílu budou výsledky falešně nízké (odtud název *pseudohyponatremie*) a neodpovídají hladině iontů ve vodní frakci. Koncentrace sodných iontů ve vodném podílu je pochopitelně vyšší než celková koncentrace (např. 158 mmol/l ve vodném podílu odpovídá 145 mmol/l celkové koncentrace).

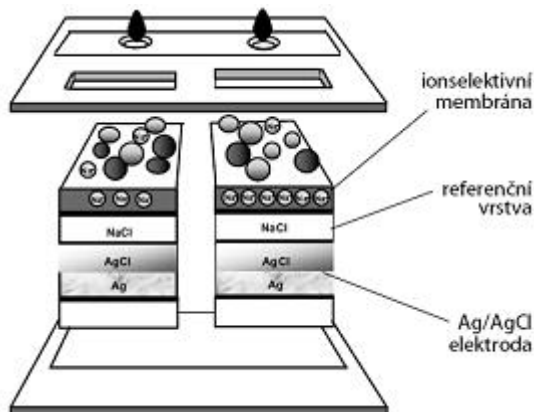
Přesto automatické analyzátory v laboratořích používají většinou nepřímou metodu s ředěnými vzorky séra nebo plazmy, někdy s možností přepnutí mezi oběma způsoby. Ředění do jisté míry přibližuje výsledek přímé metodě. Při extrémně vysokém obsahu tuků nebo bílkovin však špatnému výsledku (pseudohyponatremii) nezabrání. Technické uspořádání ISE modulu vždy umožňuje paralelní měření sodných i draselných iontů a většinou také chloridů. Lineární odezva sodné elektrody je v intervalu 1 – 100 mmol/l (kapalná membrána), resp. 0,001 – 100 mmol/l (skleněná membrána).

Při stanovení sodných iontů v moči se musí vzorky vždy ředit diluentem s velkou iontovou silou, aby se kompenzoval vliv kolísání iontové síly ve vzorku moče. Koncentrace sodných iontů v moči se mění i dvacetinásobně a iontově selektivní elektroda není schopna pracovat v takovém rozsahu změny iontové síly. Proto se přidává diluent obsahující konstantní množství disociované a dobře rozpustné soli (např. desetinasobné ředění diluentem obsahujícím > 100 mmol/l fosforečnanu hořečnatého) a kolísání koncentrace iontů v moči pak výslednou

iontovou sílu ovlivňuje málo. Nicméně spolehlivé měření v moči závisí i na dalších faktorech, např. povrchovém napětí. Proto je nutné vždy používat diluent doporučený výrobcem elektrochemického modulu. Elektrody jsou vyhřívány na 37°C.



Existuje možnost stanovení koncentrace sodíku na pevné fázi, principem je rovněž potenciometrie. V tomto případě se speciální multipipetou se dvěma špičkami dávkuje paralelně vzorek i referenční kapalina. Potenciometrická destička sestává s pěti vrstev. Nahoře je papírový můstek, který spojuje obě části komůrky a také plní funkci izolátoru proudu. Pod ním je vrstva polymeru, která slouží jako iontově selektivní membrána. Dalšími vrstvami jsou referenční vrstva želatiny s krystaly chloridu sodného a Ag/AgCl vrstva, kde dochází ke vzniku potenciálu. Spodní vrstva má funkci nosiče.



## 12.2. Stanovení draselného kationu (Draslík, Kalium, $K^+$ )

V současné době nejrozšířenější používaný princip stanovení aktivity draselných kationtů je použití ISE.

- Iontově selektivní membrána obsahuje specifický nosič draselných iontů, kterým je neionogenní makrocyclické antibiotikum valinomycin rozpuštěné v dioktyladipátu na porézním organofilním PVC nosiči. Jako nosič může sloužit také teflon.
- Méně obvyklý je v současnosti ionogenní tetra(p-chlorfenyl)boritanový anion.
- Dále se používají tzv. „crown“ etery, zejména v ISE japonských analyzátorů (např. 18-crown-6) nebo kryptandy (např. kryptand 2.2.2). Pórovitá membrána je nasycena 0,1 molárním roztokem KCl, aktivita  $K^+$  je v ní udržována na konstantní úrovni iontoměničtem; Donnanův potenciál pak závisí pouze na aktivitě  $K^+$  ve vodě (krev, sérum, plazma jsou vodné roztoky).

Podobně jako u stanovení sodného kationtu se používá přímé měření bez ředění (měřenou veličinou je aktivita ve vodné fázi) a nepřímé měření s dilucí (stanovení aktivity odpovídající

koncentraci v celém vyšetřovaném vzorku). Draselná elektroda má lineární odezvu v rozsahu 0,03 až 1000 mmol/l, takže je dobře použitelná jak pro měření draselných iontů v séru, tak i v moči. Nicméně velké změny iontové síly vlivem iontů v moči vyžadují přidání diluentu s velkou iontovou silou, aby se její výkyvy podstatně zmírnily. Při stanovení v moči se může u některých ISE projevit interference amoniakových iontů.

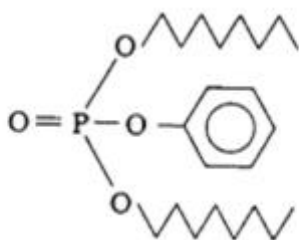
### 12.3. Stanovení chloridového anionu (Chloridy, Cl<sup>-</sup>)

Měří se aktivita chloridového anionu ve zředěném vzorku nebo v neředěném vzorku. Většina současných analyzátorů používá před potenciometrickou analýzou ředění vzorku. Nejvíce používaná je iontově-výměnná membrána obsahující kvartérní amoniakovou sůl jako anex, např. tri-n-oktylpropylamoniumchlorid v n-dekanolu. Kapalná membrána může obsahovat také o-fenantrolin. Existuje také aplikace potenciometrie na pevné fázi. V tomto případě se provádí měření bez ředění a vzorek se dávkuje paralelně s referenčním roztokem speciální dvoukanálovou multipipetou, jako při stanovení sodíku.

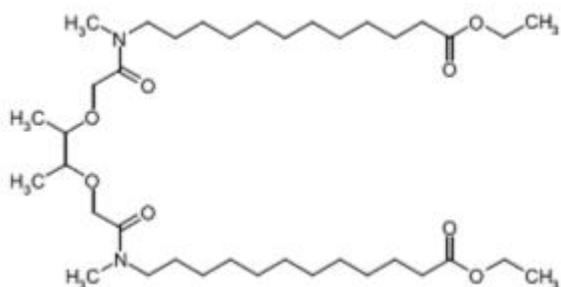
Lineární odezva chloridové elektrody je v intervalu 1 – 100 mmol/l. Přestože se často upozorňuje na nestabilitu chloridových elektrod (skutečně jejich životnost je ve srovnání se sodnými a draselnými elektrodami podstatně nižší) a nekonzistenci v selektivitě mezi jednotlivými šaržemi elektrod, je tento způsob stanovení chloridových iontů v biochemických laboratořích nejrozšířenější. Nepřímý způsob měření po ředění diluentem s velkou iontovou silou se používá častěji než přímé měření, protože je součástí technologie rozšířených ISE analyzátorů firem Abbott, Beckman, Roche, Siemens (Dade Behring, Olympus).

### 12.4. Stanovení vápenatého kationu (Ionizovaný vápník, ionizované kalcium, Ca<sup>2+</sup>)

Tento potenciometrický postup umožňuje měřit aktivitu vápenatých iontů (s jedinou výjimkou, kdy analyzátor Nova 8 firmy Nova Biomedical měřil také celkový vápník). Pro stanovení aktivity ionizovaného vápníku (iCa) se používají elektrody ionexového typu, nebo elektrody s neutrální membránou. Oba typy mají kapalnou membránu, obsahující organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou, ve kterém jsou rozpuštěny látky schopné vyměňovat nebo zachycovat ionty z vnějšího roztoku. Hydrofobní přepážka (obvykle z PVC) odděluje kapalnou membránu od měřeného roztoku. **Elektrody ionexového typu** používají ionex didecylfosforečnan vápenatý [C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>O)<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>]<sub>2</sub>Ca v dekan-1-olu nebo dioktylfenylfosfonátu (obr.a). Na fázovém rozhraní s měřeným roztokem se ustavuje rovnováha ovlivněná koncentrací vápenatých iontů v tomto roztoku.



Obr. a



Obr. b

**Elektrody s neutrální membránou** zachycují vápenaté ionty do dutin, které jim vyhovují svou velikostí (jedná se o syntetické cyklické polyetery, např. ETH 1001 (obr.b) t.j. N,N'-bis[11-(etoxykarbonyl)undecyl]-N,N'-4,5-tetrametyl-3,6-dioxaoktandiamid, nebo přírodní makrocyclické sloučeniny). Polymerní membrána obsahuje rozpouštědlo s takovými nosiči.

Při měření ionizovaného vápníku měříme potenciál měrné elektrody vůči referenční Ag/AgCl elektrodě. Obě elektrody jsou spojeny můstkem s nasyceným roztokem KCl. Tím je zaručeno jeho konstantní složení a současně nulový difuzní potenciál (iontová pohyblivost draselných a chloridových iontů je shodná). Obvyklé jsou ještě dvě přídavné platinové elektrody, které slouží pro detekci kapaliny nebo vzduchu při automatizovaném postupu. Předpokladem spolehlivosti měření je minimální odchylka mezi aktivitou vápenatého kationtu ve vzorku a v kalibračním roztoku. Expozice vzorku na vzduchu vede k úniku CO<sub>2</sub> a změně pH, na kterém je hodnota iCa závislá. Proto je nutný anaerobní odběr, zpracování i měření. Analyzátoři jsou vybaveny pH elektrodou a kromě aktuální hodnoty iCa uvádějí i hodnotu korigovanou na pH 7,4. Vliv teploty není podstatný v intervalu měření ±2 °C. Abnormální koncentrace nebo složení albuminu může u některých přístrojů zapříčinit falešně negativní nebo falešně pozitivní výsledky. Pro měření je vhodnější sérum než plazma (vliv heparinu), ale jeho anaerobní získání může být problémem. Sraženinu je nutné rychle separovat a vzorek neskladovat (vliv pH); iCa elektroda je citlivá na iontovou sílu a při měření interferují sodné ionty. Proto má každý solidní přístroj ke stanovení aktivity iCa také sodnou elektrodu. Aktivita sodných iontů nemusí být pro obsluhu dostupná, ale přístroj ji měří a používá ke korekci naměřených hodnot aktivity iCa. Vzhledem k velkému kolísání iontové síly v moči se aktivita iCa v moči nestanovuje. Mimo to iCa elektroda nepracuje při pH < 5,5, které se v moči může vyskytnout. Falešnou pozitivitu mohou způsobit bromidy.

### 12.5. Stanovení hořečnatého kationu (Ionizovaný hořčík, ionizované magnézium, Mg<sup>2+</sup>)

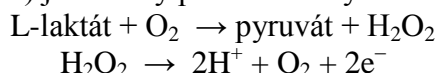
Pro stanovení ionizované frakce pomocí ISE je vhodný anaerobní odběr, současné měření pH vzorku a adjustace výsledku na pH 7,40 i když aktivita ionizovaného hořčíku (iMg) je na změny pH o něco méně citlivá, než aktivita iCa.

Iontově selektivní elektrody pro stanovení hořečnatých iontů mají často poměrně krátkou životnost (2 týdny). Používají se neutrální ionofory jako ETH 5220, tj. N,N'-oktametylenbis(N',N'-dioktylmalondiamid). Elektrody měří aktivitu ve vodné fázi vzorku, specifická je malá, interferují vápenaté kationty. Proto musí být elektrický potenciál iMg elektrody nastaven pomocí signálu iCa elektrody s využitím koeficientu selektivity pro iMg (kromě toho systém obsahuje ještě Na<sup>+</sup> a pH elektrodu). Kalibrace se provádí na dva vodné roztoky s rozdílnými koncentracemi MgCl<sub>2</sub> při známém pH a známých koncentracích Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup>. Měření iMg neruší silikonový separátor (separační gel) ze zkumavek, ani sérové lipidy.

### 12.6. Stanovení laktátu

#### a) Polarografie (amperometrie)

Měrná elektroda je potažena laktát oxidázou (odtud název „laktátová“ elektroda). Při konstantním potenciálu (přepětí) je vzniklý proud úměrný koncentraci peroxidu vodíku.



Velmi rychlý postup umožňuje měření laktátu z celé krve v elektrochemických analyzátořích. Elektroda je vlastně modifikací Clarkovy kyslíkové elektrody. Laktátový senzor obsahuje většinou čtyři elektrody (platinovou měrnou elektrodu potaženou laktát oxidázou – srovnávací argentchloridovou elektrodu – platinovou elektrodu určenou ke stabilizaci konstantního potenciálu – platinovou elektrodu bez enzymu sloužící ke stanovení interferujících látek) Odběr krve se provádí do odběrových nádobek s protisrážlivým činidlem (EDTA) a antiglykolytickým činidlem (NaF). Transport krve se uskutečňuje na ledové tříšti. Je třeba

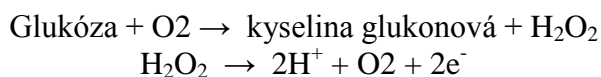
zabránit hemolýze (falešně snižuje výsledky). Separaci krevních elementů je nutné provést do 15 min od odběru, stanovení nejdéle do 2 h od odběru.

### **b) Potenciometrie**

Využívá se ferikyanidu jako mediátoru elektronů. Laktát se laktát oxidázou (LO) oxiduje na pyruvát a současně se ferikyanid redukuje na ferokyanid. Ten při zpětné oxidaci předává elektrony na platinovou katodu, kde dochází k jejich spotřebě při redukcí kyslíku na vodu. Tento postup lze automatizovat. Analýza je spolehlivá, rychlá a citlivá, ale zařízení není běžně dostupné.

## **12.7. Stanovení glukózy**

Vužívá se polarografie (amperometrie), často s využitím čipové technologie. Enzym imobilizovaný na čipu zajišťuje oxidaci glukózy ve vzorku za tvorby peroxidu vodíku. Ten je následně oxidován (+600mV), změna protékajícího proudu je úměrná koncentraci měřeného analytu.



Glukózový senzor obsahuje podobně jako u stanovení laktátu většinou čtyři elektrody (platinovou měrnou elektrodu potaženou glukózo oxidázou – srovnávací argentchloridovou elektrodu – platinovou elektrodu určenou ke stabilizaci konstantního potenciálu – platinovou elektrodu bez enzymu sloužící ke stanovení interferujících látek)

Je možné také měřit úbytek kyslíku spotřebovaného při reakci.

Firma EKF Diagnostics: analyzátoři Biosen C-line Clinic, Biosen C-line Lab+

Vlastnosti:

- Stanovení 120 až 180 vzorků za hodinu
- Čipové senzory
- 20μl vzorku (krev, plazma, sérum) se ředí 1ml systémovým roztokem
- Pravidelná kalibrace

Měřené analyty: glukóza, laktát



Biosen C-line Lab+

**Firma Eppendorf: analyzátor EBIO® plus**

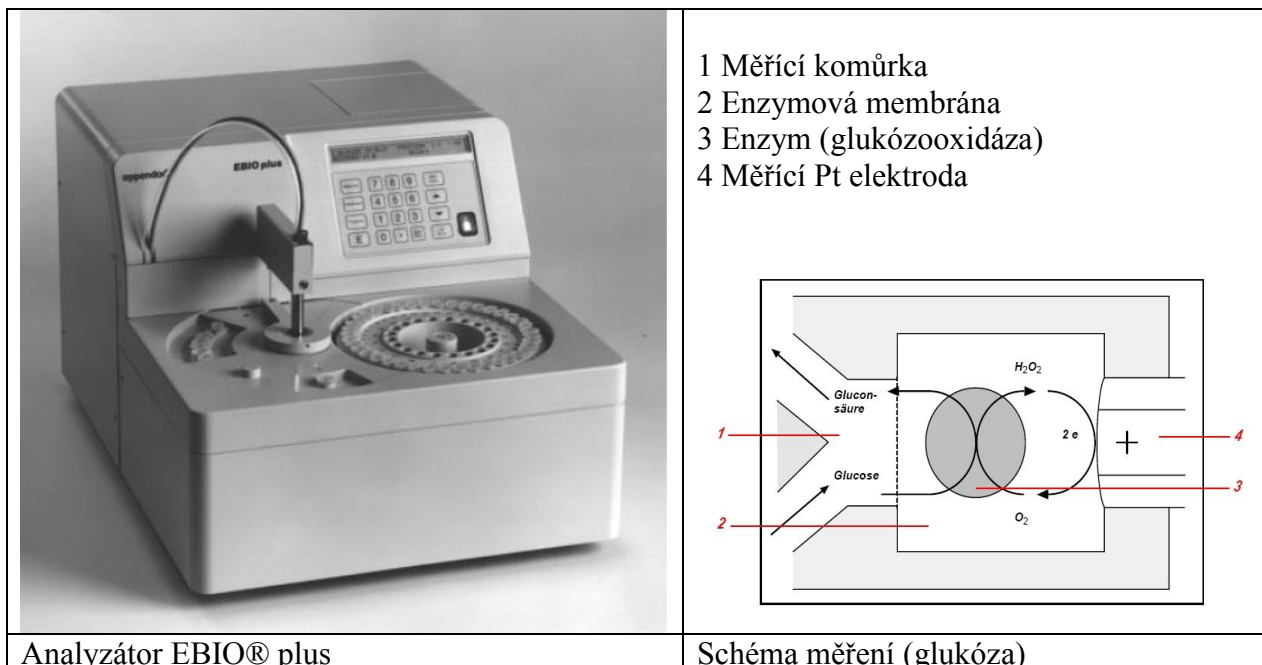
Vlastnosti:

- Stanovení 150 vzorků za hodinu



- Enzymové elektrody
- Analyzovaný materiál (krev, plazma, sérum)
- 20µl vzorku se ředí 1ml systémovým roztokem

Měřené analyty: glukóza, laktát



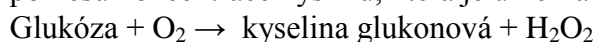
Jedním z prvních glukózových analyzátorů byl **analyzátor firmy Beckman**:

Vlastnosti:

- Stanovení 54 vzorků (sérum, plazma, moč, likvor) za hodinu
- Enzymová elektrod

Měřený analyt: glukóza

Enzym imobilizovaný v membráně elektrody zajišťuje oxidaci glukózy ve vzorku za tvorby peroxidu vodíku. Ten je rozkládan cestou, která nevede k tvorbě kyslíku. Měří se rychlost poklesu koncentrace kyslíku, která je úměrná koncentraci glukózy v analyzovaném vzorku.





Beckman Glukose Analyser 2

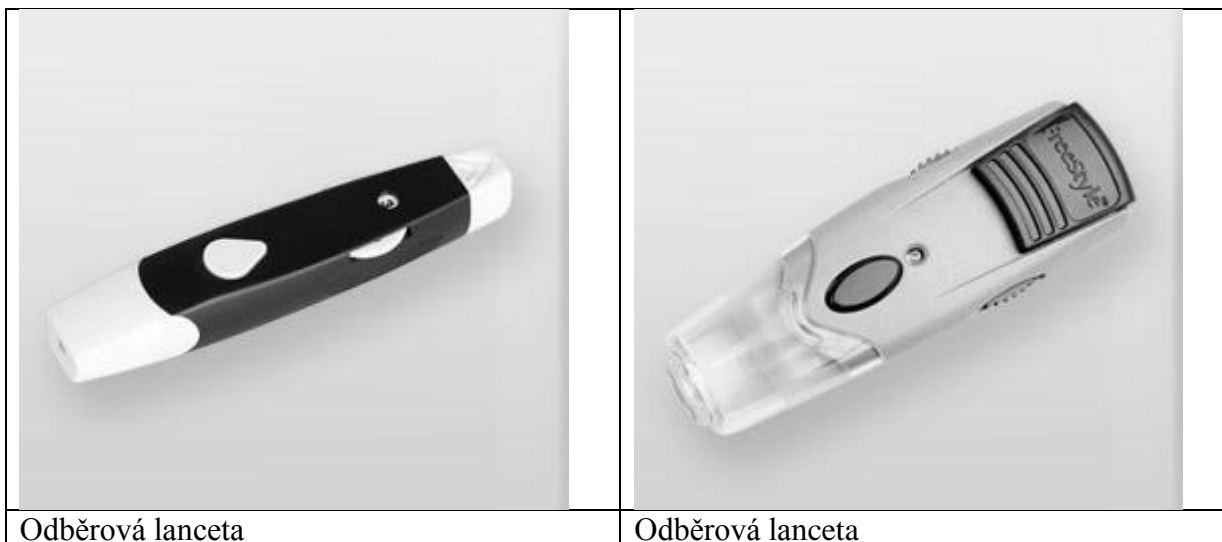
Technologie firmy **Nova Medical** použitá v glukometru StatStrip: Multi-Well™- je založena na větším počtu vrstev testovacího proužku a měrných komůrek v měřící vrstvě (jedná se o čtyři vrstvy a čtyři komůrky). Tato patentovaná technologie umožňuje rychlé stanovení koncentrace glukózy a hodnoty hematokritu; zároveň je eliminován vliv chemicky nebo elektrochemicky interferujících sloučenin přítomných v testovaném vzorku krve.




Glukometr StatStrip



Glukometr Optimum Xceed



Měření pomocí glukometrů je jednoduché. Uvádíme příklad firemního postupu (**Roche Diagnostics**) s přístrojem **Accutrend Plus** (přístroj umožňuje stanovit kromě koncentrace glukózy, také cholesterol, triacylglyceroly a laktát).

Zapnout přístroj, vložit testovací proužek, blikající šipka na displeji naznačuje, abyste přístroj otevřeli a nanесли vzorek krve

2.krok
Pomocí odběrové lancetky proved'te vpich do konečku prstu a naneste vzorek kapilární krve přímo na testovací proužek



3.krok

Zavřete přístroj a počkejte na výsledky, které se po dokončení měření zobrazí na displeji



**Kontinuální monitory** pro zjišťování koncentrace glukózy jsou přístroje, které měří koncentraci glukózy v reálném čase.

Dnes se využívají čtyři technologické postupy:

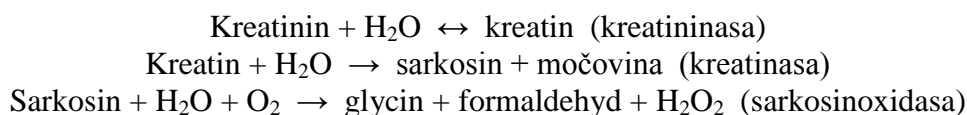
- Transkutánní senzory (s glukózooxidázou, systém obvykle tvoří senzor = měřicí elektroda, vysílač, monitor)
- Mikrodialýza kůže (metoda je založena na měření rychlosti přestupu molekul o určité velikosti přes semipermeabilní membránu, systém se skládá z biosenzoru, mikropumpy, která je zapojena na mikrodialyzační systém, řídicí jednotky)
- Neinvazivní kožní a oční přístroje k měření koncentrace glukózy (v současné době není žádný neinvazivní systém pro monitorování koncentrace glukózy dostatečně spolehlivý; výzkum se zaměřuje na: využití proteinu, na který se váže glukóza, na difuzní reflektanti založené na polarizaci, na využití Ramanových spekter, na impedanční spektroskopii, na reverzní iontoforézu a na transdermální měření vodivosti a tepelné kapacity)

## 12.8. Stanovení kreatininu

Princip: polarografie (amperometrie)

**Firma Radiometer: analyzátor ABL800 Flex**

Firma využívá dvě kreatininové elektrody. Jedna elektroda umožňuje stanovit kreatinin i kreatin přítomné v analyzovaném vzorku krve, druhá elektroda stanovuje pouze kreatin. Po odečtení obou signálů a tedy kompenzaci interferujících látek v analyzovaném vzorku krve je stanoven kreatinin. Obě elektrody mají podobné složení liší se jen v počtu imobilizovaných enzymů na membráně (jedna elektroda obsahuje všechny tři enzymy, druhá elektroda obsahuje pouze poslední dva enzymy).

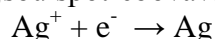


Vznikající peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) je transportován k platinové elektrodě, mezi elektrody je vloženo polarizační napětí (675mV), dochází k oxidaci peroxidu vodíku, při které vzniká elektrický proud úměrný množství peroxidu vodíku a tedy i koncentraci kreatininu v analyzovaném vzorku krve.

Na anodě probíhá oxidace (při které vznikají elektrony) peroxidu vodíku:



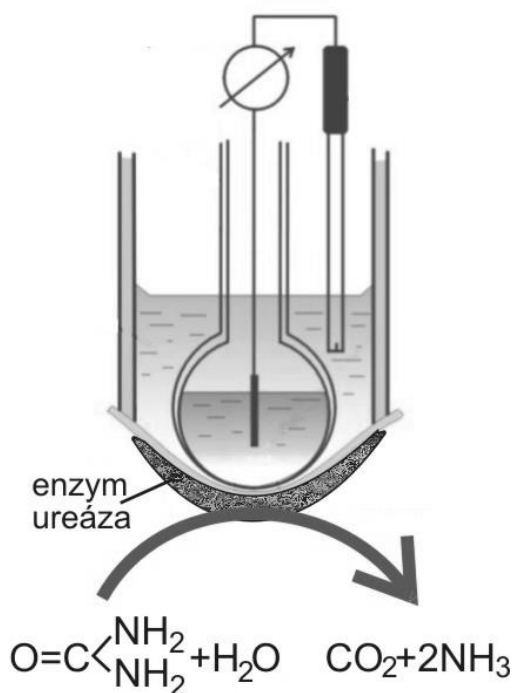
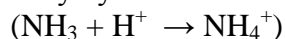
Na katodě probíhá redukce (při které jsou spotřebovávány elektrony)  $\text{Ag}^+$  (z  $\text{AgCl}$ ) na  $\text{Ag}$ :



Dva stříbrné kationy jsou redukovány při oxidaci jedné molekuly peroxidu vodíku.

### 12.9. Stanovení močoviny (urea)

Potenciometrický biosenzor se zakotvenou ureázou, stanovující vznikající oxid uhličitý ( $\text{pCO}_2$  elektroda) nebo stanovující amonné ionty vytvářené ze vzniklého amoniaku



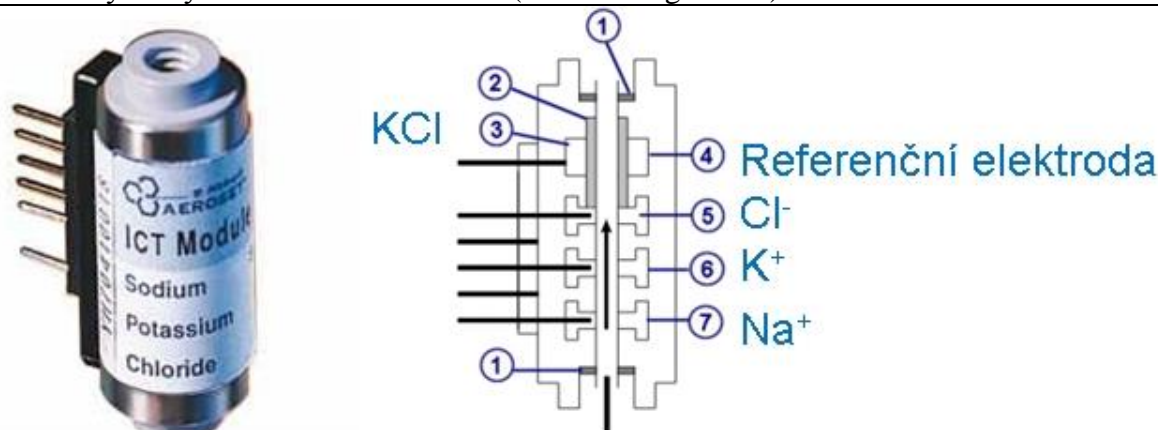
V současné době se stanovení  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ;  $\text{Cl}^-$  provádí na automatických analyzátořech, až na výjimky se tedy nepoužívají jednoúčelové přístroje.

## Architekt ci16200 technologie měření



<p><b>Fotometrie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Měření v koncovém bodě (End-point)</li> <li>• Měření reakční rychlosti (Kinetické metody)</li> <li>• Turbidimetrie</li> </ul> <p>33 fotometrických bodů 16 vlnových délek (340 až 804nm)</p>	<p><b>CMIA</b></p> <p>Chemiluminiscenční imunoanalýza na paramagnetických mikročásticích</p> <p>Chemiflex™ patentovaný ester akridinu</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• oxidace v kyselém prostředí</li> <li>• změna prostředí na zásadité</li> <li>• vzniká nestabilní N-metylakridon</li> <li>• při přechodu do stabilní formy se uvolní energie v podobě světla</li> </ul>
<p><b>Potenciometrie</b></p> <p>Technologie integrovaných čipů (ICT)</p>	

### Automatický analyzátor Architekt ci16200 (Abbott Diagnostics)



Integrovaný čip (ICT) sloužící ke stanovení  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ;  $\text{Cl}^-$  na principu nepřímé potenciometrie a uspořádání měřících elektrod

Příklad jednoúčelového přístroje:

**Firma Roche Diagnostics: analyzátor ISE 9180**

Vlastnosti:

- Programově nastavitelná konfigurace elektrod ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ;  $\text{Cl}^-$ ;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ;  $\text{Li}^+$ )

Měřené analyty:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Li}^+$



Jiným příkladem jednoúčelového přístroje je přístroj EasyLyte



**EasyLyte**

### 13. Analyzátoary acidobazické rovnováhy (ABR) a krevních plynů.

Hodnota pH krve a krevních plynů ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) patří vedle iontů a osmolality k základním charakteristikám vnitřního prostředí. Jsou důležité při monitorování vnitřního prostředí kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče, při anestezii, atd.

Přístroje pro jejich měření, stejně jako způsob jejich použití v diagnostice a léčbě poruch a rozvratů vnitřního prostředí je nerozlučně spjat se jménem dánského profesora klinické biochemie Paula Astrupa. Jeho jméno se i u nás stalo synonymem jak pro přístroj, tak i pro vlastní vyšetření acidobazických parametrů.

*Původní přístroje využívaly Astrupovu ekvilibrační metodu. Přístroj byl vybaven skleněnou mikroelektrodou pro měření pH a dvěma ekvilibračními komůrkami pro nasycení krevních vzorků dvěma různými koncentracemi  $CO_2$ . Všechny součásti přístroje byly temperovány cirkulující vodou vyhřívanou na  $37^\circ C$ . Pacientovi se odebraly 3 kapiláry arterializované kapilární krve z ušního lalůčku. V první kapiláře se změřilo aktuální pH krve. Krev ze zbývajících dvou kapilár se vypustila do ekvilibračních komůrek, ve kterých probublávaly dvě různé koncentrace  $pCO_2$ . Po několikaminutové ekvilibraci (sycení) se v obou vzorcích krve rovněž změřila hodnota pH. Aktuální hodnota  $pCO_2$  se potom zjistila extrapolací aktuální hodnoty pH krve z grafu závislosti pH na hodnotě  $pCO_2$ .*

Vývojem selektivních elektrod k měření  $pCO_2$  a  $pO_2$  začala éra analyzátorů k přímému měření acidobazických parametrů a krevních plynů. Konstrukce těchto analyzátorů od různých výrobců (Radiometer, Instrumentation Laboratory, AVL, Ciba Corning, Nova,...) byla dosti podobná. Tři elektrody (pH,  $pCO_2$ ,  $pO_2$ ) umístěné v termostátovaném prostoru ( $37^\circ C$ ) zasahují svými měrnými konci do skleněné kapiláry, do které se nasává měřený vzorek nesrážlivé krve.

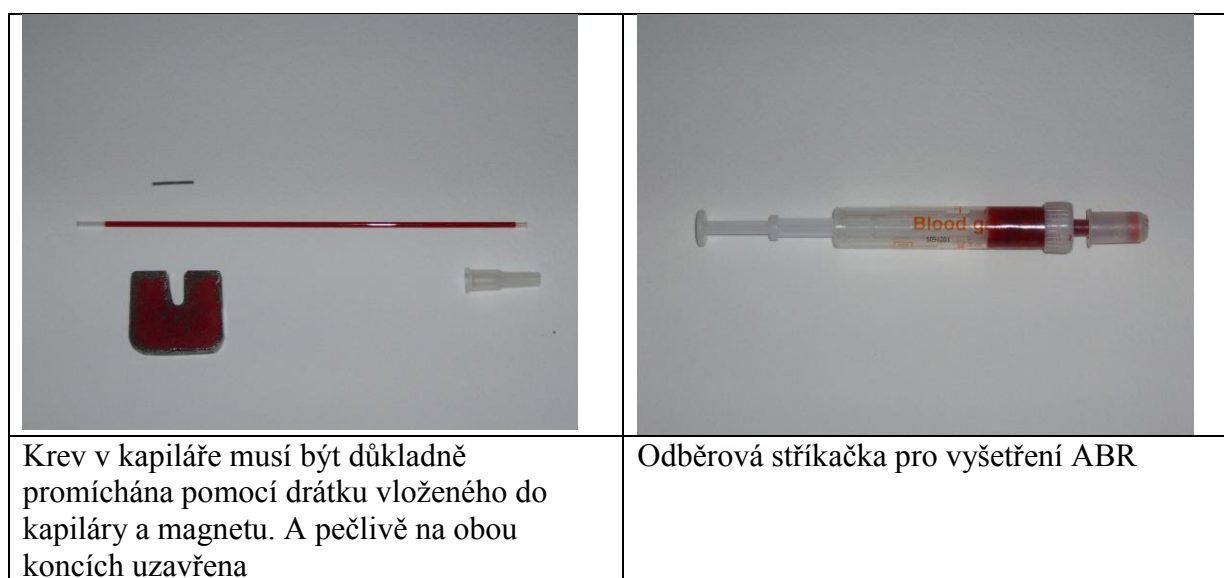
Současné analyzátoary ABR umožňují současně ze stejného vzorku krve měřit další parametry za použití iontově selektivních elektrod (Na, K, Cl, Ca, Mg), případně enzymových elektrod (laktát, glukóza, kreatinin, močovina) nebo spektrofotometrie frakcí hemoglobinu (oxyhemoglobin, karnonylhemoglobin, methemoglobin, fetální hemoglobin). Tyto analyzátoary jsou již plně automatizované. Umožňují nastavení automatické kalibrace elektrod v určených časových intervalech (např. po 6 hodinách), automatické provádění kontroly kvality, automatické promývání a případně i základní údržbu systému.

#### Preanalytické podmínky

pH,  $pCO_2$  a  $pO_2$  se stanovují:

- v nesrážlivé arterializované kapilární krvi (ušní lalůček, břicho prstu, patička u novorozenců, vždy po hyperemizaci prohrátím, masáží, apod.)
- v nesrážlivé arteriální krvi (odebírání se nejčastěji z arteria radialis, nachází se na zápěstí, v místě, kde se obvykle vyšetřuje pulz do speciální odběrové stříkačky, na jednotkách intenzivní péče se často zavádí arteriální katetr, který umožňuje opakované odběry)
- v centrální nebo (lépe) smíšené žilní krvi (z centrálního žilního katetru, portu)



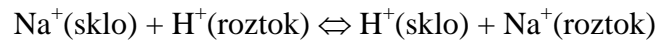


Je nutné použít protisrážlivé činidlo (heparin), v případě současného stanovení iontů je nutné použít titrovaný (balancovaný, iontově vyvážený) heparin. Odběr musí být anaerobní, bez vzduchových bublin, dokonalé promíchání krve s protisrážlivým činidlem je nutností. Analýza je nutná do 15 min od odběru, pokud se analýza provádí v mimo odběrové místo v laboratoři, musí se vzorek krve transportovat na ledu, potom je stabilita analytů při +4 až +8°C až 2h.

### 13.1. Stanovení pH – viz také kapitola Potenciometrie

Pro měření pH v roztocích se obvykle používá skleněná indikační elektroda, nejstarší a dosud i nejvíce v praxi používaná iontově selektivní elektroda. Elektroda je tvořena tenkou skleněnou membránou (tvořenou různými vícesložkovými skly), která je z jedné strany plněna pufrem o známé hodnotě pH a z druhé strany je ovlivňována prostředím měřeného vzorku o neznámém pH. Na fázových rozhraních vzniknou potenciálové rozdíly, které se měří pomocí referenčních elektrod. Potenciál vzniká výměnou iontů mezi roztokem a membránou. Ideální elektrodové sklo by mělo vykazovat rychle se ustavující teoretickou odezvu v co největším rozmezí pH, mít vyhovující chemickou odolnost malý elektrický odpor. Pro měření zásaditých roztoků obsahující sodné ionty je třeba počítat s tzv. alkalickou chybou, která se projeví naměřením nižší hodnoty pH než odpovídá skutečnosti.

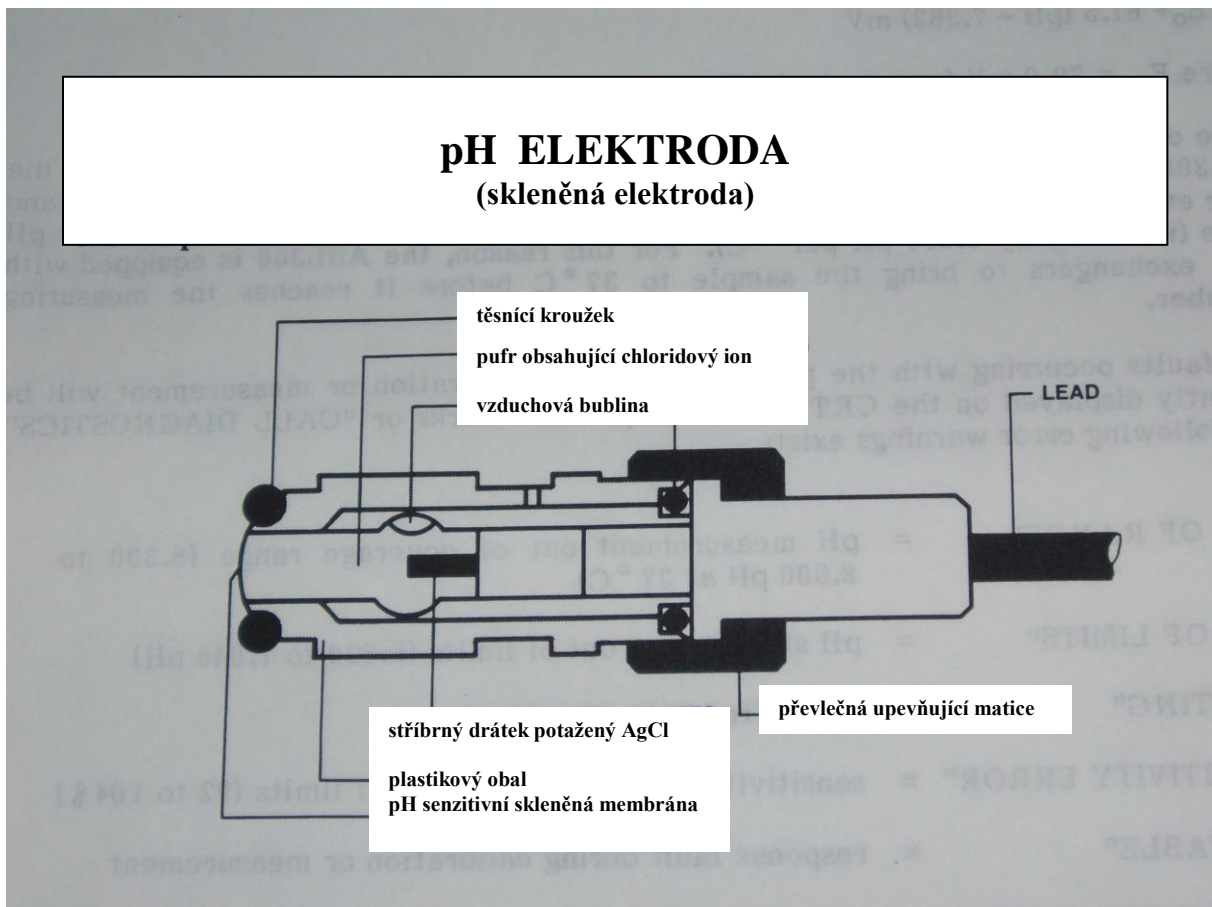
Pro měření pH je zapotřebí nejprve na povrchu skleněné membrány máčením v kyselém roztoku vytvořit hydratovanou vrstvu, v níž jsou sodné ionty ze skla nahrazeny vodíkovými ionty z roztoku:



Tyto vodíkové ionty z hydratované vrstvy se mohou účastnit při měření pH rovnovážné výměnné reakce s vodíkovými ionty v analyzovaném i vnitřním roztoku, jejímž důsledkem je vznik membránového potenciálu:



Nejvíce je používána kombinovaná pH elektroda, která má indikační i referenční elektrody společně v malé sondě. Referenční vnitřní Ag/AgCl elektroda je utěsněna v úzkém skleněném válci zakončeném skleněnou špičkou (kuličkou) citlivou na  $\text{H}^+$  ionty. Referenční vnější elektroda je tvořena drátem, který obaluje indikační elektrodu. Vnější skleněný obal je naplněn nasyceným roztokem KCl (vnější plnicí roztok) a je v blízkosti detekční špičky (kuličky) porézní (keramika). Tak vzniká kapalný můstek. Měřený roztok musí kompletně pokrýt povrch detekční špičky (kuličky). Elektroda pH pracuje v rozsahu 0 – 14 a optimální selektivitu k  $\text{H}^+$  iontům zaručuje složení skla: 72 %  $\text{SiO}_2$ , 22 %  $\text{Na}_2\text{O}$  a 6 %  $\text{CaO}$ . IFCC vypracovala v roce 1986 variantu potenciometrického měření pH jako doporučenou referenční metodu. K dispozici jsou i kazety s elektrodami na jedno použití pro POCT.



## 13.2. Stanovení pO<sub>2</sub>, parciálního tlaku kyslíku

pO<sub>2</sub> je definován, jako parciální tlak kyslíku v plynné fázi, který je v rovnováze s krví. Je měřen kyslíkovou elektrodou.

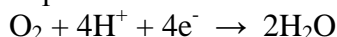
### 13.2.1. Polarografie (ampérometrie)

Tento princip používají:

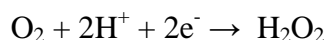
- klasické pO<sub>2</sub> elektrody
- čipové pO<sub>2</sub> elektrody
- transkutánní kyslíkové elektrody

V klasickém uspořádání měří ampérmetr proud procházející elektrickým obvodem. Elektrolyt poskytuje kontakt mezi katodou a anodou; obsahuje pufr udržující konstantní pH a také chloridy k odstranění stříbrných iontů z roztoku. Katodu pro redukci kyslíku tvoří platinový drát. Membrána propustná pro O<sub>2</sub> umožňuje jeho transport ze vzorku ke katodě. Vzorek je v kontaktu s membránou elektrody. Platinová čern katalyzuje převedení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na kyslík a vodu v případě neúplné redukce kyslíku. Vrstva AgCl je výsledkem odstranění Ag<sup>+</sup> iontů z roztoku při reakci s Cl<sup>-</sup>. Na stříbrné tyči dochází k anodické oxidaci a vložené přepětí odpovídá redukčnímu potenciálu O<sub>2</sub>. Polarografie sleduje závislost intenzity proudu a napětí (potenciálu). Vložené přepětí (630 mV) odpovídá půlvolnovému potenciálu kyslíku a umožňuje selektivně kvantifikovat jeho množství na základě měření intenzity proudu.

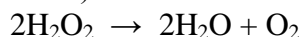
Katodická redukce probíhá jako kompletní:



nebo neúplná:

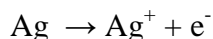


dokončená na platinové černi (amorfni Pt):

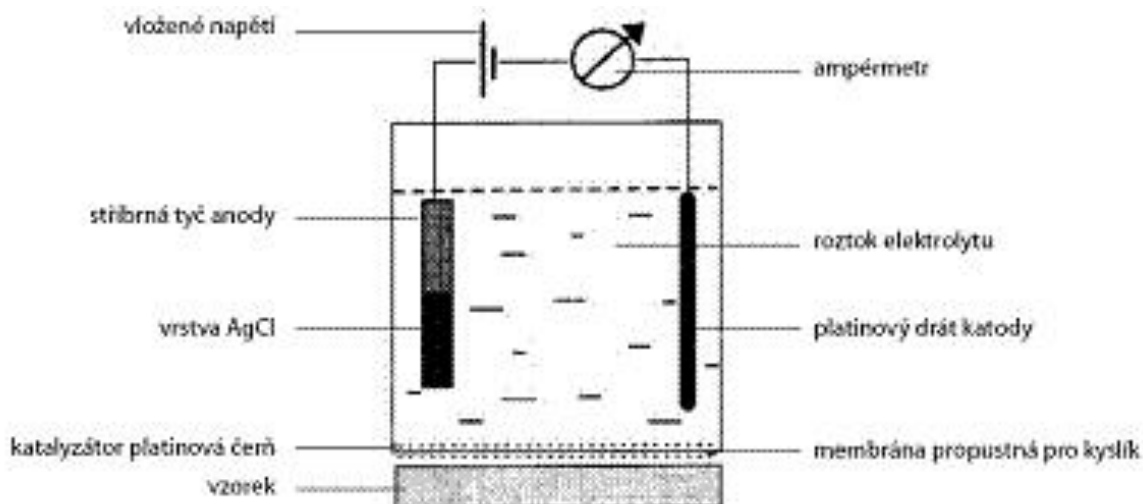


a kyslík je opět redukován na katodě. Při redukci kyslíku se spotřebovávají volné elektrony, tj. elektrický proud:

Zdrojem elektronů je anodická oxidace stříbra.



Musí být oxidovány čtyři atomy stříbra, aby mohla být redukována jedna molekula kyslíku.

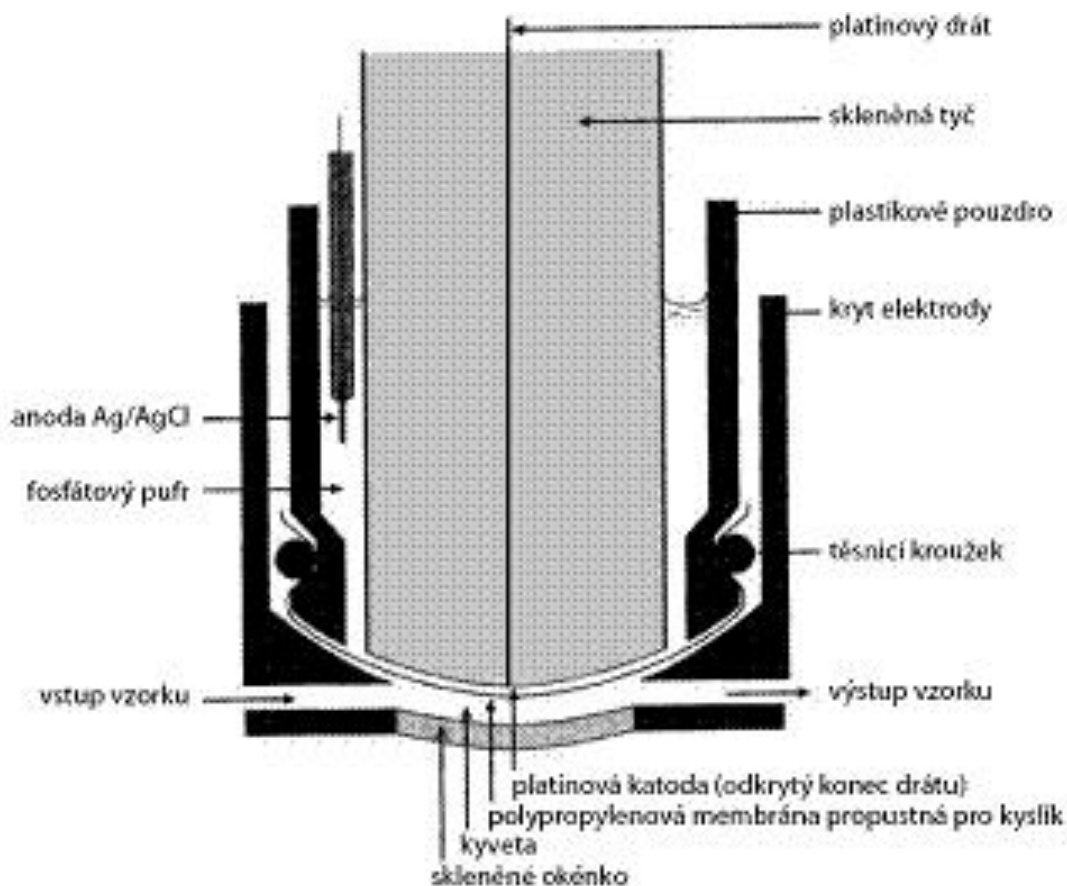


a) **Clarkova kyslíková elektroda** se skládá z měrné, polarizované platinové elektrody (katoda) a argentschloridové referenční elektrody (anoda). Obě elektrody jsou od měřeného

vzorku odděleny membránou z teflonu nebo polypropylénu, která je propustná pro O<sub>2</sub>. Na elektrody se vkládá konstantní napětí, při kterém se na katodě kyslík redukuje (-630 mV). Ampérmetr měří protékající proud, který je úměrný koncentraci rozpuštěného kyslíku v analyzovaném vzorku. Tato elektroda se používá u acidobazických analyzátorů a také např. u některých typů glukózových analyzátorů.

V elektrodě probíhají následující reakce:

- Na katodě:  $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$
- Na anodě:  $Ag + Cl^- \rightarrow AgCl + e^-$



**b) Čipové pO<sub>2</sub> elektrody** využívají technologie hustého filmu. Vrstvy jsou postupně nanášeny na keramickou podložku, přičemž se materiál vybírá podle svých elektrických vlastností (vodič, izolant). Každá vrstva se nanáší přes specifickou šablonu s dutinami pro čidla a elektrody. Tloušťka vrstev je 10 – 70 μm. Čip může tvořit až 28 různých vrstev. Technologie umožňuje do jedné základní vrstvy umístit až 16 elektrodových senzorů pro různé analyty. Čipová kyslíková elektroda se od klasické liší tím, že má zlatou katodu a je podstatně menší. Proto má spojovací otvory vrtané laserem. K dispozici jsou i kazety s elektrodami na jedno použití pro POCT.

**c) Transkutánní kyslíkové elektrody.** Základem je Clarkova polarografická elektroda přizpůsobená k použití na povrchu kůže. V anodě je zabudovaný malý termostatem řízený ohřívač (anoda je vyhřívána na 45°C), způsobující překrvení kůže na kterou je přiložen. Elektroda se kalibruje na dva body in vitro. Vlastní měření se pak provádí tak, že se na kůži kápne kapka destilované vody a přiloží se elektroda s adhesivním kroužkem. Přiložení musí být vodotěsné bez vzduchových bublin. Nejčastěji se měření provádí na kůži nad bicepsy.

### 13.2.2. Fluorimetrie

Optody využívající fluorimetrického principu detekce se používají zejména v analyzátoch POCT v práci rychlé záchranné služby. Senzor  $pO_2$  obsahuje fosforeskující barvivo rozpuštěné v PVC membráně. Barvivo (NPT7) tvoří komplex porfyriu s paladiem a přístroj detekuje zhášení fosforescence způsobené kyslíkem.

### 13.3. Stanovení $pCO_2$ , parciálního tlaku oxidu uhličitého

Princip: potenciometrie

$pCO_2$  je definován, jako parciální tlak  $CO_2$  v plynné fázi, která je v rovnováze s krví a je měřený  $pCO_2$  elektrodou.

$pCO_2$  elektroda je kombinací skleněné a argentchloridové elektrody ( $Ag/AgCl$ ) referenční elektrody uložené v plastickém obalu naplněném bikarbonátovým pufrem. Obal elektrody je na měrném konci překryt silikonovou membránou (tloušťky  $20\ \mu m$ ) na nylonové síťce (tloušťky  $50\ \mu m$ ).

$pCO_2$  elektroda je v zásadě pH elektroda s přidanou silikonovou membránou. Tato membrána umožňuje průchod pouze molekulám bez náboje (např.  $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $N_2$ ). Ionty s nábojem, jako např.  $H^+$  nemohou přes membránu projít. To vede k tomu, že rozpuštěný  $CO_2$  v krevním vzorku difunduje přes silikonovou membránu do tenké vrstvičky bikarbonátového pufru uvnitř elektrody, dokud se neustaví rovnováha (dokud nedojde k ekvilibriu).

Vznikající kyselina uhličitá disociuje a posunuje tak pH vnitřního elektrolytu elektrody na kyselou stranu.



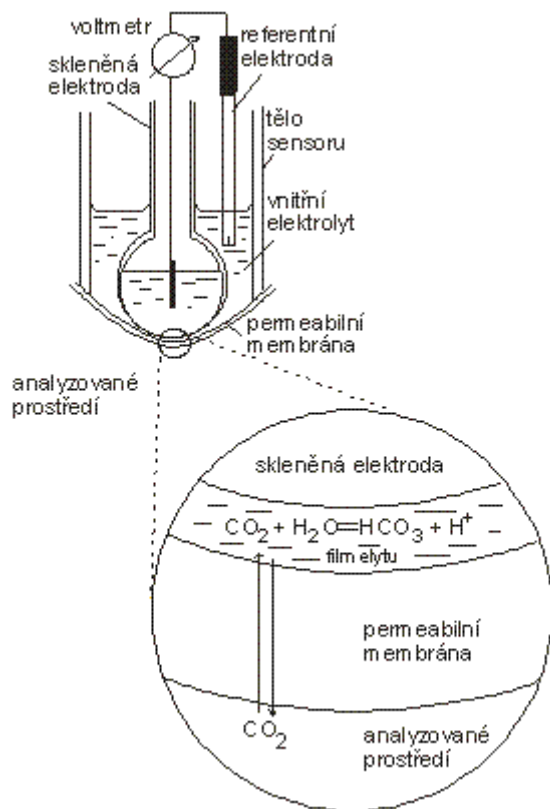
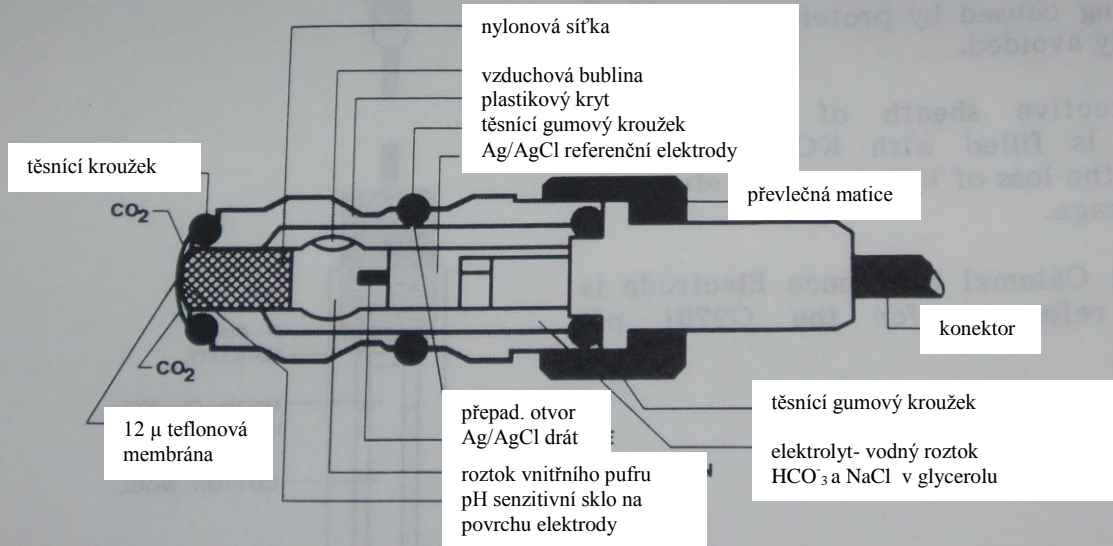
Aktivita  $H^+$  měřená pH elektrodou je v tomto prostoru úměrná parciálnímu tlaku  $CO_2$  ( $pCO_2$ ) ve zkoumaném vzorku.

Vzhledem k tomu, že přes membránu nemohou projít molekuly a atomy s nábojem, odpovídá změna pH výhradně množství  $CO_2$  v krevním vzorku. Naměřená změna pH se po ustálení elektrody převede na hodnotu  $pCO_2$ . Elektroda se kalibruje směsí plynů nebo roztokem o známém parciálním tlaku  $CO_2$ .

K dispozici jsou i kazety s elektrodami na jedno použití pro POCT.

# pCO<sub>2</sub> ELEKTRODA

(Severinghausova elektroda)



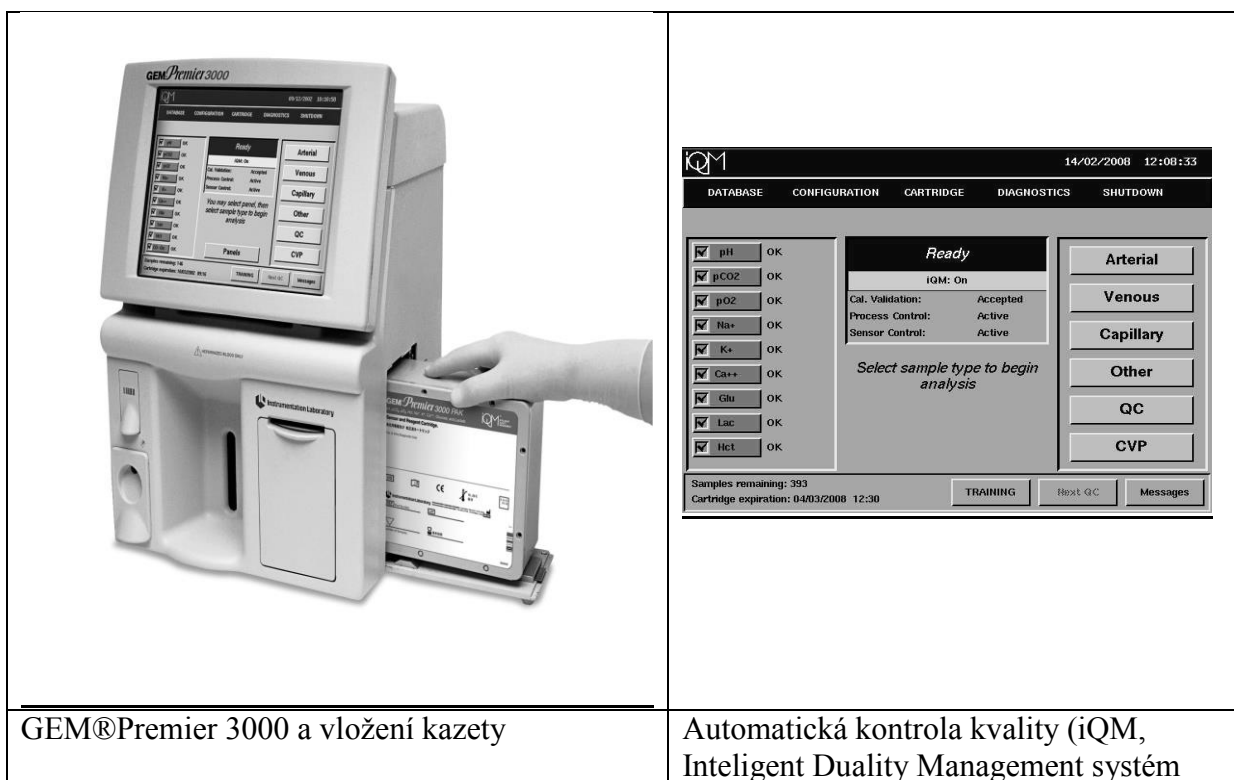
## Některé příklady technického řešení

### **Firma Instrumentation Laboratory: analyzátoři GEM®Premier 4000, GEM®Premier 3500, GEM®Premier 3000.**

Vlastnosti:

- Použití kazet (cartridge) obsahujících všechny součásti měřicího systému (senzory, reagensie, kontrolní vzorky, hadičky, ventily)
- Automatická kontrola kvality (iQM™, Intelligent Quality Management systém) : aktivní program procesu kontroly kvality určený ke kontinuálnímu monitorování analytického procesu s automatickou detekcí chyb v reálném čase, automatickou korekcí systému a automatickou dokumentací všech nápravných opatření
- Dálková správa dat, kontrola přístroje, prohlížení výsledků (GEMweb®Plus)
- Provoz bez údržby (náhrada kazety každých 30 dnů)

Měřené analyty: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, glukóza, laktát, hematokrit, hemoglobin a jeho deriváty, bilirubin a vypočítané parametry: TCO<sub>2</sub>, BE, p50, sO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aj.



### **Firma Roche Diagnostics: analyzátoři cobas b211(OMNI S), cobas b121 (OMNI C)**

Vlastnosti:

- 3 způsoby aplikace vzorku (kapiláry, ampule, stříkačka)
- Detekce hladiny reagensů
- Automatická kalibrace (jedno a dvoubodová), kontrola kvality
- Automatické čištění a údržba přístroje
- Možnost dálkové údržby a monitorování přístroje

Měřené analyty: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, glukóza, laktát, močovina, hematokrit, hemoglobin a jeho deriváty, bilirubin a vypočítané parametry: TCO<sub>2</sub>, BE, p50, sO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aj.



**Firma Radiometer Copenhagen: analyzátory ABL800 Flex, ABL90 Flex, ABL80Flex**

Vlastnosti:

- Možnost použití kazet (ABL80 Flex)
- Detekce hladiny reagensů
- Automatická kalibrace (jedno a dvoubodová)
- Přístroj je vybaven podavačem vzorků

Měřené analyty: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, glukóza, laktát, kreatinin, bilirubin, hematokrit, hemoglobin a jeho deriváty, vypočítané parametry: TCO<sub>2</sub>, BE, p50, sO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aj.



**Firma Siemens: analyzátory Rapidpoint 340/350, Rapidpoint 400/405, Rapidlab 1200 (1240, 1245, 1260, 1265)**



Vlastnosti:

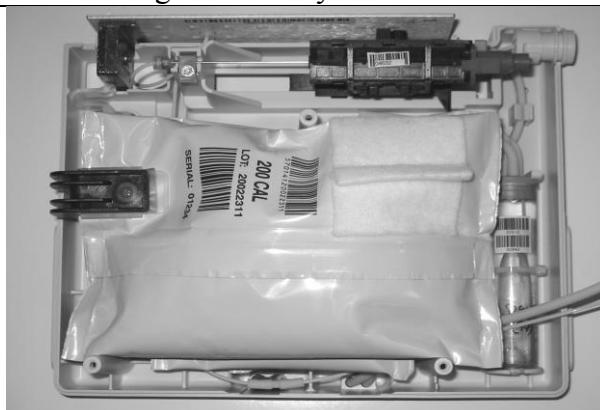
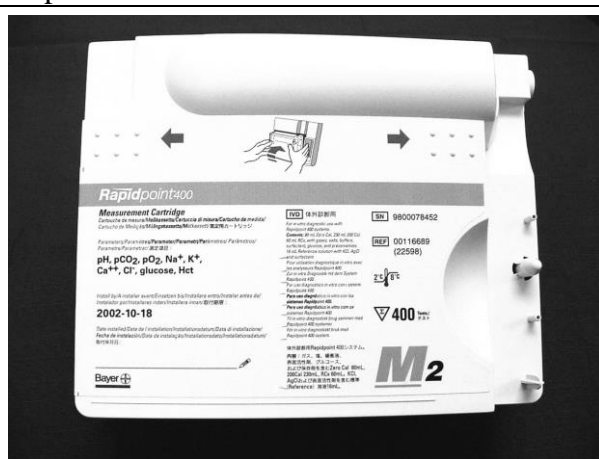
- Použití reagenčních a promývacích kazet (životnost 28 dní)
- Detekce hladiny reagencií
- Automatická kalibrace (jedno a dvoubodová) a kontrola kvality
- Možnost automatické správy dat (RAPIDComm™)
- Bezdotykové dávkování

Měřené analyty: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, glukóza, laktát, hematokrit, hemoglobin a jeho deriváty, vypočítané parametry: TCO<sub>2</sub>, BE, p50, sO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aj.



Rapidlab 1200

Vložení reagenční kazety



Reagenční kazeta

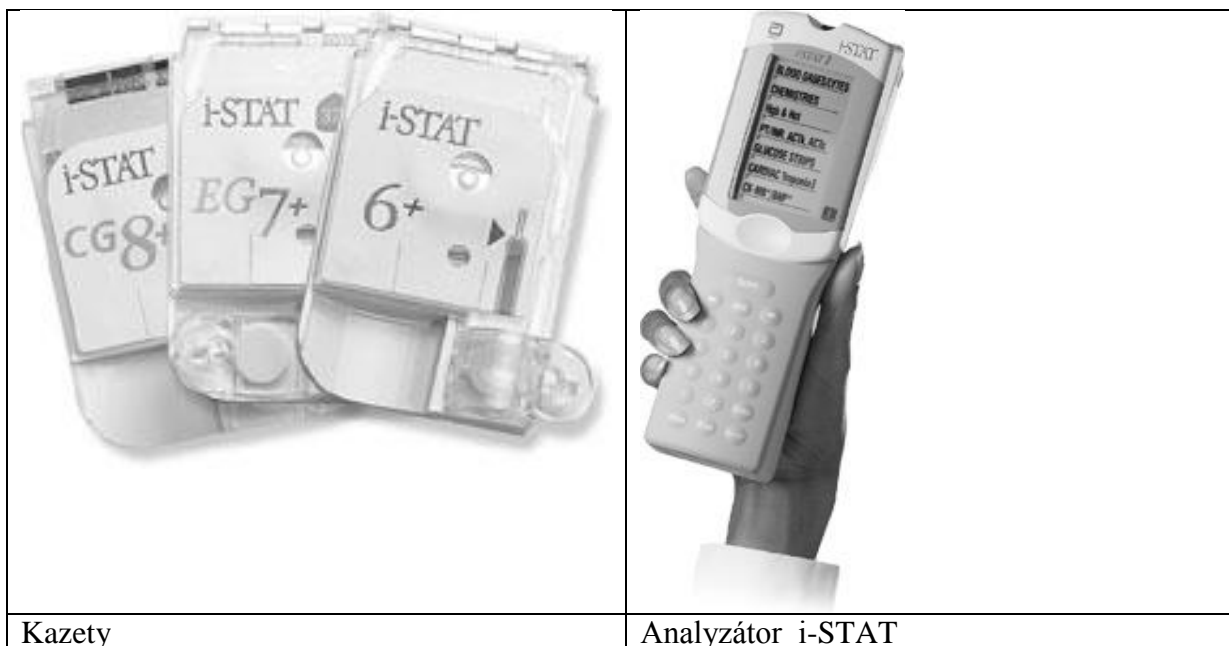
Vnitřek kazety

### Firma Abbott Diagnostics: analyzátoři i-STAT

Vlastnosti:

- Použití reagenčních a promývacích kazet
- Automatická kalibrace (jedno a dvoubodová) a kontrola kvality
- Možnost automatické správy dat (RAPIDComm™)

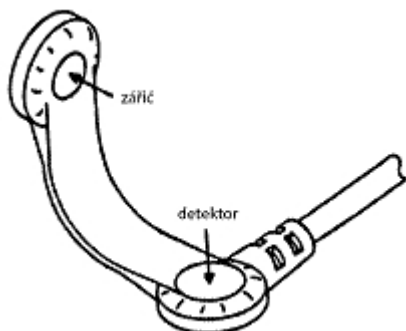
Měřené analyty: pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, glukóza, laktát, hematokrit, hemoglobin a jeho deriváty, vypočítané parametry: TCO<sub>2</sub>, BE, p50, sO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aj.



### 13.4. Stanovení saturace hemoglobinu kyslíkem

Princip: spektrofotometrie

Oxymetr v elektrochemických analyzátoch měří koncentrace oxyhemoglobinu, deoxyhemoglobinu, celkového hemoglobinu, methemoglobinu, karboxyhemoglobinu (některé registrují také sulfhemoglobin) a % saturace hemoglobinu kyslíkem. Oxymetry mohou měřit jen několik pro analýzu nejdůležitějších vlnových délek nebo poměrně rozsáhlé spektrum až 128 vlnových délek (478 – 672 nm). Základní optický systém sestává ze světelného zdroje, kyvety, hemolyzátoru, optického vlákna a detektoru. Zdrojem světla je obvykle halogenová žárovka vybavená infračerveným (tepelným) filtrem. Kvalitní oxymetry mají ještě druhý světelný zdroj – neonovou žárovku – která slouží ke generování referenčního paprsku pro detekci driftu primárního zdroje a jeho softwarovou korekci. Optickou dráhu paprsku usměrňují čočky. Kyveta ultrazvukového hemolyzátoru je vyhřívána na 37 °C a hemolýza probíhá pod tlakem 200 kPa. Jednoduchý optický systém obsahuje filtry a fotonku, sofistikovaný systém je vybaven konkávní mřížkou a detektorem diodového pole (až 128 diod).



**Pulzní oxymetr** získává signál z pulzující arteriální krve při měření in vivo, není potřeba žádný vpich k získání vzorku krve. Měří se saturace hemoglobinu kyslíkem jen při dvou vlnových délkách a to v červené a infračervené oblasti. Senzor je připojen na konec prstu

nebo ušní lalůček. Přístroj je tak jednoduchý, že ho mohou používat při monitorování hypoxie i chronici v domácí léčbě. V místě měření je absorpce konstantní s výjimkou absorpce, která vzniká ze zvětšeného objemu krve v důsledku arteriální pulzace. Pulzující složka signálu je izolována, zesílena a filtrována simultánně v červené i infračervené oblasti. Konstantní (nepulzující) signály, např. z kostí, lipidů, tkání, venózní a nepulzující arteriální krve jsou sumarizovány a využity k normalizaci pulzujících signálů. Zdrojem světla jsou dvě světlo emitující diody. Detektorem je fotonka, která poskytuje proud odpovídající intenzitě dopadajícího světla. Analogově- digitální převodník převádí signály z filtrů na číslicové signály ke stanovení saturace kyslíkem v měřené arteriální krvi.

Příbuzná technologie reflektanční spektrofotometrie se využívá při měření  $S_vO_2$  (v plicnici) nebo  $S_{cv}O_2$  (v horní duté žíle) optickými plicnicovými nebo centrálními žilními katetry. Fibrooptická vlákna na špici katetru emitují a zpětně přijímají monochromatické světlo o 2-3 vlnových délkách. Předností systémů pracujících s třemi vlnovými hodnotami je nezávislost měření na hodnotě hemoglobinu. Problémem je výskyt artefaktů, pokud optický konec katetru naléhá na cévní stěnu, výsledný signál ukazuje zkreslenou hodnotu  $S_pO_2$  85-90%.

## 14. Průtoková cytometrie (FLOW CYTOMETRY)

Průtoková cytometrie je technika umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu buněk nebo jiných částic (jadérka, mikroorganismy, latexové částice aj.) v suspenzi. Pomocí definovaných měřených parametrů (rozptyl světla, fluorescence) dovoluje rozlišovat buňky na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností (např. velikosti, množství granul, obsahu DNA, apod.) a po označení buněk fluorescenčním konjugátem monoklonálních protilátek umožňuje studium povrchových molekul, diferenciačních antigenů, intracelulárních molekul včetně cytokinů apod.

Přístroj – průtokový cytometr – vyhodnocuje řádově tisíce buněk za sekundu

### 14.1. Princip průtokové cytometrie:

Buňky v suspenzi (usměrněné do velmi tenkého proudu) protékají kapilárou a postupně protínají dráhu paprsku světla (nejčastěji laseru) kolmého na směr toku buněk. Každá buňka se chová jako sférická čočka a podle své velikosti a vnitřní struktury (granulace) rozptyluje světlo do různých směrů. Vyhodnocením rozptylu lze buňky rozřadit na jednotlivé buněčné populace (př. lymfocyty, monocyty, granulocyty).

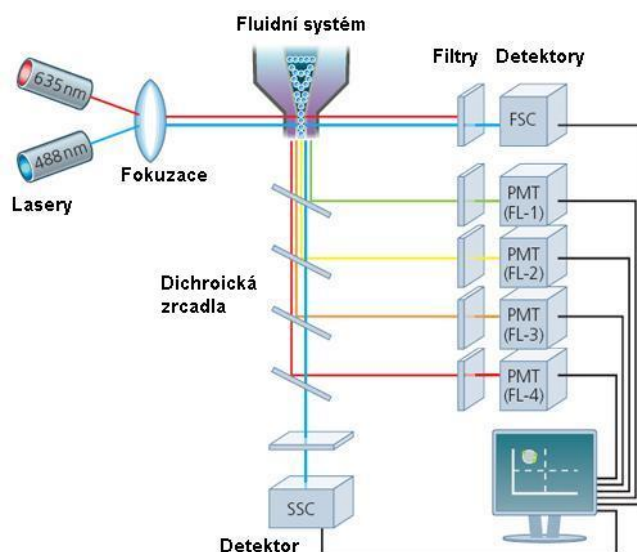
Pokud byly buňky před analýzou obarveny fluorescenčním barvivem nebo inkubovány s fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami proti určitým antigenům, dochází k excitaci fluorochromů laserovým paprskem a následné emisi fluorescenčního záření (princip přímé imunofluorescence). Takto je možné vyšetřit vnitřní strukturu buňky nebo specifické molekuly, které buňky exprimují na svém povrchu (znaky, receptory), a tím buňky třidit do dalších subpopulací.

Světlo vznikající interakcí buněk při průchodu laserovým paprskem (rozptýlené světlo a emitovaná fluorescence) je rozděleno optickou soustavou hranolů, filtrů a zrcadel podle vlnové délky fluorescence.

Obr.146: *Schema průtokového cytometru*

Převzato z

<http://www.abdserotec.com/uploads/signal1.jpg>



Obr.147: *FACS Calibur (Becton-Dickinson)*

*(Fluorescence Activated Cell Scanner)*



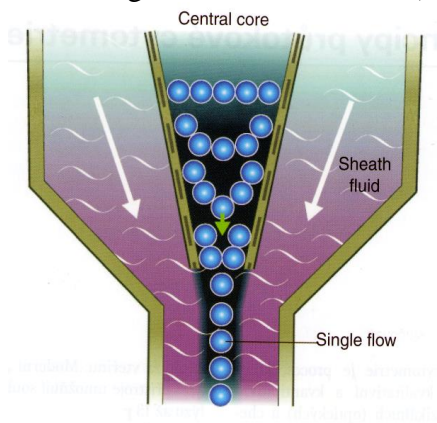
FSC...detektor rozptylu světla v malém úhlu  
 SSC...detektor bočního rozptylu  
 PMT...fotonásobiče (detektory fluorescence)

#### 14.1.1. Fluidní systém:

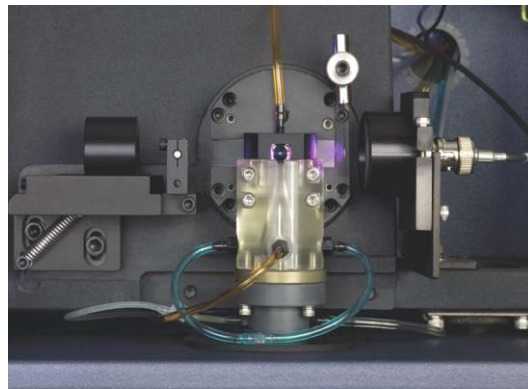
Fluidní systém průtokového cytometru zajišťuje tzv. **hydrodynamickou fokuzaci**:

Vzorek (suspenze buněk různých velikostí v izotonickém roztoku) je vnášen velmi tenkou tryskou do průtokové kyvety - silnější kapiláry, kterou proudí dostatečnou rychlostí nosná tekutina (solný roztok, tzv. Sheath fluid). Laminární průtok nosné tekutiny v kyvetě působí usměrnění buněk do velmi tenkého proudu, částice se tedy pohybují v jedné řadě za sebou.

Obr.148: *Hydrodynamická fokuzace*  
 Přejato z publikace: Iuri Marinov,  
 Průtoková cytometrie v klinické  
 hematologii, Praha, Triton 2008)



Obr.149: *Průtoková cela cytometru*  
[http://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_FACSCanto\\_II\\_brochure.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_brochure.pdf)  
 Pozn.: Obrácené uspořádání než na obr.148



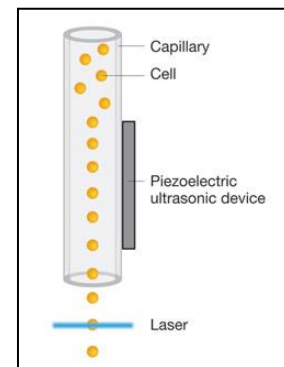
Obr.150: *Akustická fokuzace*

Přejato

<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/flow-cytometry.html>

Z:

Alternativním způsobem usměrnění buněk je **akustická fokuzace**: Technika využívá pro umístění buněk do osy kapiláry ultrazvukové vlny. Na rozdíl od hydrodynamické fokuzace nevyžaduje tento způsob rychlé průtoky a použití nosné tekutiny; je možné zpomalit průtok bez narušení fokuzace buněk a tím prodloužit dobu, po kterou buňka setrvává v laserovém paprsku. Akustickou fokuzaci využívá cytometr Attune firmy Applied Biosystems.



#### 14.1.2. Optický systém:

**Zdrojem světla** pro optický systém FACS je laser, např. argonový (488 nm – modrý), helium - neonový (635 nm – červený), heliový - kadmiový (UV), diodové lasery, argon - krypton dye laser; zdroj může být i rtuťová nebo xenonová lampa.

Světlo vznikající interakcí buněk při průchodu laserovým paprskem je rozděleno optickou soustavou podle vlnové délky fluorescence. Základními **prvky optické soustavy** jsou

- long pass filtry - propouštějí světlo od určité vlnové délky (nižší vlnové délky zachytí)

- short pass filtry - propouštějí světlo do určité vlnové délky (vyšší vlnové délky zachytí)
- band pass filtry - propouštějí světlo pouze v určitém rozsahu vlnových délek (vyšší i nižší vlnové délky zachytí), např. 520 – 540 nm
- dichroická zrcadla – odráží světlo určité vlnové délky, jiné propouští

Jako detektory slouží diody a fotonásobiče (zkratka PMT – photomultiplier tube).

**Základními parametry flow cytometrické analýzy** je rozptyl světla v malém úhlu, boční rozptyl a fluorescence:

**Forward scatter channel – FSC** (rozptyl světla v malém úhlu nebo též dopřední rozptyl) zachytí dioda dopředního rozptylu, která měří signál v malém úhlu od osy laserového paprsku. Intenzita FSC signálu je přímo úměrná velikosti buněk.

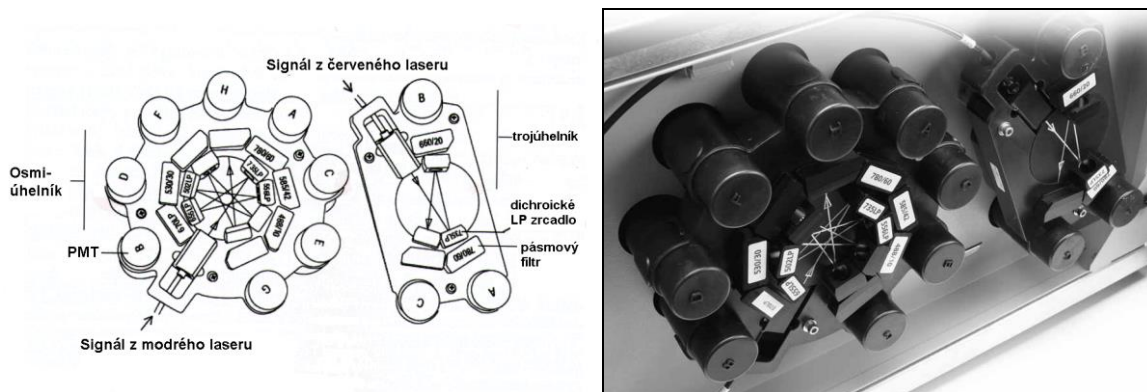
**Side scatter channel– SSC** (boční rozptyl) zachycuje fotonásobič v úhlu 90° od osy laserového paprsku, poskytuje informaci o vnitřní struktuře buněk (granulace). Kombinace FSC a SSC umožňuje identifikaci a charakterizaci buněk v heterogenní suspenzi (např. plná krev).

**Fluorescence – FL** je zachycena fotonásobičem pro každý fluorofor zvlášť v úhlu 90° od osy laserového paprsku; fotonásobiče jsou uspořádány do osmiúhelníku nebo trojúhelníku. Fluorescence poskytuje informaci o obarvených vnitřních strukturách buňky nebo o specifických membránových resp. cytoplazmatických molekulách, na které se navázala fluorescenčně značená protilátka.

Moderní přístroje používají více laserů a detektorů (max. 4 lasery, 18 detektorů)

Obr. 151: *Optický systém FACS Canto (Becton-Dickinson):*

[http://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_FACSCanto\\_II\\_brochure.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCanto_II_brochure.pdf)

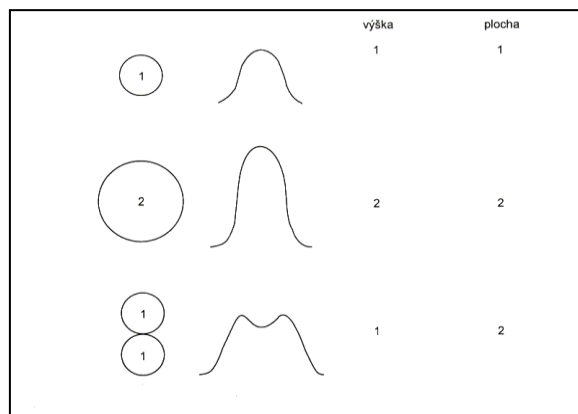


### 14.1.3. Vyhodnocovací systém

Světelné signály jsou převedeny na elektrické impulzy a lineárně nebo logaritmicky znásobeny. Zpravidla se měří „plocha“ elektrického signálu (integrál). Používají se i další možnosti zpracování signálu, například měření výšky a šířky signálu pro odlišení agregátů buněk. Elektrické signály jsou zpracovávány počítačem (digitalizace, grafické znázornění). Počítačové zpracování dat umožňuje tzv. gatování (elektronická selekce analyzovaných částic).

Obr.152: Ukázka odlišení agregátů buněk na základě měření výšky a plochy signálu

Přejato z: Tomáš Eckschlager a kol.:  
Průtoková cytometrie v klinické praxi,  
Praha, Grada



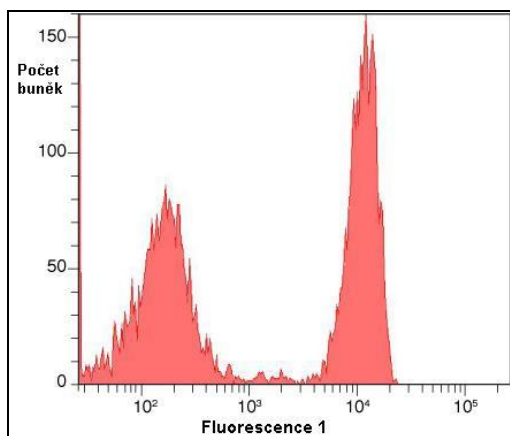
## 14.2. Zobrazování dat z flow cytometrické analýzy

Výstupem flow cytometrické analýzy jsou výsledky v číselné a grafické formě.

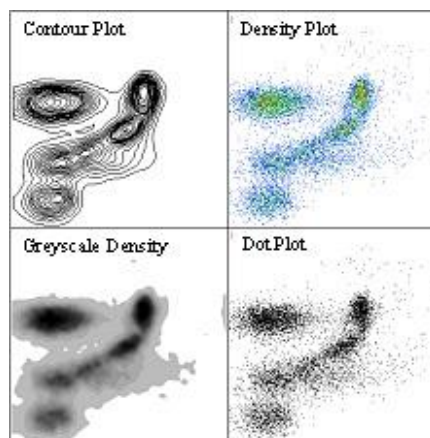
Ke grafickému zobrazení se používají jednoparametrové histogramy (na ose x je znázorněna intenzita signálu – FSC, SSC nebo fluorescence, na ose y je znázorněna četnost buněk) nebo dvouparametrové grafy o různých formátech. U dvouparametrových grafů je na ose x vynesena intenzita jednoho měřeného parametru, na ose y intenzita druhého parametru a množství buněk je znázorněno hustotou bodů (tzv. dot-plot histogram), čarami, které připomínají vrstevnice na mapě (contour-plot histogram) nebo různými barvami znázorňujícími hustotu (density plot).

Data je možné archivovat buď pouze ve formě histogramů, nebo jako soubory uchovávající všechny údaje o každé buňce. Druhý způsob je náročný na kapacitu paměti, ale umožňuje opakované zpracování dat.

Obr.153: Jednoparametrový histogram



Obr.154: Typy dvouparametrových histogramů



### **14.3. Využití flow cytometrie:**

#### **14.3.1. Historie**

Prvním předchůdcem flow cytometrů byl Counter (počítač buněk) zkonstruovaný 1953 v USA bratry Coulterovými. Pro stanovení počtu a velikosti částic v suspenzi využíval impedanční princip: Buňky usměrněné hydrodynamickou fokuzací ve vodivém roztoku prochází mezi elektrodami, na něž je vloženo napětí a systémem prochází proud. Při průchodu buňky dochází k pulznímu zvýšení elektrického odporu (impedanční pulz), jehož analýzou se získá kvantitativní a kvalitativní informace o procházejících buňkách - počet impulzů odpovídá počtu prošlých buněk, velikost impulzu odpovídá objemu buňky.

Původní Coulter princip se stále používá v hematologii pro počítání krevních buněk a moderní hematologické analyzátory jej kombinují s dalšími technologiemi (rozptyl, fluorescence).

V roce 1968 byl zkonstruovaný první fluorescenční flow cytometr. Původní název metody (až do roku 1988) zněl „pulzní cytofotometrie“. První flow cytometry byly přístroje pouze experimentální, ale technický vývoj umožnil jejich využití pro klinické účely.

#### **14.3.2. Hematologické systémy pro počítání krevních buněk**

Hematologické analyzátory krevních buněk zaznamenaly v posledním desetiletí výrazný rozvoj v užitých technologiích. Moderní analyzátory jsou schopny stanovit počty jednotlivých typů krvinek na principu průtokové cytometrie. Měřenými parametry jsou počet erytrocytů (RBC – red blood cell), trombocytů (PLT - platelet), počet a morfologický typ leukocytů (WBC – white blood cell) a další (retikulocyty, hemoglobin, odvozené parametry).

Bílé krvinky (leukocyty, WBC) se dělí na polymorfonukleární a mononukleární. Polymorfonukleáry (zjednodušeně polynukleáry) neboli granulocyty mají členité jádro a obsahují granula, podle jejichž barvitelnosti jsou dále rozlišovány na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Mononukleáry (lymfocyty, monocyty) mají nečlenité jádro, nemají specificky barvící se granula.

Počty erytrocytů, leukocytů a trombocytů byly ve vzorku nesrážlivé periferní krve počítány v komůrkách pod mikroskopem. Cytomorfologické vyšetření leukocytů bylo prováděno počítáním jednotlivých typů leukocytů v obarveném tenkém krevním nátěru na sklíčku pod mikroskopem. Oba zmíněné postupy byly časově náročné, vyžadovaly zkušenost laboratorních pracovníků a poskytovaly výsledky se značným rozptylem vzhledem k subjektivnímu způsobu hodnocení nálezů. Zavedení flow-cytometrie představovalo revoluční změnu, která umožnila automatizaci velkého počtu hematologických vyšetření. Při jednom vyšetření se tímto způsobem proměří cca 10 tisíc buněk.

##### **14.3.2.1. Princip stanovení na hematologickém analyzátoru:**

Krev je rozvedena do tří cest:

V první cestě jsou stanoveny erytrocyty a trombocyty impedanční metodou v komůrce pro měření elektrického odporu (analyzátory mají možnosti k případnému upřesnění počtu těchto buněk opticky).

Hemoglobin se stanovuje v druhé cestě spektrofotometricky v průtokové cele.

Třetí cesta je určena pro stanovení tzv. diferenciálního krevního obrazu (rozpočtu leukocytů na neutrofilny, eozinofily, bazofily, lymfocyty a monocyty); různí výrobci přístrojů kombinují různé detekční metody stanovení.



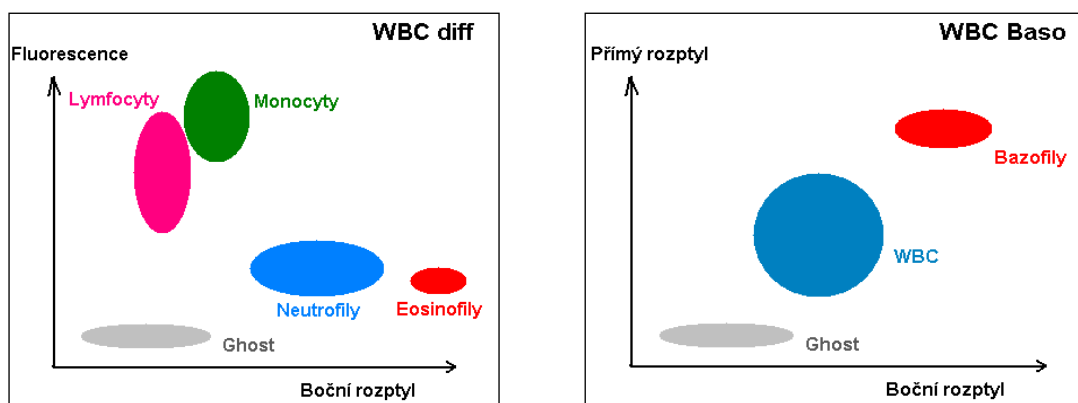
### 14.3.2.2. Příklady technických řešení stanovení leukocytů

Přístroje **Beckman Coulter** využívají elektrooptickou flow cytometrii VCS (V – volume, C – conductivity, S – scatter): Lyzačním činidlem se destrukují erytrocyty a trombocyty; leukocyty zůstávají konstitučně neporušeny a detegují se impedanční metodou (počet a objem buněk – V), vysokofrekvenčním střídavým elektrickým polem (zjišťují se vnitřní struktury buněk, které nevedou elektrický proud – C) a rozptylu laserového paprsku (měří se tvar buňky, povrch – S). Všechny tři parametry jsou měřeny simultánně v jednom kanálu na každém leukocyty a jsou softwarově zpracovány. Vyhodnocovací program rozřídí jednotlivé buňky a částice do skupin, spočítá jejich množství v každé skupině a zobrazí je jako bodový histogram (scattergramu).

Analyzátoři **Sysmex** využívají optickou metodu – fluorescenční průtokovou cytometrii. Metoda využívá dvou měřících systémů (kanálů), z nichž každý používá jiné lyzační činidlo a způsob detekce buněčných populací: v 1. systému pro měření neutrofilů, eozinofilů, monocytů a lymfocytů dochází vlivem lyzačního činidla k destrukci erytrocytů a trombocytů a k perforaci membrány leukocytů. Perforacemi se do buňky dostává barvivo, které se váže na DNA a RNA v jádře i cytoplazmě. Organické kyseliny z lyzačního činidla se navíc specificky váží na eozinofilní granula, zvyšují tím signál a tak umožňují odlišení eozinofilů od neutrofilů. Po expozici polovodičovým laserem se měří intenzita bočního rozptylu (informuje o lobularitě, tj. členitosti jádra a přítomnosti granulí v cytoplazmě) a fluorescence (odpovídá množství nukleových kyselin).

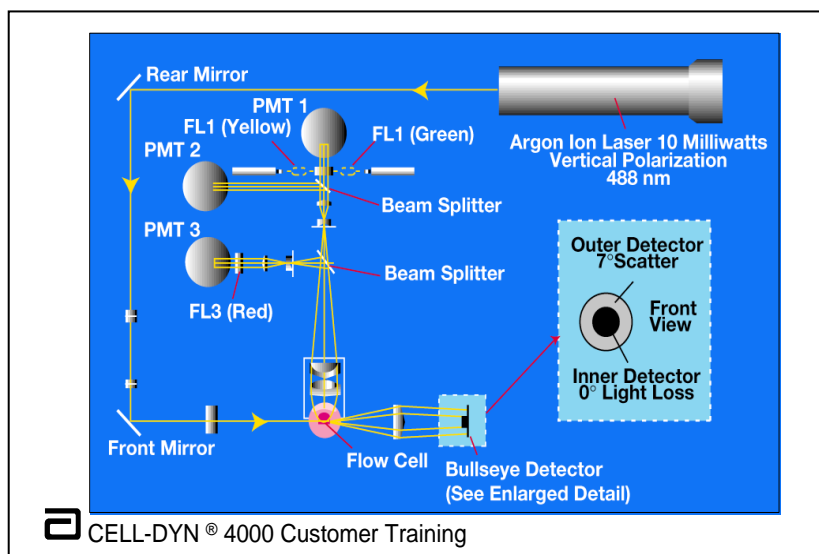
V 2. systému pro měření bazofilů dochází k destrukci všech buněk kromě bazofilů (z ostatních WBC zůstávají jen holá jádra) a měří se FSC (velikost částice) a SSC (vnitřní struktura). Zastoupení buněk je opět zobrazeno formou scattergramu.

Obr.155: Zjednodušený scattergram z WBC kanálu a z kanálu bazofilů – Sysmex (Ghost – lyzované RBC a PLT)



Přístroje firmy **Abbott** jsou založeny na průtokové cytometrii tzv. MAPSS technologii (Multi Angle Polarized Scatter Separation). Po interakci buněk s polarizovaným paprskem argonového laseru se měří rozptýlené světlo v různých úhlech a navíc je v kolmém směru sledována míra depolarizace světelného paprsku buňkou. Buňky jsou rozlišeny na základě rozptylu světla, rozlišení buněk s členěným jádrem na neutrofilly a eozinofily se děje na základě jejich schopnosti měnit rovinu polarizovaného světla.

Obr.156: Optický systém analyzátoru CELL-DYN 4000 (Abbott)

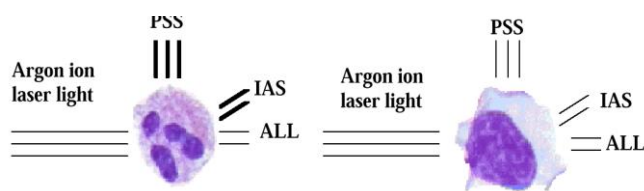


Polarizovaný paprsek argonového laseru je zrcadly (Rear, Front Mirror) usměrněn do průtokové cely (Flow Cell).

Protékající buňky zředěného vzorku krve usměrněné fokuzací v průtokové cele mění optické charakteristiky paprsku.

Detektor „buvolí oko“ (Bull’s Eye Detector) deteguje rozptýlené světlo pod úhlem 0 a 7 stupňů

Děliče paprsků (Beam Splitter) směřují světlo na 3 fotonásobiče: PMT 1 detekuje polarizované rozptýlené světlo z eozinofilů, PMT 2 rozptýlené světlo pod úhlem 90°, PMT 3 dává možnost využít fluorescenci.



Obr. 157: Měření parametry (Abbott)

ALL - úbytek světla pod úhlem 0°, měřený ve středové části detektoru „buvolí oko“, při průchodu buněk přes laserový paprsek je srovnáván s plnou intenzitou paprsku za nepřítomnosti buněk. Velikost úbytku světelného záření v rovině laserového paprsku závisí na velikosti procházejících buněk

IAS - Rozptýlené světlo měřené pod malým úhlem 7°: Buňky se složitější vnitřní strukturou (komplexitou) produkují větší intenzitu rozptýleného světla pod úhlem 7°. Rozptýlené světlo je měřeno v zevní, okrajové části detektoru „buvolí oko“.

PPS - Rozptýlené světlo měřené pod úhlem 90° je mírou členitosti buněčného jádra (lobularity).

DPS - Rozptýlené depolarizované světlo měřené pod úhlem 90°: měří cytoplazmatická granula (je mírou granularity), může být použito k odlišení eozinofilů od neutrofilů (granula obsažená v eozinofilech světlo při rozptylu depolarizují).

### 14.3.3. Flow cytometrie v močové analýze

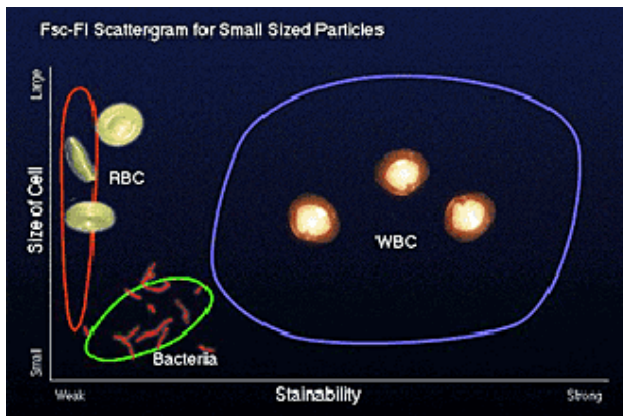
Analýza močového sedimentu a správné zařazení jednotlivých elementů má rozhodující význam v diagnostice řady onemocnění ledvin a močových cest. Mikroskopická analýza močového sedimentu v klinické laboratoři je procedura časově náročná a výsledek velmi závisí na individuální zkušenosti laboratorního pracovníka.

První přístroje, které umožnily automatizaci a standardizaci močové analýzy, se objevily v 80. letech minulého století a byly založeny na principu digitálního snímání částic ve vzorku

proudícím planární průtokovou kvyetou. Tuto techniku využívají např. močové analyzátořy firmy Iris Diagnostics; třídění elementů do skupin je prováděno na základě softwarového porovnávaní snímků s databází v počítači.

Jinou cestou k automatickému rozpoznávání a kvantifikaci částic v moči představují přístroje na principu **průtokové cytometrie** využívající impedančního měření, rozptylu světla a fluorescence - analyzátořy UF firmy **Sysmex**. Přístroje rozeznávají RBC, WBC, epitelie, hyalinní válce, patologické válce, bakterie, kvasinky, spermie, krystaly a „jiné buňky“.

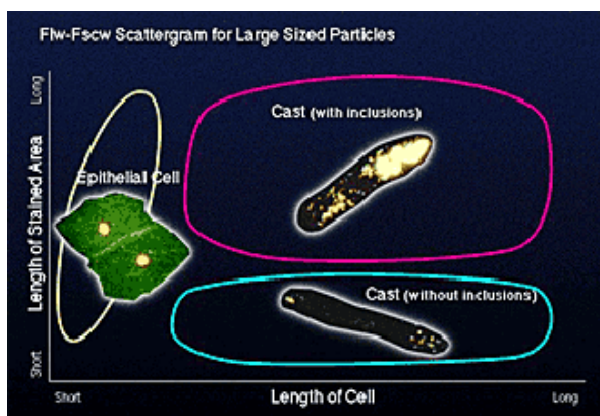
Necentrifugovaná moč je po aspiraci do přístroje promíchána a naředěna dilučním pufrem stabilizujícím osmotický tlak. Vzorek je dále obarven dvěma fluorescenčními barvivy - zvlášt' pro membrány (karbocyanin) a nukleové kyseliny (fenantridin) – a hydrodynamicky fokuzován. Na vstupu do průtokové cely je změřena vodivost, která je průchodem každé částice snížena; následuje průchod částic paprskem argonového laseru (488 nm) a optické měření. Částice jsou klasifikovány na základě impedance (odráží objem buňky), intenzity FSC (velikost částice), šířky FSC pulzu (délka částice), SSC (povrch částice), intenzity fluorescence (odráží barvitelnost elementu nebo jeho části) a šířky pulzu fluorescence (délka obarvené části) a zobrazeny pomocí několika typů scattergramů:



Obr.158: Scattergram malých částic

Závislost intenzity FSC signálu (odráží velikost částic – Size of Cell) na intenzitě fluorescence (barvitelnost částice - Stainability). WBC jakožto jaderné částice s bohatou vnitřní strukturou mají vyšší fluorescenci (umístění vpravo na grafu) na rozdíl od RBC s chudou vnitřní strukturou (umístění vlevo)

Přejato <sup>Z</sup>  
<http://www.sysmex.dk/index.asp?id=4215>



Obr.159: Scattergram velkých částic

Epitelie, válce hyalinní (without inclusions), válce patologické (with inclusions)

Závislost šířky signálu fluorescence (odráží délku obarvené části – Length of Stained Area) na šířce FSC signálu (odráží délku částice – Length of Cell)

Přejato <sup>Z</sup>  
<http://www.sysmex.dk/index.asp?id=4215>

Obecnou nevýhodou průtokové cytometrie oproti digitální obrazové analýze je nemožnost kvalitativního popisu položek (válece, krystaly) a rozpoznání zřídka se vyskytujících komponent (kvasinky, spermie atd.), analýza takovýchto vzorků musí být doplněna mikroskopii.

Velkou výhodou je naopak možnost diferenciální diagnostiky hematurii na základě distribuční křivky erytrocytů a jejich morfologie. Zajímavá je i možnost analýzy jiných tělních tekutin obsahujících menší množství buněk, např. mozkomíšní mok, sperma, tekutina z peritoneální dialýzy apod.

### 14.3.4. Buněčná imunologická vyšetření

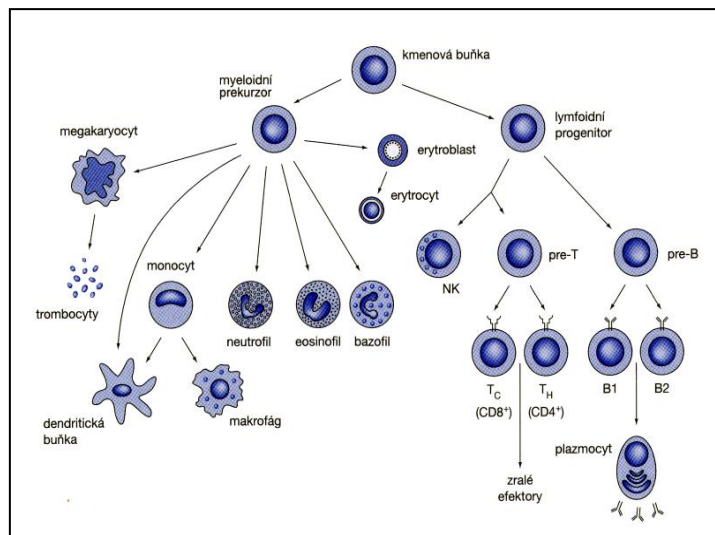
#### 14.3.4.1. Buňky imunitního systému

V rámci imunologického vyšetření se získávají informace o počtu a funkci buněk imunitního systému, které se podílejí na zajištění obrany organismu. Vyšetření buněčných subpopulací má významnou roli v diagnostice imunodeficitů, určování hematologických maligních onemocnění apod.

Obr.160: Buňky imunitního systému - převzato z Hořejší, Bartůňková: *Základy imunologie*, Praha, Triton 2009

Podstatnou část imunitního systému tvoří různé druhy leukocytů.

Z pluripotentních kmenových buněk vznikají dvě základní buněčné linie – myeloidní a lymfoidní. Z myeloidní linie vznikají (vedle erytrocytů a trombocytů) monocytů a tři druhy granulocytů (neutrofilů, eosinofilů a bazofilů), které zastupují nespecifickou část imunitního systému. Z lymfoidní linie se diferencují NK buňky (natural killer), B lymfocyty (vývoj probíhá v kostní dřeni – bone) a T lymfocyty (vývoj probíhá v brzlíku – thymus).



Konečným diferenciačním stadiem B lymfocytů jsou plazmatické buňky produkující protilátky, T lymfocyty diferencují na Th buňky (pomocné – helper) a Tc buňky (cytotoxické).

Buněčné subpopulace na svém povrchu exprimují (vystavují) specifické molekuly (znaky, receptory). Strukturně se jedná o glykoproteiny a jsou pro jednotlivé subpopulace typické. Jednotlivé znaky můžeme uspořádat do skupin, jež charakterizují nejen buněčnou linii, ale i stav diferenciace buňky nebo její aktivaci.

Pro označování diferenciačních znaků se používá jednotný systém, tzv. CD klasifikace (z ang. Cluster of Differentiation). Každý znak definované struktury, rozpoznatelný skupinou (clustrem) monoklonálních protilátek, je označen číslem, např. CD1, CD2, CD3, atd. Každý nově objevený znak dostane další pořadové číslo, které neříká nic o struktuře znaku (jedná se

jen o „inventurní“ systém). V současné době bylo charakterizováno již víc než 400 takových znaků.

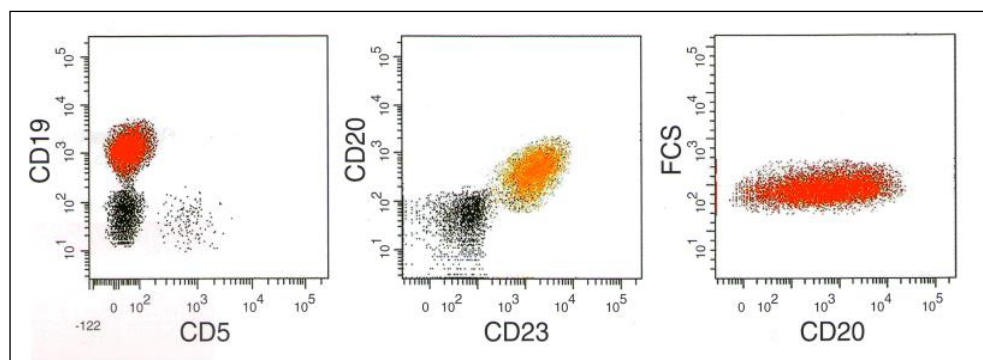
#### 14.3.4.2. Princip

Některé povrchové molekuly (CD znaky) jsou společné pro více druhů leukocytů, protože zajišťují společné základní funkce, jiné mohou být přítomné specificky pouze na určité subpopulaci. Toho se využívá při imunofenotypizaci leukocytů průtokovou cytometrií:

Buňky v plné krvi se inkubují s monoklonální protilátkou proti vyšetřovanému antigenu (CD znaku), přičemž protilátka je označena fluorescenčním barvivem (přímá fluorescence). Vazba protilátky na buněčnou strukturu je vyhodnocována průtokovou cytometrií.

Buňky je možné současně označit více fluorochromy a tím detegovat najednou více znaků. Počítačové zpracování naměřených dat pak umožní selektivní analýzu a zobrazování konkrétní cílové subpopulace – tzv „gatování“ (elektronické ohraničení, gating). Takto lze získat údaje o subpopulaci buněk charakterizovaných na základě jiného znaku, např. zastoupení znaku CD4 na CD3 pozitivních buňkách (CD3 je typický pro T-lymfocyty, kombinace CD3 a CD4 signálu z nich vyselektuje Th lymfocyty), nebo přítomnost „aktivačního“ znaku na CD3 pozitivních lymfocytech (kombinace aktivačního znaku a CD3 vyselektuje pouze aktivované T-lymfocyty) apod.

Obr.161: *Příklady gatování: na ose x dvouparametrového grafu je vynesena jeden parametr, na ose y druhý, barevně je zobrazena cílová subpopulace.*



#### 14.3.4.3. Reagencie a postupy

Pro imunologické aplikace průtokové cytometrie se používají fluorescenčně značené monoklonální protilátky. Lze používat přímou imunofluorescenci (protilátka proti zkoumanému antigenu je označena fluoroforem) i nepřímou fluorescenci (protilátka proti zkoumanému antigenu není značená a k její detekci se používá značená protilátka proti této protilátce). Výhodou přímé fluorescence je jednodušší zpracování vzorku; nepřímá fluorescence se používá v případě, že protilátka proti zkoumanému antigenu není k dispozici ve formě konjugátu s fluorochromem nebo v případě sledování slabě exprimovaného antigenu (nepřímá fluorescence poskytuje intenzivnější signál).

Pro značení protilátek je dostupná celá řada fluorochromů at' samostatných nebo tzv. tandemových, u kterých excitace primárního fluorochromu aktivuje sekundární fluorochrom.

Pro průtokovou cytometrii jsou nutné některé další reagencie, které se využívají např. k fixaci, lyzaci erytrocytů nebo permeabilizaci buněčných membrán leukocytů. Permeabilizace je šetrné poškození membrány, aby byla průchodná pro reagencie, které musí proniknout do

buňky, což je nezbytné při vyšetřování cytoplazmatických nebo jaderných antigenů, vyšetřování obsahu buněčné DNA a RNA a dalších aplikacích.

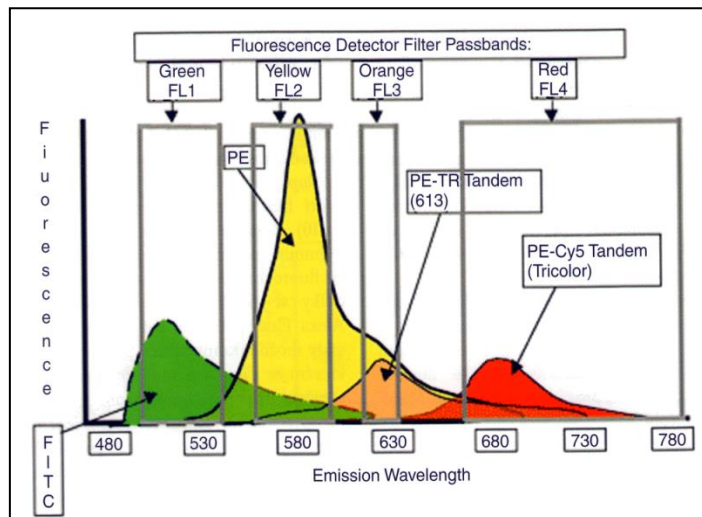
Cytometrie umožňuje tzv. kvantimetrii, tj. určení množství (intenzitu exprese) antigenu na jednotlivých buňkách na základě množství navázané protilátky. Kvantifikace se provádí srovnáním fluorescenčního signálu buněk s kalibrační křivkou sestavenou na základě měření kalibračních částic - kuliček se známým množstvím navázaného fluorochromu.

Některé cytometry mají jako jeden z parametrů i čas, takže lze provádět i kinetické studie (např. měření změn hladin intracelulárního kalcia po stimulaci buňky, stanovení aktivity intracelulárních enzymů).

#### 14.3.4.4. Přístroje

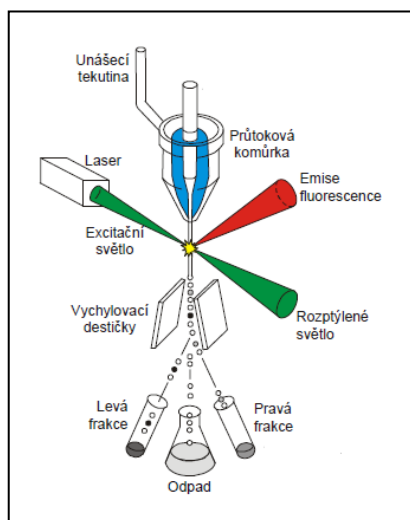
Analýzy jsou prováděny na flow cytometrech se složitým optickým systémem (více laserů a detektorů pro fluorescenci různých vlnových délek) a možností softwarové kompenzace překryvu emisních spekter jednotlivých fluorochromů, ke kterému dochází při multibarevné analýze.

Obr.162: Překryv emisních spekter ekvivalentních koncentrací samostatných (FITC, PE) a tandemových (PE-TR, PE-Cy5) fluorochromů, vymezení snímáných vln. délek pásmovými filtry



Převzato z Iuri Marinov: Průtoková cytometrie v klinické hematologii, Praha, Triton 2008

Obr.163: flow cytometr se sorterem



Některé typy moderních průtokových cytometrů (např. Calibur Becton–Dickinson, iCyt Eclipse, Partec CyFlow aj.) jsou vybaveny „sorterem“ - zařízením pro fyzické roztřídění buněk do více frakcí: Fokuzovaný proud buněk prochází vibračním mechanismem, který způsobí rozpad fokuzovaného proudu na jednotlivé kapičky, z nichž každá obsahuje pouze jednu buňku (toho lze dosáhnout kmitáním piezoelektrického krystalu). Po průchodu paprskem laseru je buňkám udělován elektrický náboj (+ nebo -), pokud splňují určité kritérium. Buňky nesoucí náboj jsou pak rozděleny do sběrných zkumavek elektrostaticky pomocí nabitých vychylovacích destiček.

Průtoková cytometrie umožňuje analyzovat desetitisíce buněk v jednom vzorku (na rozdíl od starší metody - fluorescenční mikroskopie).

V současné době jsou pro imunologické aplikace na trhu průtokové cytometry řady firem: Becton-Dickinson, BioRad, Coulter Electronics, Kratel, Meridian Instruments, Ortho, Partec aj.

### 14.3.5. Multiplexové metody

Flow cytometrie byla vyvinuta pro analýzu buněk, dokáže však detegovat jakékoli částice velikosti řádově v  $\mu\text{m}$ , např. inertní mikrosféry (kuličky) obarvené různými fluorochromy. Takovéto mikrosféry se používají pro kalibraci flow cytometrů (viz. kvantimetrie), mohou však sloužit jako pevná báze pro multiplexové analýzy. Multiplexové systémy umožňují stanovení velkého počtu analytů z minimálního objemu vzorku.

Dostupné multiplexové systémy jsou dvojího typu: planární, které jsou vlastně rozšířením ELISA metody, a „bead-based“ multiplexové analýzy (na mikrosférách) zpracovávané flow cytometrií.

Multiplexové analýzy na mikrosférách představují nejnovější aplikaci průtokové cytometrie. Mikroskopické polystyrenové kuličky (beads) jsou obarveny různými koncentracemi dvou fluorescenčních barviv, jejichž vzájemné kombinace tvoří až 500 různých barevných odstínů (typů) mikrosfér. Na každém typu mikrosféry je navázána specifická protilátka nebo proba rozpoznávající a vázající určitou molekulu (antigen, protilátku, receptor, substrát enzymu, DNA, RNA atd.). Po smísení mikrosfér se vzorkem (např. sérem, plazmou, buněčným lyzátem) v jamce mikrotitrační destičky dojde ke specifickému navázání příslušného analytu ze vzorku na povrch mikrosféry. Ke směsi je následně přidána fluorescenčně značená protilátka proti navázanému analytu.



Obr.164: *Princip multiplex. analýzy na mikrosférách*

Pro multiplexové metody je typické, že se různé typy mikrosfér kombinují do setů, které pak umožňují simultánní stanovení velkého počtu analytů z jednoho vzorku. Výsledná suspenze mikrosfér s navázaným komplexem se následně vyhodnocuje průtokovou cytometrií, kdy přístroj registruje nejdříve zbarvení vlastní mikrosféry (identifikuje navázaný analyt) a poté kvantifikuje analyt na základě intenzity fluorescence značené protilátky.

Nejnámějším multiplexovým systémem pro flow cytometrii je Luminex xMAP (Multiple Analyste Profilig), který teoreticky umožňuje 50 – 500 simultánních analýz. Techniku a reagentie Luminex dodává řada firem, např. Applied Cytometry System, Biosource International, Mirai Bio, Qiagen, Upstate, LINCO Research, Marligen Bioscience, BioRad, Invitrogen, Millipore a další. Kapacitu systému Luminex (až 500 typů mikrosfér – 500 simultánních stanovení) lze využít prakticky pouze pro analýzu nukleových kyselin; při analýze proteinů při velkém počtu simultánních reakcí hrozí větší riziko zkřížených reakcí protilátek a interferencí. Systém Luminex pro zpracování analýz vyžaduje speciální flow cytometry (Luminex nebo BioRad).

Druhou možností je CBA (Cytometric Bead Array) firmy BD Bioscience, který dovoluje simultánní stanovení 30-ti analytů a měření lze provádět na jakémkoli multibarevném flow cytometru.

Podobný systém vyrábí i Beckman Coulter, který místo kombinace dvou barev na mikročástici využívá kombinaci dvou mikrosfér pro každou metodu.

Spektrum možných aplikací zahrnuje cytokiny, chemokiny, růstové faktory, zánětlivé a kardiální markery, tumormarkery, hormony, specifické IgE, izotypy imunoglobulinů, protilátky, fosfoproteiny, intracelulární signální molekuly, HLA testování, genotypizaci a další.



## 15. Osmometrie

### 15.1. Princip

Osmometrie je analytická metoda k měření koncentrace částic v roztoku. Tato metoda využívá změn, které způsobí částice rozpuštěné v rozpouštědle tzv. koligativních vlastností roztoku.

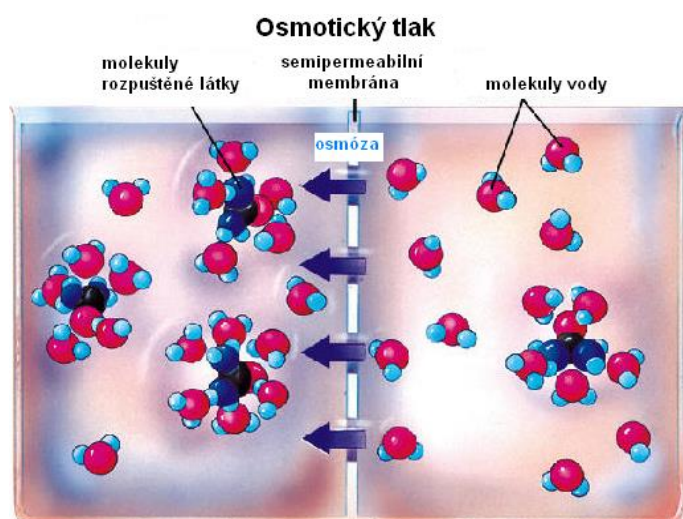
Rozpuštění látky v rozpouštědle vede ke:

- snížení tenze vodních par
- zvýšení teploty varu (ebulioskopický efekt)
- snížení teploty tuhnutí (kryoskopický efekt)
- vzniku osmózy - zvýšení *osmotického tlaku*

Všechny tyto vlastnosti jsou závislé pouze na počtu rozpuštěných částic a nikoliv na rozpuštěné látce jako takové.

#### 15.1.1. Osmotický tlak ( $\pi$ )

Osmotický tlak je tlak nízkomolekulárních látek a iontů v rozpouštědle. Jestliže jsou dva vodné roztoky o různé koncentraci od sebe odděleny polopropustnou membránou, která je propustná pouze pro vodu (ne pro rozpuštěné částice), potom proniká voda z prostoru s nižší koncentrací rozpuštěných částic, do prostoru s vyšší koncentrací rozpuštěných částic. Tento pohyb molekul vody se nazývá *osmóza*. Tlak, který je třeba vyvinout k zabránění pohybu vody přes membránu, se nazývá *osmotický tlak* (obrázek č. 164).



Obrázek 164: *Osmotický tlak*

Osmotický tlak vzniká důsledkem působení celkového počtu osmoticky aktivních částic v roztoku bez ohledu na jejich velikost. Každá částice – molekula, atom nebo iont v roztoku se podílí na konečné hodnotě osmotického tlaku stejnou mírou. Osmoticky aktivní jsou pouze částice, které jsou rozpuštěné v roztoku a které nemůžou volně přecházet přes membránu. Pokud látka disociuje, je každá její disociovaná část osmoticky aktivní částicí. Nedisociovaná látka představuje jen jednu osmoticky aktivní částici.

Osmotický tlak lze vyjádřit vztahem pro ideální roztok (van't Hoffova rovnice, rovnice č.1):

$$\pi = i \times c \times R \times T$$

kde:

$$\pi = \text{osmotický tlak (Pa = J m}^{-3}\text{)}$$

$i$  = disociační číslo, počet částic, na které rozpuštěná látka disociuje – např.  $i = 1$  pro neelektrolyty,

$i$  = počet osmoticky účinných částic (pro silné elektrolyty)

$c$  = molární koncentrace ( $\text{mol L}^{-1}$ )

$R$  = molární plynová konstanta ( $8,31441 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

$T$  = termodynamická teplota (K)

### 15.1.2. Osmolární koncentrace

Osmometrie je technika k měření koncentrace rozpuštěných částic v roztoku, tzv. *osmolární koncentrace*. **Osmolární koncentrace** se vyjadřuje jako osmolarita nebo osmolalita.

**Osmolarita** ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ,  $\text{osmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) – se vyjadřuje na objem (l) roztoku. Osmolarita je molarita ( $\text{mol/l}$ ), je to látková koncentrace osmoticky aktivních látek. Osmolarita je množství všech osmoticky aktivních látek v 1 l roztoku.

**Osmolalita** ( $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$  nebo  $\text{osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) – vyjádřená na kg rozpouštědla. Je to koncentrace osmoticky aktivních látek v jednotce hmotnosti rozpouštědla. Na rozdíl od osmolarity se jedná o množství látek v objemu rozpouštědla (tj. bez rozpuštěných látek). Osmolalita je stejná jako molalita ( $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) u neelektrolytů nebo vyšší u elektrolytů, tj. látek disociujících, než molalita téhož roztoku. Např. 1M roztok glukózy a 1M roztok NaCl mají stejnou molalitu, tj. 1 mol/kg. Molekula glukózy nedisociuje, proto je osmolalita tohoto roztoku rovna 1 osmol/kg. Roztok NaCl disociuje tak, že z jedné molekuly NaCl vzniknou dva ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), z nichž oba jsou osmoticky aktivní, proto osmolalita tohoto roztoku je 2 osmol/kg.

*Osmol* je mol osmoticky aktivních látek. Osmolalita vyjádřená v mmol/kg rozpouštědla je z termodynamického hlediska přesnější, protože koncentrace roztoku vztažená na váhu rozpouštědla není závislá na teplotě.

U silně naředěných vodních roztoků se hodnota osmolarity a osmolality téměř neliší, protože 1 l vody se přibližně rovná 1 kg vody a množství rozpuštěných látek je možné zanedbat.

## 15.2. Měření osmotického tlaku

V laboratoři se používá nepřímé měření osmotického tlaku. Vychází se z měření těch vlastností roztoku (koligativní vlastnosti), které se mění v závislosti na změně osmolality. Přístroje pro měření osmolality se nazývají osmometry. Nejvíce používaná metoda k měření osmolární koncentrace je metoda založená na měření snížení bodu tuhnutí - kryoskopie.

### 15.2.1. Kryoskopie

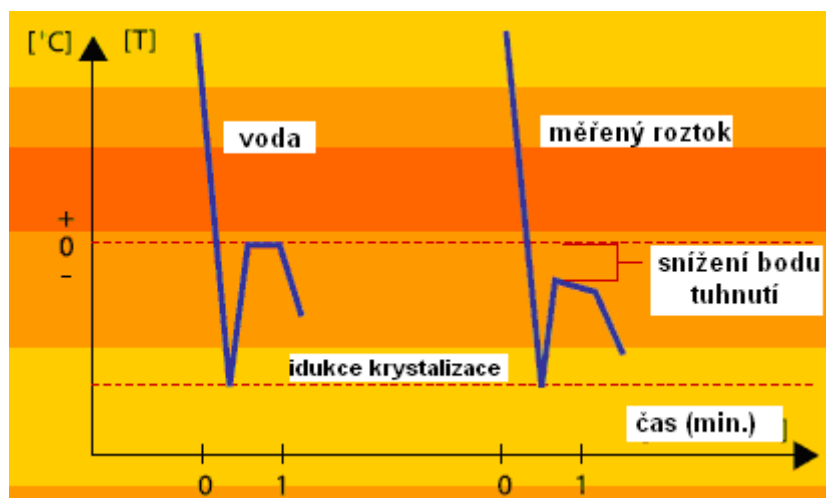
Osmometry založené na kryoskopickém principu využívají snížení teploty tuhnutí roztoku v závislosti na koncentraci částic v roztoku. Bod tuhnutí čisté vody je  $0,000 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1mol roztok glukózy rozpuštěný v 1kg vody má bod tuhnutí snížen o  $-1,858 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kryoskopický osmometr musí být vybaven velmi citlivým teploměrem, protože snížení teploty tuhnutí je velmi malé. 1 mmol látky rozpuštěný v 1 kg vody, sníží bod tuhnutí o  $0,001858 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Průběh kryoskopického měření (obrázek č.2):

- Vzorek se nejprve pomalu termoelektricky ochladí několik stupňů pod bod tuhnutí.
- Poté se mechanicky indukují začátek krystalizace.
- V tomto bodě se při krystalizaci uvolňuje skupenské teplo tuhnutí – dojde ke zvýšení teploty přesně na teplotu tuhnutí.
- Teplota tuhnutí je stejná po dobu, kdy se uvolňuje skupenské teplo tuhnutí rozpouštědla - „fáze platau“.
- Teprve pak pokračuje ochlazování mrznoucího roztoku.

- Pokles bodu tuhnutí roztoku (vzorku) proti bodu tuhnutí rozpouštědla (vody) je přímo úměrný osmolalitě.

Jednotlivé přístroje se liší způsobem, jakým vyvolávají začátek krystalizace podchlazeného měřeného vzorku. Může to být krátkodobá vibrace kovového drátku, poklep kladívka na stěnu měřicí nádoby nebo účinek ultrazvukových vln.



Obrázek 165 Kryoskopická teplotní křivka

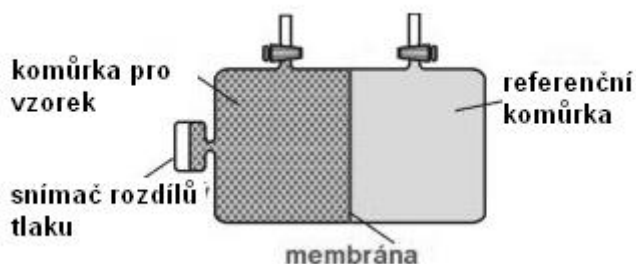
### 15.2.2. Ebulioskopie

Ebulioskopická osmometrie sleduje snížení tenze vodních par nad roztokem, zvýšení bodu varu (ebulioskopický efekt) v závislosti na koncentraci osmoticky aktivních částic v roztoku. Jeden osmol jakýkoliv částic rozpuštěných v jednom kg vody způsobí zvýšení teploty varu (ebulioskopický efekt) o  $+0,52\text{ }^{\circ}\text{C}$  a snížení tenze vodních par rozpouštědla nad roztokem o  $0,3\text{ mmHg}$  ( $39,9\text{ Pa}$ ). Osmoticky aktivní částice v roztoku snižují proporcionálně tenzi vodních par, což vede ke snížení rosného bodu. Rosný bod je teplota, při které je vzduch maximálně nasycen vodními parami, pokud teplota klesne pod teplotu rosného bodu, nastává kondenzace vodních par. Strmost poklesu rosného bodu je  $0,303\text{ }^{\circ}\text{C}$  na osmol/kg, tento pokles je velmi nízký a vyžaduje vyšší rozlišení při měření teploty ( $0,0003^{\circ}\text{C}$ ) stejně jako měření zvýšení teploty varu (ebulioskopie- zvýšení bodu varu bodu varu o  $+0,52\text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $1\text{ osmomol/kg}$ ). Při měření interferuje přítomnost alkoholu a jiných těkavých látek.

### 15.2.3. Koloidní osmometr

Jeden osmol jakýchkoliv částic rozpuštěných v jednom kg vody způsobí zvýšení osmotického tlaku o  $17\ 000\text{ mmHg}$  ( $2266\text{ kPa}$ ). V praxi není možné měřit osmolární koncentraci látek přímo měřením osmotického tlaku, tzn. tlaku vznikajícího na semipermeabilní membráně propustné pouze pro vodu, protože dostupná semipermeabilní membrána je vždy propustná pro malé ionty. I kdyby existovala vhodná membrána, tlak, který je vyvíjen na membránu, je enormně vysoký ( $1\text{ osmol}$  způsobí zvýšení osmotického tlaku o  $2266\text{ kPa}$ ) a membrána by praskla. Pokud bychom chtěli měřit pouze osmoticky aktivní molekuly proteinů, můžeme měřit osmotický tlak pomocí koloidního osmometru, kde si zvolíme odpovídající membránu s cut off hodnotou  $10 - 20\ 000\text{ Da}$ , která není propustná pro proteinové molekuly. Pro měření celkové osmolality nelze koloidní osmometr použít.

Koloidní osmometr – onkometr (obr. č. 166) se používá vzácně k měření tzv. onkotického tlaku – tlaku plazmatických bílkovin. K měření se používá polopropustná membrána, která odděluje tekutiny (referenční a měřenou), o různé koncentraci vysokomolekulárních látek. Principem měření onkotického tlaku je sledování rozdílu tlaku mezi referenční komůrkou a komůrkou s měřeným vzorkem. Rozdíl tlaků je měřen piezoelektricky.



Obrázek 166 Schéma koloidního osmometru - onkometru

### 15.3. Stanovení osmolality v biologickém materiálu

Nejčastěji používaná metoda k měření osmolární koncentrace v biologických tekutinách (plazmě, séru, moči) je založena na měření snížení bodu tuhnutí - kryoskopie. Je to robustní metoda, která má široké použití ve všech klinických zdravotnických laboratořích. Lidská plazma (podobně i plná krev a sérum) vykazuje snížení bodu tuhnutí v rozmezí  $0,54 \pm 0,014$  °C ( $0,512 - 0,568$  °C). Pokud 1 mol osmoticky aktivních částic sníží teplotu tuhnutí o  $-1,858$  °C, pak snížení o  $-0,54$  °C představuje hodnotu osmolality  $0,54/1,858 = 0,2906$  mol/kg = 290,6 mmo/l. Stejného výpočtu používají osmometry založené na kryoskopickém principu.

#### 15.3.1. Osmolalita séra (plazmy)

Osmolalita charakterizuje osmotickou kapacitu tekutiny, schopnost působit osmotickým tlakem na semipermeabilní membránu. Osmolalita plazmy se za fyziologických podmínek pohybuje v rozmezí  $285 \pm 10$  mmol/kg a je velmi přísně regulována pomocí osmoreceptorů v mezimozku, které regulují sekreci adiuretinu (ADH), jež ovlivňuje zpětnou resorpci vody v distálním tubulu ledvin. Systémy řídicí příjem a výdej vody zajišťují nejen konstantní objem celkové tělesné vody, ale i konstantní osmolalitu. Nemáme-li k dispozici osmometr, lze k odhadu osmolality použít výpočet. Nejvíce rozšířená je rovnice

$$\text{Osmolalita séra (vypočítaná)} = 2 \times \text{Na}^+ + \text{urea} + \text{glukóza}$$

Kde:  $\text{Na}^+$ , urea, glukóza jsou plazmatické koncentrace v mmol/l. Ve vzorci se počítá s hlavním extracelulárním kationtem ( $\text{Na}^+$ ), koeficient 2 započítává i odpovídající anionty. Urea a glukóza jsou jediné z běžně měřených složek plazmy, které mohou zvláště za patologických stavů dosáhnout koncentrace významně ovlivňující osmolalitu.

#### 15.3.2. Osmolální okno (osmolal gap)

Je rozdíl mezi měřenou a vypočítanou osmolalitou. Odhadovaná osmolalita podle uvedené rovnice odpovídá osmolalitě měřené, pokud se v plazmě neshledají patologické látky zvyšující osmolalitu (tabulka č. 9). Obě hodnoty se běžně shodují, resp. liší pouze v intervalu do 5, maximálně 10 mmol/kg vody. Porovnání výpočtu s měřením je užitečné tam, kde je podezření na přítomnost látek o malé molekule, s nimiž výpočet nepočítá. Např. 1 g etanolu (tedy 1 promile alkoholu) v plazmě zvýší naměřenou osmolalitu o cca 23 mmol/kg vody.

Patologická látka	Potenciální letální koncentrace (mg/l)	Osmolální okno (mmol/ kg vody)
etanol	3500	81
etyléter	1800	70
izopropanol	3400	60
metanol	800	27
ethylenglykol	210	3,4

Tabulka 9

Dalším stavem, kdy neodpovídá vypočtená osmolalita měřené osmolalitě, je extrémně vysoká plazmatická koncentrace bílkovin nebo lipidů. V těchto případech se mění podíl vody v plazmě a výpočet, který počítá s koncentrací látek na 1 l plazmy, nemůže odpovídat změřené hodnotě, která se vztahuje na 1 kg vody.

### 15.3.3. Osmolalita moče

Osmolalita moče se pohybuje u dospělého člověka v rozmezí 250 – 1200 mmol/kg při maximálním koncentračním úsilí zdravých ledvin. Na osmolalitě moče mají hlavní podíl kationty –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  a urea. Koncentrační schopnost ledvin je menší u kojenců a postupné snižování je fyziologické i vlivem stárnutí.

## 15.4. Diagnostický význam stanovení osmolality

### 15.4.1. Osmolalita séra (plazmy)

O osmolalitě séra (plazmy) rozhoduje především  $\text{Na}^+$  a odpovídající anionty, dále urea, glukóza a v malé míře bílkoviny. Podíl urey se stává významnějším až s její retencí v organismu, podíl glukózy roste u dekompenzovaného diabetika nebo při intoleranci glukózy u kriticky nemocných. Podíl bílkovin, tzv. koloidně osmotický tlak, je významný pro udržení cirkulujících tekutin v cévním řečišti. Při patologicky zvýšených hodnotách osmolality hovoříme o hyperosmolalitě a naopak při snížených hodnotách osmolality jde o stav, který se nazývá hypoosmolalita.

**Hyperosmolalita** ( $> 300 \text{ mOsm}$ )

**Hypoosmolalita** ( $< 270 \text{ mOsm}$ )

### 15.4.2. Osmolalita moče

Stanovení osmolality moče má diagnostický význam u onemocnění ledvin. Podle hodnoty osmolality moče se posuzuje koncentrační schopnost ledvin. Porucha koncentrační schopnosti ledvin patří k prvním známkám onemocnění ledvin.

## 15.5. Technická řešení výrobců - nejvíce používané kryoskopické osmometry

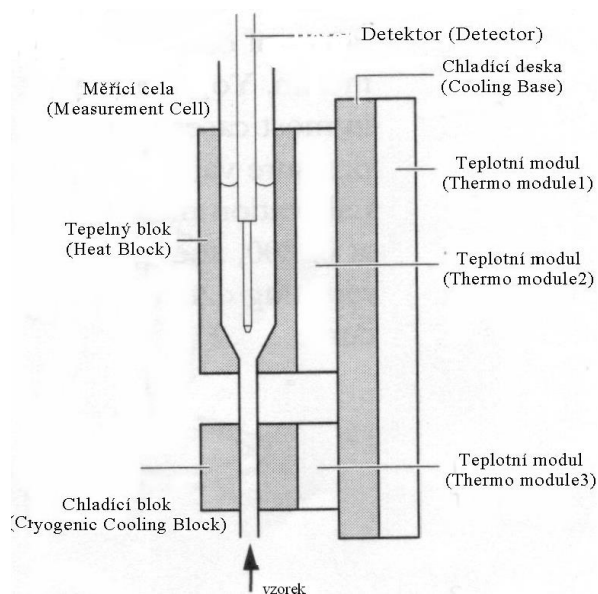
**Osmometr Arkray OM 6050** a OM 6060 výrobce ARKRAY Inc. (Japonsko)

Tento přístroj je plně automatizovaný, je vybaven podavačem vzorků, má integrovanou termotiskárnu a čtečku čárového kódu. Potřebný objem vzorků pro měření je 200  $\mu\text{l}$ , čas měření je 2 - 3 minuty. Rozsah měření je 0-2500 mOsm/kg, přesnost měření udává výrobce  $<1\%$  (CV).

### **Průběh měření:**

Tryska natáhne vzorek a pošle ho do měřící cely. Thermo-module 2 je aktivován a postupně ochlazuje teplotní modul (Thermo module 1 a 3). To způsobuje superchlazení: vzorek v měřící cele je ještě kapalný v bodě tuhnutí (tání). Thermo modul 3 je aktivován k chlazení chladicího bloku (Cryogenic Cooling Blocku), dokud teplota nepoklesne pod teplotu tuhnutí. Indukce krystalizace se provádí účinkem ultrazvukových vln. Vzorek v bloku tuhne

(zmrzne). Prove se měření teploty - pokles bodu tuhnutí roztoku (vzorku) proti bodu tuhnutí rozpouštědla (vody), který je přímo úměrný osmolalitě. Na Thermo-moduly 1 a 3 je aplikován opačný proud k zahřátí tepelného bloku ( Heat Blocku) a chladicího bloku (Cryogenic Cooling Blocku). Vzorek roztaje do svého původního kapalného stavu. Tryska přeneše vzorek z měřicí cely do odpadní nádoby (obrázek č.167).



Obrázek 167 Schéma měřicí cely analyzátoru Advaced

### ***Osmometr Fiske 210 (výrobce: Advanced Instrument, USA)***

Jedná se o jednovzorkový přístroj vhodný pro malé laboratoře. Potřebný objem vzorků pro měření je 20  $\mu$ l, čas měření je 90 vteřin. Rozsah měření je 0-2000 mOsm/kg, přesnost měření udává výrobce <1% (CV).

Průběh měření:

Vzorek je dávkován speciální pipetou, která dávkuje a umísťuje vzorek do měřicí komůrky a zároveň aktivuje spouštěcí spínač chladicí komůrky. Teplota v chladicí komůrce je udržována pomocí modulu s termoelektrickými články. Pro indukci krystalizace používá poklep kladívka na chladicí komůrku. Dynamické změny teploty vzorku se automaticky měří pomocí termistoru a hodnoty se zobrazují na displeji.

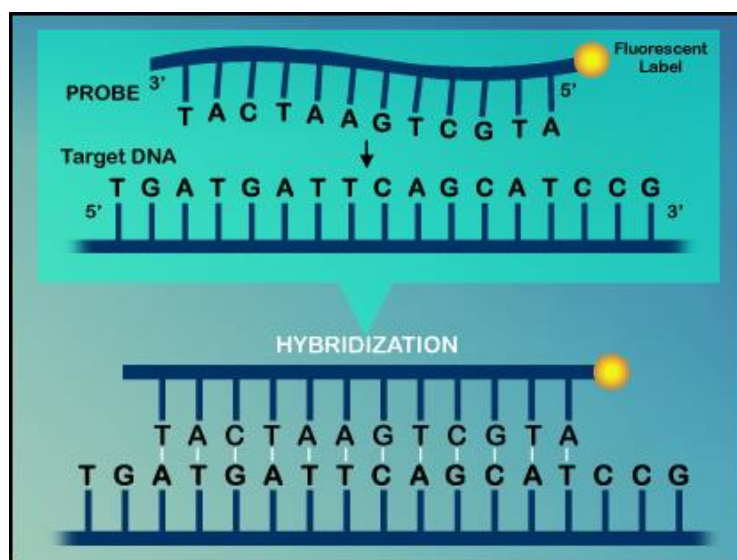
## 16. Molekulárně biologické vyšetřovací techniky

Molekulárně biologické metody postupně pronikají do mnoha odvětví. Využívají se v biologických vědách, v lékařské genetice, mikrobiologii, biochemii, genetickém inženýrství, ale také v antropologii, onkologii nebo v kriminalistice. V této kapitole je uveden princip základních molekulárně biologických technik a jejich možné využití v klinické praxi.

### 16.1. Metody průkazu specifické nukleové kyseliny

#### 16.1.1. Hybridizační techniky

Tyto techniky jsou založeny na principu spojování dvou jednořetězcových molekul nukleových kyselin za tvorby hybridu DNA-DNA, DNA-RNA nebo RNA-RNA. Jednou z této dvojice je obvykle tzv. hybridizační sonda, což je krátký úsek nukleové kyseliny (od 20-ti do několika tisíc nukleotidů) značený radionuklidem, chemiluminiforem, heptenem, antigenem nebo enzymem, která je komplementární k hledané sekvenci DNA či RNA. Hybridizační reakce může probíhat dvěma způsoby: buď jsou obě vlákna volně rozptýlena v roztoku nebo je jedna z hybridizujících složek navázána na pevný nosič.



Obr.168 Hybridizace

##### 16.1.1.1. Hybridizace v roztoku

Při této metodě jsou nukleová kyselina i hybridizační sonda rozptýleny v roztoku a mohou spolu volně reagovat. Po přidání enzymu S1-nukleázy, který selektivně rozloží pouze jednořetězcovou DNA, zůstanou v roztoku pouze dvouřetězcové hybridy. Ty mohou být potom vysráženy z roztoku kyselinou trichloroctovou nebo vyvázány na hydroxyapatit. Pro rutinní použití je však tato metoda příliš pracná a používá se tzv. **HPA – Hybridization Protection Assay**, kde je sonda označená akridinesterem navázána na mikročástici s kovovým jádrem, což usnadňuje separaci. Celá reakce probíhá v těchto krocích:

- extrakce nukleové kyseliny (výhodné je využití 16S ribozomální RNA pro vyšší výtěžnost)
- hybridizace při teplotě 60°C
- separace hybridů a degradace nenačíslených sond
- promývání roztoku
- indukce luminiscence a měření její intenzity v luminometru.

### 16.1.1.2. Hybridizace na pevném nosiči

Na rozdíl od předchozí metody je zde hybridizační sonda navázána na pevný nosič a kinetika této reakce je proto pomalejší a relativně málo efektivní. Tohoto principu se využívá hlavně u testů, kde stanovujeme více markerů současně, např. více subtypů jednoho infekčního agens (tzv. multiple tests), nebo při HLA typizaci. Můžeme testovat naráz až dvacet rozdílných sond, které jsou navázány např. na nylonový proužek.

Mezi varianty hybridizace na pevném nosiči patří dot-, blot- a slot- hybridizace, Southernův přenos (popsaný v kapitole věnované detekci mutací) a hybridizace RNA (Northern blotting). Imobilizace vzorků se provádí nejčastěji na membrány z nitrocelulózy nebo nylonu. Nukleovou kyselinu před testováním předem extrahujeme a zpravidla i amplifikujeme (pro vyšší citlivost testu) a označíme např. biotinem (pro následnou vizualizaci). Další modifikací této metody je tzv. **Sandwich hybridization assay**, kde primární sonda není značena a je použita druhá označená sonda (komplementární s jiným úsekem nukleové kyseliny) nebo přímo protilátka proti nukleové kyselině.

### 16.1.1.3. Hybridizace in situ

Je v podstatě variantou hybridizace na pevném nosiči s tím rozdílem, že hybridizace probíhá přímo v morfologicky intaktní tkáni, v buňkách nebo na chromozomech, které jsou fixovány na mikroskopickém sklíčku. To s sebou nese dva částečně protichůdné požadavky: co nejdokonalejší uvolnění analyzované nukleové kyseliny a co nejšetrnější fixace tkáně pro morfologickou analýzu.

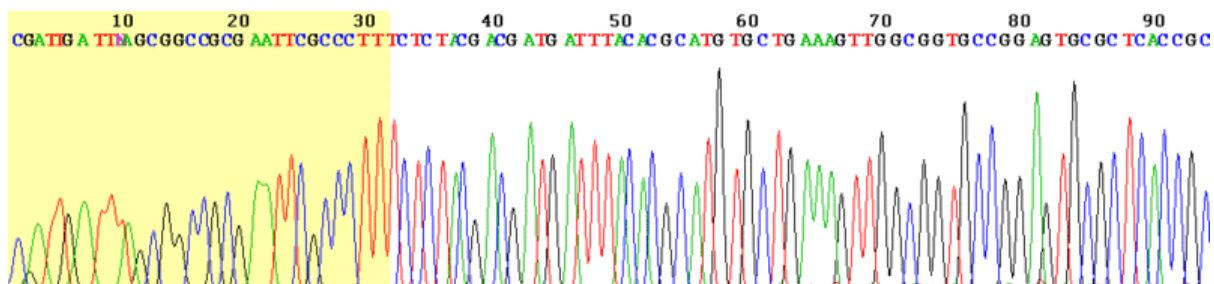
Vyšetřovaná nukleová kyselina musí být nejprve denaturována. Na ni je pak podle pravidel komplementarity bází navázána sonda. Navázání sondy na vyšetřovanou DNA se projeví jako hybridizační signál, který můžeme pozorovat pod mikroskopem.

Značení sond může být přímé, což umožňuje pozorovat hybridizační signál ihned po skončení hybridizace, ale nevýhodou je, že signál nelze zesílit. K přímému značení se nejčastěji využívá fluorescenční barvivo fluorochrom (např. u metody **FISH - Fluorescence In Situ Hybridization**) nebo radioaktivní izotop. Při nepřímém značení je sonda značena haptenem, který je následně detekován pomocí značené protilátky. Hybridizační signál je v tomto případě možné zesílit.

## 16.2. Metody pro stanovení pořadí nukleotidů

### 16.2.1. Sekvenování (sekvenace, sekvencování)

Sekvenační biochemické metody zjišťují pořadí nukleových bází (A, C, G, T) v sekvencích DNA (jaderné, mitochondriální nebo plazmidové). Dnes je známo již velké množství metod sekvenování DNA, které se liší jak některými základními principy, tak především cenou a rychlostí. V této kapitole se budeme věnovat jen několika nejzákladnějším metodám sekvenace.



Obr.169 Sekvenace dle Sangerovy metody vyhodnocená počítačem



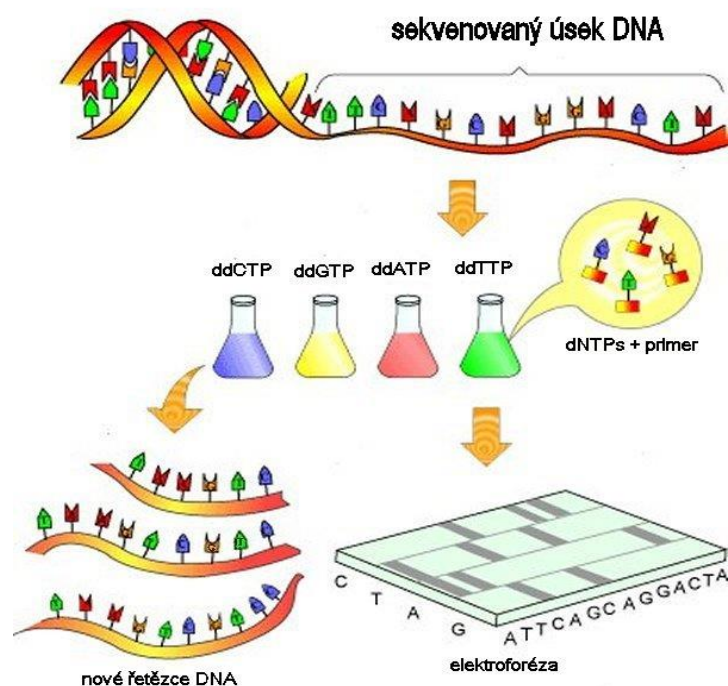
### 16.2.1.1. Sekvence dle Sangera

Od 70. let 20. století je používána metoda Fredericka Sangera, která využívá dideoxynukleotidů a následné elektroforézy. Dideoxynukleotid se začlení do replikující se DNA, ale vzhledem k absenci OH skupiny zastaví elongaci (prodlužování) řetězce.

Vybraná sekvence DNA se vloží do reakční směsi, jež obsahuje vhodný radioaktivně označený primer (např. pomocí  $P^{32}$ ), DNA polymerázu (Taq polymeráza), zásobu čtyř esenciálních deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), ale navíc také jeden ze čtyř dideoxynukleotidů, např. ddATP. Elongace tedy v tomto případě skončí vždy adeninem, ale na různých místech DNA řetězce. Do další zkumavky se přidá jiný dideoxynukleotid, celkem budeme mít tedy čtyři zkumavky.

Různě dlouhé fragmenty DNA se pak rozdělí elektroforézou v gelu. Porovnáním čtyř vedle sebe umístěných elektroforetických gelů snadno zjistíme, jak za sebou následovaly nukleové báze ve zkoumané sekvenci DNA.

Sangerova metoda má také mnoho alternativ, nové modifikace této metody např. místo označení radioaktivním primerem využívají fluorescenční barviva navázaná na jednotlivé dideoxynukleotidy. Výhoda je v tom, že místo čtyř zkumavek lze použít jen jednu, protože při elektroforéze jsou jednotlivé nukleové báze označené různými fluorescenčními barvami.



Obr.170 Princip sekvenace dle Sangera

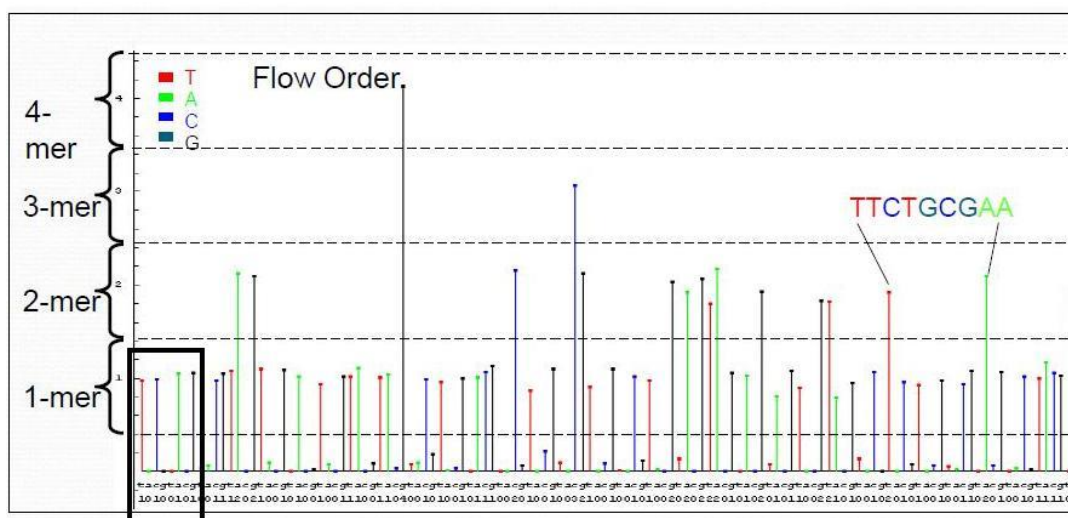
### 16.2.1.2. Maxam-Gilbertova metoda

Sekvence, kterou v roce 1977 vyvinuli Allan Maxam a Walter Gilbert, se označuje jako degradační či chemické sekvenování. Principem této metody je specifická chemická degradace purinových a pyrimidinových bází. Purinové báze jsou modifikovány pomocí dimethylsulfoxidu, pyrimidinové pomocí hydrazinu. Poté je pomocí 1M piperidinu při  $90^{\circ}\text{C}$  štěpena cukrofosfátová kostra v místě příslušné modifikované báze. Štěpení DNA je náhodné, při poměru ve prospěch DNA se rozštěpí pouze každá 3-4 báze.

Rozštípaná DNA se následně nanese na polyakrylamidový gel a nechá se proběhnout elektroforézou, která seřadí všechny sekvence podle jejich délky. Posledním krokem je zviditelnění těchto sekvencí pomocí rentgenového záření (po prvotním označení jejich konců radioaktivními značkami) a určení pořadí nukleových bází v původním vzorku DNA.

### 16.2.1.3. Pyrosekvenování (angl. pyrosequencing)

Jde o novější metodu sekvenování DNA, která vznikla v roce 1996. Je sice (podobně jako Sangerova metoda) založena také na syntéze nových sekvencí DNA, ale liší se způsobem, jak je detekováno začlenění daného nukleotidu a nevyžaduje elektroforézu. Ve směsi pro pyrosekvenování musí být však přítomno velké množství enzymů, mimo DNA polymerázy ještě ATP sulfuryláza, luciferáza a apyráza; ze substrátů pak adenosinfosfosulfát a luciferin. Do této směsi jsou postupně vkládány nukleotidy různých typů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Když se po přidání jednoho z nich uvolní světelné záření, znamená to, že se do vznikajícího řetězce začlenil jeden nebo více nukleotidů tohoto typu. Toto světlo zde vzniká v důsledku enzymatické reakce, na jejímž začátku je uvolnění pyrofosfátu z nově začleněného nukleotidu a na jejímž konci je spotřeba vzniklého ATP luciferázou k oxidaci luciferinu.



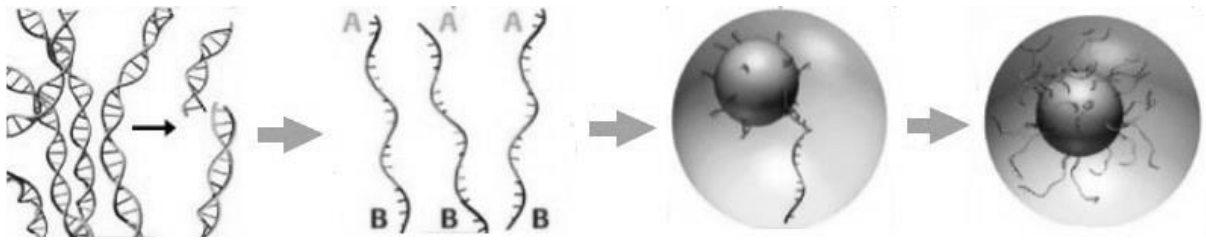
Obr.171 Výsledek pyrosekvenování

### 16.2.1.4. Sekvence nové generace (NGS – next generation sequencing)

Rozvoj molekulární biologie s nutností sekvenovat stále větší úseky DNA (nejlépe celé geomy) v krátkém čase a za nejnižší cenu vyvolal potřebu nových technologií. První metodou nové generace se stala technologie tzv. masivního paralelního sekvenování (MPSS), další metodou je pak pyrosekvenování (popsané výše).

Podstatou nových metod je vazba fragmentu nukleové kyseliny na mikrokuličky. Při emulzní PCR pak dochází na každé kuličce ke klonální amplifikaci – všechny molekuly DNA pochází z jediné molekuly templátu. Čtení sekvence je řešeno buď sekvenováním syntézou (např. u pyrosekvenování), nebo sekvenováním založeném na ligaci.

Nejnovější technologie, zatím pouze ve vývoji, jsou založeny na principu sekvenování jednotlivých molekul DNA procházejících nanometrickým pórem v křemíkovém čipu. Tento přístup slibuje výrazné výhody z hlediska nákladů, širší aplikačního použití i rychlosti sekvenování.



Obr.172 Princip klonální amplifikace

### 16.3. Metody založené na amplifikaci nukleové kyseliny

Amplifikace znamená obecně zesílení, v případě DNA zmnožení předem určeného úseku. Jedinečným nástrojem pro amplifikaci nukleových kyselin je metoda nazývaná PCR (Polymerase Chain Reaction).

#### 16.3.1. PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce)

PCR jako laboratorní techniku objevil v roce 1983 v Kalifornii prof. Kary Banks Mullis. Vynález PCR byl pro molekulární biologii skutečnou revolucí a v současné době je PCR se svými modifikacemi jednou z nejpoužívanějších technik v tomto oboru.

Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace jednotlivých řetězců se specifickými oligonukleotidy (tzv. primery) o velikosti 20-30 nukleotidových bází, které jsou do reakční směsi cíleně přidány. Tyto oligonukleotidy slouží jako počátky pro syntézu nových řetězců DNA, a tím v podstatě ohraničují nově vznikající úseky z obou stran (primery bývají zpravidla dva a označujeme je z angličtiny jako Forward a Reverse). Vlastní amplifikace DNA pak probíhá v opakujících se cyklech, které se skládají ze tří kroků:

##### **DENATURACE**

Po zahřátí DNA na teplotu kolem 95°C se rozpadnou vodíkové můstky mezi vlákna DNA, čímž se dsDNA (dvouřetězcová) rozdělí na ssDNA (jednořetězcové).

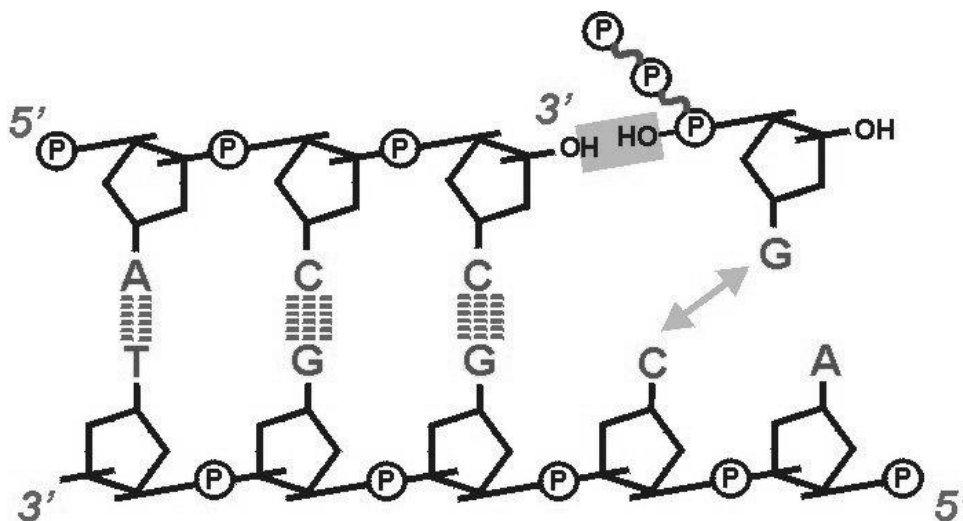
##### **HYBRIDIZACE (navázání či nasednutí primerů)**

V anglické literatuře se tato fáze označuje termínem annealing (to anneal = žíhat, kalit kov, tzn. po rozpálení prudce ochladit). Probíhá nejčastěji při teplotách kolem 50–60°C. Molekuly jednořetězcové DNA po ochlazení na tuto teplotu opět renaturují. Pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické oligonukleotidy (primery), budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR velmi důležitá a musí být individuálně nastavena pro daný pár primerů. Při příliš nízké teplotě mohou primery nasedat i na ne zcela komplementární sekvence a vytvoří se tím nespecifický produkt. Při příliš vysoké teplotě zase budou primery málo hybridizovat a produkt se nevytvoří vůbec nebo jen v malém množství.

##### **ELONGACE (extenze, syntetická fáze)**

Oligonukleotidy, které se navázaly na jednořetězcovou DNA v předchozím kroku, slouží v tomto kroku jako primery (počáteční místa replikace). Při teplotě 70-75°C začne probíhat syntéza nových vláken směrem od 5'-konce k 3'-konci. Tato syntéza je katalyzována DNA polymerázou (zpravidla termostabilní Taq polymerázou původně izolovanou z bakterie *Thermus aquaticus* z horkých pramenů Yellowstonekého národního parku) a samozřejmě

probíhá pouze za přítomnosti čtyř esenciálních deoxyribonukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), které slouží jako stavební kameny pro nově syntetizovaný řetězec (viz obr.173).



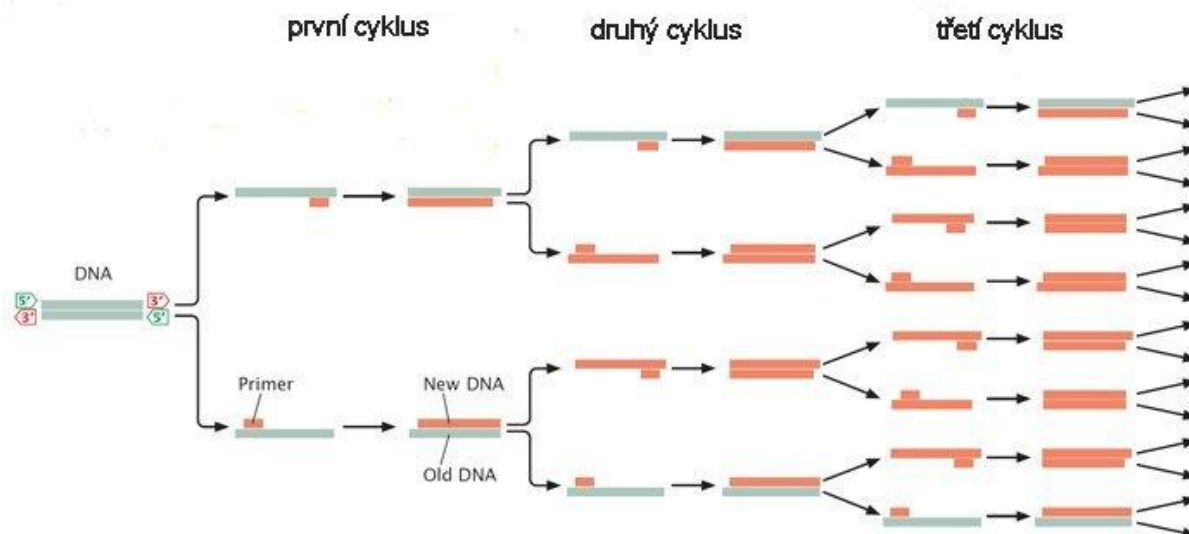
Obr.173 Syntéza nového řetězce DNA

Po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí. V dalším cyklu slouží jako templát pro polymerázu i nově vytvořené řetězce, takže se nasyntetizuje dvojnásobné množství produktu. Při opakujících se cyklech tedy množství vytvořených řetězců přibývá exponenciálně podle vzorce:

$$p = 2^n$$

kde p je počet kopií daného úseku DNA a n je počet cyklů.

V prvním cyklu, kdy jako templát slouží původní dlouhá molekula DNA, vzniknou řetězce, které z jedné strany přesahují úsek vymezený oběma primery (tzv. primární produkt). Pokud v dalších cyklech jako templát slouží takto vytvořený primární produkt, vytvoří se podle něj úsek DNA o délce přesně ohraničené polohou obou použitých primerů (od jednoho primeru bude syntéza začínat a v místě druhého skončí, neboť v tomto místě končí primární produkt). Právě těchto specifických produktů o přesně vymezené délce bude v průběhu PCR přibývat exponenciálně, zatímco delších (primárních produktů) jen lineárně.



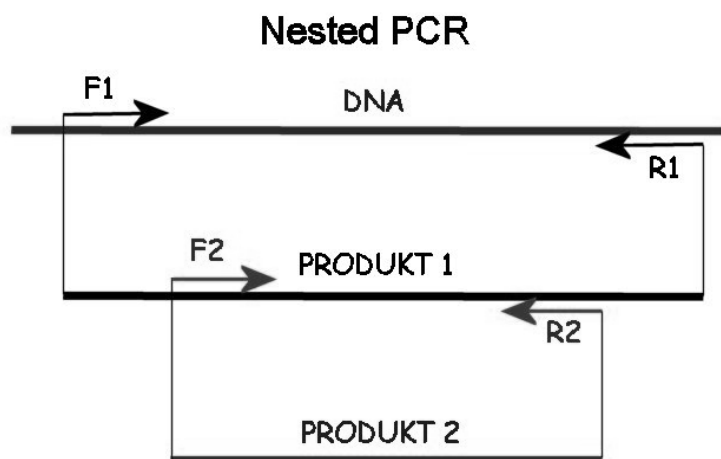
Obr.174 Schéma PCR

### 16.3.1.1. Alelicky specifická PCR

Modifikace PCR užívaná k přímé detekci bodových mutací či malých delecí. PCR směs obsahuje alelicky specifické oligonukleotidy jako primery. V tomto schématu jsou používány tři primery (na rozdíl od běžné PCR se dvěma primery). Jeden z nich představuje stabilní hranici cílového amplifikovaného fragmentu DNA a druhé dva představují alternativní verze druhého konce (mutovanou/nemutovanou). Mutace, kterou takto detekujeme, tedy tvoří hranici amplifikovaného fragmentu a je kryta primerem. Využití alelicky specifické PCR bylo poprvé popsáno v roce 1991 na detekci subtypů HLA (genů pro hlavní histokompatibilní komplex u člověka).

### 16.3.1.2. Nested PCR

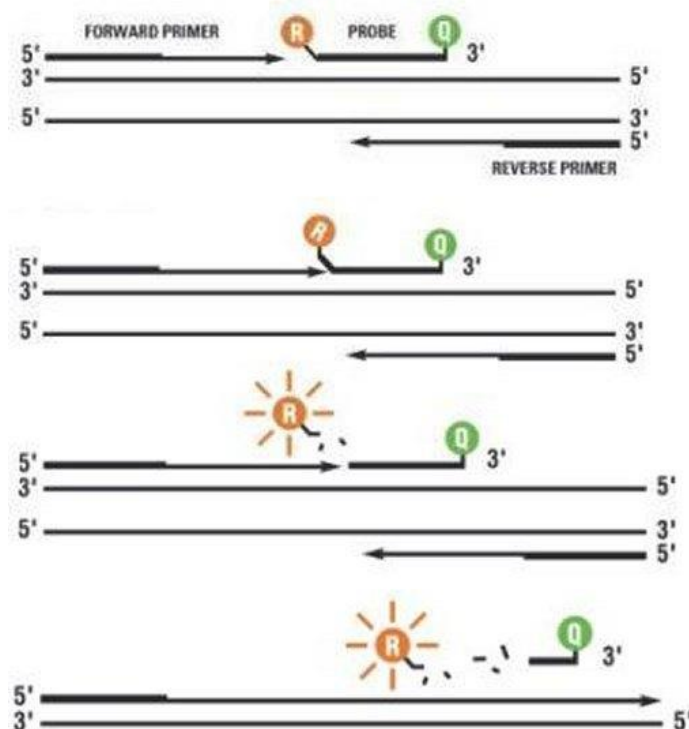
Tato modifikace PCR je využívána v mnoha laboratořích k vědeckým i diagnostickým účelům. Amplifikace zde probíhá dvoufázově. V první fázi se pomocí jedné dvojice primerů namnoží delší sekvence nukleové kyseliny. Produkt první PCR reakce je potom použit v druhé amplifikační reakci, kde se za pomoci jiné dvojice primerů namnoží kratší vnitřní sekvence tohoto produktu. Výhodou je hlavně vysoká specificita daná dvěma dvojicemi primerů. Aby se zabránilo riziku kontaminace při otevírání zkumavek při přenosu vzorků mezi první a druhou PCR reakcí, byla pro rutinně diagnostický provoz vyvinuta tzv. **Single-tube nested PCR**. Při ní je dvojice primerů pro druhou PCR přítomna již v první reakci, ale je oddělena pomocí silné vrstvy minerálního oleje. Po skončení první amplifikace se obsah zkumavky promísí a zcentrifuguje a nechá se proběhnout druhá reakce.



Obr.175 Schématické znázornění Nested PCR

### 16.3.1.3. Kvantitativní PCR v reálném čase (Real-time PCR)

Real-time PCR slouží ke kvantifikaci amplifikovaného produktu. Jde o obdobu klasické PCR s tím rozdílem, že probíhá na speciálním přístroji, který umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Základní podmínkou této reakce je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA. Úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Reakce probíhá na speciálních termocyklerech s optikou umožňující excitaci substrátů a následnou detekci fluorescence v každé jamce. Standardně se používá 96ti jamkový formát, k dispozici jsou však i 384 jamkové cyklery.



Obr.176 Schéma Real-Time PCR

Na obr.176 je schematicky znázorněna jedna z možností vizualizace RT-PCR. Specifické sondy mají ve své struktuře sekvenci, kterou hybridizují k DNA (v oblasti mezi primery) a pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor R) a zhášečem (quencher Q). Nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvětšením vzdálenosti mezi molekulou R a Q po rozštípnutí navázané sondy polymerázou.

#### 16.3.1.4. Reverzně transkripční PCR (RT-PCR)

Tato metoda je vhodná pro průkaz RNA (např. virové nebo mRNA vzniklé při transkripci z DNA). Princip spočívá v tom, že před vlastní amplifikací musí být izolovaná RNA překopírována pomocí enzymu reverzní transkriptázy do cDNA. Reverzní transkriptázy izolované z virů jsou však termolabilní a nesnášejí teplotu nad 42°C. Proto se začalo využívat reverzně transkripční aktivity, kterou má v přítomnosti  $Mg^{2+}$  iontů DNA polymeráza z bakterie *Thermus thermophilus*. Ta je schopna pracovat i při teplotě 72°C. PCR reakce pak probíhá běžným způsobem. RT-PCR se využívá při hledání nových genů, vyhledávání mutací nebo ke zjišťování síly exprese jednotlivých genů.

#### 16.3.2. LCR (Ligase Chain Reaction, ligázová řetězová reakce)

Technika ligázové řetězové reakce byla poprvé popsána v roce 1989 a princip vychází, stejně jako u PCR, z replikace DNA *in vivo*. Na rozdíl od PCR však napodobuje tvorbu opožďujícího se řetězce (tzv. Okazakiho fragmentů).

LCR používá specifické oligonukleotidové komplementární sondy, vždy ve dvojici pro každý řetězec DNA. Vlastní reakce probíhá ve čtyřech fázích:

1. tepelná denaturace DNA
2. hybridizační annealing specifických sond, mezi nimiž zůstane krátký volný úsek
3. syntéza řetězce od 3' konce jedné k 5' konci druhé sondy DNA polymerázou I
4. spojení volných konců pomocí DNA lipázy.

## 16.4. Metody detekce mutací a polymorfizmů

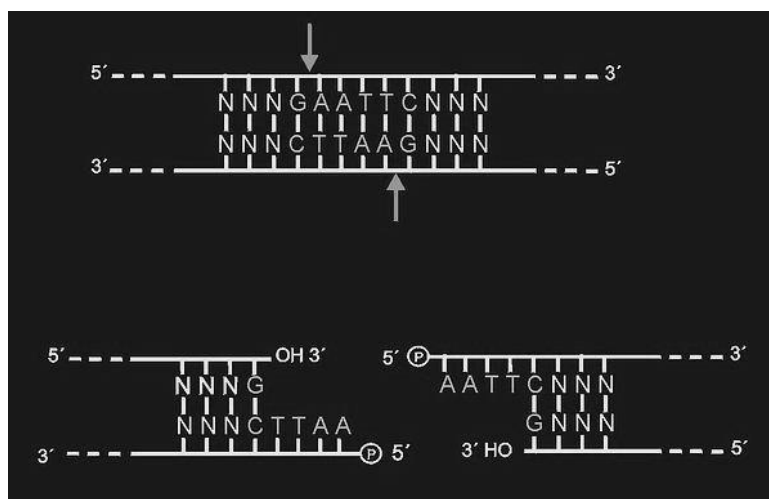
### 16.4.1. RFLP + ELFO

#### 16.4.1.1. Délkový polymorfismus restričních fragmentů (RFLP)

Restriční analýza DNA je metodou charakterizace nukleové kyseliny pomocí jejího štěpení na menší fragmenty. Využívají se k tomu bakteriální endonukleázy (restriktázy) – enzymy, které štěpí DNA v přesně definované sekvenci nukleotidů (většinou o velikosti 4-8 bp), např. enzym s názvem EcoRI (produkt bakterie *Escherichia coli*) rozštěpí každou DNA sekvenci „GAATTC“ mezi nukleotidy G a A. Pokud by byla v této sekvenci záměna třeba jen jediného nukleotidu, enzym ji už nerozpozná.

Nyní je známo asi 1500 druhů bakteriálních endonukleáz, které si bakterie tvoří na ochranu před infikujícími bakteriofágy (při napadení bakterie rozštěpí jejich DNA, jejich vlastní DNA je chráněna metylací). Počet i délka fragmentů štěpených určitým enzymem je pro DNA daného jedince specifická, proto můžeme na základě polymorfismu délky restričních fragmentů provádět odlišení DNA různých individuí. Kromě RFLP se pro DNA diagnostiku a studium příbuzenských vztahů (například při průkazu otcovství) hojně využívá polymorfismu repetitivních úseků DNA - VNTR (variabilní počet tandemových opakování).

RFLP metodou se dají vyhledávat či detekovat mutace v konkrétní sekvenci určitého enzymu. Pro rutinní diagnostiku mutací se však příliš nehodí a využívá se převážně ve výzkumu.



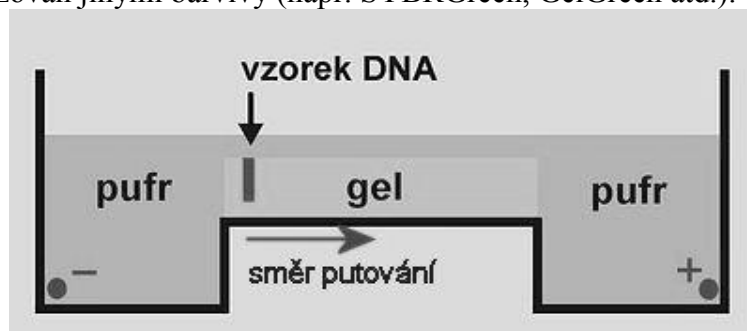
Obr.177 Štěpení DNA enzymem EcoRI

#### 16.4.1.2. Elektroforéza fragmentů DNA (ELFO)

Nepostradatelným nástrojem pro rozdělování makromolekul s různou velikostí a nábojem je gelová elektroforéza. Nukleové kyseliny mají téměř konstantní negativní náboj na jednotku hmotnosti, takže se dělí na gelech prakticky výhradně na základě své velikosti (nejkratší doputují nejdál). V elektrickém poli se díky zápornému náboji tedy pohybují od katody směrem k anodě. Elektroforetická analýza velikosti fragmentů DNA je nedílnou součástí řady molekulárně biologických metod (RFLP, SSCP, Southern blot atd.).

Horizontální elektroforéza se provádí v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu, který působí jako molekulární síto zpomalující průchod velkých molekul více než malých. Gel je ponořen do pufru (TE, TBE, TAE). Nanášení vzorku probíhá za použití vkládacích pufrů - roztoků o vysoké hustotě, které umožňují vkládání vzorků DNA do jednotlivých jamek. Manipulaci se vzorky pak umožňuje barvivo, např. bromfenolová modř, které má podobnou pohyblivost v gelu jako DNA. Vizualizace fragmentů DNA na gelu se děje přes UV

transluminátor pomocí ethidium bromidu, který je však pro svou potenciální kancerogenitu stále častěji nahrazován jinými barvivami (např. SYBRGreen, GelGreen atd.).



Obr.178 Elektroforéza DNA fragmentů

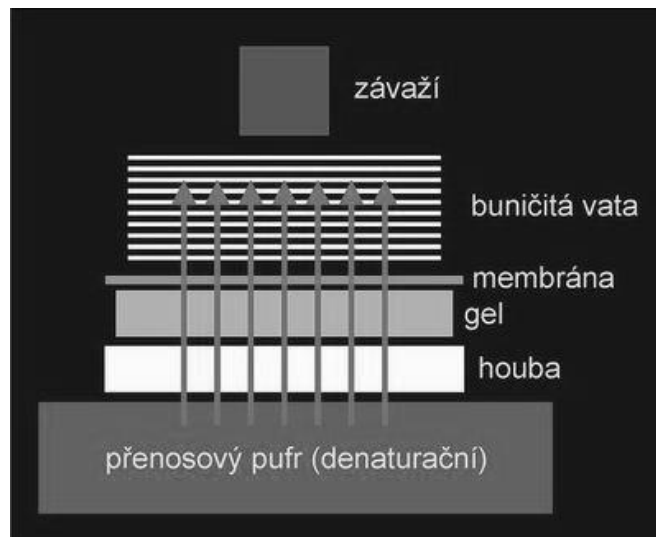
Na obr.178 je schematicky znázorněná elektroforetická vana pro agarózovou elektroforézu. Obecně jde o nádobu s vyvýšeným středem pro uložení gelu a dvěma komorami pro elektroforetický pufr po stranách. Gel je pod hladinou pufru. V nejbližším místě každé komory je vždy podélně uložena elektroda v podobě tenkého platinového drátku. Ten je propojen s vnějšími konektory, kterými se elektrody připojí ke zdroji napětí.

#### 16.4.2. Analýza DNA pomocí Southernova blottingu

V roce 1975 publikoval Edwin M. Southern nový pracovní postup, který umožňuje zjistit umístění genů a jiných sekvencí v restrikčních fragmentech DNA separovaných gelovou elektroforézou na nitrocelulóзовé nebo nylonové membráně. Tato technika nazvána podle autora "Southern blot" (později byly navrženy i analogické postupy pro přenos RNA, resp. proteinů a byly vtipně pojmenovány jako "Northern blot", resp. "Western blot").

Jde o jednoduchý postup používající kapilárního vztlínání tzv. přenosového pufru. Membrána je přiložena na horní plochu gelu, dolní plocha gelu je prostřednictvím houby nebo jiného savého materiálu spojena se zásobníkem přenosového pufru. Horní plocha membrány je poté pokryta větším množstvím savého materiálu (např. buničité vaty). Pro lepší kontakt všech vrstev je soustava přiměřeně zatížena závažím. Přenosový pufr vztlíná kapilární silou nahoru přes houbu, gel a membránu do buničité vaty. Přitom vymývá z gelu molekuly DNA a přenáší je na membránu. Ta je pro molekuly DNA nepropustná, takže zůstávají na spodní ploše membrány v přesně stejných polohách, v jakých se nacházely v gelu po roztřídění gelovou elektroforézou. Přenosový pufr obvykle obsahuje chemikálie, které narušují stabilitu vodíkových můstků v molekule DNA, takže dochází k její denaturaci. DNA je proto během přenosu denaturována (je jednovláknová) a připravená k hybridizaci se sondou.





Obr.179 Přenos podle Southerna (Southern blot)

### 16.4.3. SSCP (single strand conformation polymorphism, polymorfizmus konformace jednořetězcové DNA)

SSCP je rutinní metodou pro vyhledávání mutací. Je jednoduchou, velice senzitivní a efektivní technikou k detekci mutací typu záměny jedné báze.

Podstatou metody je elektroforéza jednovláknové DNA na polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě. Konformace jednovláknového fragmentu DNA je dána intramolekulárními interakcemi uvnitř DNA sekvence. Je závislá na teplotě a iontové síle. Již tak malý rozdíl jako je záměna jedné báze způsobí změnu konformace a rozdílnou pohyblivost při elektroforéze. Rychlost, jakou DNA putuje během elektroforézy, tedy závisí na její přesné konformaci.

Tato vysoce citlivá technika zachycuje 100% mutací v DNA fragmentech menších než 200 bází a 80% mutací v DNA fragmentech menších než 400 bází. Optimální velikost PCR produktu pro detekci mutací je 150 bází.

### 16.4.4. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Technika MLPA je relativně nová metoda molekulární cytogenetiky, poprvé publikovaná v roce 2002, která je vhodná pro vyhledávání chromozomálních aberací. Principem je hybridizace, tj. navázání oligonukleotidových sond na cílovou sekvenci DNA na základě jejich komplementarity. Každá sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů. Po hybridizaci na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny ligací. Pouze spojené sondy jsou po denuraci amplifikovány pomocí klasické PCR reakce za použití jednotného páru primerů. Namnožené sondy jsou rozděleny kapilární elektroforézou na základě jejich různé délky. Nakonec jsou analyzovány pomocí speciálního počítačového programu.

Metoda MLPA dokáže detekovat pouze početní změny struktury DNA, jako jsou delece či duplikace, neodhalí však balancované přestavby jako jsou translokace či inverze. K výhodám patří jednoduchost, rychlost a nenáročnost na množství DNA, k nevýhodám patří vysoká citlivost na kontaminaci. V praxi se používá např. v DNA diagnostice muskulární dystrofie.