

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

2009/2010

Obor 3 – Chemie

Personalizovaná medicína
nový směr v diagnostice *Asthma bronchiale*

Erika Gedeonová

Oktáva B

Sportovní gymnázium Kladno

Plzeňská, 3103, Kladno

Středočeský kraj

Místo vypracování:

ÚOT VŠCHT Praha

Vedoucí práce:

Ing. Kamila Syslová

Doc. Ing. Petr Kačer, PhD.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Ing. Petra Kačera, Ph.D. a Ing. Kamily Syslové a uvedla jsem veškerou použitou literaturu v seznamu literatury.

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala všem, kteří mi s vypracováním práce jakýmkoli způsobem pomohli.

Můj dík patří na prvním místě **Ing. Kamile Syslové** a **Doc. Ing. Petru Kačerovi, Ph.D.** za vedení práce a všestrannou pomoc při jejím zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat **prof. Ing. Liboru Červenému, DrSc.** za možnost pracovat v jeho kolektivu.

Nemohu opominout **RNDr. Marii Pokornou**, organizátorku školního kola.

Anotace

Personalizovaná medicína využívá k diagnostice nemocí a při monitorování průběhu terapie genomických a molekulárních analýz tělních tekutin (moč, kondenzát vydechaného vzduchu, plasma) a tkání. Pro její širší rozšíření do rutinní lékařské praxe je potřeba vyvinout vhodné analytické metody pro detekci a kvantifikaci specifických látek charakteristické pro konkrétní onemocnění – tzv. „biomarkery“.

Práce se zabývá přípravou a charakterizací imunomagnetických nanočástic, které slouží k separaci biomarkerů Asthma bronchiale – cysteinylovaných leukotrienů z kondenzátu vydechaného vzduchu před samotnou HPLC-MS analýzou. Druhá část experimentální činnosti se zabývala imobilizací protilátky na pórovité polymerní nosiče, jako mezikrok k přípravě diagnostického proužku, který by se měl stát vhodnou pomůckou pacientů pro orientační stanovení biomarkerů v moči a umožňoval by včasné rozpoznání patologických procesů odehrávajících se v organismu. Vyvinutá metoda kombinující imunamagnetickou separaci s hmotnostně spektrometrickou analýzou a imobilizované protilátky na polymerní nosič v podobě imunoafinitních čoček s hmotnostně spektrometrickou detekcí byly testovány na klinických vzorcích kondenzátu vydechaného vzduchu.

Obsah

1	Seznam zkratek.....	5
2	Úvod	6
3	Teoretická část	7
3.1	Asthma bronchiale	7
3.1.1	Vznik a vývoj astmatu	7
3.1.2	Diagnostika astmatu.....	10
3.2	Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV).....	11
3.2.1	Biomarkery <i>asthma bronchiale</i>	12
3.3	Stanovení biomarkerů v KVV	14
3.3.1	Separace biomarkerů z KVV (imunoseparace)	14
3.3.2	HPLC/MS analýza	16
3.4	Pracovní hypotéza	17
4	Metodika práce	18
4.1	Chemikálie a pomůcky.....	18
4.1.1	Magnetické částice	18
4.2	Příprava polymerních čoček	19
4.3	Příprava imunomagnetických částic.....	19
4.3.1	Zakotvení protilátky na tosyl-aktivované magnetické částice.....	19
4.3.2	Zakotvení protilátky na magnetické částice aktivované aminoskupinou.....	20
4.3.3	Zakotvení protilátky na magnetické částice funkcionalizované chitosanem	20
4.4	Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu	20
4.5	Stanovení α -amylasy v kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	20
4.6	Stanovení koncentrace biomarkerů v KVV.....	21
4.6.2	LC-ESI-MS/MS analýza	21
4.6.3	Validace metody	22
4.7	Klinická studie.....	22
5	Výsledky a diskuze	23
5.1	Stabilita leukotrienů	24
5.2	Odběr KVV	25
5.3	Stanovení kontaminace kondenzátu vydechovaného vzduchu slinami.....	25
5.4	Extrakce leukotrienů z KVV.....	26
5.4.1	Extrakce imunomagnetickými částicemi	26
5.4.2	Extrakce polymerními čočkami.....	28
5.5	HPLC/MS.....	29
5.6	Validace metody	30
5.7	Klinická studie.....	31
6	Závěr	33

1 Seznam zkratek

API	atmospheric pressure ionization
A_λ	absorbance při vlnové délce λ
b	tloušťka vrstvy (cm)
BSA	Albumin from bovine serum
c	látkové koncentrace (mol.l^{-1}).
CID	kolizně indukovaná disociace (collision Induced Dissociation)
Cys-LT receptory	receptory pro cysteinylované leukotrieny
cys LTs	cysteinylované leukotrieny
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	elektrosprejová ionizace (electrospray ionization)
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
HPLC-MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
IgG	imunoglobulín G
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LTA ₄	leukotrien A ₄
LTB ₄	leukotrien B ₄
LTB ₄ -d ₄	[6, 7, 14,15 ² H ₄] leukotrien B ₄
LTC ₄	leukotrien C ₄
LTC ₄ -d ₅	[19,19,20,20,20 ² H ₅] leukotrien C ₄
LTD ₄	leukotrien D ₄
LTE ₄	leukotrien E ₄
LTE ₄ -d ₃	[20,20,20 ² H ₃] leukotrien E ₄
SRM	Selective Reaction Monitoring
PBS pufr	phosphate buffered saline
RE	relativní chyba (relative error)
RIA	Radioimmunoassay
rpm	otáčky za minutu (rotation per minutes)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
R _t	retenční čas
Sulfo-NHS	Sodná sůl N-Hydroxysulfosukcinimidu
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
w	hmotnostní zlomek
ε	molární absorpční koeficient ($\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)
λ	vlnová délka (nm)

2 Úvod

Pro úspěšnou léčbu pacienta je nutná správná a včasná diagnóza nemoci. O úspěšnosti léčby rozhoduje několik faktorů: 1) včasný příchod pacienta k ošetřujícímu lékaři, 2) správné popsání symptomů pacientem a 3) rozpoznání klíčových příznaků lékařem. Většina vyšetření v současnosti se řídí podobným scénářem, který se jen trochu mění v závislosti na tom, jaké obtíže pacient uvádí. Následná terapie se volí na základě získaných údajů z epidemiologických studií. To znamená, že léčba pacienta probíhá podle zobecněných postupů a nepřihlíží se k individuálnímu stavu jedince a jeho specifickým vlastnostem (věk, pohlaví, výška, váha, strava, životní prostředí, ad.), což může u závažnějších průběhů onemocnění mít až fatální následky. Nedostatky těchto postupů při vyšetření a následné samotné terapii se snaží řešit tzv. personalizovaná medicína, která se neomezuje jen na hledání nových, rychlých a včasných postupů diagnóz s cílem zvolit nejvhodnější postup terapie, ale monitoruje i průběh samotné léčby, kterou upravuje podle specifické odpovědi organismu pacienta na danou terapii. Personalizovaná medicína využívá genomických a molekulárních analýz tělních tekutin a tkání. Pro její širší rozšíření do rutinní lékařské praxe je potřeba vytipovat specifické látky charakteristické pro konkrétní onemocnění – tzv. „biomarkery“ a vytvořit vhodnou standardizovanou analytickou metodu pro jejich detekci a kvantifikaci.

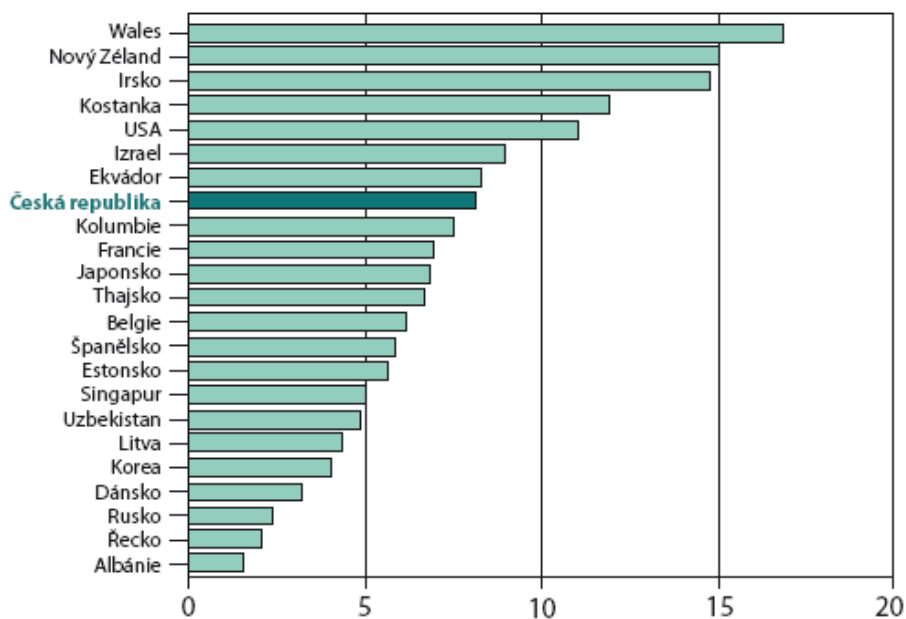
Výsledky získané analýzou krevní plazmě a moči jsou odrazem procesů odehrávajících se v rámci celého organismu a k lokalizaci patologického procesu se využívají jen v omezené míře, případně pouze jako doplněk dalších diagnostických metod. K vyšetření nemocí plic a dýchacích cest (např. diagnostika bronchiálního astmatu, azbestózy, silikózy ad.) se v běžné praxi používá celá řada diagnostických metod, které jsou v naprosté většině metodami invazivními (bronchiální biopsie, bronchoalveolární laváž), případně semi-invazivními (metoda indukovaného sputa), ty jsou pro pacienta zatěžující, u dětí a seniorů mohou být dokonce až stresovou záležitostí. Analýza kondenzátu vydechaného vzduchu je poměrně novou metodou, jež představuje alternativní cestu, kterou lze charakterizovat jako zcela neinvazivní a pro pacienta nezatěžující. Složení kondenzátu vydechaného vzduchu koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách, odkud se do něj dostává celá řada specifických látek, kterých bylo k dnešnímu dni identifikováno více jak dvě stě. V současné době se problematika využití kondenzátu vydechaného vzduchu jako zdroje biomarkerů plicních onemocnění nachází ve stavu, kdy byla popsána celá řada metodik stanovení biomarkerů, ovšem výsledky uvedených studií vykazují značný rozptyl, který je dán opomenutím důležitých specifických faktorů, které je nutné respektovat při zpracování a následné analýze této tělní tekutiny.

Předkládaná práce si kladla za cíl (1) postihnout a kvantifikovat parametry, které mohou být zdrojem v literatuře uváděných rozporuplných výsledků, a vypracovat protokol zpracování dechového kondenzátu a stanovení specifických biomarkerů *Asthma bronchiale* (cysteinylované leukotrieny) metodou kombinující imunomagnetickou separaci markerů s hmotnostně-spektrometrickou detekcí a (2) vytvořit diagnostický proužek, který by se měl stát vhodnou pomůckou pacientů pro orientační stanovení biomarkerů v moči. Koncentrace biomarkerů by se měla stanovit na základě barevné změny proužku, která by byla způsobena vytvořením vazby antigen a protilátka.

3 Teoretická část

3.1 Asthma bronchiale

Průduškové astma je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, které lidstvo pronásleduje již po tisíceletí. Nyní se však dostává do popředí pro svůj enormní nárůst. V České republice vzrostl za posledních deset let počet evidovaných astmatiků o 170% na současných 8% populace (820 000 obyvatel) a u dalších 300 000 obyvatel není ještě rozpoznáno. Každý třetí astmatik je dítě.(tj. 15% dětí do 15 let). Současně také klesá věk, kdy se astma objevuje, k prvnímu astmatickému záchvatu občas dochází už ve dvou letech života. Celosvětová prevalence astmatu se pohybuje v rozmezí 1 - 18% populace (obrázek 1.), odhaduje se, že astmatem trpí 300 milionů obyvatel naší planety. Zejména v ekonomicky vyspělých zemích je astma jednou z nejčastějších chronických nemocí. Důvody nárůstu tohoto onemocnění nejsou zatím zcela objasněny. Obviňuje se tzv. „západní“ styl života, zřejmě se uplatňuje i vliv narůstajícího znečištění ovzduší ve městech, styl bydlení, vyšší hygienické standardy, časté užívání antibiotik, výživové zvyklosti apod.



Obrázek 1: Procentuelní zastoupení astmatiků v populaci jednotlivých zemí; (GINA 2006)

Astma je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest. Jde o nemoc sice nevléčitelnou, ale dobře léčitelnou. Není-li ovšem astma adekvátně léčené, může vést až k remodelaci bronchiální stěny a nevratnému poškození plic.

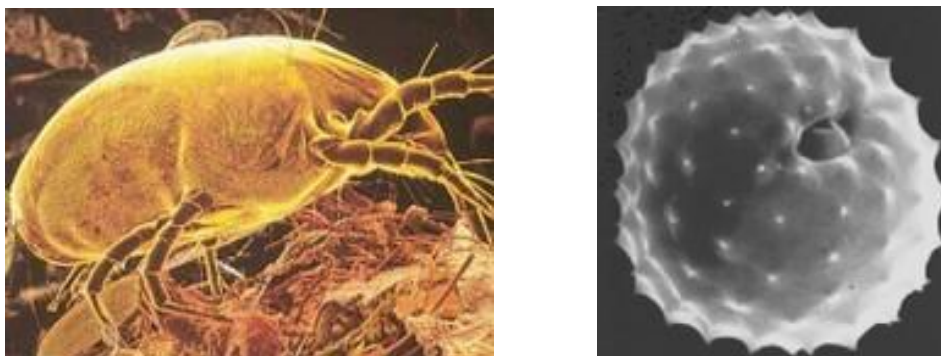
3.1.1 Vznik a vývoj astmatu

Astma může vzniknout nebo zmizet téměř v kterémkoli věku. Často začíná již v dětském věku a předchází mu delší dobu trvající nebo opakující se rýmy s kýčáním. Poté, co se stane rýma velmi intenzivní, přejdou obtíže na dolní cesty dýchací a dostavují se první astmatické záchvaty. Mezi jednotlivými záchvaty může uplynout i značně dlouhá doba.

Pokud se pacient adekvátně neléčí, po opakovaných infekcích dýchacích cest, dochází k postupnému zhoršování intenzity záchvatů a ke zkracování intervalů klidu mezi jednotlivými záchvaty. Na vývoj astmatu má bezprostřední vliv celá řada faktorů. Především jde o včasnou diagnózu choroby a správné specifické léčení spojené s kázní pacienta. V neposlední řadě pak svou roli hrají i sociální podmínky (úroveň bydlení, vliv rodiny a okolí...). Podle příčiny vzniku astmatu můžeme rozdělit onemocnění na tzv. atopické a neatopické astma.

3.1.1.1 Atopické (alergické) astma

U atopického astmatu zánět vzniká zpravidla jako neadekvátní reakce imunitního systému na látku, které pro organismus neznámají nebezpečí - tzv. alergeny (obrázek 2).



Obrázek 2: Příklady možných spouštěčů astmatického záchvatu – roztoč (vlevo), ambrózie (vpravo)

Jedná se tedy o chybnou imunitní odpověď a v důsledku toho o zvýšenou produkci histaminu buňkami imunitního systému. Hlavními spouštěči astmatu jsou roztoči a další mikroskopičtí živočichové, kteří se nalézají v domácím prachu (koberce, matrace...), pylová zrna trav, plevelů a stromů, srst domácích zvířat a další. V České republice rozlišujeme tři hlavní období pylových spouštěčů (tabulka 1.)

Tabulka 1 Nejdůležitější alergeny v určitém roční období

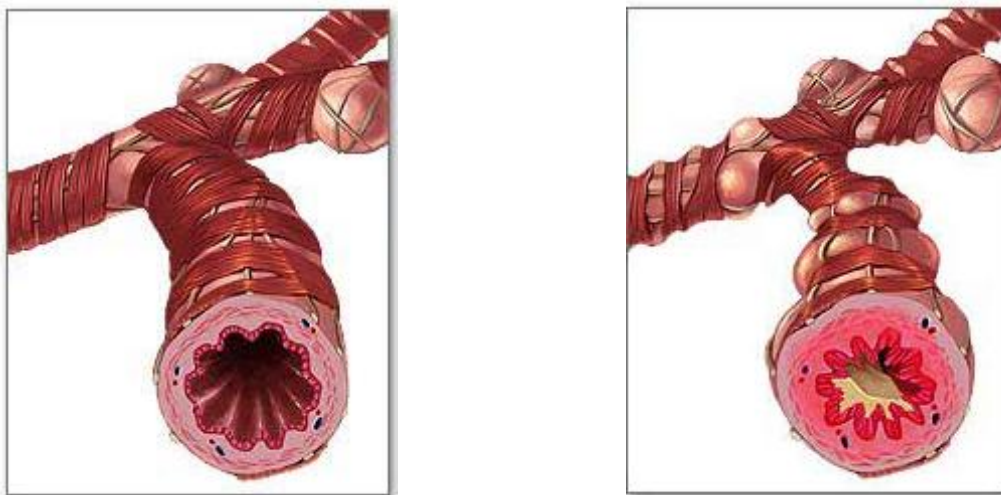
Období	Alergen
Jaro	Pyly břízovitých (bříza, olše, líska, habr...)
Léto	Pyly trav (srha, kostřava, lipnice...)
Podzim	Pyly plevelů (řepka olejka, jitrocel, ambrózie...)

3.1.1.2 Neatopické (nealergické) astma

Nealergické astma je způsobeno přetrvávající chronickou infekcí dýchacích cest zvýšenou fyzickou námahou (tzv. zátěžové astma), psychickými vlivy (psychogenní astma). Důvodem nealergického astmatu může být i gastroezofageální reflux, což je stav, při němž dochází k pronikání kyselé žaludeční šťávy do jícnu a následné dráždění sliznice jícnu může způsobit reflexní stah průdušek. Nealergické astma tedy není vyvoláno, na rozdíl od alergického, žádnou konkrétní látkou.

Klinický průběh astmatu je závislý na řadě podmínek, které jsou u pacientů dosti rozdílné (genetické predispozice, vliv prostředí, kouření, adekvátní léčba) U astmatu, kde jsou záchvaty vyvolány inhalovanými alergeny nebo alergeny přijatými potravou, je průběh obvykle mnohem příznivější, protože lze do určité míry zabránit styku pacienta s alergenem. Když je ovšem astma pouze infekčního původu, je průběh podstatně horší. U těchto pacientů dochází k záchvatům mnohem častěji, probíhají obvykle delší dobu a snadno recidivují. Tato skupina pacientů, kde má infekce hlavní úlohu, je také mnohem náchylnější na různé nespecifické podněty jako změny počasí, zápachy, kouř, chlad, větší fyzickou námahu a podobně. Průběh onemocnění je ovšem ovlivňován ještě dalšími faktory - věk pacienta, prostředí a infekce. Mírné infekce (nachlazení) astma většinou zhoršují, naopak prudké infekce (s vysokými teplotami) často působí výrazné zlepšení [1]. Průběh je rovněž ovlivňován kvalitou funkce beta-adrenergických receptorů, které mají na svědomí zvýšenou svalovou glykogenolýzu, zrychlení srdeční frekvence a kontrakce hladké svaloviny.

Při bronchiálním astmatu dochází k recidivujícím epizodám dušnosti, suchým chropům (pískotům až vrzotům – často slyšitelným při dýchání), kašli a nadměrné produkci hlenu. Při akutním záchvatu dochází v důsledku přítomnosti spouštěcích faktorů ke konstrikci průdušek a edému sliznice, ztěžujících výdech, a ke zvýšené produkci viskózního hlenu (*obrázek 3*). Dýchání se stává stále namáhavějším, zvyšuje se tlak uvnitř hrudníku a vážne žilní návrat. Tyto změny mohou vést v extrému až k srdeční nestabilitě a selhání respirace. V důsledku hypoxie¹ může dojít i k poruše vědomí.



Obrázek 3: Porovnání průdušek fyziologického stavu (vlevo) a průdušek při astmatickém záchvatu (vpravo)

Astmatické záchvaty mohou mít různou intenzitu (*tabulka 2*). Můžeme je tedy rozdělit na mírné, které vznikají často spontánně a pacient téměř nepozoruje, střední, které už spontánně nepřicházejí, a prudké, které mohou trvat až několik hodin a pacient je obvykle nedokáže zvládnout sám.

¹ Nedostatečné okysličení mozkové tkáně

Tabulka 2 **Intenzita záchvatů**

Intenzita záchvatu	Příznaky
Mírný záchvat	Malá dušnost s mírně prohloubeným a zpomaleným dýcháním a kašlem
Středně silný záchvat	Pomalý začátek, kašel i bronchiální fenomény zřetelnější
Silný záchvat	Typický pískot, velké množství hlenu, kašel a pocení; může trvat až několik hodin

3.1.2 Diagnostika astmatu

Pro účinnou léčbu, která zajistí minimalizaci poškození organismu pacienta je nutná včasná a správná diagnostika. Pro stanovení diagnostiky se dnes používá řada různých metod.

Nejdříve se provádí spirometrické měření ventilační funkce plic (*obrázek 4*). Vyšetření se provádí v klidu i při zátěži, případně po inhalaci různých látek nebo léků. Tímto vyšetřením zajistíme průchodnost dýchacích cest a jejich reakci na inhalaci alergenů nebo fyzickou zátěž. Typickým nálezem pro astma je snížení výdechových rychlostí, snížení plicní kapacity a zvýšení objemu vzduchu v plicích, který tam zůstane po maximálním výdechu.



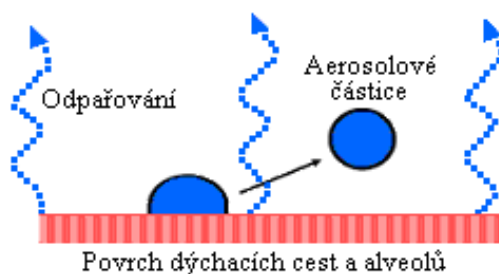
Obrázek 4: **Spirometrické vyšetření ventilace plic; provádí se na specializovaných pracovištích za dozoru odborníka**

Pokud spirometrické vyšetření přináší normální výsledky, následuje obvykle bronchoprovokační test nespecifickým podnětem (podáním látek histaminu nebo acetylcholinu). Bronchoprovokační test organismus pacienta zatěžuje a může vést až k astmatickému záchvatu. Z toho důvodu jsou proti tomuto vyšetření často vznášeny etické námitky s tím, že lékař by měl člověku obtíže léčit a ne je vyvolávat, a to ani v zájmu stanovení diagnózy. K dalším diagnostickým vyšetřením astmatu se používá celá řada invazivních (bronchiální biopsie, bronchoalveolární laváž), případně *semi*-invazivních metod (metoda indukovaného sputa), kterou jsou pro pacienta zatěžující, u dětí a seniorů mohou být až stresovou záležitostí. Proto se v současné době hledají alternativní neinvazivní cesty diagnostických metod založené na kvantifikaci specifických látek (tzv. biomarkerů) pro dané onemocnění obsažených v tělních tekutinách (plasma, moč, kondenzát vydechaného vzduchu).

3.2 Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV)

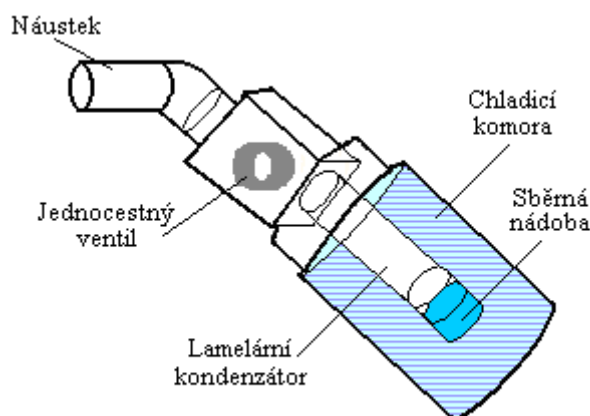
Kondenzát vydechovaného vzduchu je kapalná matrice, která vznikne zkondenzováním vydechovaného vzduchu. Tato tělní tekutina odráží složení bronchoalveolární extracelulární plicní tekutiny, jež koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách. [2]

Látky obsažené ve vydechovaném vzduchu se nacházejí ve dvou fázích – v plynné a v kapalně (ve formě aerosolů) [3], (obrázek 5). V plynné fázi jsou vedle dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého přítomny látky s dostatečnou tenzí par při tělesné teplotě a atmosférickém tlaku - voda, peroxid vodíku, uhlovodíky a řada dalších organických látek. V plynné frakci se nachází i ve vodě nerozpustné biomolekuly, které na epitelu plic a dýchacích cest spolu s vodou vytvářejí binární systém. Tenze par biomolekul a vody se v tomto případě sčítají, a tím se odpaří i látky, které jsou za normálních podmínek málo těkavé. Příkladem látek obohacujících KVV touto cestou jsou leukotrieny a prostanoidy. Molekuly málo těkavých látek rozpustných ve vodě (vazoaktivní peptidy, enzymy, DNA, proteiny a soli) se do KVV dostávají jako aerosolové částice, které jsou strhávány z povrchu sliznice turbulentním prouděním vzduchu v bronších a bronchiolech.



Obrázek 5: Schéma obohacení vydechovaného vzduchu látkami z organismu
Z povrchu plicních sklípků a dýchacích cest se odpařují těkavé látky (plynná fáze) a strhávají malé kapičky, které unášejí proud vydechovaného vzduchu (kapalná fáze – aerosolové kapičky)

Na specializovaných klinických pracovištích se získává KVV pomocí kondenzátoru vydechovaného vzduchu (obrázek 6), který zkapalní aerosolové částice a některé látky z plynné fáze. Hlavní částmi kondenzátoru vydechovaného vzduchu jsou náustek, lapač slin, jednocestný ventil, sběrná nádoba a chladicí aparatura. Úkolem lapače slin je zamezení kontaminace slinami, neboť v nich byly stanoveny vysoké koncentrace biomarkerů přítomných v KVV [4]. Možná kontaminace slinami se zjišťuje po odebrání KVV stanovením aktivity slinné α -amylasy. Jednocestný ventil slouží k oddělení vdechovaného a vydechovaného vzduchu, čímž se eliminuje možné znečištění kondenzovaného vzduchu částicemi z vnějšího prostředí. Chladicí systém může podle typu použitého chladicího média umožnit odběr při teplotách až -20°C . Tato nízká teplota je důležitá pro kvantitativní uchování tepelně labilních látek, jakými jsou prostaglandiny, leukotrieny, aldehydy ad. Během odběru, který trvá obvykle 15 – 20 minut, lze získat 2 – 3 ml KVV. Aby se zamezilo vydechování nosem, je pacientovi nasazen nosní klips.



Obrázek 6: Schéma kondenzátoru vydechaného vzduchu

V KVV byly detekovány biomarkery, které se vyskytují ve zvýšené koncentraci při patologických procesech, odehrávajících se v plicích. Jejich zvýšená hladina může signalizovat plicní onemocnění (např. *asthma bronchiale*, oxidativní stres, rakovinu plic, cystickou fibrózu a další). Včasná diagnostika uvedených onemocnění hraje důležitou roli z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta.

Výhodou KVV je, že odráží procesy odehrávající se výlučně v plicích, případně dýchacích cestách, a nikoliv v celém těle, jak je tomu v případě jiných tělních tekutin (v moči, krevní plazmě).

3.2.1 Biomarkery *asthma bronchiale*

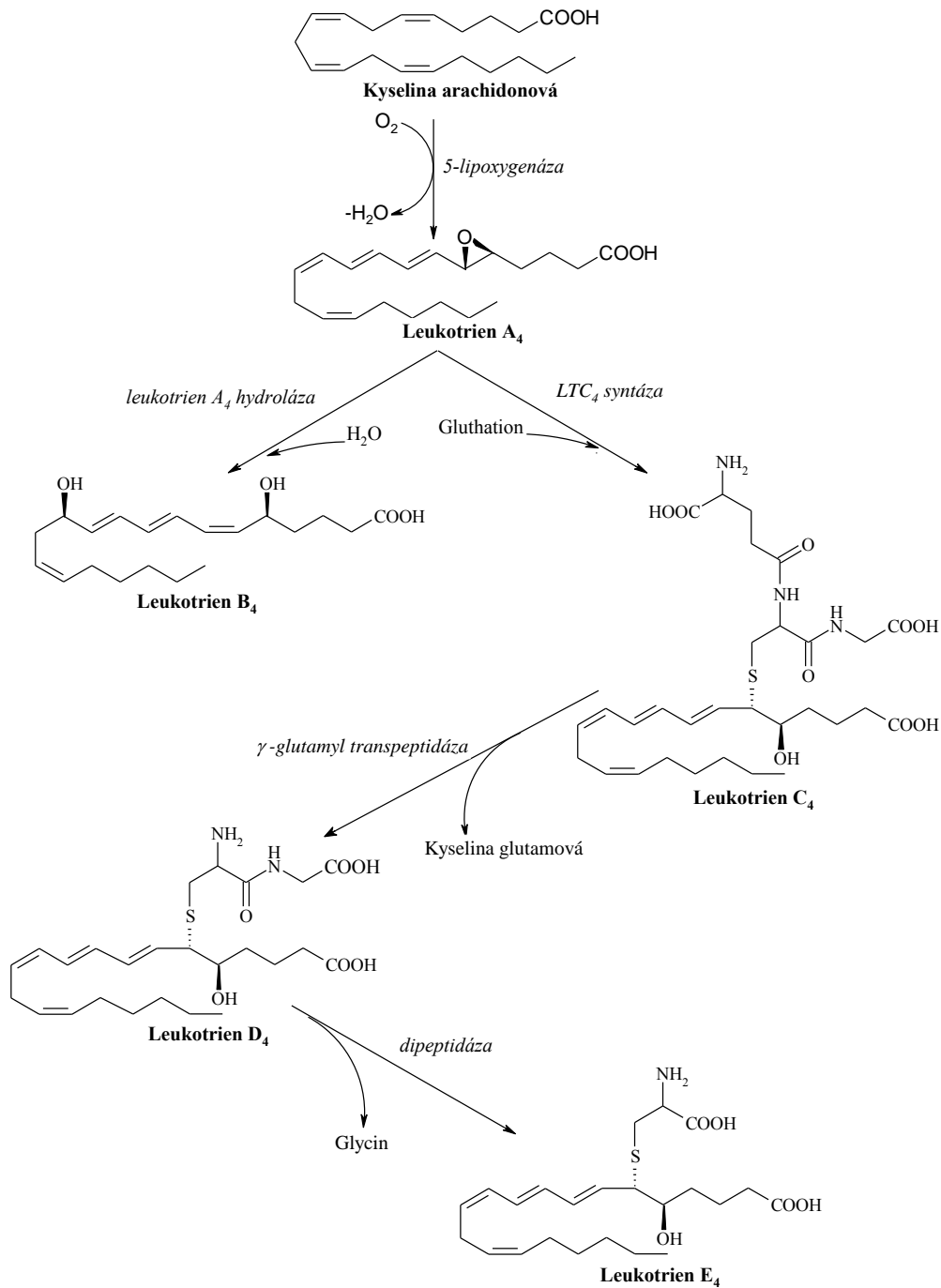
Nejdůležitější biomarkery pro *asthma bronchiale* jsou především metabolity kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je dvacetihlíkatá vícesytná mastná kyselina, která je vázaná v membránových fosfolipidech. V organismu podléhá tato kyselina enzymaticky katalyzovaným přeměnám za vzniku leukotrienů (enzymem 5-lipoxygenáza), prostaglandinů (působením cyklooxygenázy) nebo isoprostanů (působením volných radikálů). Všechny tyto látky se při velice nízkých koncentracích vyznačují vysokou fyziologickou aktivitou zejména v oblasti zánětlivých a alergických procesů, horečky, pocitů bolesti, dále jsou schopny ovlivnit krevní tlak a srážlivost krve, konstrikci bronchů a bronchiol a uplatňují se i v období těhotenství a porodu. Jejich účinky na organismus jsou pouze lokální, a to v místě svého vzniku, a před distribucí do krevního řečiště jsou inaktivovány. Pro astma však mají největší význam leukotrieny.

Leukotrieny jsou dvacetihlíkaté látky, které jsou produkovány především bílými krvinkami. Jsou to látky, uvolňované při zánětlivých procesech a alergických reakcích. Významně se uplatňují v patogenezi bronchiálního astmatu.

Při jejich vzniku z kyseliny arachidonové nejprve vzniká působením 5-lipoxygenázy nestabilní LTA_4 , který se může dále přeměňovat podle jedné ze dvou metabolických drah (obrázek 7). Při zánětlivých onemocněních vzniká působením LTA_4 hydrolázy LTB_4 , v průběhu alergických reakcí pak naproti tomu je působením enzymu LTC_4 syntázy syntetizován první člen tzv. cysteinylovaných leukotrienů (cys LTs). Mezi cysteinylované leukotrieny dále řadíme ještě LTD_4 a LTE_4 . Cys LTs se postupně přeměňují v řadě $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$ působením enzymů γ -glutamyl transpeptidázy ($LTC_4 \rightarrow LTD_4$) a dipeptidázy ($LTD_4 \rightarrow LTE_4$) [5].

Cys LTs interagují s Cys-LT receptory, které se nacházejí především na buňkách hladkých svalů, na eozinofilech a v dalších buňkách v celém organismu. Navázáním cysteinylovaných

leukotrienů na Cys-LT receptory nacházející se v plicích a dýchacích cestách dochází ke konstrikcí bronchů a bronchiol, k překrvení a následnému edému sliznic a ke zvýšené sekreci vazkého hlenu, čímž dochází k zúžení průsvitu dýchacích cest a k opakovaným epizodickým stavům výdechové dušnosti [6]. Leukotrieny jsou fyziologicky velmi aktivní i při velmi nízkých koncentracích (10^{-10} mol/l).



Obrázek 7: Syntéza leukotrienů z kyseliny arachidonové

3.3 Stanovení biomarkerů v KVV

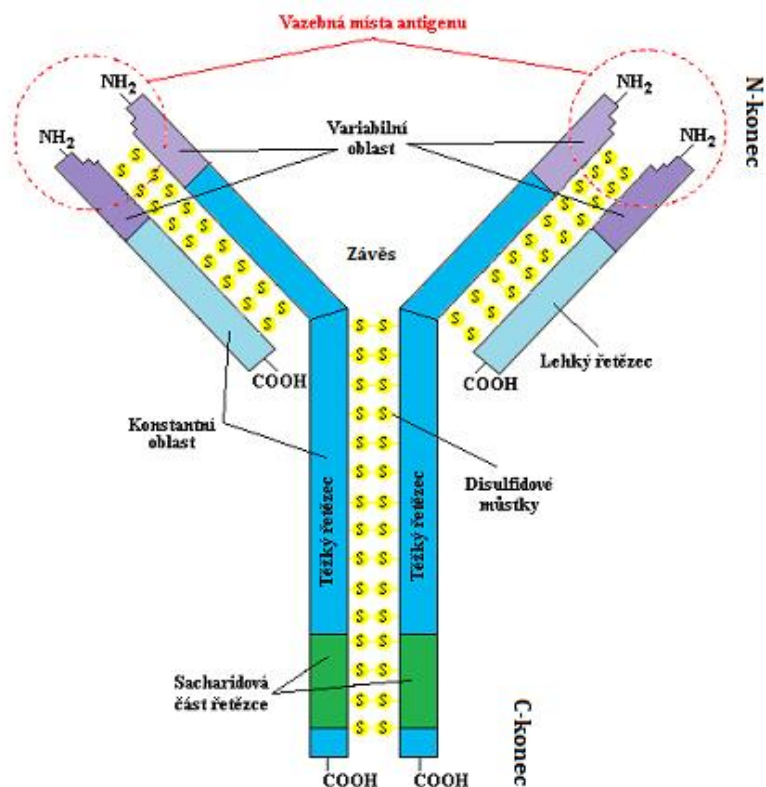
Bylo popsáno stanovení biomarkerů v různých tělních tekutinách (krevní plazma, moč, mozkomíšni mok a KVV) s využitím rozdílných analytických metod jako je RIA (Radioimmunoassay) [7], EIA (Enzyme Immunoassay) [8], ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [9], případně GC-MS [10] nebo LC-MS [11]. Biochemickými metodami lze stanovit řádově nižší koncentrace látek, než jakých je dnes dosahováno použitím hmotnostně-spektrometrických metod (GC-MS, LC-MS), ovšem meze detekce těchto instrumentálních metod se v průběhu posledního desetiletí dostaly na úroveň piko-, femto-, případně attomolů, což je plně postačující pro detekci většiny biologicky aktivních látek vyskytujících se v lidském organismu. Spojení kapalinové (respektive plynové) chromatografie s hmotnostním spektrometrem poskytuje oproti biochemickým metodám nejenom kvantitativní informaci, ale také informaci kvalitativní (strukturní). Tím jsou vyloučeny falešně pozitivní či negativní výsledky, které se v důsledku tzv. "zkřížených reakcí" vyskytují u imunochemických nebo enzymatických metod, jako je EIA, ELISA a další.

Stanovení hladin biomarkerů s využitím LC-MS detekce se skládá ze tří kroků. Nejdříve se provede odběr tělní tekutiny (KVV), v dalším kroku se provede separace sledovaných biomarkerů z matrice. To se provádí jednak z důvodu zkoncentrování, z důvodu eliminace rušivého efektu ostatních biomolekul, vyskytujících se v matrici a v neposlední řadě z důvodu kompatibility rozpouštědla s mobilní fází LC. Ve třetím kroku se provádí samotná analýza.

3.3.1 Separace biomarkerů z KVV (imunoseparace)

Imunoseparace je metoda založená na imunitní odpovědi organismu na antigen. Antigen je pro organismus strukturně cizí látka vyvolávající tvorbu příslušné specifické protilátky, která je schopna vychytávat daný antigen za vzniku komplexu antigen-protilátka. Z toho je patrné, že reakce mezi antigenem a protilátkou lze charakterizovat jako vysoce specifické.

Protilátky jsou globulární bílkoviny mající rozpoznávací protilátkovou aktivitu, tj. schopnost specificky se vázat na antigen. Základní molekulová jednotka protilátky (imunoglobulin - Ig) má tvar písmene "Y" a skládá se ze dvou identických lehkých řetězců a dvou těžkých řetězců (*obrázek 7*). Řetězce jsou k sobě navzájem připojeny pomocí disulfidických můstků. Na každé molekule Ig můžeme označit N-konec, který je zakončen – NH₂ skupinou a nachází se „v raménkách“, a C-konec, který končí – COOH skupinou a nachází se „v nožičce“. Každý řetězec můžeme rozdělit na dvě funkční oblasti. Část řetězců směrem k N-konci se nazývá variabilní oblast a úsek řetězce směrem k C-konci je oblast konstantní. Variabilní oblast je heterogenní a má jedinečnou strukturu ramen, do kterých pak antigen zapadá jako klíč do zámku. Konstantní oblast (nožička) je tvořena krystalizujícím fragmentem, kde jsou přítomny sacharidy. Přechod "ramének" v "nožičku" se nazývá závěs. V tomto místě je molekula velmi pohyblivá a raménka se zde mohou otevírat nebo zavírat v závislosti na velikosti antigenu [12].

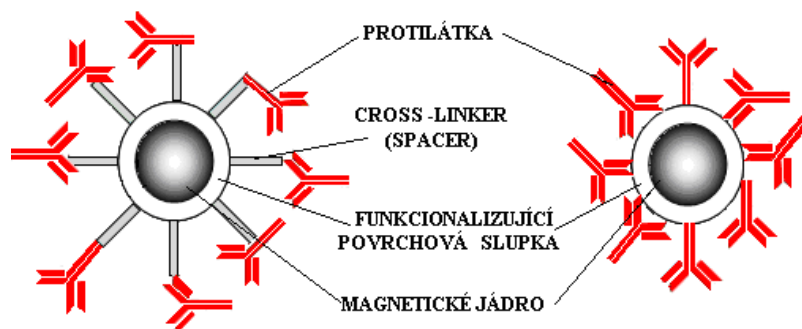


Obrázek 8: Schéma struktury imunoglobulinu

Pokud je tedy k dispozici specifická protilátka, může být provedena extrakce sledovaného antigenu z biologického vzorku kvantitativně. Pro separaci vytvořeného komplexu antigen - protilátka z biologických matric musí být protilátka zakotvena na nosiči (polymerní látky – např. sacharidy, polyvinylalkohol, polypyrrolidon, ad., nebo magnetické nanočástice), který umožní bezproblémovou separaci z tělních tekutin.

3.3.1.1 Separace imunomagnetickými nanočásticemi

Nanočástice jsou takové částice jejichž alespoň jeden rozměr je menší než 100 nm. Základem každé imunomagnetické částice je magnetické jádro tvořené maghemitem ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a magnetitem (Fe_3O_4) nebo kobaltem. Jádro obaluje slupka, která jádro stabilizuje a chrání. Na povrch slupky může být vázána ještě další molekula, tzv. cross-linker, který umožňuje spojení magnetické částice s protilátkou (obrázek 9).



Obrázek 9: Schéma magnetické částice se zakotvením protilátek pomocí cross-linkerů (vlevo) a bez nich přímo na funkcionalizovanou slupku (vpravo)

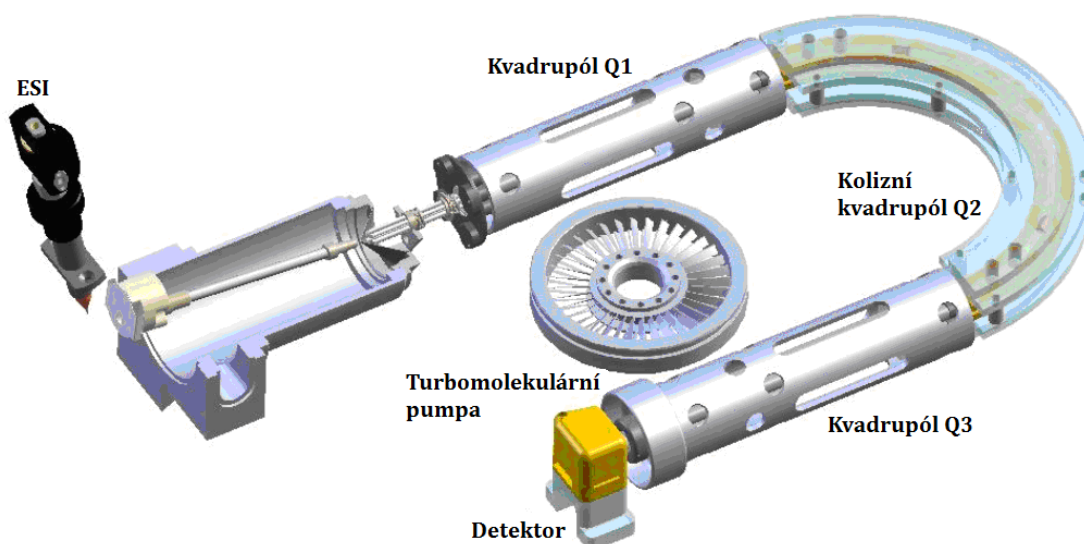
Zakotvení (imobilizace) protilátek může proběhnout třemi způsoby – fyzikální adsorpcí a kovalentním navázáním s orientací nebo bez orientace protilátky. Fyzikální adsorpci zprostředkovávají slabé vazebné interakce jako van der Waalovy síly nebo vodíkové můstky, její nevýhodou je možnost vymývání protilátky z povrchu nosiče. Kovalentní zakotvení je uskutečňováno pevnou kovalentní vazbou, orientované navázání protilátky se pak oproti neorientovanému vyznačuje vyšší vazebnou kapacitou k antigenu [13].

3.3.2 HPLC/MS analýza

Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru umožňuje dnes bezproblémovou separaci a paralelní detekci velmi nízkých koncentrací analytů a to i ve značně komplexních matricích. Díky tomu a díky vysoce specifické strukturní informaci, kterou podává, se LC-MS stává metodou první volby v analýze látek v biologických matricích.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) se používá především pro analýzu málo těžkých a tepelně labilních látek. Vysoké selektivity separace se dosahuje vhodnou volbou chromatografických fázových systémů. Nejčastěji se využívá kapalinová chromatografie s reverzními fázemi, kde stacionární fáze kolony je tvořena silikagelem, který může být modifikován nepolárními oktadecylovými skupinami, a mobilní fází nejčastěji ze směsi polárních rozpouštědel - voda, metanol a acetonitril s přísávkem pufrů.

Pro využití hmotnostně-spektrometrické detekce se analyzované látky musejí převést do plynné fáze a iontového stavu. Díky technikám umožňujících ionizaci za atmosférického tlaku (atmospheric pressure ionization - API) je možné provést tento převod i u tepelně labilních látek. Mezi nejvyužívanější API techniky patří ionizace elektrospřejem (ESI – elektropray ionization). ESI se řadí mezi měkké ionizační techniky, které se vyznačují zachováním molekulového píku při minimálním počtu vzniklých fragmentů molekuly. Kombinace ESI ionizace s vhodným analyzátozem (jednoduchý nebo trojitý kvadrupól, iontová past) je vhodnou detekční technikou pro kvantitativní stanovení látek. Trojitý kvadrupól a iontová past vedle kvantitativní informace přináší při práci v MS^n módu (pro trojitý kvadrupól maximálně MS^2 častěji označován MS/MS) i kvalitativní informaci o sledované molekule. Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem (*obrázek 10*) využívá vysoce selektivní SRM (selective reaction monitoring) mód, kde na prvním kvadrupólu Q_1 se izoluje quasi-molekulární ion (deprotonovaný molekulární ion $[MH]^-$ pro negativní ionizaci a pro pozitivní ionizaci protonovaný ion $[MH]^+$) příslušné molekuly, který je použit jako prekursor (rodičovský ion) pro následnou kolizně-indukovanou disociaci (CID). V kolizní cele kvadrupólů Q_2 dochází k selektivnímu rozpadu molekuly v jejích nejslabších místech za vzniku dceřiného spektra, specifického pro danou molekulu, ze kterého se na třetím kvadrupólu Q_3 izoluje specifický dceřiný ion s nejvyšší četností [13].



Obrázek 10: Schéma hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupólem

3.4 Pracovní hypotéza

Cílem předkládané práce je zakotvení monoklonální protilátky (imunoglobulinu G proti cys LTs) na polymerní nosič – polyvinylalkohol a magnetické nanočástice. Připravené polymerní čočky (mezikrok k přípravě diagnostického proužku) a imunomagnetické částice budou následně použity jako rychlé, citlivé a vysoce specifické metody separace biomarkerů z kondenzátu vydechaného vzduchu, který je matricí umožňující neinvazivní diagnostiku *Asthma bronchiale*.

Práce bude zaměřena na přípravu polymerní čočky a imunomagnetické částice a optimalizaci nejdůležitějších parametrů přípravy s ohledem na aplikovatelnost separačních metod pro izolaci vybraných biomarkerů ve výše uvedené matrici. Součástí práce bude také diagnostické testování na experimentálních a klinických vzorcích.

4 Metodika práce

4.1 Chemikálie a pomůcky

Název	čistota	výrobce
Leukotrien C ₄	≥ 97 %	Cayman Chemical, USA
Leukotrien D ₄	≥ 97 %	Cayman Chemical, USA
Leukotrien E ₄	≥ 97 %	Cayman Chemical, USA
[19,19,20,20,20 ² H ₅] Leukotrien C ₄ (LTC ₄ -d ₅)	≥ 97 %	Cayman Chemical, USA
[20,20,20 ² H ₃] Leukotrien E ₄ (LTE ₄ -d ₃)	≥ 99 %	Biomol, Německo
Cysteiny Leukotriene Affinity Sorbent		Cayman Chemical, USA
Protilátky proti leukotrienu C ₄ , D ₄ a E ₄ – monoklonální krysí IgG ₁		Velká Británie
Argon	5,0	SAID, Česká republika
Vzduch	technický	SAID, Česká republika
Dusík	technický	SAID, Česká republika
Methanol	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Acetonitril	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Voda	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Ethanol	HPLC	Merc, Německo
Amoniak	28 %-ní roztok	Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát	≥ 99,5 %	Riedel de Haën, Německo
Dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát	≥ 99 %	Fluka, Švýcarsko
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	99,9 %	Aldrich, USA
EDC	≥99 %	Fluka, Švýcarsko
Sodná sůl N-Hydroxysulfosukcinimidu	≥98,5 %	Fluka, Švýcarsko
Hydroxylamin hydrochlorid	99 %	Aldrich, USA
Glutaraldehyd	50 %-ní roztok	Aldrich, USA
Albumin from bovine serum (BSA)	frakce V	Sigma, USA
Glycin	99 %	Aldrich, USA
Azid sodný	99,9 %	Aldrich, USA
Škrob	Zulkowsky	Merk, Německo
3,5-Dinitrosalicylová kyselina	≥98 %	Fluka, Švýcarsko

4.1.1 Magnetické částice

4.1.1.1 Tosyl-aktivované magnetické částice

Jde o superparamagnetické (magnetické jádro tvořeno Fe₃O₄), polystyrenové částice pokryté polyuretanovou vrstvou aktivovanou reakcí s p-toluensulfonylchloridem přítomné v suspenzi o koncentraci 2 x 10⁹ částic/ml (cca 30 mg/ml) v 10 mM fosfátovém pufru (pH 7,4) s 0,1% (w) BSA

a 0,02% (w) azidem sodným. Jejich průměr se pohybuje v rozmezí $2,8 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$, plocha povrchu částic je $4\text{--}8 \text{ m}^2/\text{g}$, koncentrace aktivních skupin $50\text{--}70 \mu\text{mol}/\text{g}$ a hustota $1,3 \text{ g}/\text{cm}^3$.

4.1.1.2 Magnetické částice s aktivovanou aminoskupinou

Jsou to superparamagnetické (magnetické jádro tvořeno Co) částice pokryté uhlíkovou vrstvou aktivovanou p-anilinem obsažené v suspenzi o koncentraci $30 \text{ mg}/\text{ml}$ v 10 mM fosfátovém pufru (pH 7,4) s $0,05 \%$ (w) Tweenem 20. Průměr částic je menší než 50 nm , koncentrace aktivních skupin větší než $0,1 \text{ mmol}/\text{g}$.

4.1.1.3 Magnetické částice s chitosanem

Magnetické částice s jádrem z $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ pokryté aktivovanou vrstvou chitosanu. Částice mají průměr menší než 50 nm .

4.2 Příprava polymerních čoček

Pro přípravu polymerního roztoku bylo použito $0,81 \text{ g}$ polyetylenglykolu (PEG) a $1,35 \text{ g}$ polyvinylalkoholu (PVA), které byly rozpuštěny v 11 ml vody. Celá směs byla za stálého míchání zahřívána na teplotu $95\text{--}98^\circ\text{C}$ do vyčeření roztoku. Po ochlazení roztoku na teplotu 35°C byly do směsi přidány protilátky.

Vzniklá suspenze byla v drobných kapičkách nanášena na Petriho misku. Ze získaných kapiček o průměru přibližně $1,5\text{--}2 \text{ mm}$ byla odpařena voda. Zpolymerizované čočky byly z důvodu jejich rebobtnání ponořeny do $0,1 \text{ M}$ roztoku NaH_2PO_4 . Připravené čočky byly skladovány v roztoku NaH_2PO_4 při teplotě 4°C .

4.3 Příprava imunomagnetických částic

K imobilizaci protilátky na magnetické částice a následné separaci antigenu byly použity pufrы:

Pufr A: $0,1 \text{ M}$ fosfátový pufr o pH 7,4 byl připraven rozpuštěním $2,62 \text{ g}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ a $14,42 \text{ g}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ v deionizované vodě o celkovém objemu 1000 ml .

Pufr B: PBS pufr (phosphate buffered saline) o pH 7,4 s $0,1 \%$ BSA vznikl z $0,88 \text{ g}$ NaCl a 1 g BSA rozpuštěných v $0,01 \text{ M}$ fosfátovém pufru o pH 7,4. Celkový získaný objem pufru B činil po doředení 100 ml .

Pufr C: $0,2 \text{ M}$ TRIS o pH 8,5 s $0,1\%$ BSA - $2,42 \text{ g}$ TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml deionizované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí 1 M kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 8,5 a roztok byl naředěn deionizovanou vodou na objem 100 ml .

Pufr D: PBS pufr o pH 7,4 s $0,5 \%$ BSA - $0,88 \text{ g}$ NaCl a 5 g BSA bylo přidáno do 50 ml $0,01 \text{ M}$ fosfátového pufru o pH 7,4. Vzniklý roztok byl naředěn na objem 100 ml $0,01 \text{ M}$ fosfátovým pufrem.

4.3.1 Zakotvení protilátky na tosyl-aktivované magnetické částice

Zásobní roztok magnetických částic byl zvortexován a ze vzniklé suspenze byl odpipetován objem $30 \mu\text{l}$, který byl dán do 2 ml polypropylenové zkumavky umístěné na magnetickém stojánku. Po čtyřech minutách byl odebrán supernatant a magnetické částice byly mimo dosah magnetického

pole promyty v 200 μ l pufru A. Po opětovném umístění do magnetického stojánu byl supernatant odpipetován a promyté částice byly použity ke kotvení protilátky.

K promytým částicím bylo přidáno 50 μ l protilátky (c = 0,2 mg/ml, obsažené v PBS pufru (pH 7,4) s 15 mM azidem sodným a 0,2 % BSA) a směs byla promíchána. Suspenze byla inkubována a míchána 24 hodin při teplotě 37 °C. Vzniklé imunomagnetické částice byly promyty 2 x 200 μ l pufru B (mícháno 5 minut při teplotě 4°C; separace v magnetickém poli), 1 x 200 μ l pufru C (mícháno 4 hodiny při teplotě 37 °C) a 1 x 200 μ l pufru B (mícháno 5 minut při teplotě 4 °C). Připravené imunomagnetické částice byly skladovány v pufru B s 0,02% azidem sodným při teplotě 4 °C.

4.3.2 Zakotvení protilátky na magnetické částice aktivované aminoskupinou

30 μ l suspenze magnetických částic bylo dáno do skleněného insertu umístěného v magnetickém poli. Po odstranění supernatantu a promytím 200 μ l pufru A bylo k magnetickým částicím přidáno 50 μ l protilátky. Směs byla protřepána a k suspenzi bylo přidáno 100 μ l roztoku EDC/sulfo-NHS (10 mg EDC a 15 mg sulfo-NHS bylo rozpuštěno v 1 ml studené deionizované vody). Směs byla třepána (480 rpm) 2 hodiny při laboratorní teplotě. Pro ukončení probíhající reakce bylo do směsi přidáno 50 μ l 10 mM roztoku hydroxylaminu a směs byla dalších 15 minut třepána za laboratorní teploty. Magnetické částice byly z reakční směsi separovány a promyty 4 x 200 μ l pufru D (třepáno 10 minut při laboratorní teplotě a separováno v magnetickém poli) a následně skladovány v pufru A s 0,02 %-ním azidem sodným při teplotě 4 °C.

4.3.3 Zakotvení protilátky na magnetické částice funkcionalizované chitosanem

K 1 mg částic promytých pufrům A byl přidán 1ml 5 (w) %-ního roztoku glutaraldehydu. Vzniklá suspenze byla třepána 6 hodin při laboratorní teplotě. K separovaným a promytým částicím (2 x 200 μ l pufru A) bylo přidáno 50 μ l protilátky. Vzniklá suspenze byla umístěna na třepačku na dobu 20 hodin při laboratorní teplotě (třepáno při 480 rpm). Imunomagnetické částice byly promyty 4 x 200 μ l pufru D (třepáno 10 minut při laboratorní teplotě a následně separováno v magnetickém stojánu). Částice byly skladovány v pufru A s 0,02 %-ním azidem sodným.

4.4 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

KVV byl získáván prostřednictvím kondenzátoru vydechovaného vzduchu EcoScreen (Jaeger, Německo) na Klinice nemocí z povolání VFN a 1. LF UK. Bezprostředně po odběru vzorku bylo do 1 ml KVV přidáno 250 pg LTC₄-d₅, 250 pg LTE₄-d₃ a vzorek byl zmražen při teplotě -80 °C.

4.5 Stanovení α -amylasy v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Enzymatická reakce α -amylasy obsažené v KVV byla prováděna při teplotě 37 °C smícháním KVV a 1 %-ního škrobu v poměru 1:2. Po 40 minutách byla přidána 3,5-dinitrosalicylová kyselina a směs byla zahřátá na teplotu 90 C (5 minut), kdy došlo k denaturaci α -amylasy a redukci 3,5-dinitrosalicylové kyseliny přítomnými redukujícími cukry. Koncentrace vzniklého produktu reakce byla stanovena měřením absorbance při vlnové délce λ = 530 nm.

4.6 Stanovení koncentrace biomarkerů v KVV

4.6.1 Extrakce polymerními čočkami

V prvním kroku byly čočky promyty pufrém A. Po přidání 0,1g čoček do 1ml KVV obohaceného vnitřními standardy byla suspenze 60 minut třepána na třepačce při 560 rpm. Po uplynutí 60 minut byla odpipetována metrice KVV. Čočky s navázanými biomarkery byly promyty vodou. Komplex antigen-protilátka byl následně rozvolněn přidáním 0,5 ml 0,1M roztoku glycinu. Roztok glycinu s uvolněnými antigeny byl separován a následně analyzován užitím LC-ESI-MS/MS analýzy. Čočky byly promyty vodou a připraveny k opětovnému použití.

4.6.2 Extrakce imunomagnetickými částicemi

Extrakce markerů z KVV byla pro všechny tři typy magnetických částic se zakotvenou protilátkou realizována stejným postupem. Před přidáním magnetických částic do 1ml KVV obohaceného vnitřními standardy byly částice promyty 2 x 200 μ l pufru (pro promytí částic aktivovaných tosylem byl použit pufr B, pro ostatní částice pufr A). Suspenze imunomagnetických částic v KVV byla třepána při 480 rpm. Po uplynutí 15 minut byla suspenze umístěna do magnetického pole a byl odpipetován supernatant. Magnetické částice s navázanými biomarkery byly promyty příslušnými pufrými (4 x 200 μ l pufru, použití pufru A, nebo B podle typu částic - viz promývání částic). Komplex protilátka-antigen byl rozvolněn přidáním 50 μ l 100 mM roztokem glycinu ve vodě. Roztok glycinu s antigeny byl separován a podroben LC-ESI-MS/MS analýze. Zregenerované imunomagnetické částice byly promyty 3 x 200 μ l pufrém B (částice aktivované tosylem) nebo pufrém A (ostatní částice) a připraveny k opětovnému použití.

4.6.3 LC-ESI-MS/MS analýza

LC-ESI-MS byla realizována v systému vybaveném dvěma vysokotlakými pumpami Varian ProStar 210 (Varian, USA), autosamplerem Varian 410 (Varian, USA). Chromatografické dělení vzorku (nastříkované množství 20 μ l) bylo realizováno na koloně Hypercarb Thermo (Thermo, USA) 100 x 2,1 mm x 5 μ m s použitím mobilní fáze o složení voda s pH upraveným amoniakem na hodnotu 10,5 a methanol s acetonitrilem v poměru 60:40 s přidáním amoniakem (0,1 %). Průtok mobilní fáze byl 150 μ l/min. Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30°C. Na kolonu bylo nastříkováno 20 μ l vzorku. Přístroj byl vybaven trojitým kvadrupólovým analyzátozem Varian 1200L (Varian, USA). Při měření bylo použito negativní elektrosprejové ionizace (ESI⁻) v SRM módu. Reakce kolizně-indukované disociace argonem pro jednotlivé analyty jsou zachyceny v *tabulce 3*. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly následující: napětí na kapiláře -70 V, tlak kolizního plynu argonu 0,2 Pa, napětí na jehle -4500 V, teplota sušícího plynu 300 °C (dusík, 117 kPa) a teplota zamlžovacího plynu 50 °C (vzduch, 345 kPa). Data byla měřena a zpracovávána využitím softwaru Varian MS Workstation verze 6.52 (Varian, USA).

Tabulka 3: Kolizně disociační reakce analytů pro SRM mód MS

Analyt	SRM reakce (m/z → m/z)	Kolizní energie (eV)
LTC ₄	624 → 271	27
LTC ₄ -d ₅	629 → 254	27
LTD ₄	495 → 176	21
LTE ₄	438 → 333	19
LTE ₄ -d ₃	441 → 336	19

4.6.4 Validace metody

Vyvinuté extrakční metody byly charakterizovány následujícími validačními parametry: limit detekce – LOD, limit kvantifikace – LOQ, přesnost, správnost a výtěžnost.

Limit detekce odpovídá nejmenší koncentraci analytu ve vzorku, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Opakovanou analýzou blanku (n =10) byly určeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky slepého pokusu. Limit detekce byl pak spočítán jako průměrná hodnota slepého pokusu zvětšeného o trojnásobek směrodatné odchylky.

Limit kvantifikace představuje nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s předem zadanou nejistotou. LOQ byl určen jako průměrná hodnota slepého pokusu, ke které byl přičten desetinásobek směrodatné odchylky slepého pokusu.

Přesnost metody je definována jako těsnost shody získané koncentrace se skutečnou hodnotou. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou, která se vyjadřuje relativní směrodatnou odchylkou RSD (relative standard deviation), jež se počítá podle vztahu $RSD = s_x / \bar{x} \cdot 100$ (%), kde s_x představuje směrodatnou odchylku a \bar{x} je průměr dané stanovené koncentrace.

Správnost metody vyjadřuje odchylku výsledku od referenční hodnoty a udává se pomocí relativní chyby RE (relative error). Relativní chyba byla počítána vzorcem $RE = (\bar{x} - \mu) / \mu \cdot 100$ (%), μ představuje skutečné přidané množství a \bar{x} je průměr dané stanovené koncentrace.

Výtěžnost udává poměr koncentrace analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě (k známému přidanému množství analytu).

4.7 Klinická studie

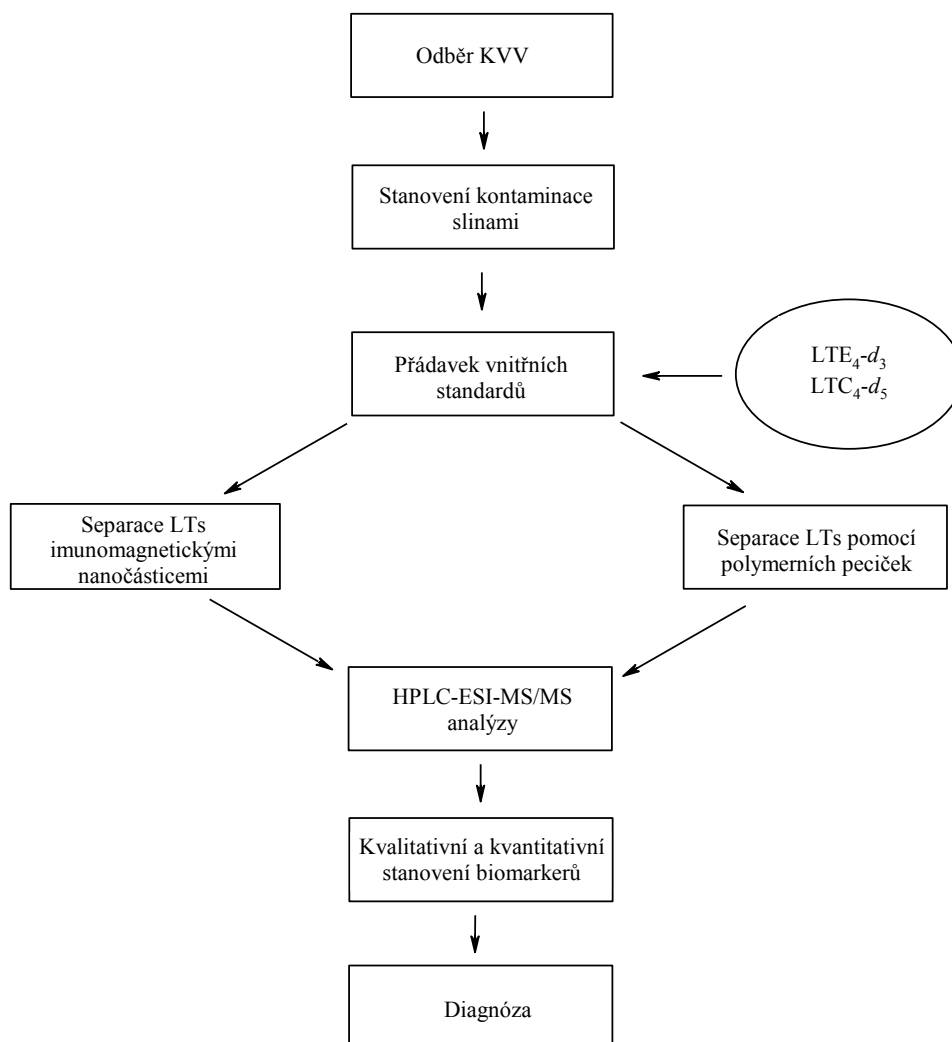
Klinická studie se zabývala sledováním hladin biomarkerů v KVV u jedinců s onemocněním *Asthma bronchiale*. Studie se skládala ze tří skupin pacientů obsahující – (1) 114 jedinců s diagnózou *asthma bronchiale* (věk 42 ± 8), u kterých nebyla zahájena farmakoterapie, (2) 65 jedinců (věk 44 ± 6) s danou diagnózou, u kterých byla prováděna farmakoterapie a (3) kontrolní skupinu 96 zdravých jedinců (věk 38 ± 7).

U studie zabývající se bronchiálním astmatem byl monitorován u 10 dobrovolníků (věk 37 ± 5) průběh hladin cys LTs během bronchoprovokačního testu. Bronchoprovokační test byl uskutečňován podáním látky histamin. KVV byl odebírán před histaminovým testem a následně v časovém intervalu 15, 30, 60, 90 a 120 minut po podání histaminu.

5 Výsledky a diskuze

Analýza biomarkerů obsažených v KVV je poměrně novou, rychle se rozvíjející oblastí v oboru lékařské diagnostiky. Diagnostika založená na stanovení markerů bronchiálního astmatu však není triviální záležitostí, což dokazuje absence standardizovaných metod pro jejich stanovení, přestože metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prokazujících možnost diferenciálních diagnostik těchto metod byla v literatuře publikována celá řada [14]. Důvodem chybějící standardizované metody je především nerespektování nízké stability markerů za laboratorních podmínek, přítomnost enzymů zodpovědných za jejich odbourávání v matrici KVV a chemické změny odehrávající se v průběhu zpracování vzorku.

Vyvinutá metoda pro stanovení hladin sledovaných biomarkerů v KVV probíhala podle schématu zachyceného na *obrázku 11* a snažila se respektovat veškerá výše uvedená omezení.



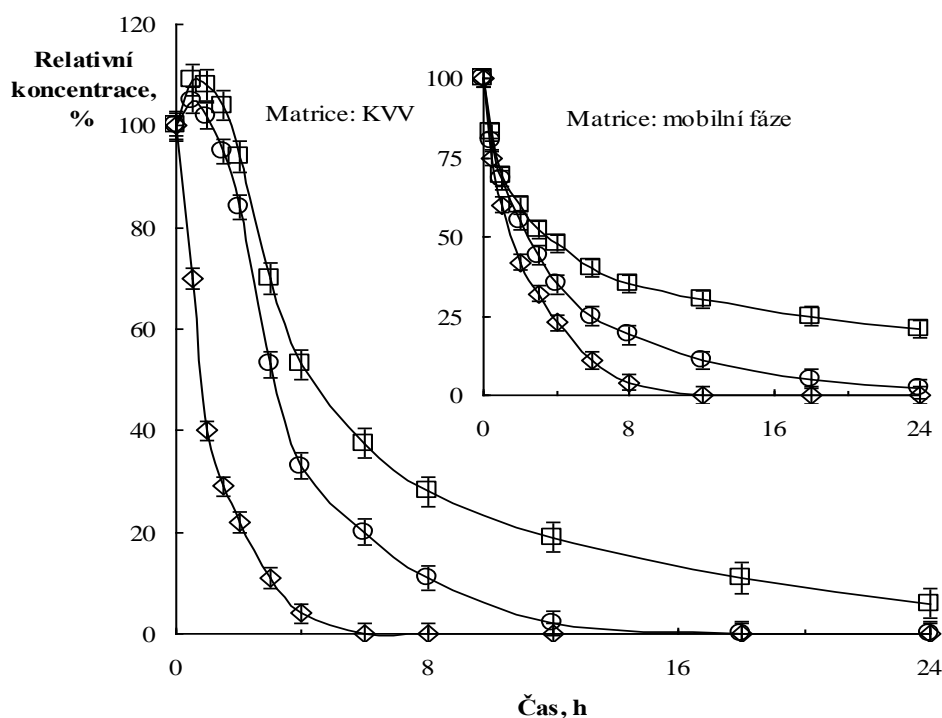
Obrázek 11: Schéma metody stanovení biomarkerů v KVV

5.1 Stabilita leukotrienů

Cys LTs nelze označit jako stabilní látky, byla u nich prokázána v přítomnosti příslušných enzymů i vzájemná přeměna (obrázek 7). Primární snahou při vývoji metody pro stanovování těchto látek v KVV bylo postihnout jejich chování v uvedené biologické matrici a nalézt postup přípravy vzorku vhodného pro MS analýzu umožňující zachytit koncentraci analytů bezprostředně po odebrání vzorku.

KVV bezprostředně po odběru vykazuje hodnotu pH v rozmezí 7,2 - 7,7. Hodnota pH KVV se však v krátkém časovém intervalu snižuje (pH = 6,0 – 6,5), což může být jednou z příčin změn, které se v uvedené matrici odehrávají po jejím odebrání. Snižování pH je zřejmě důsledek absorpce CO₂ ze vzduchu [15], pro což svědčí i fakt, že při uchování KVV pod inertní atmosférou (argon) nebyla pozorována změna pH. Vliv světla na stabilitu leukotrienů zatím nebyl prokázán. Parametrem, který významně ovlivňuje obsah těchto biomarkerů, je určitě teplota.

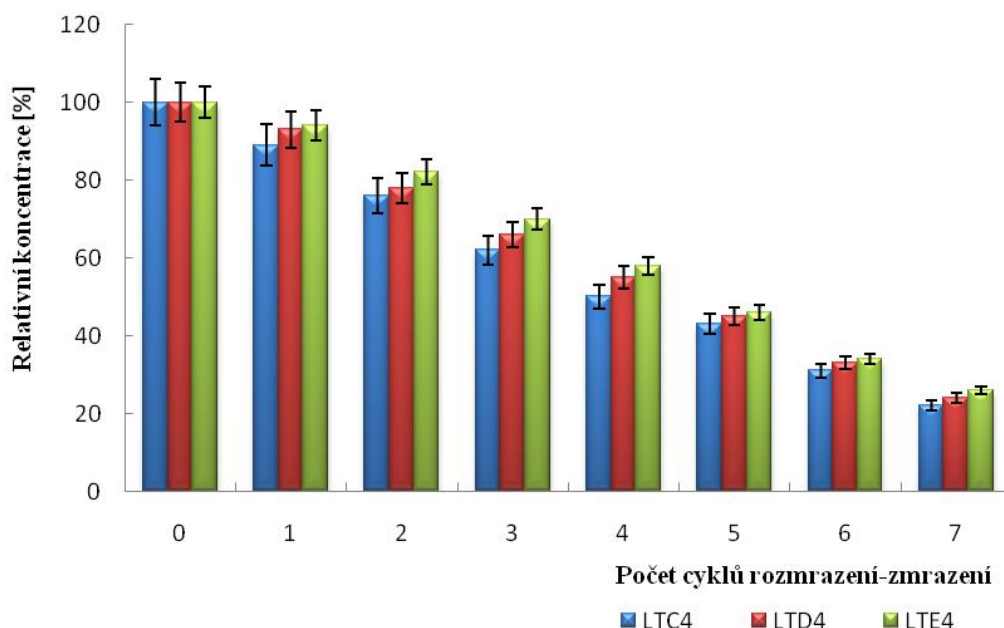
Bylo prokázáno, že za laboratorní teploty se obsah cys LTs velice rychle mění a to v důsledku jejich vzájemné přeměny a omezené teplotní stability (obrázku 12). V matrici KVV byla vedle rozpadu jednotlivých látek sledována i jejich vzájemná přeměna v řadě LTC₄ → LTD₄ → LTE₄ katalyzována enzymy přítomnými v KVV, která způsobuje krátkodobý nárůst koncentrace LTD₄ a LTE₄ ve vzorku.



Obrázek 12: Stabilita LTC₄ (◇), LTD₄ (○) a LTE₄ (□) v matrici KVV a v mobilní fázi (acetonitril:voda =70:30; pH=11) při laboratorní teplotě

Dále bylo zjištěno, že při teplotě -80 °C je možné uchovávat KVV beze změny obsahu sledovaných látek po dobu 3 měsíců (rovněž teplota -20 °C se jevila jako vyhovující), teplota 4 °C k uskladnění KVV nebyla dostatečná, docházelo sice ke zpomalení procesu vzájemné přeměny a odbourávání, ale přesto degradace sledovaných biomarkerů v obou experimentálně sledovaných matricích se pohybovala v horizontu hodin, což není příliš vyhovující pro hodnotné uchovávání KVV. Zlomovou teplotou pro stabilitu látek se jeví teplota 0°C, kdy dochází ke změně skupenství matrice.

Při každém rozmrazení či zmrazení dochází ke snížení množství cysteinylovaných leukotrienů o 8-9 % z jejich původního množství v KVV (obrázek 13).



Obrázek 13: Stabilita cys LTs při opakovaném cyklu rozmrazení - zmrazení vzorku KVV

5.2 Odběr KVV

Odběr KVV byl prováděn na Klinice nemocí z povolání 1. LF UK a VFN vybavené zařízením pro jeho odběr. Vzhledem k citlivosti biomarkerů k celé řadě faktorů je ideální ihned po odběru provést označení vzorku isotopicky značeným vnitřním standardem. Princip standardizace izotopicky značeným analogem spočívá v zcela identickém fyzikálním, chemickém a biologickém chování známého množství standardu, který při hmotnostně-spektrometrické analýze vykazuje v důsledku nahrazení vodíku deuteriem odlišné chování v detektoru umožňující velice přesné provedení kvantifikace a zároveň monitorování změn ve složení vzorku, k nimž došlo v průběhu jeho zpracování.

5.3 Stanovení kontaminace kondenzátu vydechaného vzduchu slinami

Po odběru vzorku KVV se prováděl test na kontaminaci slinami, ke které by mohlo dojít v důsledku špatně provedeného odběru. Stanovení se provádí z toho důvodu, že ve slinách se vyskytuje významné množství sledovaných biomarkerů, takže kontaminace slinami by značně ovlivnila budoucí diagnózu.

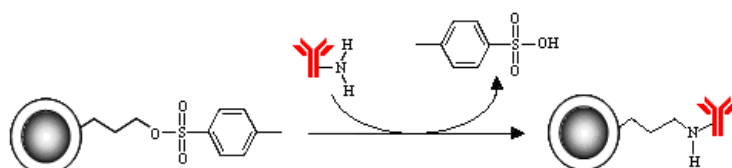
Zjištění kontaminace je možné provést prostřednictvím stanovení aktivity enzymu α -amylázy, která se detekuje na základě koncentrace uvolněného redukujícího cukru z rozštěpeného škrobu. Redukující cukr při zahřátí redukuje přidanou 3,5-dinitrosalicylovou kyselinu na 3-amino-5-nitrosalicylovou kyselinu. Koncentrace vzniklé 3-amino-5-nitrosalicylové kyseliny se stanovuje na základě absorpance při vlnové délce $\lambda = 530$ nm. Pro všechny vzorky klinické studie byla stanovena aktivita α -amylasy v KVV pod 0,1 % vzhledem k její aktivitě ve slinách. Pokud by tato aktivita byla vyšší, matrice by byla znehodnocena a dále nezkoumána.

5.4 Extrakce leukotrienů z KVV

Vzhledem k velmi nízké koncentraci biomarkerů v komplexní matici KVV je vhodné sledované látky před samotnou LC-ESI-MS/MS analýzou separovat a provést jejich zakoncentrování. Za tímto účelem byla testována imunoseparace magnetickými částicemi a pomocí polymerních čoček (mezikrok k přípravě diagnostického proužku).

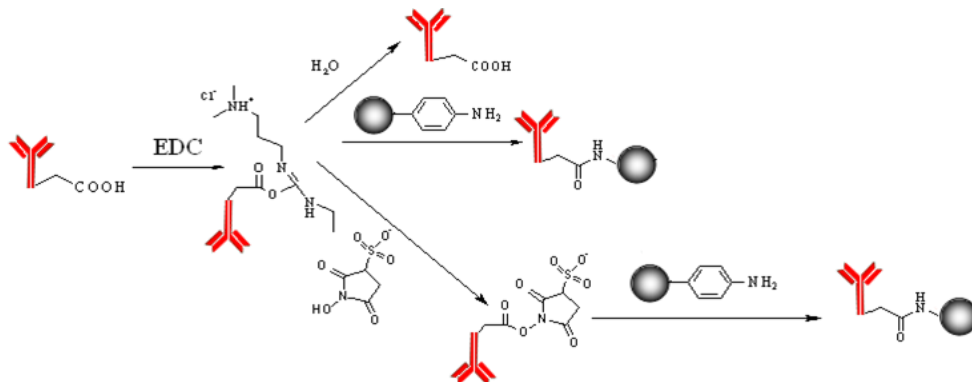
5.4.1 Extrakce imunomagnetickými částicemi

Magnetické částice aktivované tosylovými skupinami umožňovaly navázání protilátky pomocí aminoskupiny (schéma reakce obrázek 14).



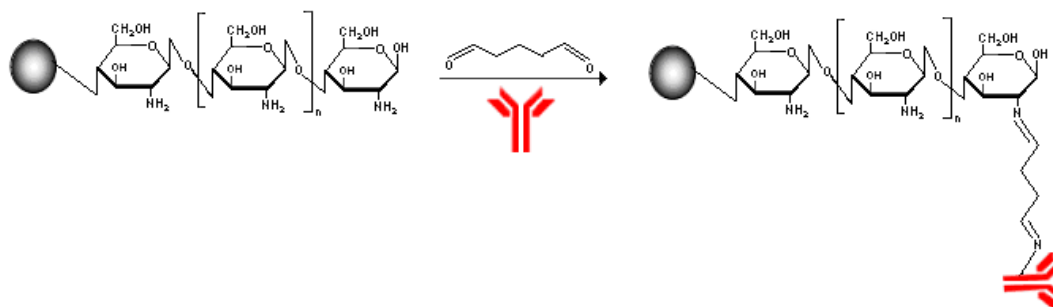
Obrázek 14 Princip navázání protilátky na magnetické částice aktivované tosylovými skupinami

U magnetických částic s povrchem aktivovaným p-anilinem se příslušné zakotvení protilátky karboxylovou skupinou provádělo pomocí reakčních činidel EDC a sulfo-NHS (princip zakotvení na obrázku 15).



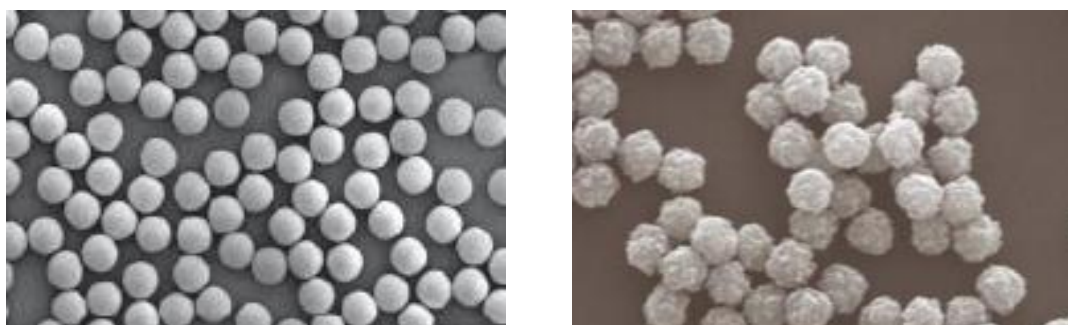
Obrázek 15 Zakotvení protilátky na nosič obsahující aminoskupinu. Kotvení protilátky se provádí pomocí karboxylové skupiny protilátky na nosič aktivovaný NH_2 skupinou s využitím činidla EDC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid). Vzniklý reaktivní esterový meziprodukt podléhá ve vodném prostředí hydrolýze. Pro větší množství zakotvených protilátek na povrchu nosiče se do reakční směsi přidává sulfo-NHS (N-hodroxy-sulfosukcinimid).

Poslední typ magnetických částic měl k dispozici povrch modifikovaný chitosanem. Imobilizace protilátky probíhala s využitím cross-linkeru glutaraldehydu, který vytvořil most mezi dvěma aminoskupinami (obrázek 16).



Obrázek 16 Princip navázání protilátky na magnetické částice modifikované chitosanem s využití cross-linkeru glutaraldehydu

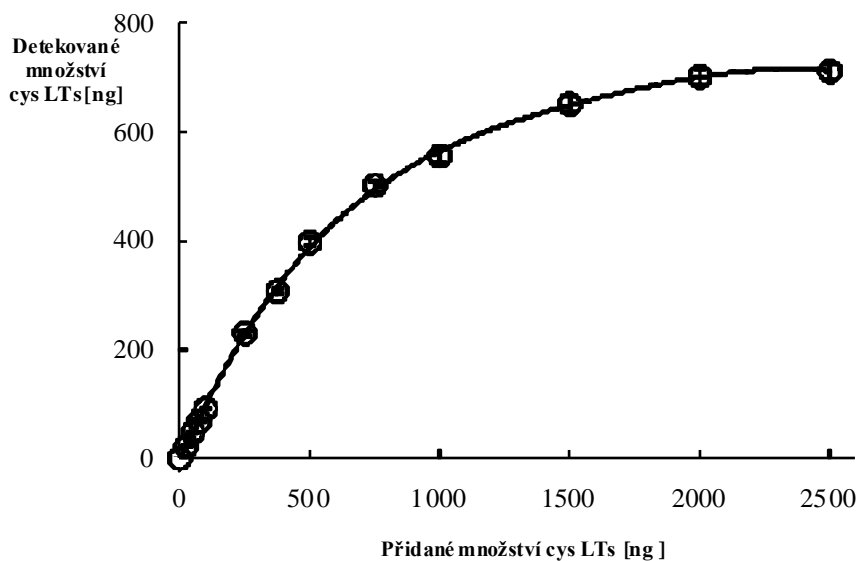
Doby jednotlivých reakcí imobilizace protilátky na povrchu magnetických částic byly optimalizovány z hlediska maximálního množství navázané protilátky. Pokrytí magnetických částic bylo sledováno pomocí vhodných charakterizačních metod – např. využitím skenovacího elektronového mikroskopu (*obrázek 17*).



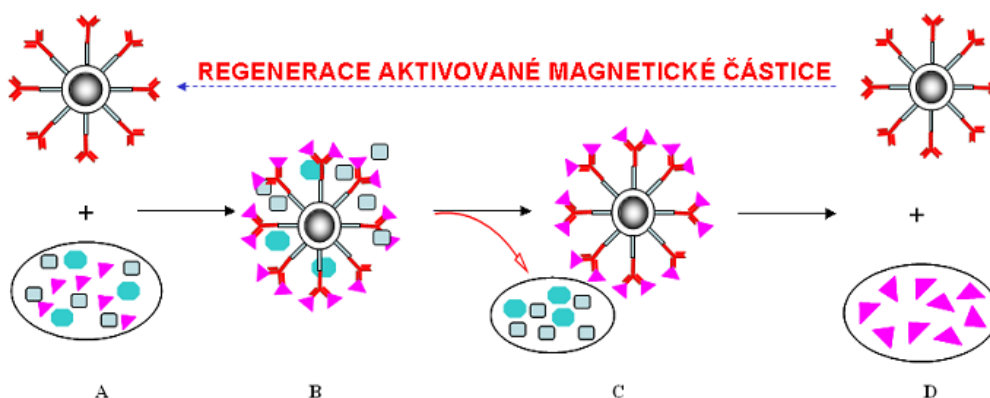
Obrázek 17 Porovnání magnetických částic před navázáním (vlevo) a po navázání protilátky na povrch magnetických částic (vpravo)

Připravené magnetické částice s navázanou protilátkou byly následně vloženy do KVV jako agens pro imunoseparaci. Experimentálně bylo ověřeno, že reakce mezi biomarkery a protilátkou probíhá téměř okamžitě a s rovnováhou posunutou výrazně na stranu komplexu antigen-protilátka (doba imunoseparace 15 minut). Po navázání biomarkerů byla separace provedena v magnetickém poli. Následně byla magnetická částice převedena do 0,1 M roztoku glycinu, kde došlo k téměř okamžitému rozvolnění komplexu. Pro jednotlivé magnetické částice byla stanovená vazebná kapacita antigenu (*obrázek 18*).

Po umístění suspenze do magnetického pole dojde k separaci magnetických částic s navázanou protilátkou, jež jsou pro promytí odpovídajícími pufrými připraveny k opakovanému použití (částice aktivované tosylovými skupinami promyty pufrým B, ostatní imunočástice pufrým A), a glycinového roztoku cysteinylovaných leukotrienů, které jsou předloženy k hmotnostně-spektrometrické analýze (*obrázek 19*). Experimentálně bylo ověřeno opakované použití částic bez výrazné ztráty sorpční kapacity připravené imunočástice.



Obrázek 18 Stanovení vazebné kapacity magnetických částic aktivovaných tosylem



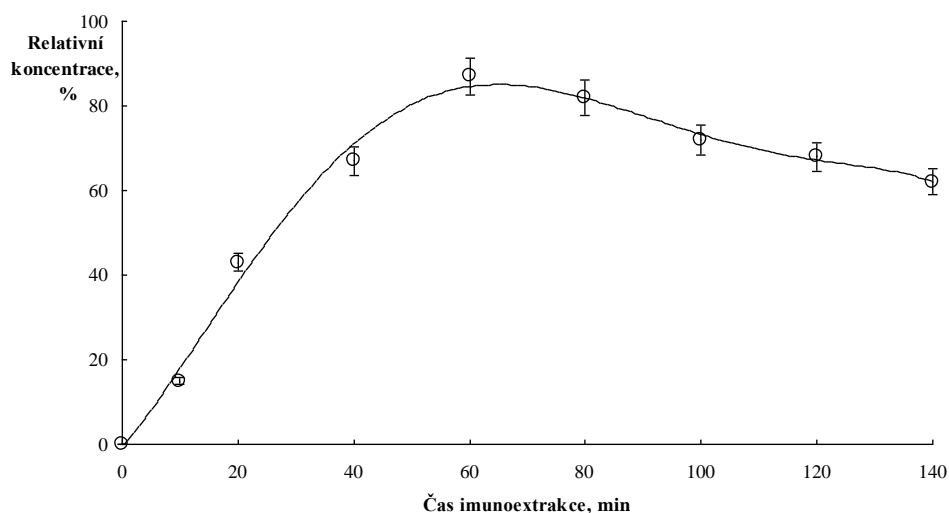
Obrázek 19 Princip imunomagnetické separace. Po vložení imunomagnetické částice do KVV (A) dojde k reakci příslušného antigenu s protilátkou (B) a vytvořený komplex se z matrice KVV separuje ve vnějším magnetickém poli (C). Rozvolněním komplexu antigen-protilátka vhodným rozpouštědlem se získá roztok s antigenem k HPLC-ESI-MS/MS analýze a regenerovaná imunočástice (D). Promytá imunočástice se použije k další separaci antigenu.

5.4.2 Extrakce polymerními čočkami

Imunoafinitní separace byla realizována přidávkem čoček (100 μ g pro cys LTs) do 1 ml KVV (vazebná kapacita čoček byla stanovena na 1 ng cys LTs na 100 mg sorbentu). Veškeré parametry imunoextrakce s použitím čoček pro cys LTS byly optimalizovány vzhledem k získání maximální výtěžnosti separace.

Typický průběh imunoextrakce je znázorněn na obrázku 20, kde je zachycena závislost doby imunoextrakce na separovaném množství. Z grafu je zřejmé, že s prodlužujícím se časem imunoextrakce dochází k nárůstu separovaného množství cys LTs z KVV, nicméně naproti tomu

dochází k rozkladu látek v důsledku negativního vlivu teploty (25 °C) na jejich stabilitu. Po dosažení maxima separovaného množství v 60. minutě začíná převažovat proces degradace.



Obrázek 20 Stanovení optimální doby imunoextrakce pro cysteinylované leukotrieny pomocí imunoafinitních čoček

Po separaci imunoafinitního čoček centrifugací (500 rpm) a po oddělení supernatantu, byly čočky promyty vodou z důvodu separace zbylých nenavázaných látek z KVV. Vzniklá vazba antigen – protilátka byla rozvolněna glycinem (optimalizované množství přidaného glycinu činilo 0,5ml na 100mg čoček), který nedenaturoval bílkovinou protilátku a umožnil regeneraci protilátek imobilizovaných v čočkách. Získaný vzorek cys LTs byl analyzován pomocí systému LC-ESI-MS/MS. Uvedeným postupem bylo možné separovat >85 % v klinickém vzorku přítomných cys LTs. Podíl nespecifických reakcí s imunoafinitním sorbetem byl zanedbatelný. Experimentálně bylo ověřeno použití regenerovaných imunoafinitních čoček v 10-ti po sobě následujících cyklech bez výrazné měřitelné ztráty sorpční kapacity.

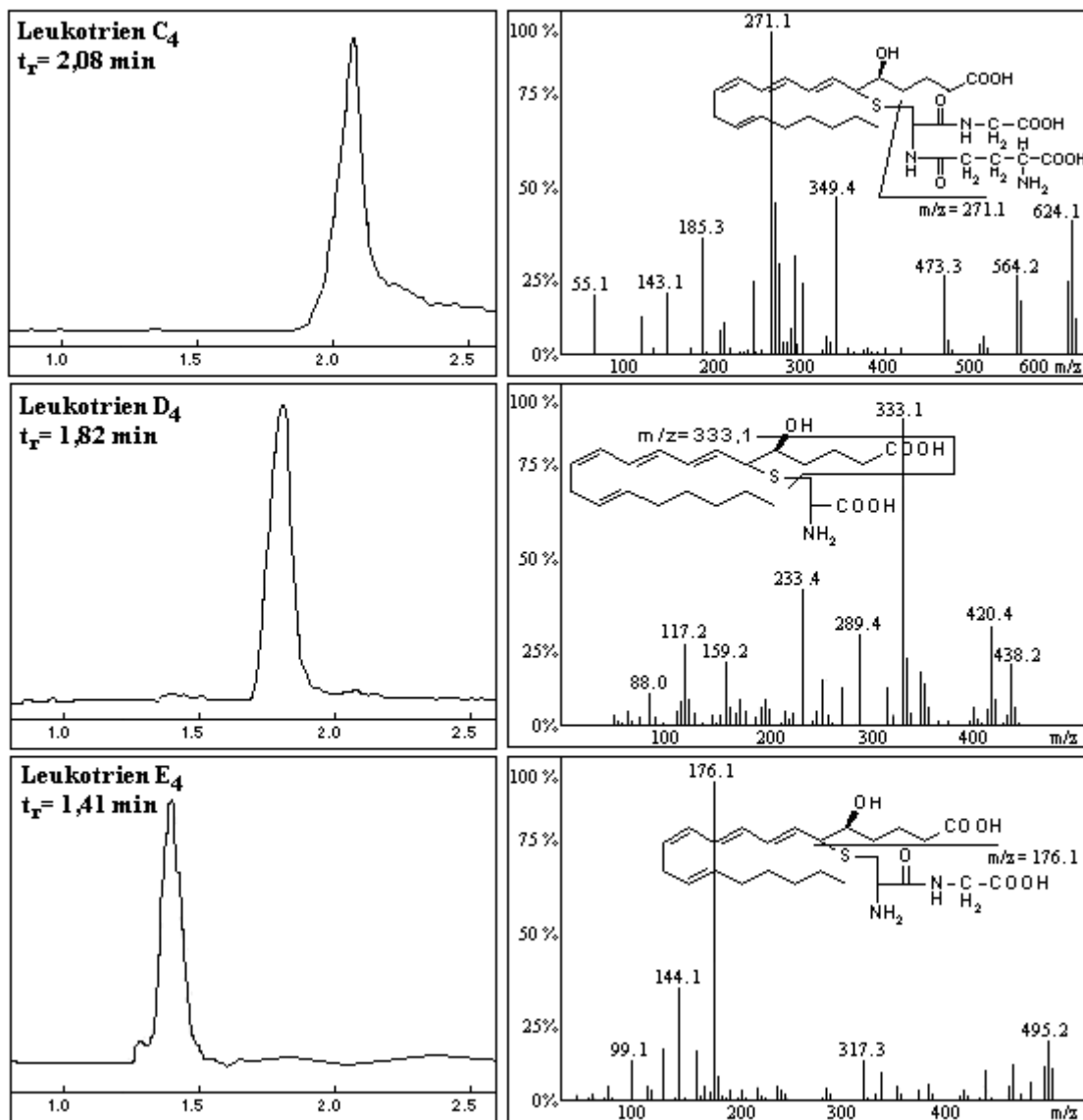
5.5 HPLC/MS

Kapalinová chromatografie pro separaci leukotrienů byla realizována na koloně Hypercarb s použitím mobilní fáze acetonitril:voda = 70:30 s pH 11. Sloužila 1) k oddělení látek od čela analýzy (aby v důsledku případné koeluce solí a endogenních složek matrice nedocházelo k potlačení signálu hmotnostního detektoru) a 2) k separaci jednotlivých leukotrienů. U LTC₄ je retenční čas (tj. čas, za který daná látka propluje kolonou) $R_t = 1,4$ min, u LTD₄ je $R_t = 1,8$ min, u LTE₄ je $R_t = 2,0$ min a LTB₄ je $R_t = 2,8$ min, mrtvý čas kolony $t_m = 0,8$ min.

Podmínky chromatografické analýzy byly optimalizovány na průtok mobilní fáze 150 μ l/min a pH = 11. Pro úpravu mobilní fáze na příslušnou hodnotu pH bylo použito triethylaminu, amoniaku a kyseliny octové.

Hmotnostně-spektrometrická detekce byla realizována negativní elektrosprejovou ionizací (ESI⁻) ve vysoce selektivním SRM módu. Na kvadrupólu Q1 byl izolovaný deprotonovaný molekulární iont $[M-H]^-$ příslušného analytu, který byl použit jako prekursor pro následnou kolizně-indikovanou

disociaci v kolizní cele kvadrupólů Q2, kde docházelo k selektivnímu rozpadu molekuly za vzniku dceřiného spektra, ze kterého byl na třetím kvadrupólu Q3 izolován specifický dceřiný ion s nejvyšší četností (obrázek 21). Kolizní energie a další parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány z hlediska získání maximální výtěžnosti vyvinuté metody.



Obrázek 21 Chromatogramy a MS/MS spektra cysteinylovaných leukotrienů

5.6 Validace metody

Pro vyvinuté analytické metody kombinující extrakční metodu (imunomagnetické částice, anebo polymerní čočky) s HPLC-ESI-MS/MS detekcí byla stanovena správnost, přesnost, výtěžnost a limity detekce a kvantifikace (tabulka 4).

Tabulka 4: Hodnoty validace pro metody kombinující extrakční metodu s HPLC-ESI-MS/MS detekcí (n=5)

Analyt	LOD [pg/ml KVV]	LOQ [pg/ml KVV]	Přesnost RSD [%]	Správnost RE [%]	Výtěžnost [%]
Imunomagnetické částice					
LTC4	3	11	10,1	10,4	89,7
LTD4	2	7	9,2	8,5	91,5
LTE4	2	6	8,7	8,2	91,8
Polymerní čočky					
LTC4	3	12	11,9	15,5	85,7
LTD4	2	7	10,6	10,4	86,9
LTE4	2	7	9,2	9,8	89,6

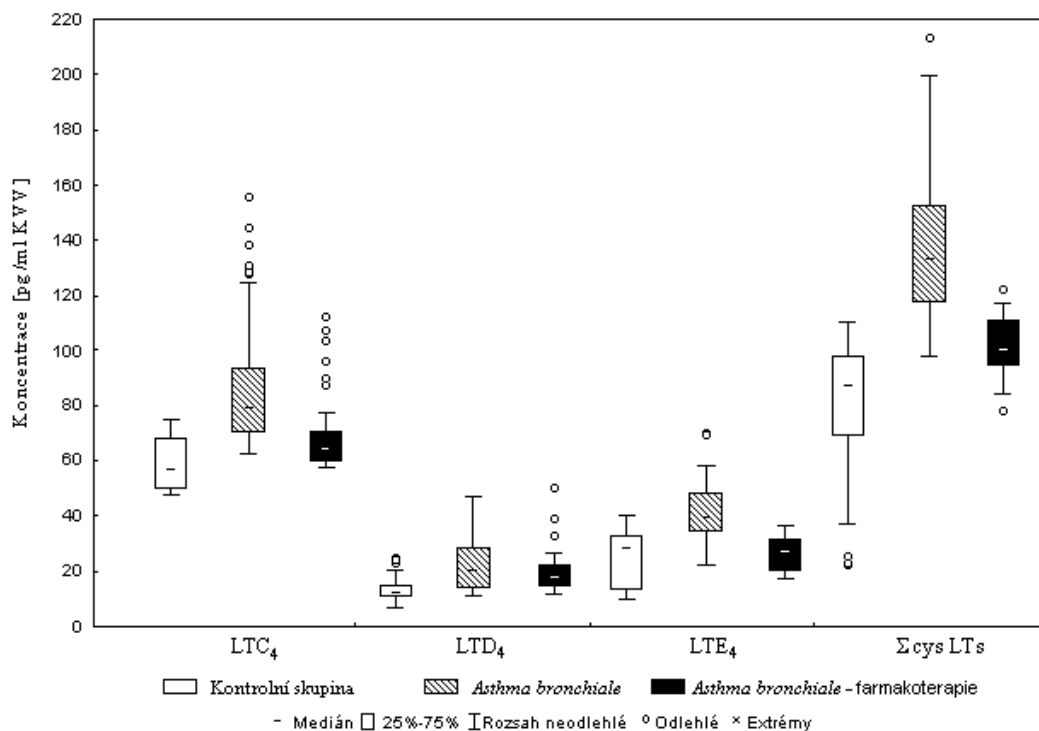
5.7 Klinická studie

Na začátku studie byla zkoumána produkce biomarkerů v průběhu denního biorytmu. U skupiny 10 dobrovolníků (věk 18 ± 2 , nekuřáci, zdraví jedinci) byly odebrány čtyři vzorky KVV vždy v průběhu jednoho dne (v 6, 12, 18 a 24 hodin). U všech subjektů byl prokázán zcela shodný trend ve vývoji koncentrací biomarkerů, které se v průběhu dne zvyšovaly a na svou původní koncentrační hladinu se vracely až v době spánku. V průběhu dne (18 – 20 hodin bez spánku) se suma cys LTs zvýšila v průměru o $25,4 \pm 3,4$ %. U všech dobrovolníků byla prokázána shoda v korelaci hladiny biomarkerů v KVV a času odběru dechového kondenzátu. Pro další studie bylo nutné respektovat tuto skutečnost a v dalších klinických studiích byly vzorky odbírány vždy mezi 8. a 12. hodinou, kdy předpokládaný vzrůst hladiny sumy cys LTs byl do $6,6 \pm 1,1$ %.

Klinická studie, jejímž cílem bylo ověřit možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, byla prováděna u 114 osob (věk 42 ± 8) s diagnózou *Asthma bronchiale*, u 65 osob s farmakoterapií (věk 44 ± 6), a kontrolní skupinou reprezentující 96 zdravých jedinců (věk 38 ± 7). Výsledky byly statisticky zpracovány. Mezi skupinou kontrolní, skupinou s danou diagnózou a skupinou s diagnózou *Asthma bronchiale* podrobených farmakoterapii byly prokázány významné rozdíly hodnot koncentrací u leukotrienů C₄ (kontrolní skupina: $57,4 \pm 8,6$ pg/ml KVV, diagnóza *Asthma bronchiale*: $80,1 \pm 6,2$ pg/ml KVV, diagnóza *Asthma bronchiale*, farmakoterapie: $67,8 \pm 6,5$ pg/ml) a leukotrienu E₄, (kontrolní skupina: $25,3 \pm 5,1$ pg/ml KVV, diagnóza *Asthma bronchiale*: $35,7 \pm 4,8$ pg/ml KVV, diagnóza *Asthma bronchiale*, farmakoterapie: $27,5 \pm 4,3$ pg/ml KVV) Je tedy patrné, že hladina LTE₄ u skupiny pacientů s diagnostikovaným astmatem a zahájenou terapií byla statisticky nevýznamná od skupiny zdravých jedinců. Význam leukotrienu D₄ pro diferenciální diagnostiku *Asthma bronchiale* nebyl zcela potvrzen, ačkoliv i v případě tohoto biomarkeru byl zaznamenán rozdíl v jeho průměrné hodnotě, která se lišila u pozitivně diagnostikovaných subjektů ($19,9 \pm 4,3$ pg/ml KVV) od zdravých jedinců ($13,8 \pm 5,2$ pg/ml KVV), nicméně rozdíl v konfidenčních intervalech byl statisticky

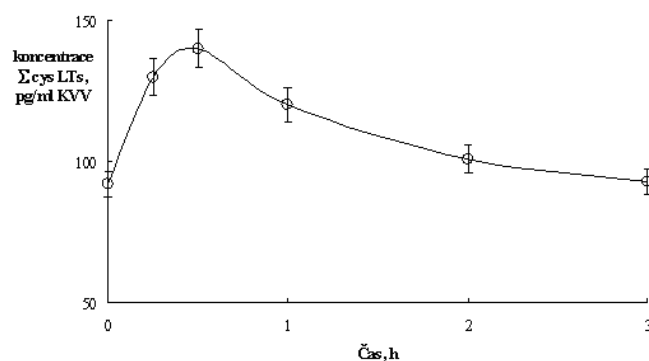
nevýznamný, hladina u lidí po farmakoterapii ($13,5 \pm 4,6$ pg/ml KVV) se shodovala s hladinou zdravých jedinců.

Rozdíl v koncentračních hladinách je výrazný u sumárních hodnot cys LTs, kde pro kontrolní skupinu byly získány hodnoty $77,8 \pm 13,8$ pg/ml KVV, pro astmatiky $133,2 \pm 20,1$ pg/ml KVV a pro astmatiky užívající farmakoterapii $101,2 \pm 10,9$ pg/ml KVV (obrázek 22).



Obrázek 22 Diferenciální diagnostika *Asthma bronchiale*

Vyvinutá diagnostická metoda byla použita rovněž v klinickém experimentu, jehož cílem bylo ověřit možnost monitorování průběhu alergického onemocnění, případně terapeutického postupu. U skupiny deseti dobrovolníků (věk 37 ± 5) byl proveden bronchoprovokační test podáním histaminu. KVV byl odebrán před histaminovým testem a následně v těchto časových intervalech: 15, 30, 60, 120 a 180 minut. Výsledek testu je zachycen na obrázku 23, ze kterého je zřejmé, že organismus na histamin reagoval zvýšenou produkcí cys LTs, jejichž hladina se po dosažení maxima své koncentrace vracela na svou původní hodnotu. Z uvedeného testu vyplývá, že uvedená metoda v sobě zahrnuje i potenciální možnost sledování účinnosti terapeutických postupů.



Obrázek 23 Průběh bronchoprovokačního testu

6 Závěr

Předkládaná práce je orientována do oblasti personalizované medicíny a zabývá se vývojem metodiky stanovení markerů *Asthma bronchiale*. V rámci experimentální činnosti byla vyvinuta metoda pro detekci a kvantifikaci cysteinyllovaných leukotrienů (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) v kondenzátu vydechaného vzduchu. Stanovení jejich koncentračních hladin v matrici KVV umožňuje neinvazivně monitorovat děje odehrávající se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách nezávisle na procesech probíhajících v celém organismu, jak je tomu při stanovení těchto látek v krevní plazmě nebo moči. Ačkoliv v nedávné době byla vyvinuta řada metod pro jejich stanovení v KVV a byla prokázána možnost diferenciální diagnostiky *Asthma bronchiale*, neexistuje do současnosti standardizovaný postup pro stanovení jejich koncentračních hladin a výsledky z různých pracovišť vykazují značnou nesourodost.

Práce si kladla za cíl identifikovat možné zdroje uvedených inkonsistencí a respektovat je při vývoji metody stanovení a návrhu metodiky měření od odběru vzorku až po získání validních dat v podobě koncentrací jednotlivých biomarkerů v uvedené matrici a jejich korelaci s fyziologickými, či patologickými procesy odehrávajícími se v plicích, případně dýchacích cestách. Princip vyvinuté metody spočívá na kombinaci vhodné extrakční techniky – imunomagnetické nanočástice a vysoce selektivní a přesné detekční metody hmotnostní spektrometrie.

Mezi možné zdroje chyb při analýze zmíněných biomarkerů lze zařadit velice rychlý rozpad sledovaných biomarkerů při laboratorní teplotě v mobilní fázi a i v samotném kondenzátu vydechaného vzduchu, kde je jejich rozpad urychlen přítomnými enzymy zodpovědnými za jejich eliminaci a za jejich vzájemnou přeměnu v řadě $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$. Sledované látky jsou citlivé i k opakovaným cyklům rozmrazování a zmrazování vzorku. Pro monitorování těchto příčin úbytku biomarkerů byla použita metoda “stable-isotope-dilution assay” založená na přidání vnitřních standardů, kterými jsou deuterované analogy sledovaných biomarkerů. Tato metoda využívá identické fyzikální, chemické a biologické chování známého množství standardu, který při hmotnostně-spektrometrické analýze vykazuje v důsledku nahrazení vodíku deuteriem odlišné chování v detektoru umožňující velice přesné provedení kvantifikace a zároveň monitorování změn ve složení vzorku, k nimž došlo v průběhu jeho zpracování. Jedna z hlavních příčin získání falešně pozitivních výsledků může vzniknout již při samotném odběru KVV, a to kontaminací slinami, neboť se v nich dané látky vyskytují ve vysokých koncentracích. Pro detekci kontaminovaných vzorků byla vyvinuta metoda, jež využívá sledování aktivity slinné α -amylasy.

Během práce zaměřené na přípravu diagnostického proužku byla prováděna imobilizace protilátek do pórovitých polymerních nosičů. Při hledání vhodného polymeru kompatibilního s protilátkou (PVA – polyvinylalkohol) byly připraveny polymerní čočky, kde velké pozornosti bylo věnováno krokům, které mohou způsobit denaturaci protilátky (teplota potřebná k polymeraci monomerů, pH). Důležitým parametrem pro polymerní čočky a následně samotný diagnostický proužek je velikost pórů. Pokud jsou póry příliš úzké, probíhá difúze antigenu k protilátce velice dlouhou dobu, naopak při použití širokých pórů dochází k difúzi protilátky do vnějšího prostředí a tím snížení vazebné kapacity čočky (proužku). K stanovení kapacity vaznosti antigenu čoček bylo použito LC-MS metody.

Vyvinuté metody pro detekci biomarkerů v KVV byly testovány na sérii klinických vzorků, kde byla prokázána možnost použití této metody v klinické praxi. Tuto metodu lze charakterizovat jako

zcela neinvazivní pro diagnostiku *Asthma bronchiale* a je možné ji použít i k sledování účinnosti farmakoterapie.

Pro uvedení metody detekce biomarkerů do klinické praxe byl vytvořen biočip, který se skládá z magnetické nanočástice, na její povrch je imobilizovaná příslušná protilátka umožňující vychytání daného antigenu. Tato imunočástice se vyznačuje rychlou separací biomarkerů a snadnou manipulací přinášející možnost automatizace celého analytického procesu. Pro orientační stanovení biomarkerů pacientem z moči pomocí diagnostického proužku, byl zvolen vhodný polymerní nosič, ze kterého byly připraveny a otestovány polymerní čočky.

7 Citovaná literatura

1. Hodek, B. (1975). *Asthma bronchiale*. Praha: Avicenum
2. Scheideler L., Manke H.G., Schwulera U., Inacker O., Hammerle H.: *American Review Respiratory Disease*. (1993), s. 148, 778
3. Montuschi, P. (2005). *New Perspectives in monitoring Lung Inflammation*. CRC Press.
4. Zakrzewski J. T., Barnes N. C., Costello J. F., Piper P. J.: *American Review Respiratory Disease* (1987), s. 136, 779
5. Montuschi P.: v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* kap. 2., CRC Press, Boca Raton 2005.)
6. Busse W., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 210 (1998)
7. Reynolds H.Y.: *Lung* (2000), s. 178, 271
8. Holz O., Kips J., Magnussen H.: *European Respiratory Journal* (2000), s. 16, 355
9. Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2002), s. 166, 301
10. Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghiro L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: *Thorax* (2003), s. 58, 505
11. Gonzalez-Reche L. M., Musiol A. K., Müller-Lux A., Kraus T., Gen T.: *J. Occupat. Med. Tox.* 1: (2006), s. 5
12. Daussant Jean, Desvaux F.-Xavier: *Introduction to Immunochemical Techniques for Medical Diagnosis, Food Quality Control and Environmental Trstiny, ICT Pratur, Praha 2007*
13. Syslová K.: *Vývoj neinvazivní diagnostiky asthma bronchiale metodou kombinující immunoafinitní separaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí* (2008)
14. Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (2001), s. 162, 1175
15. Zakrzewski J. T., Barnes N. C., Costello J. F., Piper P. J.: *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 779 (1987)