

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



MUDr. Bc. Adam Tesař

Ramanova spektroskopie jako nástroj k diagnostice Alzheimerovi choroby

Oddělení fyziky biomolekul, Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2015

Rád bych poděkoval Dr. Vladimíru Kopeckému Jr. a Dr. Kateřině Hofbauerové za připomínky k diplomové práci, za rady a pomoc s optimalizací metody a měřením. Můj dík patří také Mgr. Jakubu Klenerovi za poskytnutí skriptů a programů ke zpracování dat a za rady jak při zpracovávání postupovat. V neposlední řadě bych také rád poděkoval své snoubence a rodičům za podporu a trpělivost během měření i psaní celé práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne.....

podpis

Název práce: Ramanova spektroskopie jako nástroj k diagnostice Alzheimerovy choroby

Autor: MUDr. Bc. Adam Tesař

Katedra / Ústav: Oddělení fyziky biomolekul, Fyzikální ústav,

Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Abstrakt: Alzheimerova nemoc (AD) je nejčastější demencí v lidské populaci. Trpí jí až 10 % lidí starších 65 let a její výskyt s věkem narůstá. V současnosti dostupná léčba je schopna pouze zpomalit progresi onemocnění, proto je důležité AD diagnostikovat v časném stadiu. V naší práci jsme Ramanovou spektroskopií kapkově nanášených povlaků (DCDR) analyzovali vzorky mozkomíšního moku (MM) a krevního séra (KS) souboru 55 pacientů s cílem ověřit dříve publikovanou vysokou senzitivitu spektroskopické diagnostiky AD ze vzorků MM a nalézt novou diagnostickou metodu na vzorcích KS. Nalezli jsme vhodné podmínky pro měření KS pomocí DCDR. Výsledky měření jsme vyhodnocovali pomocí analýzy hlavních komponent a shlukové analýzy. Malé soubory vzorků MM i KS vykazovaly vysokou senzitivitu, která ale pro celý soubor pacientů prudce poklesla. Výsledky na MM byly značně ovlivněny volbou vyhodnocovaných spektrálních intervalů, největší senzitivity i specificity dosahovaly intervaly obsahující pásy na 980, 1080 a 1249 cm^{-1} , které byly již dříve popsány jako signifikantní pro AD. Výsledky na vzorcích KS byly nejvíce citlivé při analýze aplikované na celé spektrum avykazovaly nízkou senzitivitu, ale vysokou specificitu k AD (92 %). Užitím neuronových sítí jsme naopak dosáhli vysoké senzitivity (88,9 %), ale nízké specificity na vzorcích MM a KS.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, vibrační spektroskopie, biomedicínská spektroskopie, Alzheimerova choroba, mozkomíšní mok, krevní sérum

Title: Raman spectroscopy as a diagnostic method of Alzheimer disease

Author: MUDr. Bc. Adam Tesař

Department: Division of Biomolecular Physics, Institute of Physics,

Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague

Supervisor: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D

Abstract: Alzheimer disease (AD) is the most frequent dementia. The prevalence is approximately 10% in 65 years old people. The current treatment is only progression protective, therefore it is crucial to find a new diagnostic approach for diagnosing AD in early stage. We analysed a set of 55 patients by the drop coating deposition Raman spectroscopy with the goal to verify previously published high sensitivity of the AD spectroscopic diagnosis in cerebral spinal fluid (CSF) and to find a new diagnostic method for blood serum (BS). We optimized measurement conditions for BS. The results were evaluated by the cluster analysis and the principal component analysis. The small set of samples exhibited high sensitivity in both CSF and BS but that distinctly decreased in the whole set. The results for CSF were affected by the choice of the analysed spectral interval. The best for AD diagnose was the interval containing peaks at 980, 1080 and 1249 cm^{-1} . The results for BS have been the most sensitive in the whole spectral range. They have low sensitivity but high specificity for AD (92%). The usage of neural networks has conversely high sensitivity and low specificity in both sets of samples of BS and CSF.

Keywords: Raman spectroscopy, vibrational spectroscopy, biomedical spectroscopy, Alzheimer disease, cerebrospinal fluid, blood serum

Obsah

Úvod	5
1. Mozkomíšní mok a krev	7
1.1. Mozkomíšní mok	7
1.2. Krevní sérum	8
1.3. Hematoencefalická bariéra	9
2. Ramanova spektroskopie	12
2.1. Ramanova spektroskopie – úvod	12
2.2. Teorie klasického Ramanova rozptylu	13
2.3. Teorie Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků	14
2.4 Ramanova spektroskopie v biomedicíně	17
2.5. Ramanova spektroskopie biotekutin	17
2.5.1. Ramanova spektroskopie mozkomíšního moku	18
2.5.2. Ramanova spektroskopie krevního séra	19
2.6 Aplikace DCDR spektroskopie	20
3. Alzheimerova choroba	26
3.1. Úvod	26
3.2. Minimální kognitivní porucha	27
3.3. Alzheimerova choroba	27
3.4. Diagnostika Alzheimerovi nemoci pomocí vibrační spektroskopie	28
3.4.1. Diagnostika AD pomocí vibrační spektroskopie MM	29
3.4.2. Diagnostika AD pomocí vibrační spektroskopie krevního séra	30
4. Matematické metody	34
4.1. Analýza hlavních komponent	34
4.2. Shluková analýza	36
4.2.1. Podobnost objektů	36
4.2.2. Shlukovací procedury	37
4.3. Neuronové sítě	38
4.3.1 Neuron	39
4.3.2. Užití vrstevnaté sítě	39
5. Podmínky měření	41
5.1. Experimentální technika	41
5.2. Vzorke	42
5.3. Nanášení vzorků	42
5.4. Příprava vzorku	44

6. Optimalizace měření krevního séra	45
6.1. Vlastnosti substrátu	45
6.2. Vysychání vzorku	46
6.3. Nastavení spektrometru	49
6.4. Ředění vzorku	49
6.5. Vybělování fluorescenčního pozadí	51
6.6. Určení místa měření	52
6.7. Degradace vzorku	53
6.8. Optimalizace měření mozkomíšního moku	55
6.9. Měření a zpracovávání spekter	56
7. Výsledky měření a diskuze	59
7.1. Ověření diagnostické metody AD z mozkomíšního moku	59
7.1.1. Diagnostické zpracování	59
7.1.2. Diagnostika Alzheimerovi demence z MM	59
7.1.3. Prověření možnosti využít CaF_2 s pro diagnostiku vzorků MM	72
7.2. Diagnostické zpracování vzorků krevního séra	74
8. Diskuse	92
9. Závěr	95
Seznam použité literatury	98
Seznam tabulek	104
Seznam použitých zkratk	105

Úvod

Díky stoupající úrovni zdravotní péče, zlepšujícímu se životnímu stylu a kvalitnější stravě se populace západních států dožívá stále vyššího věku. Kromě mnoha výhod nás delší věk vystavuje i novým rizikům. Zatímco do devatenáctého století populace čelila zejména hrozbám infekčních epidemií, dnes bojuje s kardiovaskulárními onemocněními, riziky obezity, cukrovky a dalších chronických chorob. Postupně se stále sílící tendencí se o lidské zdraví pokouší i neurodegenerativní onemocnění, pro které je právě věk hlavním rizikovým faktorem.

Odhaduje se, že v současné době trpí demencí zhruba 1 % populace, ale zhruba 10 % lidí starších 65 let a až 30 % obyvatel nad 85 let. To je důvodem, proč se demence stává významným společenským, finančním, ale i etickým problémem. Jedná se o neurodegenerativní progradující onemocnění, které v současné době nejsme schopni vyléčit, jsme ale schopni alespoň zpomalit jeho postup. Je tedy důležité jej podchytit v co nejranější fázi, aby mohla být nasazena řádná medikace a zpomalen tak vývoj onemocnění. V současné době je diagnóza demence postavena zejména na klinické symptomatologii a sadě kognitivních testů (*Addenbrook cognitive examination*, *Mini mental state examination* nebo *Hatschinson score*), které sice dosahují vysoké senzitivity i specifity, ale vyžadují především dobrou spolupráci pacienta. Obtíže také panují i v odlišení jednotlivých typů demencí (zejména atypických forem), protože ty často bývají smíšené etiologie (např. Alzheimerovská demence kombinovaná s vaskulární demencí). Nejasnosti stále panují i ohledně přesné patogeneze většiny typu demencí. Pacient trpící demencí není omezen pouze svým současným fyzickým stavem, ale často především svojí neschopností se o sebe postarat (ať už z důvodu ztráty zažitých vzorců chování anebo pohybových schopností). Takový stav je velice náročný pro pacientovu rodinu. Metoda, která by kromě samotné diagnózy nabídla i možnost odhadnout rychlost progresu onemocnění, a tedy by rodině pomohla se připravit na nadcházející zdravotní stav (stavebními úpravami, jednáním s pečovatelskou službou) anebo umožnila dlouhodobé sledování vývoje nemoci k určení vhodné doby o zažádání o místo ve specializovaném centru, by měla významný přínos na udržení kvality soužití celé rodiny.

Proto je důležité nalézt objektivní metodu, která by detekovala brzké projevy neurodegenerativních onemocnění a která by pomohla k jejich časně diagnostice. Významný krok v tomto směru učinil Mgr. Jakub Klener pod vedením Dr. Vladimíra Kopeckého Jr., když ve své diplomové práci „Diagnostika neurodegenerativních chorob pomocí Ramanovy spektroskopie“ (2011) ukázal, že lze analýzou mozkomíšního moku pacientů s roztroušenou sklerózou a Alzheimerovou nemocí dosáhnout rozlišení nemocných pacientů a zdravých kontrol a navíc i obou nemocí navzájem. Ramanova spektroskopie je k těmto měřením vhodná jelikož využívá holistického přístupu a tudíž překračuje možnosti diagnostiky jednotlivých markerů daných onemocnění (τ -proteinu a β -amyloidu), které nejsou příliš senzitivní. Cílem

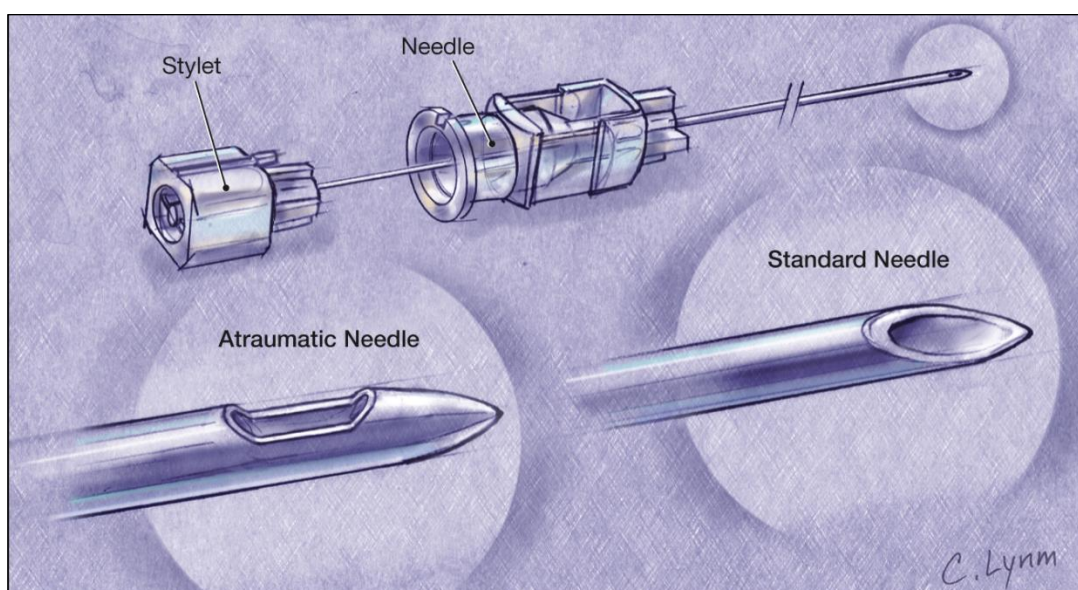
této práce je navázat na předchozí výzkum na širším vzorku pacientů a pokusit se rozšířit metodu na diagnostiku z krevního séra, které na rozdíl od mozkomíšního moku je dostupnější pro vyšetřování.

1. Mozkomíšní mok a sérum

1.1. Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok (MM) je čirá tekutina vyplňuje mozkové komory, míšní kanál a subarachnoidální a perivaskulární prostor. Zabezpečuje jednak mechanickou ochranu mozku při nárazech a je nezbytnou součástí metabolismu nervové tkáně (Sakka *et al.*, 2011). MM volně komunikuje s mozkovou intersticiální tekutinou (Tokuda & Kida, 2015). Složením se blíží krevní plazmě (tab. 1). Vzniká její ultrafiltrací, difuzí a aktivním transportem v buňkách *plexus choroideus*. U dospělého jedince jeho celkový objem tvoří 150 ml (125 ml v subarachnoidálním prostoru a 25 ml v komorách) (Sakka *et al.*, 2011). Během dne se vytvoří zhruba 600–700 ml MM, který po svém vzniku v mozkových komorách proudí do mozkových cisteren a subarachnoidálního prostoru (Junqueira *et al.*, 1997). Resorpce MM probíhá přes Pachioniovské granule (*villi arachnoides*) a také lymfatickými cestami podél hlavových nervů do krevního řečiště (Pollay, 2010). Takto mohou do krevního řečiště pronikat některé markery neurodegenerativních onemocnění, jako amyloid β v případě Alzheimerovy nemoci (Silverberg *et al.*, 2003).

Odběr mozkomíšního moku se provádí lumbální punkcí (LP). Tu lze provádět u sedícího či na boku ležícího pacienta. Punkce se provádí speciální tenkou jehlou zaváděnou za přísně sterilních podmínek (rouškování, dezinfekce kůže, atd.) do meziobratlových prostorů mezi čtvrtým a pátým bederním obratlem (nebo třetím a čtvrtým). Velkou výhodou je užití nových atraumatických jehel (obr. 1.1), které mají nižší výskyt syndromu nitrolební hypotenze vyvolaného odběrem příliš velkého množství mozkomíšního moku anebo unikáním moku mimo durální vak. Syndrom nitrolební hypotenze se projevuje bolestí hlavy, závratí, nauzeou až zvracením (Zeman, 2003).



Obr. 1. Jehly k lumbální punkci (převzato z (Strauss *et al.*, 2006))

Lumbální punkce je kontraindikována při nitrolební hypertenzi způsobené např. tumorem centrální nervové soustavy (CNS), kdy hrozí herniace mozkového kmene do páteřního kanálu. To může vést k útlaku center vitálních funkcí a ohrožení pacienta na životě. Proto by měla být každá LP doprovázena vyšetřením očního pozadí anebo zobrazovacím vyšetřením hlavy – CT/MRI (Zeman, 2003).

V současnosti je vyšetření MM využíváno hlavně při podezření na infekční onemocnění menigitidu/encefalitidu, kdy je v MM stanovován typ a počet bílých krvinek, hladina bílkoviny glukózy, chloridů (Ambler, 2006). Při podezření na subarachnoidální krvácení v MM nalézáme červené krvinky, nebo červené krevní barvivo. Nověji se vyšetření MM jeví přínosné zejména při podezření na nádorovou diseminaci, podezření na roztroušenou sklerózu, syndrom Guillain-Barre a také jako doplňující vyšetření při podezření na Alzheimerovu chorobu (Zeman, 2003).

Tab. 1. Složení mozkomíšního moku a plazmy (O. Kittnar *et al.*, 2011; wikipedia 2015; Vokurka *et al.*, 2004)

	Mozkomíšní mok		Sérum
Počet buněk	Malé lymfocyty – max. 5/mm ³		Jedná se o nebuněčnou složku krve
pH	7,33		7,3–7,4
Bílkovina	0,15–0,45 g/l	400 mg/l – lumbální krajina 100 mg/l – mozkové komory	65–85 g/l
Glukóza	2,5–4,5 mmol/l		3,9–5,6 mmol/l
Cl⁻	123–128 mmol/l		97–108 mmol/l
Na⁺	144–150 mmol/l		137–146 mmol/l
K⁺	2,0–3,0 mmol/l		3,8–5,0 mmol/l
Ca²⁺	1,1–1,25 mmol/l		2,0–2,75 mmol/l
Mg²⁺	2,25–2,5 mmol/l		0,7–1 mmol/l
Osmolalita	285 mosm/l		275–296 mosm/l
Specifická hmotnost	1003–1008		1027

1.2. Krevní sérum

Lidská krev se skládá z krevních buněk a plazmy. Krev při narušení cévní stěny má tendenci koagulovat, aby se zabránilo vykrvácení. Po koagulaci se skládá ze sraženiny (obsahující krevní elementy) a čiré žlutavé tekutiny, kterou nazýváme krevní sérum (KS) (Junqueira *et al.*, 1997). Krevní sérum je získáváno k diagnostickým metodám venepunkcí. Tedy napíchnutím jehlou žilního systému (nejčastěji v oblasti loketní jamky na ruce, nebo centrálního řečiště pomocí katetrizace jugulární vény nebo vény *subclaviae*). Je opět nutné postupovat sterilně,

ale jelikož je v krvi značné množství buněk imunitního systému, je riziko nákazy a její následné generalizace výrazně nižší než v případě MM. Odběr krve nemá absolutní kontraindikace, za relativní kontraindikaci lze však brát těžký krvácivý stav, kdy se obáváme vykrváčení pacienta. Tomu lze, ale většinou dobře předejít kompresí krvácející cévy, podáním tkáňových lepidel, v nejhorším případě krevní plazmy nebo transfuze. Odběr krve by neměl být proveden ze zánětlivě změněné žíly nebo trombotizované žíly (Staňková, 2009).

Vyšetření krve je dnes rutinně využíváno pro stanovování základních biochemických parametrů (ionty, albumin, celková bílkovina, atd.) i specializovaná vyšetření renálních a jaterních funkcí a mnoho dalších speciálních vyšetření (jako jsou hladiny hormonů atd.)

Výhodou testování KS jsou tedy jednak, nižší rizika odběru. Také nižší náročnost samotného odběru, který na rozdíl od LP nemusí provádět lékař, ale i zdravotní sestry (Song *et al.*, 2009). Ze stejného důvodu je krevní odběr ideální i pro pravidelné sledování chronicky nemocných pacientů. Dospělý člověk má 4–6 litrů krve, tudíž odběr ve většině případů nevyvolává žádné nežádoucí účinky.

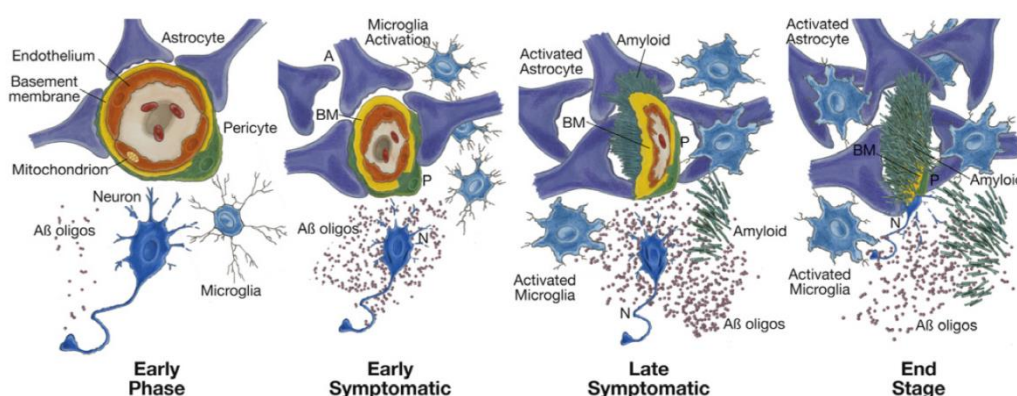
1.3. Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) je 0,3–0,5 μm tlustá membrána omezující difuzi krevních buněk a většiny molekul mezi krví a mozkovou tkání (Zolkovic, 2005). Tvoří součást tzv. neurovaskulární jednotky složené z endotelu mozkových kapilár, zakončených astrocyty a pericyty (Ballabh *et al.*, 2004), která zaručuje fyziologickou výměnu látek krve a CNS. Anatomickou podstatou HEB je těsné spojení endotelových buněk mozkových kapilár. Bylo odhadnuto, že každý neuron v mozku má svojí vlastní kapiláru a celková plocha HEB je $\sim 12 \text{ m}^2$ (Zolkovic, 2005). Funkčně nejdůležitější částí této bariéry je subcelulární spojení transcelulárních membrán endotelových buněk (*tight junction*) (Hawkins & Davis, 2005). To je tvořeno proteinovou sítí mnoha proteinů jako occludin, claudin, proteiny ZO-1 a ZO-2, atd., zamezující paracelulárnímu transportu zejména polárních látek, které mohou ve zbytku systémového oběhu pronikat kapilárními fenestracemi (mezi buněčnými póry ohraničenými pouze bazální laminou kapiláry), které v CNS nejsou (Hawkins, 2005). Naopak malé lipofilní ($< 400 \text{ kD}$) molekuly jako O_2 a CO_2 pronikající plazmatickými membránami prochází HEB bez problémů. Struktury *tight junction* zapříčiňují i dynamiku HEB. Různá exprese klíčových proteinů ovlivňuje permeabilitu HEB, např. při depleci Ca, nebo jeho vyšší intracelulární koncentraci (Hawkins & Davis, 2005).

Kromě výše zmíněné HEB, tvořené buněčnými spojeními, lze mluvit i o tzv. enzymatické HEB. Tu tvoří exoenzymy na povrchu endotelu CNS, které štěpí některé látky, které by byly schopné na základě svých fyzikálních vlastností buněčnou HEB překonat (Zolkovic, 2008).

Živiny (glukóza a aminokyseliny) pronikají do mozku přes selektivní transportéry a větší molekuly jako insulin, leptin a transferin přes receptorem zprostředkovanou

endocytózu (Ballabh *et al.*, 2004). Touto formou je zaručena značná selektivita látek přestupujících ze systémového oběhu do MM a naopak. To zásadně ovlivňuje i možnost farmakologické terapie onemocnění CNS, tím že zabraňuje přestupu přibližně 98 % malých i velkých molekul včetně léků (většinou na bázi peptidů, bílkovin, nebo anti-sense DNA/RNA) (Zolkovic, 2008). Při hypoperfuzy mozku, zánětlivé afekci, nebo neurodegenerativním onemocnění (Alzheimerova nemoc, amyotrofická laterální skleróza, Parkinsonova nemoc) dochází k narušení HEB. Porucha HEB může být nejen projevem onemocnění, ale také se může přímo podílet na jeho patogenezi (obr. 1.2). Ovlivňuje totiž průnik neurotoxických látek z, a nebo do mozkové tkáně (Zolkovic, 2008). Při Alzheimerově nemoci dochází k akumulaci amyloidu β ($A\beta$) na povrchu kapilár a vzniku mozkové amyloidní angiopatie (CAA). Pacienti se sporadickou formou Alzheimerovi nemoci většinou nemají zvýšenou produkci $A\beta$, ale mají narušeno jeho odstraňování z MM (Zolkovic, 2008). To je způsobeno nedostatečnou angiogenezí a nedostatečnou expresí transportních proteinů HEB pro $A\beta$, jak exkrečních jako LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*), tak inkrečních (e.g. RAGE – receptor pro končené produkty pokročilé glykosylace) (Zolkovic, 2005). To společně se zhoršením přísunu živin vyvolává lokální zánětlivou reakci ústící v poškození neuronů (Zolkovic, 2005). Interakce $A\beta$ s RAGE, který je hlavním transportérem $A\beta$ v HEB, vyvolávají uvolnění endothelinu 1 a vazokonstrikci mozkových kapilár. Tento jev je pozorovatelný na pozitronové emisní tomografii (PET) či magnetické rezonanci (MRI) a vede k přerušení zvýšeného prokrvení aktivní mozkové tkáně (Zolkovic, 2005). Na základě současných poznatků nelze rozhodnout zdali příčina AD je primárně neurální nebo neurovaskulární, ale podíl neurovaskulárních mechanismů a narušení funkce HEB dává dostatečné oprávnění k předpokladu vývoje diagnostické metody Alzheimerovy demence na základě vyšetření séra.



Obr. 1.2. Schematické vyobrazení podílu poškození neurovaskulární jednotky na rozvoji Alzheimerovy nemoci (převzato ze (Zolkovic, 2008)). Hypoperfuze mozku a porušení HEB vedou k akumulaci toxického $A\beta$. V počátečním symptomatickém stadiu následně dochází k aktivaci mikroglíí a astrocytů a poruše synaptického přenosu. V průběhu pozdního symptomatického stádia dochází k odumření endotelových buněk a kumulaci toxických odpadních látek ústící ve ztrátu

neuronálních funkcí. V konečném stádiu kolabuje kapilára a neuronální buňka se rozpadá.

2. Ramanova spektroskopie

2.1. Úvod

Ramanova spektroskopie (RS) je spektroskopická metoda využívající rozptyl záření na molekulách studovaného vzorku. Jedná se o dvoufotonový jev, kdy při interakci záření s vibračními hladinami rozptylující částice zaniká dopadající foton a emituje se okamžitě nový. Jde tedy o nepružný rozptyl s rozdílnou energií dopadajícího a vyzářeného fotonu. Tento jev můžeme pozorovat jako posun vlnové délky emitovaného záření, který odpovídá energii jednotlivých vibračních hladin. Ramanův rozptyl nás tedy stejně jako infračervená spektroskopie informuje o vibračním spektru částic analytu, přesto infračervená a RS mají důležité odlišnosti (viz tab. 2).

Tab. 2. Srovnání Ramanovy spektroskopie a infračervené spektroskopie (Peeran & Srinivasamurthy, 2005)

Ramanova spektroskopie	Infračervená spektroskopie
Při aktivní vibraci se mění polarizovatelnost molekuly	Při aktivní vibraci je nutná změna dipólového momentu
Lze užít vodu jako rozpouštědlo (užití zdrojů ve viditelné nebo NIR oblasti)	Voda představuje problémové rozpouštědlo pro její silnou absorpci
Vzorek může být téměř v jakékoliv formě	Prášky či gely mohou být problematické
Relativně nákladná metoda	Ve srovnání s RS levně
Nízký signál	Dostatečně silný signál
Nízký poměr signálu a šumu a vysoké fluorescenční pozadí	Fluorescence vzorku nepředstavuje problém

RS je z výše uvedených důvodů velice výhodná pro biomedicínské aplikace. Na rozdíl od jiných metod optické/elektronové mikroskopie nevyžaduje barvení a ani dodatečné značení k rozlišení jednotlivých struktur a při detekci zpětného Ramanova rozptylu (RR) lze měřit i vzorky *in vivo*.

Historie objevu Ramanova rozptylu je velice zajímavá. Snaha vysvětlit modrou barvu nebe vedla Lorda Rayleigha k formulaci teorie klasického rozptylu. Raman byl naopak fascinován modrou barvou středomořského moře, což ho přivedlo ke zkoumání rozptylu světla tekutinami a objevu Ramanova rozptylu (Long, 2002). Tento objev nejprve společně s Krishanem publikoval v *Indian Journal of Physics* (Raman & Krishan, IJP, 1928) a později 31. 3. 1928 také v krátké zprávě v časopisu *Nature* (Raman & Krishan, Nature, 1928). Jen těsně tak tento objev unikl dvěma sovětským vědcům, kteří, i když jej jistě pozorovali jako první, z objektivních příčin nestihli článek publikovat dříve než 13. 8. 1928. Byli to Landsberg s Mandelstamem,

kteří pozorovali Ramanův rozptyl na krystalu křemíku (Landsberg & Mandelstam, 1928). Teoretická předpověď Ramanova rozptylu však byla učiněna již o pět let dříve vídeňským fyzikem Adolfem Smekalem (Smekal, 1923). Za objev tohoto neelastického rozptylu však roku 1930 obdržel Nobelovu cenu za fyziku pouze C. V. Raman. O systematické vybudování teorie Ramanova rozptylu se poté zásadně zasloužil významný brněnský fyzik, působící v zahraničí, Georg Placzek.

2. 2. Klasická teorie Ramanova rozptylu¹

Při dopadu monochromatické elektromagnetické vlny

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad (2.1.-1)$$

dochází k indukci elektrických a magnetických multipólů v rozptylující částici. Nejsilnějším příspěvkem této interakce je elektrický dipólový člen. Nicméně na rozptylu se podílí i členy nižších řádů jako je elektrický kvadrupólový člen a magnetický dipólový člen, atd., jejichž zahrnutím lze získat přesnější popis. Pro naše účely postačí zahrnutí pouze dipólového členu, který budeme značit $\vec{p}(\omega)$. Přičemž závorka vyjadřuje jeho závislost na frekvenci dopadající vlny ω_0 . Velikost indukovaného dipólu je přímo úměrná intenzitě dopadajícího záření \vec{E} podle vztahu

$$\vec{p}(\omega_0) = \vec{\alpha} \vec{E}(\omega_0) \quad (2.1.-2)$$

Tenzor polarizovatelnosti $\vec{\alpha}$ je obecně funkcí vibračních (vnitřních souřadnic Q_k a závisí tedy i na k nim příslušejících vibračních módech ω_k . V rovnovážné poloze ho můžeme pomocí Taylorova rozvoje vyjádřit jako:

$$\alpha_{ij} = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots \quad (2.1.-3)$$

Index nula značí hodnotu dané veličiny v rovnovážné konfiguraci. Omezíme-li se pouze na první dva členy rozvoje (tzv. harmonická aproximace) a označíme si

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 = (\alpha_{ij})_k \quad (2.1.-4)$$

Předpokládejme dále harmonické chování souřadnic Q_k podle frekvence ω_k

$$Q_k = Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \quad (2.1.-5)$$

Dosadíme-li do vztahu (2) ze vztahu (1), (3), (4) a (5) získáme

$$\vec{p}(\omega) = \vec{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \sum_k \overleftarrow{a}_k Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \quad (2.1.-6)$$

Roznásobíme-li oba cosiny pomocí základních trigonometrických identit

$$\cos(x) \cos(y) = \frac{1}{2} [\cos(x + y) + \cos(x - y)] \quad (2.1.-7)$$

Teorii klasického Ramanovského rozptylu jsem zpracoval dle knihy *The Raman Effect* (Long, 2002).¹

Můžeme vztah (6) vyjádřit jako:

$$\vec{p}(\omega) = \vec{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \sum_k \overleftarrow{a}_k Q_{k0} \vec{E}_0 \cos[(\omega_0 + \omega_k)t + \delta_k] + \frac{1}{2} \sum_k \overleftarrow{a}_k Q_{k0} \vec{E}_0 \cos[(\omega_0 - \omega_k)t - \delta_k] \quad (2.1.-8)$$

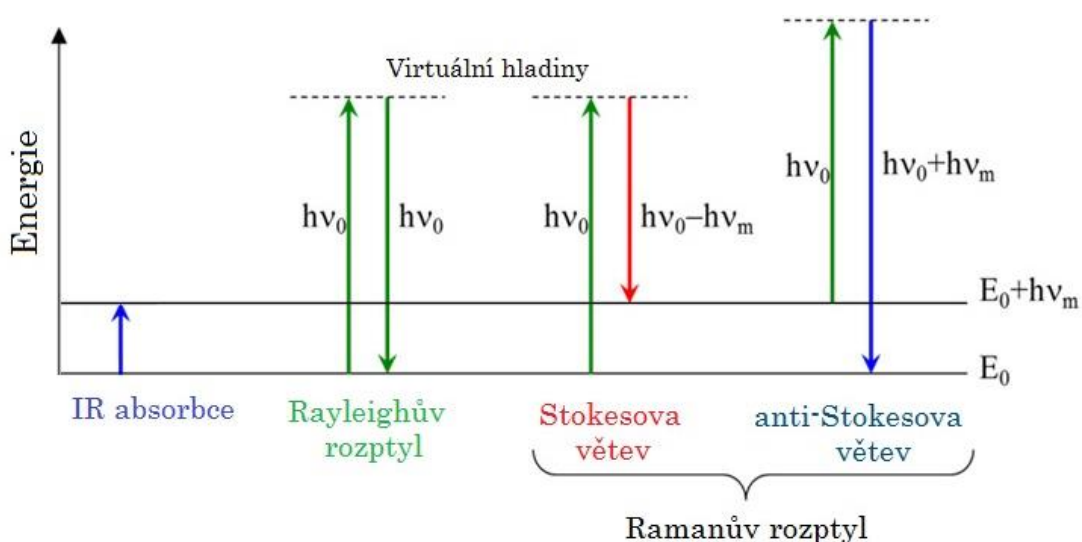
Výraz se skládá ze tří částí odpovídajících kmitům o různých frekvencích (ω_0 dopadajícího záření, a rozdílové a součtové frekvenci dopadajícího záření a vlastní vibrační energie k -módu). První člen odpovídá Rayleighovu rozptylu, druhý člen nazýváme *anti-stokesovou* a poslední *stokesovou větví* Ramanova rozptylu. Stokesovská větev nese název podle Stokesova zákona platného pro fluorescenční záření (obr. 2.1). Můžeme tedy předchozí vztah vyjádřit pomocí rovnice

$$\vec{p}(\omega) = \vec{p}^{Rayleigh}(\omega_0) + \vec{p}^{Raman-antistokes}(\omega_0 + \omega_k + \delta_k) + \vec{p}^{Raman-stokes}(\omega_0 - \omega_k - \delta_k) \quad (2.1.-9)$$

Foton emitovaný Ramanovým rozptylem není na rozdíl od Rayleighova rozptylu ve fázi s dopadajícím zářením. Jelikož vibrace molekul mají většinou náhodnou fázi vůči dopadajícímu záření je Ramanovo záření nekoherentní. Označíme-li

$$\frac{1}{2} \overleftarrow{a}_k Q_{k0} = \vec{\alpha}_k^{Raman} \quad (2.1.-10)$$

Tento člen nám udává, že k Ramanovu rozptylu dochází pouze za předpokladu, že člen $\vec{\alpha}_0$ je nenulový. Toto nastává, pokud dochází ke změně konfigurace jader při normální vibraci. Aktivita Ramanova rozptylu tak závisí na symetrii molekuly a daného vibračního vztahu.

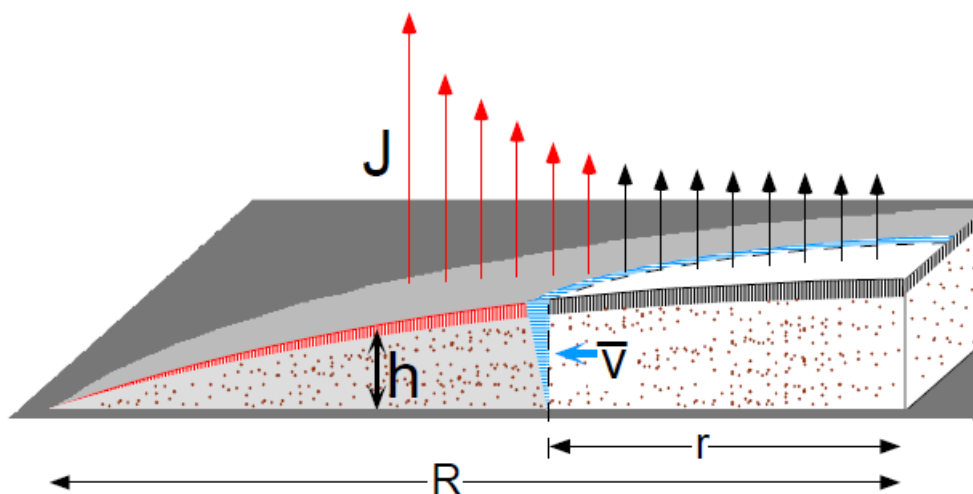


Obr. 2.1. Principu IR absorpce, Rayleighova a Ramanova rozptylu

2.3. Teorie Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků

Tato metoda využívá mikrospektroskopie povlaku destičky vzniklého vyschnutím kapky zkoumaného vzorku na vhodném hydrofobním povrchu. Zásadním přínosem

této metody je možnost analyzovat vzorek o velice nízkých koncentracích (až $1000\times$ nižších než v klasické RS), který by díky nízké intenzitě klasického RS nebyl analyzovatelný (Zhang et al., 2003).



Obr. 2.2. Vysychání kapky (převzato z Deegan *et al.*, 1997). J – značí proud vypařující se tekutiny, h – výšku kroužku, v – proud částic k hraně kroužku, R – poloměr kapky a r – vzdálenost od středu kroužku.

Pro správnou interpretaci výsledků, je důležité pochopit proces vysychání nanesené kapky. Při vysychání kapky kávy dochází k vzniku silnějšího kroužku na okraji. První popis tohoto jevu přinesli Deegan *et al.* v roce 1997, kteří pozorovali usazování pevných částic na okrajích kapky a nazvali jej *efektem kávového kroužku* (Deegan *et al.*, 1997). Jejich interpretace se zakládá na rovnováze sil povrchového napětí a povrchových interakcích, které udržují stabilní poloměr kapky, i když postupně dochází k vypařování rozpouštědla. Protože dochází ke zmenšování objemu kapky, musí být odpařené rozpouštědlo na kraji kapky nahrazováno tokem rozpouštědla z jejího středu. Takto vzniklý proud sebou unáší pevné částice. Je zřejmé, že rychlost tohoto proudění je úměrná rychlosti vypařování. Jeli vypařování dostatečně pomalé, dochází ke vzniku ustáleného stavu koncentrace φ na povrchu vypařující se kapky, který lze popsat rovnicí difuze ve tvaru:

$$\Delta\varphi = 0 \quad (2.3.-1)$$

Proud páry (obr. 2.2.) z povrchu kapky je pak dán vztahem podle Fickova zákona:

$$J(r) = -D\nabla\varphi \quad (2.3.-2)$$

kde D je difúzní koeficient páry a r je horizontální vzdálenost od středu kapky. Jedná se o parciální diferenciální rovnici, která odpovídá základním rovnicím elektrostatiky. Proto můžeme považovat kapku za vodič o fixním potenciálu φ s rovinou symetrie v rovině podložního sklíčka. Řešení takové úlohy lze nalézt v základních učebních klasické elektrodynamiky (Maxwell, 1890). Pro výsledný tok takto získáme vztah popisující divergentní proud:

$$J(r) \propto (R - r)^{\frac{-(\pi-2\theta_c)}{(2\pi-2\theta_c)}} \quad (2.3.-3)$$

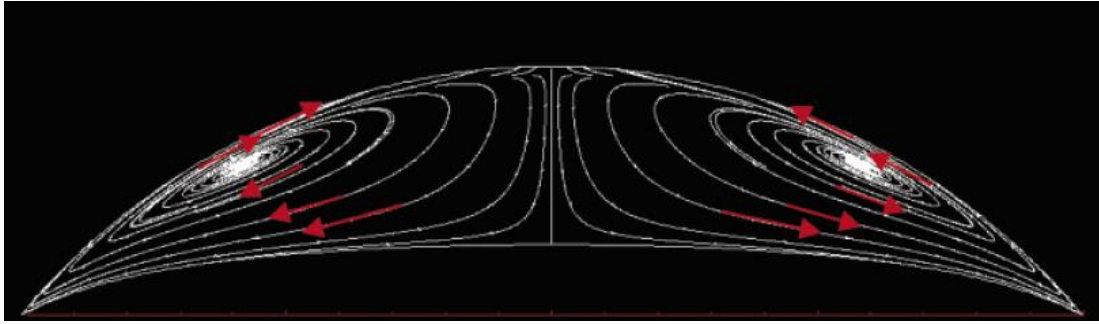
Kde R představuje celkový poloměr kapky a malé r představuje horizontální vzdálenost místa toku od středu kapky a θ_C je kontaktní úhel kapky s povrchem. Na konci vypařování v čase t_f klesne výška kapky $h(r)$ na nulu stejně jako výraz $t_f - t$. Tok v kapce k okrajům $h(r) \cdot v(r)$ však musí být zachován, aby doplnil rozpouštědlo ztracené vypařováním. Z toho lze vyvodit závislost rychlosti rozpuštěných částic na čase:

$$v(r) \propto \frac{1}{(t_f - t)} \quad (2.3.-4)$$

V čase t_f budou veškeré rozpuštěné částice transportovány na okraj, kde vytvoří prstýnek.

Ve skutečnosti dle pozorování (Hu & Larson, 2002) probíhá vypařování ve dvou fázích. Nejprve dochází ve shodě s předpokladem práce (Degan *et al.*, 1997) k vypařování při konstantním průměru kapky. Při poklesu kontaktního úhlu kapky s podložkou (2° – 4° u vody) se začíná průměr kapky smršťovat. Druhá fáze tvoří, ale pouze zlomek celkové doby vysychání kapky (Hu & Larson, 2002).

Ve skutečnosti může být efekt kávového kroužku komplikován tzv. *Marangoniho efektem* (obr. 2.3). Jedná se o vznik reversního proud působícího proti proud částic k okrajům kapky, v kapce tak vzniká cirkulující proudění (Hu & Larson, 2006). Marangoniho efekt je zapříčiněn teplotním gradientem v kapce vznikajícím během odpařování rozpouštědla. Odpařováním dochází k ochlazení povrchu kapky. Podložní povrch je naopak teplotně stabilnější a tudíž vrstva rozpouštědla, která je v kontaktu s povrchem, si zachovává původní teplotu. Vrchlík kapky se tak stává nejchladnější oblastí s vyšším povrchovým napětím, než má okraj kapky (Hu & Larson, 2006). Následně dochází ke vzniku proudění z míst s nižším do oblastí s vyšším povrchovým napětím. Při poklesu kontaktního úhlu pod 14° způsobí silné vypařování na okraji kapky změnu směru Marangoniho proudu. Vrchlík kapky již není dále dostatečně vzdálen od podložky, a proto přestává být nejchladnější oblastí, naopak okraj kapky ztrácí teplo silným vypařováním, narůstá tak povrchové napětí vedoucí k vzniku obráceného Marangoniho proudu (Hu & Larson, 2005). Vliv Marangoniho proudění na rozložení pevných částic ve vysychajících kapkách závisí nejen na teplotě, ale i na složení rozpouštědla. U vody je Marangoniho proudění velice slabé vlivem časté kontaminace vody detergenty (Hu & Larson, 2006). Naopak, např. v případě oktanu je Marangoniho proudění dostatečně silné, aby způsobilo depozici pevných částic v centru kapky (Hu & Larson, 2006). Efekt kávového kroužku může být také potlačen eliptickým tvarem rozpuštěných částic. Anizotropie tvaru částic vytváří silné daleko-dosahové kapilární interakce mezi částicemi. To vede ke vzniku povrchové sítě těchto částic bránící depozici na okraji kroužku. Podobný vliv kromě tvaru částic lze očekávat i v závislosti na chemické heterogenitě a drsnosti částic (Vermant, 2011). Yunker *et al.* ukázali, že i malá příměs eliptických částic k sférickým částicím může potlačit efekt kávového kroužku. Povrchová síť eliptických částic, může být narušena přidáním detergentu, což ukazuje závislost tohoto efektu na povrchovém napětí (Yunker *et al.*, 2011).



Obr. 2.3. Marangoniho proudění (převzato z Hu & Larson, 2006)

2.4. Ramanova spektroskopie v biomedicíně

Vývoj nových technologií, jako magnetická rezonance, ultrazvuk či počítačové tomografie (CT), rozhodující měrou ovlivnil moderní medicínu tím, že umožnil *in vivo* diagnostiku. Tyto zobrazovací metody jsou ideální pro popis orgánů a makrostruktur lidského těla, ale nejsou vhodné k analýze na buněčné a sub-buněčné úrovni. Využití RS jako zobrazovací metody k analýze tkání *in vitro* nebo *in vivo* je v současnosti věnován značný zájem (Kong *et al.*, 2015)

Jednou z největších výzev současné medicíny je léčba gliomu (maligní tumor mozku), který je druhou nejčastější příčinou smrti u pacientů mezi 15 až 44 rokem života (Kong *et al.*, 2015). Přes zlepšení diagnostiky právě díky CT a zavedení stereotaktické operativy je neustále střední dožití u nejmladnějšího typu glioblastomu multiforme pouhý jeden rok. Zlatým standardem v klasifikaci a gradingu neurálních nádorů je histopatologické vyšetření. Problémem proto zůstává, jak co s největší přesností určit hranice tumoru během operace. RS se zdá být nadějnou metodou pro *in vivo* diagnostiku. Umožňující rozlišení na úrovni jednotlivých buněk bez nutnosti značení, což by zajistilo přesné určení hranic nádorové tkáně (Diem *et al.*, 2008).

2.5. Ramanova spektroskopie biotekutin

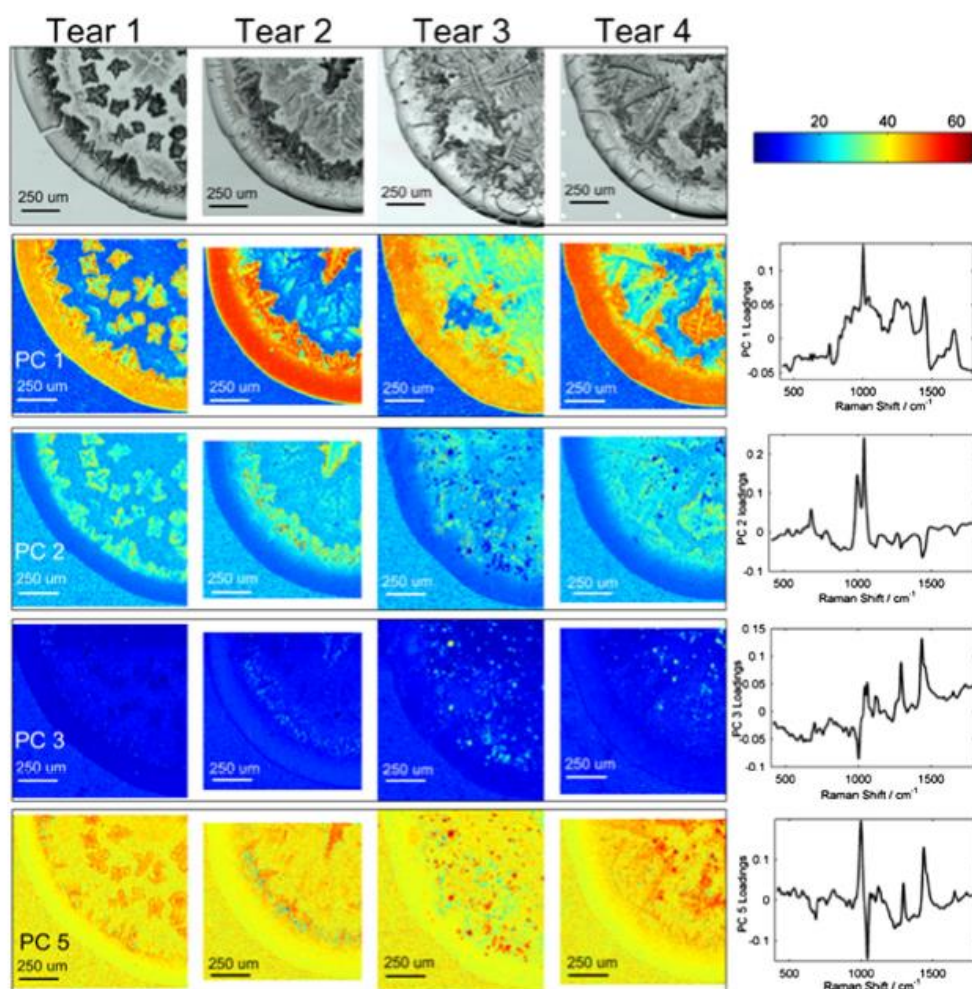
Základním médiem obsaženým v tělních tekutinách je voda, která má malý absorpční koeficient pro Ramanovu spektroskopii (Lasch & Kneipp, 2008), kde rozptylující záření je většinou ve viditelné oblasti, a naopak vysoký v oblasti středního infračerveného záření. Proto je tedy RS ideální pro výzkumu tělních tekutin (biotekutin) (Lasch & Kneipp, 2008). Za biotekutinu lze považovat slzy (obr. 2.4), moč, krev a mozkomíšní mok (Kong *et al.*, 2015). Bohužel tělní tekutiny obsahují vysoký obsah fluorescenčních molekul (Lasch & Kneipp, 2008). Tudíž se často potýkáme s vysokým fluorescenčním pozadím značně převyšujícím signál RR. Emise fluorescenčního záření klesá o několik řádů s nárůstem vlnové délky excitačního záření, a proto se nabízí blízká infračervená oblast jako vhodnější pro excitaci (Lasch & Kneipp, 2008). Bohužel, ale také klesá intenzita RR, jelikož závisí na vlnové délce λ jako λ^{-4} , a tak může být naměřena vysoká intenzita pouze při vysoké koncentraci biotekutiny a nebo pomocí povrchově zesíleného RR. Ideální

možnost jak zvýšit koncentraci dané biomolekuly v tekutině je užití DCDR spektroskopie (Zhang *et al.*, 2003). Fluorescenční pozadí lze také snížit ultrafiltrací velkých molekul, které se v biotekutině projevují jako fluorofory, nebo lze využít tzv. vybělování (*photo-bleaching*) (Lasch & Kneipp, 2008), kdy s narůstající dobou osvětlení se deaktivuje více a více fluoroforů a pozadí klesá (Van der Engh & Farmer, 1992). Další možností je užití matematických metod (pomocí proložení polynomem pozadí odečíst, což uchová ve spektru signál odpovídající větším proteinům (Lasch & Kneipp, 2008)). Bohužel, ale dochází v těchto spektrech k nárůstu šumu, který je úměrný druhé odmocnině celkové intenzity a nelze jej odečíst. Naopak při ultrafiltraci šum klesá (Lasch & Kneipp, 2008).

2.5.1. Ramanova spektroskopie mozkomíšního moku

RS mozkomíšního moku stále patří mezi okrajové oblasti výzkumu. Podílí se na tom pravděpodobně specifické vlastnosti MM v porovnání s ostatními tělesnými tekutinami. Hlavně nestabilita MM, která významně ovlivňuje reprodukovatelnost výsledků (Klener *et al.*, 2014).

Jak bylo řečeno v úvodu, lze použít RS jako diagnostickou metodu k rozlišení pacientů s Alzheimerovou chorobou a roztroušenou sklerózou (Klener *et al.*, 2011). Dále se RS také jeví velice slibně jako diagnostický postup akutní meningitidy (Gonchukov, 2014), kdy může nahradit dlouho trvající kultivaci bakterií v MM detekcí pomocí mikroskopické Ramanovy spektroskopie jediné bakterie. Bylo ukázáno, že takto lze odlišit jednotlivé druhy bakterií a tak hned od počátku lépe zacílit terapii (Harz *et al.*, 2009).



Obr. 2.4. Čtyři vzorky slz měřené pomocí DCDR spektroskopie a analyzované metodou hlavních komponent (převzato z Filik & Stone, 2008). V první řádce jsou zobrazeny fotografie vyschlých kapek slz čtyř dobrovolníků. V následujících řádcích jsou vyneseny hodnoty koeficientů první až páté hlavní komponenty v bodech měření. Příslušná subspektra jsou pak zobrazena v pravém sloupci.

2.5.2 Ramanova spektroskopie krevního séra

RS se jeví jako potenciálně velice zajímavá metoda pro zkoumání krevního séra. Krevní sérum jako nejdostupnější biotekutina, která díky cirkulaci celým tělem nese informaci o celkovém stavu pacienta, je již v současnosti rutinně využívána v řadě biochemických diagnostických, screeningových a kontrolních metod. Většina specifických molekul (proteinové povahy) je v dnešní době analyzována pomocí immunoesejí (ELISA, RIA). RS je potenciálně výhodnější tím, že nevyžaduje, jako je to mu v případě uvedených metod, výrobu speciálních protilátek (Kong *et al.*, 2015), což by mohlo mít zejména rozhodující efekt v případě biochemického screningu dědičných metabolických poruch (DMP). DMP jsou naštěstí vzácné, ale vážné typy onemocnění. Současné metody selektivně vyšetřují pouze nejčastější

onemocnění. RS-mikroskopie by svým holistickým přístupem mohla zlepšit záchyt vzácnějších forem DMP, které lze následně rozlišit pomocí sekvenování DNA.

Přínosná by dozajista byla i možnost analýzy spektra KS povrchových žil bez nutnosti odběru punkcí. Bylo ukázáno, že takovýto přístup by usnadnil monitorování glykemie u pacientů s diabetem melitus (Kong *et al.*, 2015). Diabetes v současnosti vyžaduje pravidelné odběry kapilární krve několikrát za den, což značně nepříjemné pro pacienty a vyžaduje dobrou edukaci a spolupráci pacienta. RS naopak může sledovat hladiny glukózy neinvazivně a navíc nepřetržitě, a tak lépe přizpůsobovat terapii akutnímu stavu pacienta (Kong *et al.*, 2015).

Analýzu krevního séra lze uplatnit i v nádorové diagnostice a monitorování tzv. reziduální nemoci. Bylo ukázáno, že lze rozpoznat nádorové a nenádorové buňky. Funkčnost RS analýzy séra v diagnostice nádorů byla ukázána u hepatocelulárního karcinomu, karcinomu prsu, karcinomů hlavy a krku, lymfomů a karcinomu prostaty (Kong *et al.*, 2015).

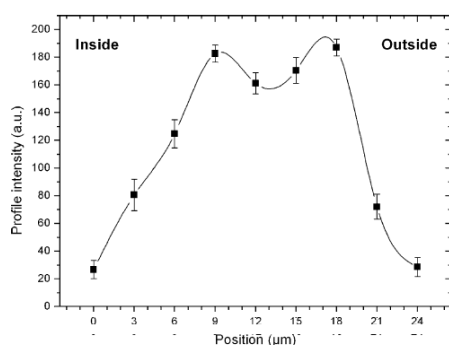
RS lze užít i v případě určení závažnosti *Astma bronchiale* a upřesnění jeho léčby. Byl ukázán její přínos v analýze počínající infekce malárie, hodnocení hladin koagulačních faktorů a zánětlivých markerů (Kong *et al.*, 2015), kde RS umožňuje odlišit pacienty v sepsi od pacientů se syndromem systémové zánětlivé reakce z neinfekčních příčin a tedy rozhodnout o nutnosti a míře antibiotické léčby.

2.6. Aplikace DCDR spektroskopie

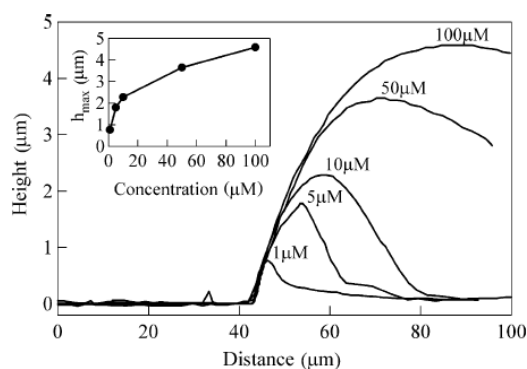
Od svého objevu byla Ramanova spektroskopie omezena svou nízkou senzitivitou, která vyžadovala vyšší koncentrace analytu (Gauglitz *et al.*, 2003) než jiné analytické (Zhang *et al.*, 2003) nebo spektroskopické metody (Gauglitz *et al.*, 2003). Přestože bylo objeveno několik velice sofistikovaných technik řešících tento nedostatek, jako například povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), nebo rezonační Ramanův rozptyl, přinášely i tyto techniky nové komplikace měření – zejména nežádoucí změny pozadí (Zhang *et al.*, 2003). SERS také zesiluje signál vibrací v závislosti na jejich orientaci ke koloidnímu povrchu a tím vnáší do spekter novou diferenci (Moger *et al.*, 2007). Je proto s podivem, že až v roce 2003 skupina kolem prof. Ben-Amotze přišla s užitím konfokální Ramanovy mikrospektroskopie kapkově nanášených povlaků (*drop coating Raman spectroscopy* – DCDR) k měření Ramanova signálu vzorků o velmi nízké koncentraci $\sim 1 \mu\text{Mol}$ (Zhang *et al.*, 2003). Toto pozorování, tak umožnilo využití RS se srovnatelnou koncentrací vzorku jako citlivé analytické metody např. hmotnostní spektroskopie nebo vysokotlaká kapalinová chromatografie (Zhang *et al.*, 2003). DCDR spektroskopie na rozdíl od těchto metod navíc umožňuje analyzovat i sekundární strukturu vzorků (Zhang *et al.*, 2003). V následujících letech se soustředil výzkum DCDR spektroskopie na optimalizaci měřících podmínek a jejich reprodukovatelnost. Již Zhang *et al.* se ve svém článku zabývali vlivem substrátu, na kterém dochází k vysušení kapky, na naměřená spektra a definovali vlastnosti ideálního DCDR substrátu. Ten by měl mít nízkou optickou absorbanci, vysokou odrazivost, malý nebo žádný signál přispívající

k pozadí měření a zejména nesmáčivý povrch, který brání rozlití analytu na rozsáhlou oblast, čímž by bylo narušeno jeho zakoncentrování. Koncentrování vzorku je kromě vypařování rozpouštědla u některých látek podpořeno *efektem kávového kroužku*, kdy molekuly analytu vytváří prstýnek na okraji vyschlé kapky (Zhang *et al.*, 2004). Proto nesmáčivost povrchu zásadně přispívá k zakoncentrování vzorku a zvyšuje detekční limit metody (Zhang *et al.*, 2003). Zhang *et al.* následně vyzkoušeli různé substráty jako teflonem potaženou destičku z nerezové oceli, zlatou folii, pozlacené sklíčko s/a nebo bez organické monovrstvy. Nejlepší výsledky však poskytovala nerezová destička s vrstvou teflonu. Další substráty pak testovali Filik a Stone při svém výzkumu užití DCDR spektroskopie k analýze směsi proteinů o koncentraci odpovídající složení slz (Filik & Stone, 2007). Ve své práci vyzkoušeli CaF_2 a křemenná sklíčka. Křemenná sklíčka způsobovala silné luminiscenční pozadí při užití laseru o vlnové délce 830 nm, proto nejsou pro DCDR měření v dané oblasti příliš vhodná. Naopak CaF_2 poskytoval pozadí bez výrazných vibračních pásů, a tak umožňoval vysokou kvalitu naměřených spekter. V porovnání s ocelovou destičkou pokrytou vrstvou teflonu, ale vyžadoval CaF_2 delší dobu akvizice, kvůli menší odrazivosti. CaF_2 má také silný pás v oblasti 320 cm^{-1} , který znemožňuje měření v dané oblasti, avšak může oproti tomu sloužit jako interní standard (Filik & Stone, 2007). Malý Ramanův rozptyl vody a možnost analýzy sekundární struktury (Zhang *et al.*, 2003) způsobily zájem o využití DCDR spektroskopie ke zkoumání proteinů. Filik a Stone při studiu směsi proteinů lidských slz (lysozymu, lactoferinu, albuminu) pozorovali vysušení kapky na CaF_2 . Doba vysychání byla přibližně dvacet minut a vedla ke vzniku prstýnku o šířce $\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ a průměru 1,7 mm (Filik & Stone, 2007). Pro podrobnější měření vzorků proteinů bylo nutné ověřit závislost měření na koncentraci vzorku, místě snímání spektra a ověřit, zdali nedochází při vysychání kapky ke změně sekundární struktury vzorku. Kopecký a Baumruk ukázali, že na vnějším okraji vzorku vaječného albuminu se nachází vrstva plně vyschlého proteinu, jejíž spektrální profil se výrazně liší od spekter měřených v roztoku. Doporučili proto užívat k měření vnitřní a střední část proužku (Kopecký & Baumruk, 2006). Následně zjistili, že lze spektrální pásy rozdělit do dvou skupin podle jejich změn v průběhu šířky proteinového proužku. První skupina byla necitlivá na změny lokálního okolí a v průběhu šířky prstýnku se neměnila její intenzita, která tak odpovídá množství proteinu, a proto může být užita k normalizaci. Druhá skupina odpovídající vibračním postranním aminokyselin naopak vykazovala výrazné změny v relativních intenzitách pásů podél šířky prstýnku a podává tak zprávu o lokálních změnách konformace v proteinu. Poukázali také na vliv koncentrace na utváření prstýnku. Při příliš vysoké koncentraci dochází k vzniku prasklin vzorku a formování krystalické fáze, při příliš nízké koncentraci je narušena tvorba prstýnku. Jako nejvhodnější koncentraci proto doporučili 0,1 mg/ml. Dále proměřili profil proteinového prstýnku (obr. 2.5) a na základě interference odhadli výšku kroužku na 600 nm (Kopecký & Baumruk, 2006). Přesné proměření výšky prstýnku a její závislost na koncentraci vysoušeného vzorku proměřili pomocí mikroskopie atomárních sil Oritz *et al.* (obr. 2.5). S rostoucí koncentrací nevzrůstá výška kroužku lineárně a je kromě koncentrace určena také typem substrátu

a složením proteinu. Ve stejné práci bylo ukázáno, že ani hodinu dlouhé měření při užití laseru do 150 mW nezpůsobovalo poškození vzorku (Ortiz *et al.*, 2006). Ortiz *et al.* se dále zabývali reprodukovatelností DCDR měření. Ukázali, že není žádný spektrální rozdíl mezi měřeními z různých kapek téhož vzorku při stejné i různé koncentraci ($\geq 10 \mu\text{M}$). Při nižší koncentraci, ale narůstá poměr signál/šum. Při koncentraci $\sim 2 \mu\text{M}$ pozorovali spektrální změny naměřeného vzorku, které bylo možné eliminovat depozicí většího objemu vzorku. V okolí rozhraní protein–substrát se spektrum odlišovalo od vyšších vrstev, což je pravděpodobně způsobeno interakcí proteinu se substrátem. Tato interakce je omezena jen na několik málo monovrstev proteinu, jelikož nebyla nalezena žádná diference mezi spektry měřeními na různých substrátech.



Obr. 2.5.1. Profil vyschlé kapky (převzato z Kopecký & Baumruk, 2006)



Obr. 2.5.2. Závislost výšky kroužku na koncentraci (převzato z Ortiz *et al.*, 2006)

Poté bylo nutné vyloučit změny struktury proteinu. Zhang *et al.* uvedli, že spektra vzorku lidského inzulinu užitím DCDR jsou blízká spektrům inzulinu měřeného klasickou Ramanovou spektroskopií v roztoku, přičemž tato podobnost zůstává zachována i několik týdnů po nanesení DCDR vzorku (Zhang *et al.*, 2003). Ortiz *et al.* dále ukázali, že rozdíl mezi DCDR spektry a spektry získanými z roztoku je velice malý. Tato změna tedy s jistotou neodpovídá denaturaci proteinové složky (Ortiz *et al.*, 2006). Pás amidu I byl mírně posunut k vyšším frekvencím, což může souviset s nárůstem obsahu β -skládaného listu ve vzorku. Přesto byla uvedená spektrální změna natolik malá, že lze využít DCDR ke studiu změn sekundární struktury (Ortiz *et al.*, 2006). Další příčinou této spektrální diference by také mohla být změna hydratace proteinu. Použitím těžké vody jako rozpouštědla ukázali Ortiz *et al.*, že si vzorky z velké části zachovávají stejnou formu jako v roztoku, i když jsou jen částečně hydratované. Detailnější srovnání spektrálních profilů vzorku v roztoku, v krystalické formě a deponovaného na DCDR přinesl Kopecký *et al.* Srovnáním dat na měřených na PspP proteinu, který je součástí fotosystému II ze *Spinacia oleracea* ukázali, že DCDR spektra a spektra měřená v roztoku se nepatrně odlišují. Tuto změnu zapříčiňuje odlišnost lokálního prostředí (hustota vzorku). Překvapivě krystalické vzorky se odlišují od vzorků v roztoku i na DCDR substrátu pouze nepatrně a to zejména v oblasti valenční vibrací $\text{CH}_2 \sim 1420 \text{ cm}^{-1}$ (Kopecký *et al.*, 2012). Na závěr shrnuli, že veškeré spektrální změny nad dvojnásobek hodnoty šumu

Lze proto interpretovat jako změny struktury, anebo složení analytu. V infračervené vibrační spektroskopii, je určování sekundární struktury komplikováno interferencí pásu O–H vibrací vody s vibrací amidu I. Pro DCDR spektroskopii bylo ukázáno, že je tato interference zanedbatelná a není tedy nutný, na rozdíl od FTIR spektroskopie, odečet spektra vody (Ortiz *et al.*, 2006). Nejvýraznější spektrální rozdíly vykazovala měření z různých míst proteinového prstýnku. Jejich odstranění bylo dosaženo pomocí ultrafiltrace vzorku. Tyto spektrální rozdíly je tedy možno připsat signálu nečistot (Ortiz *et al.*, 2006). Proto Ortiz *et al.* doporučili pro měření biologických vzorků o více složkách měření z více než jednoho bodu. Tento závěr podporují i měření Filika a Stonea, kteří pomocí mapování prstýnku vzniklého vyschnutím zjistili, že jednotlivé složky jsou ve vyschlém kroužku rozloženy nehomogenně na základě své rozpustnosti (Filik & Stone, 2008), a proto je nutné měřit z více bodů a následně vyhodnocovat zprůměrovaná spektra. V klasické Ramanově spektroskopii může být Ramanův rozptyl maskován výrazně silnějším signálem fluorescence (Zhang *et al.*, 2004). Výhodnou vlastností DCDR spektroskopie je proto zjištěná separace proteinu od fluorescenčních nečistot, což vede k výraznému poklesu fluorescenčního pozadí DCDR vzorků v porovnání s měřením kapalných či práškových vzorků. Redukce pozadí je dokonce výraznější než užití vybělování v laserovém svazku (Zhang *et al.*, 2004). Jelikož je možné užití vybělování v laserovém svazku i u DCDR, lze u této techniky dosáhnout ještě výraznější redukce fluorescenčního pozadí (Zhang *et al.*, 2004).

Po ověření možností a limitů DCDR jako nové spektroskopické metody se velice rychle začalo využívat ke studiu mnoha vlastností proteinových vzorků. Xie *et al.* využili DCDR spektroskopii k detekci fosforylace čtyř tyrosinových peptidů. Dokázali nalézt spektrální znaky fosforylace tyrosinu a pomocí metody nejmenších čtverců ji dokázali i kvantifikovat (Xie *et al.*, 2004). Filik & Stone pomocí analýzy hlavních komponent rozlišili složení směsi proteinů lidských slz (lyzozym, albumin a lactoferin) v různých poměrech (Filik & Stone, 2007). Vysokou účinnost DCDR spektroskopie ukázali Ortiz *et al.* na vzorcích lidského, hovězího a vepřového inzulínu, které se od sebe odlišují maximálně třemi aminokyselinami. Užitím metody parciálních nejmenších čtverců dokázali rozlišit jednotlivé druhy inzulínu (Ortiz *et al.*, 2004). V dalším článku pak ukázali že DCDR spektroskopie je vhodnou metodou pro studium fibrilace inzulínu (Ortiz *et al.*, 2007). Z farmaceutického a biologického pohledu je velice zajímavé využití DCDR spektroskopie v analýze a kvantifikaci navázání ligandu na protein. Xie *et al.* odstranili ultrafiltrací nenavázaný ligand a následně popsali výrazné změny v Ramanově spektru ligandu po navázání na protein. Tato metoda je ovšem použitelná pouze pro ligandy s dostatečně silným signálem (Xie *et al.*, 2007). Podobně na základě charakterizace spekter aminokyselin a spektrálním posunům vibrací amidu I a III při změně sekundární struktury navrhl Jeninks *et al.* užití DCDR spektroskopii k analýze navázání léků na cílová místa buněčných proteinů (Jeninks *et al.*, 2005). V jiném článku Xie *et al.* ukázali, že DCDR spektroskopii lze tak využít ke sledování spektrálních změn fosforylovaných peptidů indukovaných rozdílným pH (Xie *et al.*, 2004).

V posledních letech se užití DCDR spektroskopie rozšířilo i na další biomolekuly. Pagba *et al.* použili DCDR měření ke studiu kvadruplexu trombin vázajícího aptameru. Kvadruplexy jsou terciární strukturou vznikající spojením čtyř na guainin bohatých řetězců jedno, dvou, a nebo čtyř vláken DNA či RNA. V buňkách se nejčastěji vyskytují v telomerách, a tak se podílejí na apoptóze buňky. Proto jejich destabilizace se může podílet na rakovinovém bujení, ale jsou také místem vazby některých molekul na nukleové kyseliny (aptamrem). Jejich význam je nyní jedním z rychle se rozvíjející oblastí buněčné biologie. Pagba *et al.* detekovali pomocí DCDR změny v konformaci kvadruplexů při různé teplotě a jejich stabilizaci při vyšší koncentraci draslíku (Pagba *et al.*, 2011). Výsledky této studie podrobil kritickému zkoumání Bc. Pavel Souček ve své bakalářské práci „Studium nukleových kyselin a jejich interakcí pomocí Ramanovy mikrospektroskopie kapkověnanášených povlaků (DCDR)“. Měření vzorků nukleových kyselin je komplikováno tendencí vzorků nevytvářet prstýnek na okraji kapky efektem kávového kroužku. Tím pádem nedochází k nutnému zakoncentrování analytu, kterému by odpovídal silný Ramanův signál. Pouze při ředění vzorku látkami o dostatečné iontové síle (nejlépe $MgCl_2$) se podařilo prstýnek vytvořit.

Analýzou lipozomů fosfatidylcholinu a ascoletinu DCDR technikou se zabývali Kočišová a Procházka. Vzorky lipozomů vytvářely charakteristický efekt kávového kroužku a jejich spektra snímána z vnitřní části kroužku vykazovala vynikající reprodukovatelnost. Svým profilem odpovídala fázovému stavu před depozicí vzorku. Lze tedy předpokládat, že během vysoušení se nemění fáze vzorku (Kočišová & Procházka, 2010). V další práci pak určili optimální koncentraci lipozomu k analýze na 0,3–0,5 mg/ml, což odpovídá desetině koncentrace nutné pro klasický Ramanův rozptyl na lipidech. Porovnáváním vzorků od dvou dodavatelů však zjistili, že změna fáze během vysychání záleží na výrobě a čistotě vzorku (Kočišová & Procházka, 2012).

Nastíněné možnosti DCDR techniky vedli v minulých letech k prvním článkům o jejím možném užití v diagnostice. Díky své značné citlivosti a možnosti studia strukturních změn se hodí k analýze peptidů, nebo proteinů působících toxicky na lidský organizmus. Takovou látkou je např. kyselina domoová vyskytující se v mořských řasách a způsobující ztrátu krátkodobé paměti a fatální poškození mozkové tkáně. DCDR spektroskopie nabízí možnost rychle analyzovat vzorky kyseliny domoové od 25 ng/ml (Djaoued *et al.*, 2007). Haraldson *et al.* naopak poukázali na možnost využití DCDR spektroskopie v analýze microcystinu-LR smrtelně hepatotoxického produktu cyanobakterií (Haraldson *et al.*, 2011). Byly také popsány metody užití DCDR spektroskopie v diagnostice různých chorob. Filik a Stone rozpracovali využití analýzy lidských slz k zjišťování oční infekce. Jejich DCDR spektra vykazovala vysoce kvalitní signál v porovnání s klasickou Ramanovou spektroskopií i při užití kratší akvizice (Filik & Stone, 2008). Metodou vhodnou k dlouhodobému sledování pacientů s cukrovkou se zabýval Barman. Pro znalost efektivity dlouhodobé léčby je nutné znát hladinu hemoglobinu HbA1c, který vzniká neenzymatickou glykací vlivem vysoké hladiny glukózy v krvi diabetiků.

Barman *et al.* určili pomocí DCDR spektroskopie výskyt HbA1c s prahem detekce 15× menším než jsou fyziologické hodnoty a navrhli možnost vytvoření rutinní metody (Barman *et al.*, 2012). Stejného výsledku pak dosáhli i u glykované formy albuminu (Dingari *et al.*, 2012). DCDR spektroskopie se zdá být slibnou metodou i při detekci změn složení synoviální tekutiny a tak může sloužit k diagnostice osteoartrózy (Karen *et al.*, 2009). Cipriani a Ben-Amotz analyzovali tři molekuly taxánů, látek užívaných k výrobě chemoterapeutických léků a poukázali na možnost využití kombinace *ab initio* výpočtů s DCDR měřením k lepšímu popisu konformačních změn potenciálních léků a určení nejvíce efektivních molekul (Cipriani *et al.*, 2005). Je tedy zřejmé, že i přes krátkou dobu výzkumu DCDR metody lze předpokládat vývoj dalších diagnostických postupů a technik. DCDR spektroskopie tak zřejmě v brzké budoucnosti získá své místo mezi klasickými metodami nemocničních biochemických laboratoří. Jednou z prvních prací zabývajících se vývojem nové diagnostické metody na bázi DCDR byla diplomová práce Mgr. Jakuba Klenera věnovaná diagnostice Alzheimerovy demence a roztroušené sklerózy ze vzorků mozkomíšního moku (Klener, 2011). Zajímavým aspektem této práce bylo zjištění rychlé degradace MM po jeho rozmrazení (Klener *et al.*, 2014). Toto zjištění tak vytváří hlavní limitaci v práci s MM pro diagnostické účely a je tak první aplikací DCDR metody přinášející globální znalost bez ohledu na konkrétní měřenou látku. Tyto výsledky dokládají slibný potenciál DCDR metody ve studiu biologických tekutin.

3. Alzheimerova choroba

3.1. Úvod

Jak bylo uvedeno v úvodu, výskyt demence v populaci prudce narůstá. Proto dnes sílí zájem o nalezení nových diagnostických metod, terapeutických postupů a pochopení patogeneze onemocnění. Neznalost přesné patogeneze omezuje možnost přesných biochemických kritérií a současná diagnostika se stále podstatně opírá o klinický obraz onemocnění. Proto je dnes snaha objevit dostatečně senzitivní a specifickou metodu k odlišení jednotlivých demencí, jejich forem a stadií (Lindsey *et al.*, 2011). V souboru pacientů zpracovávaných v této práci jsme mohli stanovit v podstatě čtyři skupiny pacientů. Pacienty s mírnou kognitivní poruchou, Alzheimerovou demencí, kontrolní skupinu zdravých pacientů (pacientů netrpících neurodegenerativním onemocněním) a skupinu ostatních demencí (vaskulární demence, fronto-temporální demence, demence s Lewyho tělisky, atd.). Nejistota v důležitosti jednotlivých biochemických znaků upřednostňuje diagnostické metody necílicí pouze na jeden znak, ale holistické spektroskopické metody. Poznatky v této oblasti shrnuje poslední část této kapitoly.

Nejprve, ale několik vět k historii demence jako skupiny onemocnění a zejména její spojitosti s Prahou. Do první poloviny 19. století kvůli nízkému dožití populace byla demence raritní. V druhé polovině 19. století pokrok v histologických metodách umožnil popis neuropatologických změn ve vzorcích mozkové tkáně. Na základě neuropatologického nálezu a klinického obrazu popsal jako jeden z prvních demenci pražský německý psychiatr Arnold Pick v roce 1892 (obr. 3.1). Tato demence (jedna z forem fronto-temporální demence (FTD)) dodnes nese jméno Pickova demence. Pražská škola se tak společně s Mnichovskou školou Emila Krepelina stala nejvýznamnější v oblasti neurodegenerativních onemocnění (Boller *et al.*, 1998). Krepelinův žák, Alois Alzheimer v roce 1907 popsal případ pacientky Augusty D., prvního pacienta s popsanou Alzheimerovou demencí. Současně s ním publikoval český vědec německo-židovského původu Oskar Fischer v *Monatsschrift für Psychiatrie und Neurologie* 16 kazuistik pacientů s presbyofrenií. U 12 z těchto pacientů popsal také senilní plaky. V současnosti se zásluha Oskara Fischera na popisu AD bere za srovnatelnou s významem A. Alzheimerova (Goedert, 2009). Objevily se i názory na přejmenování Alzheimerovi demence na Alzheimer-Fischerovu demenci. Bohužel následný Fischerův osud byl pohnutý. Byl nucen opustit kliniku a univerzitu a následně byl transportován do Terezína, kde v roce 1942 zemřel na srdeční infarkt.



Arnold Pick, 1851 – 1924

Alois Alzheimer, 1864 - 1915

Oskar Fischer, 1876 - 1942

Obr. 3.1. Arnold Pick, Alois Alzheimer a Oskar Fischer

3.2. *Mírná kognitivní porucha (MCI)*

MCI je označení klinického stavu mezi již vyjádřenou demencí a normálním stárnutím. Je postavena na výsledku neuropsychologických testů, ve kterých pacienti s MCI dopadají přibližně o $-1,5$ až -1 směrodatné odchylky (SD) hůře než stejně staří senioři. Nemocní s MCI netrpí doposud narušení soběstačností. V populaci nad 65 let trpí MCI 10–20 % pacientů a její prevalence dále s věkem narůstá. 10–15 % pacientů s MCI každý rok progreduje do plně vyjádřené demence, část pacientů trpí dlouhodobě MCI a malé množství se zlepšuje na úroveň věkové normy (Rusina *et al.*, 2014).

Zachycení postižení kognitivních funkcí na úrovni MCI umožňuje včasné zahájení léčby a dlouhodobé sledování pacientů ohrožených demencí. Při stanovení diagnózy MCI je nutné pamatovat na značné ovlivnění volbou neuropsychologického testu, který nemusí mít dostatečně dobře stanovenou věkovou normu. MCI je označení pro stavy předcházející všem typům demencí (Alzheimerově chorobě, vaskulární demenci, demence s Lewyho tělísky, atd.) (Rusina *et al.*, 2014).

3.3. *Alzheimerova choroba*

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění projevující se typicky jako amnestický syndrom. Je nejčastější demencí v populaci (tvoří asi 50–60 %). Její riziko prudce narůstá po 65 roku, kde postihuje 2–3 % pacientů. U osmdesátiletých jí stanovujeme až u 30 % a více. Celosvětově je přibližně 36 milionů pacientů v různém stadiu AD nemoci (údaj z roku 2010) a předpokládá se, že do roku 2050 se tento počet zdvojnásobí (Rusina *et al.*, 2014). Klinicky se nejprve projeví zhoršováním epizodické paměti. Tedy postupným zapomínáním „kdo, co kdy a kde“ zejména ze současnosti a nedávné minulosti. Při následné progresi postupně dochází k poruše řeči (problém s pojmenováním předmětů), dezorientaci, problémům s rozpoznáváním osob a následně ke kompletnímu narušení plánování a sociální interakce a ztráty náhledu na nemoc (*anosognosii*). Průběh nemoci často zrcadlí

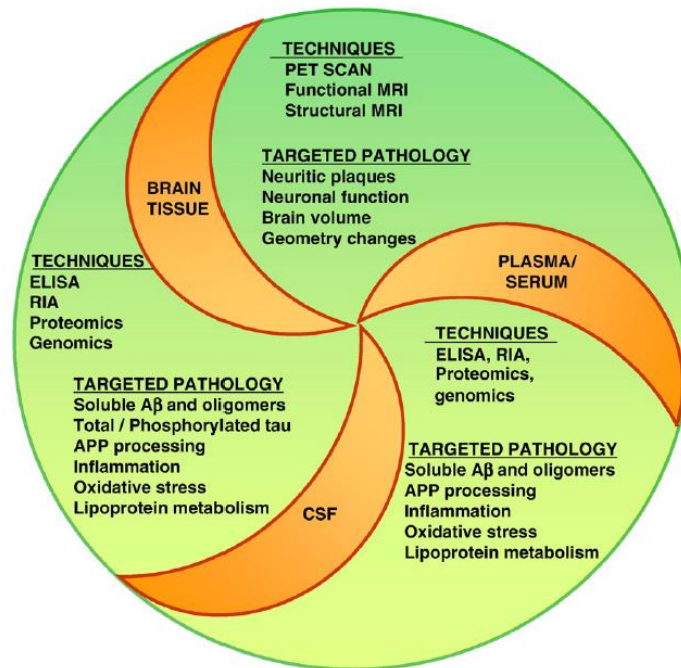
i změny emocí (Rusina *et al.*, 2014). To nezvratně vede k naprosté závislosti pacienta na pomoci svého okolí.

V současné době je diagnostika AD postavena především na MRI/CT hlavy, kde je popisována atrofie hipocampů kombinovaná s temporo-parietální kortikální atrofií (Rusina *et al.*, 2014). Podstatný je výsledek neuropsychologických testů. Doposud jako především doprovodné vyšetření je užívána analýza MM, kde je snižená hladina β -amyloidu a naopak zvýšená hladina tau proteinu (zejména jeho fosforylované formy). Velice názorné jsou metody nukleární medicíny. PET vyšetření, které *in vivo* zobrazuje snížený metabolismus glukózy v parietálních oblastech mozku, nebo přímo signálu β -amyloidu, není v ČR dostupné (Rusina *et al.*, 2014).

3.4. Diagnostika Alzheimerovy demence pomocí vibrační spektroskopie

V současné době lze užít stanovení hodnot $A\beta_{1-42}$, proteinu t-tau a p-tau v mozkomíšním moku jako součásti diagnostického protokolu AD (Rusina *et al.*, 2014). Jedná se o dostatečně specifické i senzitivní biomarkery i ke stanovení diagnózy MCI. Sledování profilu jejich hladin v závislosti na podávání potenciálního léku je v současnosti jedinou věrohodnou biochemickou metodou k ověření reakce nemoci na tuto léčbu (Blennow *et al.*, 2010). Naproti tomu, nejasnost patogeneze Alzheimerovy demence a značná specifita transportu složek mozkomíšního moku přes HEB, nebo při vstřebávání MM do krevního řečiště přináší pochyby o možnosti detekce AD z krve a jejích derivátů.

Přestože některé studie prokázaly změny v hladinách různých biochemických látek v krvi, zejména $A\beta_{1-42}$ a $A\beta_{1-40}$, výsledky těchto studií se doposud rozcházejí (Blennow *et al.*, 2010). Užitím metod proteomiky byly navrženy nové potenciální diagnostické biomolekuly v krevní plasmě a séru (obr. 3.2), které mohou sloužit k diagnostice MCI a AD (Song *et al.*, 2009). Bylo analyzováno několik významných proteinů asociovaných s AD, jako jsou α -1-antitrypsin, α -2-makroglobulin a H faktor komplementu, které se vyskytují v senilních placích v mozkové tkáni u pacientů s AD (Song *et al.*, 2009). Dalšími plasmatickými faktory jsou vitamin D-vázající protein, prekurzor apolipoproteinu J, alfa podjednotka cAMP-dependentní proteinkinasy a v séru haptoglobin, hemoglobin, vitronectin, apolipoprotein B100, jejichž hodnoty jsou při AD zvýšeny. Naopak u serpinu F1 a inhibitoru C1 proteinu komplementu byly naměřeny snížené hladiny. Kromě hladin dříve zmíněných lipoproteinů patří nízké hodnoty apolipoproteinu A v séru u pacientů s AD k biochemickým změnám doprovázejícím rozvoj AD a poukazují tak na možnost propojení patogeneze AD s lipidovým metabolismem. Apolipoprotein A je totiž hlavním zástupcem lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL) a kromě pozitivního vlivu na hladiny cholesterolu redukuje ukládání $A\beta$ do plaků v mozkové tkáni. Je ale velice komplikované ho detekovat, jelikož má tendenci ulpívat na plastických ampulkách používaných pro proteomickou analýzu (Song *et al.*, 2009).



Obr. 3.3. Diagram markerů MCI a AD v různých tkáních (převzato ze Song *et al.*, 2009)

Data o biochemických markerech rozlišujících mezi pacienty s AD a MCI jsou nejasná. Signifikantní zvýšení hladin A β u pacientek s MCI nekorelovalo s hodnotami u mužských pacientů (Humpell, 2011). Proto se v současnosti předpokládá, že pouze kombinace více biomarkerů v krvi může sloužit jako dostatečně specifické a senzitivní diagnostické kritérium AD (Humpell, 2011). Detekce některých výše zmíněných látek je značně komplikovaná a vyžaduje kombinaci vysoce citlivých metod jako je kapalinová chromatografie, micro-array analýza a hmotnostní spektroskopie (Song *et al.*, 2009). Proto se jeví užití metod vibrační spektroskopie k analýze AD a rozlišení jejich jednotlivých forem jako vhodná alternativa klasických biochemických metod (Carmona *et al.*, 2013).

3.4.1. Diagnostika Alzheimerovi demence pomocí vibrační spektroskopie MM

Díky prokázaným signifikantním změnám v hladinách A β 1–42 a tau proteinu v MM (Andreasen *et al.*, 2001) bylo logické pokusit se tyto změny detekovat pomocí spektroskopických technik. Griebel *et al.* porovnali hladiny tau proteinu a A β 1–42 stanovené metodou ELISA ve vzorcích MM s příslušnými FTIR spektry. Na souboru 71 pacientů s AD a 66 stejně starých kontrolních zdravých jedincích byli schopni rozlišit pacienty podle poměru A β 1–42/tau-proteinu s 99% senzitivitou a 86% specificitou. Následná diagnostika FTIR spekter založená na umělých neuronových sítích rozlišovala pacienty s 88,5% senzitivitou a 80% specificitou. Po odečtení pozadí byla spektra normalizována a poté byla spočtena jejich druhá derivace a užit Savitzky-Golayův filtr k jejímu vyhlazení. Spektrum dále analyzovali na dvou zvolených intervalech (3100–2700 cm⁻¹ a 1300–900 cm⁻¹), prvním interval zahrnuje

C–H valenční vibrace, druhý pak C–O, C–O–P, P–O vibrace lipidů. Největší rozdíly mezi pacienty a kontrolami pak pozorovali v pásu 2873 cm^{-1} (Griebe *et al.*, 2007).

Další analýzu vzorků MM k diagnostice AD zkoumal ve své diplomové práci Mgr. Jakub Klener. Užitím Ramanovy mikrospektroskopie stanovil spektrální změny způsobené AD. Jejich charakter je komplexní a projevují se především v pásu o 1080 cm^{-1} (změny v tomto pásu byly detekovány i u pacientů s roztroušenou sklerózou) a v intervalech mezi $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ a $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$. Tyto variace odrážejí změny skladby a konformace proteinů MM. Navíc bylo použitím shlukové a faktorové analýzy dosaženo vytvoření nové diagnostické metody AD (Klener, 2011). Ramanova mikrospektroskopie byla také užita i k diagnostice AD v histopatologických řezech hippocampu myších modelů (Chen *et al.*, 2009). Přínos této metody, která se opírá o mikrospektroskopii mozkové tkáně odebrané *post mortem*, je ovšem sporný, jelikož v současnosti již užití klasické mikroskopie histopatologických vzorků pacientů patří mezi standardní metody ověření správnosti diagnózy AD (Rusina *et al.*, 2014). Vzhledem k tomu, že žádné další práce užívající vibrační spektroskopie MM k diagnostice AD nejsou k dispozici, je zřejmé, že užití těchto metod ke studiu a diagnostice AD je doposud nevyčerpanou oblastí, která se jeví jako slibná v diagnostice a sledování pacientů s AD.

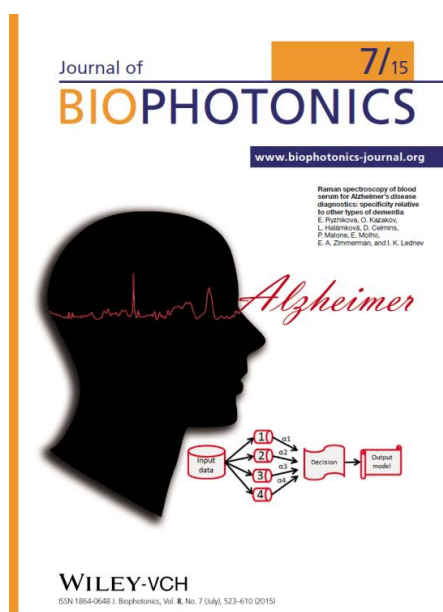
3.4.2. Diagnostika Alzheimerovi demence pomocí vibrační spektroskopie krevního séra

Užití vibrační spektroskopie krevních derivátů k diagnostice AD je rovněž novou oblastí výzkumu. O užití infračervené spektroskopie k diagnostice AD byly publikovány prvním práce na konci minulého desetiletí. Ramanova spektroskopie byla pak ve většině prací užita až v posledních pěti letech. V krevním séru a plasmě, jak bylo výše zmíněno, nebyl doposud nalezen dostatečně citlivý biochemický marker AD, proto jsou RS a FTIR spektroskopie v porovnání s klasickými biochemickými a imunochemickými metodami v diagnostice neurodegenerativních chorob slibnější.

Použití infračervené spektroskopie k diagnostice AD z krevního séra (Peuchant *et al.*, 2008) bylo ověřeno na vzorcích 40 pacientů s AD a 112 zdravých kontrolních pacientech. Pacienti byli do studie zařazováni za přísných kritérií o jejich zdravotním stavu (pacienti nesměli projevovat v posledních dvou měsících před odběrem vzorků příznaky Parkinsonovy nemoci, diabetes melitus, infekčního nebo zánětlivého onemocnění) a užívané medikaci (jednalo o pacienty, kteří neužívali žádnou medikaci, která by mohla mít vliv na oxidativní stres). K statistickému zpracování naměřených spekter byla užita shluková analýza (CA) s Wardovou metodou a Euklidovskou mírou. CA rozdělovala správně spektra naměřená ve střední blízké infračervené oblasti ($4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$) na skupinu pacientů a kontrol. Po dalším zkoumání bylo určeno, že nejlepší oblastí pro vyhodnocování CA je interval $1480\text{--}1428\text{ cm}^{-1}$. Na intervalu $1480\text{--}910\text{ cm}^{-1}$ byl soubor CA sice rozdělen s přesností 98,4 % na skupinu pacientů a kontrol, ale kontrolní skupina se dále dělila do dvou podskupin. Autoři uvádějí, že jediným rozlišitelným znakem mezi oběma

podskupinami kontrol byla hladina 8-epi-prostaglandin F2 α (Peuchant *et al.*, 2008). Při interpretaci těchto povzbudivých výsledků je nutné zvážit, jak výrazně byly výsledky ovlivněny přísnou selekcí pacientů a vyřazením pacientů trpících jinými formami demence. Burns *et al.* užívali přenosného FTIR spektrometru k diagnostice 19 pacientů s AD, 27 s MCI a 17 kontrolních pacientů. Spektrální změny související s oxidativním stresem v oblastech vibrací funkčních skupin hemu, R-CH, R-OH, H₂O, a R-NH byly užity ke klasifikaci vzorků pomocí logistické regrese. Takto dosáhli rozlišení pacientů a kontrol s 80% sensitivitou a 77% specificitou. Soubor pacientů s MCI nebyl touto metodou správně klasifikován, ale MCI pacienti byli tímto přístupem rozděleni v poměru 15:12 mezi AD a kontroly. Autoři nepozorovali vliv věku, pohlaví, uchovávání vzorků, ani užívání cholinových inhibitorů, nebo vitamínu E na rozlišení pacientů (Burns *et al.*, 2009). V roce 2012 publikovala madridská skupina P Carmona práci o využití FTIR spektroskopie mononukleárních leukocytů (autoři takto ne zcela vhodně označují monocyty) periferní krve pacientů k diagnostice AD. Monocyty se podílejí na imunologické reakci u pacientů s neurodegenerativními chorobami. Dochází v nich k akumulaci A β v mitochondriích a dalším změnám funkcí mitochondrií zapříčiňujících rozvoj oxidativního stresu (Carmona *et al.*, 2012). Zvýšení intenzity pásů na 1631 cm⁻¹ a 1638 cm⁻¹ u pacientů s AD odpovídá nárůstu struktur β -skládaného listu, které lze interpretovat jako nárůst koncentrace A β v leukocytech periferní krve. 2D-korelační spektroskopie ukázala nárůst intenzity pásu o 1750–1700 cm⁻¹ v pozitivní korelaci k pásům β -skládaného listu. Tento interval odpovídá valenční vibraci C=O a lze ho interpretovat jako znak oxidačního stresu (Carmona *et al.*, 2012). Analýza ROC (*receiver operating characteristic curve*) následně odlišila pacienty s AD s 90% senzitivitou a 95% specificitou od zdravých kontrol a s 82,1% senzitivitou a 90,5% specificitou rozlišila jednotlivá stadia AD (Carmona *et al.*, 2012). Nevýhodou této metody je nutnost izolace monocytů. Také porovnávání pacientů s AD pouze se souborem zdravých kontrol může značně nadhodnocovat vynikající citlivost této metody. První práce o možnosti využití Ramanovy spektroskopie k detekci AD byly publikovány až o několik let později než práce využívající infračervené spektroskopie. Jedna z prvních užila RS k rozlišení jednotlivých fází AD u transgenických myších modelů. K excitaci bylo užito vlnové délky 633 nm. Dle Carmona *et al.* by však užití této vlnové délky u lidských vzorků mělo způsobovat překrytí Ramanova signálu fluorescenčním pozadím a navíc předpokládají vybuzení resonančního Ramanova rozptylu hemoglobinu, bilirubinu a karotenoidů v krvi a tím překrytí spektra ostatních proteinových a lipidových frakcích plasmy. Užití laseru z blízké infračervené oblasti sice sníží fluorescenční pozadí, ale vede ke ztrátě informace o struktuře proteinů vzorku (Carmona *et al.*, 2013). Carmona *et al.* užívali Ramanovu a FTIR spektroskopii k diagnostice různých forem AD a jejich odlišení od zdravých kontrol (Carmona *et al.*, 2013). Na soubor 35 pacientů s AD a 12 zdravých kontrol aplikovali 2D-korelační spektroskopii a diskriminantní analýzu k rozlišení jednotlivých diagnóz. Zaznamenali zvýšené množství A β (pás 1672 cm⁻¹) v naměřených spektrech a zvýšené zastoupení β -skládaného listu (v oblasti pásu amidu I 1665–1680 cm⁻¹), které lze připsat zvýšeným hladinám α -1-antitripsinu a

A β . Naopak pacienti trpící AD měli snížené zastoupení α -helixů (pokles pásu 1658 cm⁻¹) v sekundární struktuře proteinů. Pro terciární strukturu proteinů u pacientů s AD byl popsán nárůst intenzity dýchací vibrace tryptofanového kruhu (758 cm⁻¹). Při měřeních FTIR spektroskopie pozorovali změny v pásech CO a OH vibrací (1000–1150 cm⁻¹), což připisují ve shodě s pozorováním na monocytech zvýšeným hladinám produktů oxidačního stresu (lipidové peroxidace), jež paří mezi další patogenetické mechanismy rozvoje AD (Song *et al.*, 2009). Na základě těchto pozorování navrhli pět kritérií pro diagnostiku jednotlivých fází AD pomocí Ramanovy spektroskopie a dvě kriteria pro FTIR spektroskopii. Takovýto model dosahoval 89% sensitivity a 92% specificity. Překvapivě lepší senzitivity (91 %) i specificity (100 %) dosáhli při rozlišování mezi zdravými kontrolami a lehkou formou AD, což nabízí slibné vyhlídky pro užití Ramanovy spektroskopie jako diagnostické metody v preklinické fázi onemocnění, kdy lze brzkým nasazením léčby ovlivnit rozvoj choroby. Tento fakt vysvětlují na základě pozorování, že nejvýraznější změny v hladinách A β v MM jsou vyjádřeny v brzké fázi onemocnění. Zdá se, že změny v periferní krvi i mozkové tkáni nekorelují s rozvojem demence, ale naopak jsou nejvýrazněji vyjádřeny v preklinickém období (Carmona *et al.*, 2013). Souběžně se vznikem této práce byl publikován článek o užití NIR-Ramanovy mikrospektroskopie krevního séra k diagnostice AD a jejího odlišení od zdravých kontrol a dalších neurodegenerativních onemocnění (obr. 3.3). Užitím multivariativní metody umělých neuronových sítí bylo dosaženo 95% senzitivity i specificity (Ryzhikova *et al.*, 2015).



Obr. 3.3. Titulní strana *Journal of Biophotonics* 7, 2015 odkazující na práci Ryzhikova *et al.*, 2015

Další možnost pro usnadnění diagnostiky AD a využití co nejméně intervenčních přístupů je spektrální zkoumání ostatních biotekutin lidského těla. Nejvhodnější se jeví v tomto směru moč, ale nejsou nám známy žádné práce pojednávající o užití vibrační spektroskopie k diagnostice AD z moče. Nicméně objevili se již zprávy

o užití hladin 3-hydroxy-propyl-mercapto-močové kyseliny v poměru ke kreatininu (Yoshida *et al.*, 2015), nebo Alzheimer-associated neuronal thread proteinu (ANTP) v moči k odlišení AD a MCI (Ma *et al.*, 2015a). Na bázi ANTP byl nyní nově vyvinut ELISA kit k diagnostice AD s 89,3% sensitivitou a 84,7% specificitou (Ma *et al.*, 2015b). Tyto první zprávy o možnosti detekce AD z moči je třeba, ale ještě ověřit na větších studiích a zjistit jejich citlivost v odlišení AD a jiných forem neurodegenerativních onemocnění. Slibné výsledky přinesla rovněž studie zkoumající vzorky slin u pacientů s AD metodou ELISA (Bernejo-Pareja *et al.*, 2010). Hladiny A β 1–42 byly sice u pacientů s AD nesignifikantně zvýšené v porovnání se stejně starými zdravými pacienty a pacienty trpícími Parkinsonovou demencí, ale podařilo se prokázat signifikantní zvýšení A β 1–42 u počátečního stadia AD v porovnání s pacienty trpícími Parkinsonovou demencí a zdravými kontrolami. Vzorky pacientů s pokročilým stadiem se naopak v hladinách A β 1–42 blížily kontrolám i pacientům s Parkinsonovou nemocí. Nejvýraznější změny v hladinách A β 1–42 tedy nastávají, v souladu s předchozími pozorováními, v brzké fázi onemocnění (Bernejo-Pareja, 2010). S ohledem na tyto výsledky, by zkoumání spektrálního profilu slin pacientů s AD také mohlo být další možností rozvoje nových diagnostických metod.

4. Matematické metody

Rozsáhlé soubory dat, kde každý pacient je reprezentován jedním spektrem vzorku krevního séra nebo mozkomíšního moku, je třeba zpracovat užitím statistických metod. Matematické zpracování, tak vlastně tvoří stavební kámen diagnostické metody. Od tohoto vyhodnocení očekáváme uspořádání vzorků jednotlivých pacientů do skupin (shluků) podle jejich diagnózy a případně dalších parametrů (jako věk, léčba, pohlaví, atd.). Tento přístup využívá metoda shlukové analýzy. Alternativním přístupem je pokusit se tento multidimenzionální problém, kde spektrum každého pacienta tvoří bázi, transformovat do nových proměnných a tím redukovat dimenzi problému. Tyto nové proměnné, společné již více pacientům nám usnadňují interpretaci výsledků a samostatně, nebo jejich kombinace, může odpovídat společným znakům u pacientů s Alzheimerovou nemocí. To je cílem analýzy hlavních komponent. Matematické pozadí obou metod přiblíží následující kapitoly.

4.1. Analýza hlavních komponent (PCA)

Při řešení velkých vícerozměrných statistických souborů je výhodné pokusit se nalézt sadu znaků (latentních proměnných), které popisují datový soubor bez ztráty informace (Hebák & Hustopecký, 1987). Tyto proměnné, označujeme jako hlavní komponenty a požadujeme po nich redukcí dimenze řešené úlohy (Johnson & Wichern, 2007). Vezměme naměřená spektra ve formě matice \mathbf{X} , kde jednotlivá spektra seřadíme do n sloupců o m odpovídajících bodech, ve kterých provádíme měření. Lze ukázat, že matici \mathbf{X} můžeme rozložit pomocí metody *singular value decomposition* (SVD), tedy rozklad do singulárních hodnot ve tvaru:

$$\begin{array}{c} m \times n \\ \left(\begin{array}{c} \mathbf{X} \\ \text{spektra} \end{array} \right) = \begin{array}{c} m \times n \\ \left(\begin{array}{c} \mathbf{U} \\ \text{subspektra} \end{array} \right) \begin{array}{c} n \times n \\ \left(\begin{array}{ccc} s_1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & s_2 \end{array} \right) \begin{array}{c} n \times n \\ \left(\begin{array}{c} \mathbf{V}^T \\ \text{koeficienty} \end{array} \right) \end{array} \end{array} \quad (4.1.-1)$$

Pro \mathbf{U} a \mathbf{V} dále platí, že se jedná o ortogonální matice, tedy pro jejich sloupce platí vztahy:

$$\sum_{i=1}^m U_{ik}U_{il} = \delta_{kl} \quad 1 \leq k \leq n \quad 1 \leq l \leq n \quad (4.1.-2)$$

$$\sum_{j=1}^m V_{jk}V_{jl} = \delta_{kl} \quad 1 \leq k \leq n \quad 1 \leq l \leq n \quad (4.1.-3)$$

kde δ je Kroneckerovo delta. Singulární čísla s_i jsou kladná čísla, která lze pomocí permutací příslušných sloupců \mathbf{U} a \mathbf{V} uspořádat sestupně od $s_1 > s_2 > \dots > s_p > 0$, $p = \min(n, m)$ a pokud je $m < n$, pak s_i pro $i > m$ jsou rovny nule (Press *et al.*, 2002). Ze vztahů (1), (2) a (3) následně vyplívá:

$$\mathbf{X}^T \mathbf{X} = (\mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T)^T \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T = \mathbf{V} \mathbf{S}^2 \mathbf{V}^T \quad (4.1.-4)$$

PCA lze tedy interpretovat jako transformaci \mathbf{A} , n původních korelovaných proměnných (jednotlivých měření) do p nových proměnných (hlavních komponent),

kteře mají maximální variabilitu a jsou tedy nekorelované (Rencher, 2002). To lze v maticovém zápisu vyjádřit rovnicí:

$$\mathbf{Y}^T = \mathbf{A}\mathbf{X}^T \rightarrow \mathbf{X}^T = (\mathbf{A}^{-1})\mathbf{Y}^T \quad (4.1.-5)$$

Kde sloupce \mathbf{Y} reprezentují jednotlivé hlavní komponenty. Požadavek na maximální rozptyl komponent může matematicky popsat pomocí kovarianční matice. Kovarianční matice vyjadřuje závislost (korelaci) jednotlivých proměnných. Na její diagonále vystupují hodnoty rozptylu σ_y jednotlivých měření a mimo diagonálu tzv. kovariance reprezentující závislost veličin. Rozptylové veličiny můžeme spočítat na základě známého vztahu (Rencher, 2002).

$$\sigma_y^2 = \frac{\sum_i^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad (4.1.-6)$$

Kovariance budou při maximální variabilitě z nulové (Rechner, 2002). Pro matici hlavních komponent C_y tak požadujeme diagonální tvar:

$$\mathbf{C}_Y \cong \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \cong \begin{pmatrix} \sigma_1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & \sigma_2 \end{pmatrix} \quad (4.1.-7)$$

Vyjádřeme kovarianční matici C_x původních proměnných pomocí SVD rozložení a transformace \mathbf{A} (Hastie *et al.*, 2008):

$$\mathbf{C}_X \cong \mathbf{X}^T \mathbf{X} \cong \mathbf{A}^{-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} (\mathbf{A}^{-1})^T \cong \mathbf{V} \mathbf{S}^2 \mathbf{V}^T \quad (4.1.-8)$$

Z porovnání levé a pravé strany vyplývá, že inverzní transformaci \mathbf{A}^{-1} odpovídá matice koeficientů \mathbf{V} . Hodnoty rozptylu hlavních komponent odpovídají druhé mocnině singulárních čísel a matici hlavních komponent \mathbf{Y}^T odpovídá \mathbf{U}^T .

Pak dle rovnice (5) můžeme jednotlivá spektra \mathbf{x}_j vyjádřit pomocí nových latentních proměnných:

$$\mathbf{x}_j = \sum_{i=1}^n v_{ij} s_i \mathbf{u}_i \quad (4.1.-9)$$

Vektory \mathbf{v}_i i \mathbf{u}_i jsou normovány na jedničku a sestupně uspořádány, proto hodnota jejich jednotlivých sčítanců postupně klesá. Tudiž od určité hranice r můžeme příspěvky dalších členů zanedbat:

$$\mathbf{x}_j \approx \sum_{i=1}^r v_{ij} s_i \mathbf{u}_i \quad (4.1.-10)$$

Existují různá doporučení pro zanedbávání vyšších sčítanců (Rencher, 2002). Nejrozšířenějším je užití grafického pořadí singulárních čísel vůči jejich hodnotě (tzv. *scree graph*). Při relativně malé hodnotě singulárních čísel a přechodu jejich závislosti v lineární průběh, přispívají další sčítance do celkového rozvoje zhruba stejnou vahou. Proto se lze domnívat, že se jedná o šum a další subspektra již nezahrnovat (Johnson & Wichern, 2007).

4.2. Shluková analýza (CA)²

Shluková analýza se snaží o uspořádání souboru vícerozměrných dat do skupin (shluků) na základě jejich podobnosti, a tak umožňuje podobně jako PCA výrazně snížit dimenzi úlohy a zároveň nalézt vnitřní vztahy souboru. CA se dělí podle algoritmu tvorby shluků na nehierarchické a hierarchické shlukování. Nehierarchické shlukování rozdělí soubor na disjunktní shluky, jejichž počet je ve většině metod předem určen. Hierarchické metody postupně přecházejí od hrubšího rozdělení souboru k jemnějšímu, anebo naopak. V prvním případě se jedná o tzv. *aglomerativní hierarchické shlukování*, které bylo využito i v naší práci. V něm jsou nejprve jednotlivým objektům připsány samostatné shluky. Na základě výpočtu jejich podobnosti jsou nalezeny dva shluky o minimální vzdálenosti a ty jsou spojeny do jednoho nového shluku. Je zaznamenána hladina, na které k tomuto spojení došlo (v kolikátém cyklu algoritmu se oba shluky spojili) a jejich vzdálenost. Následně celý algoritmus cyklicky opakujeme až do spojení všech shluků. Opačný přístup, tedy přechod od jednoho shluku pro celý soubor k shlukům pro jednotlivé objekty se nazývá *divizní*. U hierarchických metod na základě připsaných hladin a vzdáleností shluků můžeme vytvořit tzv. *dendrogram*. To jest, grafické znázornění vztahu shluků, kde na vodorovné ose zobrazujeme vzdálenosti jednotlivých shluků a na svislé ose hladiny jejich spojení. Výsledek shlukování záleží na volbě míry podobnosti shluků (vzdálenosti objektů) a na volbě shlukovací procedury (tedy, jakým způsobem podobnost jednotlivých objektů mezi shluky vyhodnocujeme)

4.2.1. Podobnost objektů

Za míru podobnosti objektů se většinou případů bere jejich vzdálenost. Tedy blízké objekty jsou si podobné více nežli vzdálené. Vzdálenost mezi objekty lze definovat různým způsobem. Nejčastěji pomocí klasické *euklidovské míry*

$$D_E(x_i, x_{i'}) = \sqrt{\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{i'j})^2} \quad (4.2.-1)$$

nebo také zavedením *Hemmingovy míry*

$$D_H(x_i, x_{i'}) = \sum_{j=1}^p |x_{ij} - x_{i'j}| \quad (4.2.-2)$$

a nebo *Cebyševovy míry*

$$D_C(x_i, x_{i'}) = \max |x_{ij} - x_{i'j}| \quad (4.2.-3)$$

Veškeré typy měr lze zobecnit ve formě *Minkowského metriky*

² Tuto kapitolu jsem zpracoval na základě knih *Vícerozměrné statistické metody* (Hebák & Hustopecký, 1987) a *Kompedium statistického zpracování dat* (Meloun & Militký, 2002)

$$D_M^m(x_i, x_i') = \sqrt[m]{\sum_{j=1}^p (x_{ij} - x_{i'j}')^m}$$

(4.2.-4)

Uvedené míry nejsou vhodné pro proměnné o různé váze (nebo jednotkách). Spektra, ale takovým problémem netrpí, a proto mezi uvedenými mírami volíme, podle toho jak moc chceme posílit vliv proměnných s velkým rozdílem mezi jednotlivými měřeními. Další nevýhodou těchto měř je, že silně korelované veličiny se stejnými váhami mají výrazný vliv na výsledek. Východiskem jak předejít těmto problémům je transformace veličin přiřazením vhodné váhy. Pokud vypíšeme hodnoty těchto vah pro každé spektrum na diagonálu matice C , lze transformaci zapsat ve tvaru:

$$u_i = C^{-1} x_i \quad (4.2.-5)$$

Ve kterém sloupec x_i představuje původní spektra a u_i transformovaná spektra. Je nutné zdůraznit, že použití takovéto transformace míry vzdálenosti potlačí vliv rozdílů ve variabilitě proměnných na výsledek, což není vždy žádoucí.

4.2.2. Shlukovací procedury

Po volbě vhodné míry následuje volba algoritmu shlukování do skupin.

1) *Metoda nejbližšího souseda (single, nearest)* spojuje shluky na základě nejmenší vzdálenosti vzdáleností objektů. Přepočítání matice vzdáleností pro nově vzniklý shluk je dán vztahem:

$$D_{gg'} = \min(D_{g'h} D_{g'h'}) \quad (4.2.-6)$$

kde g je index nově vzniklého shluku, ke kterému hledáme vzdálenosti objektů a h a h' jsou indexy sloučených shluků. Použití této procedury je výhodné při ne-eliptickém tvaru hledaných shluků, naopak pokud větší počet objektů vytváří spojení mezi dvěma shluky, mohou být často i velmi vzdálené objekty spojeny do jednoho shluku. Jsou-li oba tyto objekty nepodobné, může tento přístup vést i ke zcela milným závěrům.

2) *Metoda nejvzdálenějšího souseda (complete, furthest)* se zakládá na opačném přístupu, tedy kritériem ke spojení shluků je maximum možných mezishlukových vzdáleností objektů.

$$D_{gg'} = \max(D_{g'h} D_{g'h'}) \quad (4.2.-7)$$

Řetězení objektů se zde neuplatňuje a naopak je tendence k tvorbě kompaktních sférických nevelkých shluků.

3) *Metoda průměrné vazby* bere jako kritérium pro spojování shluků průměrnou mezishlukovou vzdálenost každého členu z jednoho shluku ke každému členu z druhého shluku

$$D_{gg'} = \frac{n_h D_{g'h} + n_{h'} D_{g'h'}}{n_h + n_{h'}} \quad (4.2.-8)$$

kde n_h respektive $n_{h'}$ je počet členů slučovaných shluků. Metoda většinou vede k obdobným výsledkům jako metoda nejbližšího souseda.

4) *Centroidní metoda* nevychází z mezishlukových vzdáleností objektů, ale stanovuje euklidovskou vzdálenosti těžišť shluků (\bar{x}_{h_j}).

$$D_E(\bar{x}_h, \bar{x}_{h'}) = \sqrt{\sum_{j=1}^p (\bar{x}_{h_j} - \bar{x}_{h'_j})^2} \quad (4.2.-9)$$

Přepočet vzdáleností nového shluku od zbylých shluků je dán vztahem:

$$D_{gg'} = \frac{(n_h D_{g'h} + n_{h'} D_{g'h'} - \frac{n_h n_{h'}}{n_h + n_{h'}} D_{hh'})}{n_h + n_{h'}} \quad (4.2.-10)$$

5) *Wardova metoda* využívá ke spojování shluků přírůstek vnitroskupinového součtu (ΔC_1) čtverců odchylek pozorování od shlukového průměru, který lze upravit do formy:

$$\Delta C_1 = \frac{n_h n_{h'}}{n_h + n_{h'}} \sum_{j=1}^p (\bar{x}_{h_j} - \bar{x}_{h'_j})^2 \quad (4.2.-11)$$

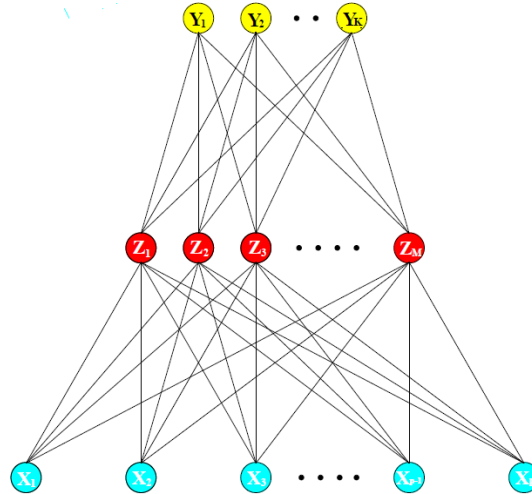
Hodnota koeficientu před sumou roste s velikostí shluků a při pevném $n_h + n_{h'}$ je maximální při $n_h = n_{h'}$. *Wardova metoda*, která minimalizuje ΔC_1 , má proto tendenci odstraňovat malé shluky a vytvářet zhruba stejně velké shluky, což je vítaná vlastnost u datových souborů se stejným rozměrem proměnných. Úpravu matice vzdáleností pro nově vzniklý shluk spočteme při užití euklidovské míry z výrazu:

$$D_{gg'} = \frac{[(n_h + n_{g'}) D_{hg'} + (n_{h'} + n_{g'}) D_{h'g'} - n_{g'} D_{hh'}]}{n_h + n_{h'} + n_{g'}} \quad (4.2.-12)$$

4.3. Neuronové sítě³

Analýza dat neuronovými sítěmi je jednou z tzv. statistických metod s učitelem. Tyto metody vyžadují znalost datového souboru se známými výsledky (v našem případě diagnózami), na kterém se systém naučí rozpoznávat i neznámé vzorky. Existuje několik typů neuronových sítí. Výhodou tzv. vrstevnatých neuronových sítí je jejich schopnost rozdělit prvky do libovolného množství skupin, které nemusí být lineárně separabilní. V těchto sítích mezi sebou komunikují jen neurony z různých vrstev (obr. 4.1).

³ Následující kapitola byla spracována podle Hastie *et al.*, (2008) a Kačenka (1998)



Obr. 4.1. Schéma třívrstvé neuronové sítě (převzato z Hastie *et al.*, 2008)

4.3.1. Neuron

Podobně jako u biologických neuronových sítí představuje neuron základní jednotku počítačové neuronové sítě. Každý neuron má n vstupů $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, a každému z nich přísluší jedna váha w_1, w_2, \dots, w_n . Vážený průměr všech vstupů pak odpovídá vyvolanému vnitřnímu potenciálu neuronu ϕ .

$$\phi = \sum_{i=1}^n w_i x_i \quad (4.3.-1)$$

Každý neuron má také určitý práh θ , který rozhoduje o výstupu y_m z neuronu. Ten se nejčastěji počítá ve tvaru sigmoidy, kde m odpovídá pořadí daného neuronu ve vrstvě. Ten pak slouží za vstup další vrstvě.

$$y_m = \frac{1}{1 - e^{\phi - \theta}} \quad (4.3.-2)$$

4.3.2. Učení vrstevnaté sítě

Schopnost učení je základní vlastností neuronových sítí. Nejprve dojde k inicializaci všech vah sítě náhodnými malými čísly. Následně jsou pro daná vstupní data (spektra vzorků souboru určeného k učení) vypočteny výstupy. Ty díky znalosti správných diagnóz d_j vzorků můžeme porovnat pomocí tzv. chybové funkce E :

$$E = \sum_j \frac{1}{2} (d_j - y_j)^2 \quad (4.3.-3)$$

K vyjádření závislosti E na hodnotách jednotlivých vah vypočteme parciální derivaci:

$$\frac{\partial E}{\partial w_{ij}} = \frac{\partial E}{\partial \phi_j} \frac{\partial \phi_j}{\partial w_{ij}} \quad (4.3.-4)$$

Následně pro novou hodnotu váhy ve vrstvě s lze užít vzorec:

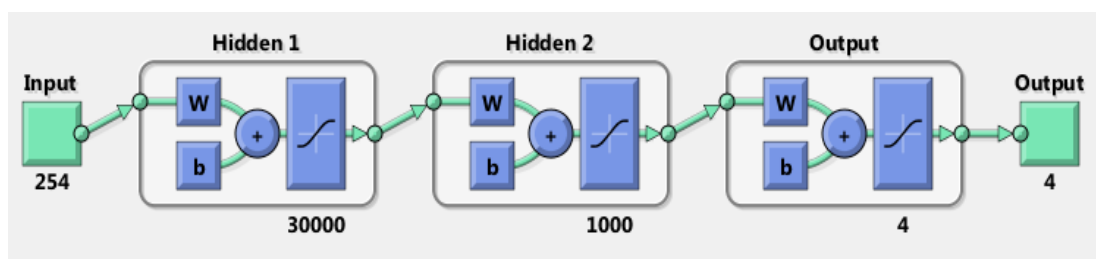
$$w_{ij}^s(\text{nový}) = w_{ij}^s(\text{původní}) + \eta \delta_j^{s+1} y_i^s \quad (4.3.-5)$$

Kde η je tzv. učicí parametr a δ_j představuje změnu váhy vypočtenou ze vztahu (4.3.-4) jako:

$$\delta_j = (1 - y_j)y_j(d_j - y_j) \quad (4.3.-5)$$

Následně se celý proces opakuje dokud není celková chyba menší než zvolená hodnota.

Námi použitou neuronovou sít s 30 00 neurony v první vrstvě, 1000 ve druhém a čtyřmi výstupními (diagnostickými) neurony ve třetí vrstvě zobrazuje obr. 4.2.



Obr. 4.2. Schematický obrázek třívrstvé neuronové sítě o 3000–1000–4 neuronech, kterou jsme použili k vyhodnocení vzorků KS a MM

5. Podmínky měření

5.1. Experimentální technika

K měření jsme používali Ramanovský mikroskop *LabRam HR800* od firmy Horiba Jobin Yvon (obr. 5.1). Většina měření (není-li uvedeno jinak) byla provedena s He-Ne laserem o vlnové délce 632,8 nm a výkonu 20 mW (k mikroskopu je též připojen i diodový laser o vlnové délce 784 nm, a Ar⁺-laser s používanými vlnovými délkami 514 a 488 nm. Systém LabRam disponuje integrovaným konfokální mikroskopem *Olympus* s objektivy 5×, 10× 50× a 100× zvětšením. Měření byla prováděna se zvětšením 50×, zatímco další objektivy jsme užívali pouze při nastavování vzorku. U spektrografu jsme použili mřížku o 600 vrypcech/mm. K detekci spekter pak sloužil kapalným dusíkem chlazený CCD detektor *Symphony* o rozlišení 1024×256 pixelů. Mikroskop disponuje automatickým posuvným stolem s krokem 0,5 μm (pohyb je však plně reprodukovatelný až od ~1 μm) (Klener, 2011), který umožňuje snímání spektrálních map. Právě snímání map snižuje závislost metody na bodových nečistotách a umožňuje získat průměrné spektrum z okraje vzorku (viz kapitola Optimalizace měření). K osvětlení vzorku během ostření a vyhledávání vhodného místa pro měření slouží bílé světlo vedené vlnovodem. Před každým nastavením spektrografu byla provedena kalibrace pomocí vzorku křemíku. Přístroj byl kalibrován na jasně definovaný pás křemíku o 520,7 cm⁻¹. Pro zvýšení reprodukovatelnosti měření disponuje mikroskop ještě neonovou výbojkou. Její spektrum měřené po každém studovaném vzorku pak bylo užito jako standart k jemnější kalibraci vlnočtové škály.



Obr. 5.1. Ramanův mikroskop LabRam HR 800 od firmy Horiba Jobin Yvon

5.2. Vzorky

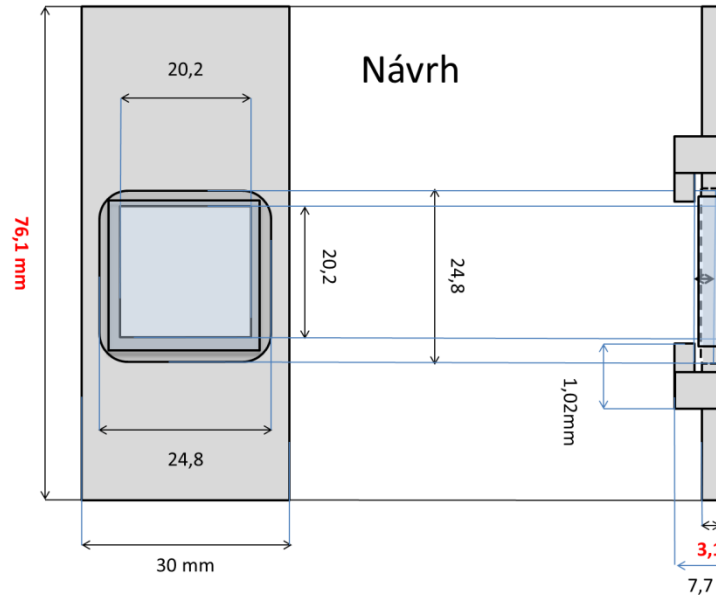
Vzorky byly získány ve spolupráci s doc. MUDr. Alešem Bartošem Ph.D. z Národního ústavu duševního zdraví. Tento projekt byl schválen etickou komisí 3. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Pacienti nebo jejich opatrovníci podepsali informovaný souhlas s odběrem vzorku. Zkoumali jsme 55 vzorků pacientů, u nichž byly k dispozici jak vzorky MM, tak krevního séra. Soubor pacientů lze rozdělit do čtyř skupin. První skupinu tvořilo 18 pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Diagnóza AD byla stanovena na základě kritérií vytvořených americkým Národním ústavem neurologických, komunikativních poruch a mrtvice (NINCDS) ve spolupráci se společností Alzheimerovi nemoci a přidružených onemocnění (ADRDA) (McKahn *et al.*, 1984). Druhou skupinu tvořilo 16 stejně starých zdravých osob, jímž byly odebrány vzorky v rámci diferenciálně diagnostických postupů. Třetí skupinou je 11 pacientů sledovaných pro minimální kognitivní poruchu. Čtvrtá skupina zahrnovala 10 pacientů s jiným typem demence a nebo odlišnou diagnózou. Podrobnější informace o testovaných pacientech shrnuje tab. 4.1.

Tab. 4.1. Podrobnější charakteristika sledovaných pacientů

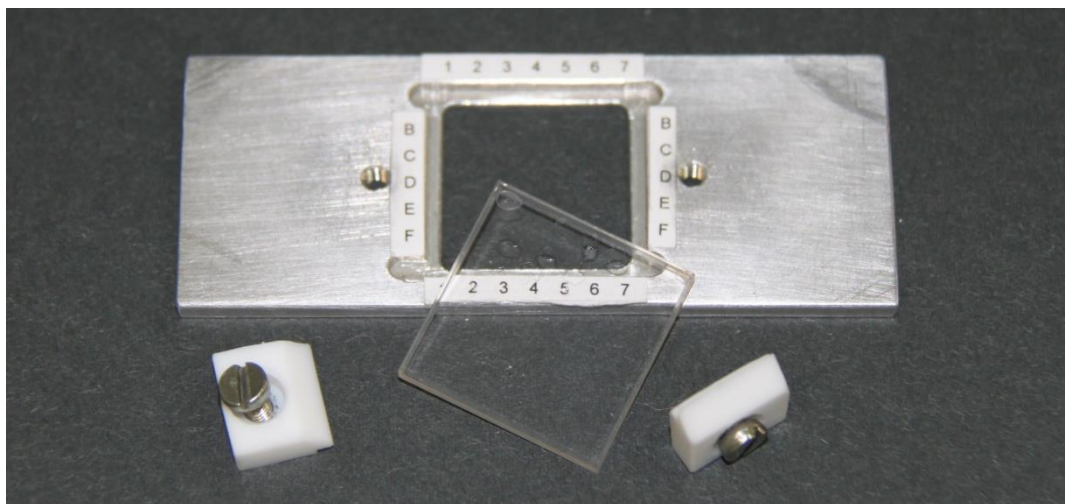
Diagnóza	Počet	Muži	Ženy	Průměrný věk	Minimální věk	Maximální věk
AD	18	6	12	77	56	88
Kontrola	16	11	5	70	58	85
MCI	11	5	6	69	57	83
Ostatní demence	10	5	5	68	54	77

5.3. Nanášení vzorku

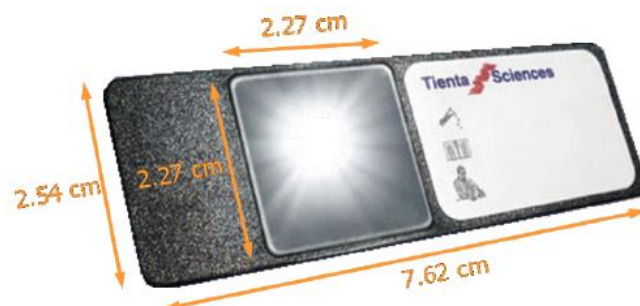
Vzorek byl nanášen na CaF₂ destičky umístěné do speciálně vyrobeného hliníkového držáku vybaveného teflonovými úchytkami (obr. 5.2 a obr. 5.3). K nanášení vzorků MM jsme ve shodě s prací Mgr. Klenera (Klener, 2011) užili podložky SpectRIM™, od firmy Tienta Sciences (obr. 5.4), tvořené plíškem leštěné nerezové oceli 2,27×2,27 cm pokryté napařenou 50 nm hydrofobní vrstvou teflonu, přičemž destička je uchycena na plastové podložce o rozměrech standardního mikroskopického skla o velikosti 2,54×7,62 cm. Pro orientaci na destičce SpectRIM™ i CaF₂ sklíčku jsme ocelový držák i plastovou destičku doplnili o souřadnicový systém o 7×7 bodech (jehož hustota byla volena tak, aby nedocházelo ke smíchání jednotlivých nanášených kapek).



Obr. 5.2. Hliníkový držák s teflonovými úchytkami k měření na CaF_2 substrátu



Obr. 5.3. Hliníkový držák s teflonovými úchytkami a CaF_2 destička



Obr. 5.4. Substráty SpectRIM™ od firmy Tienta Sciences, USA

5.4. Příprava vzorků

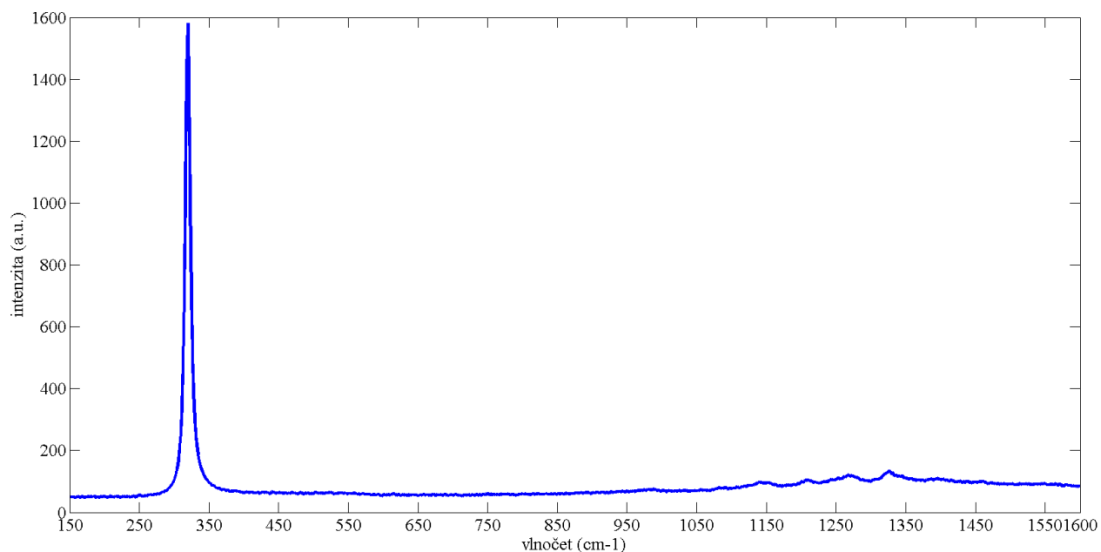
Vzorky KS i MM odebrané pacientům byli uchovávány v mrazáku při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby nemohlo dojít k jejich degradaci. Po rozmrazení byl ze vzorku KS odpipetován $100\text{ }\mu\text{l}$ vzorek určený k opakovanému rozmrazování, tak aby původní vzorek prošel jen jednou stavem ohřátí na pokojovou teplotu a zmražením. Dále byl vzorek ředěn v poměru 1:25 (viz optimalizace měření), jelikož původní vzorek krve byl příliš koncentrovaný pro takto senzitivní metodu. Vzorky byly po naředění na půl minuty stočeny na mini-centrifuze, aby se zajistila homogenita zředění. Takto získaný vzorek byl v objemu $2\text{ }\mu\text{l}$ nakápnut na kalcium fluoridovou destičku, která byla předtím důkladně očištěna proudem vzduchu z balónku. CaF_2 substrát jsme následně překryli Petriho miskou, aby nedošlo k zanesení prachových částic a nechali jsme vzorek vyschnout. Doba vyschnutí séra byla maximálně 1 hodina. U vzorku MM záleželo na použitém substrátu (viz Měření MM na CaF_2 sklíčku). Původní zkumavky, alikvoty a ředěný vzorek byl po nakápnutí okamžitě opět zmražen potopením do tekutého dusíku a následně uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazicím boxu.

Vzorky MM moku byly měřeny dle protokolu vypracovaného Mgr. Klenerem (Klener, 2011) a rovněž byly uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmrazení byly vzorky rozděleny na alikvoty. Pro nedostatek vzorku jsme odpipetovali pouze dvakrát $20\text{ }\mu\text{l}$ na alikvoty se kterými bylo následně pracováno. Jeden z alikvotů každého vzorku byl použit k následnému měření. Nejprve byl stočen v centrifuze *Mikro220R* od firmy Hettich po dobu 5 minut při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $11\ 000\text{ g}$, čímž došlo k usazení fluorescenčních nečistot (celulárních a subcelulárních fragmentů, které mohly kontaminovat vzorek). Následně jsme odebrali $2\text{ }\mu\text{l}$ ze středu vzorku k nanesení na teflonovou destičku SpectRIMTM, která byla opět předtím očištěna proudem vzduchu z balónku. Nanesené kapky jsme opět nechali vysychat přiklopeny Petriho miskou.

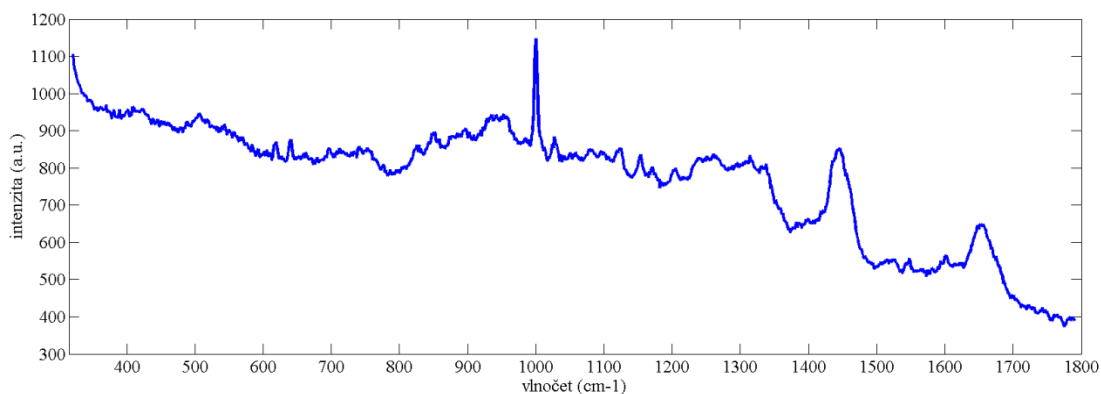
6. Optimalizace měření krevního séra

6.1. Vlastnosti substrátu

Na rozdíl od diplomové práce Mgr. Klenera jsme zvolili za substrát pro DCDR spektroskopii CaF_2 . K uchycení CaF_2 sklíček byl vyroben hliníkový držák s úchytkami. Pro orientaci na sklíčku jsme ocelový držák doplnili o souřadnicový systém o 7×7 bodech (jehož hustota byla volena tak, aby nedocházelo ke smíchání jednotlivých nanášených kapek; shodně s předchozími zkušenostmi s komerčním substrátem SpectRIM™). Největší výhodou CaF_2 substrátu je výrazně nižší pořizovací cena v porovnání s teflonem pokrytou ocelovou destičkou SpectRIM™ (Tienta Sciences). Díky konfokalitě mikroskopu je možné také využít k nanášení obě strany CaF_2 destičky. Je však nutné věnovat dostatečnou pozornost zaostřování mikroskopu na správný povrch sklíčka. Na rozdíl od substrátu SpectRIM™, lze CaF_2 destičky také po důkladném omytí deionizovanou vodou a osušením proudem vzduchu užívat opakovaně (v případě vzniku škrábanců či vrypů, je možné navíc destičku nechat v optických dílnách přeleštit). Pro zhodnocení vlivu spektrálního pozadí CaF_2 sklíčka na naměřená spektra vzorku séra a moku jsme nejprve změřili samotný povrch sklíčka. Použití mřížky o 300 vrypech/mm nám umožnilo detekovat oblast *ca.* $100\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$. Spektru CaF_2 v souladu s předchozím pozorováním Filika a Stona (Filik & Stone, 2007) dominuje pás $\sim 320\text{ cm}^{-1}$ (obr. 6.1). Tento jasně definovaný pás, se ale nachází mimo námi studovanou oblast (naše měření probíhala v rozsahu pokrývajícím především základní vibrace proteinů, tj. $700\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$). Pás CaF_2 by naopak mohl být s výhodou využit ke kontrole kalibrace, pokud bychom měřili v širší oblasti vlnočtů. V oblasti $\sim 360\text{--}1070\text{ cm}^{-1}$ nemá substrát žádný Ramanův signál. Mezi $1070\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$ lze pozorovat široký pás o maximální změně intenzity 50 relativních jednotek, přičemž typické spektrum proteinů v této oblasti má 300 relativních jednotek (obr. 6.2). Tedy jeho intenzita nevede k překrytí vibrací proteinu, což jsme ověřili měřením naneseného vzorku séra, na kterém lze jasně odlišit vibrace amidu I, amidu III a signál od postranních řetězců aminokyselin. CaF_2 je tedy levnou obnovitelnou alternativou SpectRIM™ substrátu a umožňuje detekci spektrálních změn naneseného vzorku.



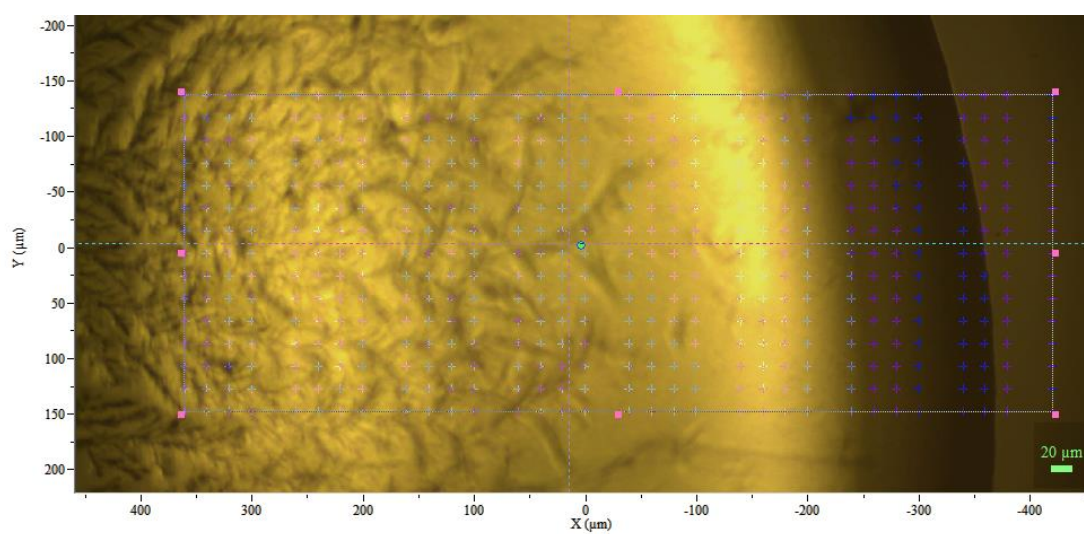
Obr. 6.1. Spektrum CaF₂ substrátu při užití mřížky o 300 vrypech/mm expozice 18 × 10 s, excitace laserem na 784,573 nm



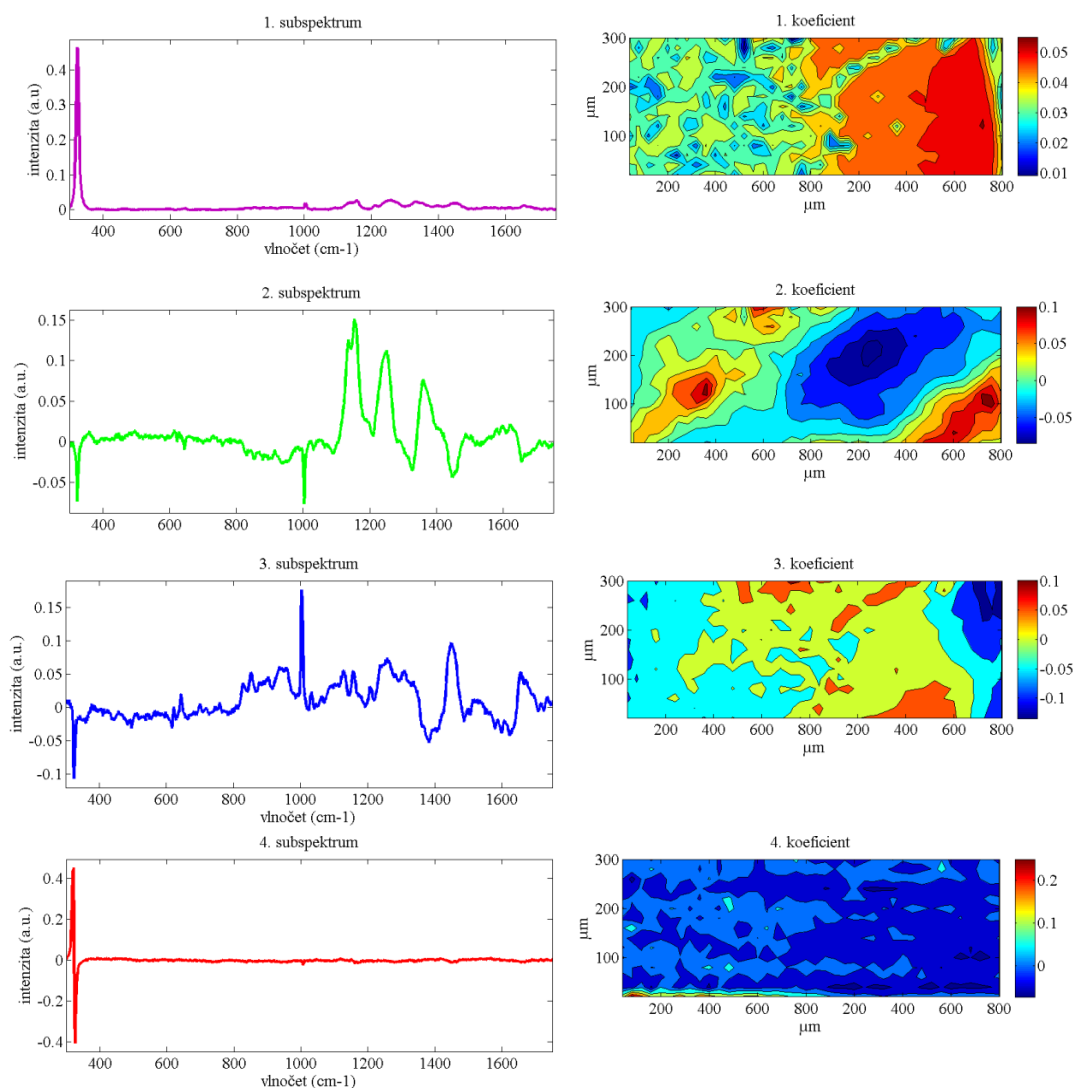
Obr. 6.2. Spektrum séra při užití mřížky o 600 vrypech/mm, akvizice 18 × 10 s, excitace laserem na 784,573 nm

6.2. Vysychání vzorku

Vzorek lidského séra po nanesení na CaF₂ substrát dle našich pozorování vysychá v rozmezí 20 minut až 1 hodiny, což je v dobré shodě s výsledky Filika a Stona na směsi proteinů (Filik & Stone, 2007). Po vyschnutí jsme se zaměřili na ověření předpokladu vytváření proteinového prstýnku efektem kávového kroužku. Na fotografii při 10× zvětšení lze vidět nepřesně ohraničený silný prstýnek (obr. 6.3), který jsme proměřili pomocí funkce mapování (snímáním v předem definovaných bodech) v 15×40 bodech s roztečí 20 μm.

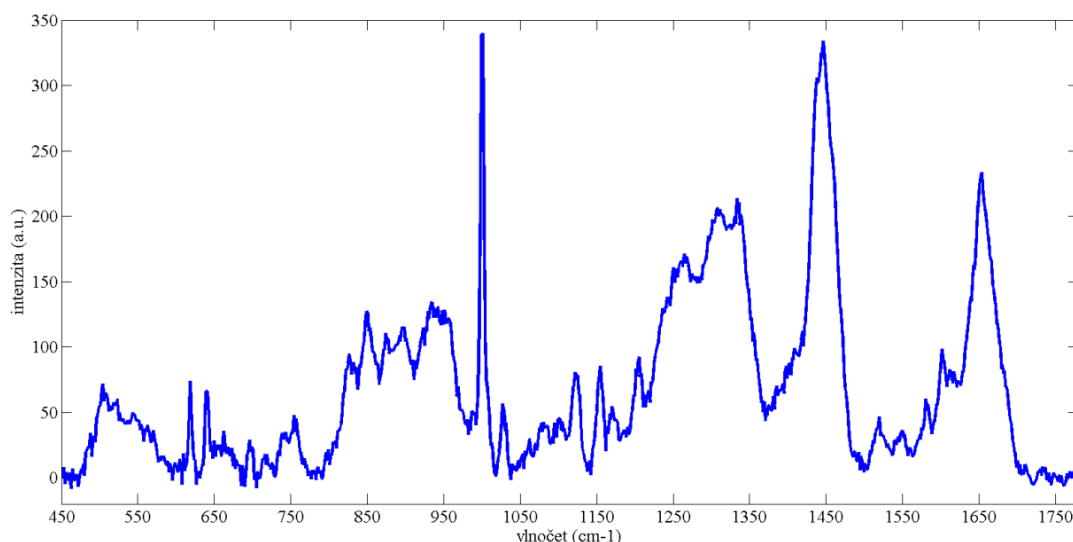


Obr. 6.3. Fotografie vyschlé kapky séra při 10× zvětšení a s vyznačením bodů spektrální mapy



Obr. 6.4. Mapy koeficientů PCA analýzy naměřených spekter

První a třetí subspektrum PCA po odečtení odpovídá signálu proteinů a jak je vidět na obr. 6.4 vytváří široký prstýnek na kraji vzorku. Druhé subspektrum naznačuje vznik odlišné vrstvy proteinů na vnějším okraji vzorku. Ve shodě s předchozí prací (Kopecký & Baumruk, 2006) lze předpokládat, že se jedná o vrstvu plně vyschlého proteinu. Nehomogenity ve třetím subspektru lze považovat za signál nečistot kontaminujících vzorek séra. Ve čtvrtém subspektru je pozorovatelný posun pásu CaF_2 , který je způsoben nestabilitou kalibrace detektoru. Další subspektra lze na základě lineárního průběhu singulárních čísel zanedbat. Z výsledků PCA tedy plyne jasná depozice proteinového prstence na kraji vyschlé kapky. To jsme následně ověřili bodovým měřením ze středu prstýnku. Při úpravě spektrálního rozmezí snímaného CCD detektorem na $430\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$, tak abychom zahrnuli do studované oblasti nejvýznamnější oblasti vibrační proteinů, jsme získali spektrum séra o vysoké kvalitě (obr. 6.5).



Obr. 6.5. Spektrum séra po odečtu pozadí

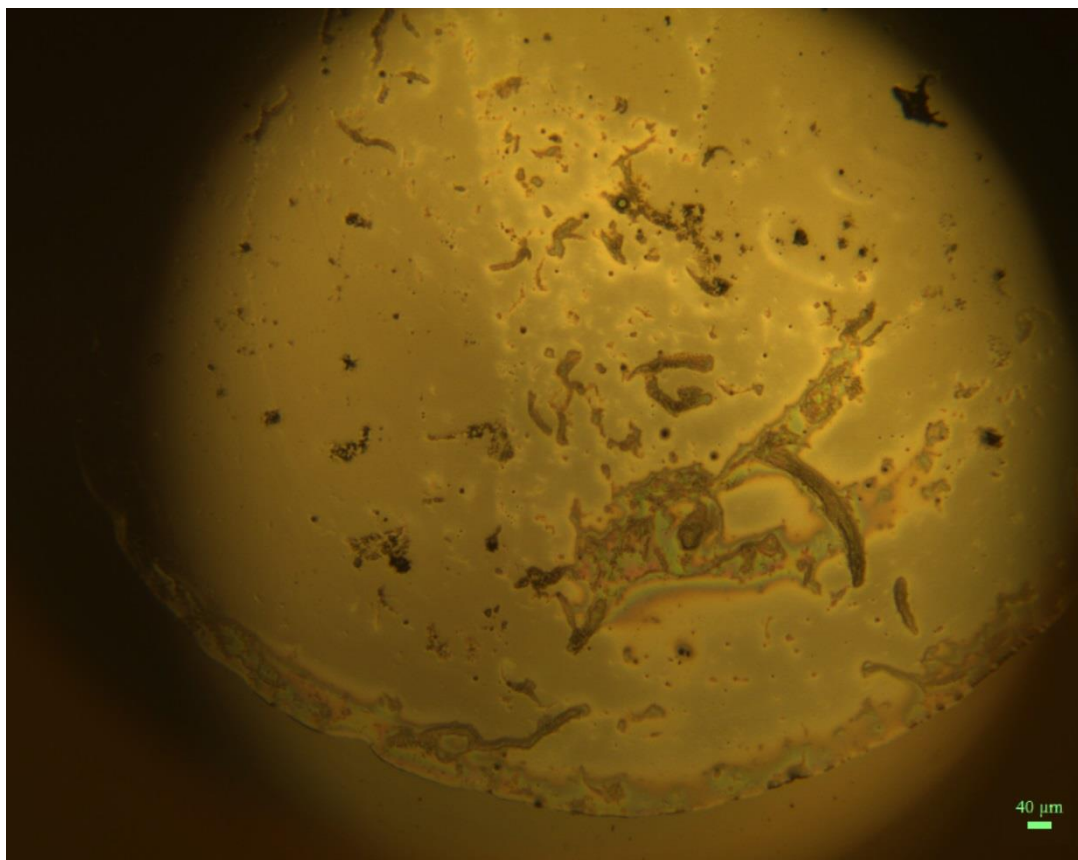
6.3. Nastavení spektrometru

Ověřili jsme vliv nastavení konfokální štěrbinu na měření. Postupným rozevíráním štěrbinu od 100 μm do 1100 μm narůstá signál vzorku i CaF_2 . Vyšší intenzita signálu umožňuje citlivěji vyhodnocovat spektrální změny, jelikož narůstá poměr signál/šum. Příliš velké rozevření konfokální štěrbinu na druhou stranu vede ke ztrátě konfokality mikroskopu, kdy nelze přesně definovat oblast vzorku a substrátu, ze kterých je snímán signál. To se projevuje výraznějším nárůstem signálu CaF_2 oproti signálu séra. Na základě těchto podmínek bylo určeno jako ideální nastavení konfokální štěrbinu na 400 μm , kdy je ještě hraničně zachována konfokalita mikroskopu a zároveň je dosaženo největší intezity signálu. Intenzita signálu je také ovlivněna fokusem objektivu. Nejlepší výsledek dle očekávání dává zaostření doprostřed výšky prstýnku séra, kdy je snímán největší rozsah séra a naopak nejméně CaF_2 . Odhadnutí zaostření doprostřed výšky prstýnku je ale pouze orientační a velice nepřesné. Navíc při měření map není dobře reprodukovatelné, a proto jsme při našich měřeních zaostřovali na hranu vysušené kapky a povrch substrátu.

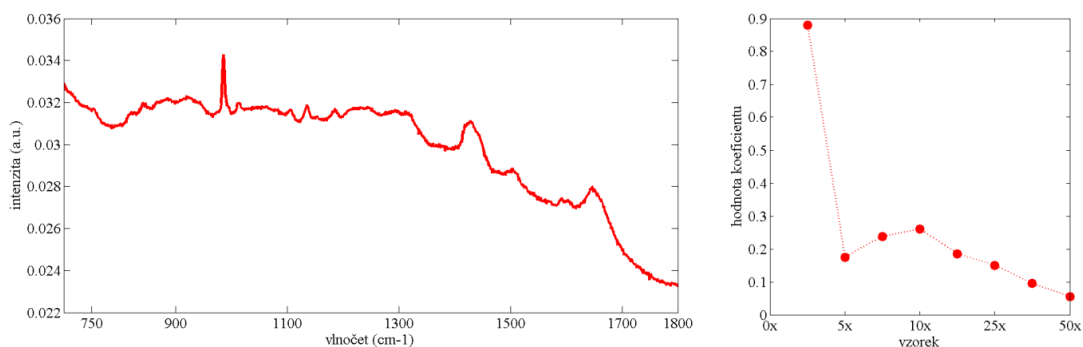
6.4. Ředění vzorku

Pro dobře definovanou reprodukovatelnost měření, která je podstatou klinicky využitelné diagnostické metody bylo nutné zejména určit cílovou oblast měření, způsob jejího měření (mapování vs. bodové měření) a snížení fluorescenčního pozadí vzorku. Veškeré tyto faktory závisejí na koncentraci vzorku. Sérum je velice koncentrovaný vzorek s obsahem 65–85 g/l bílkoviny. Proto bývá pro zpracování pomocí citlivých diagnostických metod často ředěn (např. ředění 1:100 u ELISA analýzy protilátek proti cardiolipinu (Loizou *et al.*, 1985). DCDR spektroskopie je metoda poskytující výborné výsledky i při $\sim 500\times$ nižší koncentraci jak naznačili Kopecký a Baumruk (Kopecký & Baumruk, 2006). Ve shodě s nimi jsme také

pozorovali vytváření prasklin na povrchu vzorku (Kopecký & Baumruk, 2006) tzv. krakelace, které souvisí s vysycháním zbytků vody, což může signalizovat vytváření krystalické struktury. Proto jsme proměřili vzorek séra při různém ředění 0×, 5×, 10×, 100×, 150×, 200×, 300×, 400×. Pozorovali jsme zužování prstýnku na okraji vysušené kapky séra, což umožňuje měřit u ředěných vzorků menší mapy a urychluje tak měření vzorku. Pro 300× a 400× ředění jsme zaznamenali narušení kroužku, kdy v určitých úsecích nebyl vizuálně rozlišitelný (obr. 6.6). 100×, 150× a 200× ředěn vzorky vytvářeli jasně rozlišitelný kroužek, který nebyl ale v celém vzorku homogenní. Naopak výhodou ředění byla lepší separace proteinové složky od zbylých složek krevního séra a tak zjednodušení námi studovaného systému. Ředění také vede k relativnímu poklesu signálu fluorescenčního pozadí k signálu proteinu v souladu s dříve publikovanou prací (Zhang *et al.*, 2004). Proto jsme se nadále rozhodli zaměřit se na ředění 5×, 10×, 25×, 50×, 75× a 100×. Abychom eliminovali vliv nečistot (Ortiz *et al.*, 2006), rozhodli jsme se měřit čtvercové mapy 10×10 bodů s různou roztečí, tak abychom proměřili celý prstenec. Analýzou hlavních komponent jsme ověřili, že při ředění se neztrácí složky prstýnku. Na základě poměru intenzity měřeného signálu a šířky prstýnku byla za nejvhodnější ředění zvolena 30× a 25×. Pro další postup jsme zvolili 25× ředění, jelikož má díky vyšší koncentraci vzorku vyšší signál proteinu (obr. 6.7).



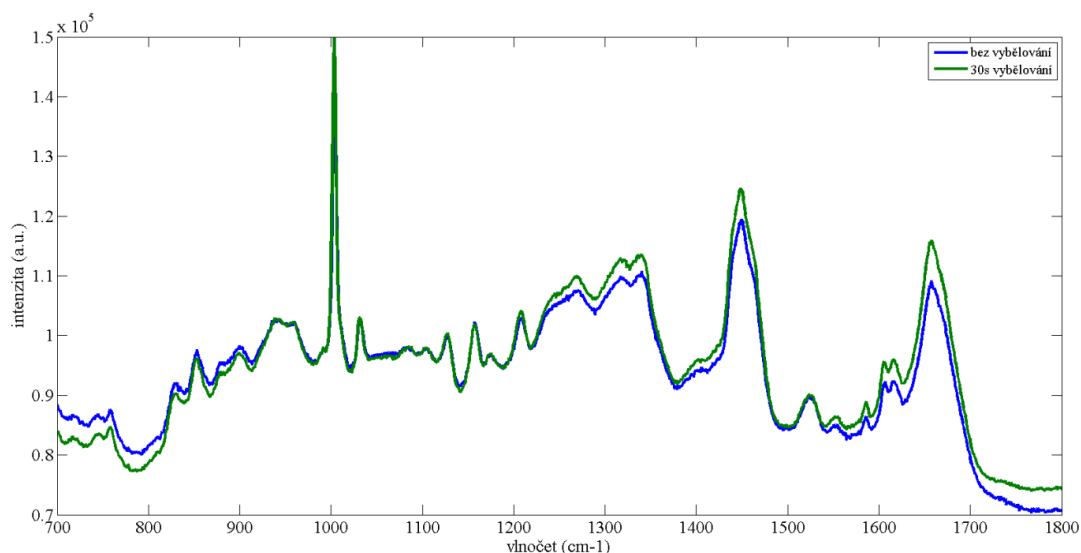
Obr. 6.6. Nehomogenní kroužek 400× ředěného vzorku



Obr. 6.7. První subspektrum a koeficient PCA analýzy průměrných spekter bez odečtení pozadí pro vzorky 0×, 5×, 10×, 15×, 25×, 50×, 75×, 100× a 400× ředěné

6.5. Vybělování fluorescenčního pozadí

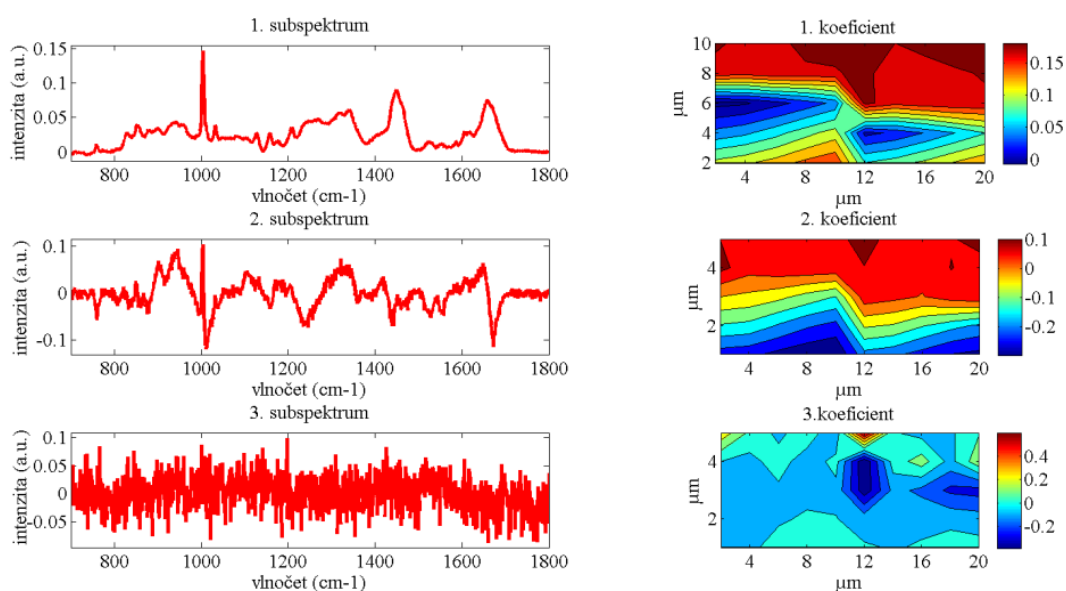
Dále jsme se pokusili redukovat pozadí pomocí vybělování, kdy v daném bodě měření nejprve svítí laser 30 s a teprve potom začne snímání Ramanova spektra. Použití vybělování, při takto krátké expozici laserovému svazku, nevedlo k výraznějšímu snížení signálu pozadí (obr. 6.8). Delší expozice by pravděpodobně vedla ke snížení signálu fluorescence, ale značně by prodlužovala dobu měření. Navíc dle dostupné literatury (Zhang *et al.*, 2004) vybělování snižuje intenzitu pozadí výrazně méně než ředění. Proto bylo od něj v dalším průběhu měření upuštěno.



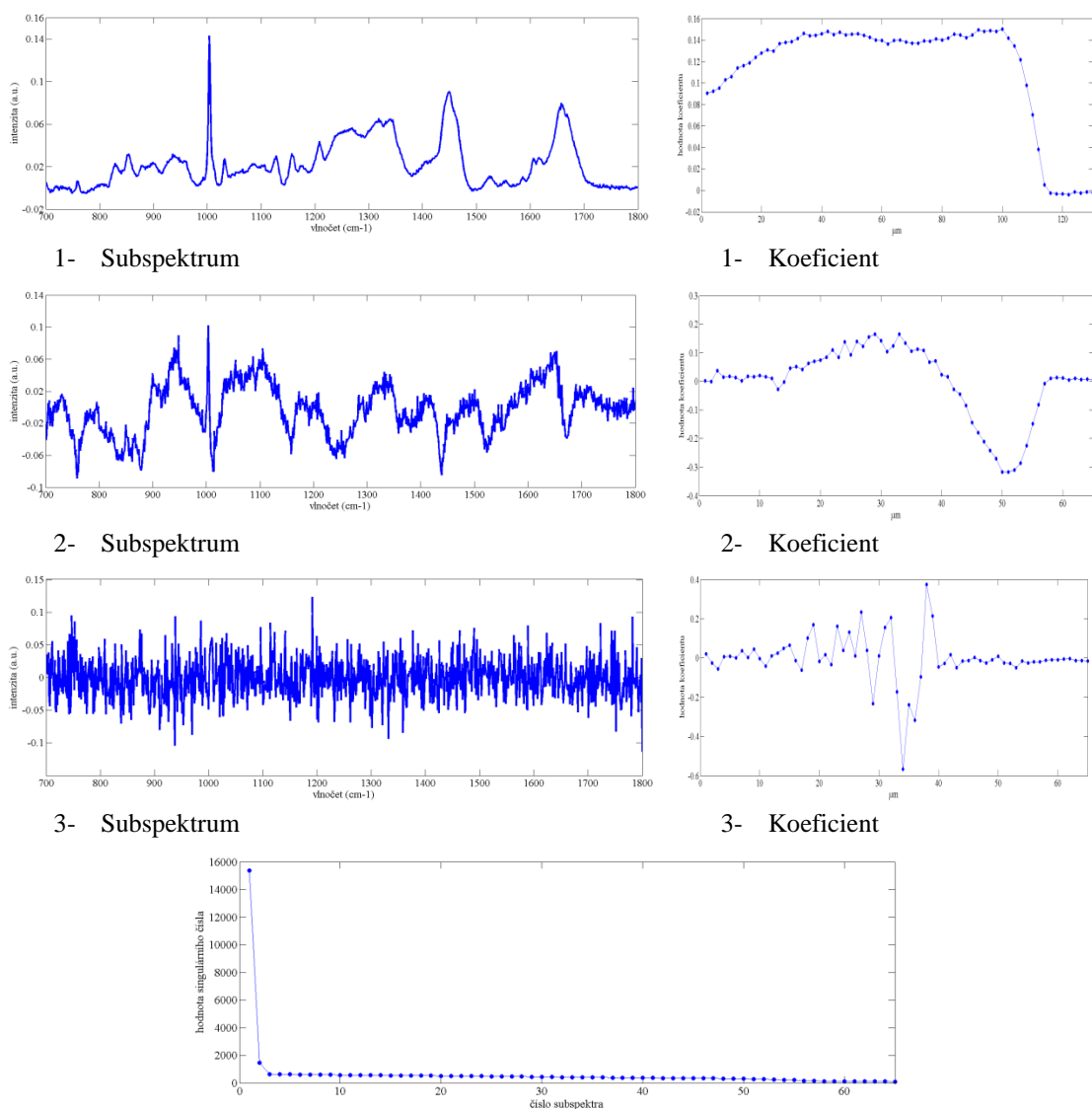
Obr. 6.8. Porovnání vzorků měřeného ze stejného místa bez vybělování a s 30s vybělováním nad každým bodem (normalizováno na pás fenylalaninu 1000 cm^{-1}).

6.6. Určení místa měření

Po určení vhodné koncentrace vzorku bylo nutné nalézt vhodné místo měření. Nejvýraznější spektrální rozdíly měření stejného vzorku způsobuje signál nečistot. Proto jsme se ve shodě s doporučením v literatuře (Ortiz *et al.*, 2006) rozhodli používat možnost mapování a výsledné spektrum získat zprůměrováním spekter z více bodů. Z výsledků PCA měření čtvercových map na vnějším a vnitřním kraji proteinového prstýnku po odečtení fluorescenčního pozadí (obr. 6.9) vychází, že prstýnek je tvořen dvěma oblastmi (viz výše), a že je v tečném směru homogenní. Abychom zvýšili efektivitu metody a zkrátili dobu měření, rozhodli jsme se měřit úsečku v radiálním směru vyschlé kapky pokrývající celou viditelnou tloušťku prstýnku (obr. 6.10). Pro lepší srovnání s metodou použitou pro měření MM (Klener, 2011) jsme drželi rozteč mezi body na 2 μm . Jak vyplívá z obr. 6.10, profil kroužku odpovídá již dříve změřeným výsledkům Kopeckého a Baumruka (Kopecký & Baumruk, 2006) se strmým vzestupem a vklesnutím na vrcholu kroužku.



Obr. 6.9. První tři subspektra a jejich koeficienty na mapách 5×5 bodů s roztečí 2 μm vynášeny do jedné mapy (vnější kraj $x \in (0-10)$, vnitřní kraj $x \in (10-20)$) proteinového prstýnku



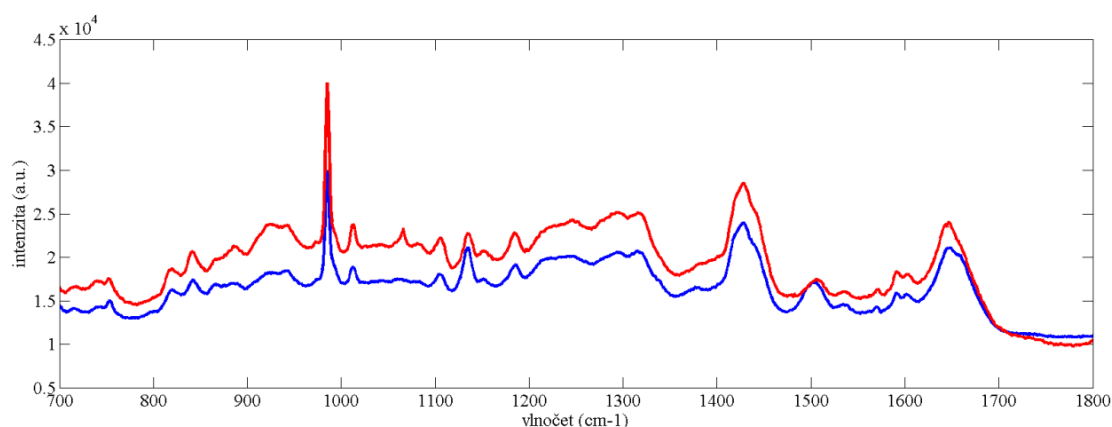
Průběh singulárních čísel PCA analýzy

Obr. 6.10. Výsledek PCA analýzy z mapy 1×65 bodů s roztečí $2 \mu\text{m}$ v radiálním směru. (U spekter bylo provedeno odečtení fluorescenčního pozadí.)

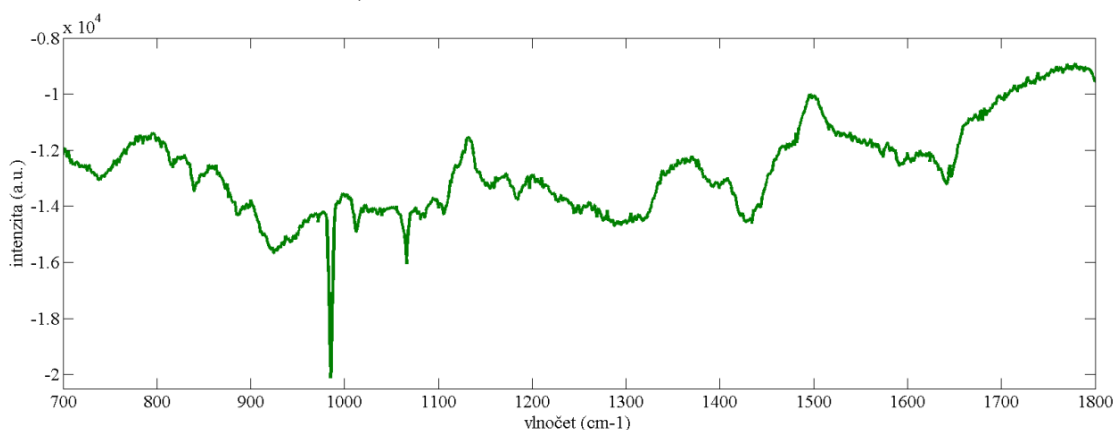
6.7. Degradace vzorku

Zhang *et al.* ve své úvodní práci k DCDR spektroskopii nepozorovali spektrální změny vzorku lidského inzulinu v horizontu týdnů. Ortiz *et al.* následně upřesnili, že ke změně spektrálního profilu mezi různou dobou měření dochází, ale že tato změna není způsobena denaturací vzorku nebo výraznou konformační změnou a souvisí pravděpodobně spíše se změnou hydratace (Ortiz *et al.*, 2006). Posun pásu amidu I k vyšším frekvencím vysvětlují malým nárůstem struktury β -skládaného listu. Během našich měření jsme pozorovali vznik prasklin na vzorcích v průběhu času a to přestože bylo sklíčko CaF_2 uchováváno v exikátoru. To je pravděpodobně způsobeno dalším vysoušením vzorku. Porovnáním měření vzorku po uchovávání přes noc v exikátoru jsme pozorovali slabý nárůst intenzity spektra (obr. 6.11 a obr. 6.12), což

by také mohlo odpovídat většímu zakoncentrování vzorku po dalším odpařování. Diferenční spektrum normalizovaných průměrných spekter vzorku ze dvou dnů vykazovalo v souladu s Oritz *et al.* posun pásu amidu I k vyšším vlnočtům a nárůst pásu na 1066 cm^{-1} odpovídajícího signálu postraních řetězců aminokyselin, který jak ukázali Kopecký & Baumruk (2006) závisí na lokálním prostředí proteinu. Zbylé spektrální rozdíly jsou způsobeny zejména různými místy měření, které nelze přesně reprodukovat. Při měření diagnostických vzorků byla s výjimkou vzorků 23, 24 a 25 měřena spektra po nakápnutí bez předchozího uchování v exikátoru. Vzorky 23, 24, 25 byly měřeny druhý den po nakápnutí, kdy byly přes noc uchovány v exikátoru. Měření druhý den je komplikováno zejména vytvořenými krakelacemi, což ztěžuje nalezení vhodného místa pro měření.



Obr. 6.11. Porovnání průměrných spekter téhož vzorku měřeného první a druhý den (červeně značeno spektrum měřené druhý den, modře spektrum měřené okamžitě po nanesení na DCDR substrát)



Obr. 6.12. Diferenční spektrum vzorků měřených první a druhý den

6.8. Optimalizace měření mozkomíšního moku⁴

Vzorky mozkomíšního moku mají spektrálně homogenní výškový profil (Rosová, 2008) a tudíž je není nutné měřit v konfokálním modu. Proto bylo při měření mozkomíšního moku použito nastavení konfokální štěrbinu na 400 μm . Rosová také zaznamenala rychlou degradaci vzorků MM při skladování za běžných podmínek a navrhla pro zpomalení rozkladu vzorku skladovat DCDR destičku v lednici při 5 °C, což rozklad zpomalí. Také ukázala, že na DCDR MM vytváří pouze malý prstýnek proteinu a ve středu vzorku se tvoří značné množství krystalů solí a močoviny (Rosová, 2008). Proto bylo zvažováno užití mikrodialýzy k odstranění nízkomolekulárních látek a zamezení jejich krystalizace. Mikrodialýza vede po dvaceti minutách k odstranění dostatečného množství krystalických látek, takže deponovaný vzorek vytváří typický vzor proteinového prstýnku. Dialýza jak bylo ukázáno, ale není vhodná k získání diagnostických dat, a proto od ní bylo upuštěno. Výrazným limitem vzorků je jejich fluorescenční pozadí. Proto bylo zvažováno využití vybělování vzorků. Vybělování vzorků, ale prodlužuje celkovou dobu měření a nevede k zjednodušení interpretace měření. Proto bylo od vybělování upuštěno. Jelikož rozměr prstýnku kávového kroužku je pro mozkomíšní mok 20–30 μm a velikost nečistot maximálně ~10 μm bylo pro zajištění dostatečné reprodukovatelnosti měření zvoleno měření čtvercové mapy o rozměrech 20×20 μm . Při určování rozteče bylo ukázáno, že poměr signál/šum pro vzorky MM narůstá rychleji než odmocnina z navýšení počtu bodů. Tedy navýšení počtu bodů zvyšuje kvalitu naměřených spekter. Vzhledem k lineárnímu nárůstu času měření, bylo ale nutné pro budoucí praktické užití metody nutné zvolit kompromisní řešení o rozteči 2 μm a době měření (včetně měření spektra kalibrační neonové výbojky) ~1 h 5 minut.

Pro měření MM k diagnostickým účelům bylo nutné optimalizovat uchovávání vzorků a ověřit jejich degradaci. Bylo ukázáno, že teplotní skok při uskladnění DCDR destičky do ledničky (~4 °C) a při jejím opětovném užití k měření způsobuje výrazné změny v prostorovém rozložení složek vyschlé kapky. Proto bylo využito exikátoru, do kterého byly vzorky po doměření uzavřeny a následně uloženy do lednice. Při jejich opětovném užití byly nejprve temperovány v exikátoru a následně použity k měření. Důležité bylo také ověřit vliv opakovaného rozmrazování a degradaci rozmraženého MM. Klener et al. ukázali, že opakované rozmrazování vzorku, nebo jeho ponechání při pokojové teplotě vedou k podobným spektrálním změnám v amidu I ~1660 cm^{-1} , které lze pravděpodobně připsat úbytku α -helikálních sekundárních struktur v proteinové složce MM. Dále pak pozorovali změny pásu na ~1610 cm^{-1} a CH₂ vibrací ~1450 cm^{-1} . Pro vzorky ponechané při pokojové teplotě pozorovali také změny v pásu ~1330 cm^{-1} , v pásu fenylyalaninu 1002 cm^{-1} , v oblasti tyrosinového dubletu (850 a 825 cm^{-1}) a pásu na ~760 cm^{-1} .

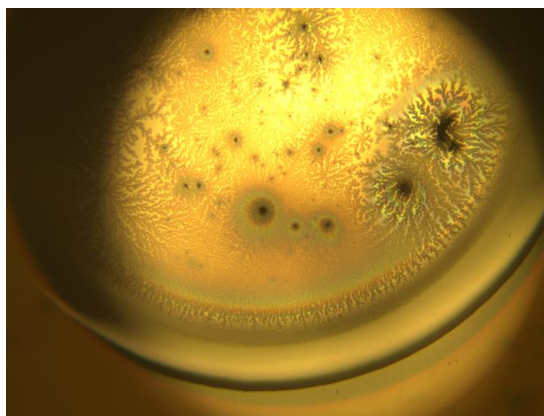
⁴ Optimalizaci měření mozkomíšního moku zpracoval ve své diplomové práci Mgr. Jakub Klener (Klener, 2011) Tato kapitola je shrnutím jeho výsledků.

Opakovaně rozmrazované vzorky naopak charakterizují změny v pásu na 1325 cm^{-1} , v oblasti amidu III $\sim 1270\text{ cm}^{-1}$, které opět značí úbytek α -helikální struktury proteinu (Klener *et al.*, 2014). Rozdílný spektrální profil vznikající při degradaci opakovaným zamrazováním nebo stáním vzorku při pokojové teplotě je nejspíše způsoben degradací různých proteinů. Zajímavým zjištěním je absence změn indukovaných zamrazováním u dialyzovaných vzorků. To by mohlo značit, že se dialýzou neodstraňují pouze nízkomolekulární soli, ale i proteiny MM. Dialýza by tak mohla způsobovat ztrátu důležitých diagnostických markerů z MM a ovlivnit tak výsledky analýzy. Aby se vliv degradace na naměřená spektra co nejvíce omezil, by veškeré zamrazované vzorky nejprve ponořeny do kapalného dusíku. Tak dojde k rychlému zamrazení vzorku, které omezí jeho degradaci.

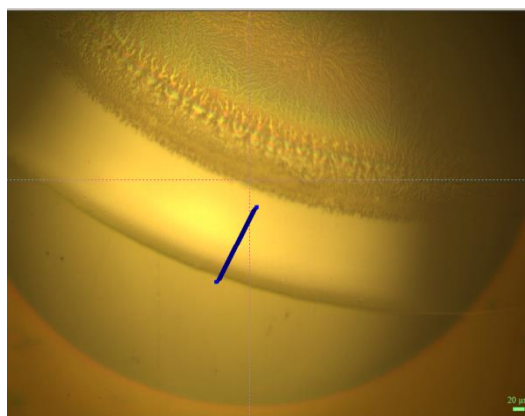
6.9. Měření a zpracování spekter

K měření vzorků byl využit obslužný software Ramanovského mikroskopu *LabSpec* (Horiba Jobin Yvon). Tento software umožňoval kalibraci detektoru na pás křemíku $520,7\text{ cm}^{-1}$, která byla prováděna každý den před započítím měření. Spektra vzorků byla vždy měřena ve třech akumulacích s 10s expozicí. *LabSpec* následně na základě porovnání spekter jednotlivých akumulací odstranil pásy způsobené průletem částic kosmického záření detektorem.

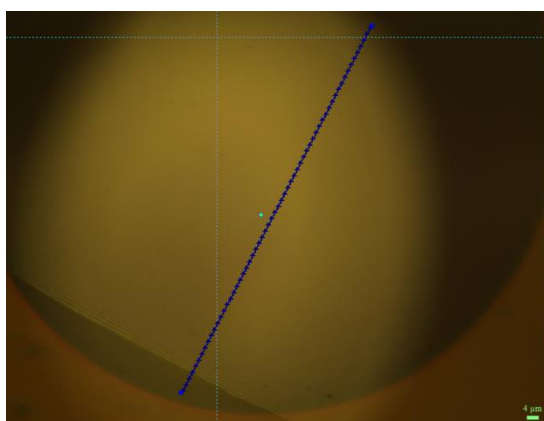
Veškerá měření byla prováděna pomocí He-Ne laseru o vlnové délce $632,8\text{ nm}$ a mřížky s 600 vropy/mm , jejíž střed byl nastaven na $1274,9\text{ cm}^{-1}$, tak aby byla snímána oblast $\sim 700\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$. Před každým měřením byly pořízeny tři fotografie při $5\times$, $10\times$ a $50\times$ zvětšení (obr. 6.13). Fotografie zobrazují lokalizaci matice bodů použitou k měření mapy. Ta byla pro vzorky séra představována úsečkou o 60 bodech v radiálním směru vyschlé kapky, a to tak aby pokryla celou šířku prstýnku vzniklého efektem kávového kroužku. Experimentálně jsme určili pro $25\times$ řaděné vzorky rozteč mezi body úsečky na $2\text{ }\mu\text{m}$. Místo měření bylo nejprve zvoleno při $10\times$ zvětšení a následně korigováno při zvětšení $50\times$, při kterém také probíhalo samotné měření, a to tak aby byly první tři měřené body umístěny na povrch substrátu a čtvrtý na hranu vyschlé kapky. Celková doba měření, včetně doby vyčítání CCD detektoru, byla ~ 36 minut.



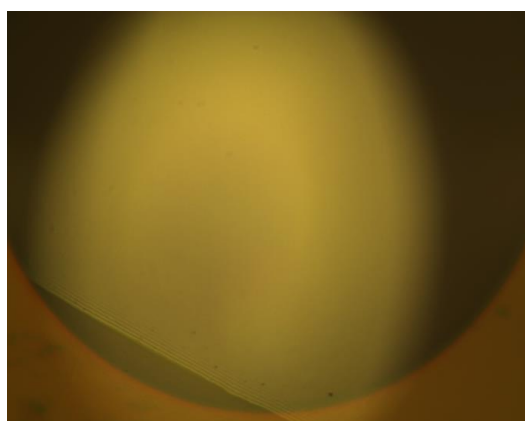
5× zvětšení



10× zvětšení s vyznačenou mapou



50× zvětšení s vyznačenou mapou

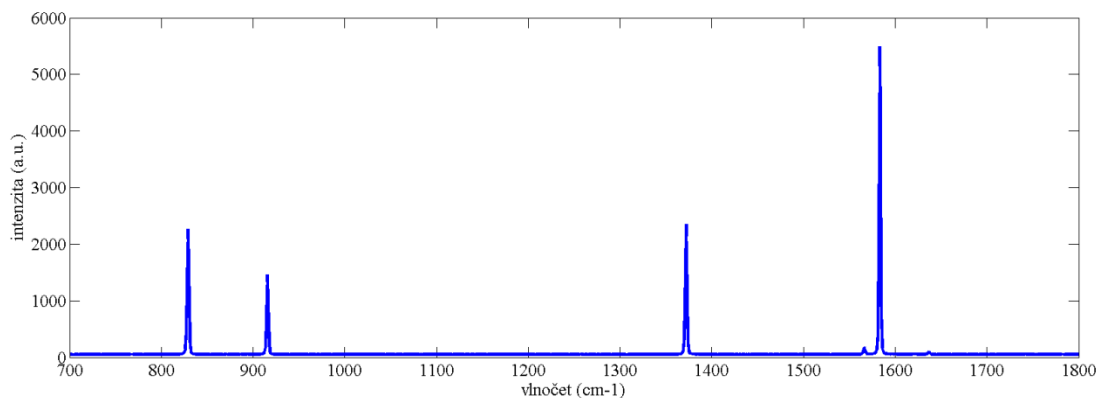


50× zvětšení oblasti po měření

Obr. 6. 13. Fotografie 25× ředěného séra při různém zvětšení a fotografie téhož vzorku po měření (bez známek fotodegradace)

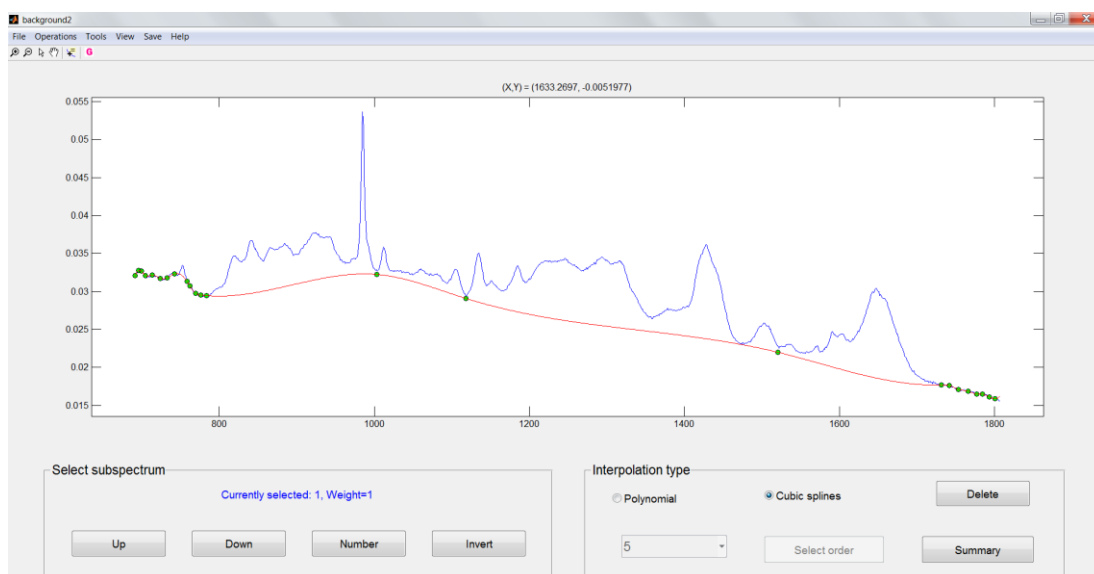
Vzorky mozkomíšního moku byly měřeny dle protokolu vypracovaného Mgr. Jakubem Klenerem, tedy při stejném nastavení mikroskopu byly měřeny mapy 10×10 bodů z okraje kroužku také s roztečí 2 μm. Mapy byly rovněž umístěny tak aby vnější hrana mapy ležela na hraně vyschlé kapky a jeden roh zasahoval na povrch substrátu a sloužil tak jako reference nulového signálu a identifikace orientace kroužku při vyhodnocování mapy. Celková doba měření byla 60 minut.

Ke každému měřenému vzorku bylo poté naměřeno kalibrační spektrum neonové výbojky (obr. 6.14). Program doc. Jiřího Boka z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy v Praze *NeoKalMok07* ve své aktualizované verzi 11/ 2011 byl následně použit k přesné kalibraci vlnočtové škály spekter podle známých čar neonové výbojky, čímž byla zajištěna porovnatelnost vlnočtů mezi jednotlivými měřeními. Tento program navíc linearizoval vlnočtovou škálu a interpoloval jí na celočíselnou škálu s krokem 1 cm⁻¹.



Obr. 6.14. Spektrum neonové výbojky použité ke kalibraci

Poté byla spektra zpracována pomocí programu *Background 2* Dr. Jana Palackého z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy v Praze v prostředí *Matlab* (The Matworks), který umožňuje rozložit spektra na jednotlivé hlavní komponenty (subspektra) metodou PCA (viz kapitola 4) a v nich následně provést odečet fluorescenčního pozadí. Takto je značně zjednodušen odečet pozadí pro celou mapu, jelikož se projevuje pouze v prvních několika subspektrech a není tak nutné jej odečítat v jednotlivých bodech. Fluorescenční pozadí je ve vzorcích séra vyvoláno zejména obsahem hemoglobinu, hemu a jejich degradačními produkty (např. bilirubinem). Ve vzorcích mozkomíšního moku se tyto látky fyziologicky nevyskytují, ale kontaminují vzorek při jeho odběru. Pozadí bylo odečteno podle doporučení Williamse pro spektrum proteinu (obr. 6.15.), který tvoří hlavní součást měřeného signálu. Hodnoty intenzity v oblastech $700\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ a $1730\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$ byly drženy rovny nule a na 1160 cm^{-1} a 1520 cm^{-1} se nule blížily (Williams, 1986). Na rozdíl od práce Mgr. Klenera, nebyla naše měření komplikována parazitními pásy kosmického záření (pravděpodobně díky klesající sluneční aktivitě) a to jak pro vzorky séra tak i moku. Nebylo tedy nutné užít jím napsaný program *Spike* k jejich dodatečnému odečtení.



Obr. 6.15. Odečet pozadí pomocí programu *Background 2*

7. Výsledky měření a diskuze

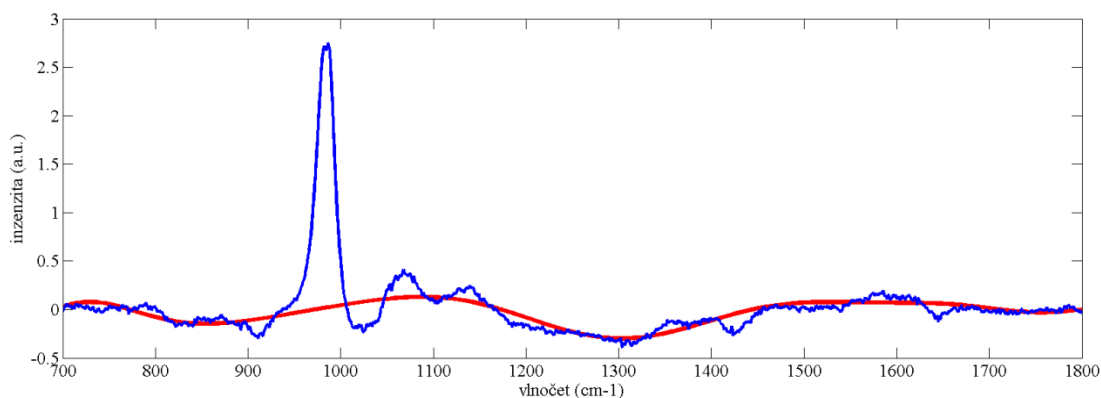
7.1. Ověření diagnostiky Alzheimerovi demence z mozkomíšního moku

7.1.1. Diagnostické zpracování

Nejprve jsme se pokusili aplikovat diagnostickou metodu vyvinutou na souboru pěti nemocných pacientů a pěti stejně starých zdravých kontrol Mgr. Klenerem v jeho diplomové práci (Klener, 2011) na větší soubor pacientů, který navíc zahrnoval i pacienty s MCI a s jiným typem demence. Nejprve jsme odečetli fluorescenční pozadí jednotlivých vzorků pomocí programu *Background 2* dle (Williams, 1986). Narozdíl od původní metody jsme neodstraňovali pásy příslušející zachycení kosmického záření detektorem. Software *LabSpec* je byl schopen na základě porovnávání jednotlivých akvizic dostatečně přesně odstranit. Následně jsme spočetli průměrná spektra a ty normalizovali na pás amidu I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$. Získaná spektra byla využita k samotné diagnostice. K odstranění umělé variability pozadí vzorků, způsobené arbitrárním odečtem, je nutné nejprve vypočítat průměrné spektrum celého souboru u a následně diferenční spektra mezi průměrnými spektry v jednotlivých vzorků a průměrným spektrem souboru:

$$d = v - u \quad (7.1.-1)$$

Diferenční spektra byla poté proložena metodou nejmenších čtverců polynomem sedmého stupně (obr. 7.1). Polynom byl následně odečten od původního spektra, čímž se zajistí minimální spektrální variabilita pozadí. Takto získaná spektra jsou poté vyhodnocena pomocí PCA a shlukové analýzy s použitím euklidovské míry a posuzováním vzdálenosti Wardovou metodou (viz kapitola 4. Matematické metody).



Obr. 7.1. Diferenční spektrum a jím proložený polynom

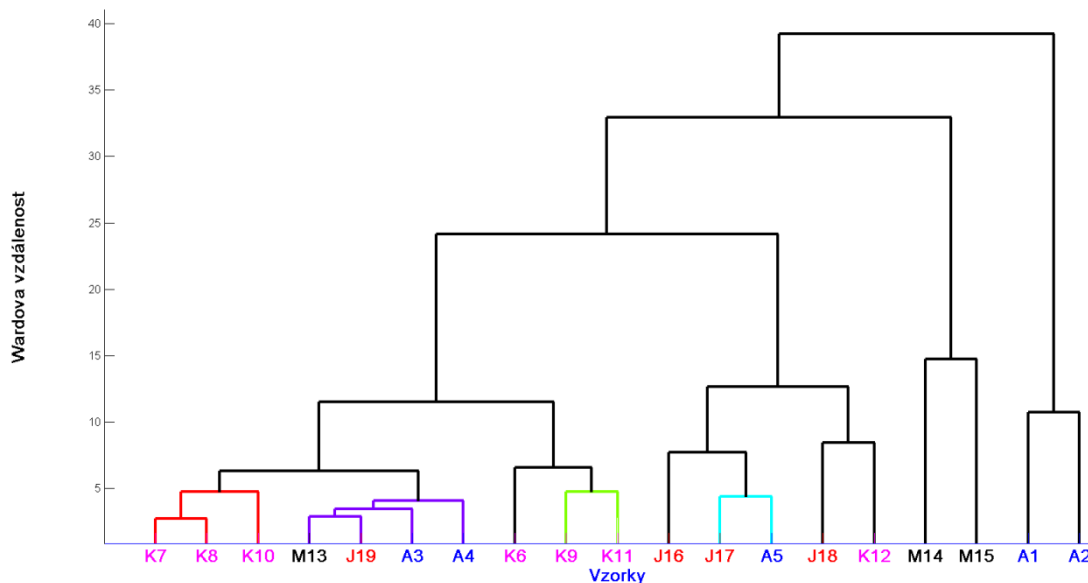
7.1.2. Diagnostika Alzheimerovi demence z MM

Měřené vzorky byly snímány se spektrografem nastaveným středem mřížky na $1274,9 \text{ cm}^{-1}$, přestože bylo ukázáno, že stejně senzitivní je metoda i při nastavení spektrografu na valenční oblast, tj. středem na 2675 cm^{-1} (Klener, 2011) V první oblasti, ale byly nalezeny komplexnější spektrální změny, z čehož lze předpokládat

lepší rozlišitelnost spekter blízkých diagnóz jako je AD, MCI a ostatní typy demencí. Spektrální změny typické pro patologický obraz AD jsou charakterizovány poklesem intenzity pásu $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ a zúžením pásu fenylalaninu $\sim 1031\text{ cm}^{-1}$. Dále pak byl ukázán úbytek hlubokého záporného pásu v oblasti amidu I, který lze interpretovat jako nárůst struktury β -skládaného listu. Také změny pásů vibrací postranních řetězců aminokyselin v oblasti $1530\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ byly asociovány s obrazem Alzheimerovy demence. Na základě výsledků publikovaných v diplomové práci (Klener, 2011) byla zpracovávaná spektra normována na pás amidu I $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$, která zaručovala nejvyšší senzitivitu metody.

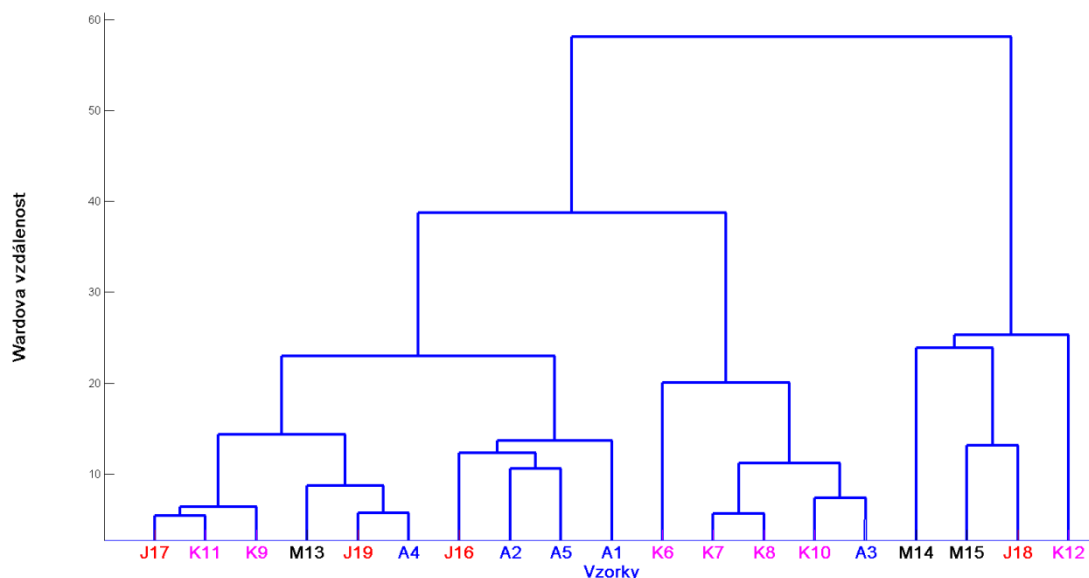
Diagnostika AD pomocí DCDR spektroskopie, tak jak ji navrhl Mgr. Klener, vedla k rozlišení 5 pacientů s AD a k nim věkově přiměřených kontrol se 100% senzitivitou a 80% specificitou. Tyto povzbuzující výsledky bylo třeba ověřit na větším souboru pacientů. Pro tento účel jsme změřili vzorky 55 pacientů. Abychom co nejlépe reprezentovali vzorek skutečné populace, byli do diagnostiky zahrnuti i pacienti s MCI a jiným typem demence. Celý soubor byl tedy tvořen 18 pacienty s AD, 16 pacienty stejně starých zdravých vrstevníků, 11 pacienty s MCI a 10 pacienty trpícími jinou diagnózou nejčastěji jinou formou demence. Vzhledem k současným omezeným možnostem v rozlišení AD a MCI, které jsou stanovovány na základě směrodatné odchylky ve výsledcích baterie psychologických testů lze předpokládat mísení AD a MCI skupiny kvůli nesprávně stanovené diagnóze onemocnění. Také odlišení jiných typů demencí je značně obtížné a určuje se ve většině případů pomocí vyhodnocení klinických symptomů, anamnézy pacienta a nepřímých znaků, jako je atrofie laloků na MRI nebo CT. Atrofie mozku, ale nemusí odrážet závažnost onemocnění a může být nalezena i u zdravých jedinců (např. u pacientů s vysokým tlakem, viz Salerno *et al.*, 1992). Proto jsme očekávali pokles senzitivity i specificity diagnostické metody při jejím užití na nový soubor pacientů.

Nejprve jsme, proto použili diagnostickou metodu vypracovanou Mgr. Klenerem pouze na prvních 19 vzorků pacientů. V této skupině metoda jasně rozlišuje čtyři shluky. Kdy jeden obsahující dva pacienty s MCI lze pokládat za diagnostický pro MCI. Přestože dva pacienti s AD vytvářejí samostatný shluk charakterizovaný maximální Wardovou vzdáleností od ostatních vzorku, byly zbylé tři vzorky AD přiřazeny do zbylých dvou shluků. Třetí shluk zahrnující tři pacienty s jinou formou demence, jednoho s AD a jednu zdravou kontrolu můžeme interpretovat jako charakteristický pro jiný než alzheimerovský typ demence. Poslední shluk je pak tvořen zejména zdravými pacienty (obr. 7.2). Metoda tedy třídí zkoumaný soubor do skupin dle diagnózy, ale je zatížena nízkou senzitivitou.



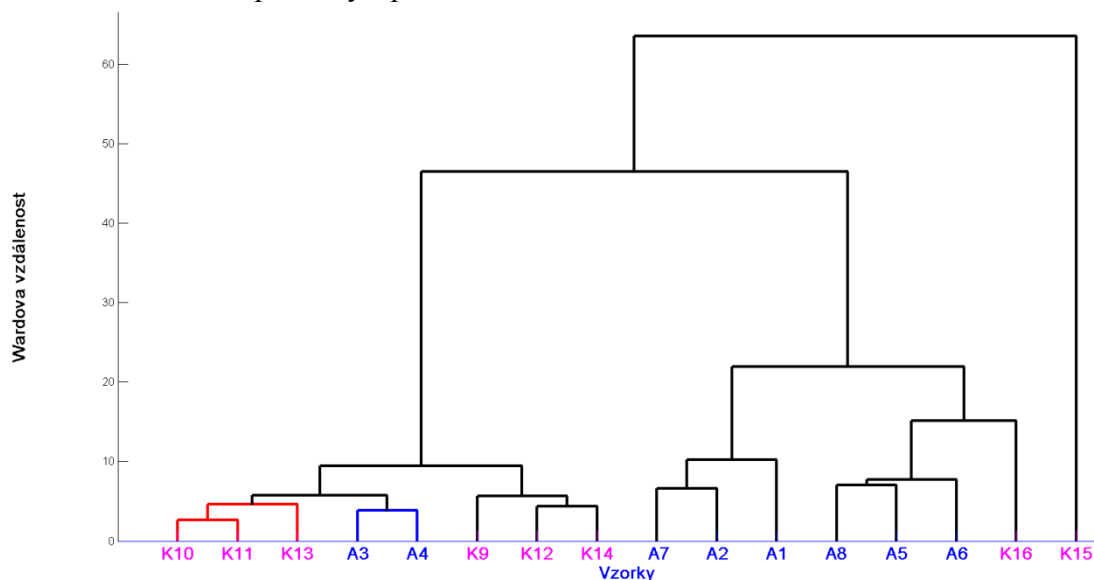
Obr 7.2. Dendrogram CA pro prvních 19 vzorků MM. U všech dále uvedených dendrogramů jsou vzorky označeny číslem celkového pořadí a písmenem, kde *A* označuje pacienty trpící AD, *M* je přiřazeno MCI, *J* je charakteristické pro jiný typ demence a *K* značí zdravé osoby stejně staré jako pacienti s AD.

Proto jsme se snažili nalézt vhodnější nastavení metody. Při zpracování CA soubor průměrných spekter bez předchozího odečtení pozadí pomocí polynomu jsme pozorovali zlepšení výsledků metody (obr. 7.3). Opět takto vznikaly čtyři shluky. Kdy shluk z největší Wardovou vzdáleností obsahoval dva pacienty s MCI s jedním zdravým pacientem a jedním s jiným typem demence (OD). Dále lze dobře rozlišit shluk příslušející třem pacientům s AD a jednomu s OD a shluk tvořený zdravými osobami s jedním Alzheimerikem. Poslední shluk nelze přesvědčivě diagnosticky interpretovat. Pro obsáhlejší soubory pacientů (>15) nebylo možné nalézt korelaci výsledků PCA analýzy jednotlivými diagnózami pro přílišnou vzájemnou variabilitu vzorků, proto ji zde neuvádíme. Nezahrnutí odečtu pozadí polynomem tedy vede k lepším výsledkům v určení pacientů s AD a zdravých kontrol, naopak ztrácí se tak rozlišení pacientů s jinou formou demence.

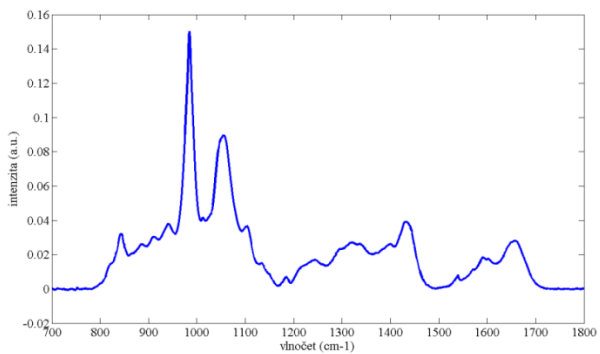


Obr. 7.3. Dendrogram CA analýzy pro prvních 19 vzorků MM bez srovnání pozadí spekter odečítáním polynomu.

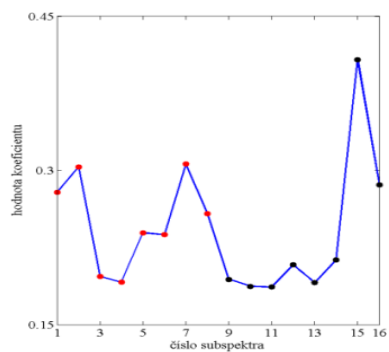
Pro ověření citlivost metody jsme se použili diagnostiku k odlišení 8 zdravých pacientů a 8 pacientů léčených pro AD. Na dendrogramu (obr. 7.4) lze rozeznat tři shluky. Pravý krajní shluk je diagnostický pro zdravé kontroly s jediným zdravým pacientem. Ze zbylých dvou shluků lze přiřadit prostřední shluk AD se šesti pacienty trpícími AD a jednou zdravou kontrolou. Levý shluk pak odpovídá zdravým kontrolám s dvěma pacienty trpícími AD.



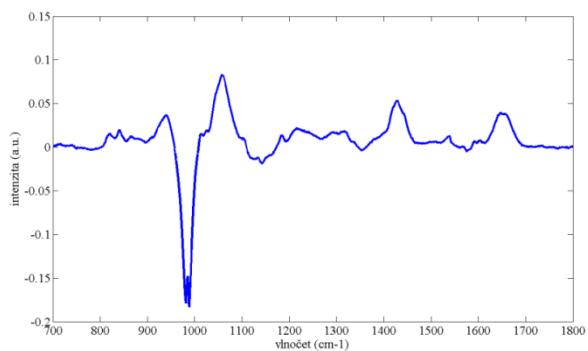
Obr. 7.4. Rozlišení 8 pacientů s diagnostikovanou AD a 8 kontrol pomocí CA MM. Ve spektrech byl proveden odečet polynomu k úpravě pozadí.



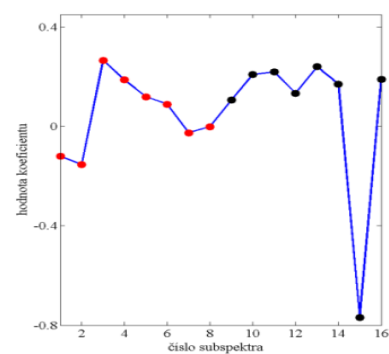
1. subspektrum



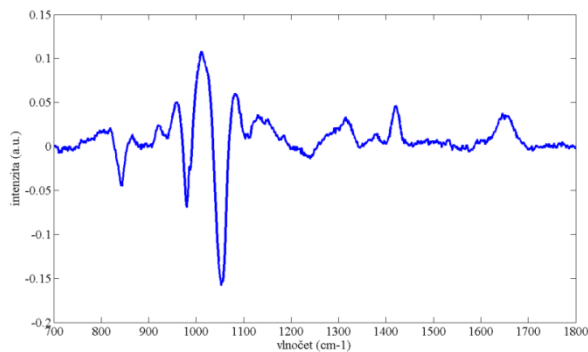
1. koeficient



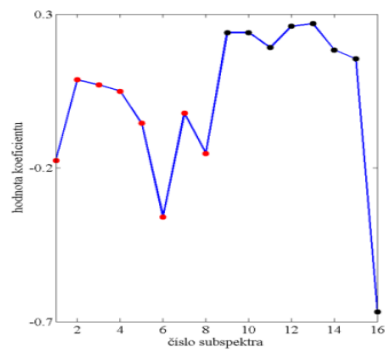
2. subspektrum



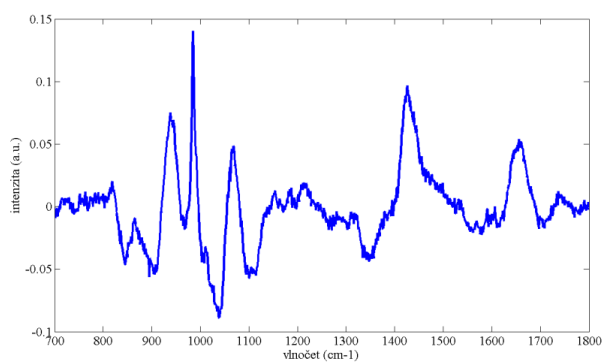
2. koeficient



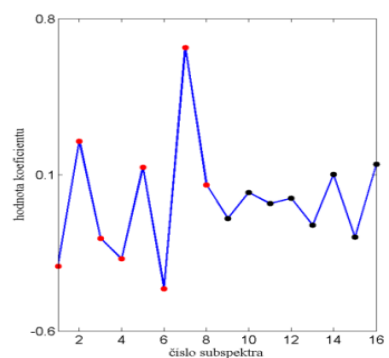
3. subspektrum



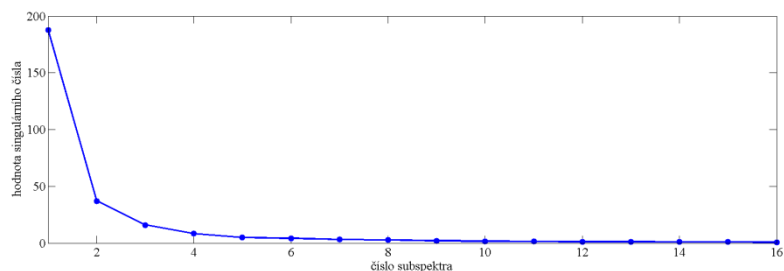
3. koeficient



4. subspektrum



4. koeficient

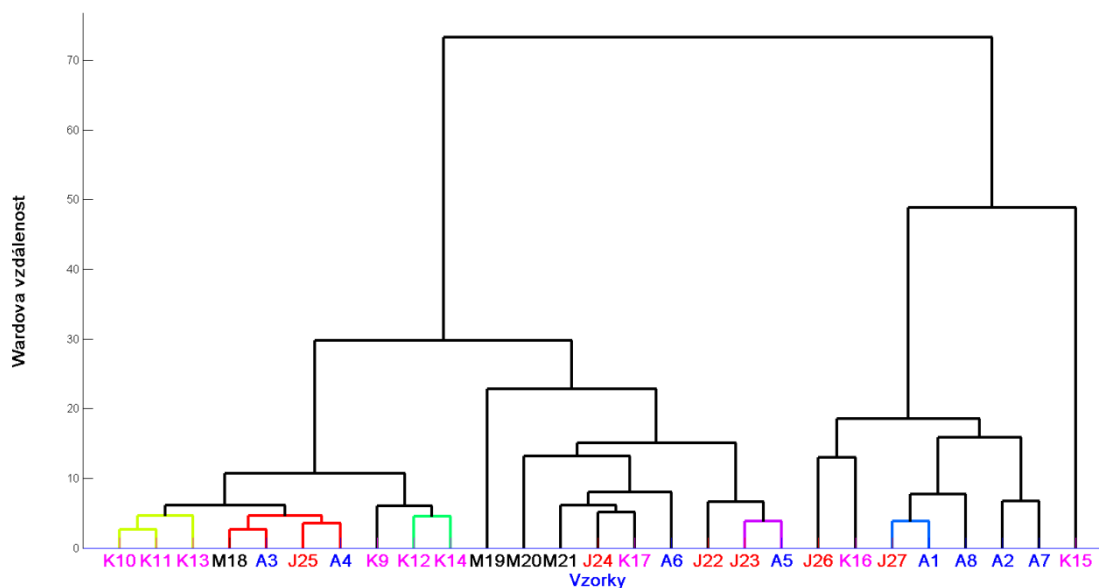


Průběh singulárních čísel PCA

Obr. 7.5. PCA MM souboru 8 pacientů s AD a 8 zdravých kontrol s výše vynesenu CA z obr. 7.4 (červeně značení pacienti s AD, černě kontroly)

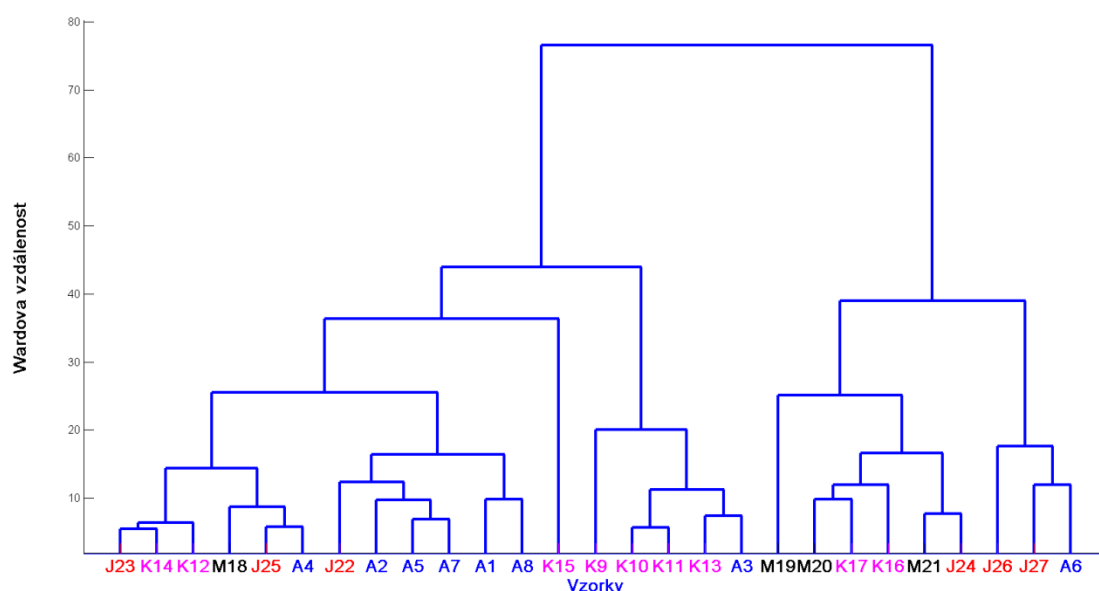
Následně jsme vyhodnotili i PCA analýzu tohoto souboru (viz obr. 7.5). Diagnosticky nejsilnější je třetí hlavní komponenta. Pomocí jí příslušných koeficientů můžeme odlišit 8 pacientů s AD a jednoho zdravého od sedmi zdravých kontrol. Pro pacienty s AD tedy dochází k poklesu pásu na $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$, a také pokles pásu 958 cm^{-1} přibližně odpovídajícímu vibracím lysinu, leucinu a valinu. Diagnosticky silné je i první subspektrum, kde lze označit šest pacientů s AD a dvě kontroly od šesti kontrol a dvou pacientů s AD. První subspektrum odpovídá svým spektrálním profilem spektru proteinu, takže odráží spíše změnu v množství proteinu, než posuvy diagnosticky důležitých pásů. Výsledky PCA jsou tak v dobré shodě s předešlým pozorováním Mgr. Klenera (2011).

Po takto ověřených diagnostických možnostech metody jsme je dále testovali na polovině celkového souboru (tedy 27 vzorcích) a snažili jsme se nastavit metodu, tak abychom dosáhli vyšší senzitivity. Při užití CA na soubor dat s odečteným polynomem (viz obr. 7.6) bylo možné rozlišit dva vzdálené shluky. Z nichž pravý se čtyřmi pacienty s AD lze interpretovat jako charakteristický pro AD. Druhý shluk se pak dělí na dva menší shluky. První odpovídající šesti zdravým pacientům, dvěma pacientům s AD a po jednom pacientovi s MCI a OD můžeme ho označit za charakteristický pro zdravé pacienty. Poslední shluk je pak charakteristický pro pacienty s MCI a OD, i když zahrnuje jednu zdravou kontrolu a dva pacienty s AD. Pro ověření hypotézy, že data bez srovnání pozadí lépe odlišují pacienty s AD, jsme spočetli CA i na souboru normalizovaných spekter, bez odečtu polynomu pozadí (obr. 7.7).



Obr. 7.6. Dendrogram výsledků CA pro 27 vzorků MM

Výsledný dendrogram dělí soubor na dva vzdálené shluky. Menší o 9 pacientech tvoří tři pacienti s OD a tři s MCI, obsahuje ale i dvě zdravé kontroly a jednoho pacienta s AD. Druhý větší shluk se dále dělí na shluk odpovídající čtyřem zdravým kontrolám a jednomu pacientu s AD, nediagnostický shluk o šesti vzorcích s dvěma kontrolami, dvěma OD a po jednom pacientu s AD a MCI a shluk zahrnující pět pacientů s AD a jednoho s OD. Nezahlutí odečtu polynomu tedy zlepšilo paradoxně výsledky CA. Vliv odečtu polynomu na výsledky shlukové analýzy jsme dále zkoumali volbou různých řádů prokládaného polynomu (polynom stupně 2–10). Výsledky CA se však nelišily od výsledků při odečtu polynomu 7 stupně.



Obr. 7.7. Dendrogram výsledků CA pro 27 vzorků MM bez odečtení polynomu

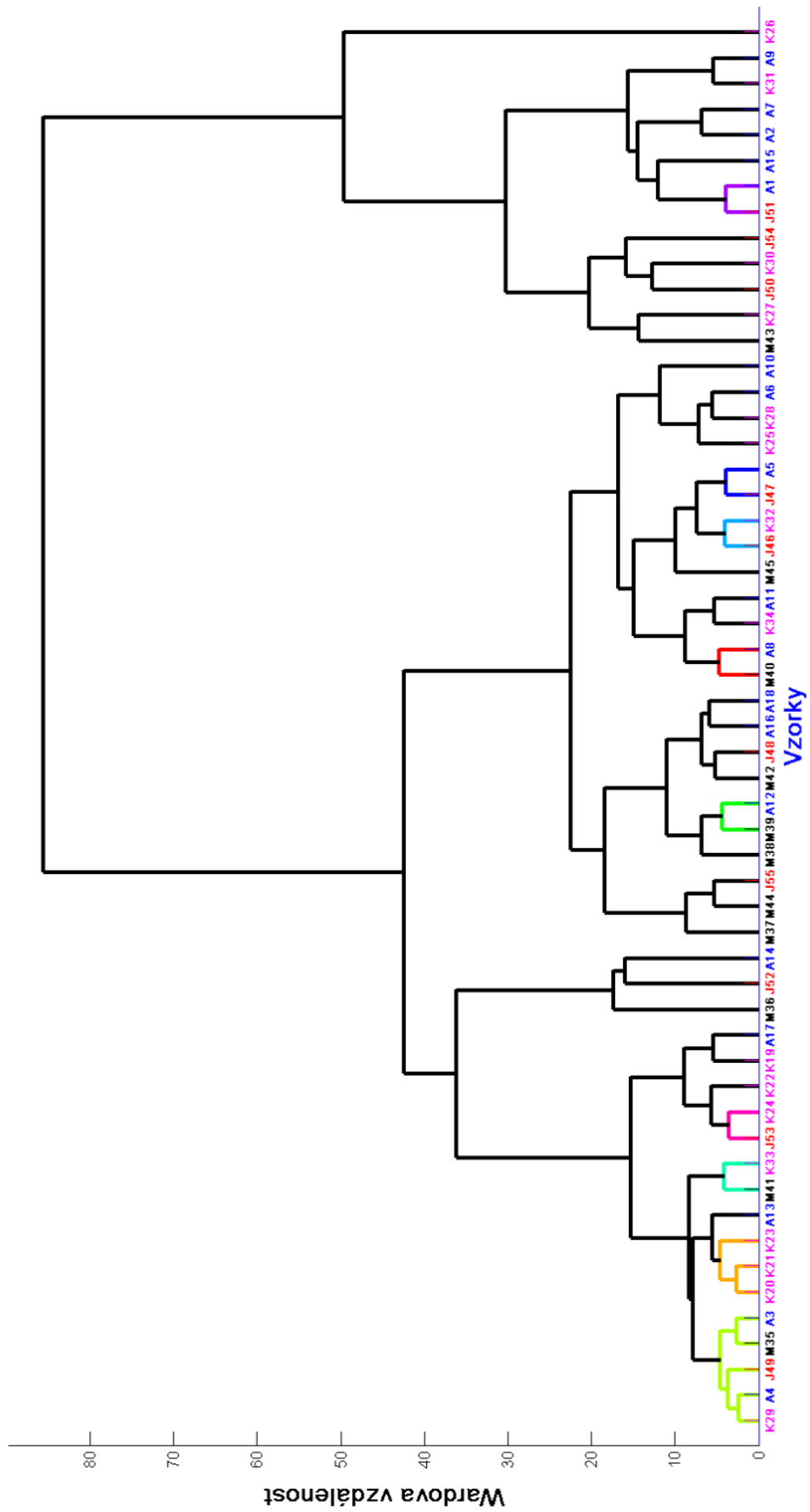
Následně jsme přistoupili k vyhodnocení celého souboru. Nejprve jsme provedli diagnostiku podle původního modelu (obr. 7.8). Jak vyplývá z obr. 7.8, vzniklé

shluky nelze interpretovat na základě diagnóz v nich obsažených pacientů. Tento neuspokojivý výsledek jsme následně pokusili překonat užitím CA pouze na určité intervaly a ne na celé spektrum. Byly vyzkoušeny různé kombinace zahrnující diagnostický pás $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$, nebo pás fenylalaninu. Nejlepší výsledky jsme získali při zahrnutí pásu amidu III $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$, diagnostického pásu $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ a pásu odpovídající vibracím lysinu, valinu a leucinu $\sim 956 \text{ cm}^{-1}$ (obr. 7.9). Zde lze jasně definovat shluk obsahující šest vzorků AD, čtyři pacienty s MCI a jednu zdravou kontrolu. Samozřejmě senzitivita takového diagnostického modelu je velice nízká $\sim 33 \%$ a specifická $\sim 86 \%$. Přičemž v naší práci vždy uvažujeme senzitivitu a specifitu vypočtenou na základě níže uvedených vzorců:

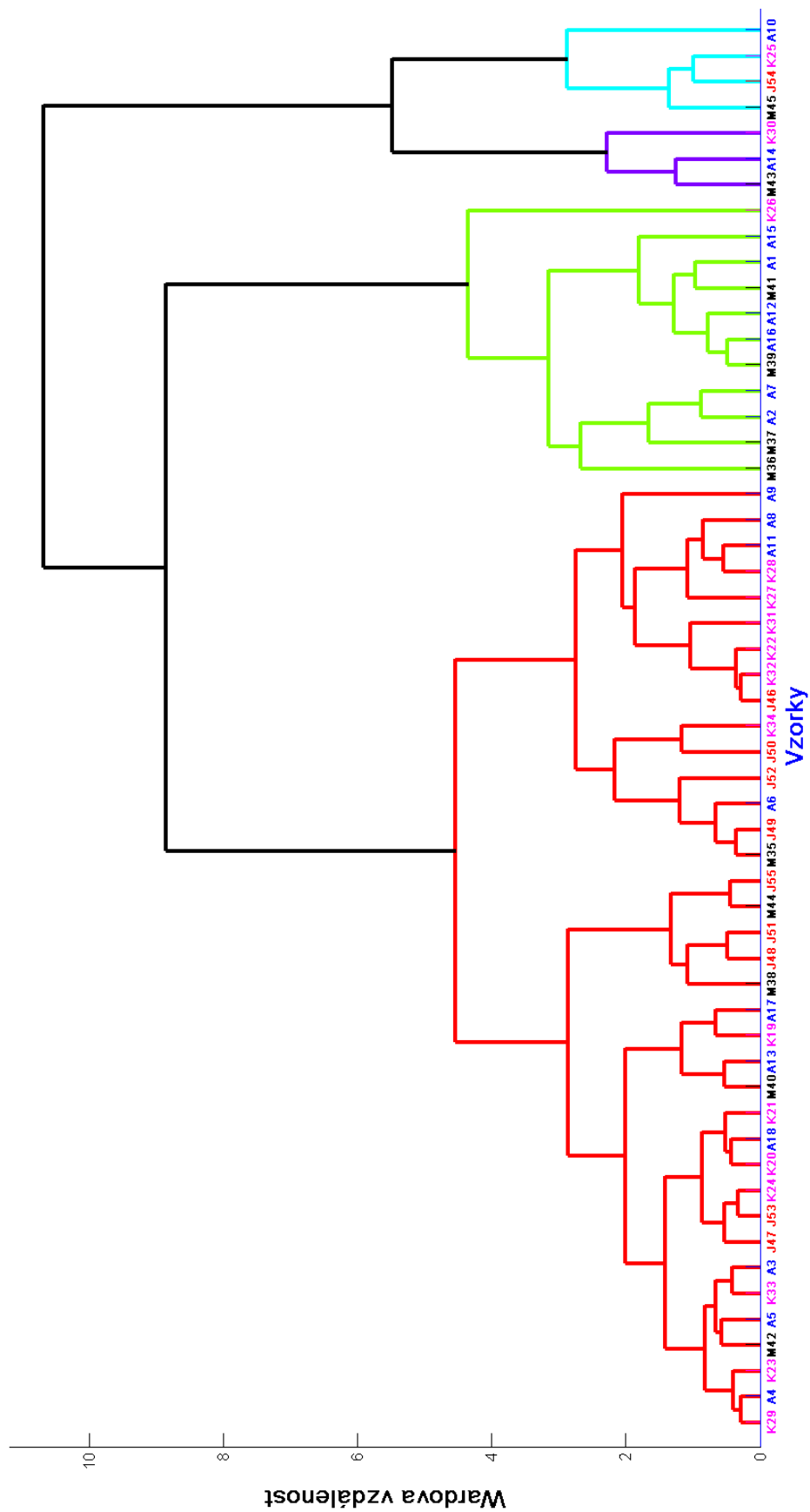
$$\textit{senzitivita} = \frac{\textit{počet skutečně pozitivních}}{\textit{počet skutečně pozitivních} + \textit{počet falešně negativních}} \quad (7.1.-2)$$

$$\textit{specifita} = \frac{\textit{počet skutečně negativních}}{\textit{počet skutečně negativních} + \textit{počet falešně pozitivních}} \quad (7.1.-3)$$

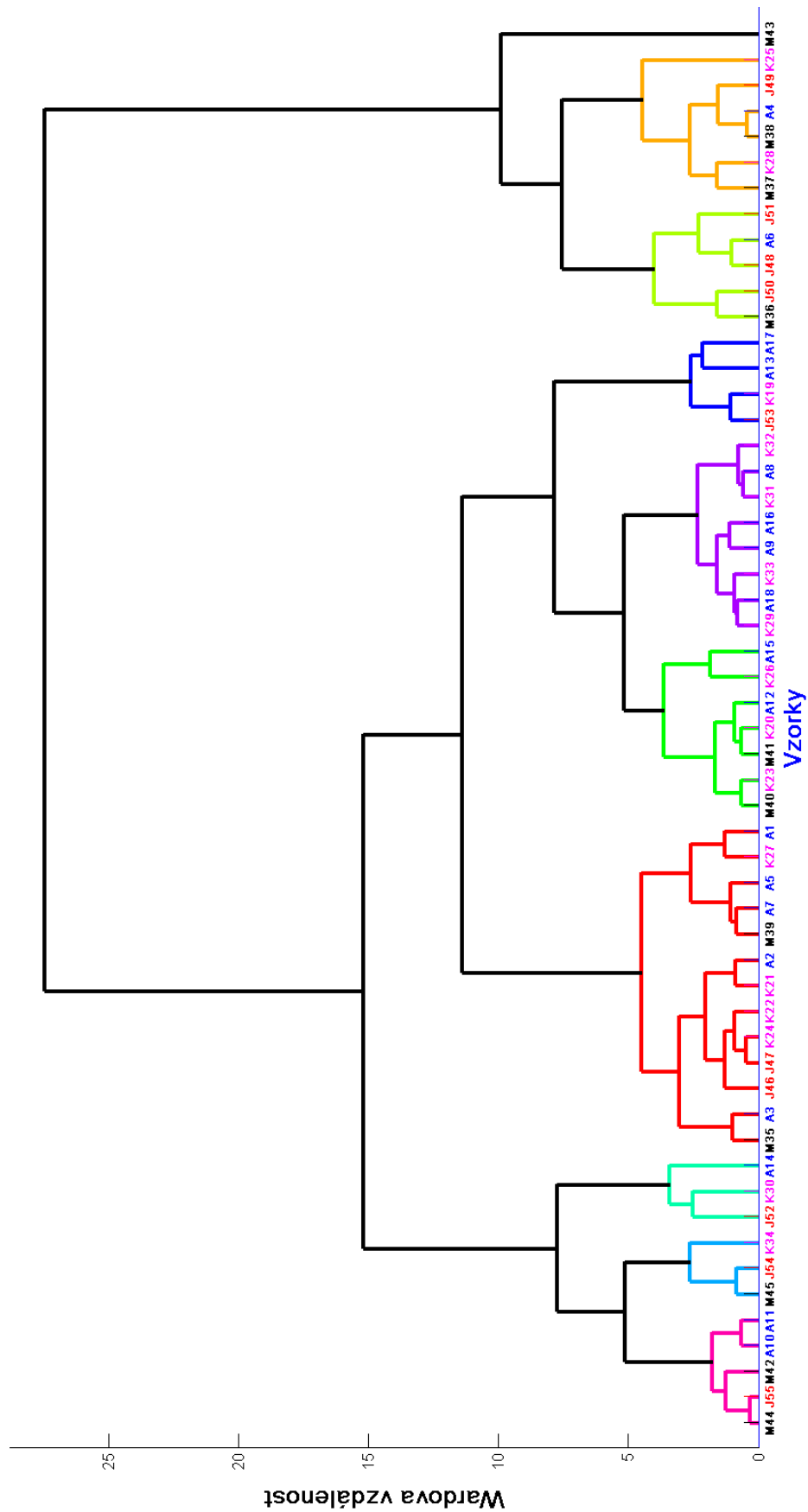
Lepší specifity dosáhneme, pokud budeme považovat za pozitivní test diagnostikování AD i MCI. Specifita pak činí $\sim 96 \%$. Aplikujeme-li diagnostickou metodu na průměrná spektra bez srovnání pozadí odečtením polynomu, získáme překvapivý výsledek (viz obr. 7.10). Jak plyne z dendrogramu, shluk o největší Wardově vzdálenosti obsahuje čtyři pacienty s MCI, čtyři s OD, dva s AD a dvě zdravé kontroly. Můžeme ho tedy brát za signifikantní pro diagnózu MCI a OD s $\sim 38\%$ senzitivitou a $\sim 88\%$ specifitou. Dále lze rozlišit další tři shluky, kdy jeden zahrnuje 8 pacientů s AD a pokud je brán jako diagnostický pro AD, dosahuje $\sim 44\%$ senzitivity a $\sim 70\%$ specifity.



Obr. 7.8. Dendrogram CA pro celý měřený soubor MM

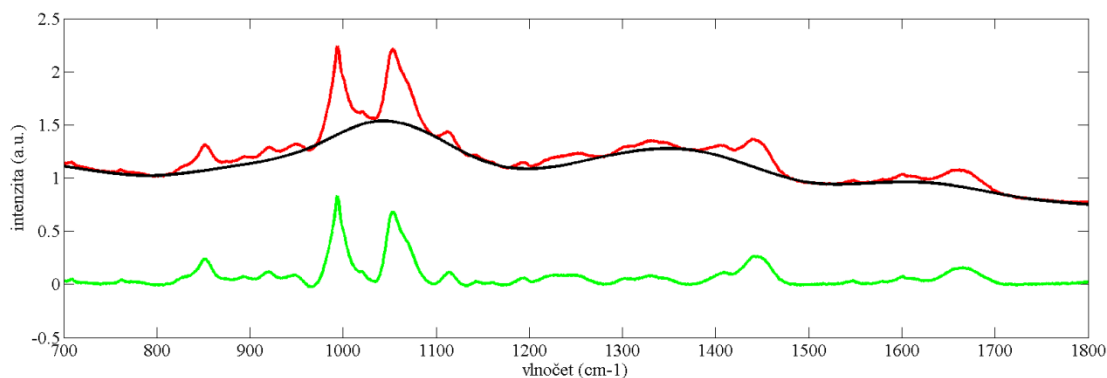


Obr. 7.9. CA celého souboru MM aplikovaná pouze na sloučené intervaly ($950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$; $1075\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$; $1245\text{--}1255\text{ cm}^{-1}$)



Obr. 7.10. CA celého souboru MM aplikovaná na spojené intervaly ($950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$; $1075\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$; $1245\text{--}1255\text{ cm}^{-1}$) bez srovnání pozadí spekter odečtem polynomu

Jak jsme ukázali, výsledky diagnostiky jsou značně ovlivněny variabilitou způsobenou ručním odečtem fluorescenčního pozadí. Proto jsme užili metody automatického odečtu pozadí metodou airPLS (*adaptive, iteratively reweighted penalized least squares algorithm*, viz obr. 7.11). Tato metoda byla užita k diagnostice AD v práci Ryzhiková *et al.*, 2015. Výsledky shlukové analýzy po odečtu fluorescenčního pozadí metodou airPLS jsou vyneseny do obr. 7.12.



Obr. 7.11. Odečet fluorescenčního pozadí metodou airPLS. Černě je označeno odečítané pozadí, červeně původní spektrum a zeleně výsledné spektrum po odečtu pozadí.

Výsledky na malém souboru které vykazovaly dobrou senzitivitu i specificitu by mohli posloužit jako vhodný učící soubor pro neuronové sítě. Proto jsme se pokusili užít metody umělých neuronových sítí k analýze souboru. K výpočtům jsme použili Neural Network ToolboxTM v prostředí Matlab (The Matworks, , USA). Výhodou neuronových sítí je jejich schopnosti postihnout i nelineární závislosti souboru. Užili jsme jich jak na soubor s ručním odečtem pozadí, tak na soubor s odečtem pozadím metodou airPLS. Při odečtení metodou airPLS se ukázalo jako nejvhodnější užití třívrstvé neuronové sítě s 3 000 neurony v první vrstvě a 1 000 v druhé, třetí vrstvu pak tvoří čtyři výstupní neurony jednotlivých diagnóz. Narozdíl od CA, při použití neuronových sítí pouze na intervaly 950–960 cm⁻¹, 1075–1085 cm⁻¹ a 1245–1255 cm⁻¹ získáme velice nízkou senzitivitu (33,3 %) a specificitu 78 %, viz obr. 7.12.

Confusion Matrix

Output Class	KO	6 10.9%	4 7.3%	7 12.7%	5 9.1%	27.3% 72.7%
	MCI	6 10.9%	5 9.1%	5 9.1%	3 5.5%	26.3% 73.7%
	AD	4 7.3%	2 3.6%	6 10.9%	2 3.6%	42.9% 57.1%
	OD	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	NaN% NaN%
		37.5% 62.5%	45.5% 54.5%	33.3% 66.7%	0.0% 100%	30.9% 69.1%
	KO	MCI	AD	OD		Target Class

Obr. 7.12. Výsledek neuronových sítí na intervalech 950–960 cm⁻¹, 1075–1085 cm⁻¹ a 1245–1255 cm⁻¹ u celého souboru vzorků MM po odečtu pozadí metodou airPLS

Confusion Matrix

Output Class	KO	1 1.8%	1 1.8%	2 3.6%	1 1.8%	20.0% 80.0%
	ZO	1 1.8%	1 1.8%	0 0.0%	1 1.8%	33.3% 66.7%
	AD	14 25.5%	9 16.4%	16 29.1%	8 14.5%	34.0% 66.0%
	OD	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	NaN% NaN%
		6.3% 93.8%	9.1% 90.9%	88.9% 11.1%	0.0% 100%	32.7% 67.3%
	KO	MCI	AD	OD		Target Class

Obr. 7.13. Výsledek neuronových sítí při analýze MM na celém rozsahu spektra po odečtu pozadí metodou airPLS

Lepší výsledek získáme, pokud se zaměříme na celý měřený interval opět při odečtu fluorescenčního pozadí metodou airPLS (obr. 7.13). Neuronové sítě při tomto

nastavení mají 88,9% senzitivitu ale nízkou specificitu 37 %. Stejný výsledek jsme získali i po aplikaci neuronových sítí na spektra s ručně odečteným pozadím při vyhodnocování diagnostiky na celém intervalu (obr. 7.14).

Confusion Matrix

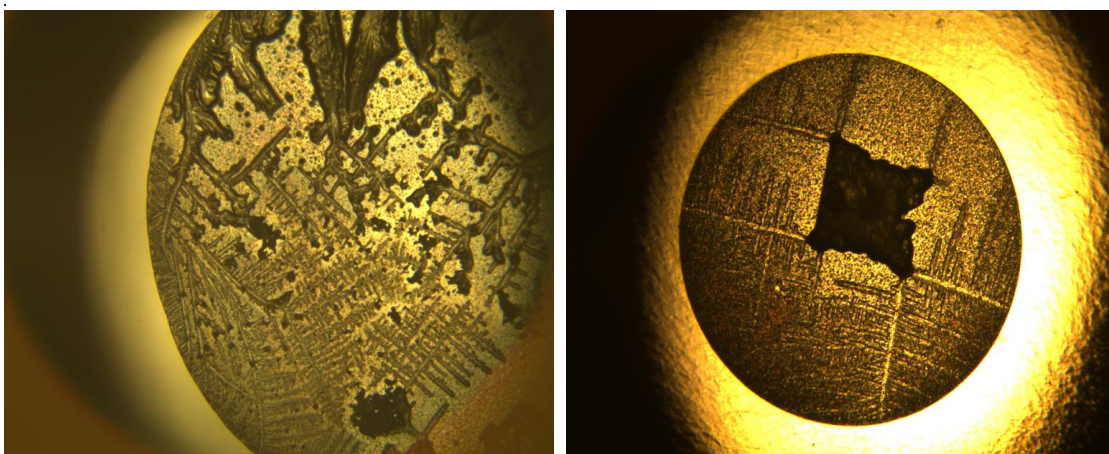
Output Class	KO	4 7.3%	0 0.0%	1 1.8%	1 1.8%	66.7% 33.3%
	MCI	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	NaN% NaN%
	AD	11 20.0%	8 14.5%	16 29.1%	4 7.3%	41.0% 59.0%
	OD	1 1.8%	3 5.5%	1 1.8%	5 9.1%	50.0% 50.0%
		25.0% 75.0%	0.0% 100%	88.9% 11.1%	50.0% 50.0%	45.5% 54.5%
	KO	MCI	AD	OD		
	Target Class					

Obr. 7.14. Výsledek neuronových sítí při analýze MM na celém rozsahu spektra po odečtu pozadí „ručně“ pomocí programu *Background 2*

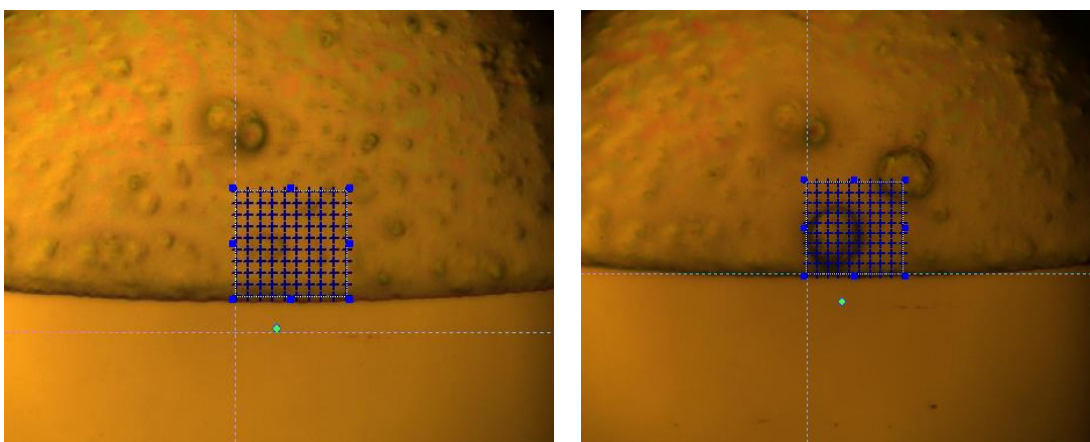
7.1.3. Prověření možnosti využít CaF₂ substrátu pro diagnostiku vzorků MM

V rámci měření vzorků MM jsme také ověřili možnost využít CaF₂ destičky k DCDR diagnostice MM. Ověření jsme provedli na náhodně zvoleném souboru 15 pacientů skládajícím se z 6 pacientů s AD, 2 pacientů s OD, 5 pacientů s diagnózou MCI a dvou zdravých kontrol (KO). Hlavní motivací byly výhody CaF₂ substrátu. Je jím dozajista pořizovací cena a možnost nanesení dvojnásobku vzorků užitím obou stran destičky. Také recyklovatelnost sklička, jeho omytím anebo přešetřením, je další výhodou tohoto substrátu. Rozhodující se ale zdá být námi zjištěné rychlejší vysychání vzorku MM na CaF₂ substrátu. Mozkomíšní mok vysychá na destičce SpectRIM™ v širokém rozmezí v závislost na zkoumaném vzorku. Bylo pozorováno vysychání trvající i ~6 hodin, což výrazně omezuje efektivitu diagnostické metody. Na CaF₂ substrátu vyschly veškeré vzorky do jedné hodiny. Tento jev je pravděpodobně podmíněn větším průměrem vyschlé kapky na CaF₂ substrátu v porovnání s destičkou SpectRIM™. Na CaF₂ substrátu byl pomocí škály software *LabSpec* změřen orientačně průměr kapky ~1,7 mm, což je ve shodě s pozorováním Filika a Stonea na vzorcích slz (Filik & Stone, 2007). Na destičce SpectRIM™ byl průměr kapky ~1,3 mm. Rozdílnost průměru kapky je pravděpodobně způsobena nižší hydrofobicitou CaF₂ substrátu ve srovnání se SpectRIM™ destičkou. Jak ale uvedli již Filik a Stone při testování CaF₂ substrátu, poskytuje nižší hodnoty signálu

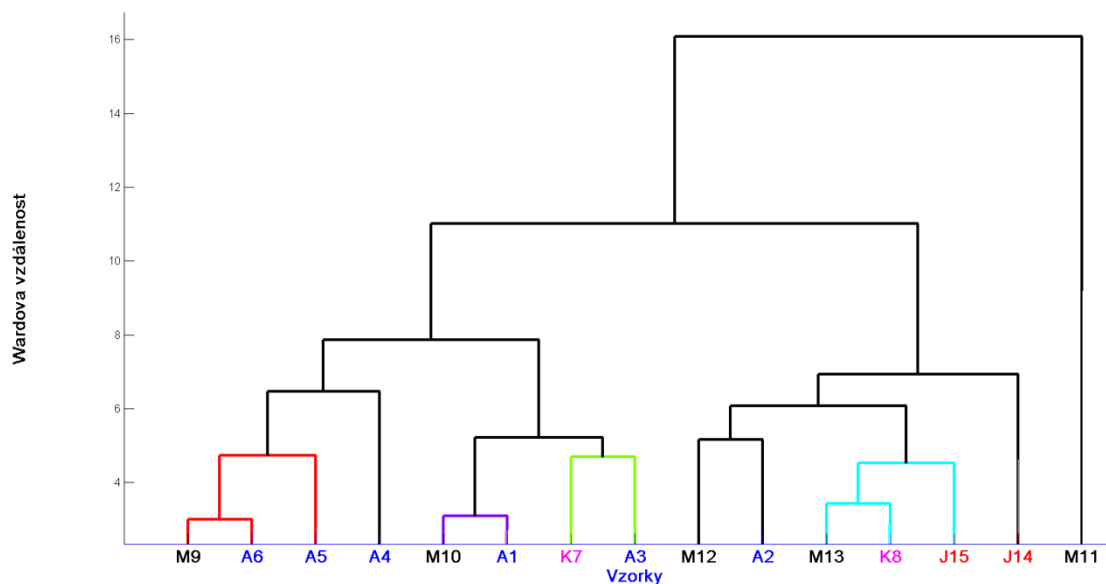
kvůli menší odrazivosti ve srovnání s teflonem potaženou ocelovou destičkou. Navíc rozdílná hydrofobicita povede i k odlišné tvorbě proteinového prstýnku. Rozdílnost kapek téhož vzorku při depozici na CaF_2 a SpectRIM™ destičku zobrazuje obr. 7.15. Dalším rozdílným aspektem při využití CaF_2 substrátu byl potlačení fotodegradace vzorku (obr 7.16). Při zpracování vzorků deponovaných na SpectRIM™ substrát jsme v souladu s předchozí prací (Klener, 2011) pozorovali fotodegradaci vzorků MM způsobenou intenzivním laserovým paprskem. Ta ovšem nenastává u vzorků MM deponovaných na CaF_2 , což je pravděpodobně způsobeno nižší odrazivostí CaF_2 sklíčka v porovnání se SpectRIM™ destičkou a tedy i menším ohřevem vzorku. Výše zmíněný soubor byl analyzován způsobem užitým pro vzorky deponované na SpectRIM™ destičku. Výsledky shlukové analýzy vyjadřuje obr. 7.17. Soubor byl roztríděn na dva velké shluky. První obsahuje pět pacientů s AD, jednoho zdravého a dva s MCI, druhý shluk tvoří dva pacienti trpící jinou formou demence, tři pacienti s MCI, jedna zdravá kontrola a jeden pacient s AD. Je tedy možno takto odlišit pacienty s AD od pacientů s ostatními diagnózami i zdravými kontrolami s 83% senzitivitou a 67% specificitou.



Obr. 7.15. Fotografie kapky vzorku MM pacienta číslo 33 při 5× zvětšení na CaF_2 substrátu (vlevo) a SpectRIM™ destičce (vpravo)



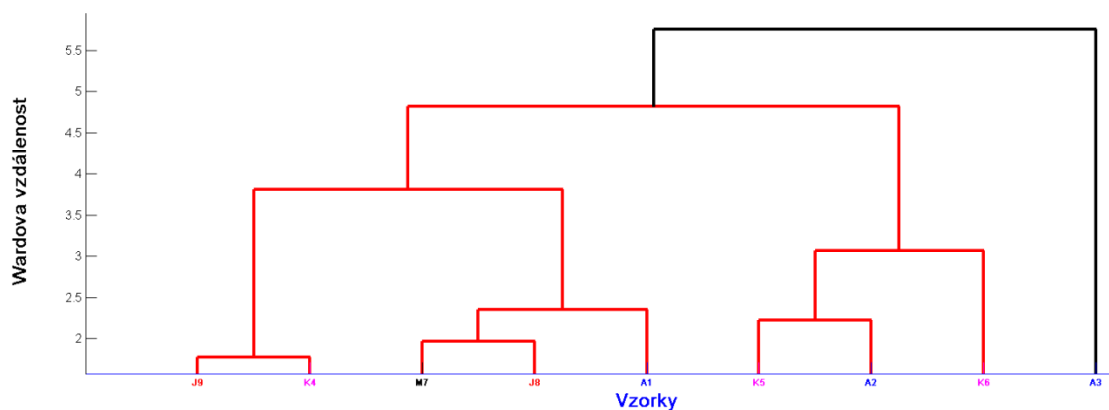
Obr. 7.16. Fotografie fotodegradace vzorku MM pacienta číslo 117 při 50× zvětšení před (vlevo) a po měření (vpravo) na SpectRIM™ destičce



Obr. 7.17. Výsledky shlukové analýzy na vzorcích MM měřených na CaF_2 substrátu

7. 2. Diagnostické zpracování vzorků krevního séra

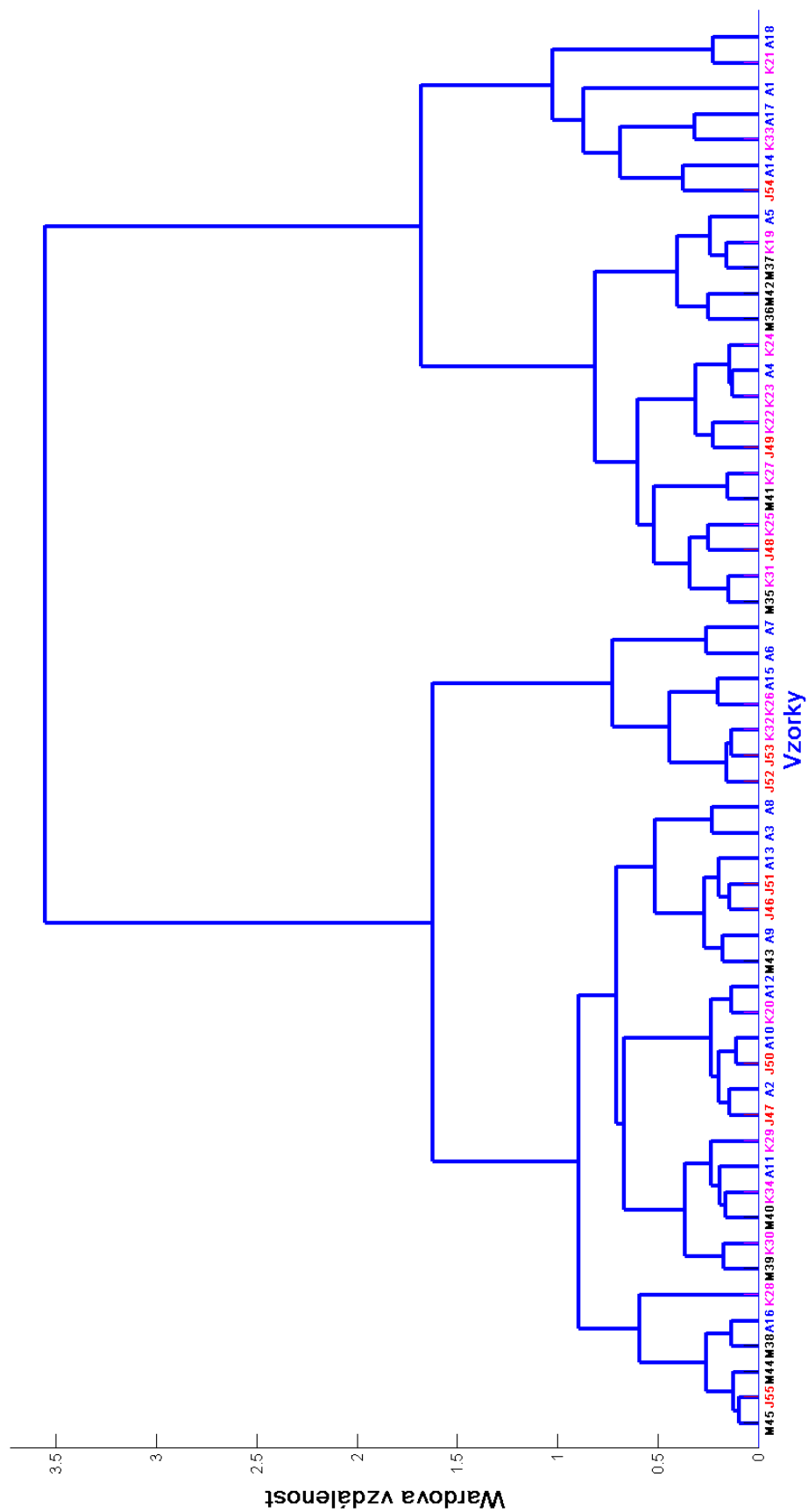
Po optimalizaci měření vzorků krevního séra jsme přistoupili k jejich diagnostice. Nejprve jsme aplikovali postup popsany Mgr. Klenerem v jeho diplomové práci na MM. Jak se ale ukázalo, tento přístup nevede k výsledkům použitelným na rozřídění pacientů dle diagnóz (viz obr. 7.18).



Obr. 7.18. Aplikace CA na 9 vzorků KS, u kterých bylo ve spektrech „ručně“ odečteno pozadí programem *Background 2*

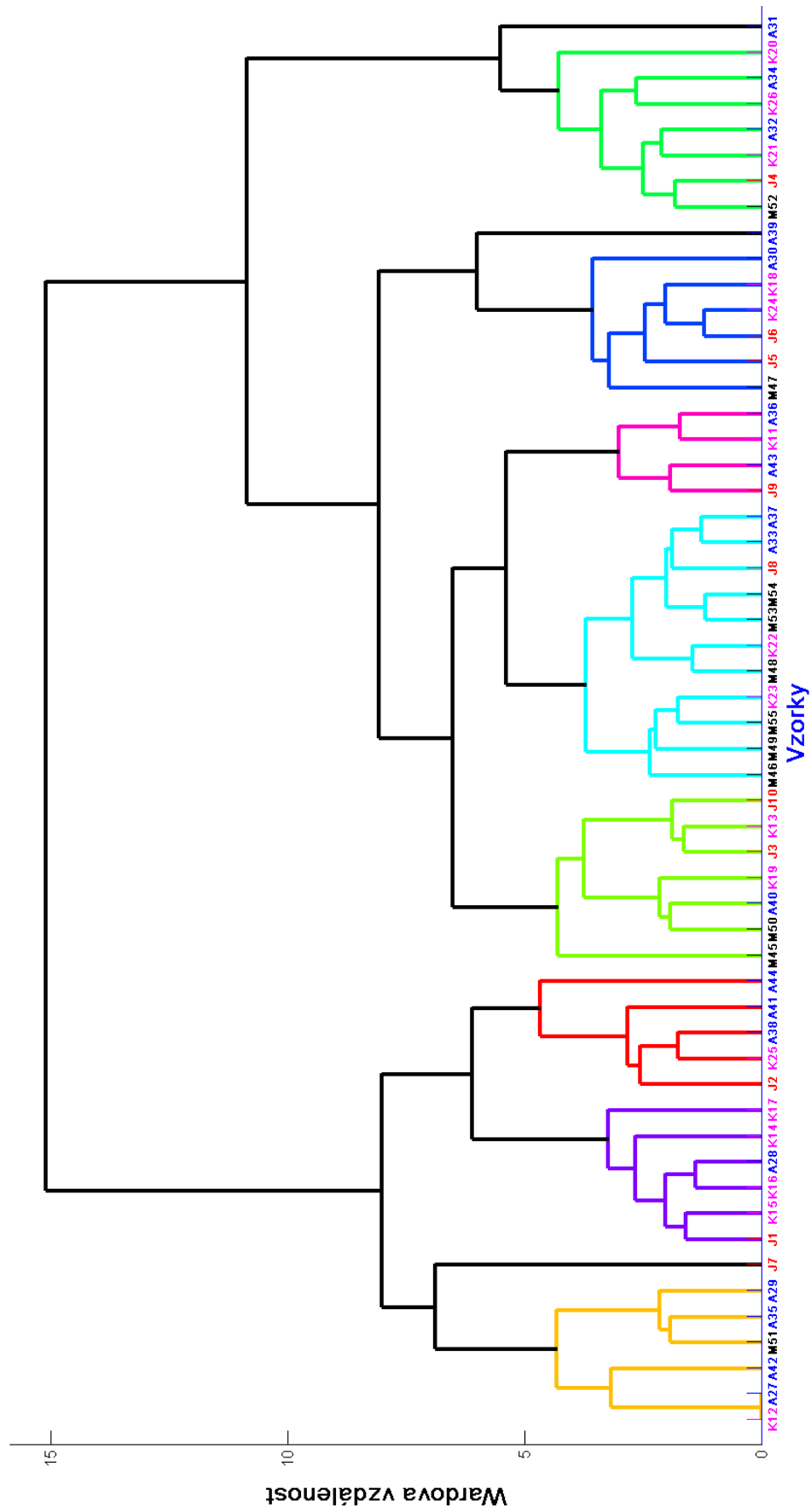
Po zkušenosti s MM, kdy výsledky výrazně závisí na zpracování fluorescenčního pozadí Ramanových spekter vzorků, jsme se rozhodli aplikovat odlišné zpracování odečtu fluorescenčního pozadí, kdy byla pomocí programu *Combine* (napsaného Dr. Janem Palackým) spojena všechna naměřená spektra KS do jednoho datového souboru o společné vlnočtové škále. Na tento soubor byla následně aplikována PCA. Získaná subspektra byla odečtena dle Williamse (1986). A poté byla takto korigovaná spektra opět rozdělena do jednotlivých souborů příslušejících daným vzorkům.

Z nich pak bylo následně spočteno průměrné spektrum, a to bylo ve shodě s metodikou užitou pro MM normalizováno na pás amidu I $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$. Výsledná spektra byla následně hodnocena pomocí CA. Takto zpracovaná spektra byla prakticky roztržena bez výraznějšího shlukování jednotlivých diagnóz. (viz obr. 7.19).



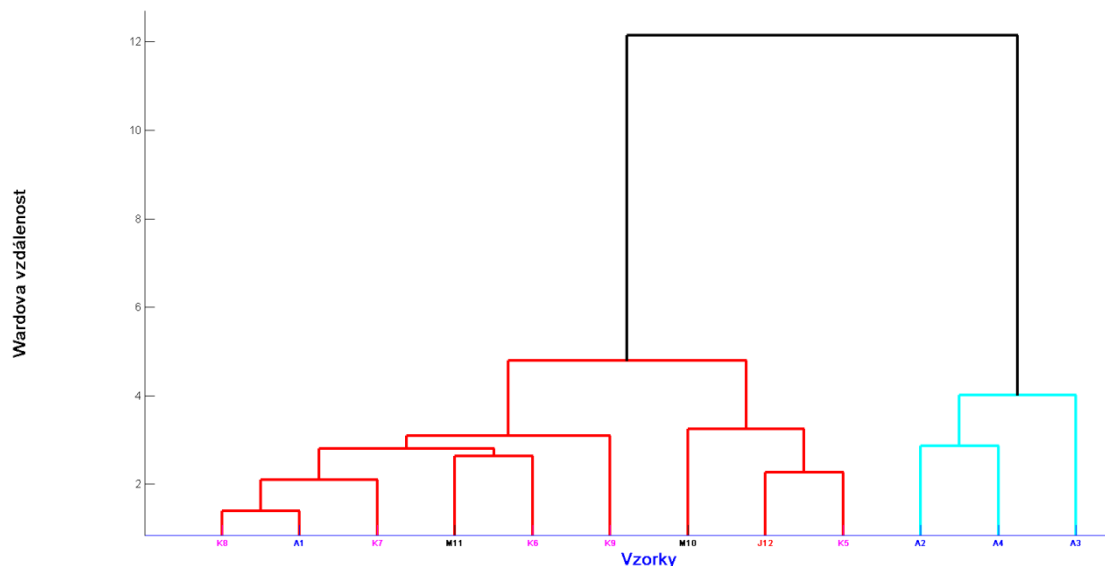
Obr. 7.19 Dendrogram CA aplikovaný na celý soubor KS po společném odečtu pozadí pomocí PCA pro spojené intervaly (950–960 cm^{-1} ; 1075–1085 cm^{-1} ; 1245–1255 cm^{-1})

Při aplikování shlukové analýzy na celý spektrální interval jsme získali zajímavý výsledek (obr. 7.20.), který sice nebyl stále diagnosticky senzitivní, ale začínal více shlukovat pacienty se stejnou diagnózou. Abychom dále posoudili vliv zpracování pozadí na výsledné hodnoty, aplikovali jsme uvedenou metodu společného odečtu pozadí pouze na první dvě subspektra. Takto hrubě zpracovaná data jsme vyhodnocovali nejprve na malých souborech.

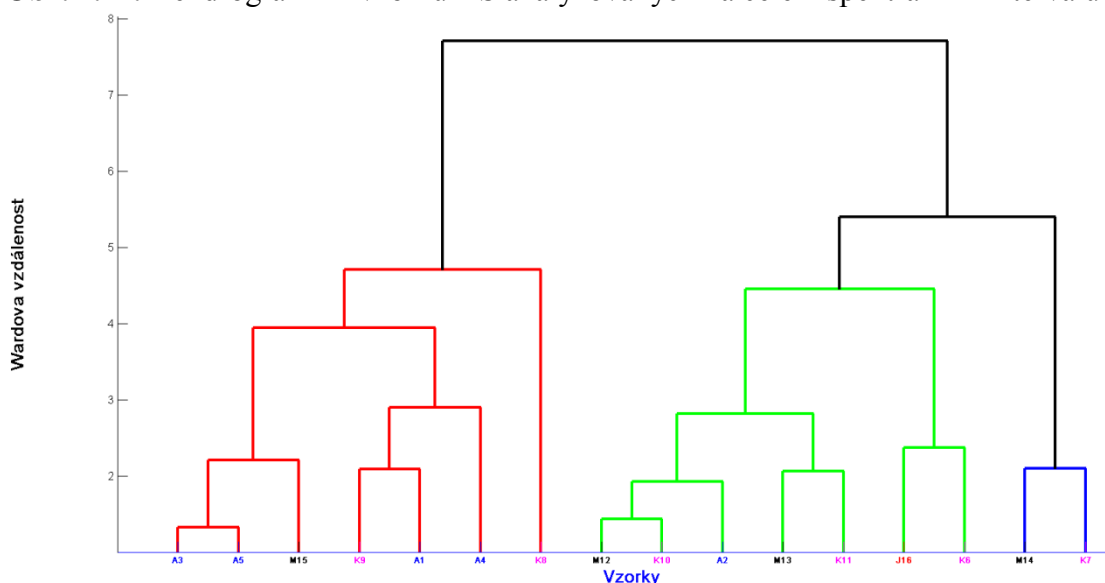


Obr. 7.20. CA 55 vzorků KS při vyhodnocování v celé spektrální šíři

Nejprve jsme analyzovali náhodný vzorek 12 vzorků séra, který byl velice citlivě CA rozlišen na pacienty s AD, kontrolní vzorky a ostatní patologie (obr. 7.21). Abychom ověřili že pro takto vybraný menší soubor dává metoda diagnostické výsledky, vyhodnotili jsme další náhodně zvolený soubor 16 vzorků (obr. 7.22), který opět vedl k senzitivnímu rozlišení pacientů s AD a zbylých vzorků. Pro oba zvolené soubory jsme užili i PCA (obr. 7.23).

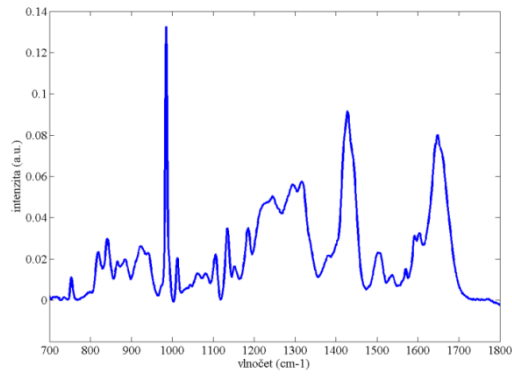


Obr. 7.21. Dendrogram 12 vzorků KS analyzovaných na celém spektrálním intervalu

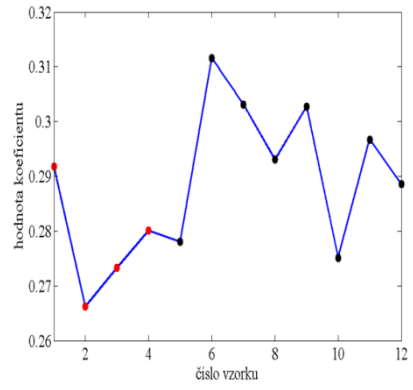


Obr. 7.22. Dendrogram 16 vzorků KSA analyzovaných na celém intervalu

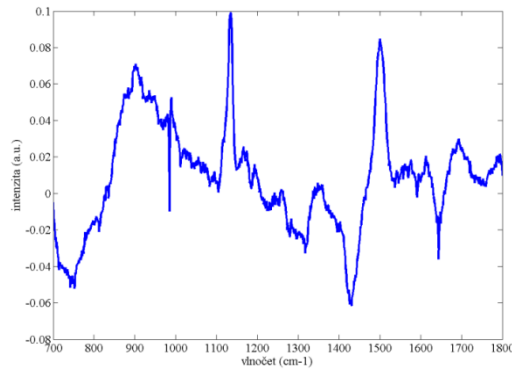
Nejvíce signifikantní PCA komponenta souboru 12 vzorků pro AD je druhé subspektrum, kde je patné, že AD je v séru spojena s nárůstem vibračního pásu $\sim 902\text{ cm}^{-1}$, pásu leucinu, valinu, isoleucinu a tryptofanu na 1134 cm^{-1} . Dochází rovněž k posunu pásu vibrací CH_2, CH_3 , lysinu a leucinu a isoleucinu z 1430 cm^{-1} na 1500 cm^{-1} a také k posunu intenzity maxima pásu amidu I z 1644 na 1694 cm^{-1} , což lze interpretovat jako nárůst struktury β -skládaného listu ve shodě s Carmona *et al.*, 2013. Podobné výsledky vykazoval i soubor o 16 vzorcích, kde byl opět s AD



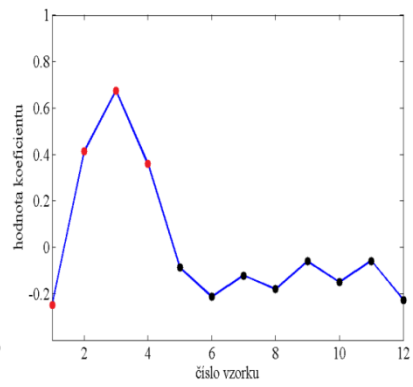
1. subspektrum



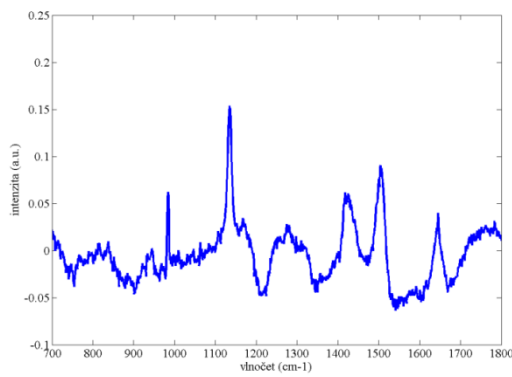
1. koeficient



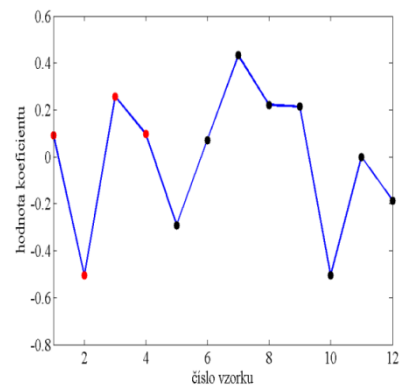
2. subspektrum



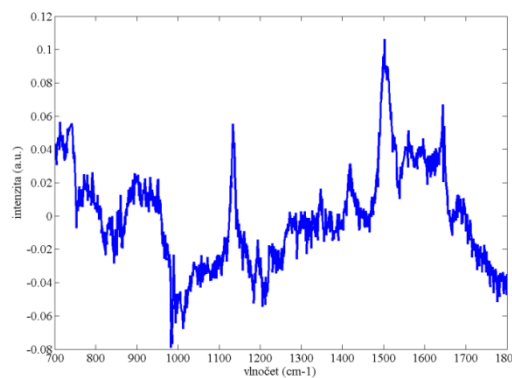
2. koeficient



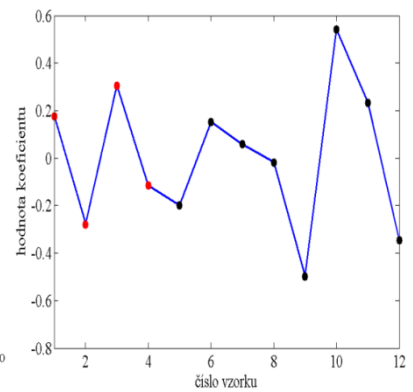
3. subspektrum



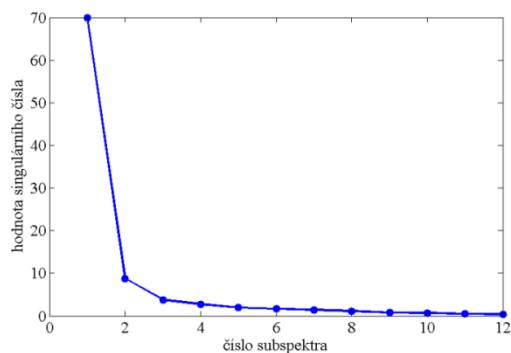
3. koeficient



4. subspektrum



4. koeficient

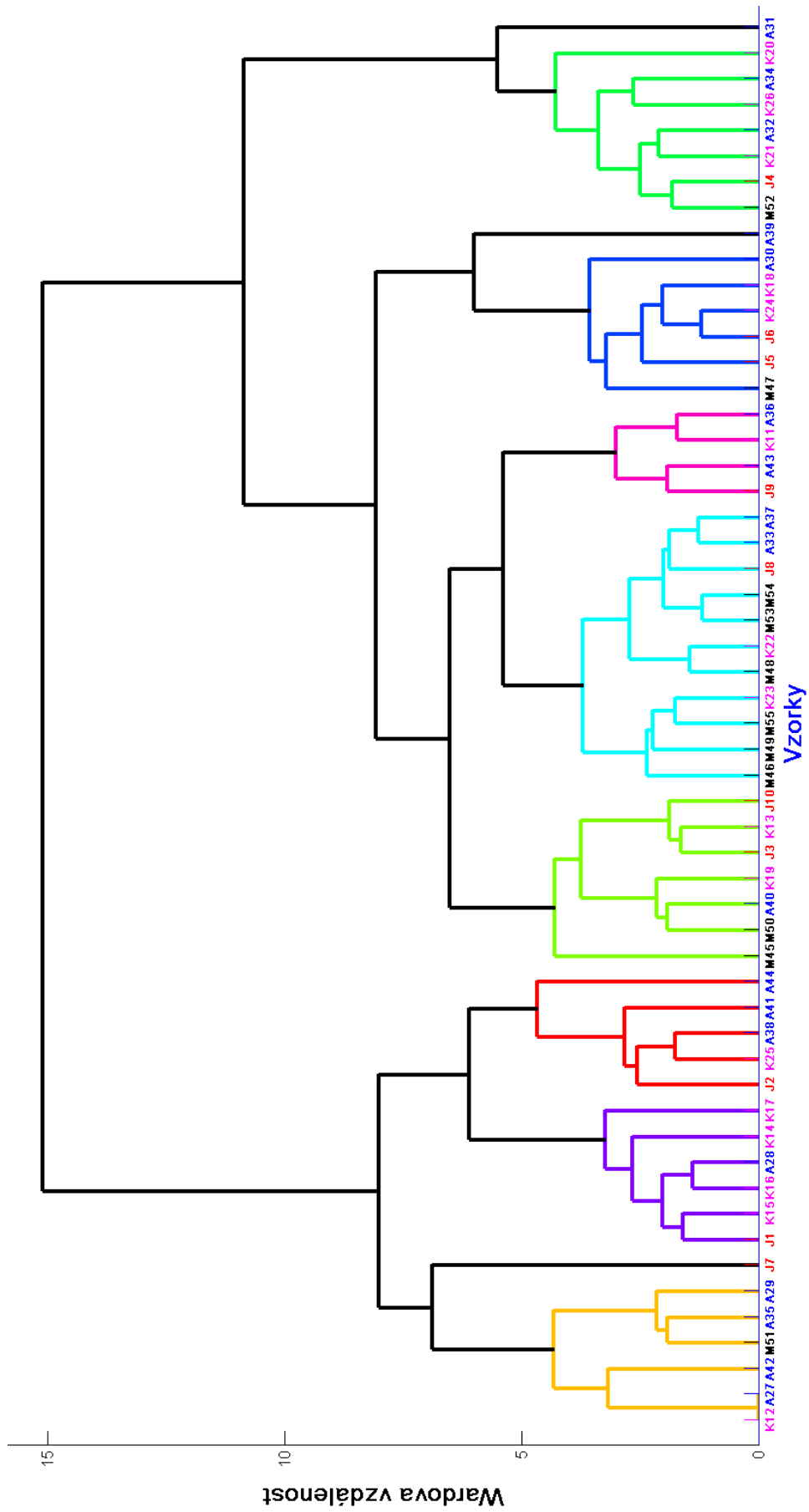


Singulární čísla

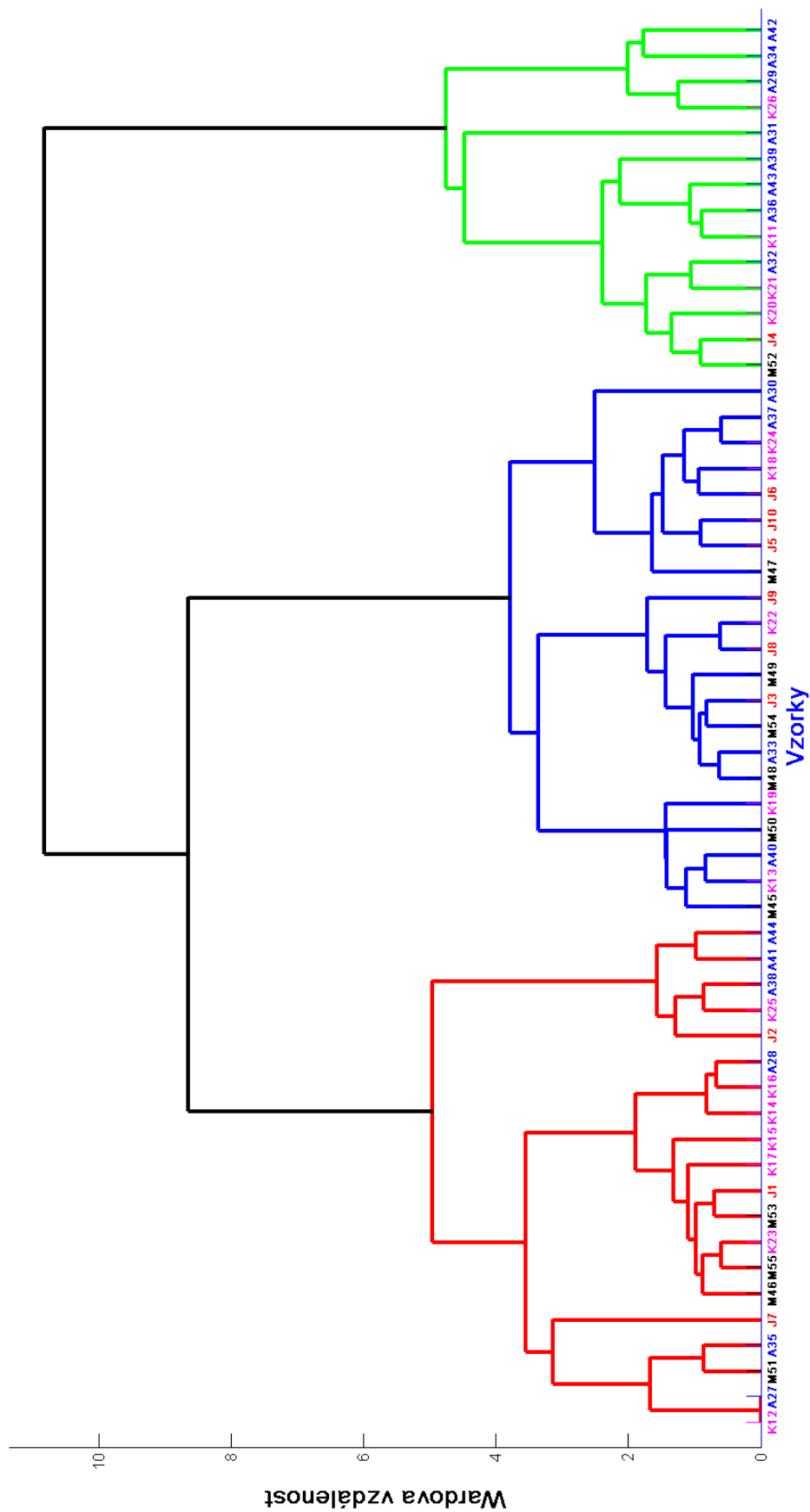
Obr. 7.23. PCA 12 vybraných vzorků KS (zobrazeny jsou pouze první čtyři koeficienty)

asociován nárůst pásu $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ a pás na $\sim 1130\text{ cm}^{-1}$. Rovněž docházelo k méně výraznému posunu pásu amidu I na 1660 cm^{-1} .

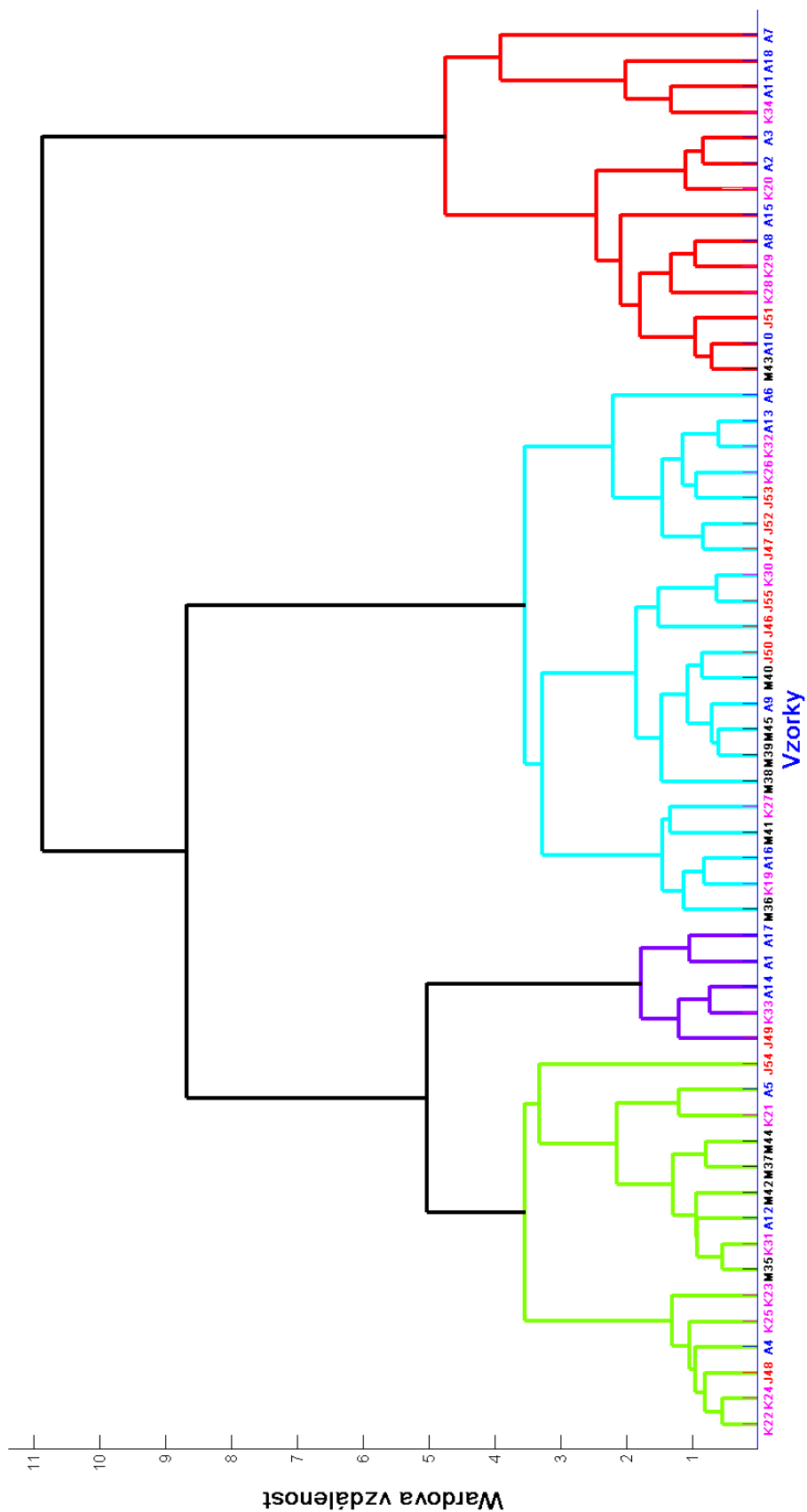
Povzbuzeni těmito výsledky jsme aplikovali přístup opět na celý soubor (obr. 7.24). Celkový výsledek rozlišil soubor do pěti shluků podle diagnóz s Wardovou vzdáleností blízkou sedmi.. Nejlépe definováni jsou pacienti s MCI vytvářející shluk o šesti pacientech s MCI, dvou s AD, jedním s OD a dvěma zdravými pacienty. Jehož diagnostická senzitivita pro MCI je pouze $\sim 54\%$ a specificita $\sim 88\%$. Zbylé shluky jsou pro dané diagnózy méně senzitivní. Dále jsme se pokusili omezit CA pouze na intervaly určené PCA na menších souborech (tedy $880\text{--}920\text{ cm}^{-1}$, $110\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$, $1410\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ a $1640\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$). Výsledek CA je zobrazen na obr. 7.25., na kterém můžeme rozeznat dva diagnosticky neurčitě shluky a třetí shluk obsahující 8 pacientů s AD, tři zdravé kontroly a po jednom pacientovi s MCI a OD. Tento shluk lze brát za typický pro AD a to s 44% senzitivitou a 84% specificitou. Takto nově definovanou senzitivní oblast pro CA jsme ověřili zpracováním vzorků s detailně odečteným fluorescenčním pozadím pomocí PCA (viz obr. 7.26).



Obr. 7.24. Dendrogram 55 vzorků KS analyzovaný na celém spektrálním intervalu



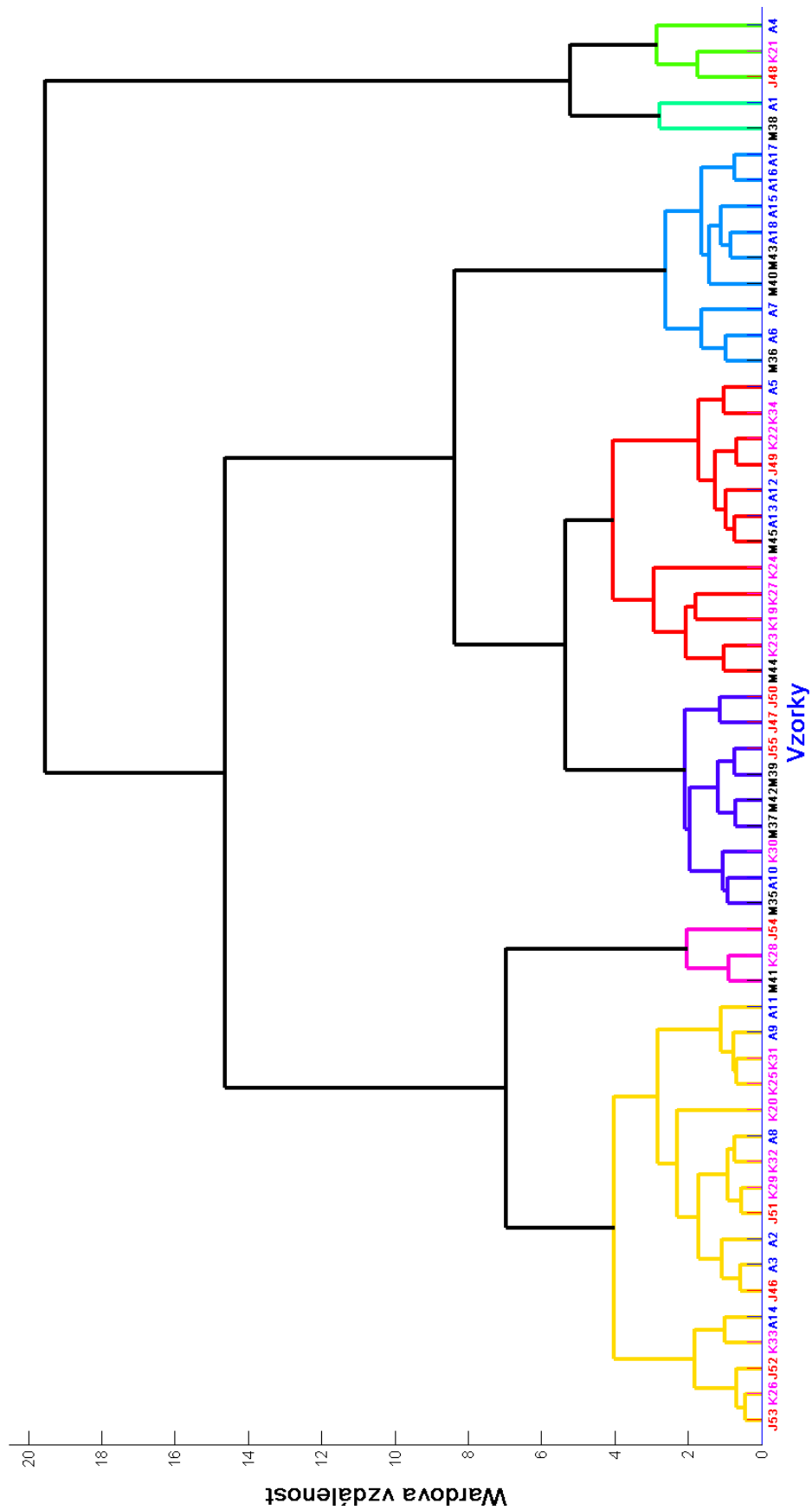
Obr. 7.25. Dendrogram 55 vzorků KS analyzovaný na spojených intervalech 880–920 cm^{-1} , 1010–1150 cm^{-1} , 1410–1520 cm^{-1} a 1640–1700 cm^{-1}



Obr. 7.26. Dendrogram 55 vzorků KS s detailně odečteným fluorescenčním pozadím ve všech subspektrech, analyzovaný na spojených intervalech $880\text{--}920\text{ cm}^{-1}$, $1010\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$, $1410\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ a $1640\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$

Vznikají tři velké a jeden malý shluk. Přičemž shluk obsahující osm pacientů s AD čtyři zdravé a po jednom s OD a MCI má opět 44% senzitivitu pro AD a 84% specificitu. Prostřední shluk se skládá ze šesti pacientů s MCI a OD, pěti zdravých kontrol a čtyř AD. Bereme-li ho jako senzitivní pro společnou diagnózu OD a MCI dosahuje pak 57% senzitivity a 73% specificity.

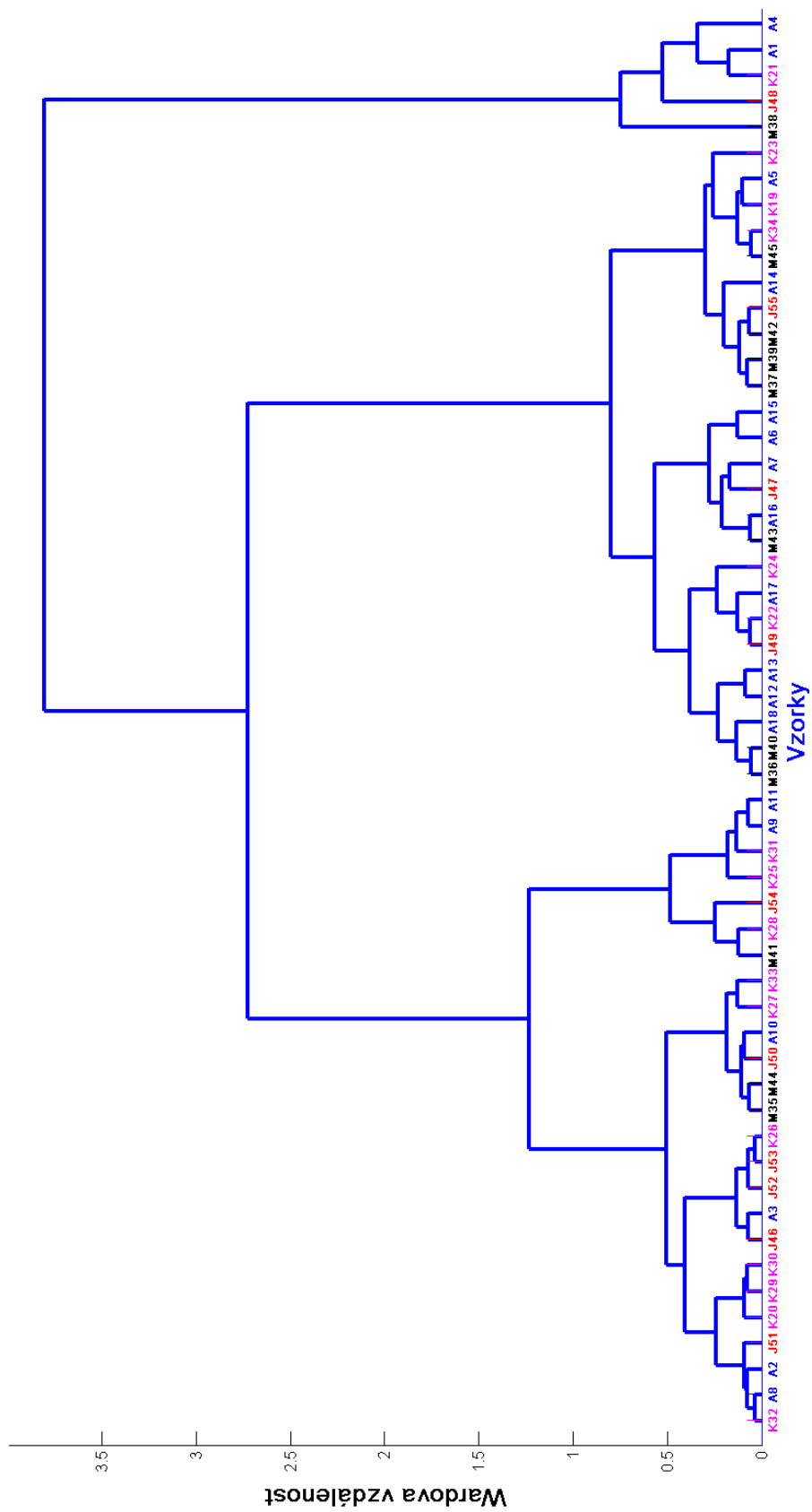
Jelikož odečet pozadí může vést k signifikantně odlišným výsledkům, vyzkoušeli jsme použití shlukové analýzy na spektra bez odečtu pozadí. Data získaná zpracováním celého souboru na celém intervalu jsou ukázána obr. 7.27.



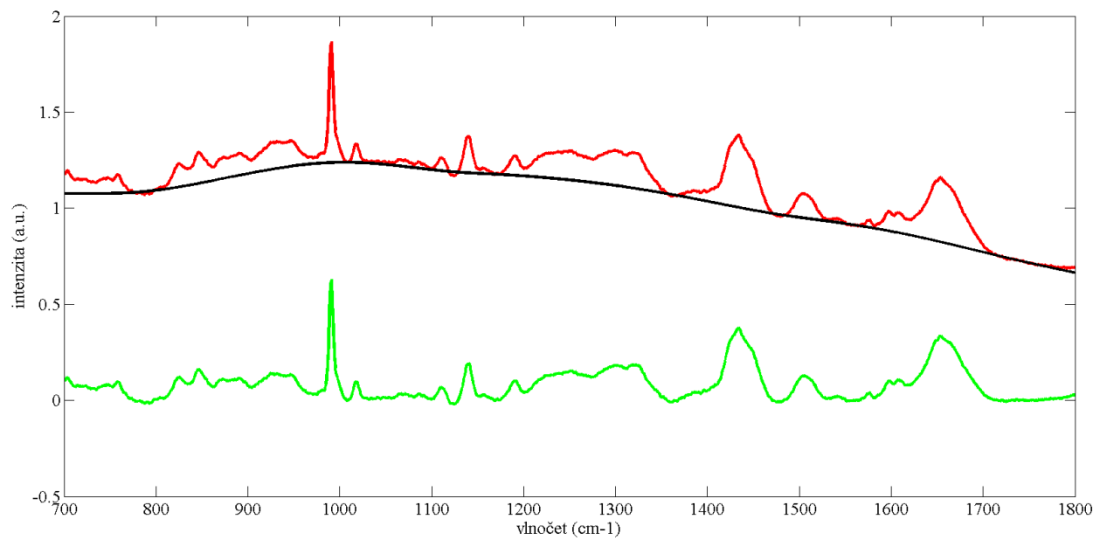
Obr. 7.27. Dendrogram CA provedené na celém spektrálním intervalu pro 55 vzorků KS

Jasně lze detekovat pět shluků s vzájemnou Wardovou vzdáleností 4–5, kdy první obsahuje osm kontrolních pacientů, pět s OD, pět pacientů s diagnostikovanou AD a jednoho s MCI. Další shluk obsahuje 50 % pacientů s MCI dva s jiným typem demence a jednoho s Alzheimerovou demencí. Další shluk je diagnosticky ne zcela určitý, jelikož zahrnuje čtyři kontroly, tři pacienty s AD, dva s OD a jednoho s MCI. Následný shluk spojuje pacienty s AD (6) s pacienty s MCI (3). Poslední shluk je také neurčitý a obsahuje dva pacienty s AD a po jednom z každé zbylé skupiny. Dosáhli jsme tedy postupně zvýšení senzitivity metody pro AD, která byla ale stále pouhých 30 %, opět s výrazně lepší specificitou (~92 %). Zajímavý výsledek dostaneme, pokud aplikujeme CA pouze na intervalech 950–960 cm^{-1} ; 1075–1085 cm^{-1} ; 1245–1255 cm^{-1} určených jako nejcitlivějších k AD v MM (viz obr. 7.28). Zde lze rozlišit dva velké shluky a jeden nesignifikantní malý o pěti vzorcích. První velký shluk obsahuje 10 zdravých kontrol, šest pacientů s OD pět pacientů s AD a tři s MCI. Lze ho tedy připsat zdravým jedincům. Naopak druhý shluk obsahuje 12 pacientů s AD, 7 s MCI, po pěti zdravých a tři pacienty s OD. Tento shluk má tedy 67% senzitivitu pro AD, ale pouze 61% specificitu. Nicméně je dobře viditelné, že ty to dva shluky celkem přesně odlišují zdravé kontroly od nemocných pacientů. Překvapivě omezení CA pouze na intervaly určené z PCA 12 vzorků séra vedlo k horším výsledkům. Následně jsme se pokusili odečíst pozadí automaticky pomocí programu airPLS (obr.7.29). Při vyhodnocení CA na celém intervalu (podobný výsledek i při CA na intervalech 880–920 cm^{-1} , 110–1150 cm^{-1} , 1410–1520 cm^{-1} a 1640–1700 cm^{-1}) získáme výsledek viz obr 7.30. Soubor se rozděluje na dva veliké shluky. Pravý shluk zahrnuje 10 pacientů s AD, pět s MCI, tři s OD a tři zdravé kontroly. Má tedy 55% senzitivitu a 70% specificitu pro AD.

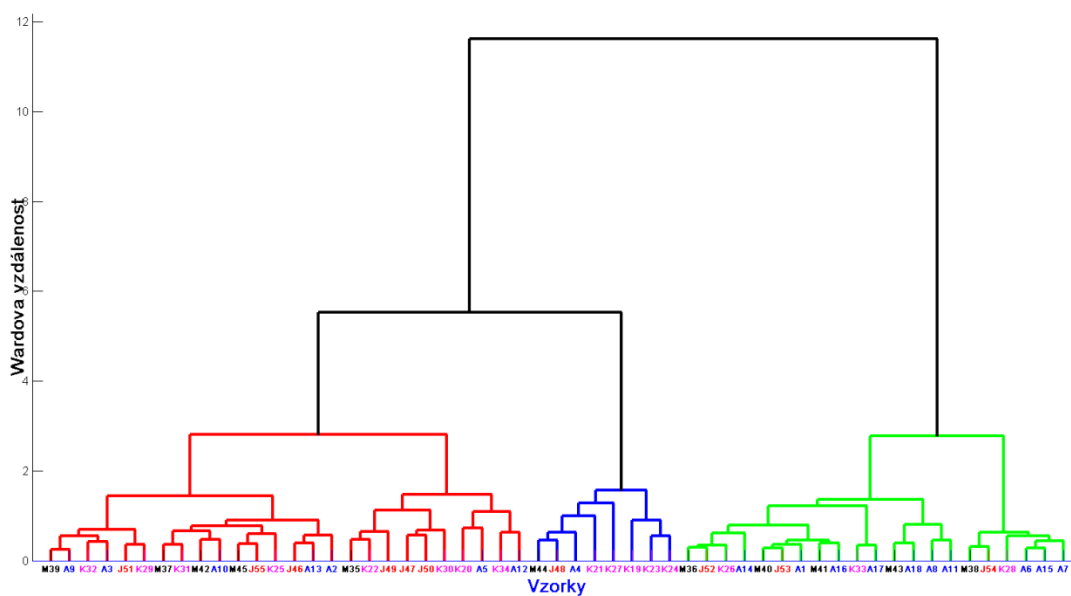
Jelikož výsledky CA vzorků KS opět projevovali vysokou senzitivitu i specificitu v malých souborech, ale s nárůstem dimenze problému jí ztrácely, užili jsme opět neuronových sítí. Neuronové sítě jsme aplikovali na soubory bez odečtu fluorescenčního pozadí a též s odečtem fluorescenčního pozadí metodou airPLS anebo námi výše uvedenou metodou odečtu pozadí v jednotlivých subspektrech PCA. Opět ve shodě s MM jsme nejvyšší senzitivity dosáhli při použití třívrstvé neuronové sítě s 3 000 neurony v první vrstvě, 1 000 ve druhé a čtyřmi výstupními neurony ve třetí vrstvě. Pro odečet pozadí metodu airPLS a použitím neuronové sítě na celý spektrální interval jsme dosáhli 89% senzitivity, ale pouze 27% specificity (obr. 7.31). Pro vzorky séra bez odečtení fluorescenčního pozadí jsme získali rozumný výsledek 72,2% senzitivity a 60% specificity (obr. 7.32). Výsledky analýzy pomocí neuronových sítí při odečtení fluorescenčního pozadí v prvních dvou subspektrech PCA jsme získali 83,3% senzitivitu, ale pouze 19% specificitu (obr. 7.33)



Obr. 7.28. Dendrogram CA 55 vzorků KS na intervalech 950–960 cm^{-1} ; 1075–1085 cm^{-1} ; 1245–1255 cm^{-1}



Obr. 7.29. Odečet fluorescenčního pozadí DCDR spektra KS metodou airPLS



Obr. 7.30. Dendrogram CA 55 vzorků KS v celé spektrální šíři po odečtení fluorescenčního pozadí metodou airPLS

Confusion Matrix

Output Class	KO	1 1.8%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	100% 0.0%
	MCI	4 7.3%	0 0.0%	2 3.6%	4 7.3%	0.0% 100%
	AD	11 20.0%	10 18.2%	16 29.1%	6 10.9%	37.2% 62.8%
	OD	0 0.0%	1 1.8%	0 0.0%	0 0.0%	0.0% 100%
		6.3% 93.8%	0.0% 100%	88.9% 11.1%	0.0% 100%	30.9% 69.1%
	Target Class					
	KO	MCI	AD	OD		

Obr. 7.30. Výsledek metody neuronových sítí pro KS aplikovaný na celém spektrálním rozsahu po odečtu pozadí metodou airPLS

Confusion Matrix

Output Class	KO	8 14.5%	5 9.1%	4 7.3%	4 7.3%	38.1% 61.9%
	MCI	2 3.6%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0.0% 100%
	AD	5 9.1%	5 9.1%	13 23.6%	5 9.1%	46.4% 53.6%
	OD	1 1.8%	1 1.8%	1 1.8%	1 1.8%	25.0% 75.0%
		50.0% 50.0%	0.0% 100%	72.2% 27.8%	10.0% 90.0%	40.0% 60.0%
	Target Class					
	KO	MCI	AD	OD		

Obr. 7.31. Výsledek neuronových sítí pro KS na intervalech $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$; $1075\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$; $1245\text{--}1255\text{ cm}^{-1}$, bez odečtení pozadí

Confusion Matrix

Output Class	KO	0 0.0%	0 0.0%	1 1.8%	0 0.0%	0.0% 100%
	MCI	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	0 0.0%	NaN% NaN%
	AD	13 23.6%	9 16.4%	15 27.3%	8 14.5%	33.3% 66.7%
	OD	3 5.5%	2 3.6%	2 3.6%	2 3.6%	22.2% 77.8%
		0.0% 100%	0.0% 100%	83.3% 16.7%	20.0% 80.0%	30.9% 69.1%
	KO	MCI	AD	OD		
	Target Class					

Obr. 7.32. Výsledek neuronových sítí na celé spektrální šíři při odečtu pozadí pomocí programu *Background 2*

8. Diskuze

Měřením 55 vzorků MM jsme se pokusili ověřit nadějně výsledky z diplomové práce Mgr. Klenera na reprezentativním souboru pacientů trpících Alzheimerovou demencí, minimální kognitivní poruchou, jinou formou demence a zdravých stejně starých kontrol. Ověřili jsme senzitivitu diagnostické metody na rozlišení 8 pacientů s AD a 8 zdravých kontrol (obr. 7.3) a také rozlišení jednotlivých diagnóz na 19 vzorcích (obr. 7.2). S narůstajícím počtem vzorků, ale výrazně narůstá jejich variabilita a dochází ke ztrátě třídění vzorků podle diagnóz (obr. 7.8). Tento trend lze zmírnit aplikováním CA pouze na určité intervaly měřených spekter. PCA na malých souborech ve shodě s předchozími pozorováními (Klener, 2011) ukázala asociaci AD s nárůstem pásu 1080 cm^{-1} , poklesem amidu I a posunem pásu z 1010 cm^{-1} na 1053 cm^{-1} a také poklesem pásu na $\sim 958\text{ cm}^{-1}$. S ohledem na tento výsledek jsme následně zkoumali výsledky CA celého souboru na různých spektrálních intervalech. Nejlepších výsledků dosahuje vyhodnocování na intervalech $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$; $1075\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$ a $1245\text{--}1255\text{ cm}^{-1}$. Tento fakt je ve velmi dobrém souhlasu s doposud publikovanými pozorováními. Např. Griebe *et al.* (2007) určili při studiu MM vibrační spektroskopii oblast $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ za signifikantní pro AD. Pokusíme-li se význam jednotlivých intervalů interpretovat, pak vliv intervalu $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$ na výsledky shlukové analýzy lze vysvětlit na základě pozorování Xie *et al.*, (2005), zabývajícím se fosforylací peptidů. Ti ukázali, že pás na 980 cm^{-1} odpovídá vibraci OPO_3H^- a je charakteristický pro fosforylaci proteinu. Pás 1080 cm^{-1} pak patrně reprezentuje obecnější patologické změny MM, jelikož byly popsány jeho signifikantní změny u pacientů s roztroušenou sklerózou (Klener, 2011), nebo s Parkinsonovou nemocí (Ahmed *et al.*, 2011). Jeho změny byly popsány rovněž jako signifikantní pro osteoartrózu při analýze synoviální tekutiny (Esmonde-White *et al.*, 2009). Změny těchto pásů tedy neodpovídají pravděpodobně změně proteinové složky moku, ale reprezentují patrně nějaký obecný zánětlivý znak (Klener, 2011). Význam intervalu $1245\text{--}1255\text{ cm}^{-1}$ je zřejmě dán změnami vibrace amidu III $\sim 1249\text{ cm}^{-1}$. Signifikantní změny tohoto pásu při Alzheimerovi nemoci prokázal ve své práci Klener, 2011. Přes slibné výsledky z předchozí diplomové práce (Klener, 2011), výsledky diagnostické metody pro soubor 55 pacientů měly i při užití CA na daných intervalech velmi nízkou senzitivitu (33 %) pro AD. To lze interpretovat v souladu s uvedenými spektrálními znaky, které odpovídají spíše obecně zánětlivým změnám, které jsou pravděpodobně podobné u AD i MCI a jiných demencí, proto tyto diagnózy často tvoří společné shluky a tím snižují senzitivitu metody. Dalším významným aspektem je dozajista i nepřesnost v klinické diagnóze. Ta v současné době stále stojí především na vyhodnocování psychologických testů (jejichž výpovědní hodnota závisí na správnosti určení věkové normy a také na celkové inteligenci pacienta, kdy jde jen obtížně objektivně srovnávat ztrátu kognice u vysokoškolsky vzdělané osoby a osob se základním vzděláním). Naopak dosažená specificita $\sim 86\%$ přináší vysokou negativní prediktivní hodnotu a mohla by tak sloužit k uklidnění pacientů stíhaných pochybami o možnosti AD. Společná diagnostika pro AD a MCI vede ještě

k výraznější specificitě 96 %. Překvapivá je výrazná změna výsledků CA při opomenutí srovnání pozadí spekter odečtem polynomu sedmého stupně. Zde lze diagnostikovat MCI nebo jiný než Alzheimerovský typ demence se specificitou 88 %. Závislost výsledku na odečtu polynomu je pravděpodobně dána odečtem variability vzorků spojené s MCI a OD, které se v surových spektrech nejvíce odlišují, a proto taky nejvýrazněji ovlivňují průběh prokládaného polynomu, což vede k jejich potlačení při jeho odečtu. Kombinace vysoké specificity pro AD a MCI, a též pro MCI a OD může pacientům nabídnout diagnostickou metodu, která by v počáteční fázi poruchy kognice objektivně umožnila predikovat, zdali pacient trpí MCI. Použití automatického odečtu fluorescenčního pozadí metodou airPLS nevedlo v MM k výraznějšímu zlepšení výsledků. Je to pravděpodobně dáno značnou rozdílností obsahu fluorescenční příměsi v jednotlivých vzorcích, která je lépe odstraněna individuálním přístupem „ručního“ odečtu v programu *Background 2*. Výsledky neuronových sítí se v porovnání s CA a PCA projevovaly výrazně vyšší senzitivitou 88,9 % bez rozdílu při různém odečtu pozadí. Překvapivě lepších hodnot bylo dosaženo pro celý spektrální interval, než pro jednotlivé podintervaly. Hodnoty získané z neuronových sítí se značně měnily mezi jednotlivými zadáními, což naznačuje pravděpodobně malý rozsah tréninkového (učícího) souboru. Celkový soubor všech naměřených vzorků byl rozdělen na tréninkový (65 %), validační (25 %) a diagnostický (10 %). Lze proto předpokládat zlepšení výsledků metody neuronových sítí u rozsáhlejších souborů spekter.

Vyhodnocení analýzy naměřených spekter KS nebylo diagnosticky rozlišitelné při užití metodiky vyvinuté pro analýzu MM. Zejména hrubší odečet pozadí, nebo nejlépe žádný odečet pozadí, vedl k formování shluků podle dané diagnózy. Automatický odečet pozadí metodou airPLS nevedl ke zlepšení senzitivity ani specificity metody. V závislosti na průběhu pozadí se výsledky z KS výrazně liší od chování vzorků MM, kde naopak odečet pozadí je důležitý pro zvýšení její citlivosti s ohledem na AD. Tento na první pohled rozporuplný fakt lze interpretovat na základě rozdílné variability fluorescenčního pozadí MM a KS. Zatímco KS fyziologicky obsahuje značné množství fluorescenčních látek o fyziologické koncentraci, vzorky MM získávají příměs fluorescenčních látek většinou až jako kontaminaci při odběru lumbální punkcí. Lze tedy předpokládat, že složení, a tedy i spektrální profil fluorescenčního pozadí, bude napříč prvky KS homogenní. Ztráta senzitivity metody odečtem pozadí je pravděpodobně způsobena odečením variability odrážející nemoc. Na základě toho lze předpokládat, že se jedná primárně o intenzitní změnu ne o posuny spektrálních pásů. Naopak vzorky mozkomíšního moku jsou díky rozdílné kontaminaci krví během odběru ve svém fluorescenčním pozadí více variabilní, což vede k potlačení diagnostické síly použitých statistických metod při neodečtení pozadí. Vysoká senzitivita i specificita získaná na náhodně zvolených malých souborech (12 a 16 pacientů) ukázala ve shodě s Carmona *et al.* (2013) na asociaci AD s posunem pásu amidu I z 1644 na 1694 cm^{-1} , což lze interpretovat jako nárůst struktury β -skládaného listu, a dále i s nárůstem vibračního pásu $\sim 902 \text{ cm}^{-1}$, pásu leucinu, valinu, isoleucinu a tryptofanu na 1134 cm^{-1} a posunem pásu vibrací

CH₂, CH₃, lysinu a leucinu a isoleucinu z 1430 na 1500 cm⁻¹, které pravděpodobně odráží směny v terciární struktuře proteinů. Přesto výsledky senzitivity CA pro celkový měřený interval byly lepší než výsledky získané pouze na určitých podintervalech, jako tomu bylo v případě MM, což také podporuje intenzitní původ variability vzorku KS vůči spektrální variabilitě v MM. Jelikož jsme pozorovali větší tendenci tvořit společné shluky mezi jednotlivými patologiemi (AD, OD, MCI) než mezi kontrolami a jednotlivými diagnózami, můžeme opět předpokládat, že spektrální změny spojené s jednotlivými chorobami se projevují podobným obecnějším zánětlivým profilem. To není překvapivé, jelikož v souladu s literaturou je za hlavní patologický mechanismus AD v periferní tkáni považován oxidativní stres (Song *et al.*, 2009), který je ale společný většině zánětlivých pochodů v lidském těle. Také vyšší senzitivita diagnostiky séra pro MCI je v souladu pozorováním Carmona *et al.*, 2013, kteří pozorovali nejvyšší změny asociované s AD v počátečních klinických stadiích.

Vysoká senzitivita publikovaných výsledků o diagnostice AD spektroskopickými metodami v KS se ve světle našich výsledků jeví poněkud pochybná. Ve většině případů je to dáno především volbou diagnostikovaného souboru vzorků. Například Peuchant *et al.* (2008) pomocí shlukové analýzy zpracovali vzorek 40 pacientů s AD 112 zdravých kontrol s přesností 98,4 %, a přitom volili velice přísné podmínky pro zahrnutí vzorků do studie jako je vyřazení pacientů užívajících určitou medikaci, čímž selektivně zvyšovali senzitivitu svých výsledků; nebo porovnáváním pouze zdravých a nemocných pacientů a ne porovnávání vzájemně špatně odlišitelných patologií. Náš soubor pacientů byl naopak velice nehomogenní a zahrnoval různé diagnózy v různém stádiu, čímž dobře odrážel vzorek reálné populace a tím také realitu praktické medicínské diagnostiky. Také věk kontrol, který se např. v případě práce Griebeho *et al.* (2007) lišil od průměrného věku pacientů s AD o 16 let může zvyšovat senzitivitu diagnostické metody. Souběžně se vznikem této práce byl publikován článek o užití NIR-Ramanovy mikrospektroskopie KS (Ryzhiková *et al.*, 2015). V této práci byly měřeny neředěné vzorky séra vyschlé na aluminiové folii. Užitím neuronových sítí byli autoři schopni rozlišit pacienty s AD, OD a zdravé kontroly s 95% senzitivitou i specificitou, přestože jsme užili stejnou metodu odečtu pozadí a rozsáhlejší neuronové síť (~20× více neuronů ve vrstvě) nedosáhli jsme zdaleka tak dobrých výsledků ani v MM, kde lze očekávat lepší senzitivitu. Vzhledem ke srovnatelnému rozsahu analyzovaných souborů i zastoupení jednotlivých diagnóz se takto vysoká senzitivita metody ve stínu našich pozorování jeví nadhodnocená i s ohledem na faktory přirozeně narušující senzitivitu metody, jako je nepřesné stanovení klinické diagnózy. Naopak námi pozorovaná vyšší senzitivita metody při volbě náhodných menších souborů, kterou je třeba ale dále objektivizovat, poukazuje na vhodnost využití neuronových sítí ke zpracování výsledků a diagnostice AD.

9. Závěr

Cílem této práce bylo ověřit možnosti diagnostiky AD z KS na vzorku blízkém reálné populaci, optimalizovat podmínky měření a dále prohloubit dříve získané znalosti měření a diagnostiky vzorků MM. Nejprve jsme se rozhodli užít CaF_2 destičky jako substrátu pro DCDR spektroskopii. Následně jsme ověřili, že v námi detekované oblasti substrát nepřisívá vlastním signálem, který by komplikoval analýzu spektrálních změn proteinové složky krevního séra. Jelikož DCDR spektroskopie je velice senzitivní metodou srovnatelnou s analytickými biochemickými metodami a KS je velice koncentrovaný biologický vzorek (65–85 g/l bílkoviny) rozhodli jsme se nalézt optimální ředění vzorku. Při ředění docházelo k vytvoření jasně viditelného proteinového kroužku, který ale při zředění 300× až 400× byl již velice nehomogenní. Na základě poměru intenzity signálu/šumu a šířky prstýnku jsme určili za nejlepší 25× ředění. Jelikož reprodukovatelnost DCDR spektroskopie je nejvíce omezena spektrálními pásy nečistot, bylo na počátku rozhodnuto o měření map (tedy získání spekter z více bodů vzorku). Proměřením proteinového prstýnku pomocí funkce mapování a vyhodnocením dat PCA jsme ověřili homogenitu kroužku v tečném směru kapky, což nám umožnilo se v následujícím měření omezit pouze na body na úsečce kolmé k hraně vyschlé kapky. Vzorky vykazovali výrazné fluorescenční pozadí, které při užití 30s vybělování nevedlo k výraznému poklesu. Při analýze vhodného ředění jsme naopak pozorovali pokles fluorescenčního pozadí, tak jak uvedli Zhang *et al.* (2004).

Následně jsme změřili KS a MM 55 pacientů. Vyzkoušeli jsme CaF_2 jako substrát pro měření mozkomíšního moku. Jeho použití zvýšilo efektivitu měření rychlejším vysycháním vzorku (i několikanásobným). Díky nižší reflektivitě CaF_2 substrátu jsme pozorovali pokles intenzity snímaného Ramanova signálu, naopak ale odpadl problém s fotodegradací vzorku, který byl pozorován u substrátů SpectRIM™. Pro zpracování dat jsme využili již dříve vyvinutou diagnostickou metodu (Klener, 2011) k ověření její vysoké senzitivity i při změně substrátu. V diagnostikované skupině jsme tak byli schopni odlišit pacienty s AD s 83% senzitivitou a 67% specificitou.

Diagnostická metoda vyvinutá Mgr. Klenrem byla užita na soubor 55 pacientů k jejich rozřídění podle medicínských diagnóz. Pozorovali jsme pokles senzitivity metody při narůstajícím počtu pacientů. To jsme očekávali, jelikož lze předpokládat nepřesnosti v klinické diagnóze jednotlivých pacientů. Výsledek metody velice záležel na volbě spektrálních oblastí pro CA. Ve shodě s předchozími pozorováními dosahovala diagnostika nejlepších hodnot na intervalu (950–960 cm^{-1} ; 1075–1085 cm^{-1} ; 1245–1255 cm^{-1}), přičemž změny na intervalu 950–960 cm^{-1} lze přisoudit změně fosforylace proteinů (Xie *et al.*, 2005). Také pás na 1080 cm^{-1} odpovídající vibraci OPO_3^{2-} , byl již určen za signifikantní pro AD. Tento pás patrně reprezentuje obecnější patologické změny MM, jelikož jeho změna byla popsána i u pacientů s roztroušenou (Klener *et al.*, 2011), a parkinsonovou nemocí (Ahmed *et al.*, 2011). Poslední interval odpovídá vibracím amidu III ~1249 cm^{-1} . Změny tohoto pásu při Alzheimerovi nemoci již popsal Klener, 2011. Výsledky diagnostické

metody aplikované na celý soubor se projevovaly nízkou senzitivitou v určení AD (44 %). To podporuje interpretaci dříve popsanych spektrálních znaků jako markerů obecně zánětlivých změn v MM, jež se pravděpodobně shodují s AD, MCI a jinými typy demenci. Toto rovněž potvrzuje i pozorování častého nalezení společných shluků pro tyto patologie. Dosažená specificita ~86 % přináší vysokou negativní prediktivní hodnotu a mohla by tak sloužit jako pomocná metoda při nejistotě diagnózy a zvažování nasazení medikace. Pro společnou diagnostiku AD a MCI byla specificita dokonce 96 %. Překvapivě k výrazné změně výsledků vede neodečtení polynomu sedmého stupně od diagnostikovaných spekter. Účelem tohoto polynomu je odstranit variabilitu vnesenou „ručním“ odečtem fluorescenčního pozadí vzorků. Opominutí odečtu polynomu vede k 88% specificitě společné diagnostiky pro MCI a jiné typy demenci. Automatický odečet pozadí metodou airPLS nevedl ke zlepšení citlivosti metody. Následně jsme použili neuronové sítě o 3 000 neuronech v první vrstvě, 1 000 v druhé a 4 diagnostických neuronech ve třetí vrstvě. Dosáhli jsme tak vysoké senzitivity 88,9 %, ale velice špatné specificity 37 %.

Diagnostické spektroskopické metody aplikované na vzorky KS vedly k nesignifikantním výsledkům. Proto byla navržena změna diagnostického přístupu, kdy jsme se pokusili zajistit homogenitu odečtu fluorescenčního pozadí vzorků jeho společným odečtem od jednotlivých hlavních komponent celého souboru. Tento přístup vedl k senzitivním výsledkům na malých souborech (~10 osob). Použitím PCA jsme na nich pozorovali asociaci diagnózy AD s posunem pásu amidu I z 1644 na 1694 cm^{-1} ve shodě s Carmona *et al.* (2013), s nárůstem vibračního pásu ~902 cm^{-1} , pásu leucinu, valinu, isoleucinu a tryptofanu na 1134 cm^{-1} , a posunem pásu vibrací CH_2, CH_3 , lysinu a leucinu a isoleucinu z 1430 na 1500 cm^{-1} . S nárůstem souboru pacientů však docházelo k poklesu senzitivity metody. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při výpočtu CA na celém spektrálním intervalu, což společně s nejlepšími výsledky metody při neodečítání pozadí poukazuje na možný původ diagnostických rozdílů mezi vzorky v intenzitě spektrálních pásů, a tedy v zastoupení jednotlivých proteinů. Opět se jedná spíše o obecný znak zánětlivé povahy, než o diagnostiku konkrétního onemocnění. To se nám podařilo ukázat CA celého souboru vzorků po úpravě pozadí odečtem polynomu sedmého stupně. CA následně vytvořila dva velké shluky, které lze interpretovat jako charakteristické pro skupinu zdravých kontrol a skupinu pacientů s neurodegenerativním onemocněním, což je v souladu se současnou představou o projevech neurodegenerativních onemocnění mimo centrální nervovou soustavu. Za hlavní patologický mechanismus se totiž pokládá v periférii oxidativní stres, který není charakteristický pouze pro jednu diagnózu.

Naše výsledky tedy jednoznačně ukazují, že senzitivity a specificity doposud publikovaných vysoce senzitivních a specifických spektroskopických diagnostických metod pro AD jsou značně ovlivněny volbou testovaného souboru, jeho rozsahem a zahrnutím i jiných neurodegenerativních onemocnění než jen AD. Přestože jsme ani optimalizací diagnostické metody nedosáhli vysoké senzitivity, podařilo se nám navrhnout postupy s vysokou specificitou, která byla 86% pro diagnózu AD z MM

a 88% pro diagnostiku MCI z KS. Tyto slibné výsledky a prokázaná vysoká senzitivita a specifická na malých souborech byla motivací k užití neuronových sítí. Dosáhli jsme tak vysoké senzitivity (až 88,9 %), ale pouze 27 % specifcity. Je to pravděpodobně dáno malým rozsahem diagnostikovaného souboru, což poukazuje na možnost nalezení silnější metody při rozšíření analyzovaného souboru. Na tuto problematiku a hlubší pochopení spektroskopických rozdílů mezi jednotlivými diagnózami se chystáme zaměřit v následujícím výzkumu.

Seznam použité literatury

- Ambler Z. (2006): *Základy neurologie*, Karolinum, Praha
- Andreasen N., Minthon L., Davidsson P. *et al.* (2001): Evaluation of CSF-tau and CSF-Aβ₄₂ as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice, *Archives of Neurology*, **58**, 373–379.
- Ballabh P., Braun A., Nedergaard M. (2004): The blood–brain barrier: an overview structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiology of Disease*, **16**, 1–13.
- Barman I., Dingari N. C., Woong Kang J. *et al.* (2012): Raman spectroscopy-based sensitive and specific detection of glycated hemoglobin, *Analytical Chemistry*, **84**, 2474–2482.
- Bermejo-Pareja F., Antequera D., Vargas T. *et al.* (2010): Saliva levels of Aβ_{1–42} as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study, *BMC Neurology*, **10**, 108.
- Blennow K., Hampel H., Weiner M., Zetterberg H. (2010): Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease, *Nature Review Neurology*, v tisku.
- Boller F., Forbes M. M.: (1998): History of dementia and dementia in history: An overview, *Journal of the Neurological Sciences*, **158**, 125–133.
- Burns D. H., Rosendahl S., Bandilla D., *et al.* (2009): Near-infrared spectroscopy of blood plasma for diagnosis of sporadic Alzheimer's disease, *Journal of Alzheimers Disease*, **17**, 391–397.
- Carmona P., Molina M., Calero M., Bermejo-Pareja F. *et al.* (2012): Infrared spectroscopic analysis of mononuclear leukocytes in peripheral blood from Alzheimer's disease patients, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **402**, 2015–2021.
- Carmona P., Molina M., Calero M., Bermejo-Pareja F. *et al.* (2013): Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy, *Journal of Alzheimer's Disease*, **34**, 911–920.
- Cipriani P., Ben-Amotz D. (2005): Characterization of select members of the *Taxane* family using Raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, **36**, 1052–1058.
- Deegan R. D., Bakajin O., Dupont T. F. *et al.* (1997): Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops, *Nature*, **389**, 827–828.
- Diem M., Griffiths P. R., Chalmers J. M. (2008); *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*, John Wiley & Sons.
- Dingari N. C., Horowitz G. L., Woong Kang J., Dasari R. R., Barman I. (2012): Raman spectroscopy provides a powerful diagnostic tool for accurate determination of albumin glycation, *PLoS One*, **7**, e32406.

- Djaoued Y., Balaji S., Priya S., (2007): Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions, *Spectrochimica Acta A*, **67**, 1362–1369.
- Esmonde-White K. A., Mandai G. S., Raaii F. *et al.* (2009): Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis, *Journal of Biomedical Optics*, **14**, 034013.
- Filik J., Stone N., (2007): Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures, *Analyst*, **132**, 544–550.
- Filik J., Stone N., (2008): Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, **616**, 177–184.
- Gauglitz G., Vo Dinh T. (2003): *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VCH, Wienheim.
- Goedert M.:(2009): Oskar Fischer and the study of dementia, *Brain*, **132**; 1102–1111.
- Gonchukov S. A., Lonkina T. V., Minaeva S. A *et al.* (2014): Confocal Raman microscopy of pathologic cells in cerebrospinal fluid, *Laser Physics Letters* **11**, 015602.
- Griebe M., Daffertshofer M., Stroick M. *et al.* (2007): Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease, *Neuroscience Letters*, **420**, 29–33.
- Halvorson R. A., Vikesland P. J. (2011): Drop coating deposition Raman (DCDR) for microcystin-LR identification and quantitation, *Environmental Science and Technology*, **45**, 5644–5651.
- Harz M., Kiehntopf M., Stockell S. *et al.* (2009): Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy; *Journal of Biophotonics*, **2**, 70–80.
- Hawkins B. T., Davis T. P. (2005): The Blood-brain barrier/neurovascular Unit in Health and Disease, *Pharmacological Review*, **57**, 173–185.
- Hastie T., Tibshirani R., Friedman J. (2008): *The Elements of Statistical Learning – Data Mining, Inference and Prediction*, druhé vydání, Stanford.
- Hebák P., Hustopecký, J. (1987): *Vicerozměrné statistické metody s aplikacemi*, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha.
- Hu H., Larson R. G. (2005): Analysis of the effects of marangoni stresses on the microflow in an evaporating sessile droplet, *Langmuir*, **21**, 3972–3980.
- Hu H., Larson R. G. (2006): Marangoni effect reverses coffee-ring depositions, *Journal of Physical Chemistry B*, **110** (14), 7090–7094.
- Hu H., Larson R. G. (2002): Evaporation of a sessile droplet on a substrate, *Journal of Physical Chemistry B*, **106**, 1334–1344.
- Humpell C. (2011): Identifying and validating biomarkers for Alzheimer’s disease, *Trends in Biotechnology*, **29** (1), 26–32.
- Chen P., Shen A., Zhao W. *et al.* (2009): Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer’s disease diagnosis, *Applied Optics*, **48**, 4743–4748.
- Jenkins A. L., Larsen R. A., Williams T. B. (2005): Characterization of amino acids using Raman spectroscopy, *Spectrochimica Acta A*, **61**, 1585–1594.

- Johnson R. A., Wichern D. W. (2007): *Applied Multivariate Statistical Analysis*, Pearson, New Jersey.
- Junqueira L. C., Carneiro J., Kelly R. O. *et al.* (1997): *Základy histologie*, Nakladatelství a vydavatelství H & H, Jinočany.
- Kačenka P. (1998): *Neuronové sítě, historie, využití neuronových sítí a často používané typy sítí*, Matematický korespondenční seminář, Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.
- Kittnar O., Jandová K., Kuriščák E. *et al.* (2011): *Lékařská fyziologie*, Grada, Praha.
- Klener J. (2011): *Diagnostika neurodegenerativních chorob pomocí Ramanovy spektroskopie*, Diplomová práce, Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.
- Klener J., Hofbauerová K., Bartoš A. *et al.* (2014): Instability of cerebrospinal fluid after delayed storage and repeated freezing: A holistic study by drop coating deposition Raman spectroscopy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **52**, 657–664.
- Kong K., Kendall C., Stone N., Nothinger I. (2015): Raman spectroscopy for medical diagnostics – From *in vitro* biofluid assay to *in vivo* cancer detection, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v tisku.
- Kočišová E., Procházka M. (2011): Drop-coating deposition Raman spectroscopy of liposomes, *Journal of Raman Spectroscopy*, **42**, 1606–1610.
- Kočišová E., Vodláková A., Procházka M. (2012): DCDR spectroscopy as efficient tool for liposome studies: Aspect of preparation procedure parameters, *Spectroscopy: An International Journal*, **27**, 349–353.
- Kopecký Jr. V., Baumruk V. (2006): Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules, *Vibrational Spectroscopy*, **42**, 184–187.
- Kopecky Jr. V., Kohoutova J., Lapkouski M. *et al.* (2012): Raman spectroscopy adds complementary detail to the high-resolution x-ray crystal structure of photosynthetic PsbP from *Spinacia oleracea*. *PLoS One*, **7**, e46694.
- Landsberg G., Mandelstam M. (1928): Eine neue erscheinung bei der lichtzerstreuung in krystalen, *Die Naturwissenschaften*, **16**, 557–558.
- Lasch P., Kneipp J. (2008): *Biomedical Vibrational Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Lindsay K. W., Bone I., Fuller G. (2010): *Neurology and Neurosurgery Illustrated*, Elsevier, Edinburgh.
- Long D. A. (2002): *The Raman Effect – A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, Chichester.
- Loizou S., McCrea J. D., Rudge A. C. *et al.* (1985): Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): standardization and quantitation of results, *Clinical & Experimental Immunology*, **62**, 738–745.
- Ma L., Chen J., Wang R., *et al.* (2015): The level of Alzheimer-associated neuronal thread protein in urine may be an important biomarker of mild cognitive impairment, *Journal of Clinical Neuroscience*, **4**, 649–52.

- Ma L., Wang R., Han Y. *et al.* (2015): Development of a novel urine Alzheimer-associated neuronal thread protein ELISA kit and its potential use in the diagnosis of Alzheimer's disease, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v tisku.
- Maxwell J. C. (1890): *Scientific Papers, Vol. 2*, Cambridge.
- Melon M., Militký J.,(2002): *Kompendium statistického zpracování dat*, Academica, Praha.
- McKhann, G., Drachman D., Folstein M. *et al.* (1984): Clinical-diagnosis of Alzheimers-disease – report of the MINCDS–ADRDA work group under the auspices of department of healthand human services task force on Alzheimer disease, *Neurology*, **34**, 939–944.
- Moger J., Gribbon P., Sewing A., Winlove C. P. (2007): Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1770**, 912–918.
- Ortiz C., Zhang D., Xie Y., Jo Davisson V., Ben-Amotz D. (2004): Identification of insulin variants using Raman spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, **332**, 245–252.
- Ortiz C, Zhang D, Xie Y, Ribbe A. E., Ben-Amotz D. (2006): Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis, *Analytical Biochemistry*, **353**, 157–166.
- Ortiz C., Zhang D., Ribbe A. E., Xie Y., Ben-Amotz D. (2007): Analysis of insulin amyloid fibrils by Raman spectroscopy, *Biophysical Chemistry*, **128**, 150–155.
- Pagba C. V., Lane S. M., Wachsmann-Hogiu S.,(2011): Conformational changes in quadruplex oligonucleotide structures probed by Raman spectroscopy, *Biomedical Optics Express*, **2**, 207–217.
- Peeran M., Srinivasamurthy K. G. (2005): *Comparison of Raman and IR spectroscopy*, <http://www.chemvista.org/ramanIR4.html>.
- Peuchant E., Richard-Harston S., Bourdel-Marchasson I. *et al.* (2008): Infrared spectroscopy: a reagent-free method to distinguish Alzheimer's disease patients from normal-aging subjects, *Transational Research*, **152**, 103–112.
- Pollay M. (2010): The function and structure of the cerebrospinalfluid outflow system, *Pollay Cerebrospinal Fluid Research*, 7–9.
- Press W. H., Teukolsky S. A., Vetterling W. T., Flannery B. P. (2002): *Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing, Second Edition*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Raman C. V., Krishan K. S. (1928): A new type of secondary radiation, *Nature*, **121**, 501–502.
- Raman C. V., Krishan K. S. (1928): A new radiation, *Indian Journal of Physics*, **2**, 387–398.
- Rencher A. C. (2002): *Methods of Multivariate Analysis, second edition*, John Wiley & Sons, New York.
- Rusina R., Matěj R., Bartoš A. *et al.* (2014): *Neurodegenerativní onemocnění*, Mladá fronta, Praha.

- Ryzhikova E., Kazakov O., Halamkova L. *et al.* (2015): Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostics: specificity relative to other types of dementia, *Journal of Biophotonics*, **8**, 584–596.
- Sakka L., Coll G., Chazal J. (2011): Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid, *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, **128**, 309–316.
- Salerno J.A., Murphy D.G., Horowitz B. *et al.* (1992): Brain atrophy in hypertension, A volumetric magnetic resonance imaging study, *Hypertension*, **20**, 340–348
- Silverberg G. D., Mayo M., Saul T., *et al.* (2003): Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: a hypothesis, *Lancet Neurology*, **2**, 506–11.
- Smekal A. (1923): Zur Quantentheorie der Dispersion, *Die Naturwissenschaften*, **43**, 873–875.
- Song F., Poljak A., Smythe G. A., Sachdev P. (2009): Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Brain research reviews*, **61**, 69–80.
- Staňková A. (2009): Odběr krve žádná věda? *Sestra*, **4**, <http://zdravi.e15.cz/clanek/sestra/odber-krve-zadna-veda-418591>.
- Straus S. E., Thorpe K. E., Holroyd-Leduc J. (2006): How do I perform a lumbar puncture and analyze the results to diagnose bacterial meningitis?, *Journal of the American Medical Association*, **296**, 2012–2022.
- Van der Engh G., Farmer C. (1992): Photon-bleaching and photon-saturation in flow cytometry, *Cytometry*, **13**, 669–677.
- Tokuda T., Kida S. (2015): New findings and concepts on production and absorption of cerebrospinal fluid: reconsiderations and revisions of an unquestioningly accepted dogma of 100 years, *Brain Nerve*, **67**, 617–26.
- Vermant J. (2011): When shape matters, *Nature*, **476**, 286–287.
- Vokurka M., Hugo J. *et al.* (2004): *Velký lékařský slovník*, 4. vydání, Maxdorf, Praha.
- Williams R. (1986): Protein secondary structure analysis using Raman amide I and amide III spektra, *Methods in Enzymology*, **139**, 311–331.
- Xie Y., Zhang D., Jarori G. T., Jo Davison V., Ben-Amotz D. (2004): The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation, *Analytical Biochemistry*, **332**, 116–121.
- Xie Y., Jiang Y., Ben-Amotz D. (2005): Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, **343**, 223–230.
- Xie Y. Zhang D., Ben-Amotz D. (2008): Protein–ligand binding detected using ultrafiltration Raman difference spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, **373**, 154–160.
- Yoshida M., Higashi K., Kuni K. *et al.* (2015): Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease with acrolein metabolites and creatinine in urine, *Clinica Chimica Acta*, **441**, 115–121.

- Yunker P. J., Still T., Lohr M. A., Yodh A. G. (2011): Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions, *Nature*, **476**, 308–311.
- Zeman D. (2003): Vyšetření mozkomíšního moku – část I., *Lékařské listy*, **43**, <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/vysetreni-mozkomisniho-moku-i-cast-157363>.
- Zolkovic B. V. (2005): Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration, *TRENDS in Neurosciences*, **28**, 202–208.
- Zlokovic B. V. (2008): The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders, *Neuron*, **57**, 178–201.
- Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F. *et al.* (2003): Raman detection of proteomic analytes, *Analytical Chemistry*, **75**, 5703–5709.
- Zhang D., Mrozek M. F., Xie Y., Ben-Amotz D. (2004): Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition, *Applied Spectroscopy*, **58**, 929–933.

Seznam tabulek

Tab. 1. Složení mozkomíšního moku a plazmy (O. Kittnar *et al.*, 2011; wikipedia 2015; Vokurka *et al.*, 2004)

Tab. 2. Srovnání Ramanovy spektroskopie a infračervené spektroskopie (Peeran & Srinivasamurthy, 2005)

Tab. 4.1. Podrobnější charakteristika sledovaných pacientů

Seznam použitých zkratek

- A β – amyloid beta
AD – Alzheimerova nemoc
CA – shluková analýza (*cluster analysis*)
CAA – mozková amyloidová angiopatie (*cerebral amyloid angiopathy*)
CNS – centrální nervová soustava
CT – počítačová tomografie (*computer tomography*)
DCDR – Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman)
DMP – dědičná metabolická porucha
ELISA – Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FTD – fronto-temporální demence
HEB – hemato-encefalická bariéra
KS – krevní sérum
LP – lumbální punkce
MCI – mírná kognitivní porucha (mild cognitive impairment)
MM – mozkomíšní mok
MRI – zobrazovací magnetická rezonance
OD – jiný typ demence (*other dementia*)
PCA – analýza hlavních komponent (*principle component analysis*)
PET – pozitronová emisní tomografie
RAGE – receptor pro konečné produkty pokročilé glykosylace (receptors for advanced glycation products)
RIA – radio-imuno assay
RR – Ramanův rozptyl
RS – Ramanova spektroskopie
SD – směrodatná odchylka
SIRS – syndrom systematické zánětlivé odpovědi
SPECT – jednofotonová emisní počítačová tomografie
SVD – rozklad do singulárních čísel (*singular value decomposition*)