

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Jakub Klener

Diagnostika neurodegenerativních chorob pomocí Ramanovy spektroskopie

Fyzikální ústav UK

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2011

Poděkování:

Rád bych poděkoval hlavně RNDr. Vladimíru Kopeckému Jr. Ph.D. za obětavost, ochotu, trpělivost a odborné konzultace při vedení diplomové práce, za podporu ve chvílích, kdy jsem již při psaní práce propadal beznadějí a za velmi rychlé reakce při korekcích právě psaných úseků práce. Také bych chtěl poděkovat doc. MUDr. Aleši Bartošovi (Psychiatrické centrum Praha) za poskytnutí vzorků mozkomíšního moku a ochotnou konzultaci lékařské problematiky práce. Dále mé poděkování také patří RNDr. Kateřině Hofbauerové, Ph.D. za pomoc a instruktáž při práci v biochemické laboratoři. V neposlední řadě bych chtěl ocenit rodinné zázemí a Báru za morální, psychickou a finanční podporu a za toleranci častého ponocování nad zpracováním výsledků a tvorbou textu.

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 Praze dne 15. 4. 2011

Podpis autora:

Název práce: **Diagnostika neurodegenerativních chorob pomocí Ramanovy spektroskopie**

Autor: Bc. Jakub Klener

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vladimír Kopecný Jr., Ph.D., Fyzikální ústav UK

e-mail vedoucího: kopecny@karlov.mff.cuni.cz

Léčba neurodegenerativních chorob je často velmi obtížná a její úspěšnost závisí na včasné diagnóze. Proto jsme v této práci vyvíjeli novou diagnostickou metodu roztroušené sklerózy a Alzheimerovy nemoci pomocí Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR) mozkomíšního moku (CSF). Podařilo se nám nalézt podmínky měření, za kterých byla měřená spektra dostatečně reprodukovatelná a které jsou přijatelné pro běžnou diagnostickou praxi. Přitom jsme zjistili, že CSF podléhá poměrně rychlé degradaci při pokojové teplotě, která byla ve spektrech s jistotou detekovatelná již po 5 hodinách, a degradaci vlivem opakovaného zamrazování. DCDR spektra CSF od jednotlivých pacientů byla analyzována pomocí faktorové a shlukové analýzy. Roztroušená skleróza se ve spektrech projevovala sníženou intenzitou Ramanova pásu na 1080 cm^{-1} , který pravděpodobně souvisí s nějakým obecnějším patologickým stavem. Spektrální změny způsobené Alzheimerovou nemocí byly mnohem komplexnější a kromě změn ve výše zmíněném páse zde byly identifikovány také změny na intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ a $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ související se změnami ve skladbě a konformacích proteinů. Navíc se nám podařilo pomocí DCDR spekter rozlišit mladé zdravé pacienty od starších ročníků. V této práci bylo tedy ověřeno, že DCDR spektroskopie je vhodnou diagnostickou metodou pro klinickou praxi k určení neurodegenerativních chorob prostřednictvím komplexní analýzy CSF.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, Alzheimerova nemoc, Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků, vibrační spektroskopie, mozkomíšní mok

Title: Diagnostics of neurodegenerative diseases by means of Raman spectroscopy

Author: Bc. Jakub Klener

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D., Institute of Physics of Charles University

Supervisor's e-mail address: kopeccky@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: Therapies of neurodegenerative diseases are often very difficult and their success depend on an early diagnose. From that reason we have been developing new diagnostic method for multiple sclerosis and Alzheimer disease by drop coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy of cerebrospinal fluid (CSF) in this work. We found out conditions of measurements, where spectra were reproducible and accepted for standard diagnostic practices. We discovered that CSF has fast degradation at a room temperature, which was detectable in spectra after 5 hours, and degradation due to refreezing. DCDR spectra of CSF from individual patients were analyzed by factor and cluster analysis. Multiple sclerosis was manifested by lower intensity of a Raman band at 1080 cm^{-1} , which is probably connected with more general pathologic state. Spectral changes caused by Alzheimer disease were more complex and beside changes mentioned above also changes connected with composition and conformation of proteins were identified in regions $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ and $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$. Additionally, we succeeded in distinguishing of young healthy patients from older patients in DCDR spectra. In this work were checked up, that DCDR is good diagnostic method for clinical practices for determining neurodegenerative diseases through the complex analysis of CSF.

Keywords: multiple sclerosis, Alzheimer disease, drop coating deposition Raman spectroscopy, vibrational spectroscopy, cerebrospinal fluid

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Neurodegenerativní choroby centrálního nervového systému	1
1.1.1	Roztroušená skleróza	1
1.1.2	Alzheimerova nemoc	3
1.1.3	Mozkomíšní mok	3
1.2	Užití vibrační spektroskopie v medicíně	4
1.2.1	Vibrační spektroskopie tkání	5
1.2.2	Vibrační spektroskopie tělních tekutin	7
1.2.3	Vibrační spektroskopie ve výzkumu Alzheimerovy nemoci a roztroušené sklerózy	10
1.3	Ramanova spektroskopie	11
1.3.1	Klasická teorie Ramanova rozptylu	12
1.3.2	Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků	15
1.4	Využití DCDR	18
2	Materiály a metody	23
2.1	Použité matematické metody	23
2.1.1	Analýza hlavních komponent (PCA)	23
2.1.2	Shluková analýza (CA)	25
2.1.3	Savitzkého-Golayův filtr	27
2.2	Experimentální technika Ramanovy spektroskopie	27
2.3	Vzorky	28
2.4	Příprava vzorků	29
2.5	Měření a zpracování spekter	30
2.5.1	<i>Spikie</i> – program na odečítání pásů kosmického záření	36
3	Výsledky měření	41
3.1	Optimalizace použití dialýzy	41
3.2	Vybělování vzorků	51
3.3	Reprodukovatelnost měření	53
3.4	Optimalizace skladování vzorků	67
3.5	Optimalizace rozteče a velikosti spektrální mapy	76
3.6	Prověření degradace vzorků	79
3.7	Některé komponenty mozkomíšního moku	86
3.8	Vývoj nové diagnostické metody	93
3.8.1	Diagnóza pacientů trpících roztroušenou sklerózou	93
3.8.2	Diagnóza pacientů trpících Alzheimerovou nemocí	97
3.8.3	Rozlišení věku a diagnózy všech pacientů	106

4	Diskuze	111
5	Závěr	115
	Literatura	117
	Seznam zkratek	127
	Seznam tabulek	129
	Přílohy	131

Kapitola 1

Úvod

1.1 Neurodegenerativní choroby centrálního nervového systému

Neurodegenerativní choroby jsou onemocnění, při kterých zanikají některé populace nervových buněk. Neurochemický mechanismus, který stojí v pozadí těchto chorob, není často ještě zcela pochopen, s čímž souvisí i jejich obtížná léčitelnost. Podmínkou úspěšné léčby je včasná diagnóza těchto chorob a proto se tato práce zabývá vývojem nové diagnostické metody pro neurodegenerativní choroby centrálního nervového systému (CNS). Metoda byla vyvíjena a ověřována na vzorcích pacientů s roztroušenou sklerózou. Obecnost metody byla poté také zkoumána i na druhé, menší skupině pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (AD – z angl. Alzheimer disease).

1.1.1 Roztroušená skleróza

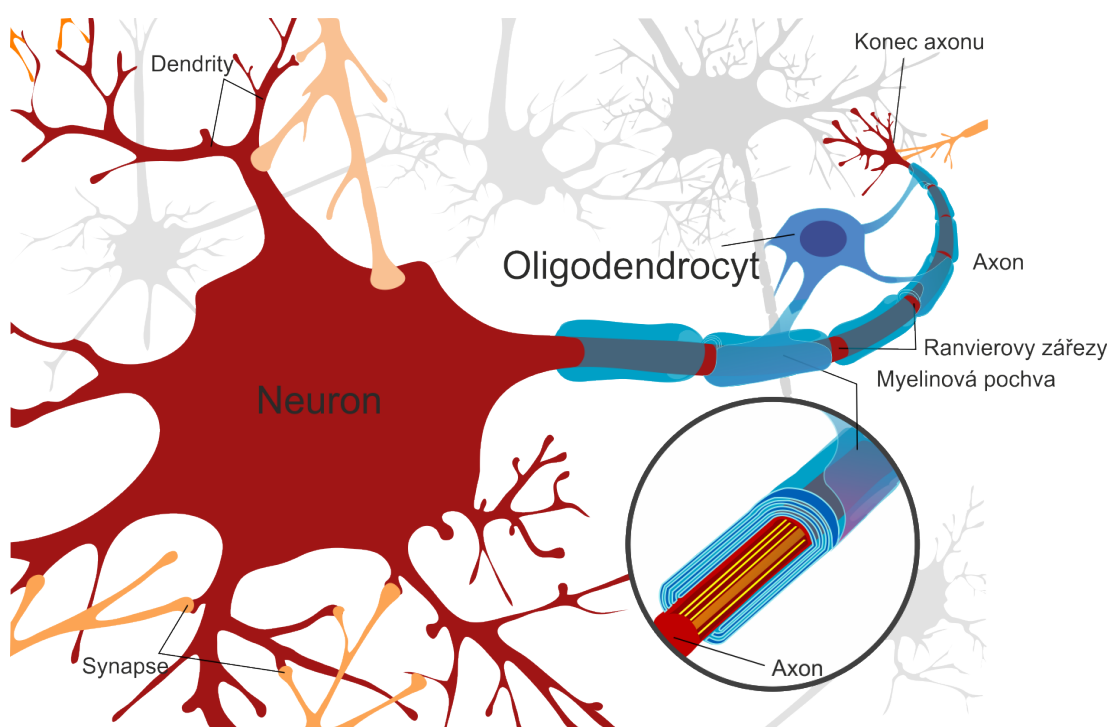
Roztroušená skleróza (RS) je chronické neurologické autoimunitní onemocnění CNS, které je jak zánětlivé, tak i neurodegenerativní povahy. Řadíme ji mezi demyelinizační onemocnění, protože při ní dochází k destrukci myelinových obalů axonů. Již v časných stádiích choroby také dochází k přerušení samotného axonu, a tím k trvalému zániku postiženého nervového spojení. V napadených oblastech CNS, které mohou být roztroušeny na různých místech, vznikají zánětlivá ložiska o velikosti v průměru mezi půl a jedním cm [Bartoš a Piřha, 2004]. Po odeznění zánětu se často na jejich místě rychle tvoří gliová jizva, která je pevnější konzistence než okolní tkáň. Odtud také plyne název skleróza (z řeckého *skleros*, což znamená tvrdý).

Klinické příznaky RS jsou různé v závislosti na tom, v jaké části CNS vzplanul zánět. U některých pacientů dokonce může mít choroba tzv. benigní průběh, kdy se klinická symptomatika nemusí projevit vůbec nebo jen velmi nespecificky, protože zánět postihl méně důležité části mozku. V 85 % případů se však onemocnění manifestuje formou atak. Příznaky nemoci se při nich většinou rozvinou během několika dní a po určitém období stabilizace postupně odeznívají, ať již zcela nebo pouze částečně s určitým trvalým deficitem. Mezi atakami je klidové období (remise). Časem onemocnění přechází do fáze sekundární chronické progresy, při které pomalu postupuje neurologická invalidita v důsledku vyčerpání axonálních

rezerv. Zbýlých 15 % pacientů má pozvolný nárůst neurologické invalidity již od počátku (tzv. primární progresse) [Havrdová, 2008].

RS nejčastěji postihuje pacienty ve věku 20–40 let, přičemž ženy jsou postiženy v průměru 2–3krát častěji než muži [Bartoš a Pítha, 2004]. Poměrně pravděpodobná je genetická predispozice pro vznik choroby, protože u některých etnických skupin se choroba nevyskytuje (např. eskymáci, Laptěvové, Maurské obyvatelstvo Malty) [Havrdová, 2008]. V ČR činil výskyt v roce 2008 kolem jednoho nemocného na tisíc obyvatel, čímž se řadí RS mezi nejčastější příčiny invalidity mladých v naší republice [Havrdová, 2008].

Z etiopatogenetického hlediska je RS poruchou imunitního systému, kdy se naruší schopnost organismu chránit vlastní zdravé neuronální struktury (například oligodendrocyty¹ – viz *Obr. 1.1*) před imunitní reakcí, které tím pádem začnou být vnímány jako cizorodé a spustí se kaskáda dějů imunitní odpovědi vedoucí k poškození CNS.



Obr. 1.1: Obrázek neuronu s oligodendrocytem tvořícím myelinovou pochvu, která je spolu s axonem při roztroušené skleróze napadena imunitním systémem (obrázek byl vytvořen na základě obrázků z wikipedie) [Wikipedia, 1. 1. 2011].

Na výše uvedených faktech je také založena současná diagnóza, která by měla prokázat roztroušené záněty v CNS autoimunitní povahy. Klíčové je zjištění klinických příznaků typických pro RS. Roztroušená ložiska poškození v CNS se prokazují pomocí magnetické rezonance mozku a míchy. Vyšetření mozkomíšního moku (CSF – z angl. cerebrospinal fluid) slouží k odhalení autoimunitních pochodů v oblasti CNS. Je v něm třeba nalézt alespoň dva oligoklonální pásy, které nejsou přítomny v krevním séru. Oligoklonální pásy jsou proužky tvořené imunoglobuliny IgG vzniklé při izoelektrické fokusaci krevního séra nebo mozkomíšního moku. Přítomnost některých těchto pásů pouze v CSF indikuje tvorbu imunoglobulinů

¹Oligodendrocyty jsou buňky, které tvoří myelinovou pochvu (viz *Obr. 1.1*), která velmi zrychluje přenos vzruchu po axonu.

lokálně v CNS. V současnosti je tedy za pomoci těchto metod možná poměrně včasná diagnóza nutná k brzkému zahájení terapie.

1.1.2 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc je chronické neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k postupnému poklesu rozumových schopností. AD je chorobou hlavně starší populace², proto se vlivem stárnutí obyvatelstva³ její výskyt stále zvyšuje. Již dnes je AD pátou nejčastější příčinou úmrtí u osob starších 65 let [Bartoš a Hasalíková, 2010].

Z neurochemického hlediska je AD charakterizována patologickým ukládáním amyloidu β ($A\beta$) a τ -proteinu. $A\beta$ je peptid obvykle o 38–42 aminokyselinách, který je produkován proteolytickým štěpením proteinu ne zcela známé funkce s názvem amyloid precursor protein [Welzel a Walsh, 2011]. Při AD dochází k nadprodukci $A\beta$ a jeho agregaci v extracelulárním prostoru. Jakmile jeho množství dosáhne určité koncentrace, dojde k dramatické změně jeho struktury na strukturu bohatou na β -skládané listy. Ta se snadno shlukuje do amyloidních fibril, které pak tvoří amyloidní plaky [Ohnishi a Takano, 2004]. K tvorbě plaků je nejvíce náchylný $A\beta$ o 42 aminokyselinách ($A\beta_{42}$) [Yin et al., 2007].

Uvnitř buněk dochází k hyperfosforylaci τ -proteinů. Za normálního stavu τ -proteiny stabilizují mikrotubuly, ale hyperfosforylované agregují a vytvářejí neurofibrilární smotky, což vede k degradaci cytoskeletu [Hernandez a Avila, 2007]. Výše zmíněné odchylky pak aktivují neurotoxické dráhy, které způsobují dysfunkci a zánik neuronů.

Tyto změny zkoumají některé diagnostické metody, které jsou založené na určování koncentrací neurochemických ukazatelů v CSF. Typická je nízká koncentrace $A\beta_{42}$ v důsledku jeho agregace a vysoká koncentrace jak hyperfosforylovaného tak celkového τ -proteinu [Burger et al., 2006, Clark et al., 2003, Tapiola et al., 2009]. Rovněž je možné určovat koncentrace $A\beta$ oligomerů [Fukumoto et al., 2010]. Tyto diagnostické metody však trpí tím, že zatím nebyla zcela objasněna neurochemická podstata AD. Schází také jednotný protokol nakládání se vzorky. Proto se hodnoty z různých laboratoří liší i o 20–30 % [Mattsson et al., 2010]. Dále se k diagnóze používají různé metody funkčního a strukturálního zobrazení mozku [Forlenza et al., 2010]. Poslední skupinou diagnostických metod AD je sledování klinických příznaků za pomoci různých psychologických testů [Bartoš a Hasalíková, 2010].

I přes alarmující nárůst výskytu nebývá AD často rozpoznána nebo je diagnostikována v pozdních fázích [Bartoš a Hasalíková, 2010]. Časná diagnóza by mohla vést k brzkému zahájení léčby a tak oddálit závažná stadia choroby.

1.1.3 Mozkomíšní mok

Centrální nervovou soustavu obklopuje čirá a bezbarvá tělní tekutina, která se nazývá mozkomíšní mok (CSF). CSF se od pacientů získává lumbální punkcí. Objem CSF dospělého jedince je 150–180 ml, přičemž jeho denní produkce je

²pravděpodobnost výskytu demence, jejíž nejčastější formou je Alzheimerova nemoc, je ve věku 63 let 0,7 % a každých 5 let se zdvojnásobuje [Bartoš a Hasalíková, 2010]

³v roce 1989 byl průměrný věk v České republice 36,1 roku, v roce 2009 již 40,6 [Český statistický úřad, 1. 1. 2011]

složka	(mg/l)	citace
Na ⁺	3500	[Masopust, 1. 1. 2011]
K ⁺	110	[Masopust, 1. 1. 2011]
Cl ⁻	4300	[Racek, 1999]
Ca	50	[Masopust, 1. 1. 2011]
HCO ₃ ²⁻	1300	[Masopust, 1. 1. 2011]
fosfát (anorg.)	50	[Masopust, 1. 1. 2011]
Mg	27	[Masopust, 1. 1. 2011]
Cu	0,016	[Masopust, 1. 1. 2011]
Fe	0,045	[Masopust, 1. 1. 2011]
glukóza	450–700	[Racek, 1999]
laktát	100–200	[Racek, 1999]
močovina	250	[Masopust, 1. 1. 2011]
celkový protein	150–400	[Racek, 1999]
prealbumin	17,3	[Masopust, 1. 1. 2011]
albumin	155	[Masopust, 1. 1. 2011]
IgG	17,6	[Masopust, 1. 1. 2011]
IgA	1,9	[Masopust, 1. 1. 2011]

Tabulka 1.1: Složení mozkomíšního moku

500–600 ml. Kromě vody (99 %) obsahuje také bílkoviny, ionty a další molekuly. Podrobnější složení mozkomíšního moku je uvedeno v *Tab. 1.1*. Protože je CSF v těsném kontaktu s mozkovou tkání, mohl by být ideálním zdrojem neurochemických ukazatelů neurodegenerativních chorob [Reiber, 2001]. Pro jeho výzkum je však nutné zvolit vhodnou metodu, kterou by mohla být například vibrační spektroskopie, vzhledem k jejímu současnému velkému rozvoji ve zkoumání nových diagnostických metod v medicíně [Diem et al., 2008, Lash a Kneipp, 2008] .

1.2 Užití vibrační spektroskopie v medicíně

Vibrační spektroskopie, ke kterým patří spektroskopie Ramanova a infračervená absorpční spektroskopie, jsou založené na zkoumání vibračních stavů molekul. I při malých změnách ve složení a koncentraci molekul, které jsou způsobeny nemocí či obecně patologickým stavem, můžeme získat otisk těchto změn ve vibračních spektrech. Navíc je vibrační spektroskopie spolu s nukleární magnetickou rezonancí metodou nedestruktivní, což jí jako diagnostické metodě uděluje velký potenciál v medicínských aplikacích [Schrader et al., 1999]. Tento přístup však má i svá úskalí.

Hlavní nevýhodou infračervené absorpční spektroskopie v medicínské aplikaci je silná absorpce infračerveného záření vodou, pro kterou je velmi obtížné získat požadovanou informaci bez vysušení vzorku. Zkoumání vodných roztoků pomocí infračervené spektroskopie se proto často provádí za použití velmi tenkých kyvet nebo pomocí zeslabeného úplného odrazu (ATR - attenuated total reflectance), kdy se využije absorpce evanescentní vlny v roztoku vznikající při úplném odrazu, která penetruje do vzorku pouze v řádu desetin až jednotek mikrometrů [Petrich, 2001]. Dále lze také použít absorpční spektroskopie v blízké infračervené oblasti

(NIR - z angl. near infrared), kde má voda řádově menší absorpční koeficient nebo je možné nechat vzorek vyschnout na nějakém substrátu a měřit poté spektra z vyschlého filmu pomocí spektroskopie ve střední infračervené oblasti.

Ramanova spektroskopie naopak trpí jiným nedostatkem. Kvantový výtěžek Ramanova jevu je totiž o 6–10 řádů nižší než je tomu u fluorescence, takže jsou často Ramanova spektra při excitaci ve viditelné oblasti zatížena velmi silným fluorescenčním pozadím. Tento problém lze vyřešit například použitím excitačního záření v blízké infračervené oblasti, kdy energie záření již není dost velká na to, aby ve vzorku vybudila fluorescenci [Hirschfeld a Chase, 1986]. Další možností je použít rezonančního zesílení Ramanova jevu při excitaci UV zářením o vlnové délce kratší než 270 nm, přičemž například rezonance s aminokyselinami s postranním aromatickým řetězcem lze dosáhnout zářením o excitaci 229 nm, pro nukleové kyseliny je třeba použít 257 nm [Ramser et al., 2004] nebo použití povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS - z angl. surface enhanced Raman spectroscopy). Proto není divu, že vibrační spektroskopie již začíná pronikat do vývoje nových diagnostických metod.

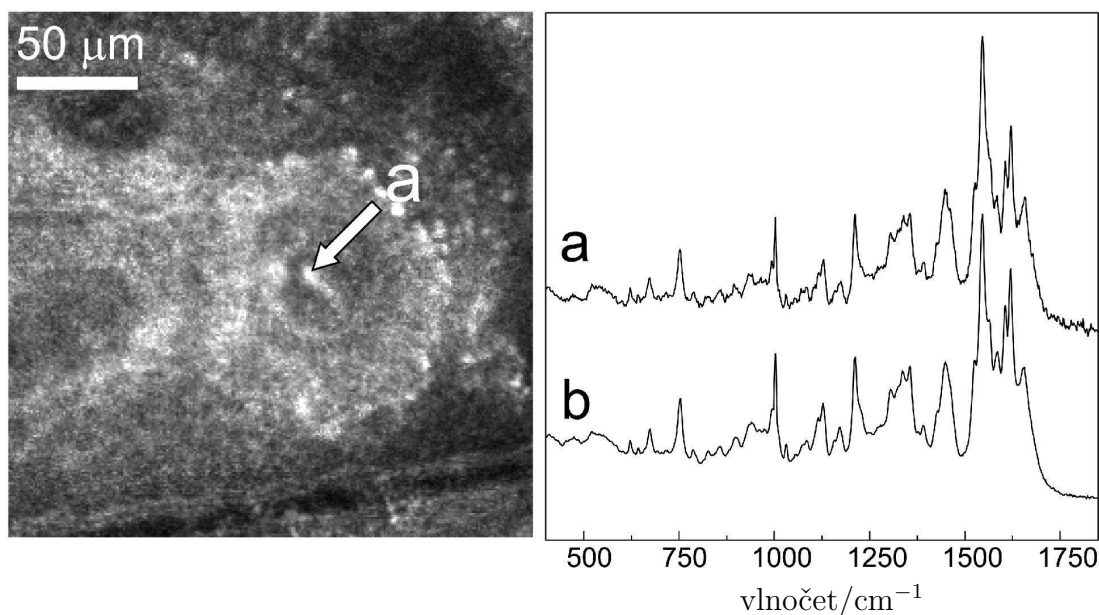
1.2.1 Vibrační spektroskopie tkání

Jednou z oblastí biomedicínského využití vibrační spektroskopie je výzkum tkání. Ramanova spektroskopie tkání většinou využívá vlnových délek v blízké infračervené oblasti. Výhodou tohoto přístupu je skutečnost, že takovéto záření proniká do hloubky až několika milimetrů, čehož se využívá například ve výzkumu pokožky. Caspers et al. (2001) tak zkoumali hloubkový profil obsahu vody v krajních vrstvách pokožky, na což navázali v další práci [Caspers et al., 2003] získáním Ramanova spektra ze středu kožní kapiláry, které bylo velmi podobné spektru krve *in vitro* Obr. 1.2. Dále se výzkumu kůže, konkrétně složení jejích nejkrajnějších vrstev, jak pomocí Ramanovy tak infračervené absorpční spektroskopie zabývali ve své práci Greve et al. (2008). Kromě rozlišení různých vrstev pokožky se jim také podařilo identifikovat rozdíly lidské a prasečí kůže a kůže ženské a mužské.

Dále je pak velké úsilí směřováno na výzkum rakoviny Ramanovou i infračervenou spektroskopii, konkrétně rakoviny kůže [Fendel a Schrader, 1998, Gniadecka et al., 1997, Patil et al., 2011], děložního čípku [Sharma et al., 2010], prsu [Moreno et al., 2010], plic [Lee et al., 2009], žaludku [Teh et al., 2009], prostaty [Baker et al., 2009], hlavy a krku [Conti et al., 2009], úst [Krishnakumar et al., 2008] a dalších.

In vivo měření Ramanových spekter rakovinných tkání a jejich rozlišení od tkání zdravých je možné také za pomoci sondy s optickými vlákny. Utzinger et al. (2001) takovou sondou změřili *in vivo* spektra normální tkáně děložního čípku, tkáně s metaplazií a různými stupni dysplazie, tedy předrakovinnými stavy rakoviny děložního krčku, což je jeden z nejvíce zkoumaných typů rakovin [Krafft a Sergo, 2006].

Vibrační spektroskopie se využívá také na zobrazování tkání. Spektra jsou postupně naměřena z celé zkoumané tkáně pomocí mikroskopu, který navíc může být konfokální nebo s FPA (focal plane array) v případě infračervené absorpční spektroskopie. Poté jsou spektra zpracována analýzou hlavních komponent (PCA – z angl. principal component analysis) nebo shlukovou analýzou (CA – z angl. cluster analysis), která rozdělí spektra do několika skupin s charakteristickými



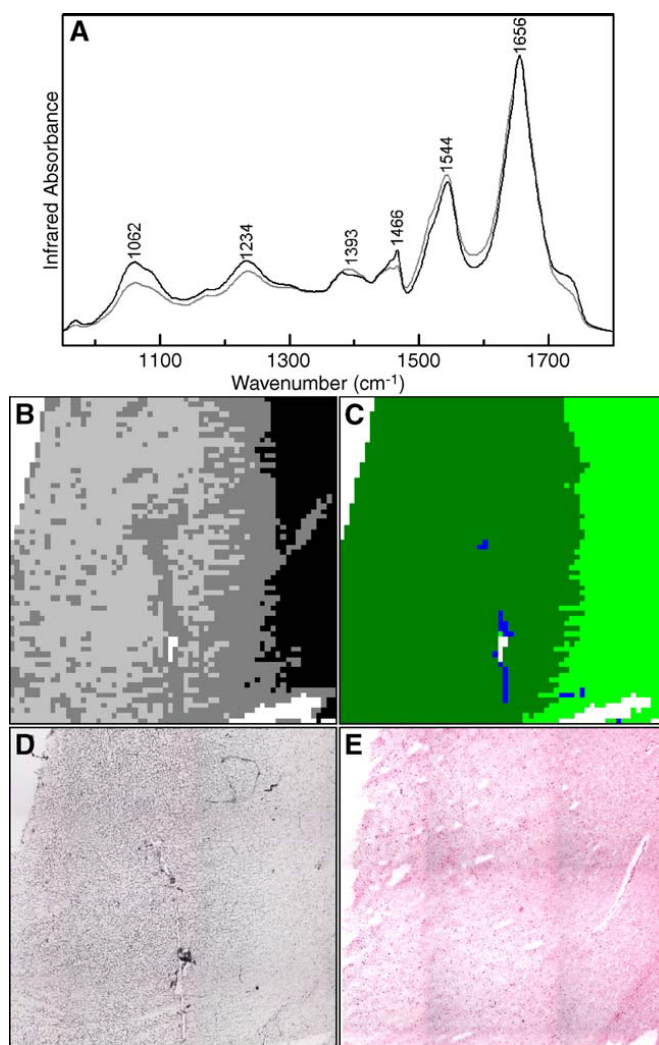
Obrázek 1.2: *In vivo* konfokální obrázek a Ramanovo spektrum kožní kapiláry v hloubce 60 μm pod povrchem. Šipka v místě **a** ukazuje pozici, ze které bylo získáno Ramanovo spektrum. Graf (a) představuje *in vivo* Ramanovo spektrum měřené z bodu (a) s akumulacním časem 30 s, graf (b) uvádí spektrum změřené *in vitro* [Caspers et al., 2003].

znaky. Přiřazením barvy těmto skupinám pak vznikne Ramanův obraz tkáně v nepravých barvách Obr. 1.3 [Zhang et al., 2008].

Banerjee a Zhang (2007) takto rozlišili spektrum mozkové buňky astrocytu a astrocytomu, což je rakovinná buňka odvozená z astrocytu, která z velké části tvoří mozkové nádory. Ramanovo spektrum astrocytomu bylo podobné spektru zdravé buňky, ale mělo výrazně vyšší intenzitu.

Krafft et al. (2006) zkoumali zobrazováním pomocí infračervené mikrospektroskopie původ sekundárních nádorových buněk. Kontrolní vzorky zdravé mozkové tkáně získali *post mortem* během autopsie, nádorové vzorky získali od pacientů, kteří podstoupili operaci mozku. Pro zpracování změřených spekter použili CA a SIMCA (soft independent modeling of class analogies) algoritmus. CA provádějí za použití euklidovské míry a metody mnohonásobného rozptylu (multiplicative scattering method), při které se náhodně zvolí středy fixního počtu shluků, naleznou se všechna spektra, která k jednotlivým shlukům náleží, a spočítají se nová těžiště shluků. Tento proces se opakuje dokud nejsou spektrální diference spekter ve shluku minimální. Metodu SIMCA autoři použili na spektra zpracovaná PCA. Tato metoda totiž umí na základě vybraného počtu hlavních komponent najít jejich souvislost s předem známým přiřazením nádorových tkání ke tkáním jejich původu.

Vibrační spektroskopie se používá i na výzkum mineralizovaných tkání. Zkoumají se změny v lokálním složení kostí, vývoji lebky v prenatálním a postnatálním věku [Tarnowski et al., 2002], nemoci kostí, jako je kraniosynostóza [Tarnowski et al., 2004] nebo renální osteodystrofie [Isaksson et al., 2010] nebo možnosti měření spekter neinvazivně přes kůži sondou s optickými vlákny za účelem odhalení osteoporózy [Matousek et al., 2006].



Obrázek 1.3: Zobrazování metastáze plicní rakoviny LC1 v mozku pomocí infračervené absorpční spektroskopie. V části (A) jsou průměrná infračervená absorpční spektra světlešedého shluku a černého shluku, které jsou zobrazeny v části (B) a které vznikly za použití shlukové analýzy infračervených absorpčních spekter mozkové tkáně. Část (C) ukazuje to samé rozdělení, tentokrát však za pomoci modelu SIMCA, přičemž šedá hmota mozková je tmavě zelená, světlá hmota mozková světle zelená a rakovina plic je modrá. Fotomikrograf neobarvené kryosekce je v části (D) a odpovídající H&E obarvená hematoxilinem a eosinem tkáň v části (E). [Krafft et al., 2006].

1.2.2 Vibrační spektroskopie tělních tekutin

Tělní tekutiny v sobě často odrážejí různé patologické stavy. K jejich výzkumu můžeme přistupovat dvěma odlišnými způsoby. Buď v nich můžeme hledat jednotlivé chemické ukazatele nemocí, nebo můžeme zvolit přístup diagnostický, kdy se pokoušíme identifikovat celkové změny v tělní tekutině. V obou přístupech lze s úspěchem aplikovat vibrační spektroskopii. Předem však musíme mít k dispozici skupinu dobře určených vzorků o známé koncentraci analytů nebo o známé diagnóze, ze kterých poté vychází predikční schopnost dané vibračně-spektroskopické metody.

Určování koncentrací chemických ukazatelů nemocí je dnes možné pomocí řady biochemických metod, které jsou však často poměrně zdlouhavé a nákladné. V tomto ohledu jim může být vibrační spektroskopie dobrým konkurentem, protože je značně levnější, poměrně rychlá a z jednoho spektra lze analyzovat velké množství

látek najednou. Podstatou těchto metod je určit závislost známých koncentrací analytů ve zkušebních vzorcích na jejich vibračních spektrech, přičemž nejčastěji se k tomuto účelu používá regrese částečných nejmenších čtverců (PLS - z angl. partial least squares). Nedostatkem vibrační spektroskopie při určování koncentrace analytu je většinou její menší přesnost než mají biochemické metody.

Pomocí infračervené absorpční spektroskopie lze tedy určovat například koncentrace glukózy [Arnold a Small, 1990], proteinů a triglyceridů [Hall a Pollard, 1992], močoviny [Heise et al., 1994], albuminu [Petrich, 2001], LDL a HDL cholesterolu [Liu et al., 2002] a apolipoproteinu B [Liu et al., 2007] v krevním séru. Dále pak také byla zkoumána koncentrace glukózy ve spektrech celé krve s cílem vyvinout metodu schopnou detekce diabetes jak *in vivo* [Kim et al., 2003, Shen et al., 2003] tak *ex vivo* [Low-Ying et al., 2002]. Sakudo et al. (2005) určili koncentraci HIV1 v krevním séru v dobré shodě s vyšetřením ELISA (enzyme linked imuno sorbent assay).

Také Ramanovou spektroskopií lze zkoumat koncentrace různých látek v krvi, konkrétně Rohleder et al. (2004) určili koncentrace glukózy, triglyceridů, močoviny, celkového proteinu, cholesterolu, HDL, LDL a kyseliny močové v krevním séru s přesností kolem 12 % na koncentracích, které jsou apkeptovatelné pro mnoho medicínských aplikací, přičemž pokud použili ultrafiltrát, přesnost se u glukózy a močoviny ještě dvakrát zvětšila. Oproti tomu Ramanova spektroskopie plné krve je značně obtížná, protože krev obsahuje fluorofory, jejichž spektrum překrývá spektrum Ramanovo, hemoglobin, který absorbuje světlo a tím se krev zahřívá, což vyvolává lokální změny ve složení, a krevní buňky, na jejichž povrchu dochází k Miovu rozptylu [Rohleder a Petrich, 2008]. Proto na plnou krev Berger et al. (1997) použili NIR Ramanovu spektroskopii a určili v ní s přesností řádově stejnou jako přesnost metod používaných v medicíně koncentrace glukózy a hydrogenuhličitanu. Dále pak byla tato metoda rozvinuta na určení dalších složek krve v krevní plazmě i celé krvi [Berger et al., 1999] a za pomoci optického vlákna také na určení koncentrací v krevní plazmě a moči [Qi a Berger, 2007].

V moči se nejčastěji určuje koncentrace kreatininu a celkového proteinu, které slouží k prověření funkce ledvin, přičemž koncentraci kreatinu lze pomocí infračervené spektroskopie detekovat jak ve vyschlém filmu moči [Shaw et al., 1996], tak v kapalně formě [Shaw et al., 2000]. Dále se také infračervená spektroskopie hodí na určování koncentrace močoviny [Shaw et al., 1996, 2000], kyseliny močové, sulfátu a fosfátu [Heise et al., 2001].

Ramanův signál moči je při excitaci o vlnových délkách viditelného světla překryt fluorescencí, a proto Dou et al. (1996) použili na určování koncentrace glukózy, acetonu, močoviny a kreatinu, uměle přidaných do moči, laser o vlnové délce v infračervené oblasti. V pozdější práci [Dou et al., 1997a] byla pro změnu spektra měřena na anti-Stokesově větvi Ramanova rozptylu, kterou fluorescence nepřekrývá. Na základě svých měření také použili přístroj bez spektrometru, který měřil intenzitu rozptýleného záření pouze v úzké oblasti vybrané filtrem [Dou et al., 1997b]. Ve všech případech byli schopni detekovat vyšší fyziologické koncentrace. Park et al. (2007) použili k měření koncentrace glukózy v moči přenosný Ramanovský spektrometr s nízkým rozlišením, aby tak přiblížili tuto metodu použití mimo laboratoř, například přímo v toaletní míse. Pro tento účel moč desetkrát zředili a poté měřili koncentrace uměle přidané glukózy.

Moč lze také zkoumat pomocí povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS). Například Farquharson et al. (2000) zkoumali koncentraci kreatinu a kyseliny močové v SERS spektrech na speciálním sol-gelu s obsahem stříbra. Trachta et al. (2004) zase spojili SERS s kapalinovou chromatografií, čímž detekovali v jednotlivých složkách krve a moči psychofarmaka, takže by tato metoda mohla plnit funkci druhého nezávislého testu při identifikaci požití nelegálních látek.

V Ramanově spektru moči lze také zjistit přítomnost efedrinu [Guimaraes et al., 2006], z čehož plyne, že by Ramanova spektroskopie mohla být alternativou k časově náročným dopingovým kontrolám.

Dále lze také pomocí infračervené vibrační spektroskopie určovat koncentrační poměry lecitin/sfingomyelin a surfaktant/albumin v plodové vodě, s jejichž pomocí lze diagnostikovat respirační selhání nezralých novorozenců (IRDS - z angl. infant respiratory distress syndrome) [Liu et al., 1998, 2000] a koncentrace glukózy a laktátu, které jsou považovány za ukazatele infekce a fetální hypoxie [Liu a Mantsch, 1999].

Ve slinách se dají detekovat podané látky a na rozdíl od krevní plazmy je získávání vzorků rychlé a neinvazivní s nižším rizikem infekce [Choo a Huestis, 2004]. Také Farquharson et al. (2005) v SERS spektrech slin dobře detekovali uměle přidaný 5-fluorouracil, což by mohlo být využito při úpravě dávkování léků.

Zajímavou aplikací je pokus zkoumat koncentraci glukózy nepřímo v oční komorové vodě. Lambert et al. (2005) ukázali, že i přestože se použije výkon laserového svazku, který nepoškozuje sítnici a nepřekračuje bezpečnostní limit, je Ramanův signál dostatečný k určení koncentrace glukózy. V této oblasti však bude ještě třeba zjistit vztah mezi koncentrací glukózy v krvi a v komorové vodě.

Výše zmíněné metody jsou limitovány souvislostí měřených biochemických ukazatelů s diagnostikovanými chorobami. Tento problém řeší druhý přístup, který si klade za cíl diagnostikovat patologický stav z celkového obrazu vzorku a který je možný pouze pomocí vibrační spektroskopie. Pokud se toto podaří, může být další snahou identifikovat průvodní biochemické znaky, což následně může vést k lepšímu pochopení dějů stojících za patologickým stavem. Vývoj vibračně spektroskopických diagnostických metod je často možný pouze s použitím vícerozměrných statistických metod nebo neuronových sítí (ANN - z angl. artificial neuronal network).

Jedním z použití tohoto přístupu může být například vyšetření synoviální tekutiny, protože klasické metody při jejím zkoumání měly přes velké očekávání poměrně omezený výstup, a proto velká většina z asi 100 druhů artritidy nemůže být vyšetřena pomocí rutinního testu synoviální tekutiny. Shaw et al. (1995) a Eysel et al. (1997) ukázali, že lze rozlišit několik základních typů artritidy s lepší, než 90% přesností. Je zajímavé si povšimnout, že druhá z prací [Eysel et al., 1997] identifikovala jako pro diagnózu vhodný region vlnočtovou oblast $2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$. Pozdější studie pomocí infračervené absorpční spektroskopie [Shaw a Mantsch, 2000, Shaw et al., 1998] i Ramanova rozptylu [Koljenovic et al., 2005] ukázaly, že přestože tento region většinou není považován jako část spektra obsahující takzvaný otisk prstu, je tato oblast velmi informačně bohatá a vhodná pro analytické a diagnostické účely.

Další aplikací infračervené vibrační spektroskopie jako diagnostické metody je vyšetření krevního séra. Například Staib et al. (2001) pod vlivem úspěchů výzkumu synoviální tekutiny použili nové metody „genetic algorithm optimal

region selection“ [Nikulín et al., 1998] k identifikaci 8 významných pásů, na jejichž integrální intezity následně použili diskriminační analýzy k diagnóze revmatoidní artritidy v krevním séru a dosáhli tak na vzorku 94 nemocných a 97 zdravých pacientů přesnosti přes 80 %.

Velmi atraktivní cíl také tvoří diagnóza cukrovky z krevního séra a otázka, zdali dosáhne diagnostická metoda zkoumající celkový obraz séra lepších výsledků, než zkoumání koncentrací glukózy a jiných biochemických ukazatelů této choroby. Petrich et al. (2002) byli schopni rozlišit zdravé pacienty a pacienty trpících cukrovkou 1. typu na vzorku 40 zdravých a 40 nemocných se senzitivitou 80 % a specificitou 86 %. Podobné úspěšnosti dosáhli i při diagnóze cukrovky 2. typu a navíc dosáhli 71% senzitivity a 79% specificity v rozlišení těchto dvou chorob mezi sebou.

Dále je pak zajímavá práce [Liu et al., 2003], která se zabývá rozlišením pacientů s β -thalassemií, což je nemoc související s poruchou hemoglobinu. Bylo v ní použito Wardovy metody CA s euklidovskou mírou a lineární diskriminační analýzy na skupinu 56 nemocných a 35 zdravých, přičemž bylo velmi překvapující, že dostali poměrně dobré výsledky na základě pouze jediného pásu SH vibrací na frekvenci kolem 2553 cm^{-1} . Backhaus et al. (2010) použili CA a ANN k identifikaci 97 pacientek s rakovinou prsu od 96 pacientek zdravých s 95% specificitou a 98% senzitivitou.

Pro změnu Ramanovu spektroskopii použili Pichardo-Molina et al. (2007) na rozlišení pacientek s rakovinou prsu za pomoci PCA a lineární diskriminační analýzou na skupině 11 nemocných a 12 zdravých se senzitivitou 97 % a specificitou 78 %. Saade et al. (2008) zase použili NIR Ramanovu spektroskopii na rozlišení 10 pacientů trpících žloutenkou typu C od 14 zdravých pacientů ze vzorků krevního séra. K rozlišení použili diskriminační analýzy s Mahanobisovou mírou a PCA. Takto dosáhli senzitivity 88 % a specificity 92 %.

Dalším zajímavým použitím CA a ANN je práce Ahmed et al. (2010) zabývající se výzkumem Parkinsonovy nemoci. Podařilo se jim v infračervených absorpčních spektrech identifikovat důležité pásy 689, 1078, 1169, 1244, 1542, 2953, 2930, 3060, 3293 a 3296 cm^{-1} , jejichž intezity pak spolu s věkem, pohlavím a stádiem nemoci vložili do ANN, čímž získali pro různá stádia nemoci specificitu i senzitivitu větší než 90 %.

Povrchem zesílená Ramanova spektra použili Kah et al. (2007) na diagnózu Rakoviny úst ze slin.

1.2.3 Vibrační spektroskopie ve výzkumu Alzheimerovy nemoci a roztroušené sklerózy

Vibrační spektroskopie již také okrajově pronikla do výzkumu RS a AD. LeVine a Wetzel (1998) zkoumali odlišnosti pěti vzorků zdravé mozkové tkáně od mozkové tkáně získané od pěti pacientů trpících RS pomocí infračervené mikroskopie. Pro každý vzorek proměřili spektroskopickou mapu, která se skládala ze 17 spekter získaných z bodů umístěných na přímce a vzdálených od sebe $200\text{ }\mu\text{m}$. Podařilo se jim identifikovat význačné pásy, konkrétně u spekter s RS byl poměr pásů 2923 a $3293, 1468\text{ a }1544\text{ cm}^{-1}$, $1740\text{ a }1544\text{ cm}^{-1}$, $1468\text{ a }1740\text{ cm}^{-1}$ nižší, přičemž pás 1468 cm^{-1} náleží CH_2 vibracím a 1740 cm^{-1} karbonylovým vibracím. Z uvedených

poměru výšky pásů tedy lze usuzovat na štěpení a oxidaci lipidů v nemocné tkáni, přičemž štěpné procesy převažují.

Griebe et al. (2007) měřili infračervená absorpční spektra CSF 71 pacientů s AD a srovnávali je se spektry 66 zdravých pacientů. Nemocní byli ve věku 54–78 let, přičemž průměrný věk byl 64,8 roku, zdraví se věkově pohybovali mezi 17 a 83 roky s průměrným věkem 48 let. Autoři ve studii však tvrdí, že věk nebyl nijak korelovaný s koncentracemi A β a τ -proteinu z čehož usuzují na věkovou nezávislost spekter. Změřená spektra vyhladili a spočetli jejich druhou druhou derivaci pomocí Savitzkého-Golayova filtru braného přes pět bodů. Poté vizuálně identifikovali dva významné regiony – region 3100–2700 cm⁻¹, který považovali za oblast C–H valenčních vibrací reprezentujících vibrace lipidů a oblast 1300–900 cm⁻¹, kterou přiřadili C–O, C–O–P a P=O vibracím. Na vytipované regiony aplikovali analýzu pomocí ANN, čímž dosáhli 88,5% sensitivity a 80% specificity. Vykreslením všech spekter do jednoho grafu odhalili nejvíce signifikantní diagnostický pás na 2873 cm⁻¹.

Další výzkum směřoval k diagnóze AD pomocí infračervené spektroskopie z krevního séra [Peuchant et al., 2008]. K tomu byly získány vzorky od 25 pacientů s AD a 76 zdravých kontrolních pacientů. Všichni kontrolní i nemocní pacienti byli starší 65 let a prošli velmi pečlivým výběrem, přičemž byli ze studie vyřazováni ti, kteří měli příznaky Parkinsonovy nemoci, cukrovky, zánětu nebo zánětlivého onemocnění v posledních dvou měsících před odběrem vzorků. Navíc žádný z nich nežíval žádné léky. Spektra byla získávána z vysušených vzorků a poté jejich první derivace zpracována CA Wardovou metodou s euklidovskou mírou na intervalu 1480–910 cm⁻¹, která vzorky rozdělila s úspěšností 98,4% na tři hlavní skupiny, skupinu nemocných, k ní příbuznou skupinu zdravých a vzdálenou skupinu zdravých. K dalšímu prozkoumání náleží, zdali jsou tyto výsledky přenositelné na populaci pacientů, kteří nevyhovují tvrdým kritériím této studie.

Burns et al. (2009) se pro změnu pokusili použít na rozlišení zdravých pacientů od pacientů trpících AD přenosný spektrometr v blízké infračervené oblasti s mřížkovým spektrografem, fotodiodovým detektorem s velkým rozsahem a vzorkovou celou na malé objemy připojenou přes optické vlákno, který analyzoval oblast 700–1050 cm⁻¹. Na vzorku 19 pacientů trpících AD, 27 majících lehkou kognitivní disfunkci a 17 zdravých, se jim podařilo dosáhnout 80% specificity a 77% sensitivity. V této studii také polemizují s přesností, použitou diagnózou pacientů a diskuzí výsledků uvedenou v práci Peuchant et al. (2008).

Je vidět, že je zatím většina diagnostických metod založených na vibrační spektroskopii pouze ve fázi vývoje a že zbývá udělat ještě mnoho práce a vyjasnit mnoho dílčích problémů, aby se vibrační spektroskopie stala běžnou diagnostickou metodou v medicínské praxi. I tato práce se snaží přispět svým dílem, přičemž výzkumnou metodou zde byla zvolena Ramanova spektroskopie.

1.3 Ramanova spektroskopie

Jelikož ještě není vyřešena přesná spojitost doposud měřených neurochemických ukazatelů s chorobami, které se pomocí nich diagnostikují, rozhodli jsme se mozkomíšní mok zkoumat holisticky, k čemuž se hodí metody vibrační spektroskopie,

mezi nimiž vyniká spektroskopie Ramanova, která je založená na Ramanově rozptylu.

Ramanova spektroskopie je metoda, která zkoumá záření rozptýlené na studovaném analytu Ramanovým rozptylem. Ten se popisuje teorií optického rozptylu. Optický rozptyl je jev, při kterém dochází k vychýlení fotonu z jeho dráhy v důsledku interakce s nějakou částicí. Jedná se o dvoufotonový jev, což znamená, že při interakci s částicí dochází k zániku dopadajícího fotonu a k okamžité emisi fotonu rozptýleného. Pokud má rozptýlený foton jinou energii než foton dopadající, jedná se o rozptyl nepružný, pokud se navíc energie fotonu změnila v důsledku interakce s vibračními hladinami rozptylující částice, jedná se o rozptyl Ramanův.

Historie tohoto jevu je poněkud pohnutá. Jako první tento jev publikoval Ind C. V. Raman nejprve v Indian Journal of physics [Raman, 1928] a následně 31. března 1928 i v Nature [Raman a Krishnan, 1928] poté, co si 28. února 1928 všiml, že rozptýlené světlo roztoků obsahuje kromě světla o stejné vlnové délce jako dopadající, také světlo o vlnové délce nižší a vyšší. Tento jev již několik let před tím teoreticky předpověděl Smekal (1923) a co víc, nezávisle na Ramanovi ho dokonce o týden dříve než Raman, 21. února 1928, pozorovali ruští vědci G. Landsberg a L. Mandelštam, a to na krystalech křemene, kde byl jev daleko prokazatelnější. S publikováním však otáleli, jednak z osobních důvodů, kdy byl právě v té době jeden z Mandelštamových příbuzných uvězněn a částečně také kvůli nedostatečnému sebevědomí, protože se jejich závěry nesetkaly s přílišnou podporou u ruské vědecké veřejnosti [Ginzburg, 2011]. Proto byl jejich článek [Landsberg a Mandelstam, 1928] přijat až 13. července 1928. Roku 1930 tak byla udělena Nobelova cena C. V. Ramanovi za „práci na rozptylu světla a objevení efektu, který je po něm nazvaný“. O rozpracování teorie k Ramanovu rozptylu se poté velmi zasloužil rodák z Brna Georg Placzek [Amaldi a Placzek, 1932, Placzek a Teller, 1933]

1.3.1 Klasická teorie Ramanova rozptylu

Tato část práce je inspirována kapitolou Classical Theory of Rayleigh and Raman Scattering z knihy The Raman Effect [Long, 2002]. Za původce rozptýleného záření jsou jak v klasickém, tak v kvantově-mechanickém přístupu považovány oscilující elektrické a magnetické multipólové momenty indukované v molekule dopadajícím elektromagnetickým polem. Vzhledem k tomu, že velikost příspěvku elektrického kvadrupólu a magnetického dipólu je většinou o několik řádů nižší ve srovnání s oscilujícím dipólem elektrickým, omezme se pouze na aproximaci uvažující indukovaný oscilující elektrický dipól.

Při dopadu fotonu, který je reprezentován rovinnou monochromatickou vlnou o elektrické intenzitě \vec{E} , na molekulu tedy vzniká oscilující indukovaný dipólový moment \vec{p} závislý na frekvenci dopadajícího fotonu ω_1 . Závislost \vec{p} na \vec{E} můžeme popsat vztahem

$$\vec{p}(\omega_1) = \overset{\leftrightarrow}{\alpha} \vec{E}(\omega_1), \quad (1.1)$$

kde $\overset{\leftrightarrow}{\alpha}$ je tenzor elektrické polarizovatelnosti molekuly, který je obecně funkcí jaderných souřadnic molekuly Q_k a tudíž závisí i na frekvencích vibrací molekuly. Rozvineme-li ho podle jaderných souřadnic v rovnovážné poloze, získáme

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \frac{1}{2} \sum_{k,l} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots, \quad (1.2)$$

kde $(\alpha_{\rho\sigma})_0$ je hodnota $\alpha_{\rho\sigma}$ v rovnovážné konfiguraci molekuly a Q_m jsou normální vibrační souřadnice molekuly, kterým přísluší vibrační frekvence ω_m . Sčítání probíhá přes všechny normální souřadnice a derivace jsou počítány v rovnovážné poloze molekuly.

Pokud se spokojíme pouze s prvními dvěma členy rozvoje, to znamená, že použijeme tzv. harmonickou aproximaci, získáme

$$\alpha_{\rho\sigma} = (\alpha_{\rho\sigma})_0 + \sum_k (\alpha_{\rho\sigma})'_k Q_k, \quad (1.3)$$

kde

$$(\alpha_{\rho\sigma})'_k = \left(\frac{\partial \alpha_{\rho\sigma}}{\partial Q_k} \right)_0. \quad (1.4)$$

Z $(\alpha_{\rho\sigma})'_k$ můžeme složit nový tenzor $\overset{\leftrightarrow}{\alpha}'_k$. Dále, pokud budeme považovat vibrace dle normálních souřadnic Q_k za harmonické s frekvencí ω_k

$$Q_k = Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \quad (1.5)$$

a dosadíme-li dále do rovnice (1.1) za dopadající elektromagnetické pole rovinnou harmonickou vlnu

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\omega_1 t), \quad (1.6)$$

získáme vztah pro indukovaný elektrický dipól

$$\vec{p} = \overset{\leftrightarrow}{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_1 t) + \sum_k \overset{\leftrightarrow}{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k0} \cos(\omega_k t + \delta_k) \cos(\omega_1 t). \quad (1.7)$$

Tento vztah lze pomocí trigonometrické identity

$$\cos(x)\cos(y) = \frac{1}{2} [\cos(x+y) + \cos(x-y)] \quad (1.8)$$

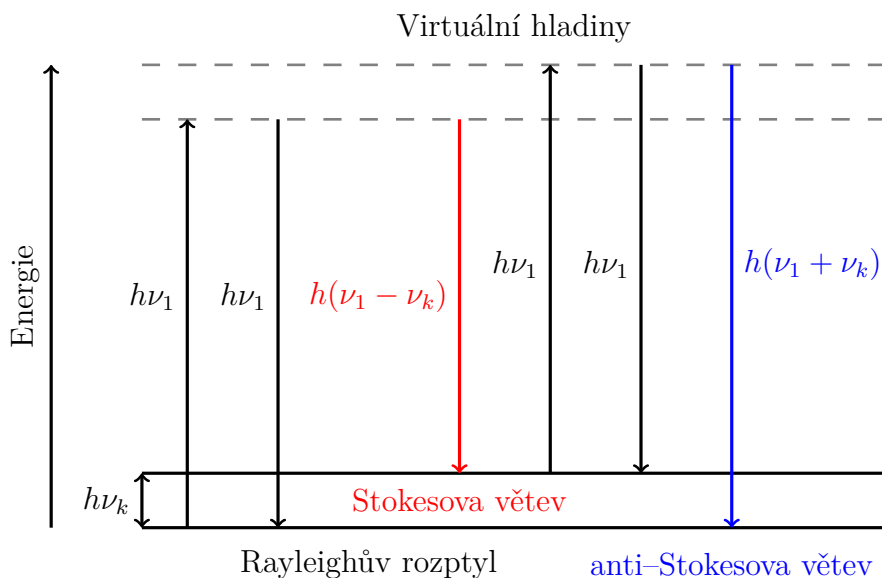
upravit na konečný tvar

$$\begin{aligned} \vec{p} = & \overset{\leftrightarrow}{\alpha}_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_1 t) + \\ & + \frac{1}{2} \sum_k \overset{\leftrightarrow}{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k0} \cos[(\omega_1 - \omega_k)t - \delta_k] + \\ & + \frac{1}{2} \sum_k \overset{\leftrightarrow}{\alpha}'_k \vec{E}_0 Q_{k0} \cos[(\omega_1 + \omega_k)t + \delta_k]. \end{aligned} \quad (1.9)$$

Ve výrazu (1.9) můžeme identifikovat tři složky indukovaného dipólu, které kmitají na frekvenci dopadajícího záření ω_1 a na frekvencích rozdílových a součtových s vlastními vibracemi molekuly. Jelikož kmitající elektrický dipól emituje záření na stejné frekvenci, na které sám kmitá, můžeme první člen z rovnice (1.9) identifikovat jako pružný Rayleighův rozptyl, kdy má rozptýlené záření stejnou frekvenci jako záření dopadající, druhý člen jako zdroj Ramanova rozptylu Stokesovy větve o frekvenci $\omega_1 - \omega_k$ a poslední člen reprezentuje anti-Stokesovu větev Ramanova rozptylu a záření o frekvenci $\omega_1 + \omega_k$. Výraz tedy můžeme přepsat do tvaru

$$\vec{p} = \vec{p}^{\text{Rayleigh}}(\omega_1) + \sum_k \vec{p}^{\text{Raman}}(\omega_1 - \omega_k + \delta_k) + \sum_k \vec{p}^{\text{Raman}}(\omega_1 + \omega_k - \delta_k), \quad (1.10)$$

kde jsme označili $\vec{p}^{\text{Rayleigh}}(\omega_1)$ jako příspěvek Rayleighova rozptylu a Ramanovu



Obrázek 1.4: Diagram Rayleighova a Ramanova rozptylu: Dopadající světlo o energii $h\nu_1 = \hbar\omega_1$ se může rozptýlit buď s nezměněnou frekvencí (Rayleighův rozptyl) nebo s frekvencí menší respektive větší o frekvenci vibračního přechodu ν_k (Stokesova respektive anti-Stokesova větev Ramanova rozptylu)

rozptylu na vibraci o frekvenci ω_k jsme přiřadili členy $\vec{p}^{\text{Raman}}(\omega_1 \pm \omega_k \pm \delta_k)$. Všimněme si, že foton rozptýlený Rayleighovým rozptylem nemění fázi, kdežto kmitání indukovaného dipólu Ramanova rozptylu je fázově posunuto vůči dopadající vlně o δ_k . Tato veličina definuje relativní fázi k-normální vibrace rozptylující molekuly vůči dopadající vlně. Jelikož vibrace molekul ve vzorku mají většinou náhodnou fázi, dochází zde k dekoherenci Ramanovsky rozptýleného záření i přestože je buzeno koherentním zářením laseru. Tensor $\vec{\alpha}_0$ můžeme označit jako tenzor Rayleighova rozptylu

$$\vec{\alpha}^{\text{Rayleigh}} = \vec{\alpha}_0 \quad (1.11)$$

a analogicky můžeme vyjádřit tenzor Ramanova rozptylu pro k-vibrační souřadnici jako

$$\vec{\alpha}_k^{\text{Raman}} = \frac{1}{2} \vec{\alpha}'_k Q_{k0}. \quad (1.12)$$

Výše uvedený klasický přístup nám může poskytnout jistý kvalitativní náhled na mechanismus Rayleighova a Ramanova rozptylu. Rayleighův rozptyl zde totiž vzniká z kmitů indukovaného elektrického dipólu o stejné frekvenci jako je frekvence dopadajícího záření a podmínkou vzniku Rayleighova rozptylu je nenulovost $\vec{\alpha}^{\text{Rayleigh}}$. Jelikož jsou však všechny molekuly polarizovatelné, bude mít vždy rovnovážný tenzor $\vec{\alpha}_0$ nenulové složky a z toho plyne i nenulovost $\vec{\alpha}^{\text{Rayleigh}}$. Z toho vyplývá, že všechny molekuly vyvolávají Rayleighův rozptyl.

Pro Ramanův rozptyl je situace složitější. Podmínkou aktivity vibrace molekuly o frekvenci ω_k v Ramanově rozptylu je nenulovost Ramanova tenzoru $\vec{\alpha}_k^{\text{Raman}}$, což klade podmínku na nenulovost alespoň jedné ze složek $(\alpha'_{\rho\sigma})_k$, které jsou definovány jako parciální derivace složek tenzoru polarizovatelnosti dle jednotlivých vibračních souřadnic (1.4). To znamená, že k aktivitě dané vibrace v Ramanově rozptylu je nutná změna konfigurace jader molekuly při normální vibraci. Nezbytnou vazbu

mezi pohybem jader a elektrickým polem zajišťují elektrony, které sledují pohyby jader a moduluje tak vibrace indukovaného elektrického dipólu.

Jak již bylo zmíněno výše, Ramanův jev je velmi slabý a proto je pro vzorky, měřené pomocí Ramanovy spektroskopie důležitá vysoká koncentrace měřeného analytu. V mozkomíšním moku je však pouze něco kolem 300 mg/l celkového proteinu (viz *Tab. 1.1*) a kdybychom uvažovali, že hmotnost jednoho proteinu je zhruba 100 kDa, tak vychází koncentrace proteinů asi 3 μM , což je hluboko pod detekčním koncentračním limitem klasické Ramanovy spektroskopie. Tento problém lze však překlenout například nedávno objevenou Ramanovou spektroskopií kapkově nanášených povlaků.

1.3.2 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR)

Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR - z angl. drop coating deposition Raman) je technikou, kdy se pomocí Ramanovy mikrospektroskopie zkoumá povlak vzniklý vyschnutím kapky zkoumaného vzorku na vhodné podložce. Výhodou tohoto postupu je, že lze zkoumat poměrně malý objem velmi zředěného vzorku [Zhang et al., 2003].

Proces vysychání kapky poprvé popsali Deegan et al. (1997) a protože pozorovali, že v kapce rozptýlené pevné částice se usazují na okrajích kapky, nazvali ho efektem kávového kroužku. Při objasnění mechanismu vycházeli z toho, že se rozpouštědlo z kapky vypařuje, že je na okrajích kapky v kontaktu s podložkou pod nenulovým kontaktním úhlem a hlavně z předpokladu, že si okraje kapky stále drží svůj poloměr, protože jsou připevněny k podložce v důsledku rovnováhy sil povrchového napětí a povrchových interakcí. Dále předpokládali, že gradienty povrchového napětí, difúze rozpuštěných částic a elektrostatické a gravitační efekty jsou zanedbatelné.

Za těchto podmínek se při vypařování kapky zmenšuje její objem a jelikož má kapka zafixovaný poloměr, je třeba doplňovat vypařené rozpouštědlo z okrajů kapky rozpouštědlem ze středu kapky, což vede ke vzniku proudění od středu ke krajům, které s sebou unáší rozpuštěné částice. Z toho je také patrné, že rychlost vnitřního proudu v kapce je určena rychlostí vypařování.

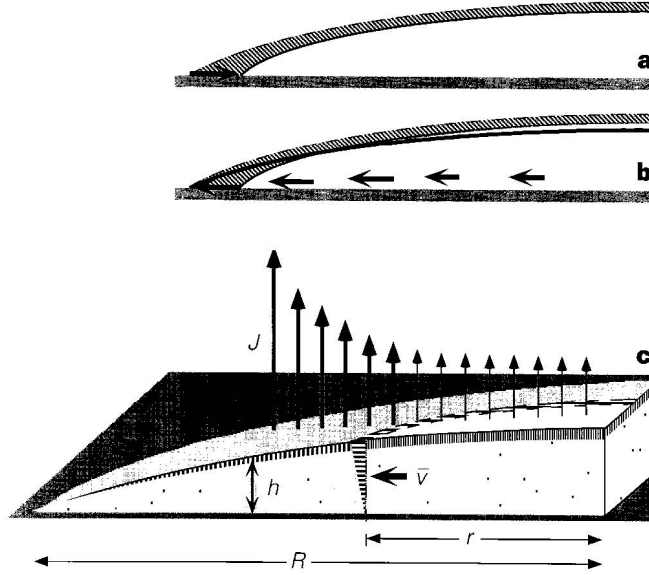
Při procesu vypařování dochází k rychlé výměně molekul mezi povrchem kapky a okolím. Těsné okolí kapky tedy musí být nasycené párou rozpouštědla, což znamená, že na povrchu kapky je nasycená koncentrace páry ϕ_s . Koncentrace páry v nekonečnu ϕ_∞ nasycená není, a tak dochází k difúzi páry od kapky. Při pomalém vypařování koncentrace páry rychle dosáhne ustáleného stavu a můžeme ji popsat rovnicí difúze

$$\Delta\phi = 0. \quad (1.13)$$

Tok páry z povrchu kapky je pak úměrný gradientu koncentrace

$$J(r) = -D\nabla\phi, \quad (1.14)$$

kde D je difúzní koeficient páry v okolí a r je horizontální vzdálenost od středu kapky. Tuto rovnici lze řešit stejně jako v elektrostatice, kde kapku lze připodobnit k vodiči o fixním potenciálu ϕ_s . Povrch, na kterém je kapka můžeme považovat za



Obrázek 1.5: (a) Procesem vypařování rozpouštědla z kapky se vytváří tlak na zmenšení poloměru kapky. (b) Kontaktní linie povrchu kapky se substrátem si však v důsledku rovnováhy sil povrchového napětí a povrchových interakcí drží svůj poloměr a tak musí docházet k doplňování rozpouštědla na krajích kapky, čímž vzniká proud, který s sebou unáší i rozpuštěný analyt, a ten se pak usazuje na kraji kapky a tvoří zde prstýnek. (c) Zavedení potřebných veličin k vysvětlení jevu [Deegan et al., 1997].

rovinu symetrie, tím ale vzniknou ostré okraje kapky o dvojnásobném úhlu než je kontaktní úhel kapky θ_c , což vede k divergentnímu řešení

$$J(r) \propto (R - r)^{-\frac{\pi - 2\theta_c}{2\pi - 2\theta_c}}, \quad (1.15)$$

kde R je poloměr kapky. Aby byl vykompenzován divergentní tok povrchem kapky na kontaktní linii, je zde třeba mít i divergentní rychlost proudění

$$\bar{v} \propto J(r) \propto (R - r)^{-\frac{\pi - 2\theta_c}{2\pi - 2\theta_c}}. \quad (1.16)$$

Tato teorie předpovídá, že v čase t_f na konci vypařování výška kapky $h(r)$ klesne na nulu stejně jako $t_f - t$. Tok v kapce k okrajům $h(r)\bar{v}(r)$ však musí být zachován, aby doplnil vypařené rozpouštědlo, z čehož vyplývá, že rychlost musí růst jako

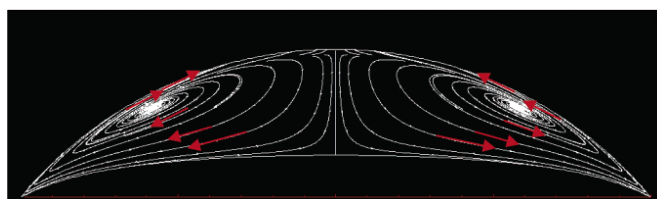
$$\bar{v} \propto \frac{1}{t_f - t}. \quad (1.17)$$

Také z toho vyplývá, že v čase t_f bude všechen rozpuštěný materiál usazený na okrajích kapky a vytvoří jakýsi prstýnek.

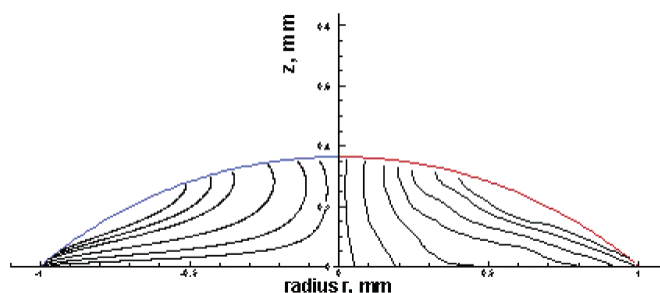
Hlubším studiem výše popsaného jevu lze zjistit, že vysychání kapky probíhá ve dvou fázích [Hu a Larson, 2002]. V první, která trvá po většinu doby vysychání kapky dochází ke snižování kontaktního úhlu kapky, přičemž se zachovává průměr kapky, ve druhé fázi, kdy je již kontaktní úhel příliš malý dochází ke zmenšování průměru kapky.

Hu a Larson (2006) dále poukázali na to, že je třeba při vypařování kapky brát v úvahu ještě další efekty, jako jsou například Marangoniho proudy uvnitř kapky, které vznikají v důsledku gradientu povrchového napětí kapky vlivem rozdílné teploty povrchu kapky. Povrch kapky je ochlazován vypařováním rozpouštědla

z kapky, a proto je teplota na povrchu kapky nižší než teplota kapky na styčné ploše s podložkou. Vrchol kapky je od podložky, která je tepelně stabilnější než kapka, oddělen větší vrstvou rozpouštědla, a tak je také méně ovlivněn teplotou podložky, takže má nižší teplotu než povrch kapky v blízkosti kontaktní linie. S nižší teplotou se zvyšuje povrchové napětí a pod povrchem kapky vzniká Marangoniho proudění z míst o nižším povrchovém napětí (tedy z okraje kapky) do míst o vyšším povrchovém napětí (tedy do středu kapky), což spolu s prouděním ze středu kapky k jejímu okraji dává vzniknout cirkulačnímu proudění v kapce. Pokud však klesne kontaktní úhel pod kritickou mez, není již vrstva rozpouštědla pod vrcholem kapky dost velká na to, aby převážila větší rychlost vypařování, a tedy i silnější ochlazování na krajích kapky, a tak se postupně v průběhu vysychání kapky Marangoniho proudy vytrácí až obrátí svůj směr a podpoří proudění ze středu kapky k jejím okrajům [Hu a Larson, 2005].



Obrázek 1.6: Model proudění v kapce při započtení Marangoniho proudů [Hu a Larson, 2006].



Obrázek 1.7: Model proudění v kapce (vlevo) získaný nejlepším fitem teorie na skutečné proudění v kapce vody (vpravo) ukazuje, že v kapce vody se Marangoniho efekt projevuje pouze nepatrně [Hu a Larson, 2006].

Gradient povrchového napětí se velmi sníží, pokud je povrch kapky kontaminován povrchově aktivními látkami. V tomto případě často Marangoniho proudy skoro zanikají [Hu a Larson, 2005]. Příkladem jsou kapky, kde je rozpouštědlem voda, jejíž povrch se velmi snadno kontaminuje povrchově aktivními látkami, a tak částice rozpuštěné ve vodě často tvoří prstýnek na vnější straně kapky vzniklý efektem kávového kroužku [Savino et al., 2002]. Pokud je však kapka tvořena rozpouštědlem, které není snadno kontaminovatelné povrchově aktivními látkami, mohou Marangoniho proudy dokonce zaujmout dominantní postavení a způsobit koncentrování rozpuštěného materiálu na středu kapky [Hu a Larson, 2006].

Efektu kávového kroužku lze využít kromě jiného také pro Ramanovu spektroskopii. Při vysychání kapky totiž dochází k zakoncentrování částic, které chceme měřit, na okrajích kapky, a tak lze získat Ramanova spektra roztoků dokonce při koncentraci $1 \mu\text{M}$ [Zhang et al., 2003].

1.4 Využití DCDR

Ramanovu spektroskopii kapkově nanášených povlaků poprvé popsali Zhang et al. (2003), kteří se zaměřili na základní vlastnosti této metody a její srovnání s ostatními metodami. Abychom získali dobrý DCDR signál, je třeba použít vhodného substrátu, na kterém se nechá kapka vysychat. Takový substrát by měl mít malou optickou absorpenci, vysokou odrazivost, malý Ramanovský signál a měl by být nesmáčivý roztokem analytu, protože na nesmáčivém povrchu zaujímá deposit mnohem menší plochu než na smáčivém, čímž se velmi zvyšuje povrchová hustota analytu a spolu s ní i detekční limit DCDR. Navíc na nesmáčivých površích často nastává efekt kávového kroužku, takže dochází ke koncentraci vzorku na ještě menší ploše [Zhang et al., 2003]. Jaký by byl nejlepší substrát pro DCDR zkoumali Zhang et al. (2003), přičemž z použitých povrchů (skleněná destička, skleněná destička potažená zlatem, skleněná destička potažená zlatem a navíc SAM - Self Assembled Monolayer, nerezová destička pokrytá tenkou vrstvou teflonu) se ukázala jako nejlépe splňující výše uvedená kritéria nerezová destička pokrytá tenkou vrstvou teflonu. Výhodou takovéto destičky je také její chemická inertnost.

Další substráty pro DCDR vyzkoušeli ve své práci Filik a Stone (2007). Konkrétně se jednalo o křemennou destičku, která se však ukázala nevhodná vzhledem k tomu, že měla značný fluorescenční signál na použité vlnové délce laseru 830 nm a destičku z fluoritu (CaF_2), která sice má vlastní velmi ostrý pás v Ramanově spektru na 320 cm^{-1} a měření na ní musí probíhat dlouho, protože je destička transparentní, ale naproti tomu je relativně levná a dá se snadno použít znovu na rozdíl od nerezové destičky pokryté teflonem.

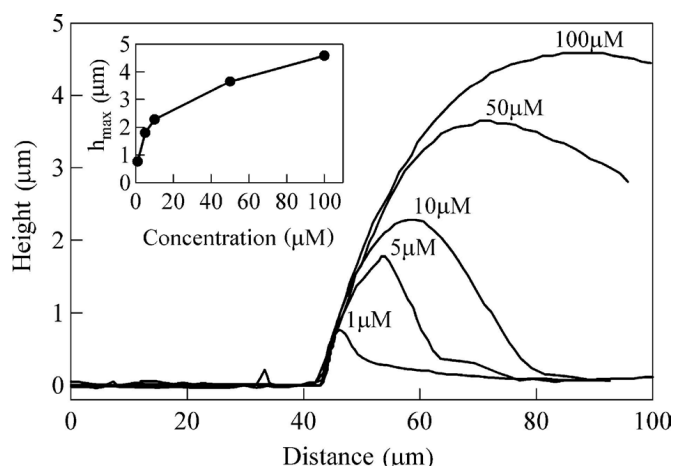
Spektra získaná metodou DCDR jsou velmi dobře reprodukovatelná a v zásadě stejná jako spektra získaná z roztoků o mnohem vyšších koncentracích pomocí běžné Ramanovy spektroskopie, což bylo ukázáno konkrétně třeba na spektrech lysozymu, která byla v podstatě shodná, jak s použitím DCDR, tak běžné Ramanovy spektroskopie [Zhang et al., 2003]. Přestože je vzorek po vysušení v pevném stavu, zdá se, že zůstává velmi hydratovaný. Navíc Zhang et al. (2003) ukázali, že DCDR spektrum lidského inzulinu je velmi blízké běžnému Ramanovu spektru vodného roztoku lidského inzulinu v jeho přirozeném stavu, což ukazuje na to, že při procesu vysychání kapky nedochází k jeho denaturaci. Později bylo ukázáno, že molekuly usazené ve vnější části prstýnku sice mohou být vysušením poškozeny, ale výběrem vhodného místa lze získat spektra v dobré kvalitě [Kopecký a Baumruk, 2006].

Další porovnání [Zhang et al., 2004] ukázalo, že v Ramanových spektrech kapkově nanášených povlaků je potlačená fluorescence oproti spektrům z krystalických vzorků, konkrétně u krystalů O-fosfo-L-serinu byl fluorescenční signál desetkrát vyšší než DCDR spektrum získané z depositu kapičky 10 mM roztoku a třikrát vyšší, pokud byly krystaly před měřením fotovybělovány. Dále autoři zkoumali rozdíl ve složení depositu na okraji a uvnitř kroužku vzniklého vyschnutím kapky inzulinu a lysozymu, přičemž zjistili, že spektrum sebrané z okraje kapky je velmi podobné spektru inzulinu, respektive lysozymu, kdežto spektra zevnitř usazeniny odpovídají spektrům použitého pufru, přestože koncentrace rozpuštěného inzulinu, respektive lysozymu, byla stokrát, respektive tisíckrát, menší než koncentrace pufru. Tento jev vysvětlili tím, že špatně rozpustné proteiny se usazují rychle v okrajích kapky, kam je unáší vnitřní proudění v kapce vzniklé

procesem vysychání, kdežto dobře rozpustné látky, jako například pufr a nečistoty zaviňující fluorescenci, které byly v kapce přítomny pouze v malé koncentraci, zůstávají rozpuštěné mnohem déle, a proto se usazují uvnitř kapky mimo kroužek tvořený proteiny.

Různě rozpustné látky by se tak měly usazovat v různých částech povlaku. Toto tvrzení však není univerzálně použitelné [Zhang et al., 2004], protože například látky s vysokou vzájemnou afinitou se nebudou separovat nebo látky, které špatně krystalizují, jako jsou třeba cukry, tvoří při vypařování viskózní hydráty, které v sobě mohou zadržovat fluorescenční nečistoty.

Studiem struktury kroužku vzniklého vysycháním vodného roztoku albuminu se zjistilo [Kopecký a Baumruk, 2006], že Ramanova spektra v různé vzdálenosti od okraje kroužku se od sebe liší, a to na spektrálních pásech příslušejících postranním řetězcům aminokyselin citlivým na změny lokálního prostředí, přičemž největší změny oproti vodnému roztoku byly vidět na vnějším okraji kroužku. Při měření výškového profilu kroužku Ortiz et al. (2006) pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM - z angl. atomic force microscope) zjistili, že výška kroužku se nezvyšuje s koncentrací použitého roztoku lineárně, ale že pro zvyšující se koncentraci se přírůstek maximální výšky snižuje *Obr. 1.8*. Nepřímo, z intezity neměnicích se pásů, výškový profil kroužku také změřili Kopecký a Baumruk (2006). V nejvyšším bodě pak výšku depozitu odhadli podle interference okrajů kapky.



Obrázek 1.8: Výškové profily kroužků tvořených vyschnutím 3 μl roztoků proteinů o různých koncentracích. Ve výřezu je ukázána závislost maximální výšky (h_{max}) na koncentraci proteinu [Ortiz et al., 2006].

Porovnáváním DCDR spekter inzulínu, tentokrát však s vodným roztokem, se zabývali také Ortiz et al. (2006) a našli pouze drobné změny, které si dle autorů lze vysvětlit například tím, že vysušené proteiny jsou jinak hydratované, ve vyschlém kroužku je jiná koncentrace nečistot nebo při vysychání dochází k nepatrným změnám v sekundární struktuře, čemuž by také nasvědčoval posun pásu amidu I k nepatrně vyšším frekvencím, který může znamenat zvýšený počet β -skládaných listů. Přesto je však DCDR spektrum stále velmi odlišné od spektra inzulínu denaturovaného. Dále bylo v této práci zjištěno, že DCDR spektra nezávisí na hydrofobicitě použitých substrátů, konkrétně teflonem potažené nerezové destičky a křemenné destičky, což bylo vysvětleno tím, že k interakci analytu se substrátem dochází pouze v nejspodnější vrstvě vytvořeného depozitu, které výsledný Ramanův signál příliš neovlivní. Ortiz et al. (2006) se dále věnovali fotostabilitě

depozitů. Ani po hodině ozařování He-Ne laserem na vlnové délce 632,8 nm však nepozorovali žádné výrazné změny v DCDR spektru. DCDR spektrum také nezávisí na koncentraci zkoumaného roztoku, pouze při koncentracích nižších než 10 μM se snižuje poměr signál/šum a více se projevuje závislost DCDR spektra na čistotě rozpouštědla. Kvalitu spekter o nízké koncentraci lze zvýšit použitím větších objemů vzorků [Ortiz et al., 2006].

Ortiz et al. (2004) ukázali, že pomocí DCDR je možno od sebe rozlišit lidský, vepřový a hovězí inzulín, přestože lidský inzulín se liší od hovězího pouze třemi aminokyselinami a od vepřového dokonce pouze jednou. Tím naznačili, že kromě nízkého koncentračního limitu má DCDR také velmi dobrou rozlišovací schopnost strukturní. Dalším studiem pomocí DCDR diferenční spektroskopie bylo zjištěno, že formování amyloidních vláken z inzulínu způsobí změny v oblastech spektra amidu I, amidu III a peptidické kostry proteinu, které odpovídají zvýšenému množství β -skládaných listů [Ortiz et al., 2007]. Na tuto práci navázali Gryniiewicz a Kauffman (2008) výzkumem srážení inzulínu za účelem vyvinout novou metodu, která by byla schopná charakterizovat množství denaturovaného inzulínu a obecně i jiných látek v léčivech. Srážení inzulínu indukovali tepelným zahříváním a pomocí DCDR spekter a regrese částečných nejmenších čtverců se jim podařilo získat závislost množství sraženého inzulínu na spektrálních změnách a tím ověřit použitelnost této metody.

Další práce využívající DCDR se věnují fosforylaci peptidů. Fosforylací proteinů totiž živé organismy regulují mnoho buněčných procesů. Nejprve Xie et al. (2004) našli spektrální rozdíl fosforylace tyrosinu v peptidech na dubletu 820–850 cm^{-1} a oslabení pásu nacházejícího se u 1205 cm^{-1} . Na analýzu spekter s různým stupněm fosforylace byla použita metoda částečných nejmenších čtverců. Dále pak byly změřeny [Xie et al., 2005] změny v Ramanových spektrech a DCDR spektrech fosforylovaných a nefosforylovaných aminokyselin serinu a threoninu v závislosti na pH. Ukázalo se, že u fosforylovaných peptidů narozdíl od nefosforylovaných, dochází ke změnám spektra okolo 980 cm^{-1} . Zhang et al. (2005) zkoumali místo fosforylace na aminokyselinovém třináctimeru, který pochází z jedné domény tyrosin kinázy, přičemž byli schopni metodou částečných nejmenších čtverců rozlišit, zdali k fosforylaci došlo na serinu, threoninu nebo tyrosinu.

Fosforylaci proteinů také zkoumali Moger et al. (2007), kteří porovnávali povrchově zesílená Ramanova spektra a DCDR spektra fosforylovaných a nefosforylovaných peptidů obsahujících tyrosin a serin. Obě metody ukazovaly prakticky stejné změny ve spektrech způsobené fosforylací, přestože jsou pásy SERS spektra zesíleny selektivně a mají tak různou intenzitu a navíc SERS spektrum obsahuje i pásy, které se v DCDR spektru nevyskytují.

Cipriani a Ben-Amotz (2005) měřili Ramanova spektra krystalů a roztoků metodou kapkově nanášených povlaků tří zástupců skupiny taxanů. Spektra následně porovnali s výsledky kvantově-mechanického výpočtu energetických hladin pomocí Hartree-Fockovy metody a konstatovali, že takto získaná spektra jsou v dobré shodě s pozorovanými. Drobné odlišnosti vysvětlili složitějším vzájemným ovlivňováním se atomů velkých molekul, než předpokládá teorie.

V medicíně by se dala DCDR aplikovat například na výzkum slz. Filik a Stone (2007) zkoumali pomocí DCDR a analýzy hlavních komponent poměry koncentrací proteinů ve vodném roztoku. Použili lysozym, laktoferin a albumin ve stejné celkové koncentraci, jako se nachází v lidských slzách ($\sim 3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Zjistili, že ve

spektrech ze středu proužku vzniklého vysycháním kapky bylo nejvíce zastoupeno spektrum lysozymu. Proměřili proto složení proužku v příčném řezu a odhalili, že rozložení proteinů v kroužku není rovnoměrné a že se lysozym ukládá na vnitřní straně kroužku, zatímco laktoferin a albumin směrem k vnějšímu okraji, což by mohlo být způsobeno například odlišnou hmotností lysozymu, který je lehčí než zbylé dva proteiny. Zprůměrováním spekter změřených v různé vzdálenosti od okraje kroužku bylo možné detekovat i malé změny v relativních koncentracích proteinů. Autoři předpokládají, že by bylo možné využít tuto metodu pro rychlou a jednoduchou diagnózu očních infekcí, které se projevují právě změnou koncentrace proteinů.

Na tento výzkum navázali Filik a Stone (2008) měřením DCDR spekter vysušené kapky slzy metodou Ramanova zobrazování. Analýzou hlavních komponent rozdělili naměřená spektra na čtyři hlavní složky – proteiny, hydrogenuhličitan sodný s močovinou, lipidy a močovinu s lipidy. Z proteinové složky se dá následně získat poměr koncentrací hlavních proteinů v slzách obsažených, o což se pokusili v dalším výzkumu Filik a Stone (2009). Nejprve separovali jednotlivé proteinové složky pomocí centrifugačních filtrů a poté jejich spektra spolu se spektrem močoviny proložili metodou nejmenší čtverců na spektrum nefiltrované slzy, čímž získali poměrné zastoupení těchto složek v slze.

Dále byl také v práci [Filik a Stone, 2008] popsán proces vysušování slzy na hydrofobním povrchu. Nejprve se zformuje kroužek z proteinů, které jsou nejméně rozpustné, poté se začnou od vnějšího okraje tvořit krystalky obsahující chlorid sodný, močovinu a malé množství proteinů. Jako poslední vysychají okraje krystalků. Lipidy jsou nerozpustné a ukládají se uvnitř kapky mimo vnější proteinový proužek.

V další studii se Djaoued et al. (2007) zaměřili na výzkum kyseliny domoové, neurotoxinu, který způsobuje ztrátu krátkodobé paměti. Zjistili, že se DCDR spektrum mění v závislosti na koncentraci kyseliny a je odlišné od spektra krystalické formy například tím, že zmizely téměř všechny pásy vibrační karboxylové skupiny a dále tím, že jsou všechny pásy rozšířené, což je způsobeno změnou délky vazeb při interakci s molekulami vody.

Das et al. (2008) zkombinovali DCDR a SERS. Jako podložku pro metodu kapkově nanášených povlaků použili SERS substrát se zlatými nanočásticemi, čímž dokázali získat spektra myoglobinu dokonce z attomolárních koncentrací.

Novou metodou založenou na DCDR je ultrafiltrační Ramanova diference (UFRD) [Xie et al., 2008]. Využívá se zde spojení ultrafiltrace a DCDR diferenční spektroskopie, pomocí kterého bylo zkoumáno vázání ligandu na protein. Tato metoda je schopná detekovat pouze ligandy se silným Ramanovým signálem, u ligandů se slabým signálem je však schopná detekovat alespoň změny sekundární struktury proteinu v důsledku vazby ligandu.

Využití DCDR na výzkum oxidativního poškození proteinů za pomoci značení oxidovaných míst dinitrofenyl hydrazinem (DNPH) nazvali Zhang et al. (2009) ratiometric Raman spectroscopy (RMRS). Ramanova spektroskopie se příliš nehodí na zkoumání oxidačního stavu karbonylů neoznačených proteinů, jelikož v Ramanově spektru proteinů dominují především pásy příslušející aromatickým aminokyselinám a vibračním módům kostry proteinu. Můžeme však použít značení pomocí DNPH, který se váže na oxidované karbonyly a má výrazný Ramanův pás kolem 1340 cm^{-1} . Oxidační stav karbonylů získáme srovnáním jeho intezity

s intenzitou pásu fenylalaninu zkoumaného proteinu. Nutnou podmínkou je znalost počtu fenylalaninů ve zkoumaném proteinu. Nová metoda byla ověřena na měření oxidačního stavu lysozymu a hovězího sérového albuminu. Bylo ukázáno, že detekční limit je 0,33 pmol karbonylu v kapce, což je tisíckrát méně v porovnání s hojně používanou fluorescenční metodou a přibližně stejně, jako je třeba na imunoblotting pro hovězí sérový albumin. Navíc je možné z Ramanových spekter narozdíl od jiných metod identifikovat měřený protein porovnáním s databází DCDR spekter. Za tímto účelem autoři vytvořili pokusnou databázi 15 proteinů.

Esmonde-White et al. (2009) měřili DCDR spektra sinoviální tekutiny za účelem diagnózy osteoartrózy. Data vyhodnocovali jednoduchým porovnáním intenzit pásů, přičemž nejlepší výsledek získali pro poměr pásů 1080 a 1001 cm^{-1} .

DCDR tedy v posledních letech nalézají uplatnění i v medicínském výzkumu a mohla by být vhodnou metodou ke studiu mozkomíšního moku.

Kapitola 2

Materiály a metody

2.1 Použité matematické metody

Z aplikací Ramanovy spektroskopie v medicíně plyne, že se často k získání požadované informace ze spekter používají různé multidimenzionální statistické metody. Cílem těchto metod je snížit dimenzi problému, což znamená, že se snaží nalézt vnitřní (latentní) proměnné, kterých je mnohem méně než naměřených spekter a přesto dostatečně přesně vystihují daný problém. Z taxonomického hlediska je můžeme rozdělit na vícerozměrnou regresi, metody s učitelem (supervised pattern recognition) a bez učitele (unsupervised pattern recognition).

Vícerozměrné regresní metody jsou schopny upravit parametry teoretického modelu tak, aby model co nejvíce odpovídal realitě. K tomuto přístupu potřebujeme mít data, na kterých se nastaví parametry modelu a navíc znát parametrizovaný model, který vystihuje závislost měření na interpretaci měření (například model reakční kinetiky). Oproti tomu, metody s učitelem nepožadují znalost modelu, ale pouze cvičný datový set, u kterého jsou známy jak výsledky měření, tak jejich souvislost se znakem, který chceme u jednotlivých vzorků detekovat (například jsou známa Ramanova spektra a diagnóza). Tyto metody jsou poté na základě naučených souvislostí ze cvičebního setu schopné přiřadit požadovaný znak i neznámému vzorku. Konečně, multidimenzionální statistické metody bez učitele jsou ty, které se snaží vystihnout vnitřní podstatu dat bez jakékoli další informace o datech. V této práci byli použiti pouze zástupci poslední zmíněné kategorie, konkrétně analýza hlavních komponent (PCA) a shluková analýza (CA).

Další matematické metody, hojně využívané nejen ve vibračně-spektroskopické praxi k získání důležitých informací z naměřených dat zatížených náhodným šumem, jsou různé vyhlazovací metody. Mezi nimi dominantní postavení zaujímá Savitzkého-Golayův filtr, který byl v této práci také využit.

2.1.1 Analýza hlavních komponent (PCA)

Analýza hlavních komponent se snaží nalézt několik latentních proměnných, které nejlépe vystihují variabilitu a vzájemnou závislost spekter [Wall et al., 2003]. Úplné a jednoznačné rozložení souboru spekter do báze nových spekter, která jsou na sebe ortogonální, je možné za použití singulárního rozkladu (SVD – z angl. singular value decomposition). Tato nová báze spektra nazýváme faktory. Při matematické formulaci problému SVD uspořádejme n naměřených spekter o m

bodech do sloupců matice \mathbf{X} . Dále bez újmy na obecnosti předpokládejme, že $m > n$ a hodnost matice \mathbf{X} je n . Poté existuje jednoznačný rozklad matice \mathbf{X}

$$\begin{pmatrix} m \times n \\ \mathbf{X} \\ \text{spektra} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} m \times n \\ \mathbf{U} \\ \text{faktory} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} n \times n \\ \begin{pmatrix} s_1 & & 0 \\ & \ddots & \\ 0 & & s_r \end{pmatrix} \\ \text{singulární čísla} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} n \times n \\ \mathbf{V}^T \\ \text{koeficienty} \end{pmatrix}, \quad (2.1)$$

kde T značí transpozici, matice \mathbf{U} a \mathbf{V} jsou ortogonální a matice \mathbf{S} je diagonální. (Připomeňme, že matice \mathbf{A} je ortogonální, pokud všechny její sloupce \mathbf{a}_i splňují podmínky $\mathbf{a}_j^T \cdot \mathbf{a}_k = \delta_{jk}$, kde δ_{jk} reprezentuje Kroneckerovo delta, které se rovná jedné při $j = k$ a nule v ostatních případech.) Matici \mathbf{U} nazveme maticí faktorů, protože v jejích sloupcích jsou umístěny báze vektory, do kterých jsme naměřená spektra chtěli rozložit, matici \mathbf{S} nazveme maticí singulárních čísel a prvky na její diagonále bez újmy na obecnosti budeme považovat za seřazené od největšího po nejmenší a nazveme je singulární čísla. Matici \mathbf{V} nazveme maticí koeficientů, protože v jejích sloupcích jsou umístěny souřadnice jednotlivých spekter ve faktorové bázi. Vyjádřením tohoto vztahu pro i spektrum získáme

$$\mathbf{x}_j = \sum_{i=1}^n v_{ij} s_i \mathbf{u}_i. \quad (2.2)$$

Vzhledem k tomu, že \mathbf{v}_i i \mathbf{u}_i jsou normovány na jedničku a singulární čísla s_i jsou seřazena sestupně, je vidět, že významnost faktorů postupně klesá spolu s klesajícími singulárními čísly s_i a od určité hranice r již začínají být jejich příspěvky zanedbatelné a tak můžeme sumu (2.2) omezit pouze na prvních r členů

$$\mathbf{x}_j \approx \sum_{i=1}^r v_{ij} s_i \mathbf{u}_i. \quad (2.3)$$

Jako kritérium, kdy již lze považovat vliv dalších faktorů za nevýznamný, je možné brát analýzu průběhu singulárních čísel nebo reziduální chyby. Pokud jejich závislost dosáhne stavu, kdy s přidáváním nových faktorů klesají jejich hodnoty lineárně, znamená to, že již do problému přinášejí informaci stále stejné váhy, tedy pravděpodobně nějaký šum, a lze je zanedbat. Reziduální chybu E_i lze spočítat dle vztahu

$$E_i^2 = \frac{1}{m(n-i)} \sum_{j>i}^n s_j^2 \quad (2.4)$$

Dá se ukázat, že s_i^2 jsou variancemi jednotlivých faktorů, čímž se dostáváme k definici analýzy hlavních komponent, která se snaží nalézt takové komponenty, které by objasňovaly nejvíce variance v naměřeném datovém souboru, z čehož také plyne přímá souvislost mezi PCA a SVD. Vybrané báze vektorů se v PCA neříkají faktory, nýbrž komponenty a rozvojové koeficienty naměřených spekter $v_{ij} s_i$ se nazývají skóre.

V dalším textu budeme trochu nepřesně používat pojem faktorové analýzy ve smyslu zpracování metodou SVD.

2.1.2 Shluková analýza (CA)

Shluková analýza je metoda seskupování dat s podobnými vlastnostmi do skupin – shluků (blíže viz [Hebák a Hustopecský, 1987]). CA se dělí na *hierarchické* a *nehierarchické*, přičemž *hierarchické* algoritmy se ještě dále dělí na *aglomerativní*, kdy se z malých shluků postupně skládají větší a *divizní*, při kterých se velké shluky rozdělují na menší. CA se také dají rozdělit na ty, které vyžadují znalost počtu shluků předem a na ty, které počet shluků určí z vnitřních souvislostí dat.

Různé shlukové analýzy se také liší způsobem posuzování vzdálenosti objektů, objektů a shluků a shluků mezi sebou. Pro další úvahy předpokládejme, že máme naměřených n spekter (objektů) o m bodech (proměnných), která jsou uvedena ve sloupcích \mathbf{x}_i matice \mathbf{X} .

Základním způsobem měření vzdálenosti je *euklidovská míra*

$$D_E(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \sqrt{\sum_{k=1}^m (x_{ki} - x_{kj})^2}. \quad (2.5)$$

Dále ještě mají podobné vlastnosti míry *Hemmingova*

$$D_H(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \sum_{k=1}^m |x_{ki} - x_{kj}| \quad (2.6)$$

a *Čebyševova*

$$D_H(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \max_k |x_{ki} - x_{kj}|. \quad (2.7)$$

K těmto měřám se také sluší uvést jejich zobecnění, *Minkowského metriku*

$$D_M^{(l)}(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \sqrt[l]{\sum_{k=1}^m (x_{ki} - x_{kj})^l}. \quad (2.8)$$

Všechny výše uvedené míry se dají použít pouze na proměnné, které mají zhruba stejnou váhu, což je v případě spekter splněno a liší se tím, jak moc zdůrazňují vzdálenost proměnných, které se mezi jednotlivými měřeními výrazně liší. Nevýhodou těchto měř je, že silně korelované proměnné v nich mají velký vliv na výsledek.

Východiskem může být transformace proměnných, při které každé proměnné přiřadíme vhodnou váhu, kterou umístíme na diagonálu transformační matice \mathbf{C} . Spektra v nových proměnných \mathbf{u}_i poté získáme

$$\mathbf{u}_i = \mathbf{C}\mathbf{x}_i. \quad (2.9)$$

Pro *euklidovskou míru* na transformované souřadnice pak obdržíme vztah

$$D_E^2(\mathbf{u}_i, \mathbf{u}_j) = \sqrt{(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j)^T \mathbf{C}^T \mathbf{C} (\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j)}. \quad (2.10)$$

Váhy se mohou používat jak empirického charakteru, tak exaktního. V obecném případě transformační matice nemusí být nutně diagonální. Použijeme-li inverzní kovarianční matici $\mathbf{C}^T \mathbf{C} = \mathbf{S}^{-1}$, odstraníme kromě závislosti na měřících jednotkách také nevýhodu plynoucí z nadměrného vlivu korelovaných proměnných a dojdeme ke známé Mahalanobisově vzdálenosti

$$D_M^2(\mathbf{x}_i, \mathbf{x}_j) = \sqrt{(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j)^T \mathbf{S}^{-1} (\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j)}. \quad (2.11)$$

Je však třeba uvážit, že použitím normovaných proměnných nebo *Mahalano-bisovy míry* potlačíme vliv rozdílné variability proměnných a posílíme vliv málo významných proměnných na výsledek.

Po volbě vhodné míry následuje volba algoritmu shlukování měření do skupin. Dále se zaměříme pouze na aglomerativní hierarchický postup, který byl použit i v této práci. Jeho výsledky můžeme graficky znázornit v dendrogramu, což je stromová struktura souvislostí mezi skupinami, kterou vytvoříme postupným spojováním shluků na úrovni hladiny jejich vzdálenosti. Vzdálenosti mezi shluky lze posuzovat různými způsoby, přičemž pro všechny metody je společné, že v prvním kroku považujeme každé měření za samostatnou skupinu. Dále se vytvoří matice \mathbf{D} vzdáleností všech shluků mezi sebou a nalezneme se nejkratší vzdálenost mezi dvěma skupinami, které se spojí dohromady a jim příslušející řádky i sloupce se z matice vzdáleností vypustí. Následně do matice vzdáleností přidáme sloupec a řádek obsahující vzdálenosti nové skupiny od ostatních skupin dle zvoleného algoritmu výpočtu vzdáleností skupin. Postup se opakuje do vzniku jedné velké skupiny.

Metoda *nejbližšího souseda* (single linkage) nalezneme nejkratší vzdálenost mezi členy porovnávaných skupin. Korekci matice vzdáleností pak získáme dle vztahu

$$D_{gg'} = \min(D_{g'h}, D_{g'h'}), \quad (2.12)$$

kde g' je index shluku, ke kterému hledáme vzdálenost a h a h' jsou indexy právě sloučených shluků do nově vzniklého shluku o indexu g . Při použití této metody se často i velmi vzdálené objekty mohou sejít v jednom shluku. Dochází k tomu v důsledku řetězení objektů, které je obzvláště nevýhodné, pokud požadujeme, aby shluky měly typický eliptický tvar se zhuštěným jádrem.

Naopak metoda *nejvzdálenějšího souseda* (complete linkage) za vzdálenost mezi shluky volí maximální vzdálenost mezi jejich členy

$$D_{gg'} = \max(D_{g'h}, D_{g'h'}). \quad (2.13)$$

Při použití této metody nedochází k řetězení objektů a tvoří velmi kompaktní často sférické shluky přibližně stejné velikosti.

V metodě *průměrné vazby* (average linkage) je vzdálenost shluků počítána jako průměrná vzdálenost každého člena z jednoho shluku ke každému členu z druhého shluku

$$D_{gg'} = \frac{n_h D_{g'h} + n_{h'} D_{g'h'}}{n_h + n_{h'}}, \quad (2.14)$$

kde n_h respektive $n_{h'}$ je počet členů slučovaných shluků. Tato metoda dává podobné výsledky jako metod *nejvzdálenějšího souseda*.

Centroidní metoda (centroid linkage) měří vzdálenosti těžišť shluků. Vzdálenost nově vzniklého shluku od ostatních shluků pak získáme dle vztahu

$$D_{gg'} = \frac{1}{n_h + n_{h'}} \left(n_h D_{g'h} + n_{h'} D_{g'h'} - \frac{n_h n_{h'}}{n_h + n_{h'}} D_{hh'} \right). \quad (2.15)$$

Konečně, pro *Wardovu* metodu je kritériem pro spojování shluků přírůstek celkového vnitroskupinového součtu čtverců odchylek pozorování od shlukového průměru. Pro úpravu vzdáleností nově vzniklého shluku od ostatních poté získáme

$$D_{gg'} = \frac{1}{n_h + n_{h'} + n_{g'}} [(n_h + n_{g'}) D_{g'h} + (n_{h'} + n_{g'}) D_{g'h'} - n_{g'} D_{hh'}]. \quad (2.16)$$

Vnitroskupinový součet čtverců odchylek roste s rostoucí velikostí shluků a pro pevné $n_h + n_{h'}$ je maximální při $n_h = n_{h'}$, což znamená, že *Wardova* metoda odstraňuje malé shluky a tvoří shluky zhruba stejné velikosti. Tato metoda se velmi hodí pro datové soubory se stejným rozměrem proměnných. (Poslední dvě zmíněné rovnice (2.15, 2.16) platí pouze v případě použití *euklidovské* míry.)

2.1.3 Savitzkého-Golayův filtr

Savitzkého-Golayův filtr se řadí mezi *low-pass* filtry, což znamená, že se snaží ze spekter odstranit vysokofrekvenční šum, který za sebou skrývá pomaleji se měnící požadovanou informaci. Jedná se o polynomiální filtr, který nezachovává intenzitu pásů, zato se však při jeho aplikaci zachovává integrální intenzita pásu a pozice maxima pásu.

Z matematického hlediska je nejjednodušším příkladem filtru případ, kdy je každý spektrální bod z filtrem vyhlazované oblasti nahrazen lineární kombinací několika okolních bodů [Savitzky a Golay, 1964]

$$g_i = \sum_{j=-n_L}^{n_R} c_j f_{i+j}, \quad (2.17)$$

kde g_i představuje hodnotu vyhlazeného spektra, $f_i = f(\tilde{\nu}_i)$ k němu příslušející hodnotu v bodě ν_i původního spektra a n_L a n_R je počet použitých bodů „nalevo“ respektive „napravo“ od vyhlazovaného bodu. Počet všech bodů $n_L + n_R + 1$, přes které se lineární kombinace počítá, se nazývá délka datového okna (anglicky *moving window*). *Savitzkého-Golayův* algoritmus v tomto vztahu dále předpokládá, že $n_L = n_R$ a tedy lichou délku datového okna při ekvidistantním rozmístění dat s krokem δ

$$\tilde{\nu}_{i+j} = \tilde{\nu}_i + j\delta. \quad (2.18)$$

Podstatou této metody pak je, že všemi body v datovém okně proložíme polynom pomocí metody nejmenších čtverců. V tomto případě je řešení exaktní a pokud mají navíc body, kterými polynom prokládáme ekvidistantní škálu, lze pro výpočet prostředního bodu g_i použít vztahu (2.17), ve kterém se pak koeficienty c_j nazývají *Savitzkého-Golayovy koeficienty* a dají se spočíst pro každý stupeň polynomu a každou délku okna. Navíc se z polynomu snadno získává jeho derivace, a tak lze dokonce nalézt i koeficienty c_j , dle nichž vyhlazené hodnoty g_i vyjadřují derivované spektrum. Jak je vidět z výše popsaného, tak tento algoritmus vyniká svou jednoduchostí a výpočetní nenáročností. První tuto metodu publikovali Savitzky a Golay (1964), kteří ve své práci dokonce tabelovali koeficienty c_j pro délku okna do 25 bodů, jak pro případ bez použití derivace, tak pro derivaci prvního až pátého řádu a pro polynomy až šestého řádu.

2.2 Experimentální technika Ramanovy spektroskopie

Měření DCDR spekter bylo prováděno na integrovaném Ramanově systému LabRAM HR800 od firmy Horiba Jobin-Yvon. Tento systém je vybaven interním He-Ne laserem o výkonu zhruba 20 mW na vlnové délce 632,8 nm s možností připojení dalších externích laserů o různých vlnových délkách. Přístroj má integrován

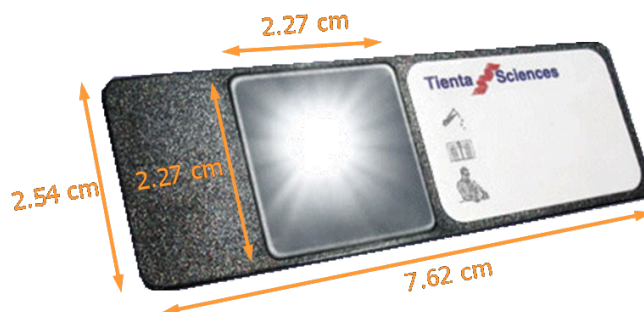
konfokální mikroskop Olympus BX40. Pro měření byly k dispozici objektivy taktěž od firmy Olympus $5\times$ NA 0,1, $10\times$ NA 0,25 a $50\times$ NA 0,7. Spektra však byla snímána výhradně s objektivem se zvětšením $50\times$ s ohledem na optimální poměr získaného signálu k akumulární době a taktěž s ohledem k zaostření laserového svazku, jehož soustředění do menší stopy by mohlo poškodit vzorek.

Konfokální šterbina mikroskopu je nastavitelná v rozmezí 0–1000 μm , přičemž pro šterbiny větší než 400 μm je již potlačena konfokalita mikroskopu.

Z mikroskopu prochází svazek přes dva holografické notch filtry na spektrograf Czerny–Turner, který má ohniskovou vzdálenost 800 mm a je s asymetrickou montáží a který má dvě vyměnitelné mřížky s 1800 vrypy/mm (standardní) a 600 vrypy/mm. Pro měření v této práci byla použita mřížka se 600 vrypy/mm. Na výstupu dává spektrograf rovnoměrné rozložení intenzity [Šípová, 2006]. Signál ze spektrografu je snímán kapalným dusíkem chlazeným CCD detektorem o velikosti 1024×256 pixelů.

Mikroskop je navíc vybaven stolkem s automatickým posuvem s krokem 0,5 μm (reprodukovatelně až od 1 μm), osvětlením bílým světlem pomocí optického vlákna a kamerou připojenou k počítači.

DCDR Ramanova spektra byla měřena ze vzorků deponovaných na podložkách SpectRIMTM od firmy Tienta Sciences. Tyto podložky jsou tvořeny plastovou destičkou velikosti normálního mikroskopického skla $2,54\times 7,62$ cm, na které je umístěn plíšek leštěné nerezové oceli o rozměrech $2,27\times 2,27$ cm s napařenou 50 nm hydrofobní vrstvou teflonu *Obr. 2.1*. Na každou z destiček nanášíme vzorky v rozteči 7×7 vzorků (tj. celkem 49 vzorků na jednu destičku) s ohledem na optimální využití plochy při nanášení objemu vzorku až 5 μl .



Obrázek 2.1: Podložka SpectRIMTM od firmy Tienta Sciences, na které byly deponovány kapičky pro DCDR měření

2.3 Vzorky

Vzorky CSF byly získávány ve spolupráci s doc. MUDr. Alešem Bartošem Ph.D. z Psychiatrického centra Praha. Studie se zúčastnilo 19 pacientů s RS, k tomu 19 kontrolních subjektů ve stejné věkové kategorii, 5 pacientů trpících AD a k nim 5 kontrolních subjektů, taktěž ve stejné věkové kategorii. Podrobnější věkové údaje pacientů jsou uvedeny v *Tab. 2.1*.

Diagnóza klinicky jisté RS a typ průběhu RS v době lumbální punkce byly určeny podle platných kritérií [Lublin a Reingold, 1996, McDonald et al., 2001, Poser et al., 1983]. Třináct pacientů s RS nebylo před provedením lumbální punkce

zařazení	počet	ženy	muži	Věk (v rocích)		
				průměrný	minimální	maximální
RS	19	74 %	26 %	34	21	49
kontroly k RS	19	74 %	26 %	34	24	46
AD	5	40 %	60 %	71	65	76
kontroly k AD	5	40 %	60 %	64	58	72

Tabulka 2.1: Věkový profil pacientů a profil zastoupení jednotlivých pohlaví, RS je zkratka pro roztroušenou sklerózu, AD pro Alzheimerovu nemoc

vůbec léčeno, dva užívali imunosupresivní léčbu (steroidy a/nebo azatioprin), dva pacienti byli léčeni imunomodulačními preparáty (interferony beta nebo glatiramer acetát) a dva podstupovali imunosupresivní a zároveň imunomodulační léčbu.

Kontrolní jedinci k RS podstoupili lumbální punkci v rámci rutinního diagnostického vyšetřování. Manifestovali se vertigem nebo bolestí hlavy (vertebrogení, nespecifickou, migrenózní) nebo psychogenními či únavovými syndromy. Vyšetření a podrobné zhodnocení pacientů nepřineslo konkrétní vysvětlení pro jejich potíže.

Pacienti trpící Alzheimerovou nemocí podstoupili pečlivý klinický výběr podle kritérií NINCDS-ADRDA [McKhann et al., 1984].

Vzorky kontrolních osob k AD vznikaly přirozeným způsobem z běžné klinické praxe. Jednalo se o pacienty, u nichž byla indikována lumbální punkce za diagnostickým účelem, a to jiným než v rámci diferenciální diagnostiky kognitivní poruchy. Podmínkou zařazení byly normální kognitivní funkce podle kognitivních testů (MMSE nebo ACE) [Bartoš a Hasalíková, 2010]. Kontrolní subjekty trpěly různými, méně závažnými diagnózami nebo příznaky.

Kromě vzorků určených k vývoji nové diagnostické metody byly také ve fázi optimalizace měřících podmínek použity vzorky 4 pacientů, kteří neměli jednoznačnou diagnózu a nebyli tedy vhodní ke studiu neurodegenerativních chorob.

Každý subjekt účastníci se studie měl přiřazeno z Psychiatrického centra v Praze unikátní číslo, pod kterým po dobu trvání studie vystupoval.

Vzorky CSF byly skladovány v mrazících boxech při teplotě -80°C a k jejich rozmrazení došlo teprve těsně před jejich přípravou na měření. Vzorky poskytnuté k AD (nemocní i kontroly) byly všechny během skladování jednou rozmrazeny pro jiné účely, než výzkum uvedený v této práci.

Tento projekt schválila etická komise 3. LF UK. Pacienti nebo jejich odpovědní zástupci podepsali informovaný souhlas s účastí v této studii.

2.4 Příprava vzorků

Vzorky CSF byly z mikrozkupek, ve kterých byly skladovány, hned po rozmrazení rozděleny na alikvoty do mikrozkupek o objemu 1,5 ml. Každý ze vzorků ze souboru pacientů s RS (jak nemocných, tak kontrol) byl rozdělen na 4 alikvoty o objemu nejméně 50 μl , přičemž k dalšímu měření byla určena pouze jedna z nich. Vzorky pacientů trpících AD a k nim příslušející kontroly takto rozděleny nebyly vzhledem k menšímu obdrženému objemu těchto vzorků. Náhodně byly vybrány alikvoty určené k měření, které byly vloženy do chlazené centrifugy Mikro220R od firmy Hettich. Vzorky byly následně stočeny po dobu 5 minut při teplotě 5°C na 11000 g, aby došlo k usazení možných fluorescenčních nečistot (buněk či zbytků

buněčných organel, atp., které mohly při klinickém odběru vzorků kontaminovat CSF).

Poté byly odebrány 2 μl vzorku ze středu mikrozkuumavky a deponovány na DCDR substrát, kde se nechala vzniklá kapička vyschnout přiklopená Petriho miskou jako ochranou proti kontaminaci prachem během vysychání. DCDR destička byla před každou depozicí vzorků důkladně očištěna proudem vzduchu z laboratorního balónku. V případě, kdy byly zkoumány i dialyzované vzorky, se také ještě před umístěním vzorku na DCDR destičku nanesly 2 μl vzorku na filtr Millipore VSWP01300 o poloměru 13 mm a velikosti pórů 25 nm a byly dialyzovány proti destilované vodě. Po uplynutí požadovaného dialyzačního času byl vzorek z filtru odebrán a deponován na DCDR substrát. Vysychání kapičky na destičkách SpectRIMTM trvalo různou dobu od 20 minut až po několik hodin (v závislosti na tom, od kterého pacienta vzorek pocházel).

Kromě vzorků CSF byly také měřeny některé látky, které by v moku mohly být obsaženy, konkrétně lidský sérový albumin, glukóza a močovina. Vodný roztok lidského sérového albuminu (Albumin lidský lyofilizovaný pro laboratorní účely – Imuna, n. p., Šarišské Michalány, elektroforetická čistota 97,0) byl připraven z destilované vody na výslednou hmotnostní koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztok glukózy (D+ glukóza monohydrát – Merck) měl hmotnostní koncentraci 0,11 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztok močoviny (od firmy Serva) byl připraven na hmotnostní koncentraci 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Všechny tyto roztoky byly poté naneseny v objemu 2 μl na DCDR destičku a ponechány vyschnout.

2.5 Měření a zpracování spekter

Ramanovský integrovaný systém LabRAM HR800 byl každý den před sérií měření kalibrován na čáru křemíku 520,7 cm^{-1} pomocí obslužného softwaru LabSpec od výrobce. Tento software byl také použit k veškerému měření. Spektra byla vždy sbírána nejméně ve třech akumulacích, protože LabSpec umožňoval jejich porovnáním odstranit ta, která byla „poškozena“ průletem částice kosmického záření detektorem.

V bakalářské práci Nadi Rosové (2008) bylo ukázáno, že výškový profil kapky je spektrálně homogenní a tudíž nebylo nutné využívat konfokalitu systému, ale naopak bylo žádoucí shromáždit rozptýlené záření z celého profilu vzorku a mít tak lepší poměr signál/šum v kratším akumulacním čase. Konfokální šterbina proto byla pro všechna měření nastavena na 400 μm , kdy laserový svazek nebyl nikterak významně omezen a měření tedy neprobíhalo v konfokálním módu mikroskopu.

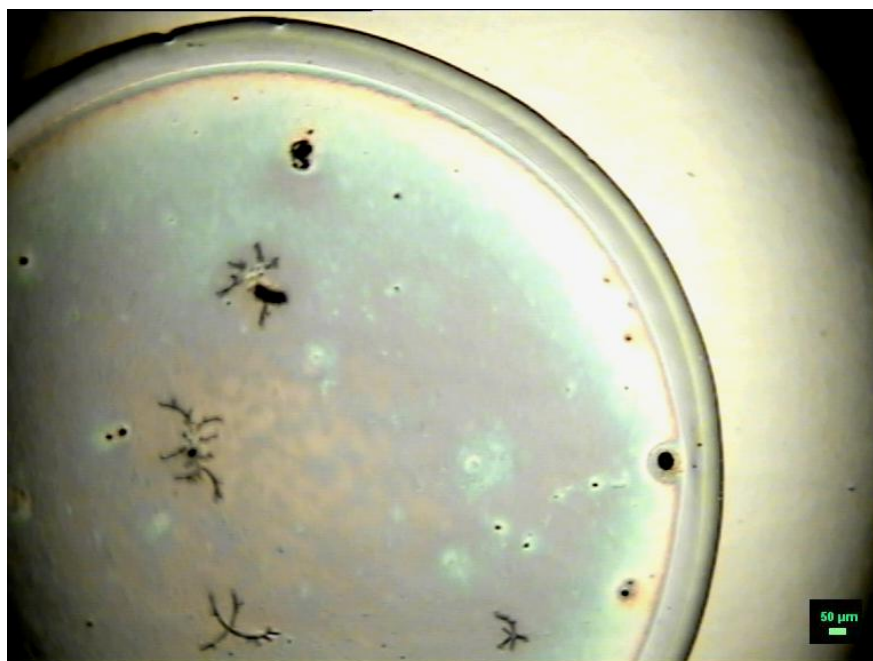
Pro všechna měření byla šterbina nastavena na 100 μm a mřížka otočena středem na 1275 cm^{-1} . Výjimku tvořilo několik posledních měření při zkoumání AD, kdy bylo měřeno kromě tohoto nastavení mřížky také s nastavením středu mřížky na 2675 cm^{-1} .

Před samotným měření byly pořízeny dvě fotografie vzorku za použití objektivu s pětinasobným zvětšením (*Obr. 2.2*) a bylo vytipováno vhodné místo k měření na okraji kapky, kam by se dle teorie v kapitole 1.3.2 měly usazovat proteiny. Na toto místo bylo zaostřeno objektivem s padesátinasobným zvětšením (*Obr. 2.3*), se kterým byla pozice pro měření ještě upřesněna. Vzhledem k nehomogenitě složení okraje vyschlé kapky, která již byla konstatována jinými autory [Kopecký a Baumruk, 2006] a ověřena v této práci (*Obr. 2.3*), bylo využito možnosti měření

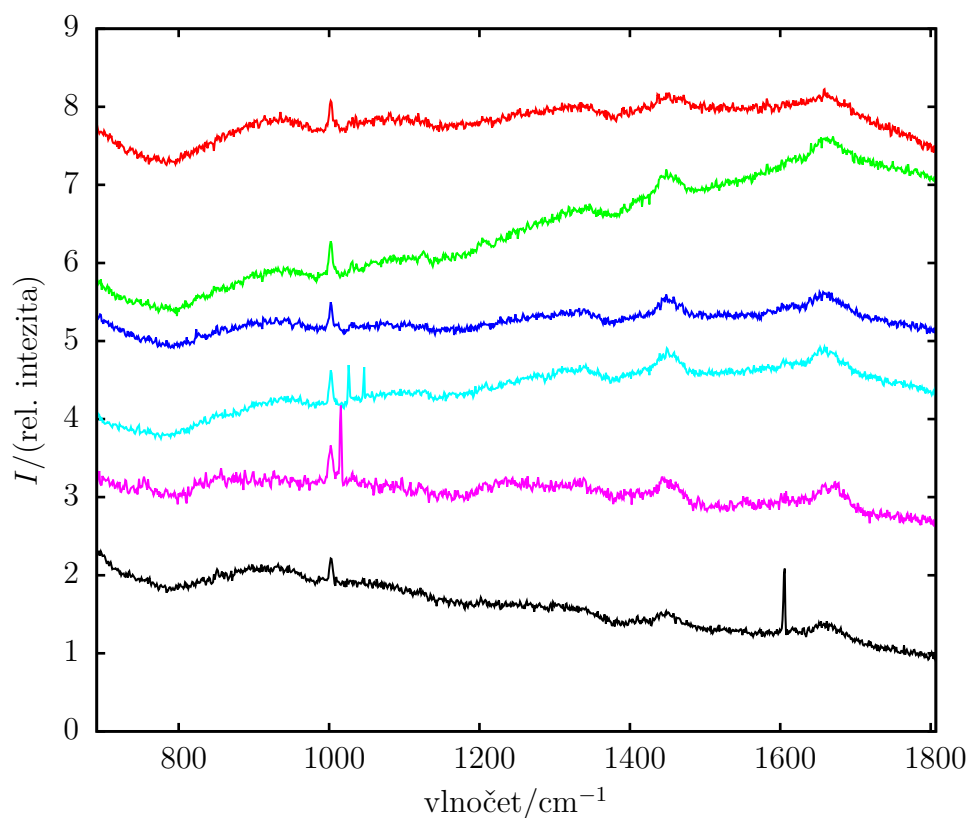
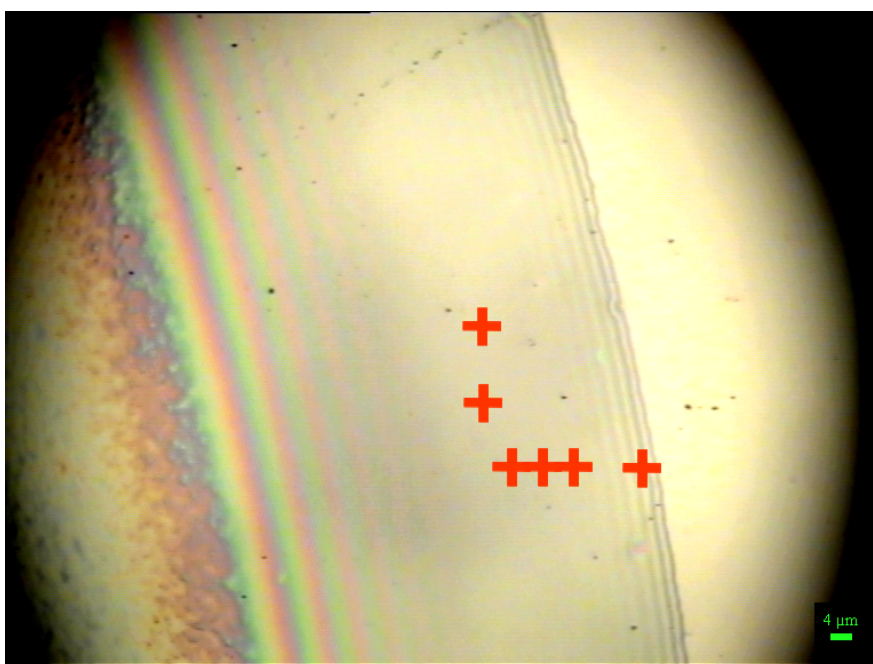
tzv. spektrálních map, kdy byla ve vzorku zvolena série bodů v obdélníkové matici, ze kterých se získala spektra (viz *Obr. 2.4*). Ke každé takto získané mapě bylo ještě naměřeno kalibrační spektrum neonové výbojky při stejném nastavení mřížky spektrografu, aby vlnočtová škála měla správné hodnoty pro všechna měření provedená v daný den a především aby byla co nejlépe zajištěna vzájemná porovnatelnost měření v různých dnech.

Následná kalibrace na proměřené čáry neonu proběhla pomocí programu *NeoKalMik07* od doc. Jiřího Boka z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy v Praze. Tento program navíc linearizoval vlnočtovou škálu pomocí lineární interpolace na škálu celočíselnou s ekvidistantním krokem jeden cm^{-1} .

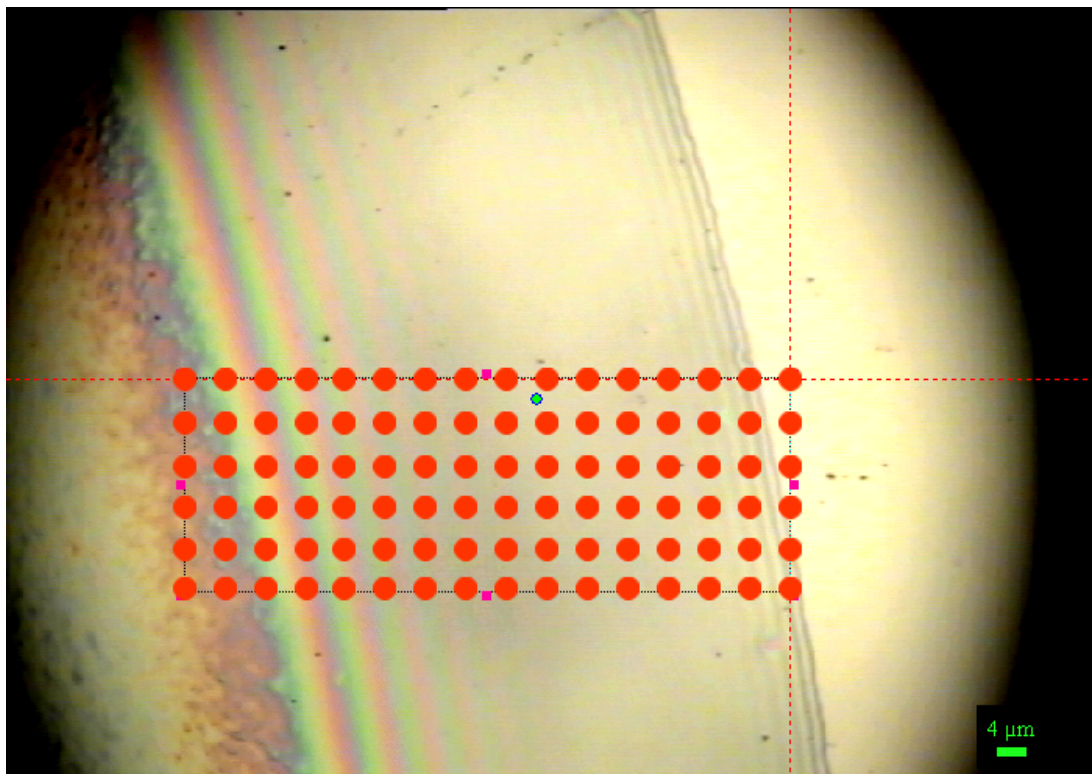
Dále bylo nutné odečíst od spekter fluorescenční pozadí. (S největší pravděpodobností způsobené stopovým množstvím hemoproteinů či hemu ve vzorcích.) K tomu s výhodou využijeme toho, že se měří mapy a že fluorescenční pozadí v různých spektrech sleduje pouze několik základních vzorů, které je možné identifikovat pomocí faktorové analýzy a které se promítnou pouze do několika prvních faktorů, přestože jsou v mapě naměřeny řádově desítky až stovky spekter. Z *Obr. 2.5* je patrné, že redukce dimenze problému pomocí faktorové analýzy je opravdu markantní a že se fluorescenční pozadí již do vyšších faktorů nepromítá (*Obr. 2.6*). Pro případ na *Obr. 2.5* lze uvažovat 5 významných faktorů dobře vystihujících 96 spekter. Za účelem odečtení pozadí ve faktorové analýze bylo využito programu *background* napsaného Janem Palackým na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy v Praze v prostředí Matlab (The Matworks, Natick, MA, USA). Ten umožňoval od každého faktoru vzniklého aplikací faktorové analýzy na celou změřenou mapu, odečíst plochu pod křivkou definovanou uživatelsky určenými body proloženými kubickými spliny (*Obr. 2.7*). Pozadí bylo odečteno u všech faktorů, na kterých byl zřetelný fluorescenční signál. Z faktorů korigovaných na



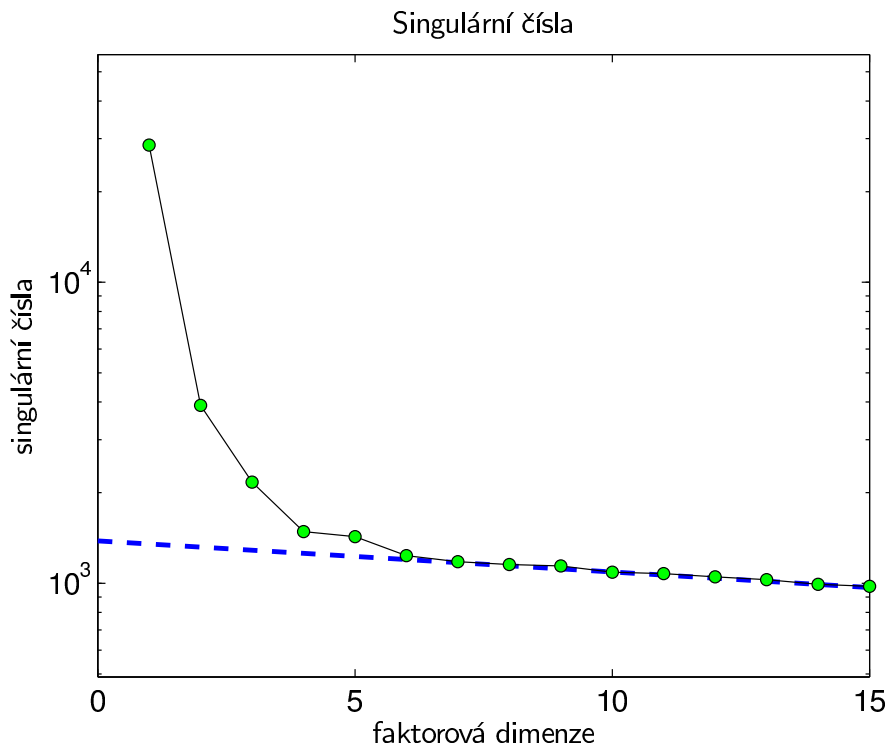
Obrázek 2.2: Část vyschlé kapky mozkomíšního moku v pětinasobném zvětšení. Vzorek byl před umístěním na DCDR substrát 20 min dialyzován a pocházel od pacienta s nedostatečnou diagnózou, který nemohl být zařazen do setu dobře charakterizovaných pacientů pro vývoj nové diagnostické metody.



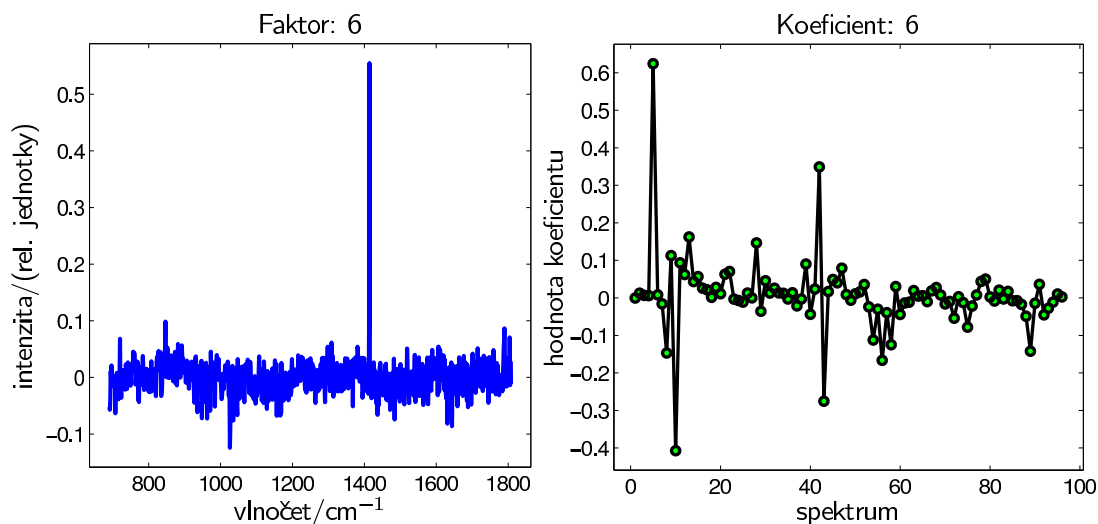
Obrázek 2.3: V horní části je zobrazena vyschlá kapka dialyzovaného mozkomíšního moku pod objektivem 50×, přičemž spektra z označených bodů jsou v dolní části. Spektra byla akumulována 3×10 sekund a vertikálně posunuta pro zřetelnější zobrazení. Ze spekter je vidět, že fluorescenční pozadí je poměrně variabilní a že do spekter pronikají pásy kosmického záření. Proto bylo přistoupeno k měření spektrálních map, aby se dala odlišná spektra dobře identifikovat a z dalšího zpracování vyřadit. Jedná se o stejný vzorek jako na *Obr. 2.2*.



Obrázek 2.4: Ukázka volby matice bodů, ze kterých se měřila spektrální mapa. Fotografie byla pořízena objektivem se zvětšením $50\times$ a vzdálenost jednotlivých bodů je $5\ \mu\text{m}$. Jedná se o stejný vzorek, jako vzorek na Obr. 2.2



Obrázek 2.5: Ukázka grafu singulárních čísel faktorové analýzy spektrální mapy změřené z bodů na Obr. 2.4. Pro lepší přehlednost grafu je zobrazeno pouze prvních 15 singulárních čísel. Prvních 5 faktorů je významných, průběh singulárních čísel ostatních faktorů je lineární, což znamená, že již pravděpodobně obsahují pouze šum (viz Obr. 2.6). Nevýznamná singulární čísla byla proložena metodou nejmenších čtverců lineární závislosti (zobrazeno přerušovanou čarou).

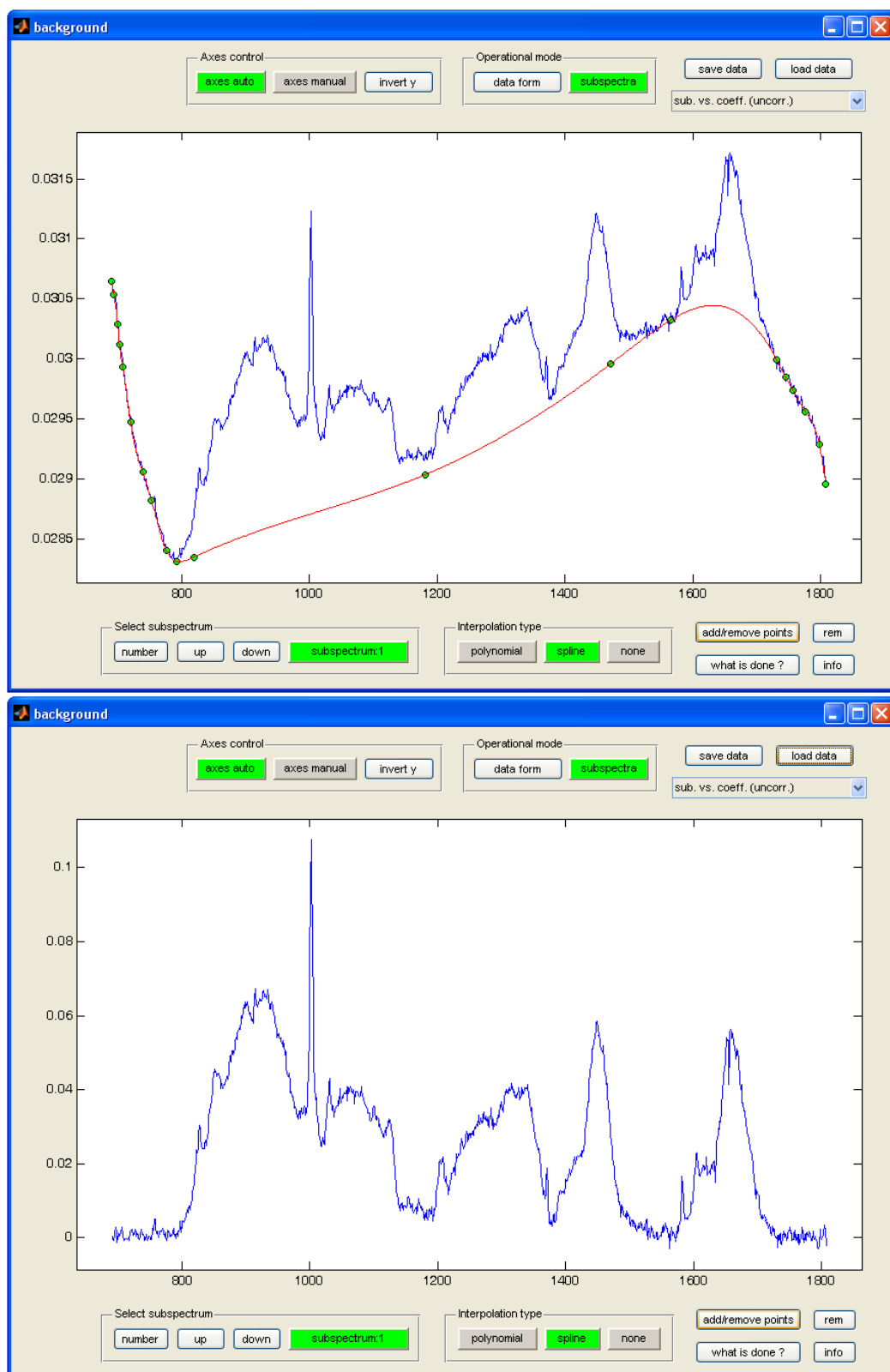


Obrázek 2.6: Ukázka šestého faktoru, který byl již dle průběhu singulárních čísel na Obr. 2.5 označen za nevýznamný (vlevo) a k němu příslušejících koeficientů zastoupení v jednotlivých spektrech (vpravo). Je zřejmé, že v takto vysokém faktoru již není zobrazen žádný náznak fluorescenčního pozadí ani důležité informace o vzorku, ale také, že kromě šumu je ve faktoru ještě obsažen pás kosmického záření. O pás kosmického záření se jedná proto, že je velmi ostrý a také z důvodu jeho lokalizace pouze v několika spektrech, což je vidět v grafu koeficientů (vpravo). Tento artefakt je ve spektrech přítomen, přestože bylo použito automatického odečítání pásů pocházejících od kosmického záření pomocí měřicího softwaru LabSpec.

pozadí pak následně bylo rekonstruováno korigované spektrum (viz Obr. 2.7). Pozadí bylo odečítáno tak, aby signál byl na 800 a 1730 cm^{-1} roven nule a na 1190 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} se nule blížil (viz Obr. 2.7). Tyto vlnočty byly voleny na základě jednoznačné dominance proteinové složky ve spektrech, pozadí tedy bylo korigováno dle pravidel pro odečítání fluorescenčního pozadí u Ramanových spekter proteinů uvedených v práci [Williams, 1986].

Dále je z Obr. 2.6 zřejmé, že jsou ve spektrech přítomny parazitní pásy způsobené průletem kosmického záření CCD detektorem i přestože měřicí program LabSpec obsahoval možnost je odstraňovat přímo při měření porovnáváním spekter z několika akumulací z jednoho bodu. Proto byl v rámci této diplomové práce ještě napsán v prostředí Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) program *Spikie* (viz přílohy), který umožňoval pásy způsobené kosmickým zářením dodatečně odečíst (viz kapitola 2.5.1).

Dále se také ve spektrálních mapách objevovaly různé spektrální nehomogenity, jejichž vliv bylo žádoucí odstranit. (Jejich nejpravděpodobnější příčinou mohly být hemoproteiny, krvinky, zbytky buněčných membrán atp., které mohly náhodně kontaminovat vzorek při odběru od pacienta. Případné nečistoty ulpěné při výrobě na DCDR substrátu však nelze rovněž vyloučit.) Proto byla spektra v mapě, která se velmi lišila od ostatních, nahrazena spektry průměrnými. K nahrazení docházelo v rámci této diplomové práce napsanou rutinou v Matlabu, která fungovala na základě faktorové analýzy. Bylo v ní možné označit spektra k vyřazení ručně nebo využít automatického označení, které spočívalo v následujícím. Spočetl se průměr a rozptyl koeficientů zastoupení subspektra v jednotlivých spektrech a pokud byl některý koeficient vzdálen od průměru o více než čtyřnásobek rozptylu, bylo k němu příslušející spektrum vyřazeno. Tento postup byl proveden pro několik nejvýznamnějších faktorů kromě prvního, který byl považován za období



Obrázek 2.7: Ilustrační obrázek k odečítání pozadí pomocí faktorové analýzy ze spektrální mapy změřené z bodů z Obr. 2.4. Zobrazen je první faktor v programu *background*. Zelené body, které byly uživatelsky zadány, jsou spojeny křivkou kubických splinů, která bude od faktoru odečtena (obrázek nahoře). Podobně se určí body i v několika dalších faktorech, které ještě obsahují známky fluorescenčního pozadí. Dole je pak zobrazen první faktor vzniklý faktorovou analýzou spektrální mapy, již s odečteným pozadím.

průměrného spektra a tak odrážel množství celkového proteinu v jednotlivých částech mapy.

2.5.1 *Spikie* – program na odečítání pásů kosmického záření

Program *Spikie* byl napsán v prostředí Matlab (The Matworks, Natick, MA, USA) v rámci této diplomové práce. Slouží k odstranění ostrých pásů z naměřených spekter, které vznikají průletem kosmického záření CCD detektorem. Idea algoritmu pocházela od doc. Jiřího Boka (Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze). Algoritmus je založen na následujícím postupu. Nejprve se vypočte diferenční spektrum \mathbf{d} mezi spektrem vyhlazeným Savitzkého-Golayovým filtrem \mathbf{v} a spektrem neupraveným \mathbf{u} (viz *Obr. 2.10*)

$$\mathbf{d} = \mathbf{u} - \mathbf{v}, \quad (2.19)$$

kde je třeba ve vektoru \mathbf{u} neupraveného spektra uvažovat pouze body vyhlazené Savitzkého-Golayovým filtrem.

Následně se spočte směrodatná odchylka tohoto diferenčního spektra

$$s = \sqrt{\sum_i^n \frac{d_i^2}{(n-1)}}, \quad (2.20)$$

kde n značí počet bodů vyhlazeného spektra. Střední hodnota diferenčního spektra je zde předpokládána nulová, což plyne z podstaty Savitzkého-Golayova filtru v ideálním případě, kdy tento filtr odstraňuje pouze Gaussovský šum metodou nejmenších čtverců. Dále se předpokládá, že pásy kosmického záření jsou velmi ostré, a proto budou Savitzkého-Golayovým filtrem silně vyhlazeny. Pro identifikaci pásů kosmického záření se určí hranice h v násobcích směrodatné odchylky, o kterou se musí takovýto pás lišit od vyhlazeného spektra. Za pásy kosmického záření jsou pak označeny všechny prvky v_i vektoru \mathbf{v} stupních spekter takové, jejichž difference d_i splňují následující podmínku

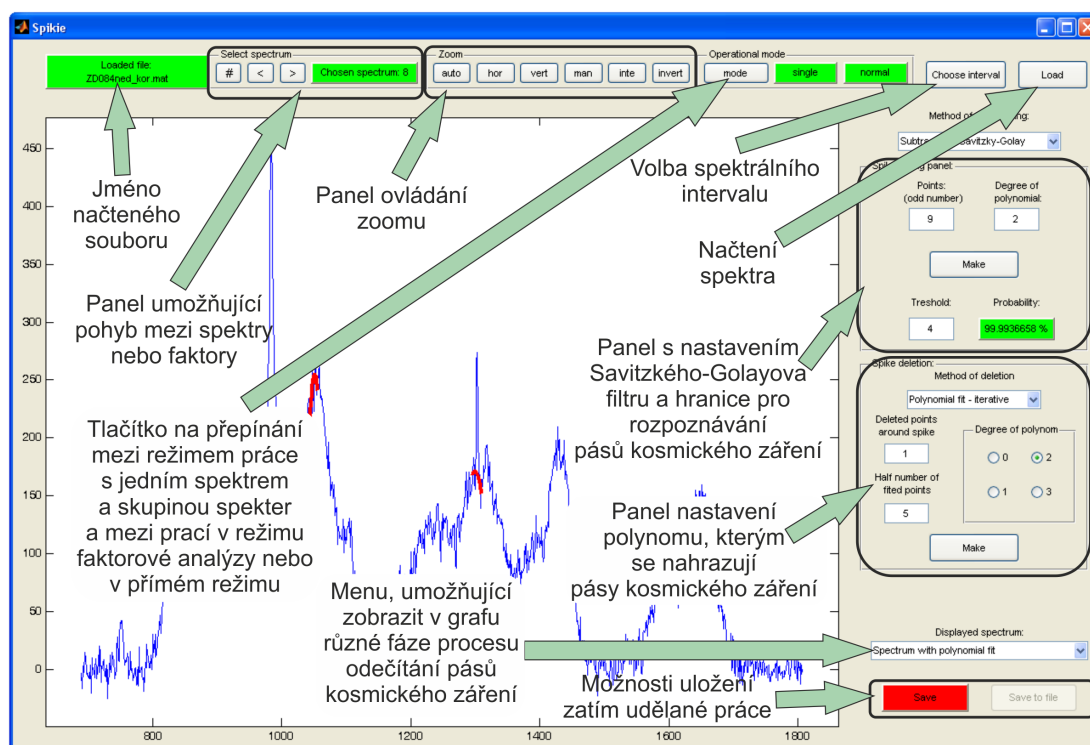
$$\frac{d_i}{s} > h \quad (2.21)$$

Poté se určí, kolik bodů v okolí označených bodů pás zdeformuje. Ty dále budou považovány také za součást odečítaného pásu. Takto označené pásy se v původním spektru nahradí hodnotami polynomu proloženého okolím pásu. Program umožňuje i volbu iterativního postupu, kdy se tento proces znovu opakuje na nově vzniklém spektru, až již nedochází k označení nových bodů.

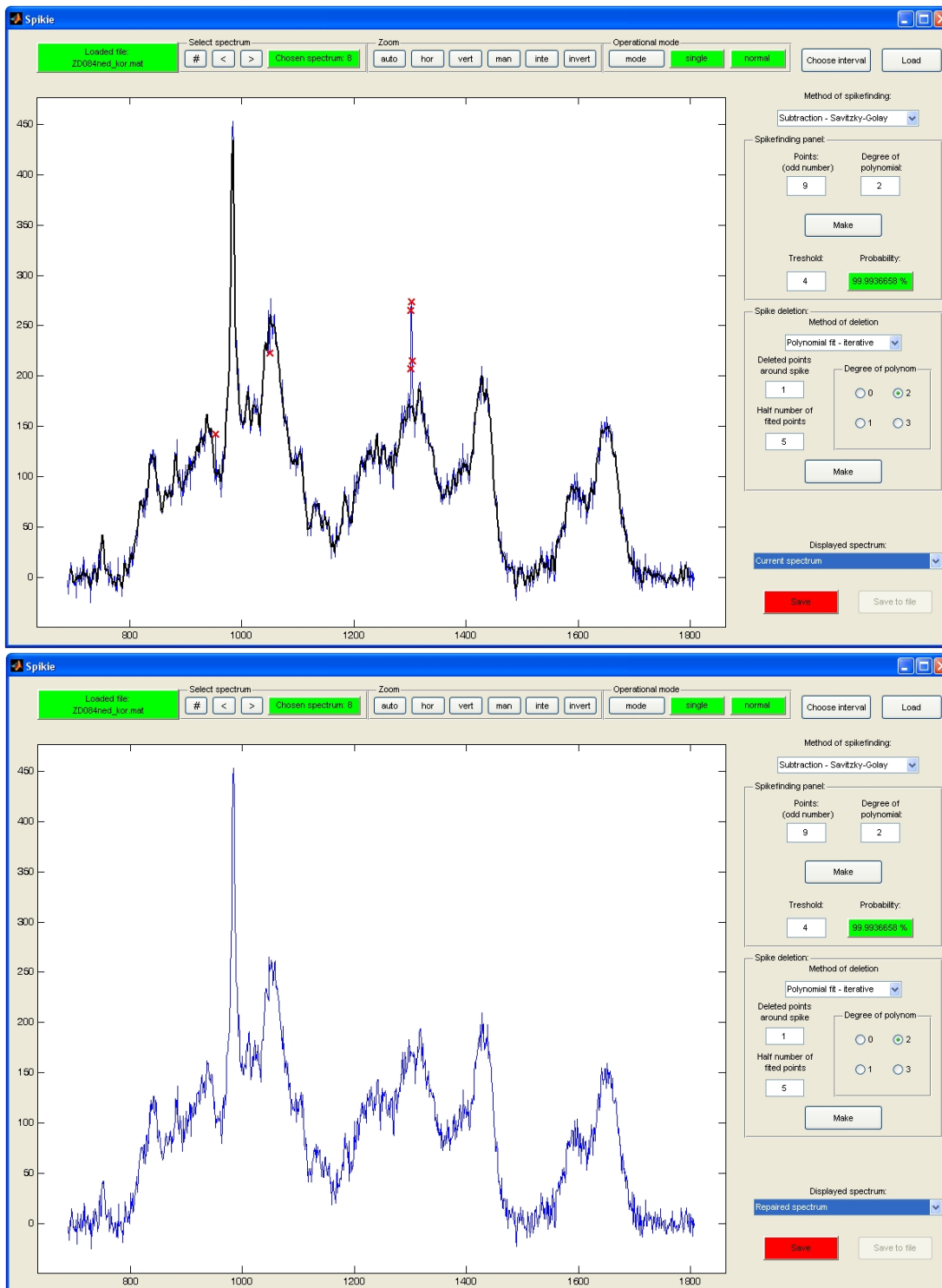
Tento algoritmus je také možné aplikovat pouze na spektrální podintervaly vložených dat nebo na celou skupinu spekter. Program také umožňuje provést faktorovou analýzu skupiny spekter a poté algoritmus aplikovat na jednotlivé faktory. Faktorová analýza by totiž mohla v procesu rozkladu do jednotlivých faktorů pásy kosmického záření separovat od ostatních informací, a tak by mohlo být jednodušší je odečíst. Tento předpoklad se potvrdil pouze částečně, protože se v některých případech ostré pásy promítají do více faktorů a pak se jejich ostrost snižuje a jejich identifikace je naopak o něco náročnější.

V programu je možné ovládat nastavení Savitzkého-Golayova filtru (velikost datového okna a stupeň polynomu), stupeň polynomu a počet bodů, kterými se bude prokládat při odečítání pásu kosmického záření a hranici pro identifikaci pásů kosmického záření, přičemž tato hranice je přepočítána na pravděpodobnost jejího nepřekročení za předpokladu Gaussovského rozptylu diferenčního spektra. Celý postup je možné sledovat vizuálně v grafickém rozhraní programu. Stručný popis grafického rozhraní je uveden v *Obr. 2.8*

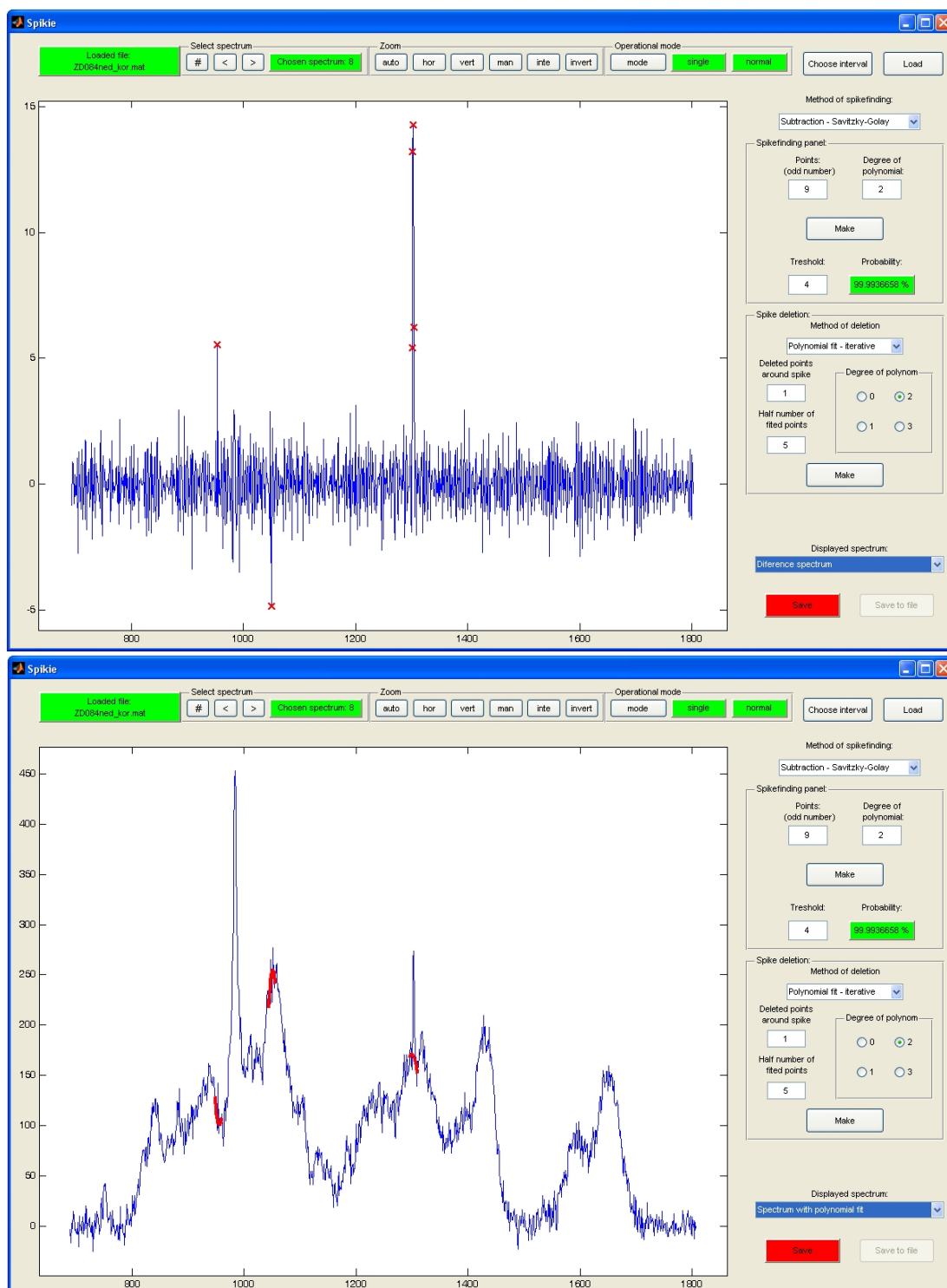
Pro účely této diplomové práce bylo používáno převážně nastavení Savitzkého-Golayova filtru s polynomem druhého stupně a datovým oknem přes 9 bodů. Práh pro nalezení pásů kosmického záření byl zvolen na čtyřnásobek směrodatné odchylky diferenčního spektra, což odpovídalo pravděpodobnosti nepřekročení této hranice pro Gaussovský šum přibližně 99,9937%. V této práci bylo v každém spektru přes 1100 bodů, což znamená, že jako pás kosmického záření byl chybně určen jeden bod přináležející šumu přibližně v každém patnáctém analyzovaném spektru. Polynom pro odečítání pásů kosmického záření byl většinou volen druhého stupně a prokládán pěti body (nebo polovinou zvolené délky datového okna, pokud mělo jiný počet bodů než devět) na každou stranu odečítaného pásu.



Obrázek 2.8: Popis grafického rozhraní programu *Spikie*



Obrázek 2.9: Ilustrační obrázek odečítání pásů kosmického záření pomocí programu Spikie. Nahoře je spektrum proložené Savitzkého-Golayovým filtrem s označenými pásy kosmického záření, dole je to samé spektrum, ve kterém jsou již pásy odečteny. Diferenční spektrum, dle kterého byly určeny pásy kosmického záření, je v Obr. 2.10



Obrázek 2.10: Nahoře je obrázek zobrazení diferenčního spektra mezi neupraveným spektrem a filtrovaným spektrem pomocí Savitzkého-Golayova filtru. Použité spektrum je uvedeno v Obr. 2.9 nahoře. Kolem bodů označených v diferenčním spektru byl v tomto případě uvažován ještě na každou stranu jeden bod, který je pásem kosmického záření postížen a který bude také odečten. Body vybrané k odečtení byly nahrazeny hodnotami polynomů druhého stupně, které byly proloženy pěti body po obou stranách označených pásů (zobrazeno na obrázku dole).

Kapitola 3

Výsledky měření

Experimentální část práce se skládala ze dvou etap. V první bylo třeba optimalizovat podmínky měření, vyjasnit otázku skladování vzorků a osvojit si měřicí i matematické metody, aby měření v druhé části, která se zabývala spektrálním rozlišením nemocných pacientů od zdravých, byla co nejpřesnější a co nejvíce reprodukovatelná. Optimalizace měřicích podmínek pokračovala v návaznosti na bakalářskou práci Nadi Rosové 2008, ve které bylo ukázáno, že vzorky mají spektrálně homogenní výškový profil a tak není třeba měřit v konfokálním módu. Dále se ve zmíněné práci také konstatuje, že vzorky deponované na substrát, na rozdíl od čistého proteinu (Zhang et al. (2003) zjistili, že se DCDR vzorky čistých proteinů nemění v řádu týdnů), podléhají poměrně rychlé degradaci, pokud se skladují za běžných podmínek. Spektrální změny byly pozorovatelné již za tři dny od připravení vzorků. DCDR vzorky proto byly skladovány v lednici při 5 °C, čímž se rozklad výrazně zpomalil.

Jako první byla v této práci zkoumána možnost použití mikrodialýzy, která ze vzorků odstraní nízkomolekulární látky, jež jsou nejspíše zodpovědné za tvorbu krystalů ve vzorku [Filik a Stone, 2008]. Nedialyzované vzorky totiž tvoří pouze malý prstýnek, který je navíc velmi narušený krystaly [Rosová, 2008].

3.1 Optimalizace použití dialýzy

Použitím mikrodialýzy by se dala snížit složitost problému a tím ulehčit následné provedení diagnózy na základě DCDR spekter. Dialýza byla zkoumána ve třech nezávislých měřeních na třech různých osobách z pokusné skupiny vzorků, přičemž příprava vzorků od každé osoby probíhala v jiný den. Ze vzorku od každého jedince byla nanášena na DCDR substrát jedna nedialyzovaná kapka a několik kapek dialyzovaných s různou dobou dialýzy. Podrobnosti jsou uvedeny v *Tab. 3.1*. Spektra byla měřena v podobě spektrálních map, přičemž z každého bodu bylo spektrum akumulováno 3×10 s. Mapa pro vzorek č. 11 a 49 byla měřena z matice 10×10 bodů, pro vzorek č. 19 z matice 20×5 bodů, přičemž matice byla volena tak, aby co nejvíce zasahovala do středu kapky. Všechny mapy měly rozteč bodů 5 μm.

Vliv dialýzy na morfologii kapky je patrný i vizuálně. Snímky kapek vzorku č. 11 za použití objektivu 5× jsou uvedeny v *Obr. 3.1* a kapek vzorků od všech osob za použití objektivu 50× v *Obr. 3.2, 3.3* a *3.4*. V obrázcích nedialyzovaných kapek jsou zřetelné struktury krystalů solí a močoviny, které prorůstají depozitem.

Číslo vzorku	Doba dialýzy (min)						
	0	5	10	15	20	25	30
11	ano	ano	ano	ano	ano	–	–
19	ano	ano	ano	ano	–	ano	–
49	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

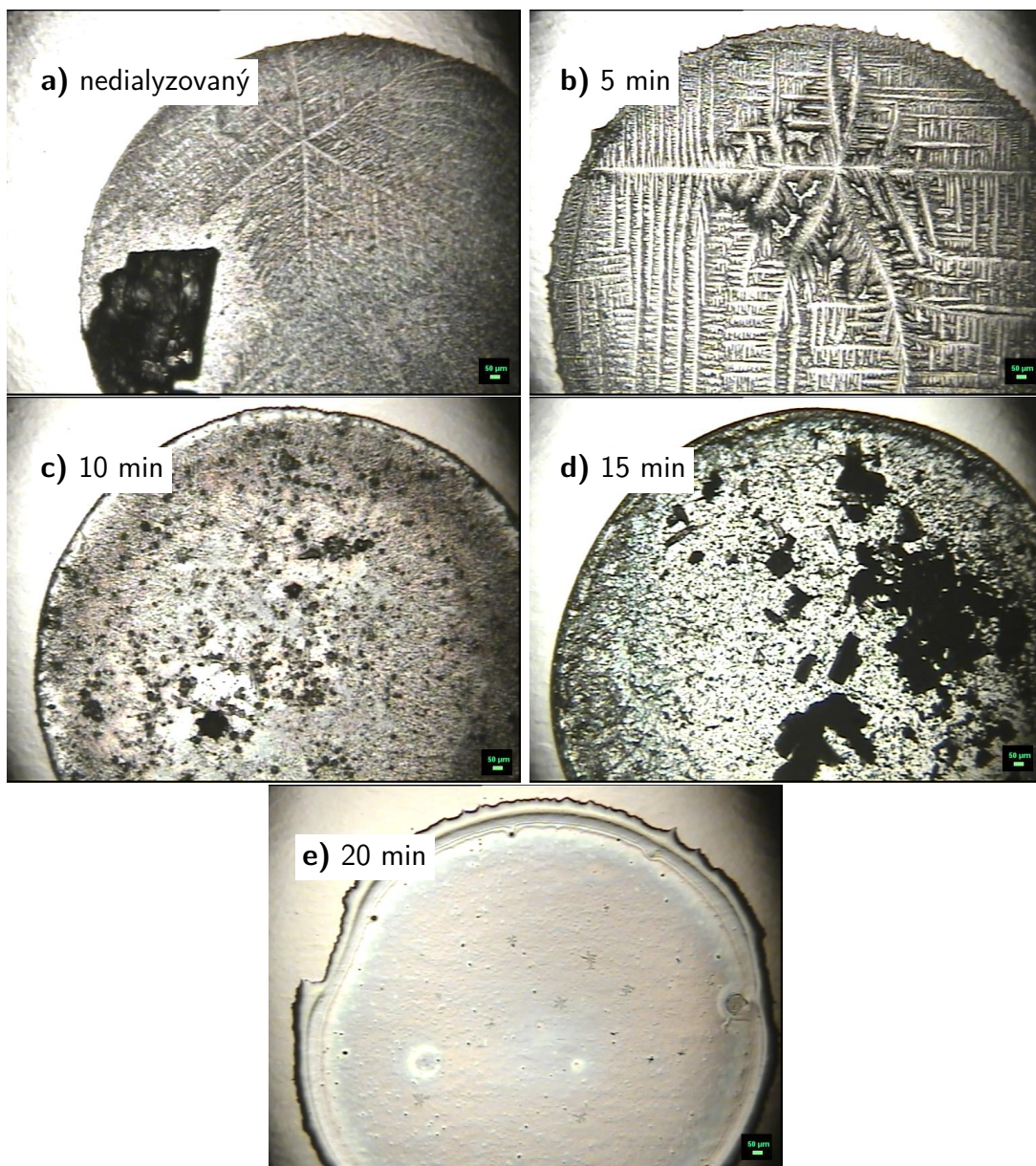
Tabulka 3.1: Shrnutí zkoumaných dob dialyzace vzorků pro různé osoby. Doba 0 min znamená, že dialýza vůbec neproběhla.

Číslo vzorku	Doba dialýzy/min						
	0	5	10	15	20	25	30
49	9	6	4	4	3	6	5
19	9	9	5	4	–	5	–
11	8	8	10	11	6	–	–

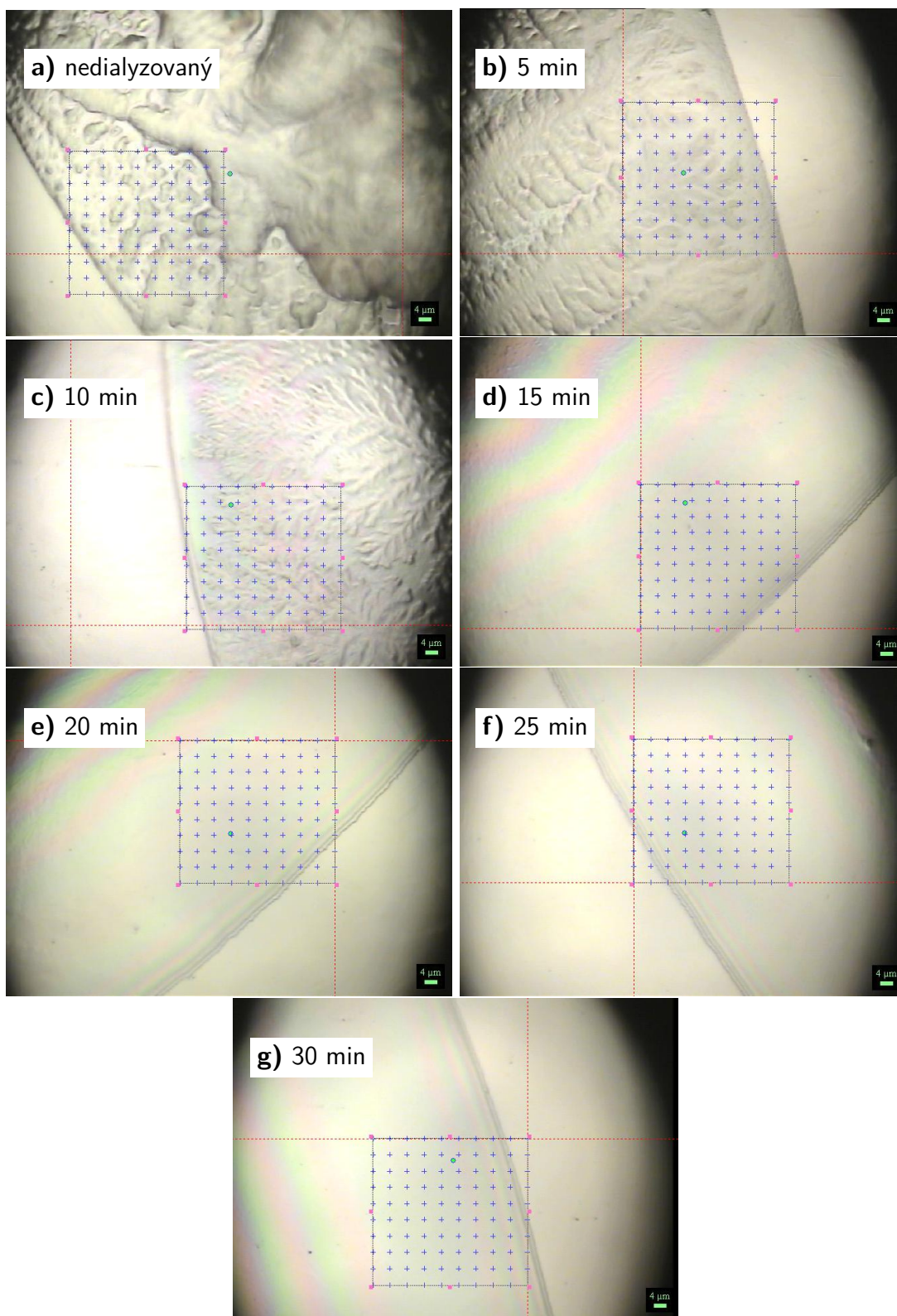
Tabulka 3.2: Počet významných faktorů v závislosti na době dialýzy

Tyto struktury s dobou dialýzy postupně mizí, až přibližně po 20 min dialýzy již nejsou v obraze pod mikroskopem prakticky pozorovatelné. S rostoucí dobou dialýzy je také čím dál více patrný prstýnek vzniklý usazováním proteinů na okraji kapky.

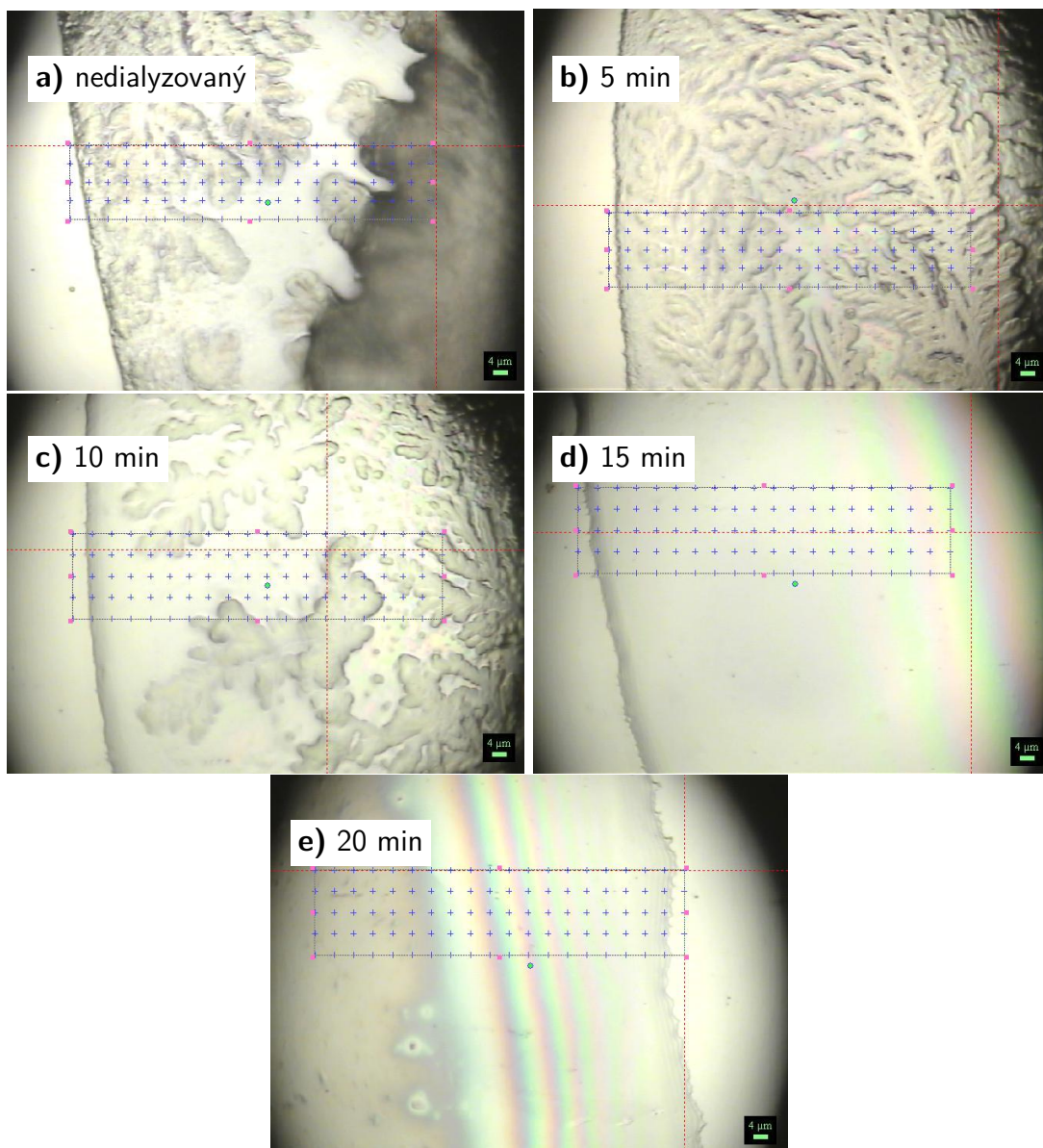
Jako měřítko složitosti systému byl uvažován počet významných faktorů získaných faktorovou analýzou naměřené mapy. Faktory byly považovány za nevýznamné, pokud jejich hodnoty dosáhly lineární závislosti. Průběhy singulárních čísel jsou uvedeny v Obr. 3.5, 3.6 a 3.7, přičemž výsledky jsou shrnuty v Tab. 3.2 a Obr. 3.8. Z Obr. 3.8 je patrný klesající počet významných faktorů s rostoucí dobou dialýzy. Dialyzované vzorky jsou tedy spektrálně homogennější, což by mohlo přispět k lepší reprodukovatelnosti měření. Tento obrázek také ukazuje, že počet významných faktorů není příliš reprodukovatelný. Proto byla další otázkou reprodukovatelnost měření. Nejprve bylo ověřeno, zdali by nebylo možné zlepšit reprodukovatelnost vybělováním vzorků těsně před měřením.



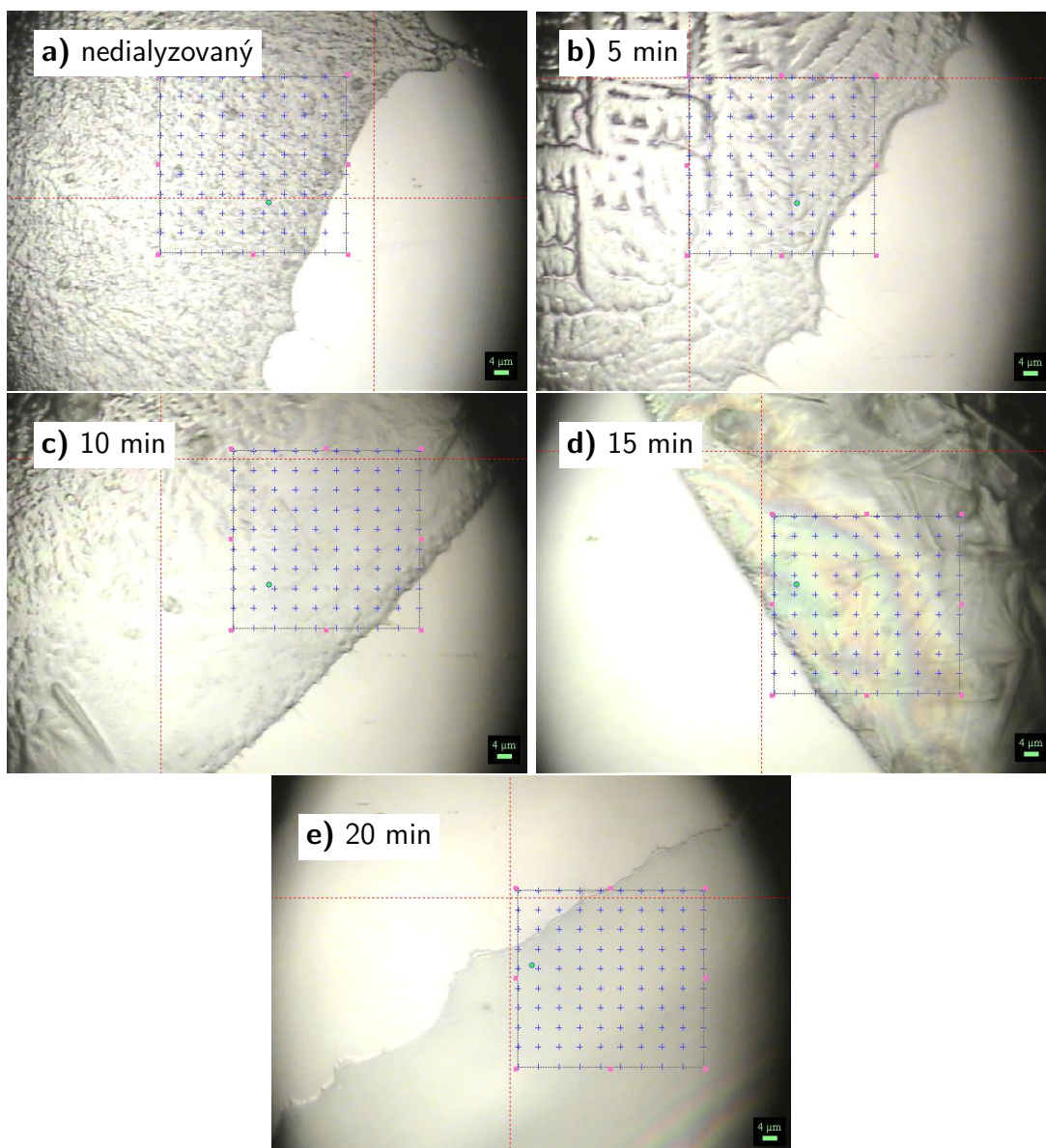
Obrázek 3.1: Fotografie vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 11 za použití objektivu 5×.



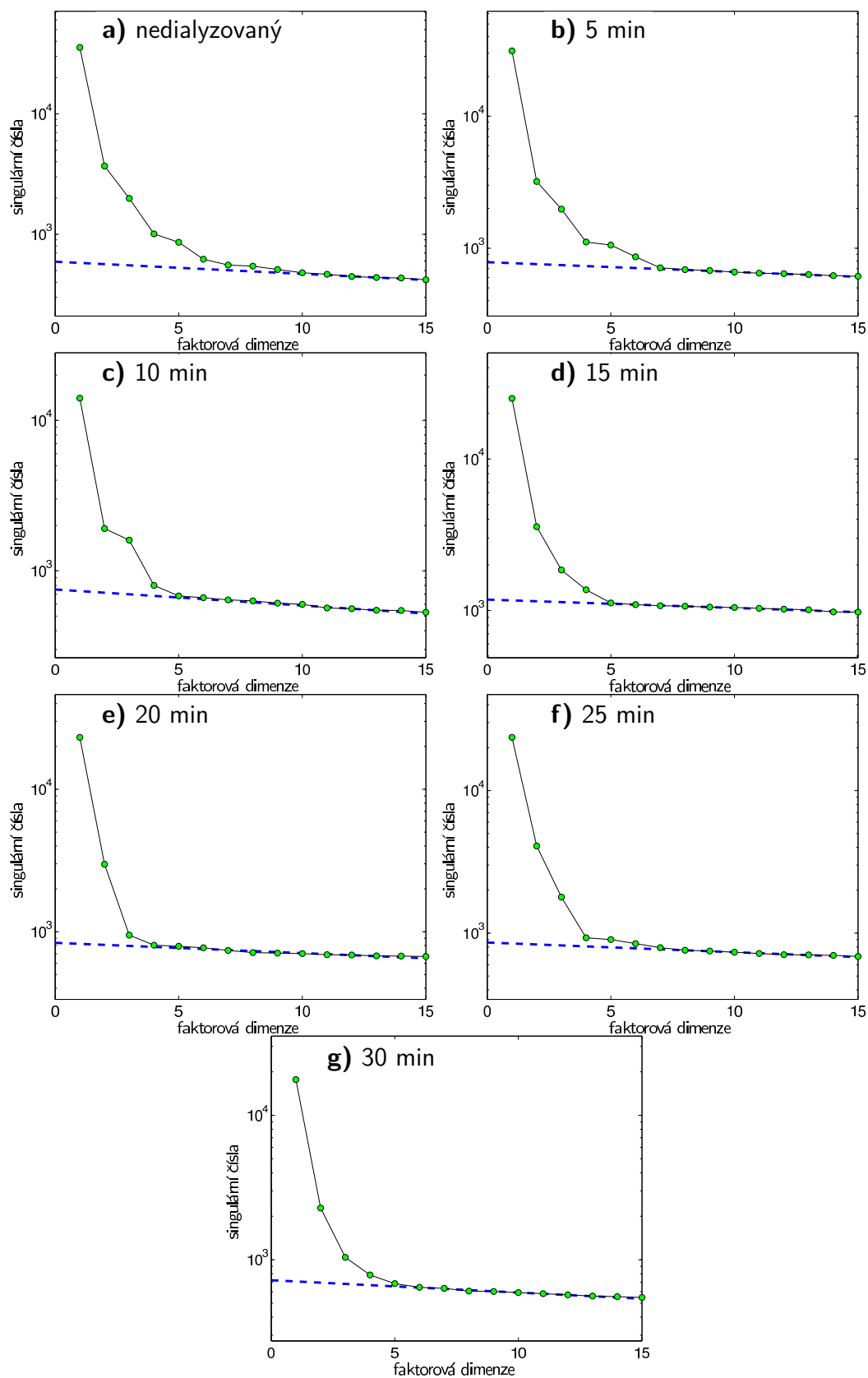
Obrázek 3.2: Fotografie vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 49 za použití objektivu 50×.



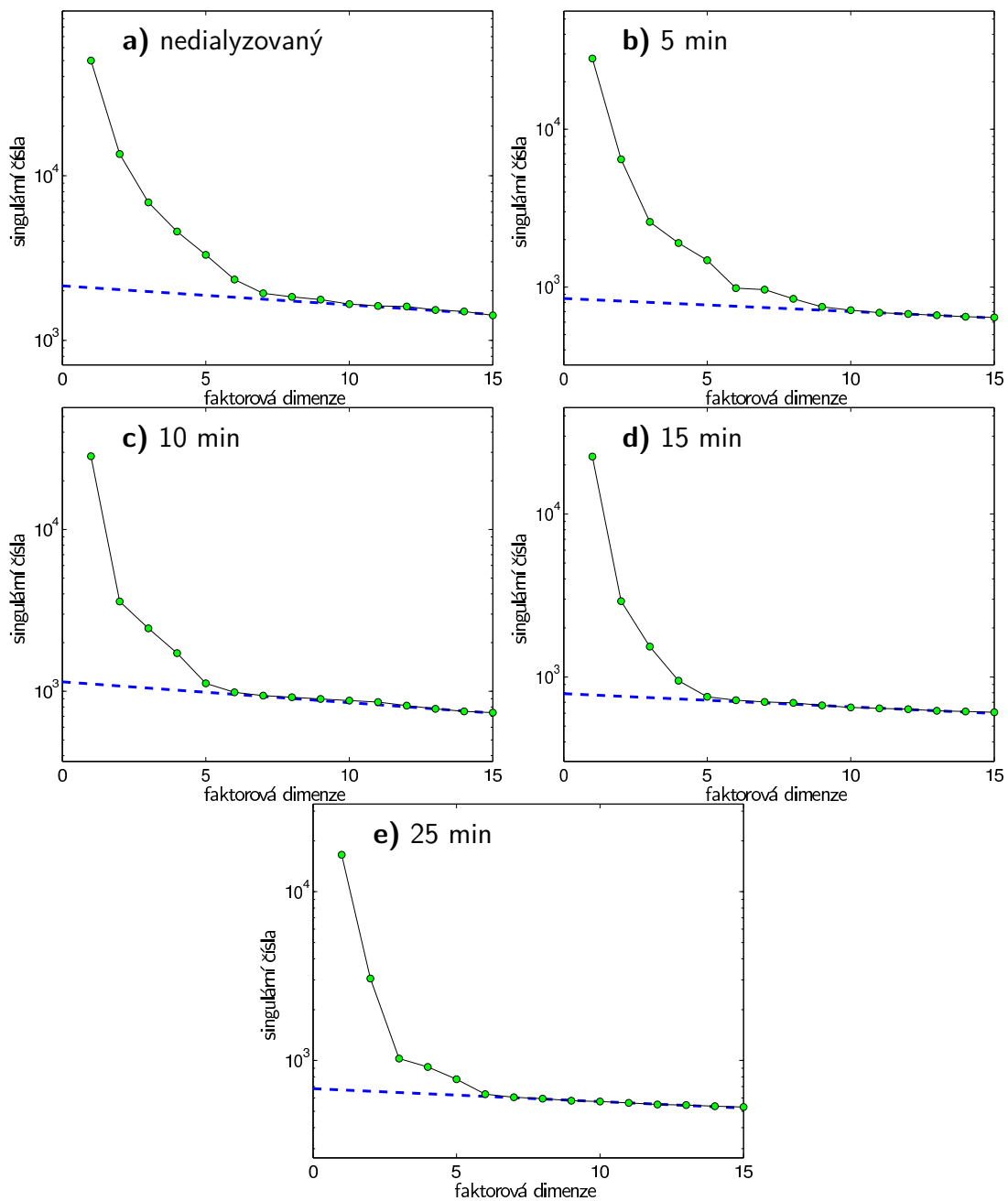
Obrázek 3.3: Fotografie vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 19 za použití objektivu 50×.



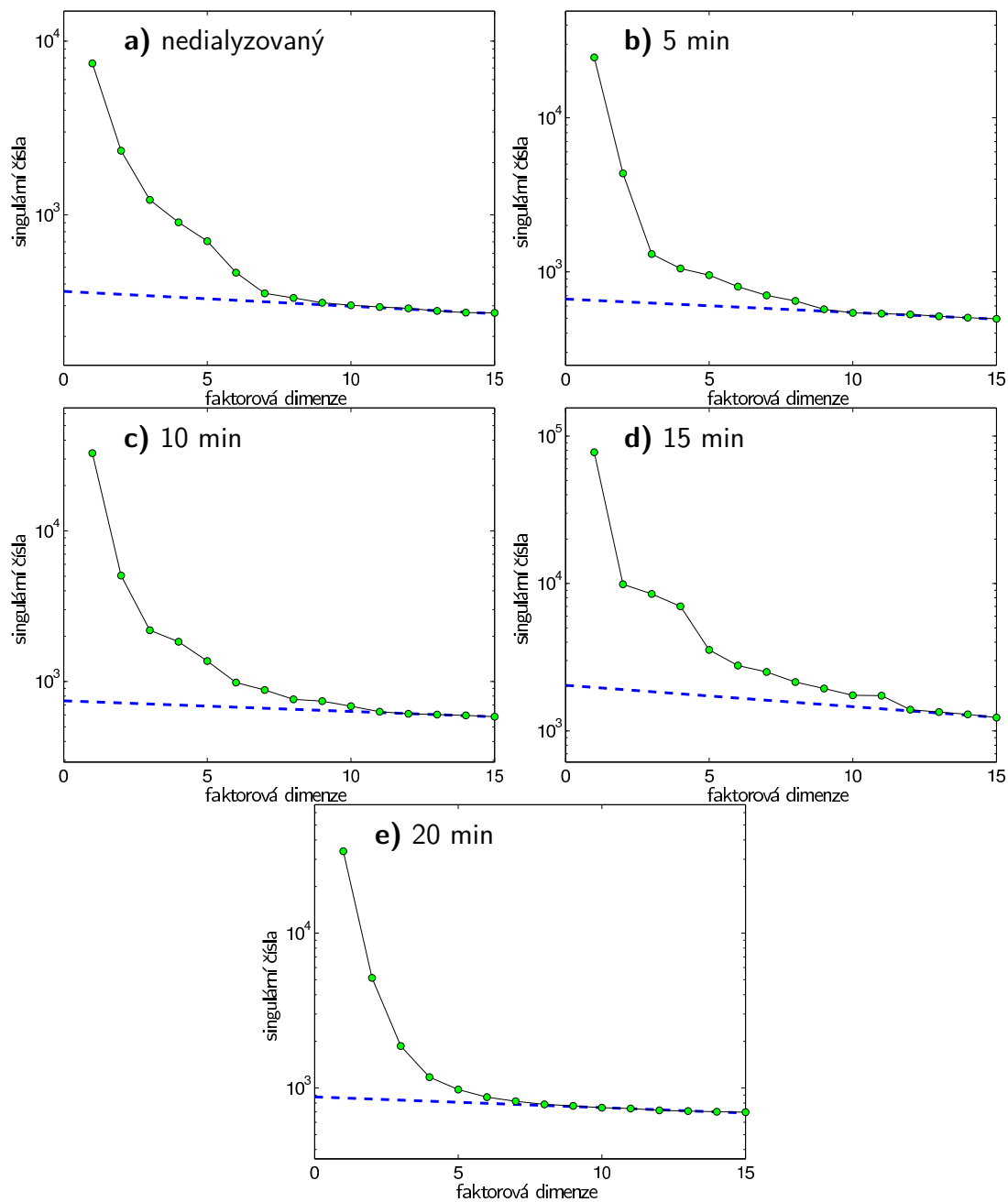
Obrázek 3.4: Fotografie vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 11 za použití objektivu 50×.



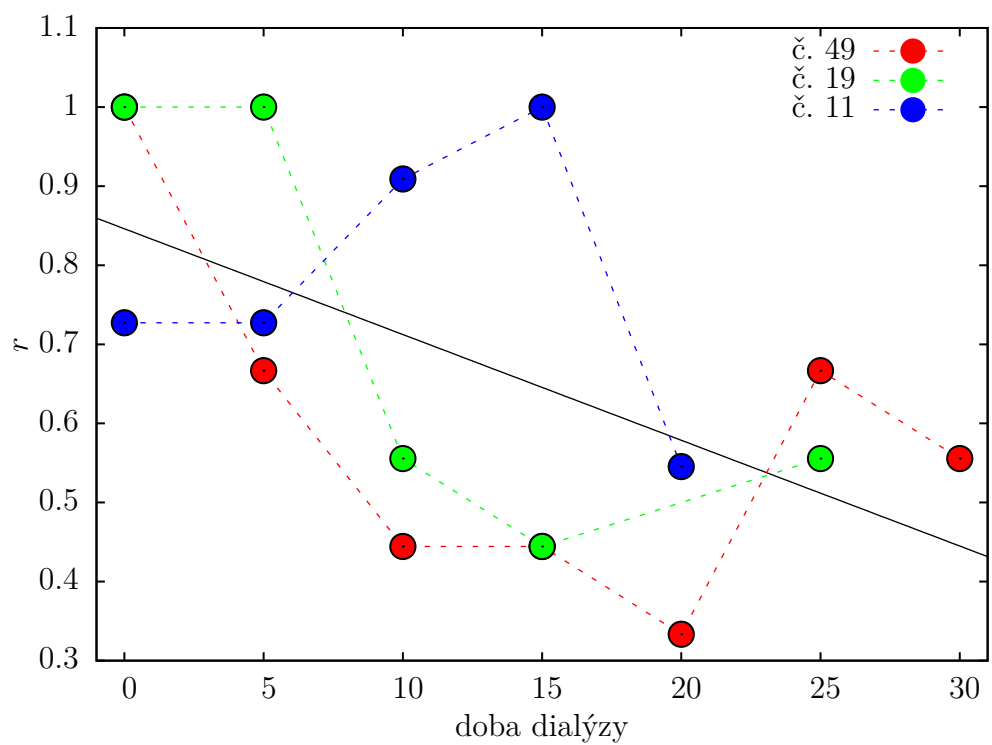
Obrázek 3.5: Singulární čísla faktorové analýzy spektrálních map měřených ze vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 49. Kvůli lepší čitelnosti je zobrazeno pouze prvních 15 singulárních čísel. Nevýznamná singulární čísla byla proložena metodou nejmenších čtverců lineární závislosti (zobrazeno přerušovanou čarou)



Obrázek 3.6: Singulární čísla faktorové analýzy spektrálních map měřených ze vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 19. Kvůli lepší čitelnosti je zobrazeno pouze prvních 15 singulárních čísel. Nevýznamná singulární čísla byla proložena metodou nejmenších čtverců lineární závislosti (zobrazeno přerušovanou čarou).



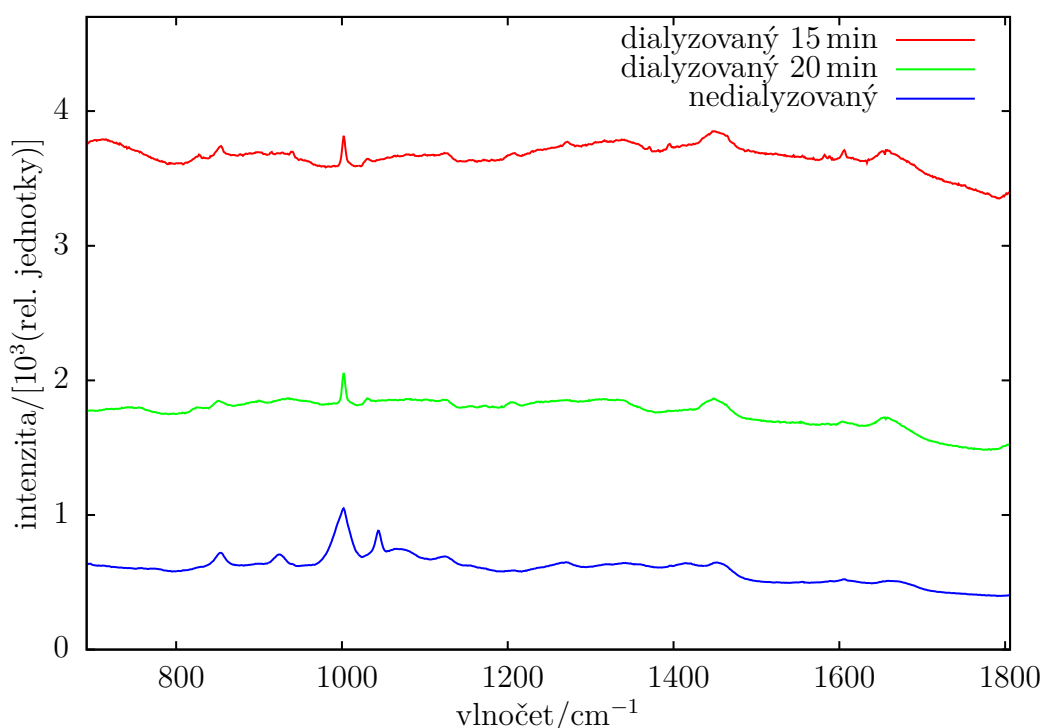
Obrázek 3.7: Singulární čísla faktorové analýzy spektrálních map měřených ze vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 11. Kvůli lepší čitelnosti je zobrazeno pouze prvních 15 singulárních čísel. Nevýznamná singulární čísla byla proložena metodou nejmenších čtverců lineární závislosti (zobrazeno přerušovanou čarou).



Obrázek 3.8: Závislost složitosti vzorku na době dialýzy. Poměr r byl spočten jako podíl mezi počtem faktorů pro dobu dialýzy a maximálním počtem faktorů u daného vzorku. Všechny hodnoty poté byly proloženy lineární závislostí metodou nejmenších čtverců (černá čára) pro zvýraznění trendu klesající složitosti s přibývajícím dobou dialýzy.

3.2 Vybělování vzorků

Hned při prvním měření, které probíhalo v této práci na vzorku č. 49 bylo zjištěno, že spektra jsou „posazena“ na vysokém fluorescenčním pozadí, které by mohlo vnášet nepřesnost do výsledků ve fázi odečítání pozadí a zhoršovat poměr signál/šum. Spektra nekorigovaná na pozadí a vzniklá průměrováním přes celé spektrální mapy změřené z depositů vzorku č. 49 s různou dobou dialýzy, jsou uvedena v *Obr. 3.9*, ze kterého je patrné, že signál fluorescenčního pozadí byl v některých případech více jak desetkrát silnější než intenzita nejvyššího pásu ve spektru. Nejnižší fluorescenční pozadí bylo u nedialyzovaného vzorku. Proto bylo ověřeno, zdali by vliv fluorescenčního pozadí na reprodukovatelnost výsledků nesnížilo vybělování vzorků.

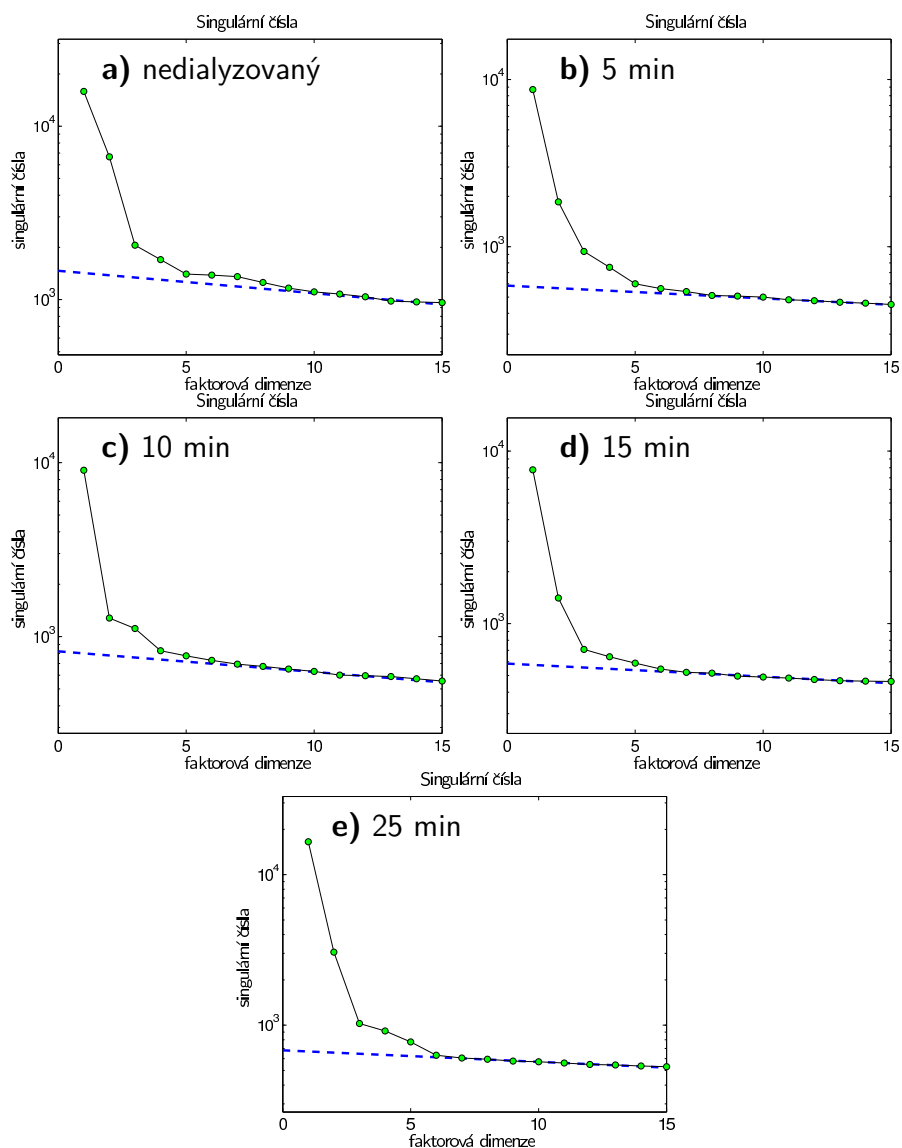


Obrázek 3.9: Průměrná spektra nekorigovaná na pozadí vzorku č. 49 s různou dobou dialýzy. Ve spektrech je patrné vysoké fluorescenční pozadí, zvláště u 15 min dialyzovaného vzorku, kde dosahuje signál fluorescenčního pozadí patnáctinásobku nejintenzivnějšího pásu.

Účinnost vybělování byla testována v průběhu zkoumání dialýzy na vzorku č. 19. Spektra byla z každého bodu akumulována ve dvou fázích. Nejprve se z měřeného bodu spektrální mapy změřilo spektrum s akumulací 3×3 s, které reprezentovalo vybělování a hned poté se z toho samého bodu změřilo spektrum s akumulací 3×10 s. Jako měřítko složitosti byla znovu brána faktorová dimenze získaná aplikací faktorové analýzy na celou spektrální mapu. Grafy singulárních čísel vybělovacího setu jsou zobrazeny v *Obr. 3.10*, singulární čísla následného měření byla diskutována v předchozí kapitole 3.1 v *Obr. 3.6*. Z grafů odečtené faktorové dimenze pro oba případy jsou uvedeny v *Tab. 3.3*. Z tabulky je zřetelné, že fluorescenční pozadí se daří poměrně dobře odečíst a že nedochází ke snižování složitosti systému v důsledku takto dlouhého vybělování. Od vybělování tedy bylo v dalším postupu upuštěno a reprodukovatelnost měření byla zkoumána bez něj.

vzorek	Doba dialýzy/min				
	0	5	10	15	25
nevybělený	9	7	6	5	5
vybělený	9	9	5	4	5

Tabulka 3.3: Faktorová dimenze spektrálních map měřených bez vybělení s akumulací dobou 3×3 s a po 9s vybělování každého bodu. Obě spektrální mapy byly měřeny ze zcela identických bodů v těsném sledu za sebou. Je zřetelné, že fluorescenční pozadí se daří poměrně dobře odečíst a že nedochází ke snižování složitosti systému v důsledku takto dlouhého vybělování.



Obrázek 3.10: Singulární čísla faktorové analýzy spektrálních map měřených ze vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 19 před vybělením. Singulární čísla spektrálních map po vybělení vzorků jsou uvedena v Obr. 3.6. Pro lepší čitelnost je zobrazeno pouze prvních 15 singulárních čísel. Nevýznamná singulární čísla byla proložena metodou nejmenších čtverců lineární závislosti (zobrazeno přerušovanou čarou).

3.3 Reprodukovatelnost měření

Aby byla měření reprodukovatelnější, přistoupili jsme k měření spektrálních map. Vzhledem ke složitosti systému bylo však nutné i v tomto případě reprodukovatelnost prověřit. V první fázi byly změřeny spektrální mapy ze dvou různých míst té samé kapky vzorku od pacienta č. 19 (*Obr. 3.11–3.16*). Ve druhé fázi poté byla prozkoumána reprodukovatelnost spekter mezi dvěma různými kapkami vzorku od pacienta č. 49 (*Obr. 3.17–3.21*). Měření bylo provedeno pro nedialyzovaný a 20 min dialyzovaný vzorek. Doba akumulace byla 3×10 s a rozteč bodů v mapě, ze kterých se měřila spektra byla $5 \mu\text{m}$. Na spektrální mapy byla následně aplikována faktorová analýza a byly porovnávány jednotlivé faktory. Ve všech případech byl první faktor velmi dominantní a k němu příslušející singulární číslo bylo přibližně o jeden řád větší než následující singulární čísla.

Z *Obr. 3.11* je patrné, že v případě měření ze dvou míst stejné nedialyzované kapky, jsou si první faktory velmi podobné a dochází pouze k mírným změnám v poměru intenzity pásů, které jsou nejzřetelnější u dvou nejdominantnějších pásů na 1002 a 1079 cm^{-1} . Pro porovnání druhých faktorů je třeba brát v úvahu i faktory třetí. Ve druhém faktoru v *Obr. 3.12* nalevo jsou pásy jak na intervalu s dominantními pásy přibližně mezi 920 cm^{-1} a 1130 cm^{-1} , tak v oblasti amidu I ($\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$), CH_2 deformačních vibrací ($\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$) i amidu III ($\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$), kdežto napravo druhému faktoru dominuje pás 1079 cm^{-1} a změny v ostatních pásech jsou přítomny až ve třetím faktoru. Třetí faktor nalevo tyto pásy nevykazuje. Ve třetích faktorech jsou také přítomny pásy na 1062 cm^{-1} a 1089 cm^{-1} , které jsou oddělené výrazným negativním pásem a které přísluší rozšíření pásu na 1079 cm^{-1} . Také pás na 956 cm^{-1} a negativní pás na 1002 cm^{-1} je přítomen ve 3. faktorech měření z obou míst na kapce. Porovnávání dalších faktorů v tomto případě je již velmi spekulativní (viz *Obr. 3.13*).

První faktory dvou spektrálních map ze stejné kapky z 20 min dialyzovaného vzorku (viz *Obr. 3.14*) jsou si velmi blízké. Je to dáno také tím, že v nich již není přítomen pás na 1079 cm^{-1} , v jehož poměru intenzity vůči pásu fenylalaninu na 1002 cm^{-1} docházelo k drobným změnám. Druhý a třetí faktor (viz *Obr. 3.15*) také obsahují velmi podobné spektrální vzory a jisté odlišnosti lze spatřit až ve čtvrtém a pátém faktoru (viz *Obr. 3.16*).

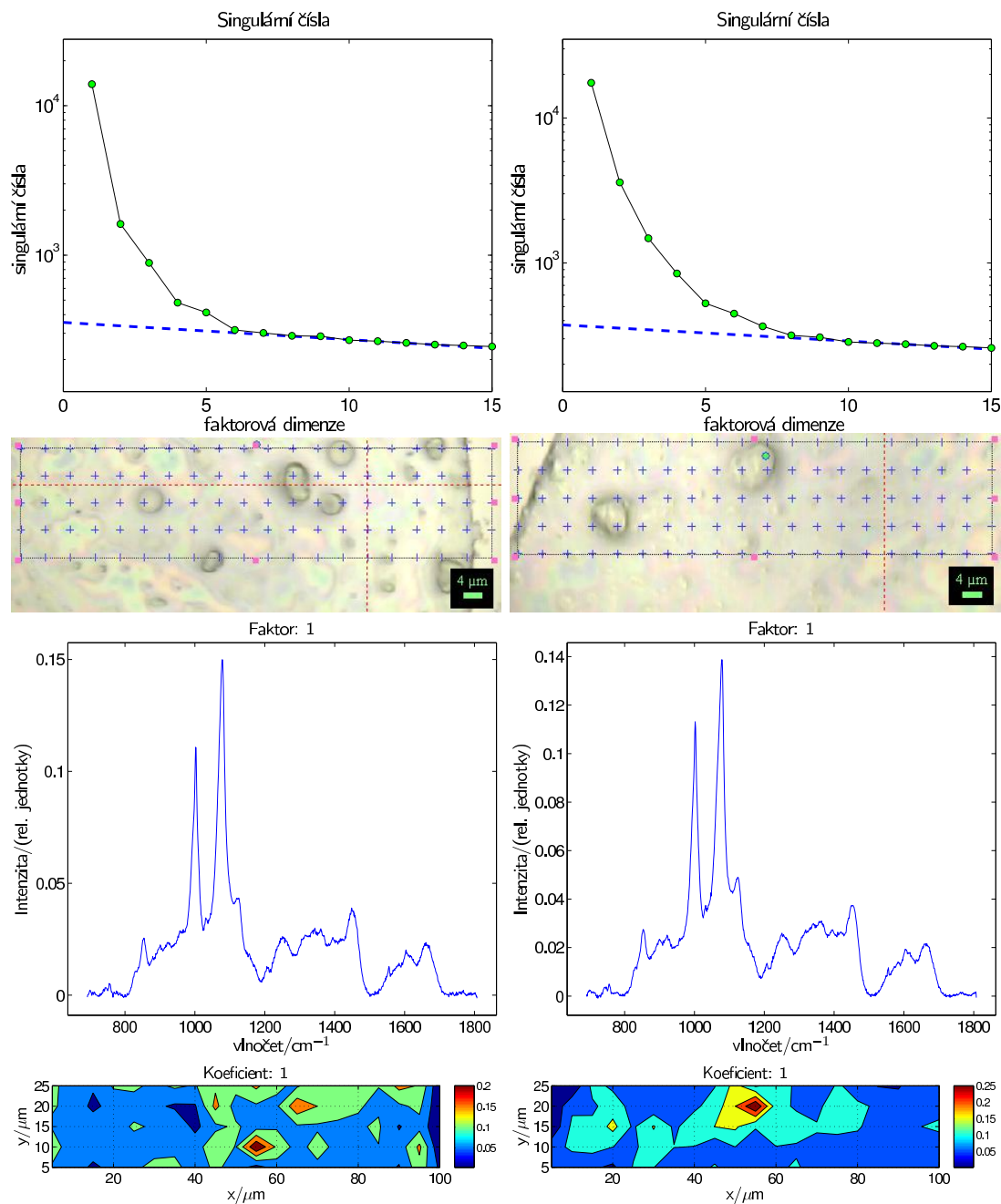
Pro spektrální mapy ze dvou různých nedialyzovaných kapek stejného vzorku je nápadný v prvním faktoru zcela odlišný poměr mezi pásy na 1002 cm^{-1} a 1079 cm^{-1} . Toto je však v prvním faktoru jediný výrazný spektrální ukazatel zjevné odlišnosti morfologie kapek, která je vidět z fotografií měřených oblastí v *Obr. 3.17*. Druhé faktory jsou si v tomto případě velmi podobné. Ve třetím faktoru napravo se navíc oproti odpovídajícímu faktoru nalevo objevuje náznak pásu kolem 1790 cm^{-1} , ale jinak jsou si i třetí faktory velmi podobné.

V případě dialyzovaného vzorku se zdá reprodukovatelnost měření ze dvou různých kapek toho samého vzorku také lepší v důsledku nepřítomnosti pásu 1079 cm^{-1} v prvním faktoru (viz *Obr. 3.19*). Faktory jsou si znovu velmi podobné až do faktorové dimenze tři (viz *Obr. 3.20*), podobnost dalších faktorů je již silně spekulativní vzhledem k nízkému poměru signál/šum (viz *Obr. 3.21*).

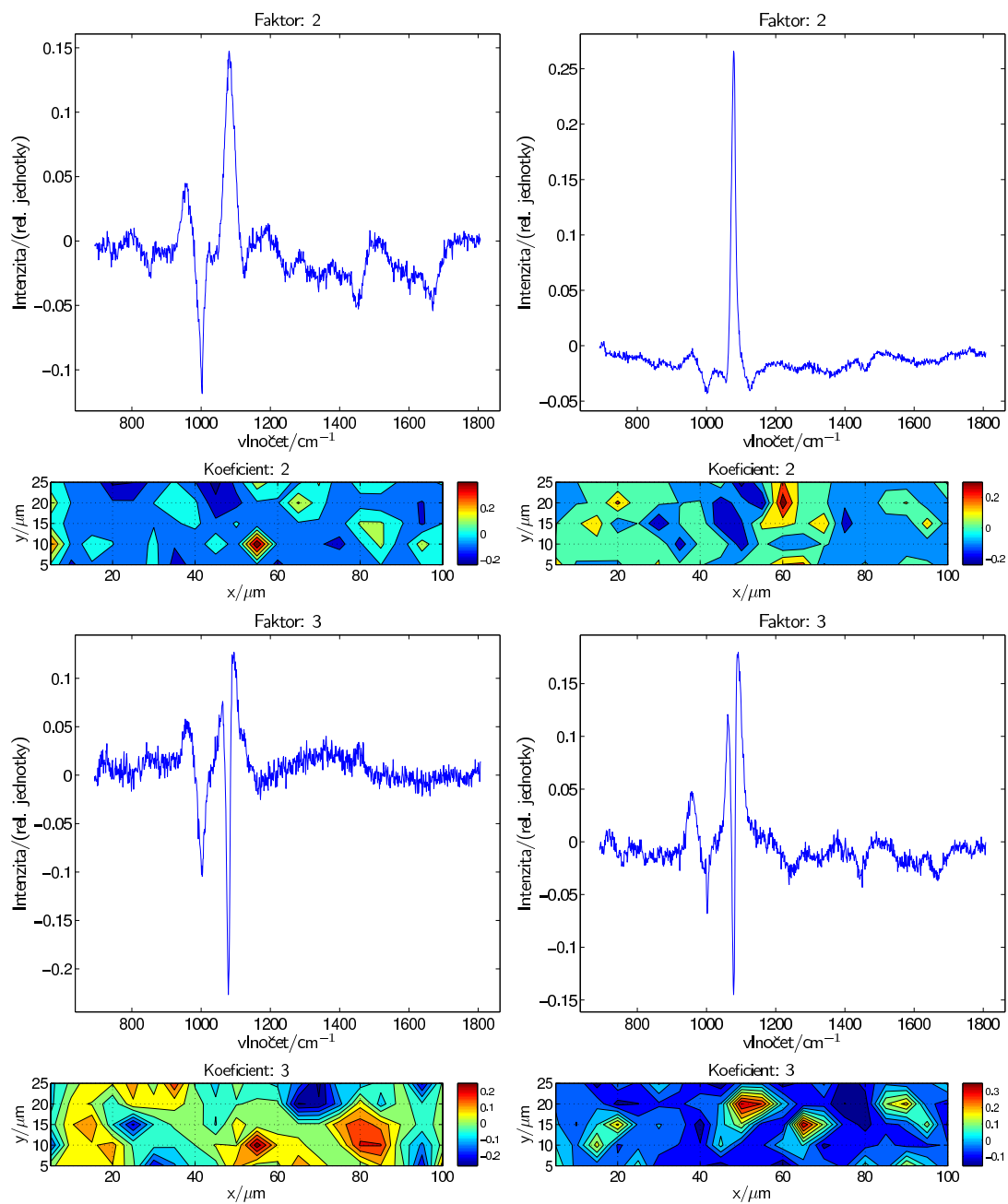
Ze shrnutí výše popsaného porovnání plyne, že u nedialyzovaných vzorků je reprodukovatelnost měření nižší hlavně v důsledku změn intenzity pásu na 1079 cm^{-1} oproti měření u dialyzovaných vzorků, která jsou velmi reprodukova-

telná v jedné kapce i mezi kapkami. Pro měření ze dvou kapek nedialyzovaného vzorku jsou tyto změny velmi výrazné. Velmi odlišné pro případ dvou kapek nedialyzovaného vzorku také byly fotografie proměřovaných depozitů, které jsou zobrazeny na *Obr. 3.22*. Svým dílem k nereprodukovatelnosti pásu na 1079 cm^{-1} pravděpodobně přispěla skutečnost, že právě při přípravě těchto vzorků přestala fungovat centrifuga a CSF v mikrozkuvkách tedy nebyl dostatečně homogenní a zbavený nečistot. Proto bylo pro další měření velmi žádoucí upřesnit protokol přípravy vzorků. Vzorek byl vždy, před vložením do centrifugy protřepán a po centrifugaci z centrifugy opatrně vyjmut a nanesen na DCDR substrát nebo filtr v případě dialýzy. Dialýzou se původce pásu na 1079 cm^{-1} odstraní a tedy odpadá problém reprodukovatelnosti tohoto pásu.

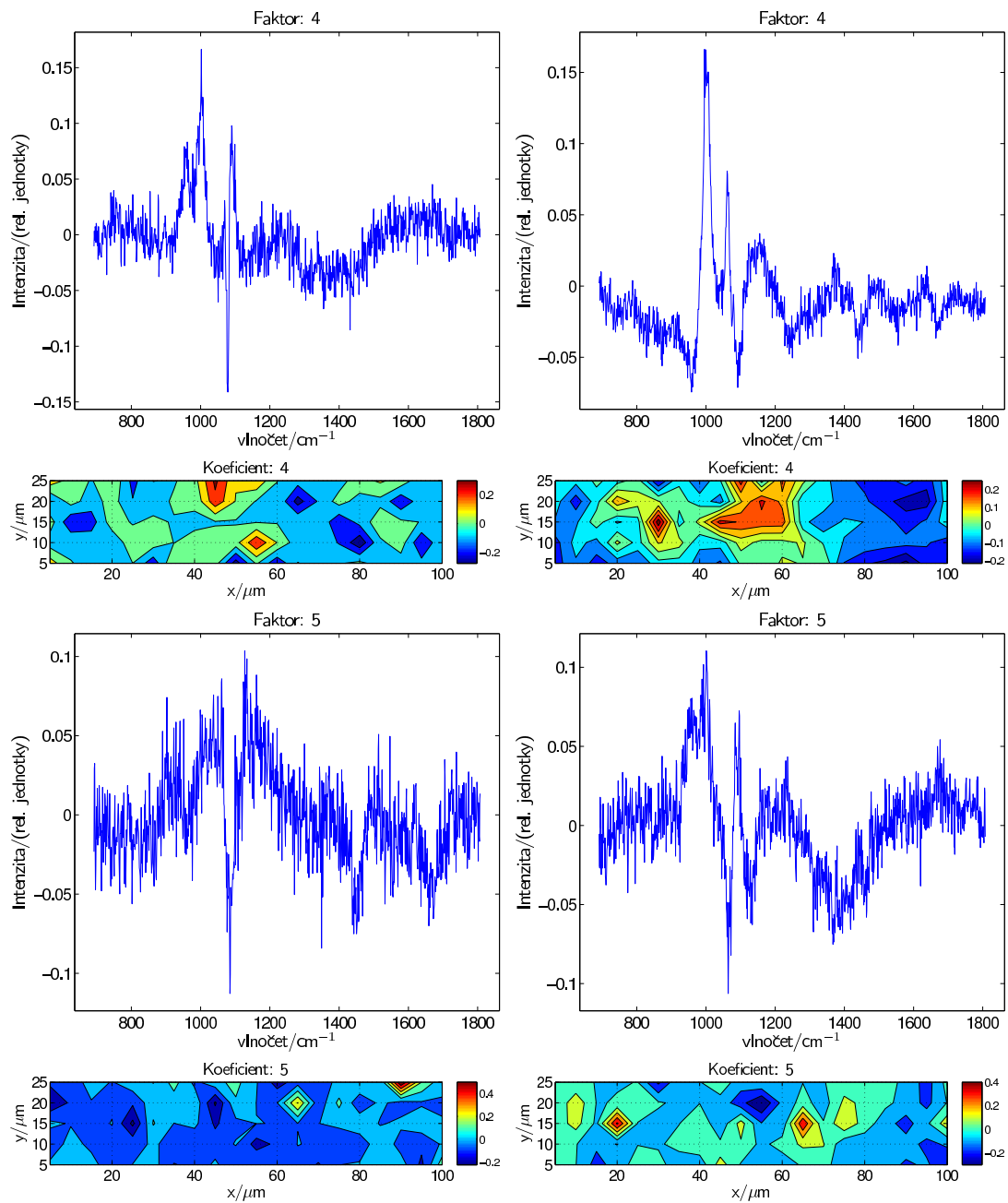
Při měřeních dialyzovaných vzorků se ukázalo, že depozity podléhají fotopškození, což je dobře patrné srovnáním fotografií pořízených před a po měření. Fotografie depozitů po měření jsou na *Obr. 3.23*. Z toho vyplývá, že v dalších měřeních není vhodné prodlužovat akumulární časy měření z jednoho bodu a kvalitu získaných spekter případně zlepšovat měření rozsáhlejších spektrálních map.



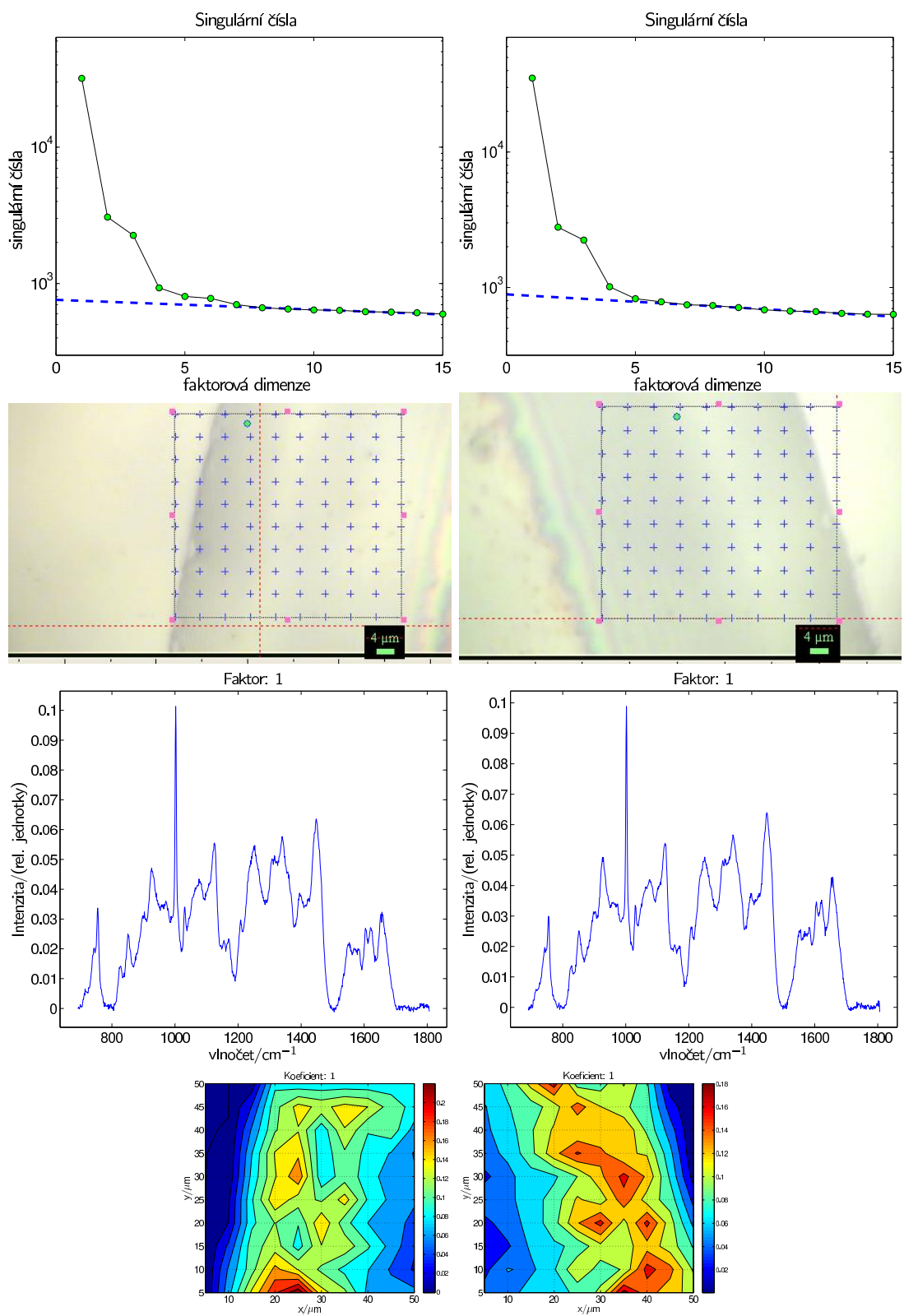
Obrázek 3.11: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kape. Pokračování je v Obr. 3.12 a 3.13.



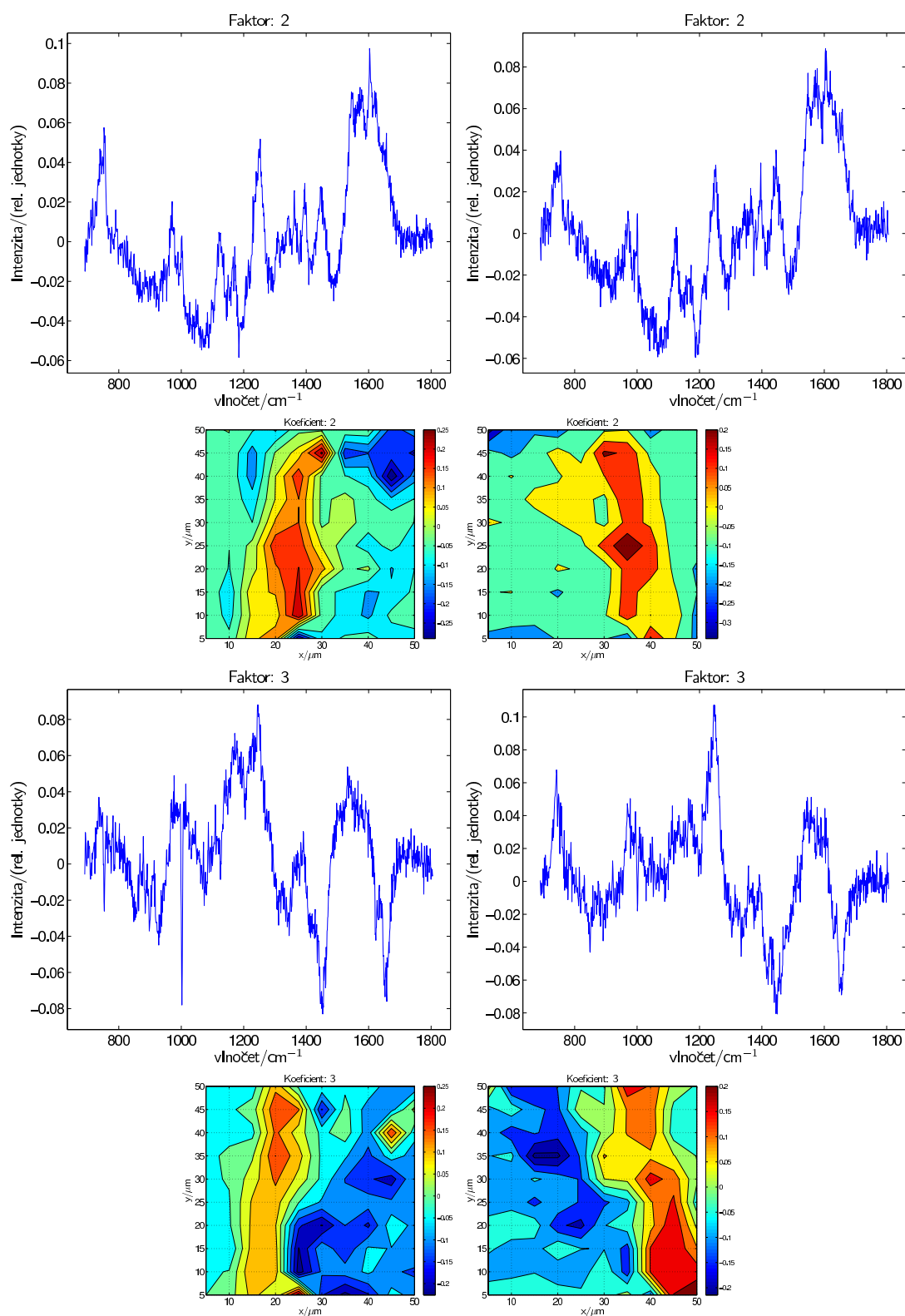
Obrázek 3.12: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kapce. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.11 a pokračuje v Obr. 3.13.



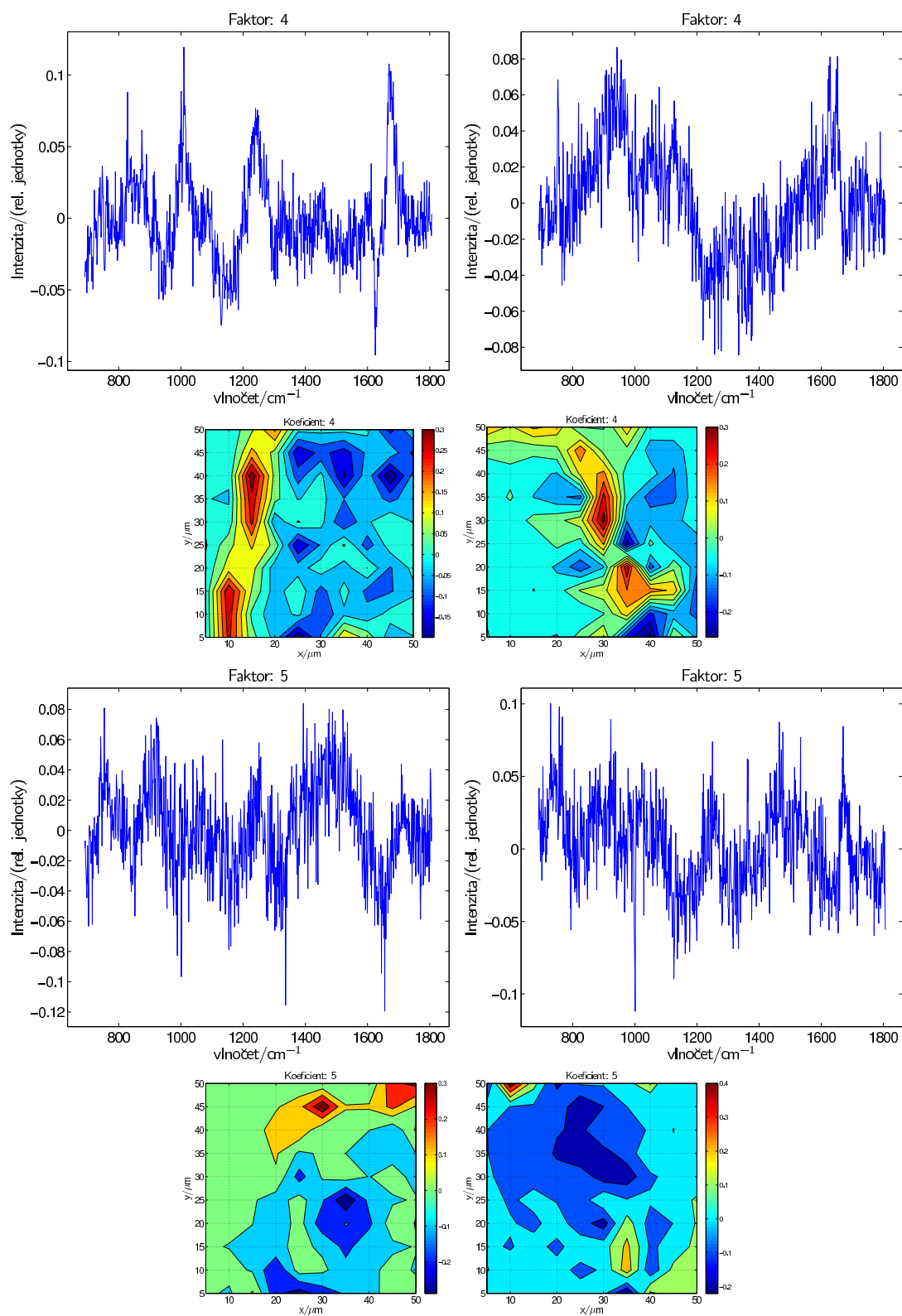
Obrázek 3.13: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kapce. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.12 a 3.13.



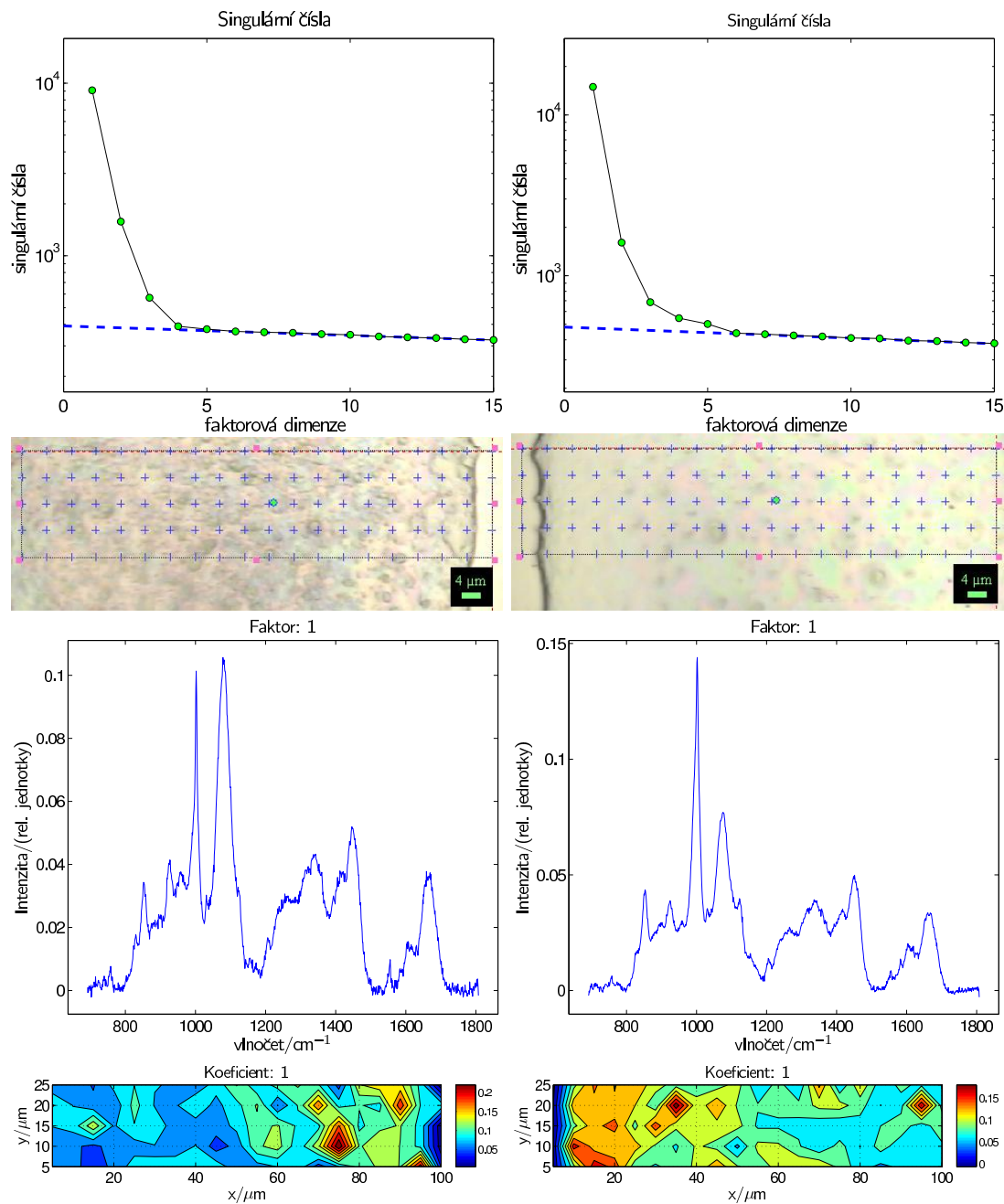
Obrázek 3.14: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kapce. Pokračování je v Obr. 3.15 a 3.16.



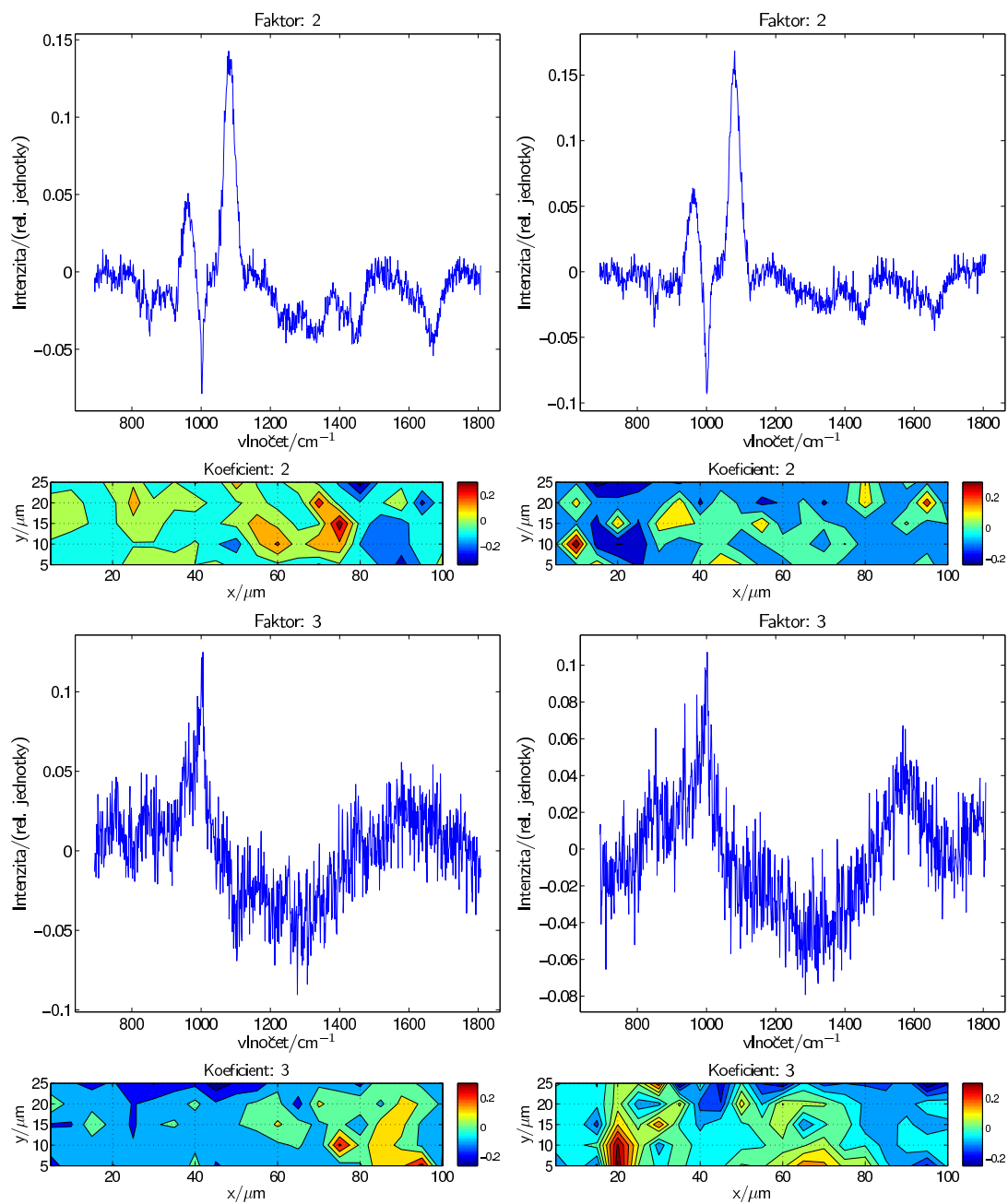
Obrázek 3.15: Faktorová analýza spektrální mapy z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kapce. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.14 a pokračuje v Obr. 3.16.



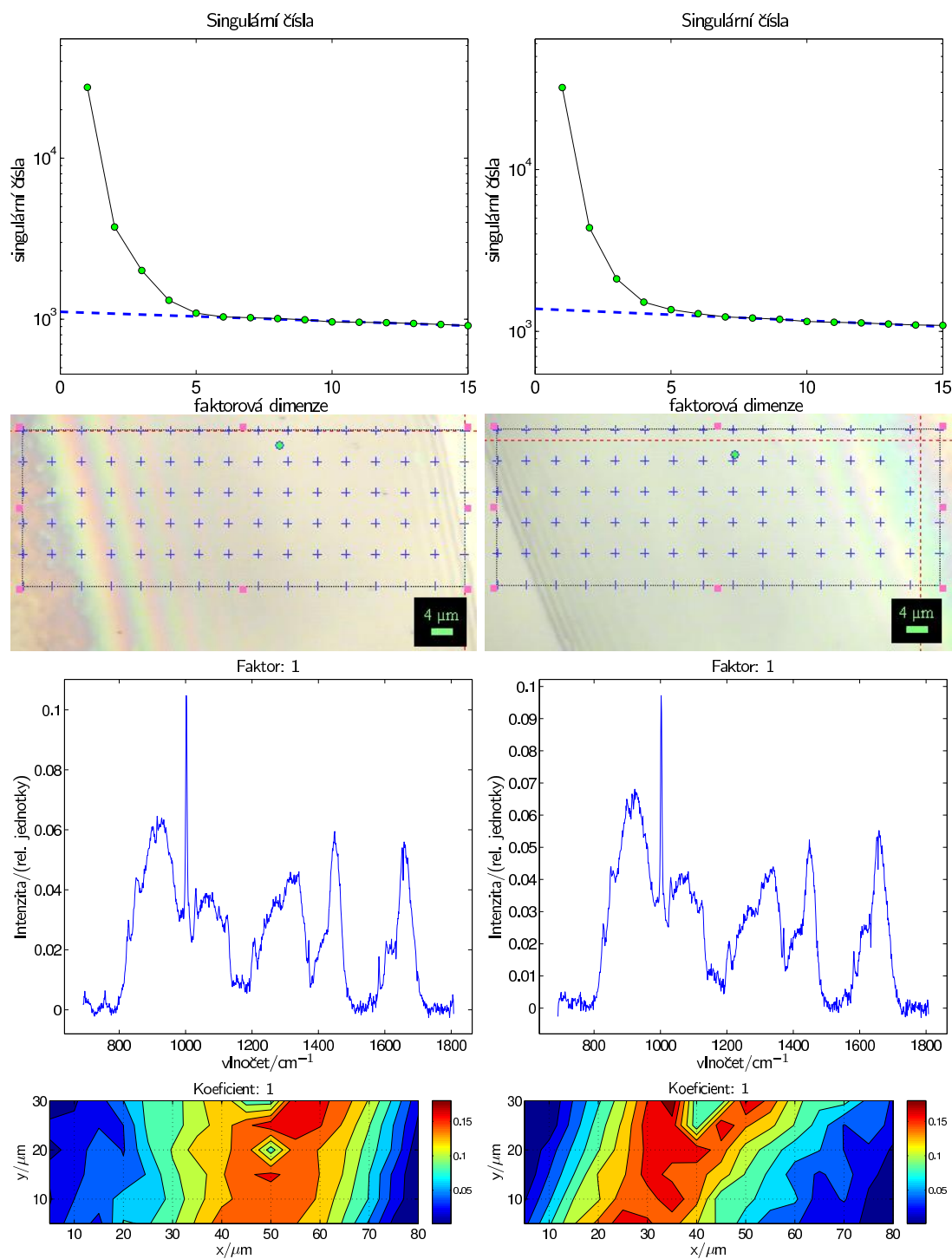
Obrázek 3.16: Faktorová analýza spektrální mapy z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou míst na stejné kapce. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.15 a 3.16.



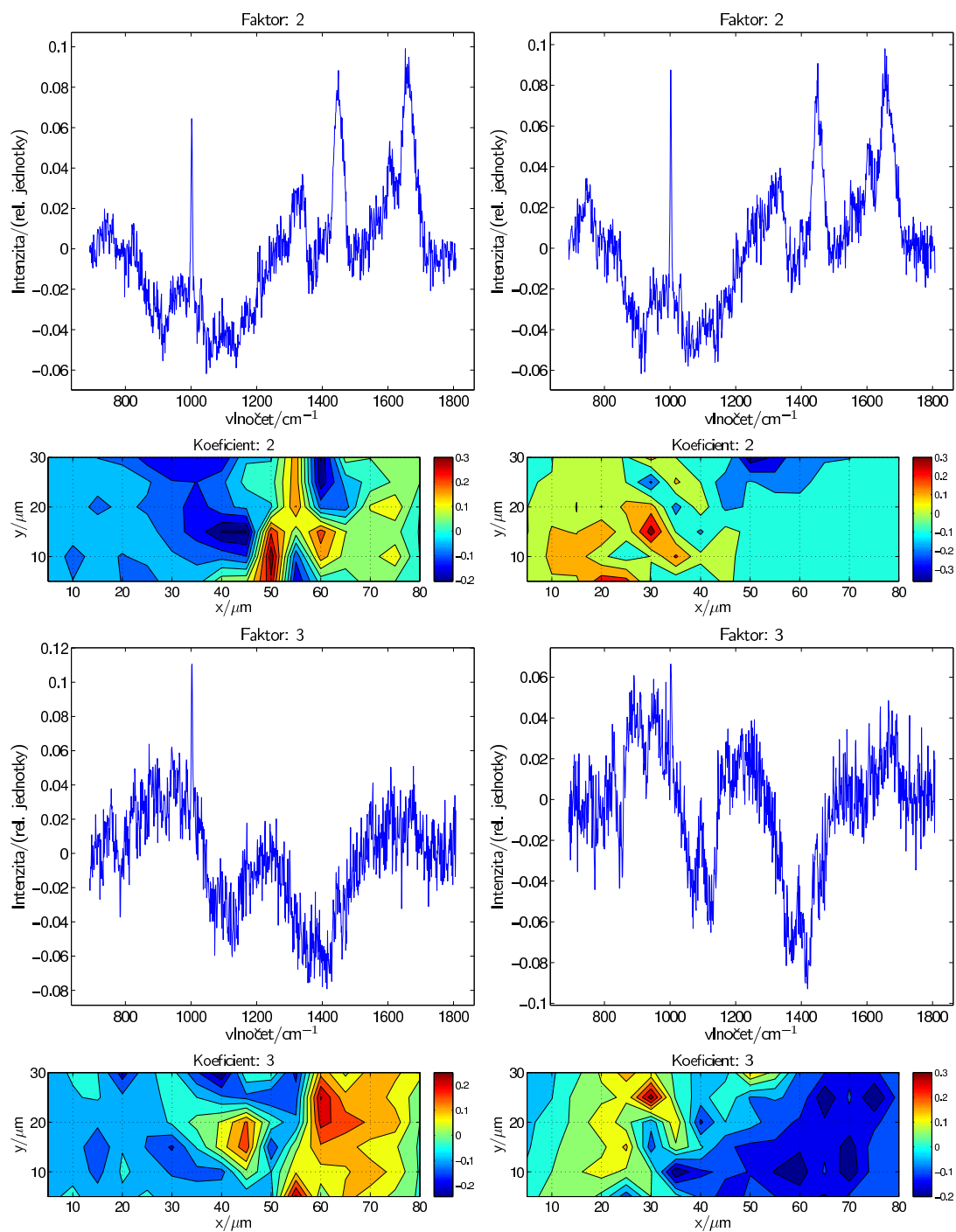
Obrázek 3.17: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 49. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou různých kapek. Pokračování je v Obr. 3.18.



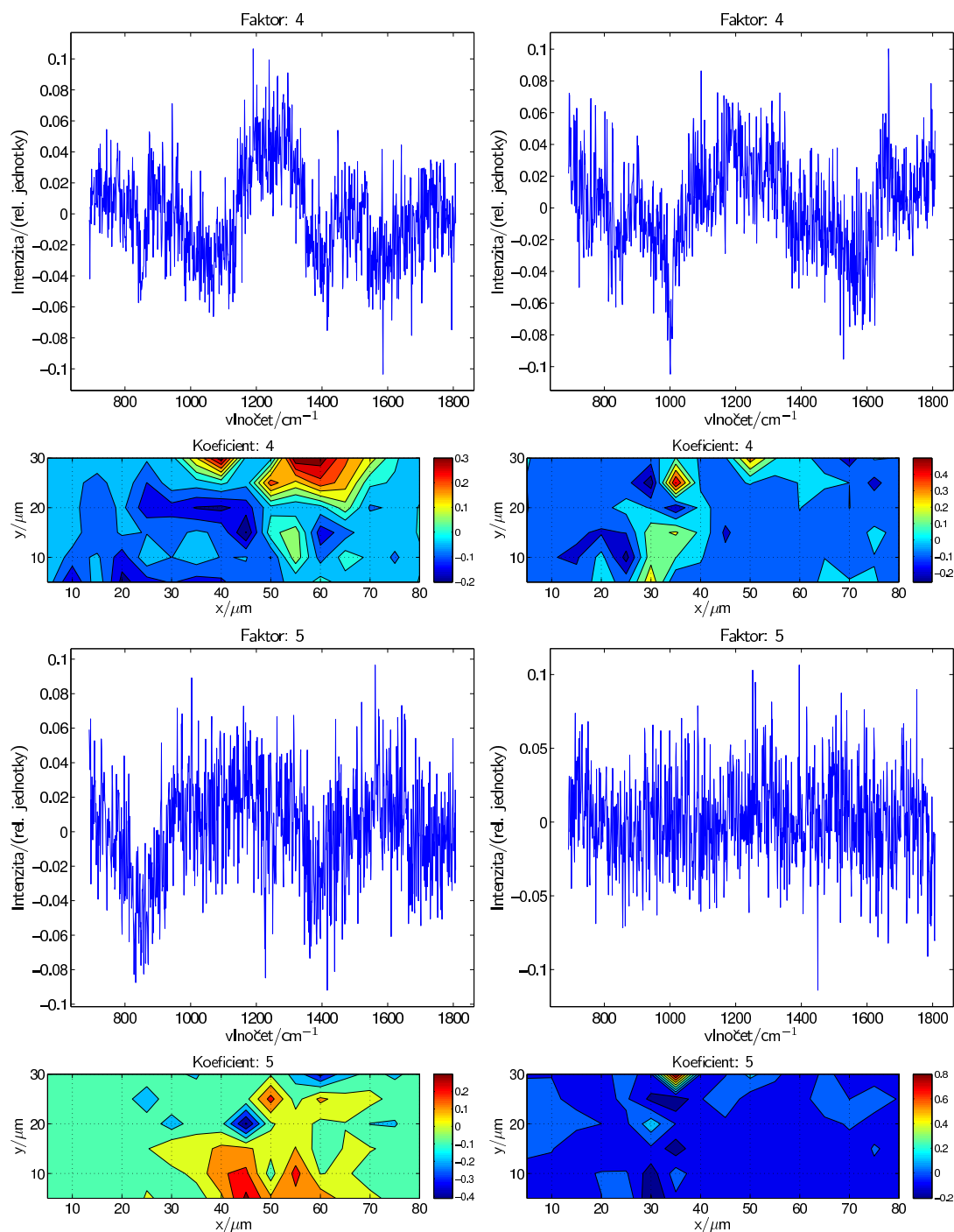
Obrázek 3.18: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 49. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou různých kapek. Pokračování je v Obr. 3.17.



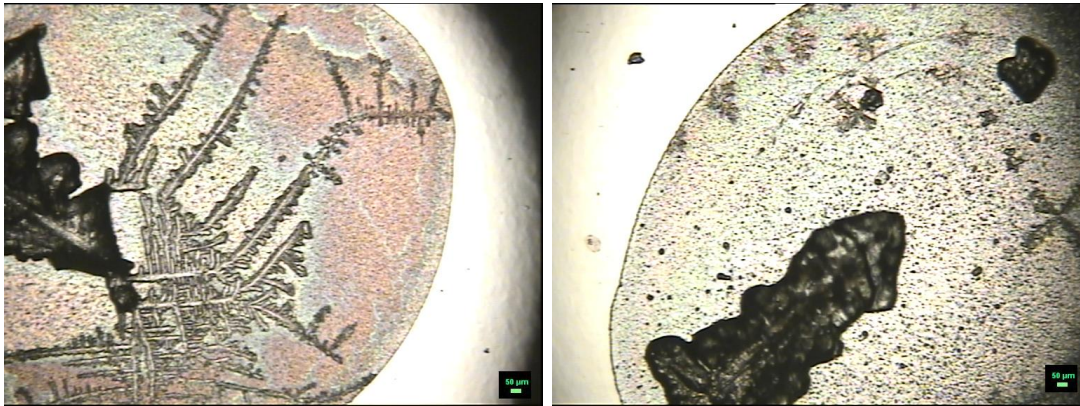
Obrázek 3.19: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 49. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou různých kapek. Pokračování je v Obr. 3.20 a 3.21.



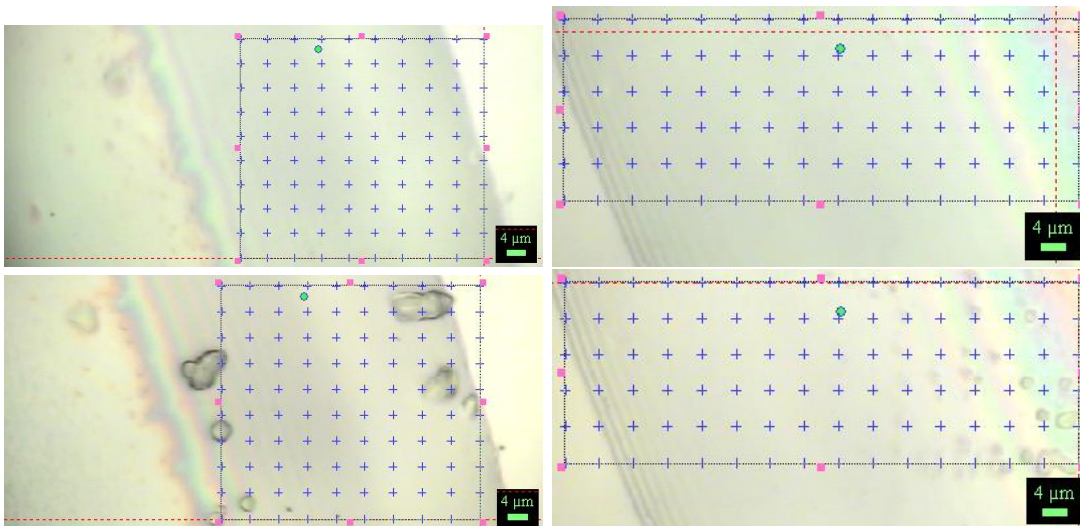
Obrázek 3.20: Faktorová analýza spektrální mapy z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 49. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou různých kapek. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.19 a pokračuje v Obr. 3.21.



Obrázek 3.21: Faktorová analýza spektrální mapy z 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 49. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze dvou různých kapek. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.20 a 3.21.



Obrázek 3.22: Fotografie dvou různých kapek nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 49, na kterých je velmi zřetelná odlišná struktura depositů.



Obrázek 3.23: Při měření dochází k fotodegradaci vzorků, která je dokonce patrná i na fotografiích vzorků. Na obrázcích jsou fotografie depositů před měřením (nahore) a po měření (dole) pořízené z 20 min dialyzovaných vzorků od pacienta č. 19 (obrázky nalevo) a pacienta č. 49 (obrázky napravo), na kterých jsou vidět měřením indukované změny projevující se tmavšími skvrnami.

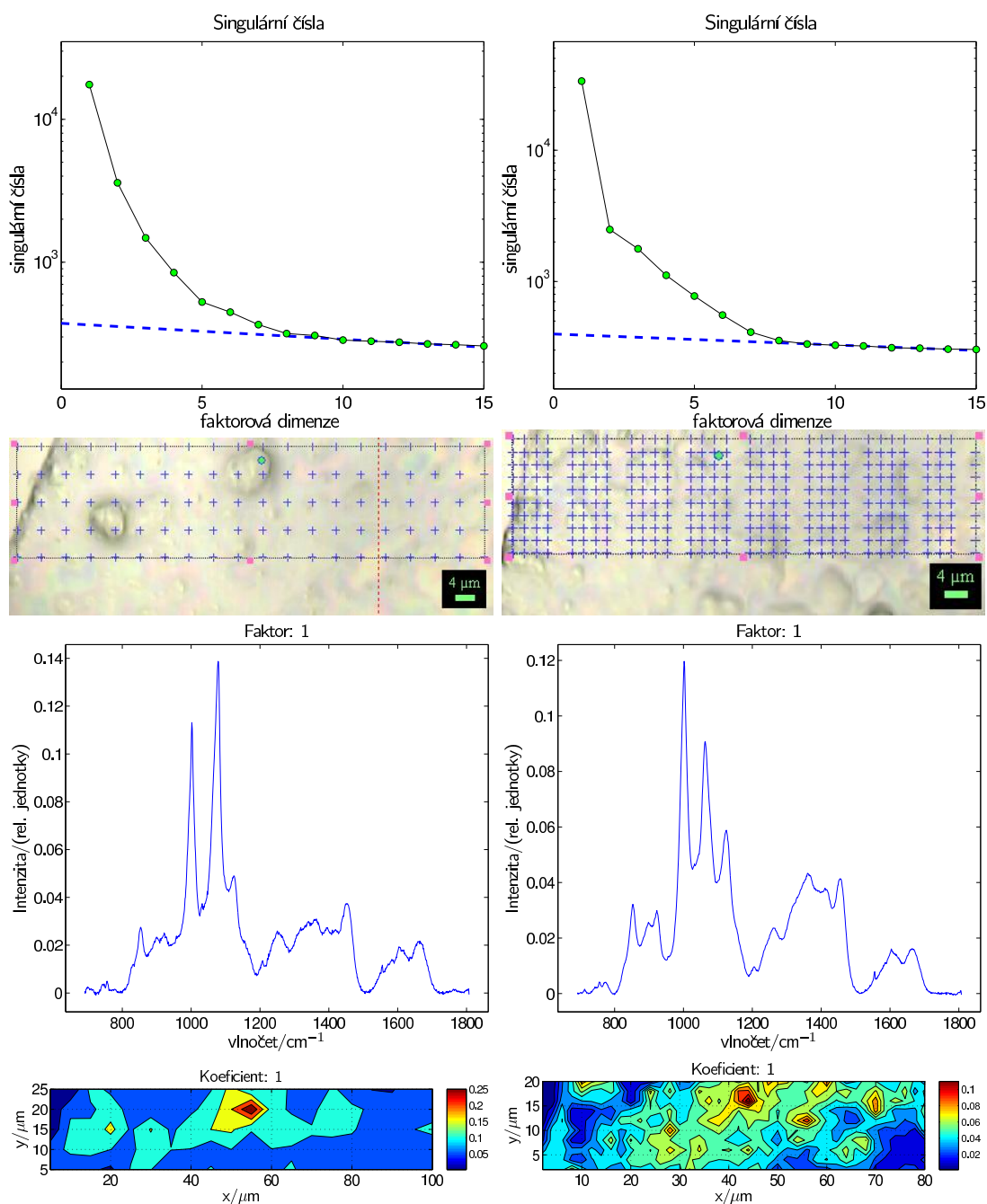
3.4 Optimalizace skladování vzorků

Dále bylo třeba určit, jaká je optimální rozteč bodů a velikost spektrální mapy. Za tímto účelem byly znovu proměřeny depozity nedialyzovaného a 20 min dialyzovaného vzorku č. 19, které již byly použity při výzkumu reprodukovatelnosti měření ze dvou míst na stejné kapce. Od tohoto měření byly depozity uskladněné čtyři dny v lednici, poté na nich bylo nalezeno místo, ze kterého byla pořízena předchozí spektrální mapa s roztečí $5\ \mu\text{m}$ a z tohoto místa byla změřena spektrální mapa nová, tentokrát však se čtyřnásobným počtem bodů a roztečí pouze $2\ \mu\text{m}$. Výsledky měření jsou uvedeny na *Obr. 3.24* a *3.25*. Již z prvních faktorů faktorových analýz spektrálních map je patrné, že mezi měřeními došlo k výrazné změně prostorového rozložení složek vyschlé kapky, v případě nedialyzované kapky jsou tyto změny dokonce dobře viditelné i na fotografii depozitu (viz. *Obr. 3.24*). Bylo navrženo, že původcem tohoto jevu by mohl být teplotní skok mezi teplotou v laboratoři a teplotou v lednici. Při vyjmutí vzorku z lednice totiž docházelo k mírnému orosení DCDR destičky se vzorky. Pro ověření této hypotézy byly vytvořeny nové vzorky, ze kterých byly změřeny spektrální mapy. Poté byly tyto vzorky před vložením do lednice uloženy v exikátoru. Z lednice byly vzorky vyjmuty za několik dní, nechány nejméně půl hodiny temperovat v exikátoru při laboratorní teplotě a teprve poté byly z exikátoru vyjmuty, vloženy do mikroskopu a proměřeny.

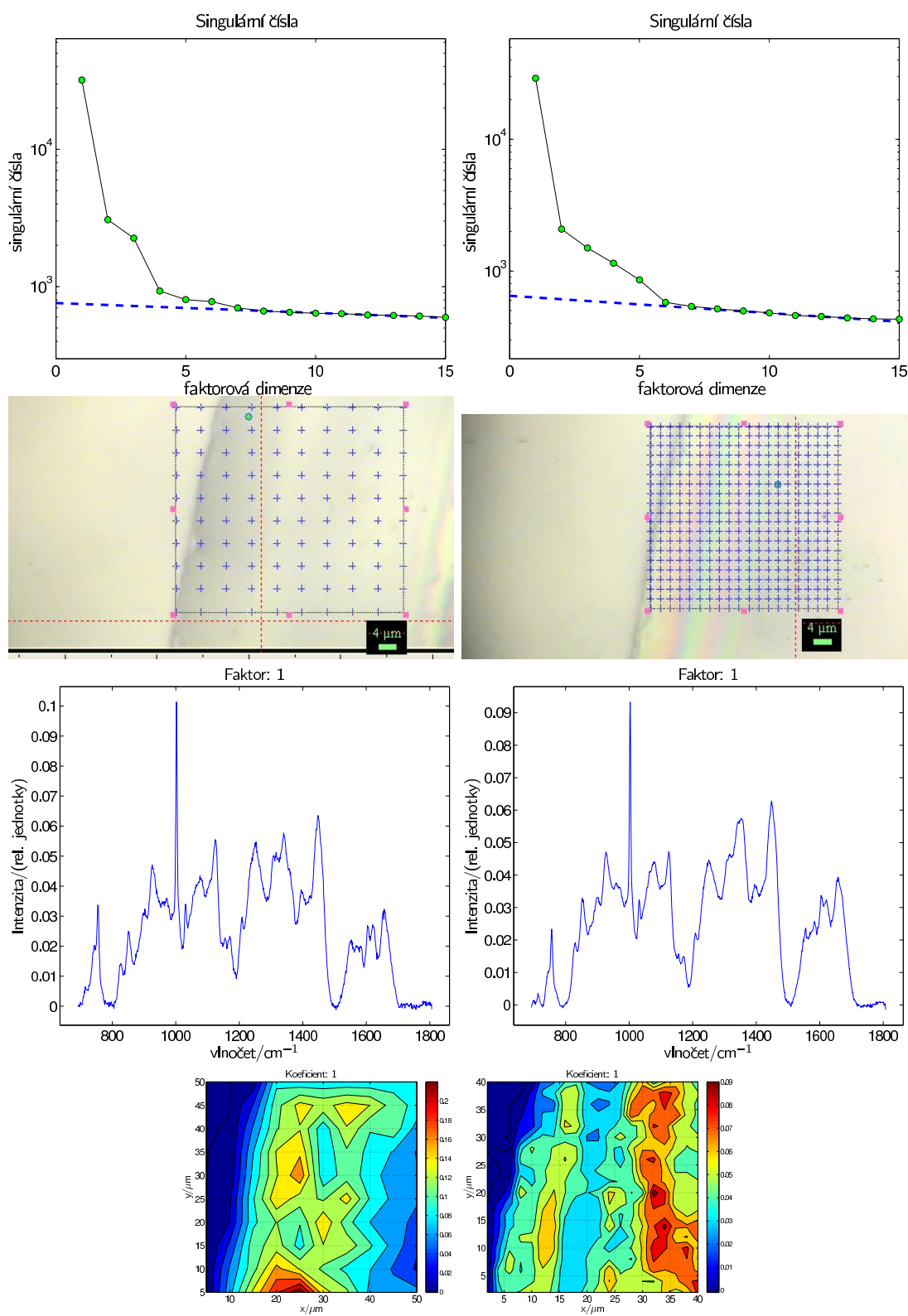
Konkrétně takto byl zkoumán nedialyzovaný vzorek od pacienta č. 11 (viz *Obr. 3.26*, *3.27* a *3.28*), ze kterého byly měřeny spektrální mapy s roztečí $5\ \mu\text{m}$ a který byl mezi měřeními uskladněný čtyři dny a 5 min dialyzovaný vzorek č. 19 s roztečí spektrální mapy $2\ \mu\text{m}$ (viz *Obr. 3.29*, *3.30* a *3.31*), který byl mezi měřeními uskladněn sedm dní. Obě spektrální mapy obsahovaly 10×10 bodů.

Již z fotografií měřených oblastí nedialyzovaného vzorku (viz *Obr. 3.26*) je patrné, že exiktor velmi přispěl ke stabilitě vzorků při skladování a hlavně při přemístování vzorků z nízké teploty v lednici ($\sim 4\ ^\circ\text{C}$) na běžnou laboratorní teplotu ($\sim 22\ ^\circ\text{C}$). Silná podobnost vzorků je patrná i z faktorové analýzy. První faktory i mapy jejich koeficientů jsou si velmi podobné (viz *Obr. 3.26*), rozložení koeficientů druhého a třetího faktoru se již různí více (viz *Obr. 3.27*). U vyšších faktorů již žádná podobnost není pozorovatelná. Pro dialyzovaný vzorek je shoda v mapách koeficientů velmi dobrá dokonce až do čtvrtého faktoru.

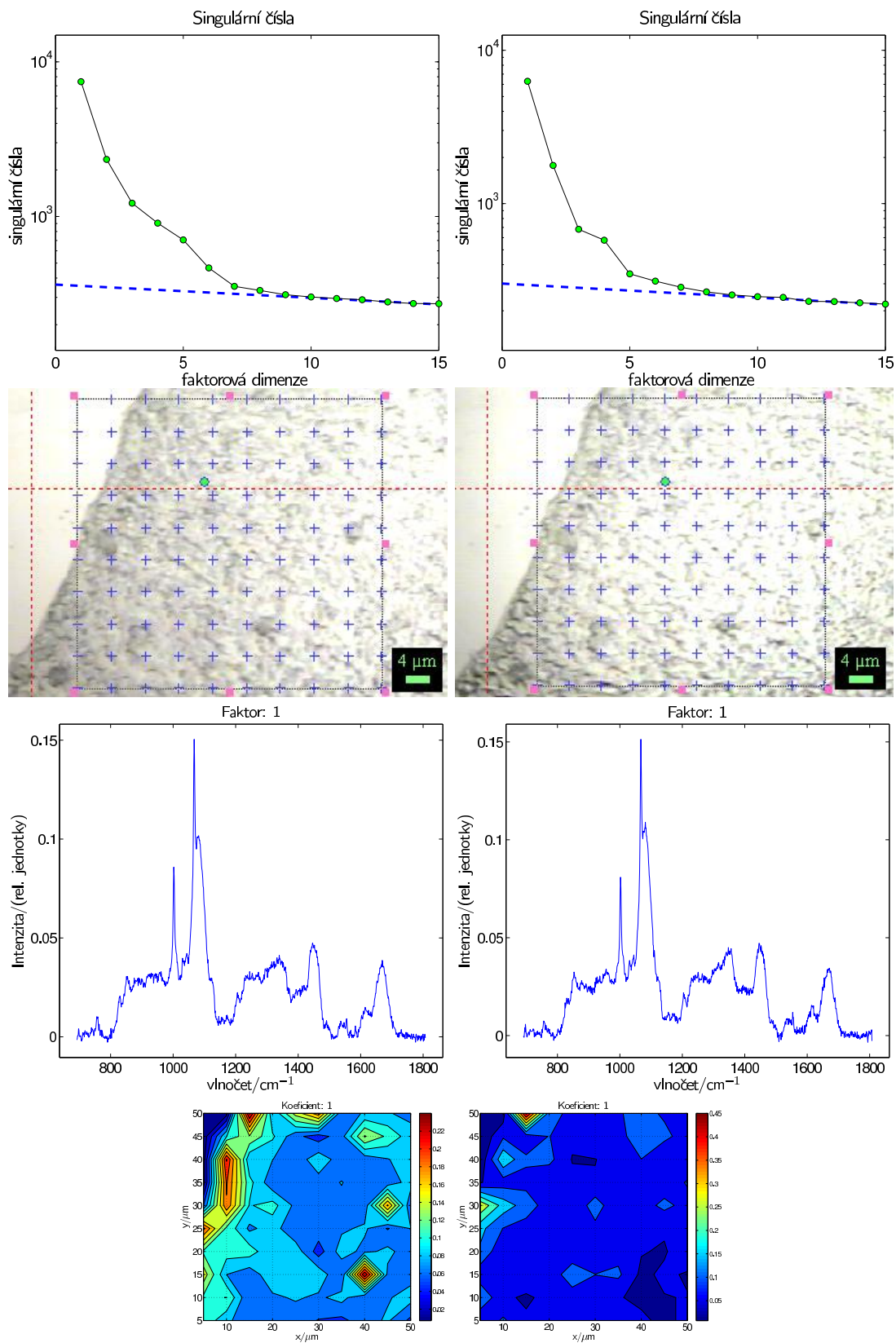
Odchytky jsou největší měrou zapříčiněny skutečností, že se nepodařilo měřit obě spektrální mapy z přesně stejných bodů. Tento problém více vyniká u map, které mají větší rozteč bodů. Exikátor velmi omezuje změny ve vzorku způsobené skladováním a proto byly pro všechna následující měření DCDR destičky se vzorky skladovány v lednici v exikátoru a po vyjmutí z lednice se v něm nechaly alespoň půl hodiny ustálit na laboratorní teplotě. Nyní, když byla vyjasněna otázka skladování DCDR destiček mezi měřeními, mohli jsme přistoupit k optimalizaci velikosti a rozteče spektrální mapy.



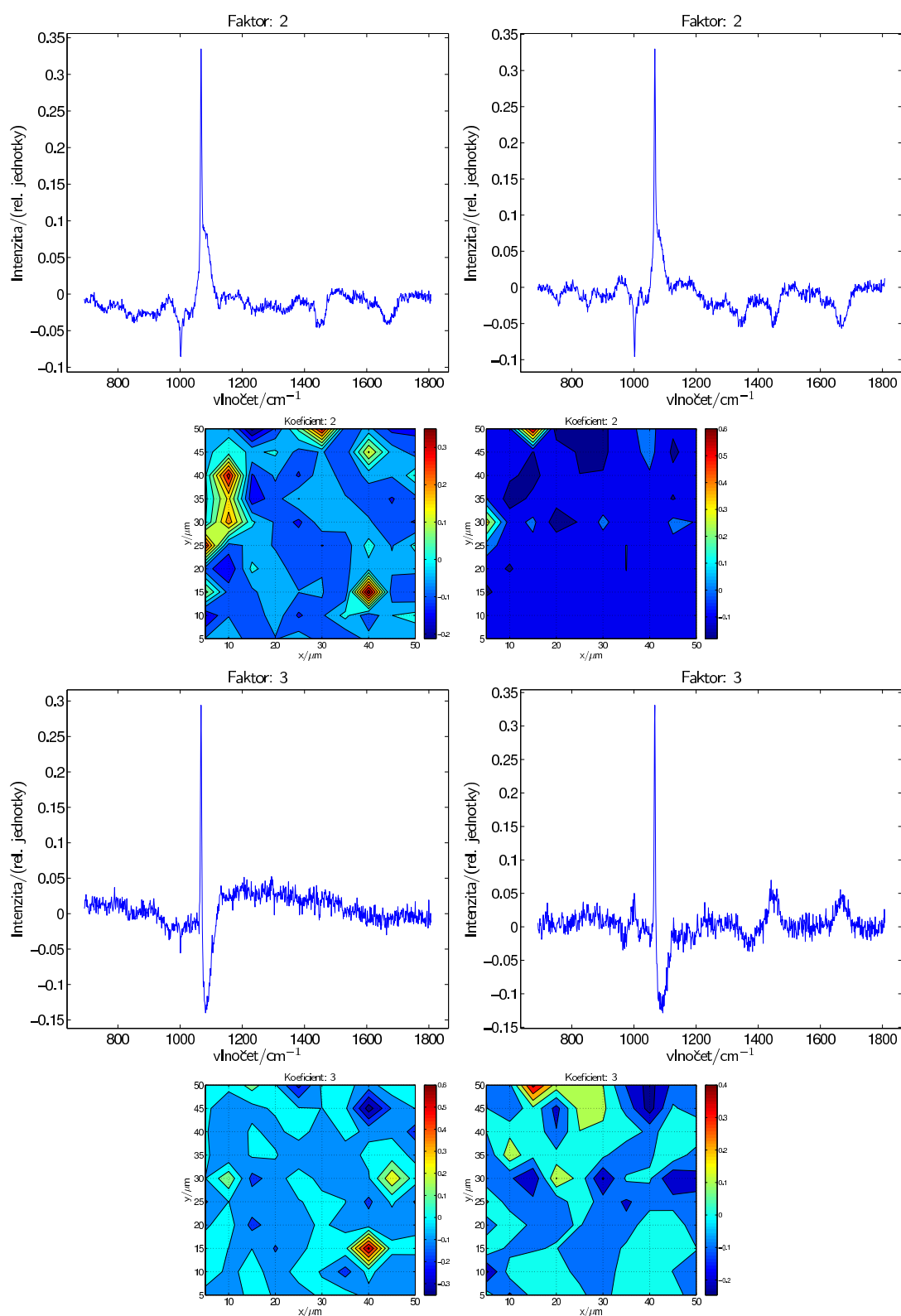
Obrázek 3.24: První faktor faktorové analýzy spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém sloupci jsou výsledky měření z toho samého místa depozitu jako v levém sloupci, měření v pravém sloupci však proběhlo o čtyři dny později. Z fotografií i ze spekter je zřetelné, že během uskladnění v depozitech došlo ke změnám prostorového uspořádání složek mozkomíšního moku.



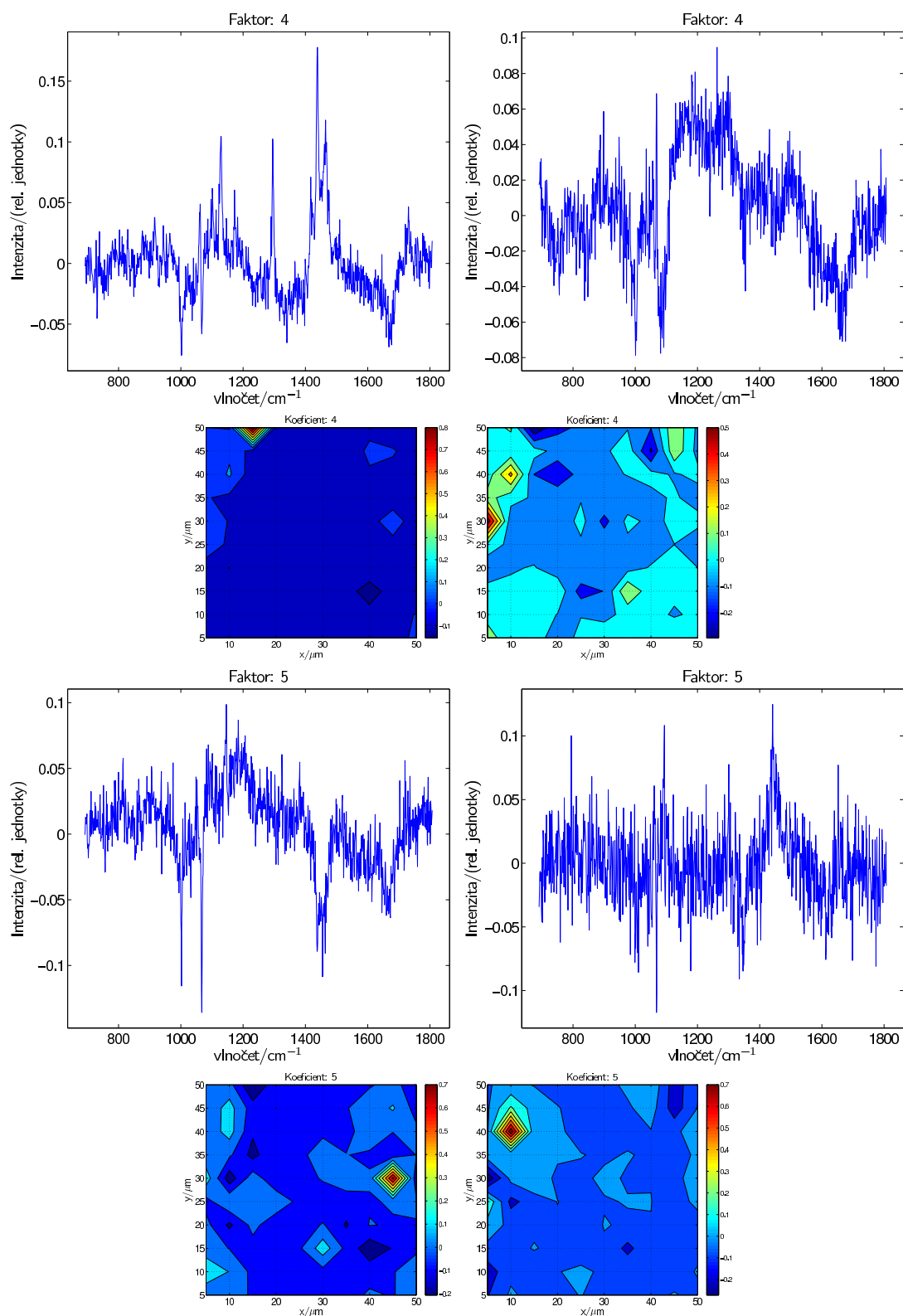
Obrázek 3.25: První faktor faktorové analýzy spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z 2 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém sloupci jsou výsledky měření z toho samého místa depozitu jako v levém sloupci, měření v pravém sloupci však proběhlo o čtyři dny později. Ze spekter je zřetelné, že během uskladnění v depozitech došlo ke změnám prostorového uspořádání složek mozkomíšního moku.



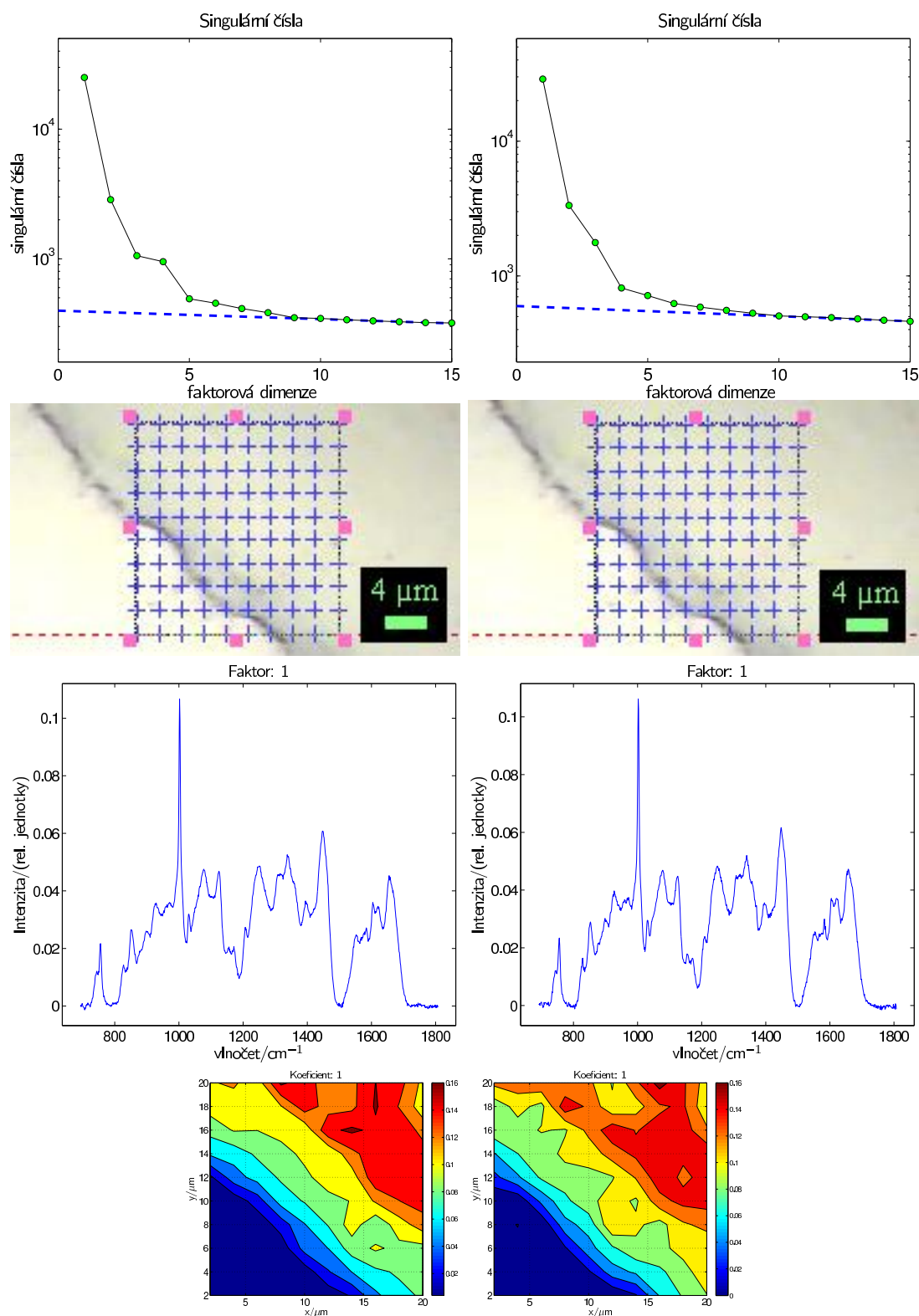
Obrázek 3.26: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 11. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa depozitu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o čtyři dny později. Pokračování výsledků faktorové analýzy je v Obr. 3.27 a 3.28.



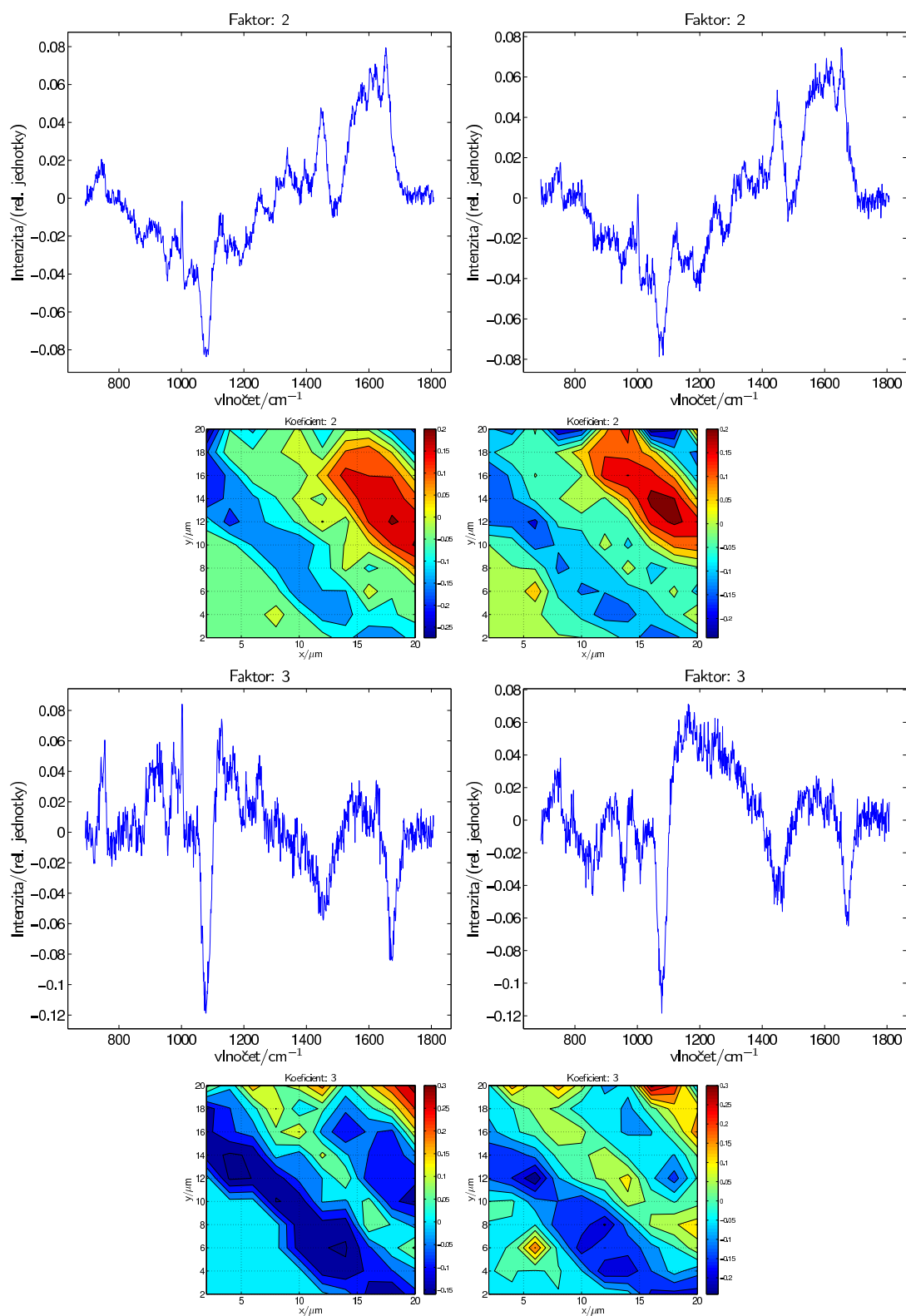
Obrázek 3.27: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 11. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa depozitu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o čtyři dny později. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.26 a pokračuje v Obr. 3.28.



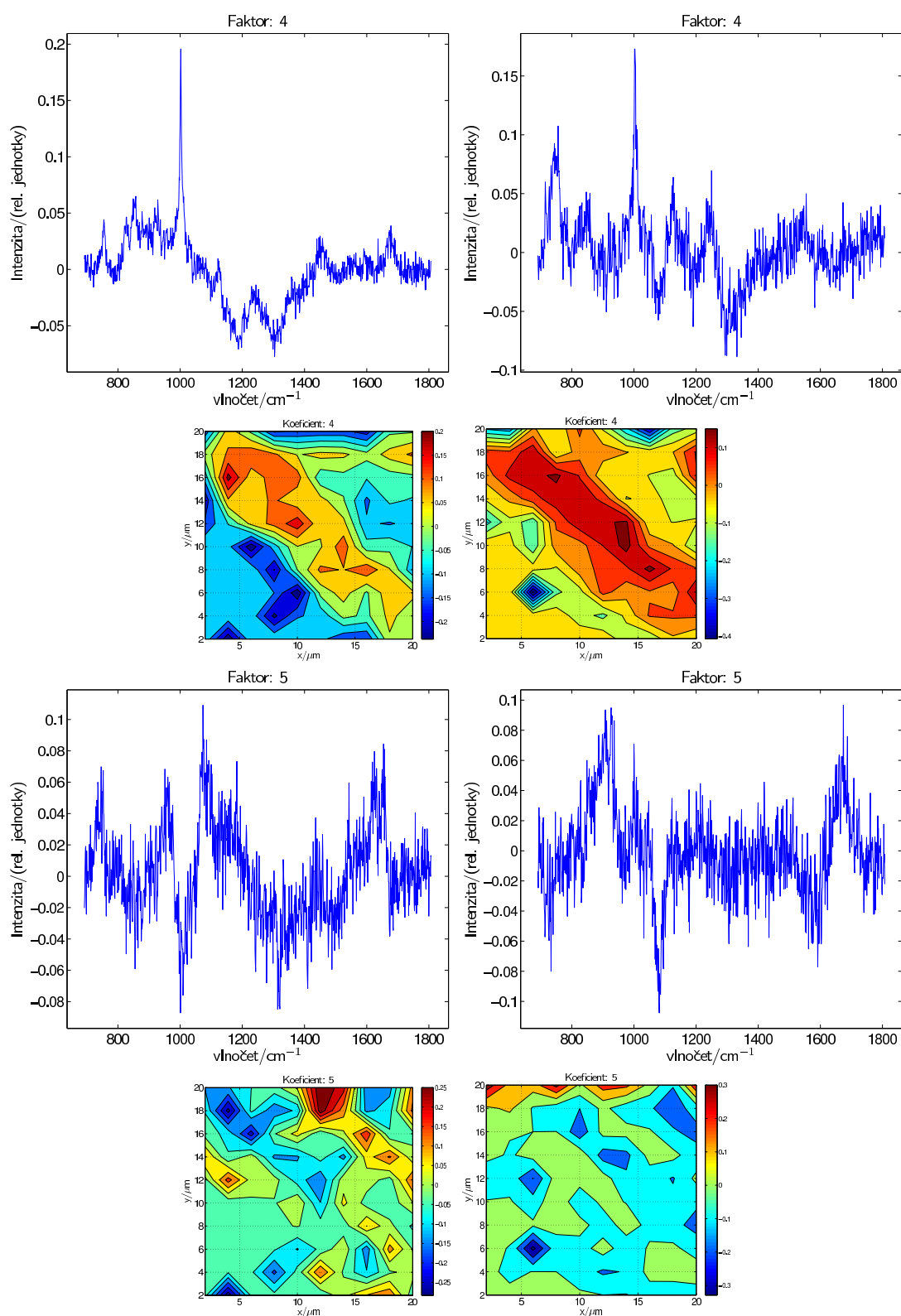
Obrázek 3.28: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 11. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa deponátu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o čtyři dny později. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.26 a 3.27.



Obrázek 3.29: Faktorová analýza spektrální mapy s fotografií měřené oblasti z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa depozitu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o sedm dní později. Pokračování výsledků faktorové analýzy je v Obr. 3.30 a 3.31.



Obrázek 3.30: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa depozitu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o sedm dní později. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.29 a pokračuje v Obr. 3.31.



Obrázek 3.31: Faktorová analýza spektrální mapy z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 19. V pravém a levém sloupci jsou výsledky měření ze stejného místa depozitu, přičemž měření, jehož výsledky jsou uvedeny v pravém sloupci proběhlo o sedm dní později. Tento obrázek navazuje na Obr. 3.29 a 3.30.

3.5 Optimalizace rozteče a velikosti spektrální mapy

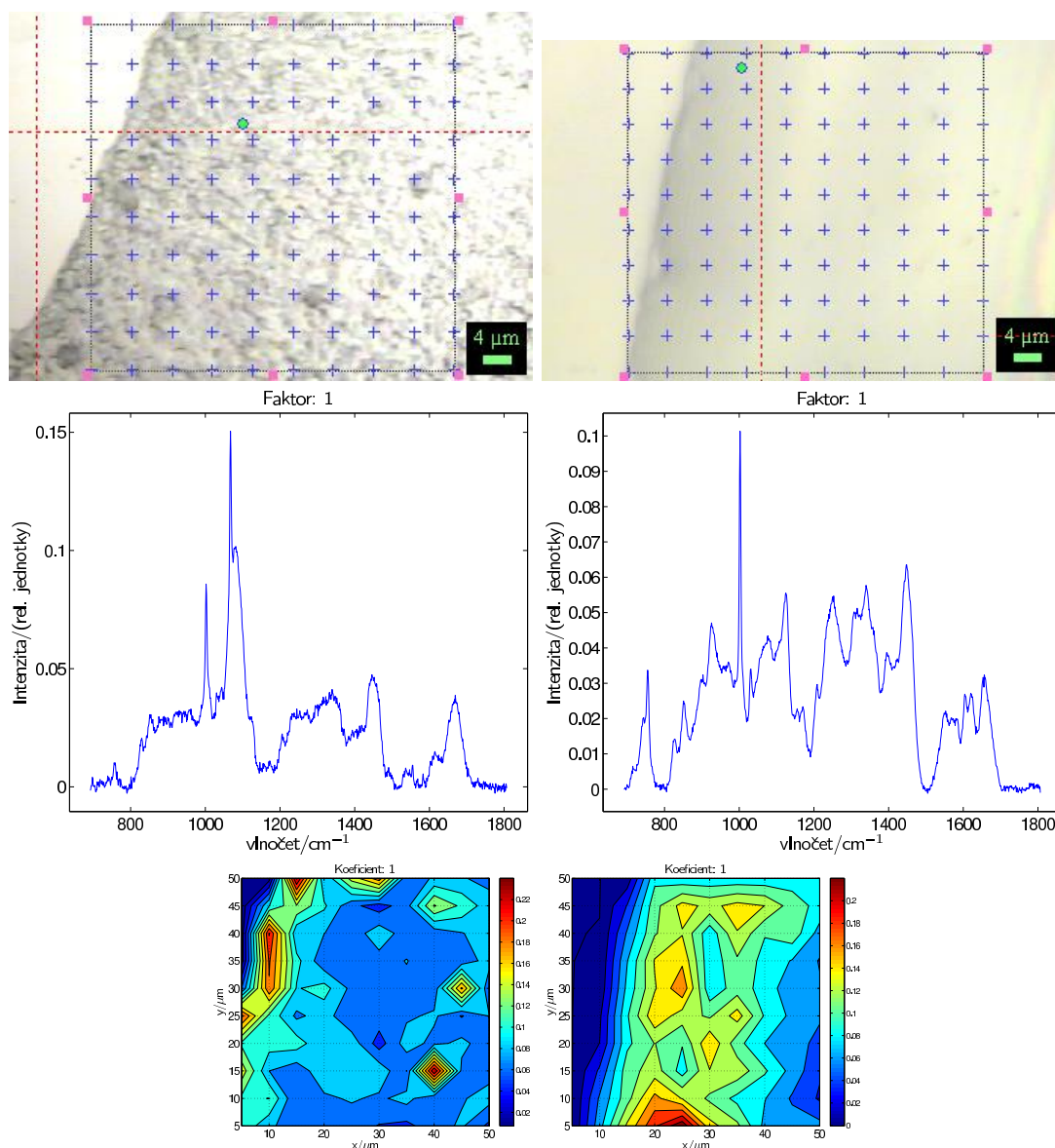
Z důvodů časové optimalizace měření, kdy se počítalo s budoucím použitím vyvíjené diagnostické metody v lékařské praxi bylo třeba nalézt oblast depozitu s nejvyšší koncentrací proteinů, ve kterých jsme předpokládali, že budou viditelné patologické změny způsobené analyzovanými nemocemi. Z map koeficientů zastoupení prvních faktorů zobrazených na *Obr. 3.32* je patrné, že často dochází k usazování proteinů, ve shodě s teorií popsanou v kapitole 1.3.2, na těsném okraji vyschlé kapky. Z obrázku je také viditelná hranice do 20–30 μm od okraje. Proto bylo omezeno zasahování mapy od okraje do středu kapky shora na 30 μm . Podíváme-li se na vyšší faktory, které jsou uvedeny v *Obr. 3.33*, můžeme odhadnout radiální rozměr různých nehomogenit v kapce na 10 μm (ukázáno ve druhém a třetím faktoru), přičemž, aby bylo dosaženo dostatečné reprodukovatelnosti měření, byla požadována dvojnásobná velikost měřené oblasti. Z výše popsaného tedy bylo rozhodnuto, že spektrální mapa bude měřena ze čtvercových map s rozměrem kolem 20 \times 20 μm , přičemž úhlopříčka čtverce bude směřovat do středu kapky a vrchol čtverce bude přesahovat o $\sim 3 \mu\text{m}$ vně kapky, abychom měli kontrolu nulového signálu a vodítka k identifikaci spektrální mapy s fotografií. Uvážíme-li, že délka úhlopříčky takového čtverce je zaokrouhleně 28,3 μm , získáme přesah čtverce do středu kapky přibližně 26,3 μm .

Pro takovouto čtvercovou mapu bylo nutné rozhodnout, jakou rozteč by měly mít její body. Proto byly proměřeny spektrální mapy ze 3 vzorků s různou dobou dialýzy od pacienta č. 19, přičemž z každého vzorku byla změřena spektrální mapa s roztečí bodů 2 μm a hned poté z toho samého místa spektrální mapa s roztečí 1 μm , tedy se čtyřnásobným počtem bodů. U těchto map poté byl určen poměr signál/šum průměrného spektra, jako poměr mezi intenzitou pásu fenylalaniny na 1002 cm^{-1} a šumem signálu nad 1750 cm^{-1} , kde se již nevyskytovaly žádné pásy. Výsledky shrnuje tabulka *Tab. 3.4*. Z tabulky je patrné, že při zečtyřnásobení bodů se poměr signál/šum zvětšil 2,6–2,8 \times , což je o něco více, než teoreticky předpokládaná hodnota odmocniny z navýšení počtu bodů pro normálně rozdělený šum, v našem případě tedy 2 \times . Zvýšením počtu bodů tedy zvyšujeme kvalitu spekter a zvyšujeme tedy šanci na nalezení spektrálních změn způsobených nemocí.

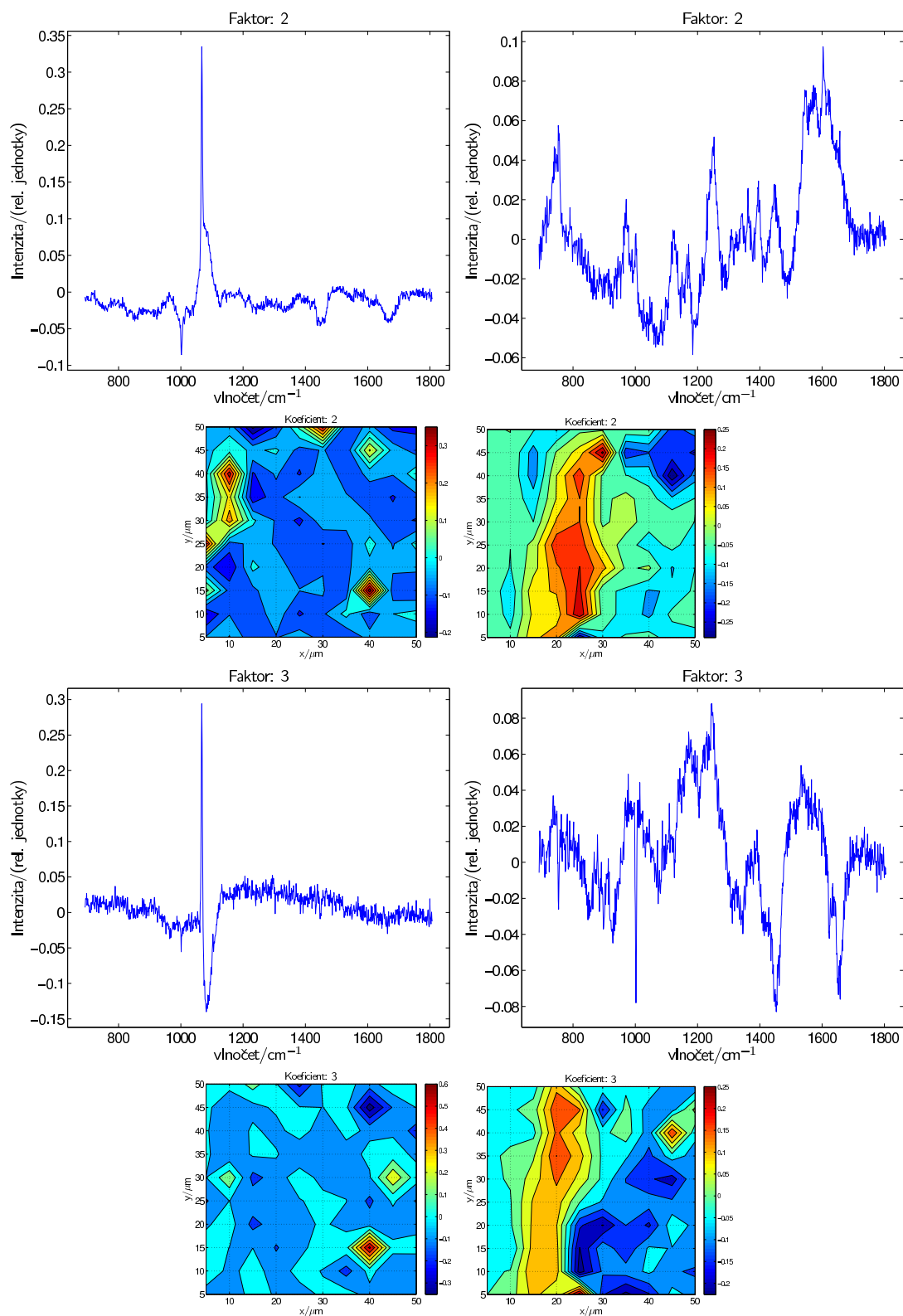
Posledním, velmi výrazným kritériem optimalizace velikosti mapy byla pozdější aplikovatelnost této metody v medicínské praxi. Jak bylo ukázáno výše, kvalita signálu narůstá o něco rychleji než odmocnina z počtu bodů, kdežto čas potřebný na měření spektrální mapy narůstá s počtem bodů lineárně. Spektrální mapa, která obsahovala 100 bodů, byla měřena i s kalibračním spektrem neonové výbojky přibližně hodinu a deset minut, kdežto mapa o 400 bodech byla měřena již čtyři a půl hodiny. Nakonec tedy bylo rozhodnuto, že je třeba ustoupit s kvalitou spekter, aby byla možnost za den změřit alespoň čtyři vzorky, protože to zhruba odpovídá klinické praxi při odběru CSF, a tak byly pro další měření zvoleny čtvercové spektrální mapy o 10 \times 10 bodech s roztečí 2 μm .

doba dialýzy/min	SNR ₁	SNR ₂	$\frac{SNR_2}{SNR_1}$
0	70	180	2,6
5	80	220	2,8
20	40	110	2,8

Tabulka 3.4: Shrnutí poměrů signál šum průměrných spekter spektrálních map měřených na vzorcích pacientů č. 19 s různou dobou dialýzy. Poměr signál šum byl určen pro průměrné spektrum spektrální mapy s roztečí 2 μm o 10 \times 10 bodech (SNR₁) a roztečí 1 μm o 20 \times 20 bodech. Obě spektrální mapy byly měřeny těsně po sobě z toho samého místa. Z poměrů $\frac{SNR_2}{SNR_1}$ je zřejmé, že poměr signál šum se při zečtyřnásobení počtu bodů v mapě, zvýšil více než dvakrát, jak předpokládá teorie pro normálně rozdělený šum.



Obrázek 3.32: Faktorová analýza spektrálních map s fotografiemi měřených oblastí z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 11 (sloupec vlevo) a 20 min dialyzovaný od pacienta č. 19 (sloupec vpravo). V mapách koeficientů prvního faktoru jsou přítomny zřetelné pásy nejvyšší koncentrace proteinů při okraji kapky, jejichž šířka nepřesahuje 30 μm . Další faktory jsou uvedeny v Obr. 3.33.



Obrázek 3.33: Druhé a třetí faktory spektrálních map z nedialyzovaného vzorku od pacienta č. 11 (sloupec vlevo) a 20 min dialyzovaného vzorku od pacienta č. 19 (sloupec vpravo). U dialyzovaného vzorku jsou v mapách koeficientů patrné pásy naznačující nehomogenitu složení depozitu, jejichž šířka je kolem $10\ \mu\text{m}$, u nedialyzovaného vzorku se projevují nehomogenity spíše bodového charakteru, avšak v mapě koeficientů k druhému faktoru mají také poloměr kolem $10\ \mu\text{m}$. Fotografie měřené oblasti spolu s prvními faktory a grafy singulárních čísel jsou uvedeny v předchozím Obr. 3.32

3.6 Prověření degradace vzorků

V bakalářské práci Nadi Rosové (2008) již degradace DCDR vzorků CSF byla zkoumána. V této práci bylo na tuto otázku navázáno, ale zaměřili jsme se na degradaci CSF ještě před nanesením na DCDR substrát, abychom ověřili účinnost nově vyvíjené metody a také abychom ujasnili skladování vzorků CSF a vliv opakovaného rozmrazení vzorků na jejich kvalitu. Vzorek pacienta č. 50 jsme rozdělili na dva alikvoty. Z obou alikvotů byly odebrány vzorky, které se po 5min dialýze a též nedialyzované nanasly na DCDR substrát. Vzápětí poté byla ze vzorků změřena spektra. První alikvot se nechal stát při pokojové teplotě a po určitém čase z něj byly znovu odebrány vzorky, ze kterých se bez dialýzy a po 5min dialýze změřila DCDR spektra. Souhrn dob od rozmrazení, ve kterých byla měřena DCDR spektra je uveden v *Tab. 3.5*. S druhým alikvotem se zacházelo obdobně, pouze mezi měřeními byl místo ponechání na laboratorní teplotě zamrazen na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a znovu rozmražen teprve těsně před dalším měřením. Všechna spektra při zkoumání degradace vzorků byla získávána ve čtvercové spektrální mapě o hraně 10 bodů a rozteči $2\text{ }\mu\text{m}$. Ze změřených spektrálních map byla, po odečtení pozadí a odstranění artefaktů způsobených kosmickým zářením, vypočtena průměrná spektra, která byla dále zpracována faktorovou analýzou.

Průběhy koeficientů zastoupení jednotlivých faktorů ve změřených spektrech v závislosti na době degradace při pokojové teplotě nebo na počtu rozmrazení jsou uvedeny v *Obr. 3.34–3.37*. Pro degradaci na pokojové teplotě lze u nedialyzovaného vzorku vyzorovat vzrůstající zastoupení čtvrtého faktoru ve spektru (viz *Obr. 3.34*) a u dialyzovaného vzorku dokonce druhého faktoru (viz *Obr. 3.35*). Změny způsobené rozmrazováním jsou také patrné ve stoupající tendenci koeficientu zastoupení čtvrtého faktoru ve spektru nedialyzovaného vzorku (viz *Obr. 3.36*). Dialyzovaný vzorek v tomto ohledu nemá pozorovatelný žádný prokazatelný trend koeficientů zastoupení jednotlivých faktorů.

Výše označené faktory související s degradací vzorků jsou shrnuty v *Obr. 3.38*. Ve všech třech případech jsou pozorovatelné velmi podobné spektrální změny amidu I (~ 1660), které pravděpodobně náleží úbytku α -helikálních struktur v proteinové složce vzorku, pásu na $\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ a CH_2 vibrací ($\sim 1450\text{ cm}^{-1}$). Vzorky ponechané při pokojové teplotě se také v průběhu degradace mění v pásu $\sim 1330\text{ cm}^{-1}$, fenylalaninu (1002 cm^{-1}), v oblasti tyrosinového dubletu (850 a 825 cm^{-1}) a pásu na $\sim 760\text{ cm}^{-1}$. Komplexnější změny jsou pozorovatelné v nedialyzovaném vzorku v oblasti $1004\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$.

Degradaci způsobenou zamrazováním oproti tomu provází změny v pásu na 1325 cm^{-1} , amidu III ($\sim 1270\text{ cm}^{-1}$), což opět pravděpodobně odpovídá úbytku zastoupení α -helixu v proteinech CSF, na pásu 1046 a $\sim 900\text{ cm}^{-1}$. Změny v oblasti tyrosinového dubletu jsou v tomto případě skryté v šumu a spojené v jeden pás na 840 cm^{-1} . Na pásu fenylalaninu (1002 cm^{-1}) jsou změny pouze nepatrné. V pásu na 1130 a 1057 cm^{-1} se změny shodují s degradací nedialyzovaného vzorku při pokojové teplotě.

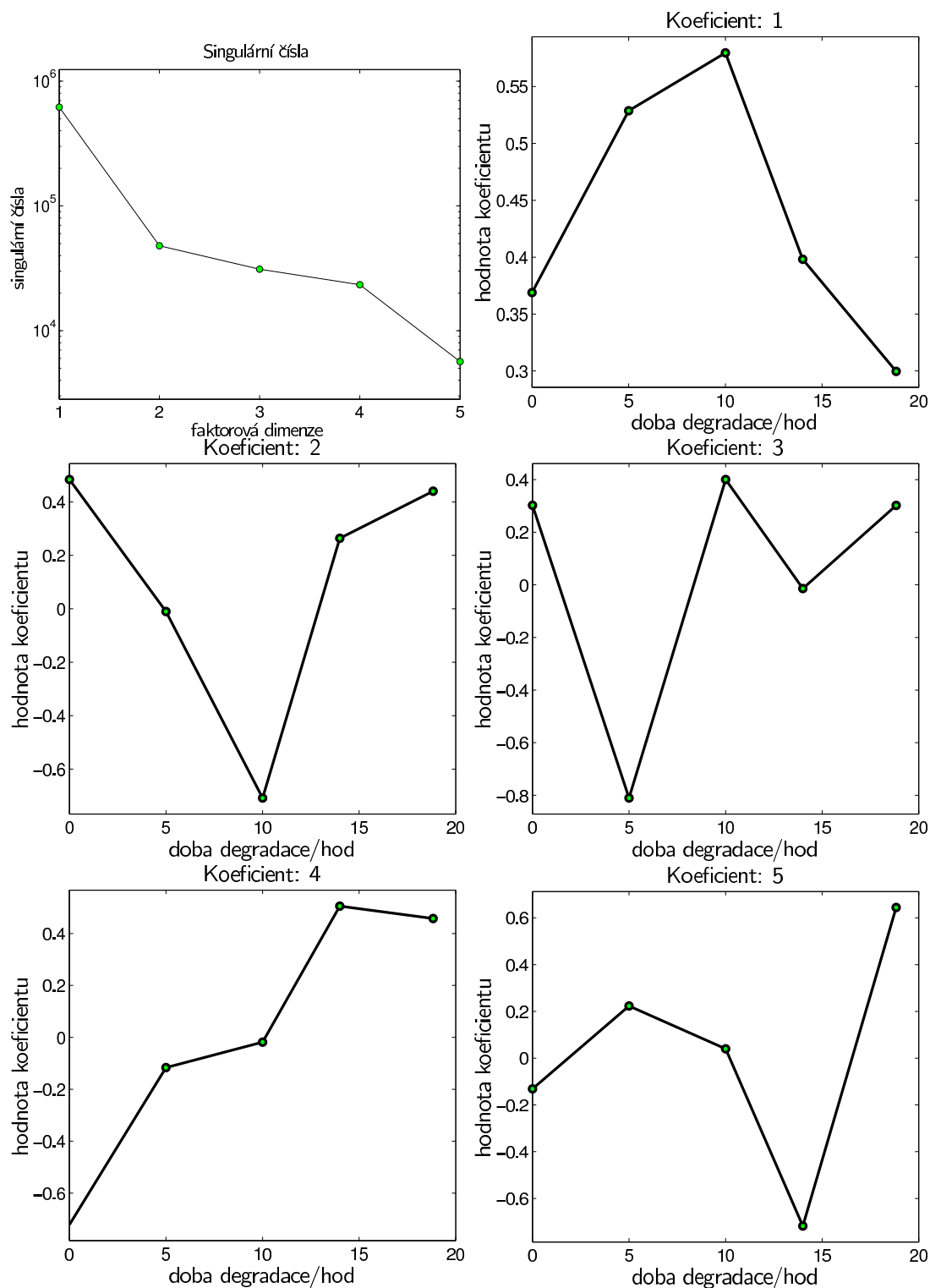
Z porovnání spektrálních změn způsobených degradací je zřejmé, že při zamrazování jsou postiženy jiné proteiny než při degradaci na pokojové teplotě, protože spektrální změny indukované těmito dvěma procesy se v obou případech liší. Na změny sekundární struktury proteinů citlivý pás amidu I se sice mění v obou dvou případech podobným způsobem, při zamrazování však dochází navíc i ke změnám

Pořadí měření	1	2	3	4	5
Doba od rozmražení/(hod:min)	0:00	5:00	10:00	14:00	18:50

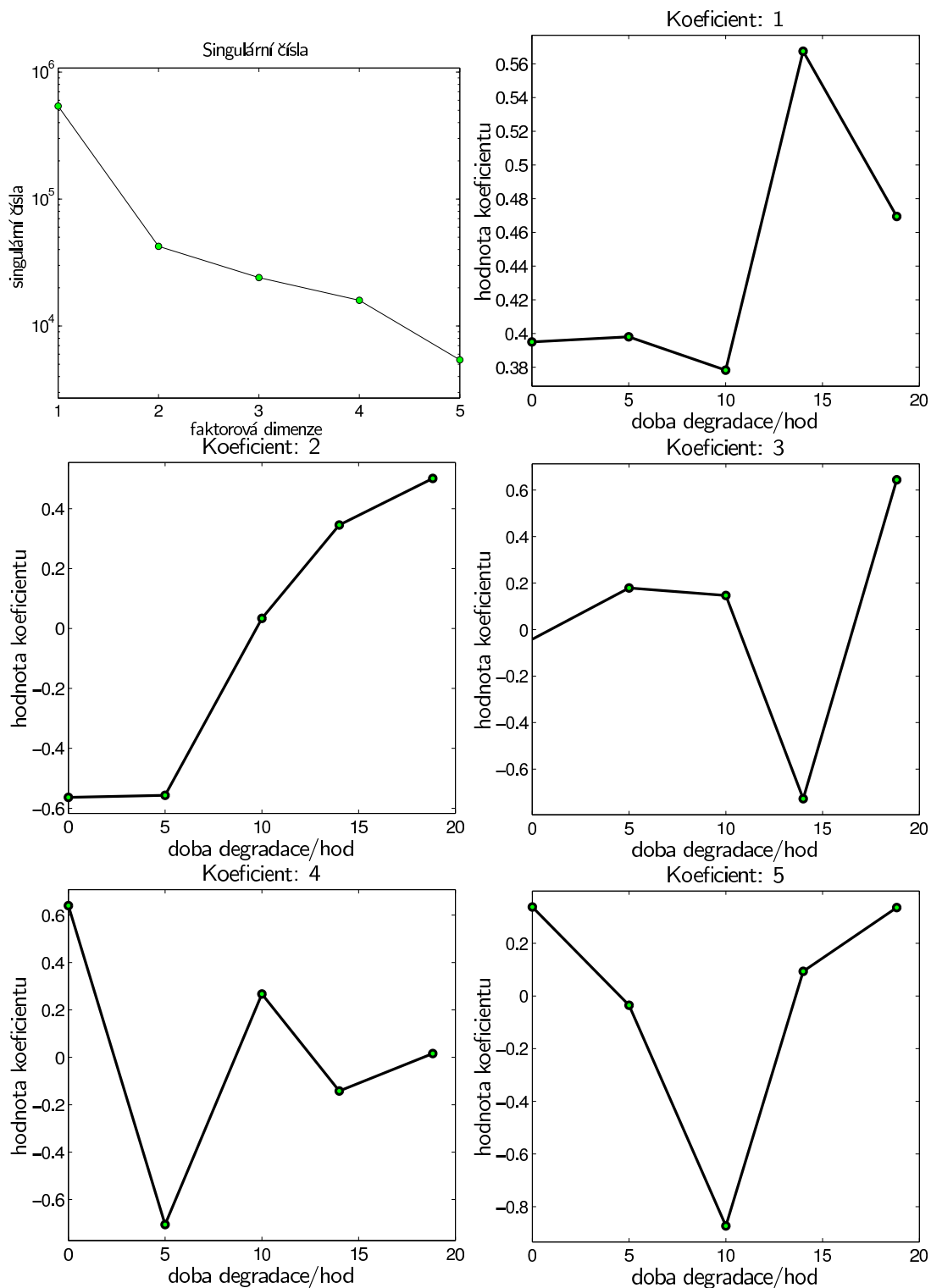
Tabulka 3.5: Délka degradace vzorků při pokojové teplotě od rozmražení vzorku. Tabulka je společná pro nedialyzovaný i pro 5 min dialyzovaný vzorek

v pásu amidu III. Nedialyzované vzorky také vykazují změny v oblasti 1004–1220 cm^{-1} , ve které jsou pravděpodobně hodně zastoupeny pásy neproteinové části CSF. Velmi zajímavé je pozorování, že změny indukované zamrazováním vzorků nejsou při tomto nastavení podmínek měření pozorovatelné u dialyzovaného vzorku. To totiž znamená, že se dialýzou pravděpodobně ze vzorku neodstraňují pouze soli, ale také proteiny a jiné složky CSF, které podléhají degradaci zamrazováním vzorku a které by mohly být budoucími ukazateli patologického stavu.

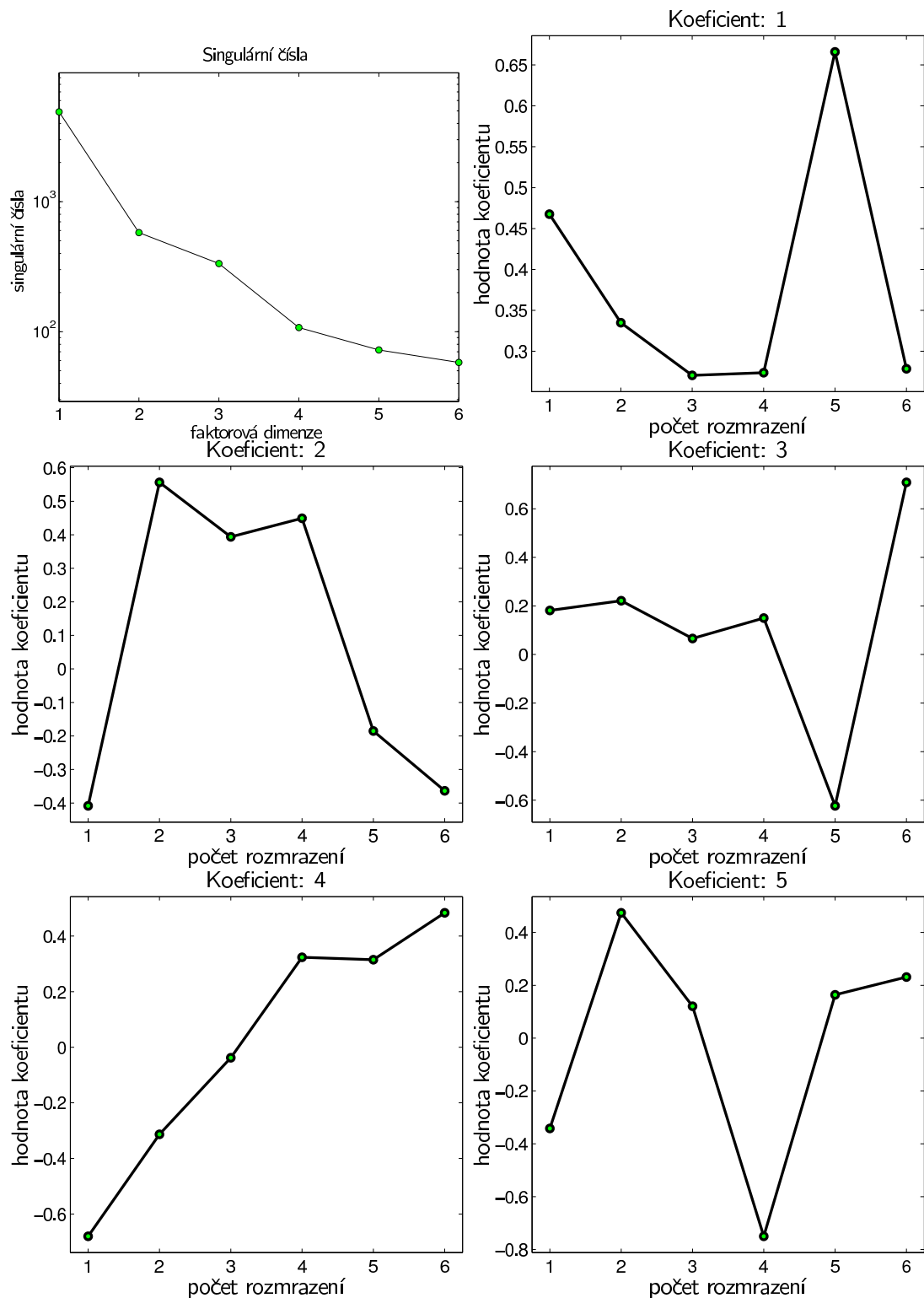
V dalším postupu, abychom se vyvarovali degradaci vzorků zamrazováním, jsme všechny vzorky, které bylo třeba zmrazit, zamrazovali ponořením do kapalného dusíku. Takto totiž vzorek zamrzne tak rychle, že v něm nedojde ke změnám indukovaným pomalým zamrazováním.



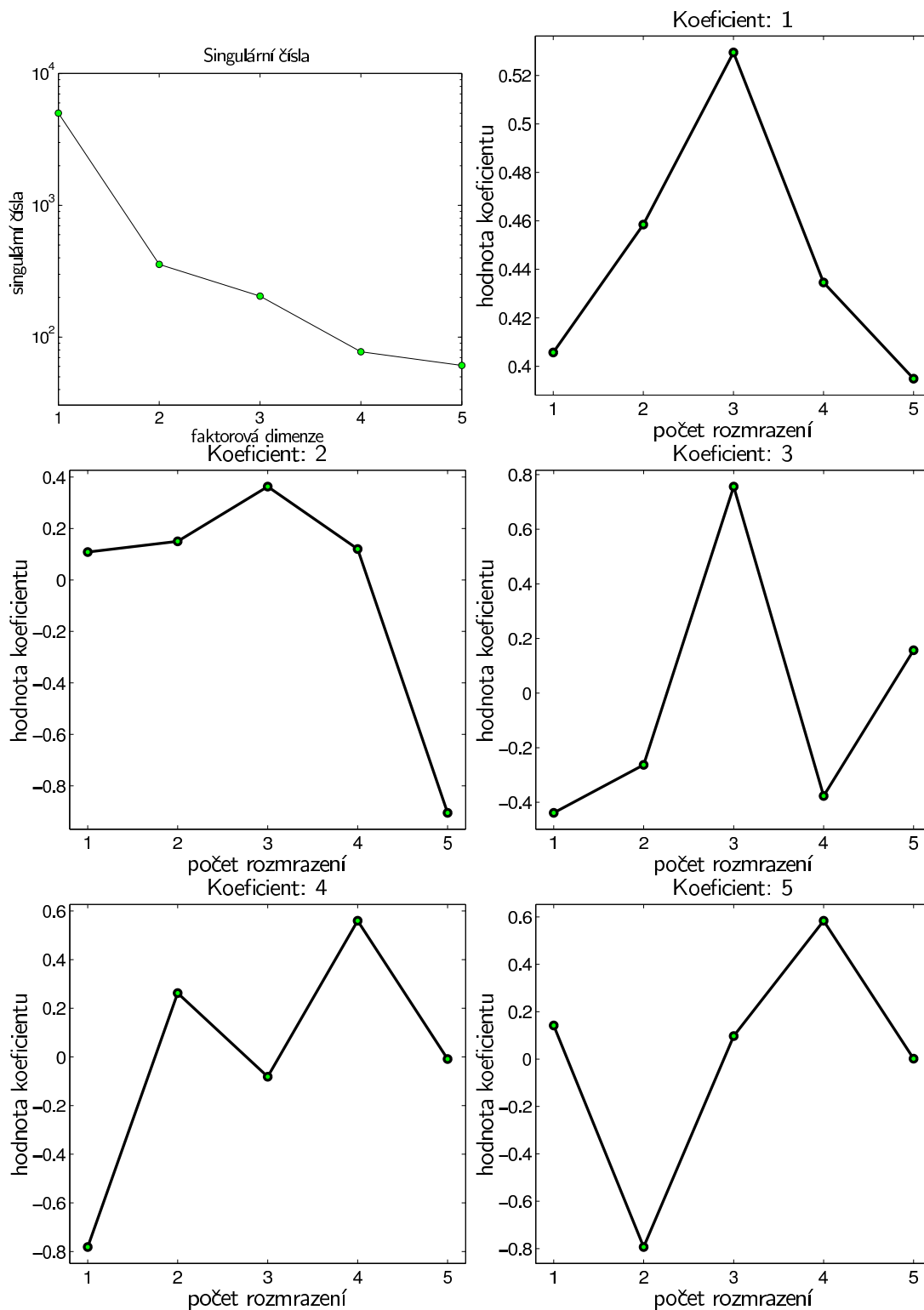
Obrázek 3.34: Singulární čísla a koeficienty zastoupení faktorů v průměrných spektrech spektrálních map pořízených z nedialyzovaných vzorků pacienta č. 50 po různé době degradace při pokojové teplotě. Ve čtvrtém faktoru je pozorovatelný vzestupný trend zastoupení faktoru s dobou degradace. Tento faktor je zobrazen v Obr. 3.38



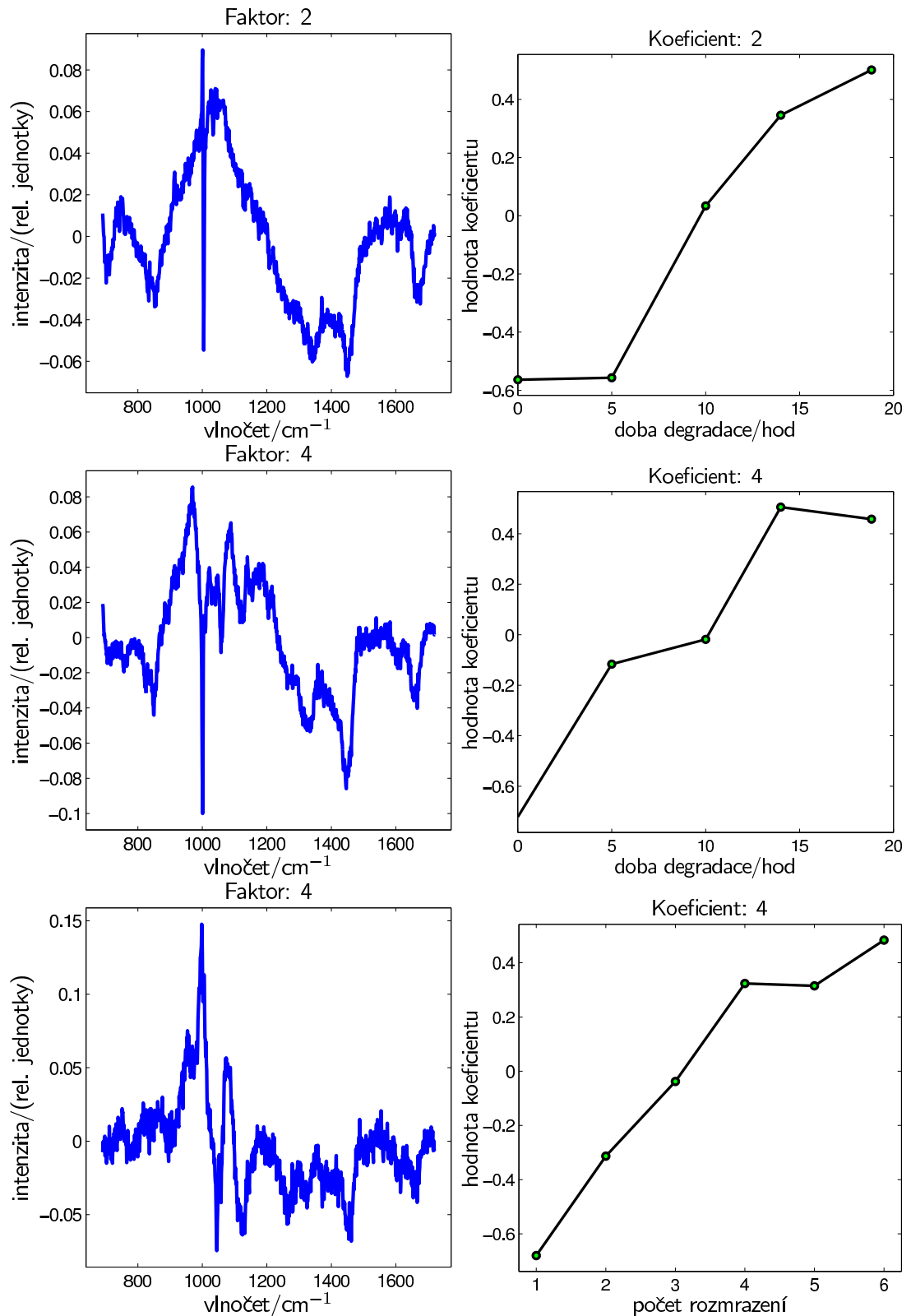
Obrázek 3.35: Singulární čísla a koeficienty zastoupení faktorů v průměrných spektrech spektrálních map porízených z 5 min dialyzovaných vzorků pacienta č. 50 po různé době degradace při pokojové teplotě. Ve druhém faktoru je pozorovatelný vzestupný trend zastoupení faktoru s dobou degradace. Tento faktor je zobrazen v Obr. 3.38



Obrázek 3.36: Singulární čísla a koeficienty zastoupení faktorů v průměrných spektrech spektrálních map pořízených z nedialyzovaných vzorků pacienta č. 50 po různém počtu zamrazení vzorku na teplotu -20°C . Ve čtvrtém faktoru je pozorovatelný vzestupný trend zastoupení faktoru s počtem zamrazení. Tento faktor je zobrazen v Obr. 3.38



Obrázek 3.37: Singulární čísla a koeficienty zastoupení faktorů v průměrných spektrech spektrálních map porízených z nedialyzovaných vzorků pacienta č. 50 po různé době degradace při pokojové teplotě. V žádném z koeficientů faktorů zde není pozorovatelný trend související se zamrazováním vzorku, což poukazuje ve srovnání s nedialyzovaným vzorkem (viz Obr. 3.36) na skutečnost, že při dialýze se kromě solí ze vzorku odstraňují také proteiny a jiné složky moku, které jsou náchylné k degradaci zamrazováním.



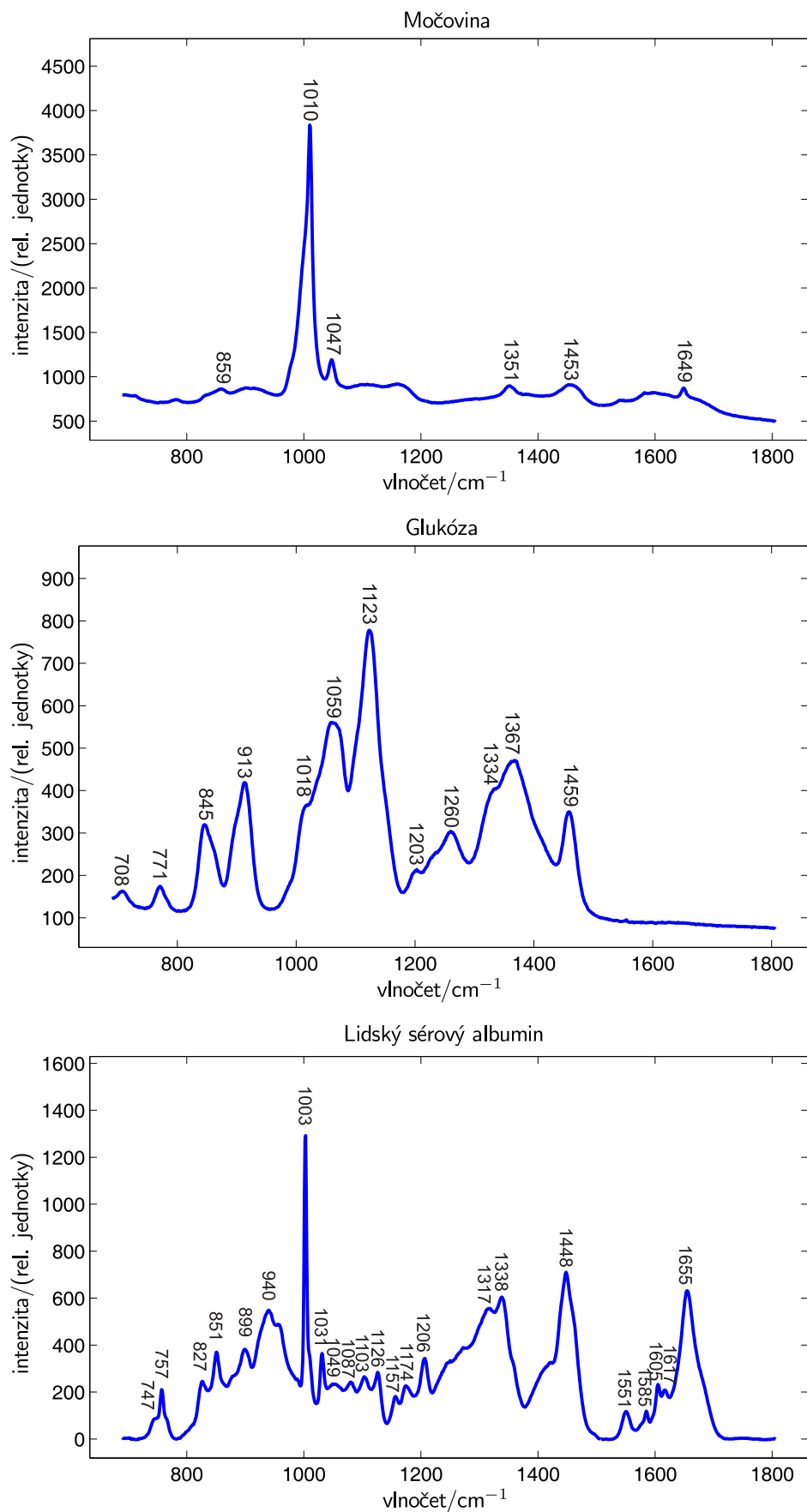
Obrázek 3.38: Faktory, jejichž zastoupení sledovalo rostoucí trend (viz k nim příslušející koeficienty zastoupení ve spektrech) v důsledku degradace vzorku. Nahoře je uveden druhý faktor související s degradací 5 min dialyzovaného vzorku při pokojové teplotě, uprostřed nalezneme čtvrtý faktor související s degradací nedialyzovaného vzorku, taktéž při pokojové teplotě a dole je uveden čtvrtý faktor, jehož zastoupení ve spektru roste s počtem zamrazení vzorku

3.7 Některé komponenty mozkomíšního moku

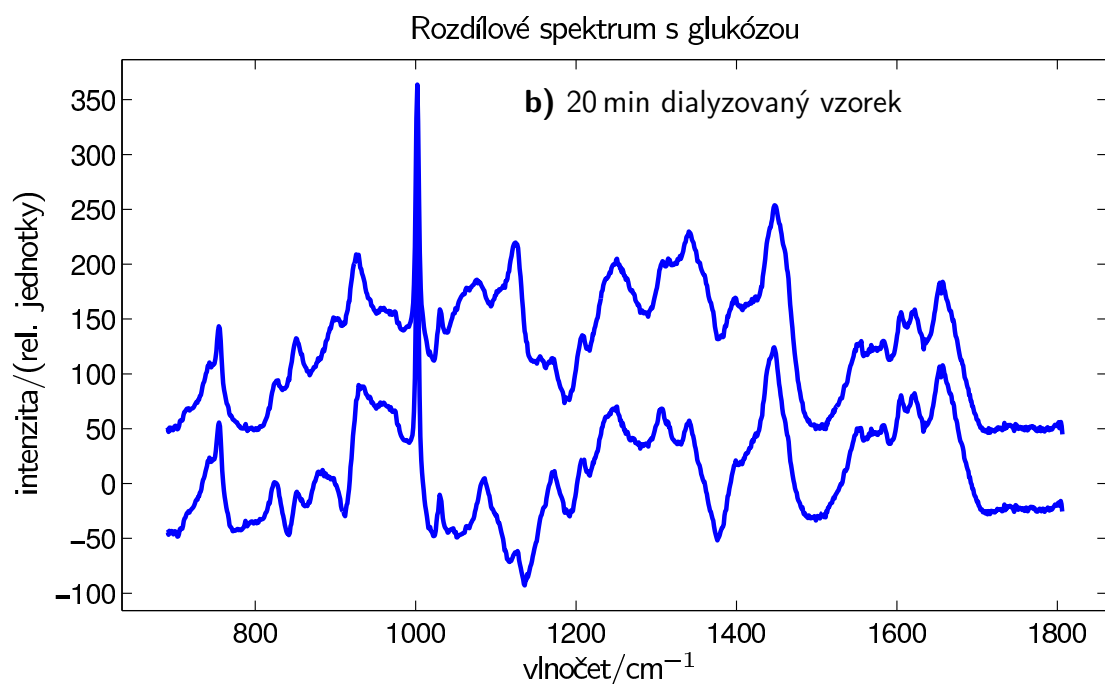
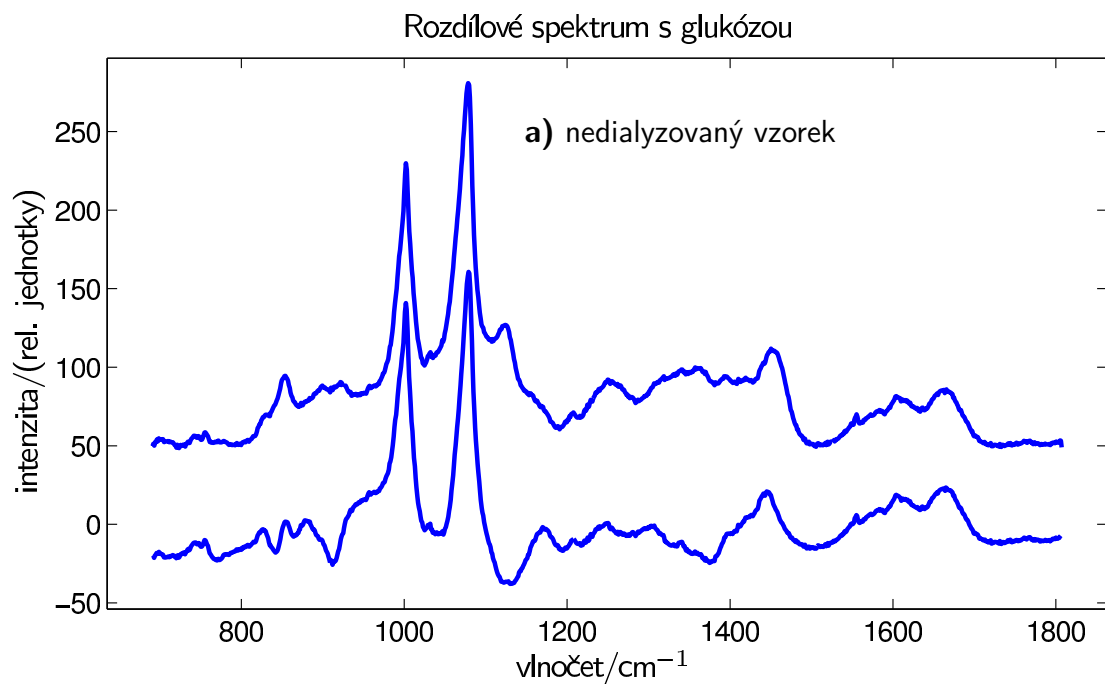
Na konci optimalizace podmínek měření byla proměřena spektra některých významných komponent CSF (viz. *Tab. 1.1*), aby bylo ověřeno, zdali by nebylo možné DCDR spektra získaná z CSF zjednodušit jejich odečtením. Konkrétně se jednalo o močovinu, glukózu a lidský sérový albumin, jejichž DCDR spektra můžeme spatřit na *Obr. 3.39*. Poté byla tato spektra jednotlivě odečtena od průměrných spekter ze spektrálních map nedialyzovaného a 20 min dialyzovaného vzorku pacienta č. 19 pomocí programu napsaném v Matlabu (The Mathworks, Natick, MA, USA) Janem Palackým na Fyzikálním ústavu v Praze, který využíval metody ortogonálních diferencí. Rozdílová i původní spektra jsou zobrazena na *Obr. 3.40*, *3.41* a *3.42*.

Z rozdílových spekter s glukózou (viz *Obr. 3.40*) je patrné, že její spektrum je přítomné jak ve spektru nedialyzovaného tak spektru dialyzovaného vzorku. V obou spektrech pozorujeme při odečtení výrazný úbytek pásu na 1125 cm^{-1} , 910 cm^{-1} , oblasti v okolí pásu 1370 cm^{-1} a snížení pásu na 1079 cm^{-1} . Při odečtu spektra močoviny (viz *Obr. 3.41*) se ukázalo, že signál močoviny rozšiřoval pás fenylalaninu na 1002 cm^{-1} v nedialyzovaném vzorku. Ve spektru dialyzovaného vzorku je zřejmé, že metoda ortogonálních diferencí odečetla ze spektra signál močoviny špatně. Močovina totiž byla nejspíše ze vzorku odstraněna dialýzou, na což poukazuje skutečnost, že pás fenylalaninu v neodečteném spektru je velmi ostrý a pokud se zaměříme na *Obr. 3.42*, který ukazuje odečítání spekter lidského sérového albuminu, zjistíme, že tento pás byl skoro celý odečten. Dominantní pás na 1079 cm^{-1} který je přítomen pouze v nedialyzovaném vzorku, však nenáleží žádné z komponent mozkomíšního moku a nepodařilo se ho tedy na základě těchto komponent identifikovat. Přiřazení pásů ve spektru CSF na základě výše popsaných úvah a popisu spekter proteinů v literatuře je uvedeno v *Obr. 3.43* a *Tab. 3.6*.

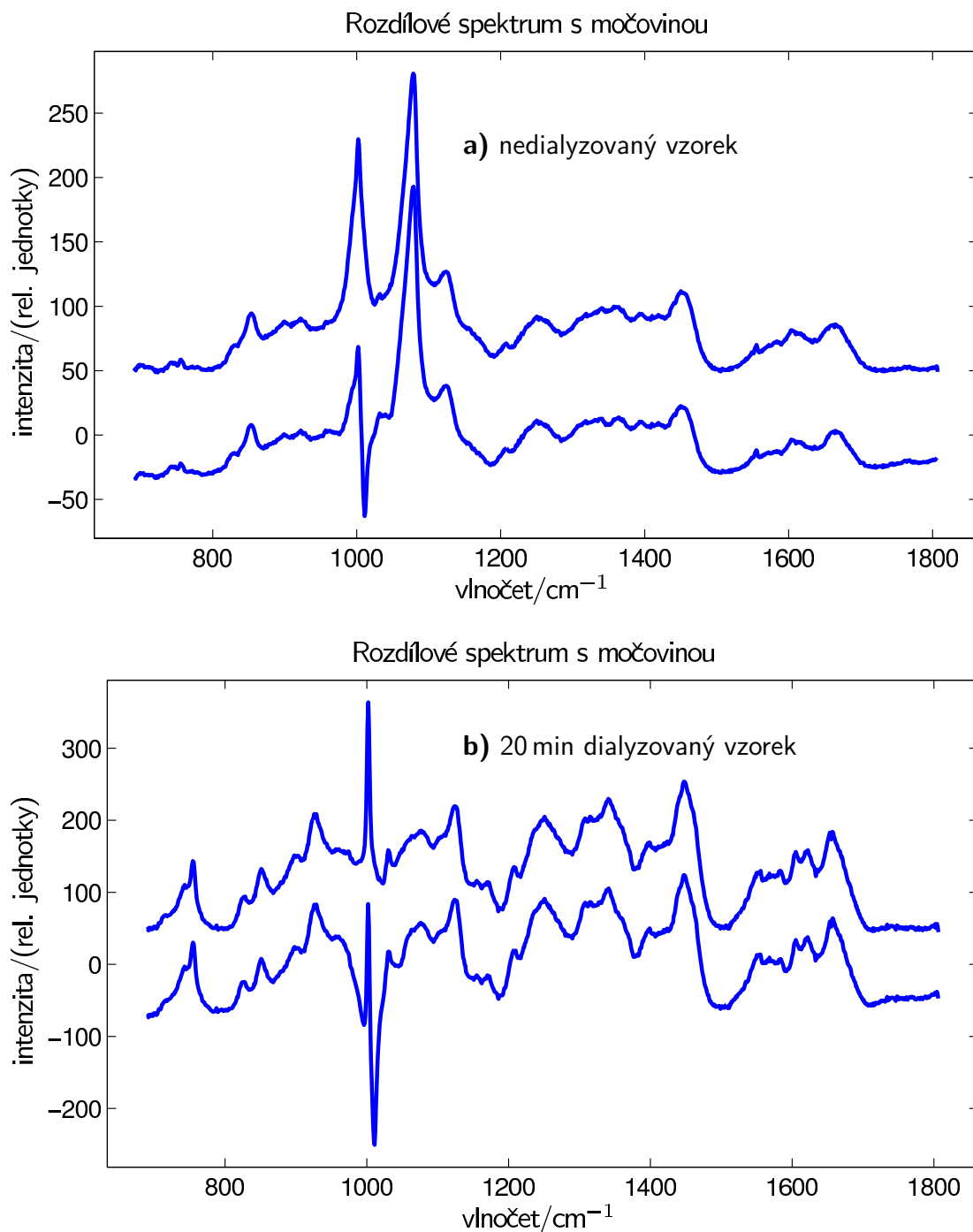
Proměřením některých komponent CSF se podařilo přiřadit část pásů v jeho spektru. Ukázalo se však, že DCDR spektrum CSF je velmi komplexní, a že z něj nelze lehce odečíst jeho jednotlivé spektrální komponenty a ulehčit si tak budoucí analýzu.



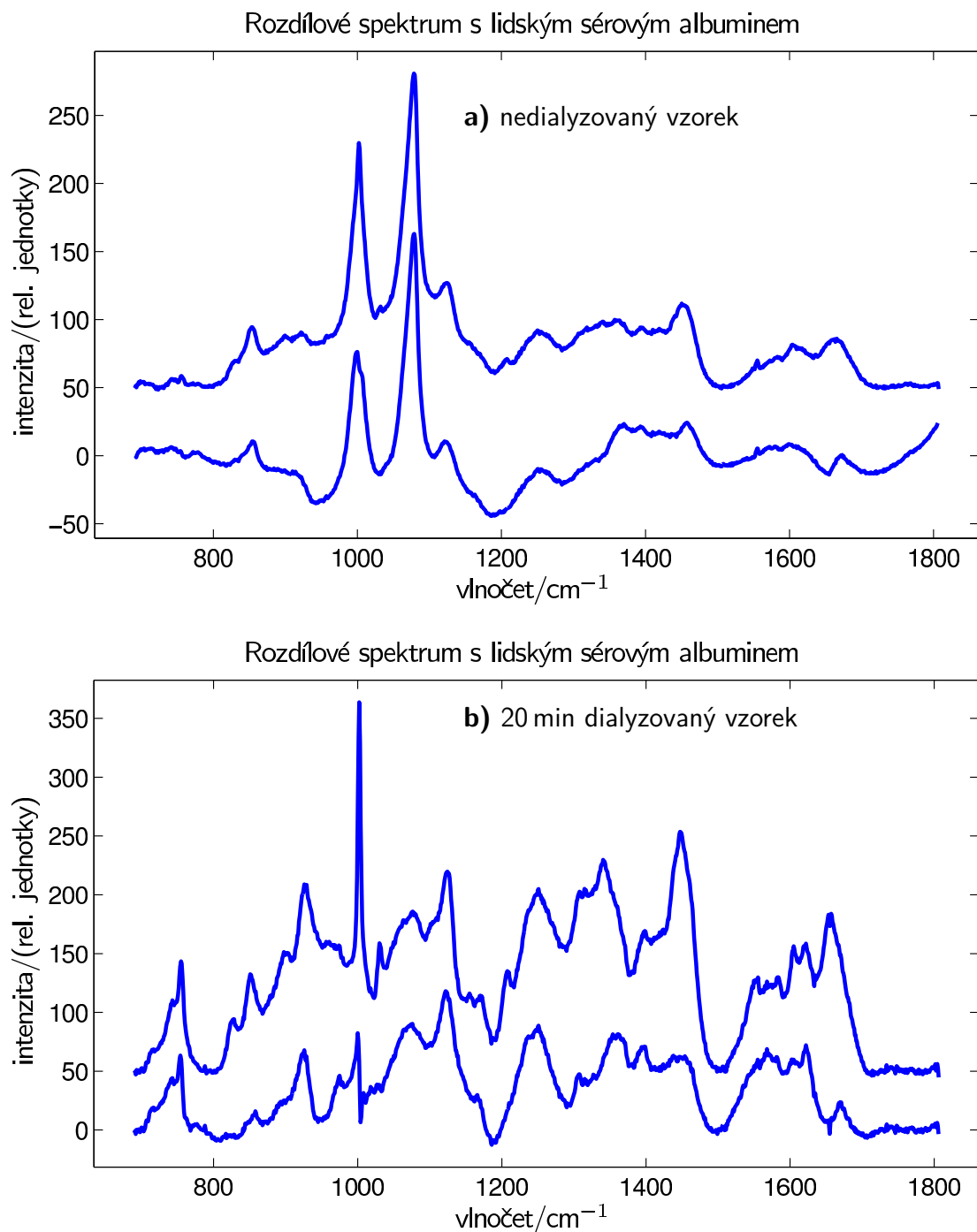
Obrázek 3.39: DCDR spektra některých komponent mozkomíšního moku.



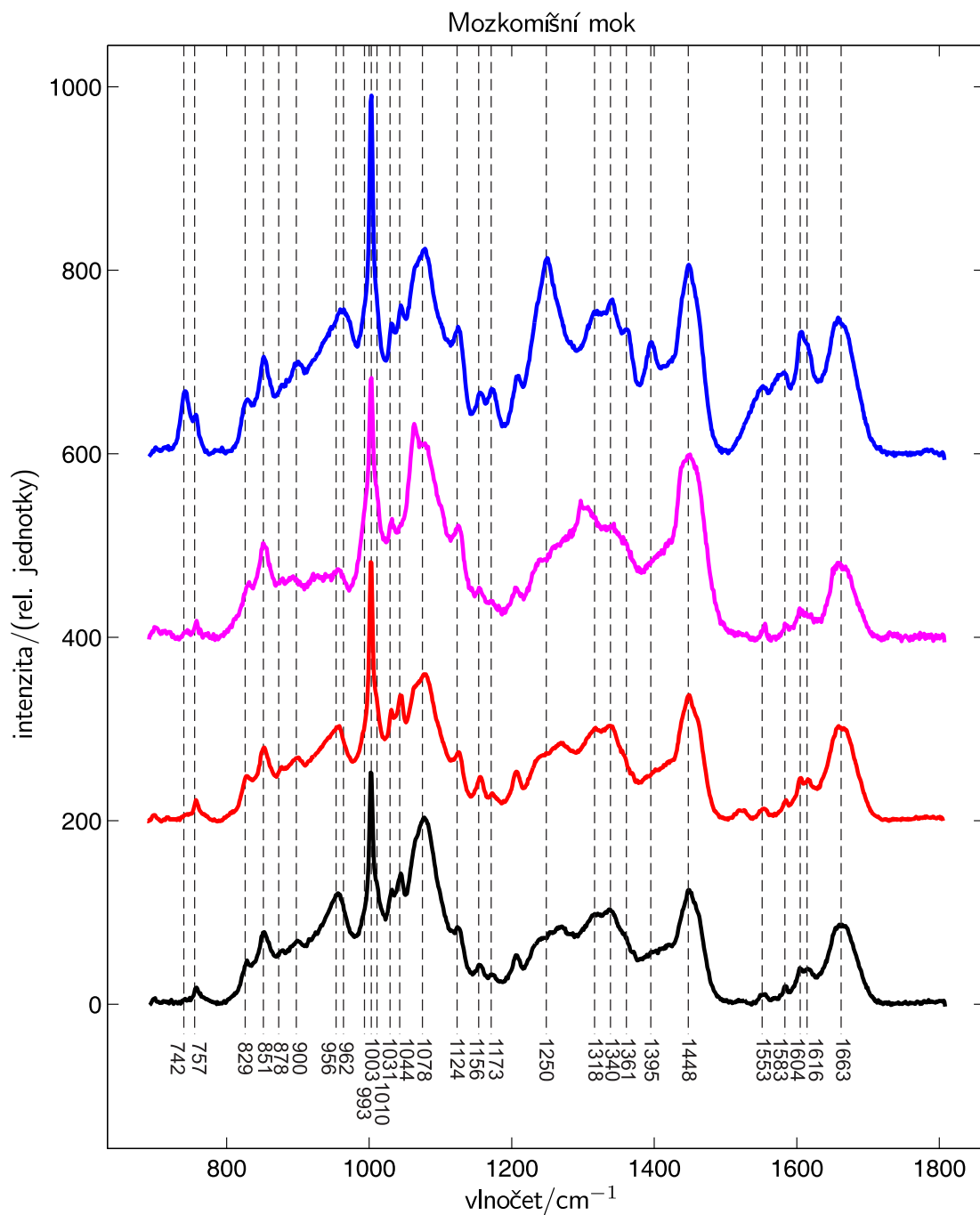
Obrázek 3.40: Průměrná a rozdílová spektra získaná ze spektrální mapy měřené na nedialyzovaném (graf a)) a 20 min dialyzovaném (graf b)) DCDR vzorku mozkomíšního moku od pacienta č.19. Průměrným spektrům odpovídá vždy horní linka, diferenčním spodní. Rozdílová spektra vznikla odečtením spektra glukózy uvedeného v Obr. 3.39 od spektra průměrného metodou ortogonálních diferencí.



Obrázek 3.41: Průměrná a rozdílová spektra získaná ze spektrální mapy měřené na nedialyzovaném (graf a)) a 20 min dialyzovaném (graf b)) DCDR vzorku mozkomíšního moku od pacienta č.19. Průměrným spektrům odpovídá vždy horní linka, diferenčním spodní. Z diferenčních spekter je zřejmé, že močovina byla ze vzorku dialýzou odstraněna. Rozdílová spektra vznikla odečtením spektra močoviny uvedeného v *Obr. 3.39* od spektra průměrného metodou ortogonálních diferencí.



Obrázek 3.42: Průměrná a rozdílová spektra získaná ze spektrální mapy měřené na nedialyzovaném (graf a)) a 20 min dialyzovaném (graf b)) DCDR vzorku mozkomíšního moku od pacienta č.19. Průměrným spektrům odpovídá vždy horní linka, diferenčním spodní. Rozdílová spektra vznikla odečtením spektra lidského sérového albuminu uvedeného v Obr. 3.39 a polynomu pátého stupně od spektra průměrného metodou ortogonálních diferencí.



Obrázek 3.43: Označení pásů ve spektrech mozkomíšního moku typických spektrálních zástupců ze skupiny mladých (v grafu označeno černě) a starých (fialově) zdravých kontrolních pacientů, pacientů trpících roztroušenou sklerózou (červeně) a pacientů s Alzheimerovou nemocí (modře). Ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí vidíme výrazné zvýšení intenzity na pásech 1553, 1583, 1604 a 1616 cm^{-1} , které by mohlo indikovat, dle výsledků práce [Ettrich et al., 2002], vyšší zastoupení proteinových oligomerů v mozkomíšním moku. Přiřazení vibrací jednotlivým pásům je uvedeno v Tab. 3.6

$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	přiřazení	reference
742	Cys ($\nu\text{C-S P}_C$), Trp	[1]
757	Trp	[1]
829	Tyr, Phe	[1, 2]
851	Tyr, Phe	[1, 2]
878	Trp, Ile, Val	[2]
900	Ala	[1, 2]
956	Lys, Val, Leu	[1, 2]
962	Lys, Leu, $-\text{OPO}_3\text{H}^-$	[1, 2, 3]
993 sh	Ile, His	[1, 2]
1003	Phe	[1, 2]
1010 sh	Trp	[1, 2]
1031	Phe	[1, 2]
1044	Lys, Ala, Phe, močovina	[1, 2]
1078	Lys, Phe, $-\text{OPO}_3^{2-}$	[1, 2, 3]
1124	Ile, Val, Leu, Trp	[1, 2]
1156	Ile, Val	[1, 2]
1173	Tyr, Phe	[1, 2]
1250	amid III, neuspořádané klubko	[1, 2]
1318	amid III, α -helix	[1, 2]
1340	Trp, Phe, Val	[1, 2]
1361	Trp, Phe, Val	[1, 2]
1395	νCOO^-	[1, 2]
1448	δCH_2 , δCH_3 , Lys, Ile, Leu	[1, 2]
1553	Trp	[1, 2]
1583	Trp, Phe	[1, 2]
1604	Phe, Tyr	[1, 2]
1616	Tyr, Trp	[1, 2]
1663	amid I, α -helix/ β -skládaný list	[1]

Tabulka 3.6: Přiřazení pásů ve spektru mozkomíšního moku, ve kterém $\bar{\nu}$ symbolizuje vlnočet, sh značí postranní pás. Reference [1] odkazuje na práci [Tensmeyer a Kauffman, 1996] a [2] je citace na práci [Overman a Thomas, 1999] a [3] odpovídá práci [Xie et al., 2005].

3.8 Vývoj nové diagnostické metody

Optimalizací podmínek měření tedy bylo určeno, že dále se budou měřit spektrální mapy velikosti 10×10 bodů s roztečí $2 \mu\text{m}$ na nedialyzovaných a 5 min dialyzovaných vzorcích, protože delší dialýza pravděpodobně kromě solí také odplavuje proteiny, které podléhají degradaci a ve kterých by mohly být vidět změny způsobené patologickým stavem.

Ze změřených spektrálních map se po odečtení pozadí, ostrých pásů kosmického záření a vyřazení velmi odlišných spektrálních bodů spočetla průměrná spektra u , která se normalizovala na intenzitu jednoho z výrazných pásů (příslušné pásy jsou uvedeny u jednotlivých částí měření). Z těchto spekter se pak také vypočetlo průměrné spektrum \bar{u} a následně i diferenční spektrum v s tímto průměrným spektrem

$$v = u - \bar{u}. \quad (3.1)$$

Diferenční spektrum bylo poté proloženo metodou nejmenších čtverců polynomem sedmého stupně, který se pak odečetl od původního spektra u , čímž byla zajištěna minimální mezispektrální variabilita pozadí vzniklá při jeho ručním odečítání pomocí programu background (viz str. 31). Takto upravená spektra byla následně podrobena shlukové a faktorové analýze, jejichž popis je uveden v kapitolách 2.1.2 a 2.1.1. Pro CA byla používána euklidovská míra, vzdálenost shluků byla posuzována Wardovou metodou, která ve srovnání s ostatními námi testovanými metodami, které jsou popsány v kapitole 2.1.2, dosahovala nejlepších výsledků. Bylo také vyzkoušeno vyřešit problém s mezispektrální variabilitou pozadí pomocí spekter první a druhé derivace vyhlazených Savitzkého-Golayovým filtrem (o Savitzkého-Golayově filtru pojednává kapitola 2.1.3). Tímto přístupem však bylo dosaženo horších výsledků.

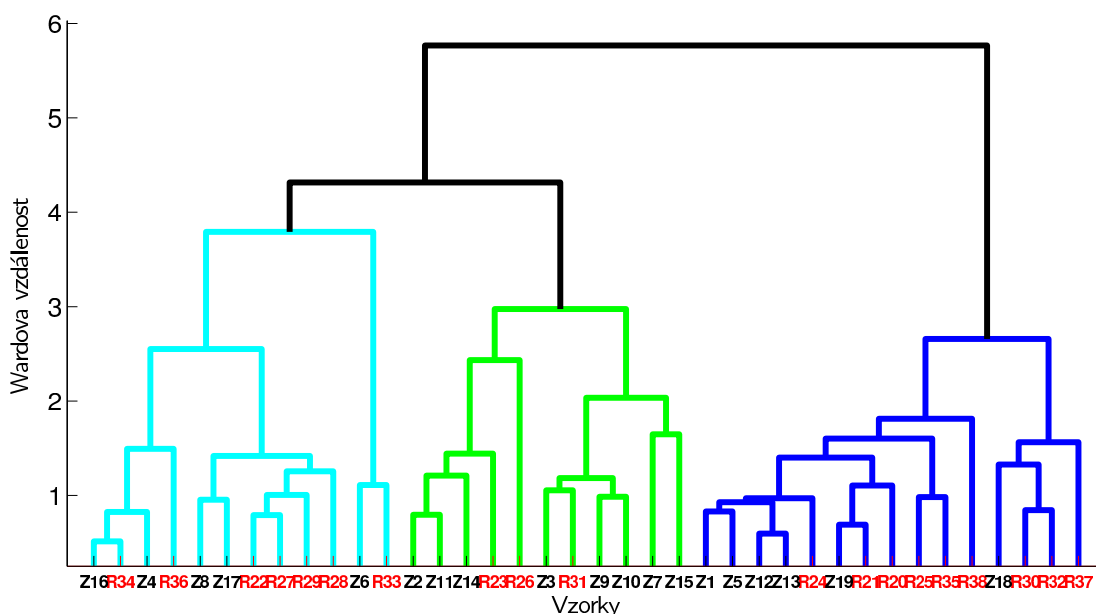
3.8.1 Diagnóza pacientů trpících roztroušenou sklerózou

Pro výzkum RS jsme použili 19 vzorků pacientů trpících RS a k nim 19 kontrolních vzorků stejné věkové kategorie. Všechna spektra jsme normovali na intenzitu pásu fenylalaninu na 1002 cm^{-1} . Nejprve jsme se pokusili zpracovat dialyzované vzorky. V koeficientech faktorové analýzy se nám však nepodařilo nalézt žádnou závislost související s diagnózou a stejně tak ani v CA, která je uvedena na *Obr. 3.44*, nebylo patrné žádné tvoření shluků korelujících s diagnózou pacientů. Proto jsme museli přistoupit k analýze složitějšího, nedialyzovaného systému.

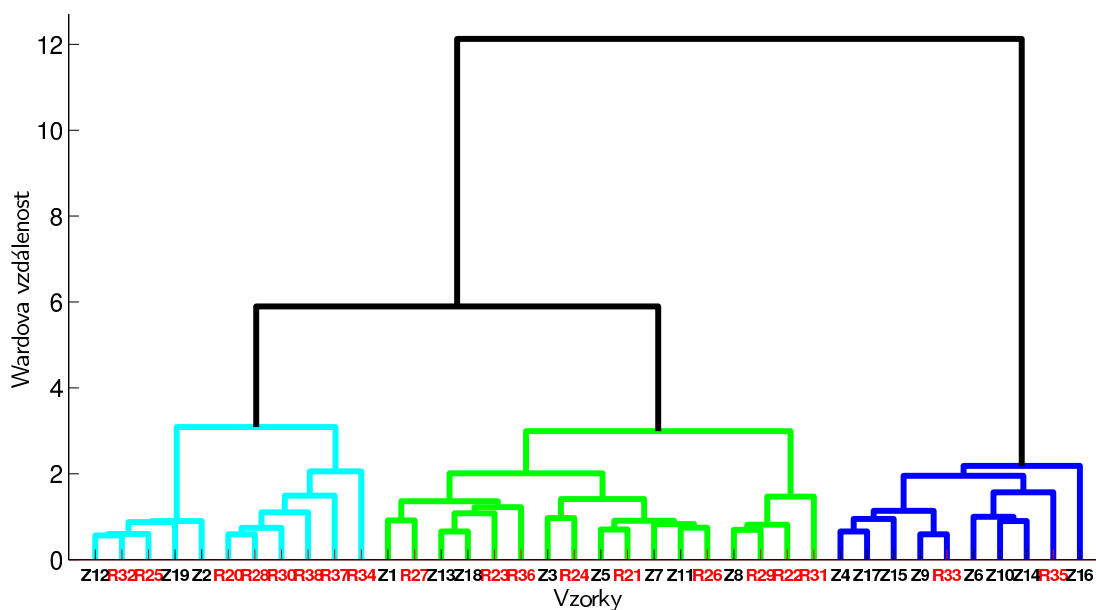
V *Obr. 3.47* je uvedena faktorová analýza spekter nedialyzovaných vzorků. Již v druhém faktoru se pacienti rozdělují dle diagnózy. Máme zde skupinu 8 zdravých pacientů, do které se však dostali i dva nemocní pacienti, 13 pacientů, kteří nejsou přesně určeni a 12 pacientů, kteří byli určeni správně jako nemocní. K nemocným pacientům byly zařazeny i dva zdravé kontrolní vzorky. Velmi zajímavé je povšimnout si, kde dochází ke spektrálním změnám způsobeným touto nemocí ve druhém faktoru. Ty totiž nejsou nejvýraznější na pásech proteinů, jak bylo původně předpokládáno, ale v poměrech pásů na 955 a 1080 cm^{-1} vůči pásu fenylalaninu na 1002 cm^{-1} , a tedy vůči intenzitě spektra proteinů v CSF zastoupených. Tímto poznatkem se také vysvětluje volba pásů, na který byla spektra normována a pro který byly získány nejlepší výsledky. Spektra normovaná na pás fenylalaninu totiž mají nejlépe srovnané pozadí v jeho okolí, kde právě

dochází k největším změnám a tyto změny pak v použitých statistických metodách nejlépe vynikají.

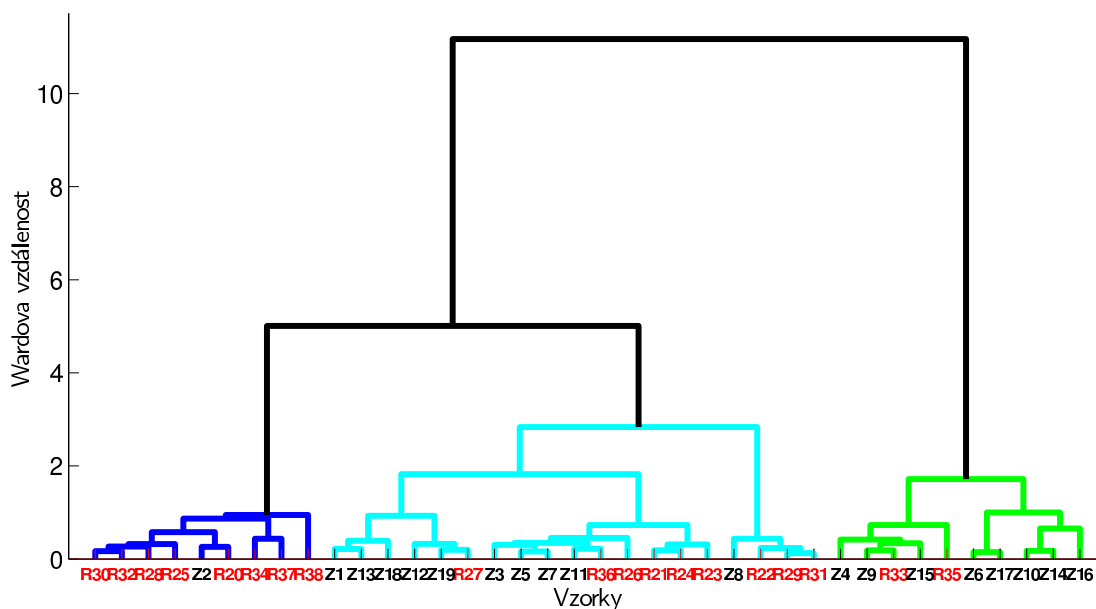
Použitím CA (viz Obr. 3.45) na spektra nedialyzovaných vzorků získáme podobné výsledky, jaké vyplývají z faktorové analýzy, správně určených nemocných je však v tomto případě pouze osm a přibývá k nim navíc ještě zdravý vzorek Z19. Výsledky CA ještě můžeme vylepšit, zaměříme-li se pouze na pás na 1080 cm^{-1} , kde dle faktorové analýzy dochází k největším spektrálním změnám. V takovémto případě obdržíme ve shluku nemocných osm dobře určených vzorků a jeden chybně určený vzorek. Navíc se začnou tvořit shluky nemocných a shluky zdravých v zóně neurčených pacientů, které by mohly odpovídat různým stupňům progresu patologického stavu. Zúžení analyzovaného intervalu nemá žádný vliv na shluk zdravých. Jako měřítko účinnosti metody byla spočtena *senzitivita*, což je poměr mezi správně diagnostikovanými nemocnými a celkovým počtem nemocných a *specifita*, která je podílem mezi počtem zdravých, kteří byli chybně určeni jako nemocní a celkovým počtem zdravých. Pokud zahrneme i shluk tří nemocných a jednoho zdravého, který se tvoří v zóně neurčených v Obr. 3.45 napravo do skupiny nemocných pacientů, získáme pro tuto metodu *senzitivitu* 58 % a pokud budeme pacienty, kteří nebyli určeni jako nemocní považovat za zdravé, bude *specifita* 90 %. Z faktorové analýzy získáme *senzitivitu* dokonce 63 %.



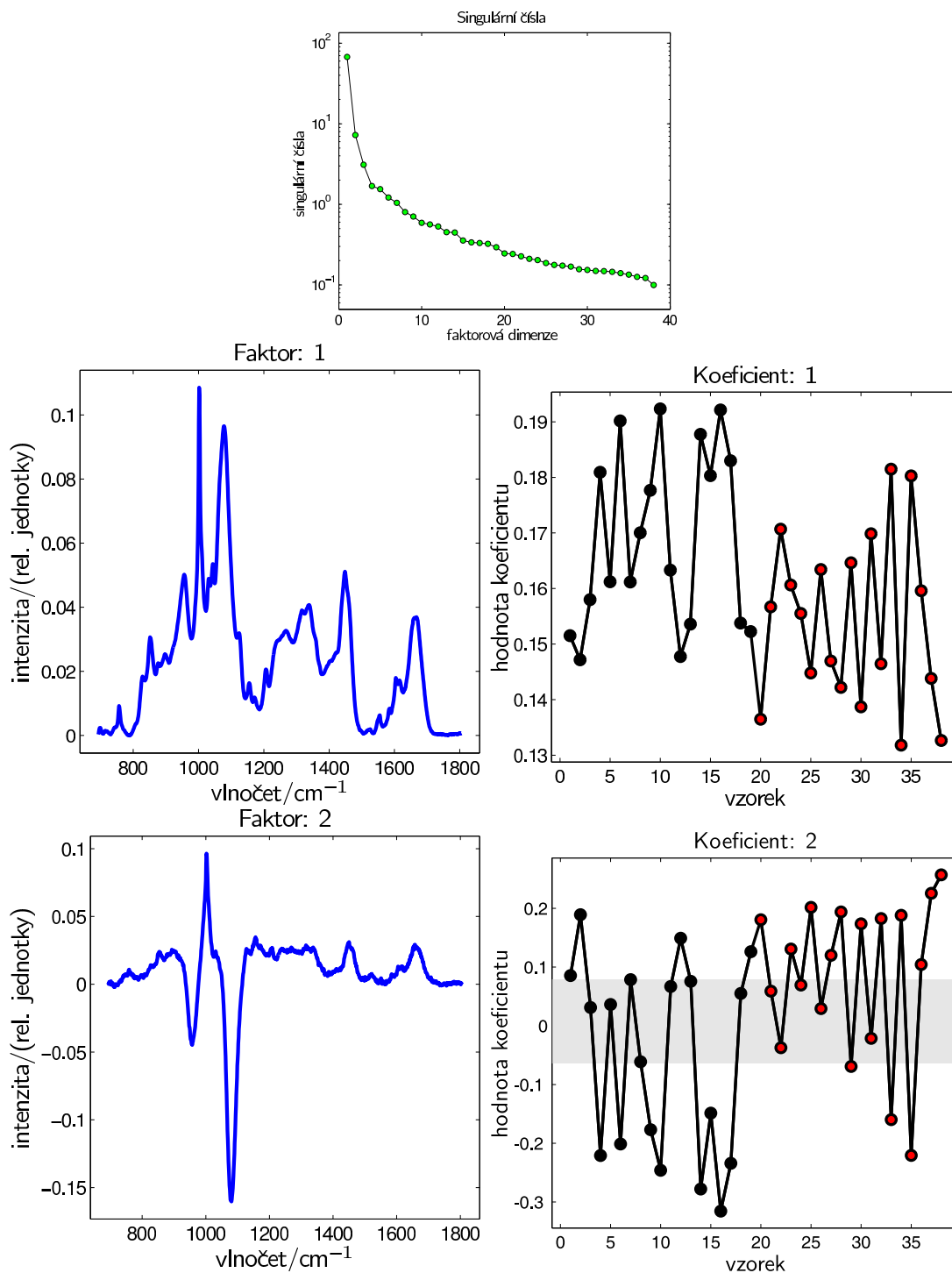
Obrázek 3.44: Dendrogram shlukové analýzy použité na spektra 5 min dialyzovaných vzorků pacientů trpících roztroušenou sklerózou (v grafu zvýranění červeně a označení písmenem **R**) a k nim příslušejících zdravých kontrol (v grafu zvýranění černě a označení písmenem **Z**).



Obrázek 3.45: Dendrogram shlukové analýzy použité na spektra nedialyzovaných vzorků pacientů trpících roztroušenou sklerózou (v grafu zvýranění červeně a označení písmenem **R**) a k nim příslušejících zdravých kontrol (v grafu zvýranění černě a označení písmenem **Z**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.



Obrázek 3.46: Dendrogram shlukové analýzy použité na intervalu $1020\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ na spektra nedialyzovaných vzorků pacientů trpících roztroušenou sklerózou (v grafu zvýranění červeně a označení písmenem **R**) a k nim příslušejících zdravých kontrol (v grafu zvýranění černě a označení písmenem **Z**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku. Ve středu obrázku se napravo začíná tvořit další shluk nemocných a nalevo shluk zdravých pacientů.

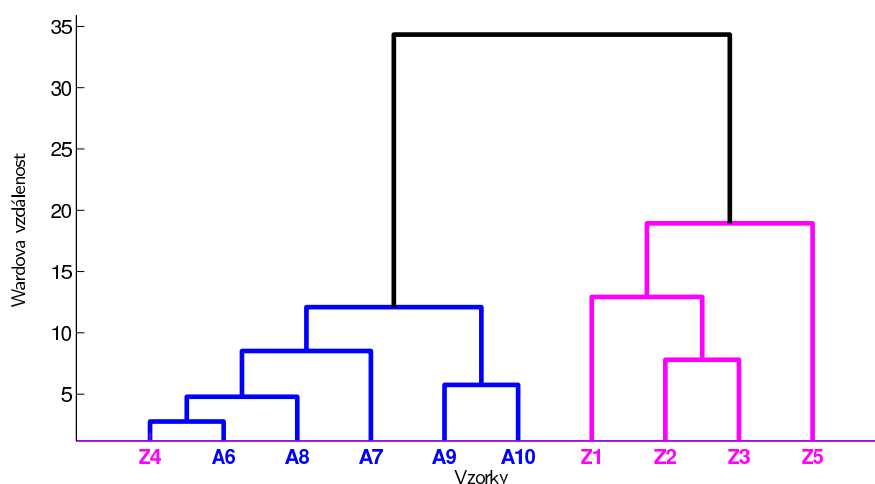


Obrázek 3.47: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 19 spekter zdravých pacientů a 19 spekter pacientů trpících roztroušenou sklerózou. V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku, jsou černě označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a červeně koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících roztroušenou sklerózou. Koeficienty nad šedým pásem byly touto metodou určeny jako zástupci spekter nemocných pacientů, kdežto koeficienty pod šedým pásem přiřazují spektra ke zdravým pacientům. Šedý pás označuje pacienty, kteří nejsou tímto přístupem striktně přiřazeni ani k jedné ze skupin. Poloha šedého pásu byla určena tak, aby byli všichni nemocní, kteří byli chybně posouzeni shlukovou analýzou na Obr. 3.45 chybně posouzeni i zde. Definice hranice, kdy již je pacient nemocný byla složitější, jelikož chybné určení vzorku Z19 jako nemocného jako v shlukové analýze by znamenalo také chybné určení vzorku Z1, proto byl vzorek Z19 přiřazen k pacientům, kteří touto metodou nejsou diagnostikováni ani jako nemocní ani jako zdraví.

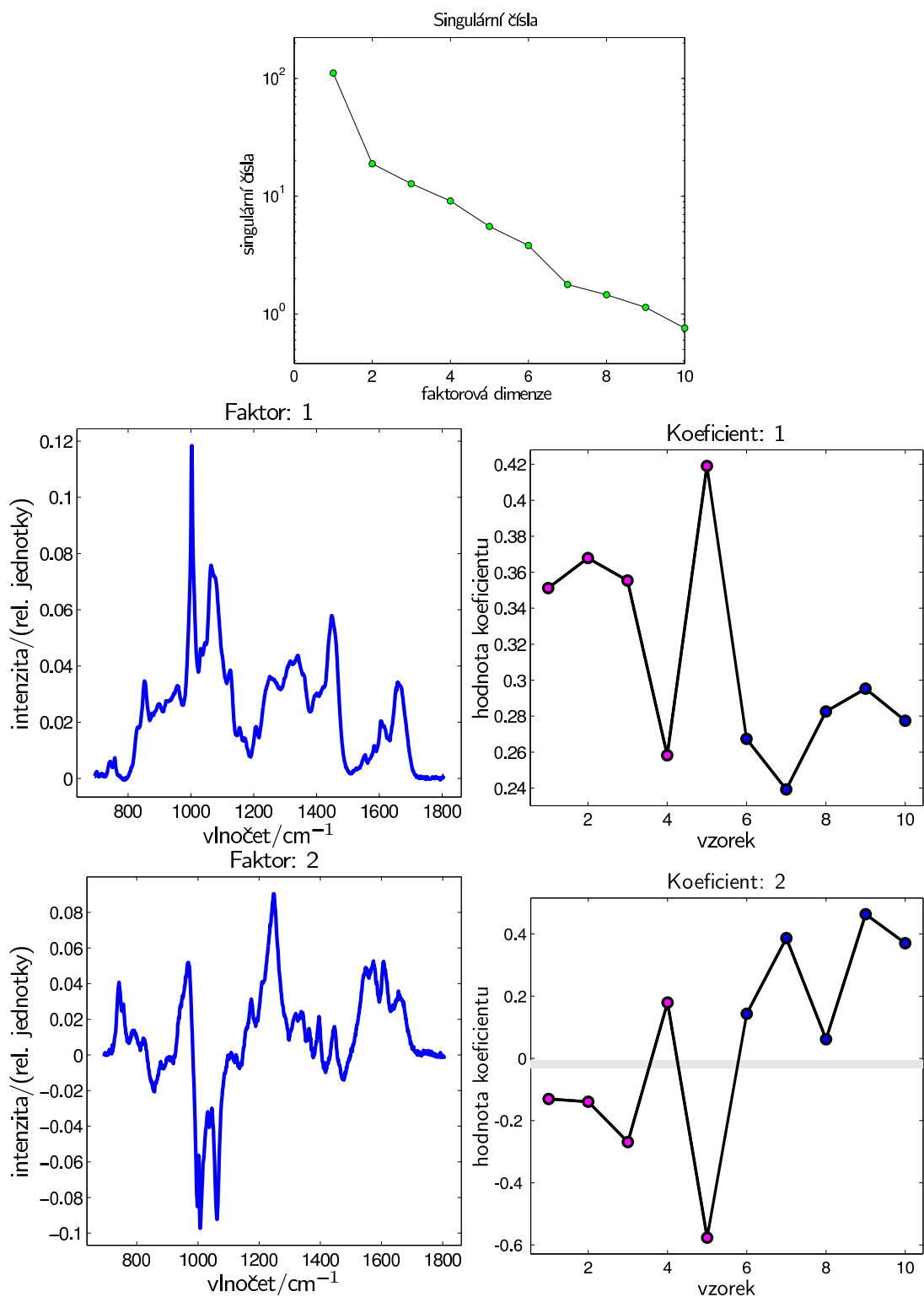
3.8.2 Diagnóza pacientů trpících Alzheimerovou nemocí

Set pacientů trpících AD, na kterých byla vyvíjena nová diagnostická metoda byl znatelně menší (pět vzorků od nemocných pacientů s pěti kontrolami ve shodné věkové kategorii), než tomu bylo u RS. Dobře diagnostikované vzorky AD jsou totiž mnohem vzácnější, vzhledem k mnohem menším diagnostickým možnostem pro tuto nemoc.

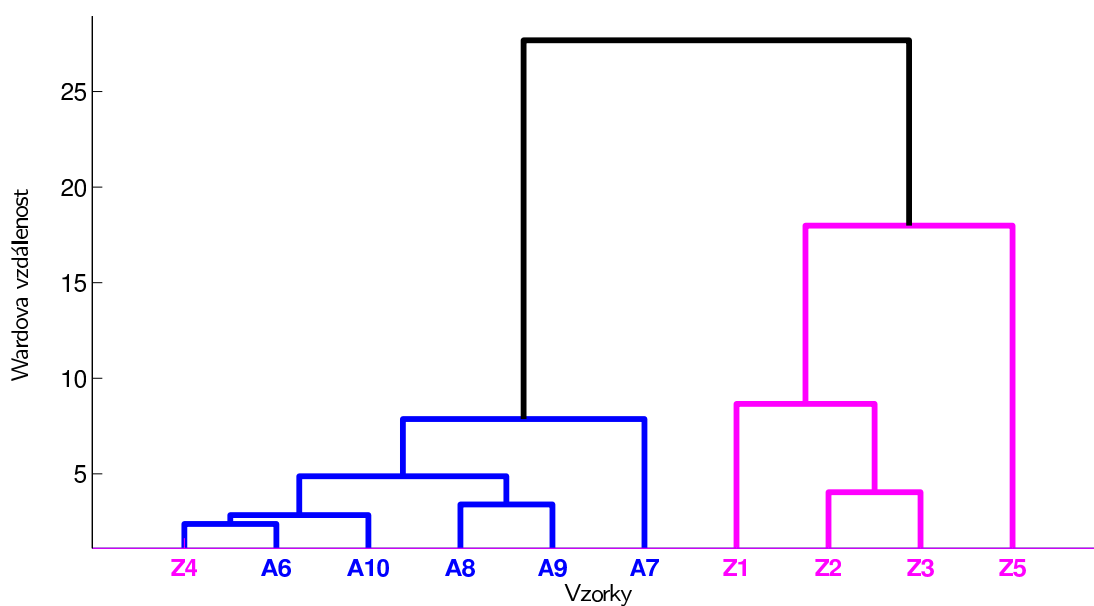
V této části již byly na základě výsledků měření pacientů s RS zkoumány pouze nedialyzované vzorky. Spektra byla normalizována na pás amidu I ($\sim 1660\text{ cm}^{-1}$), protože takováto normalizace nejlépe srovnala pozadí proteinové části CSF, ve kterých, jak se ukázalo později, dochází k nejsignifikantnějším změnám v důsledku AD. Výsledky CA jsou shrnuty v dendrogramu na Obr. 3.48. Všechna spektra příslušející vzorkům nemocných pacientů byla přiřazena do shluku tvořeného nemocnými. Navíc k nim byl přiřazen ještě zdravý pacient Z4. Ostatní zdraví pacienti tvoří shluk zdravých. Využijeme-li faktorové analýzy, která je zobrazena na Obr. 3.49, dokážeme na základě druhého faktoru určit pásy, ve kterých v důsledku nemoci dochází ke změnám. Je zřejmé, že změny ve spektrech jsou mnohem komplexnějšího rázu, než je tomu u RS a že tyto změny nejsou vázané pouze na pás na 1080 cm^{-1} . Dokonce, provedeme-li faktorovou analýzu pouze na intervalu $900\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ tak, jak jsme to učinili u diagnostiky RS, dosáhneme horších výsledků (viz Obr. 3.52), než v případě intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ (viz Obr. 3.52). Dendrogramy CA k těmto dvěma intervalům, které jsou uvedeny na Obr. 3.50 a 3.51, však rozdělují vzorky v obou případech do stejných skupin. Z druhého faktoru faktorové analýzy provedené na intervalu $900\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ můžeme spojit s patologickým stavem klesající intenzitu pásu na 1080 cm^{-1} , jako tomu bylo u RS, a zúžení pásu fenylalaninu. Z faktorové analýzy na intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ můžeme ve druhém faktoru identifikovat změny způsobené patologickým stavem v oblasti postranních řetězců aminokyselin $1530\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ a úbytek hlubokého záporného pásu v oblasti amidu I, který pravděpodobně náleží přírůstku struktur β -skládaného listu.



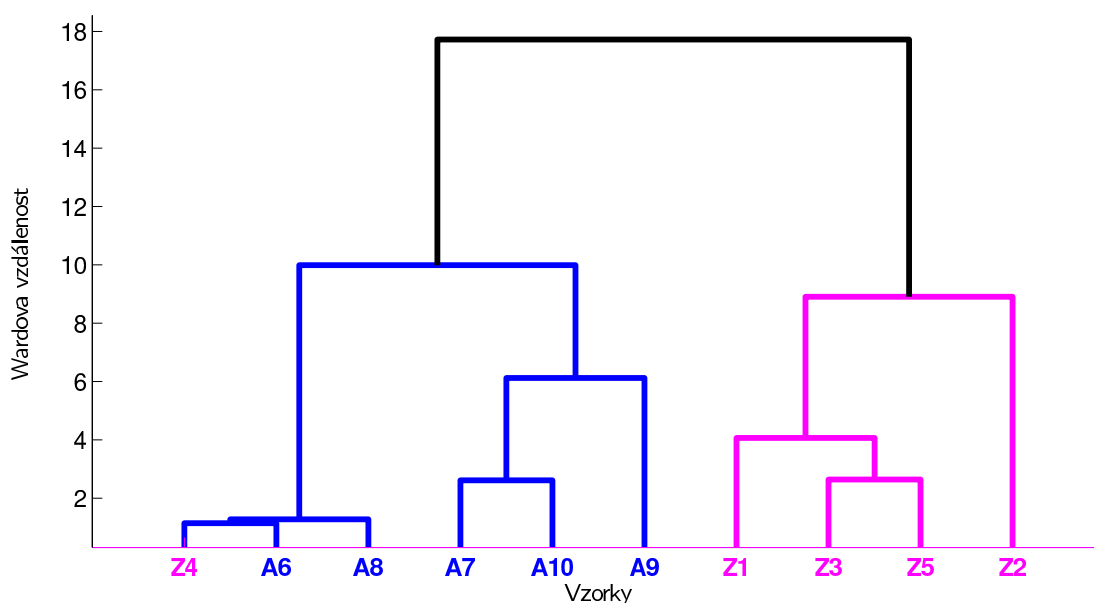
Obrázek 3.48: Dendrogram shlukové analýzy použité na spektra vzorků pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (v grafu zvýraznění modře a označení písmenem **A**) a k nim příslušejících kontrol (v grafu zvýraznění fialově a označení písmenem **S**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.



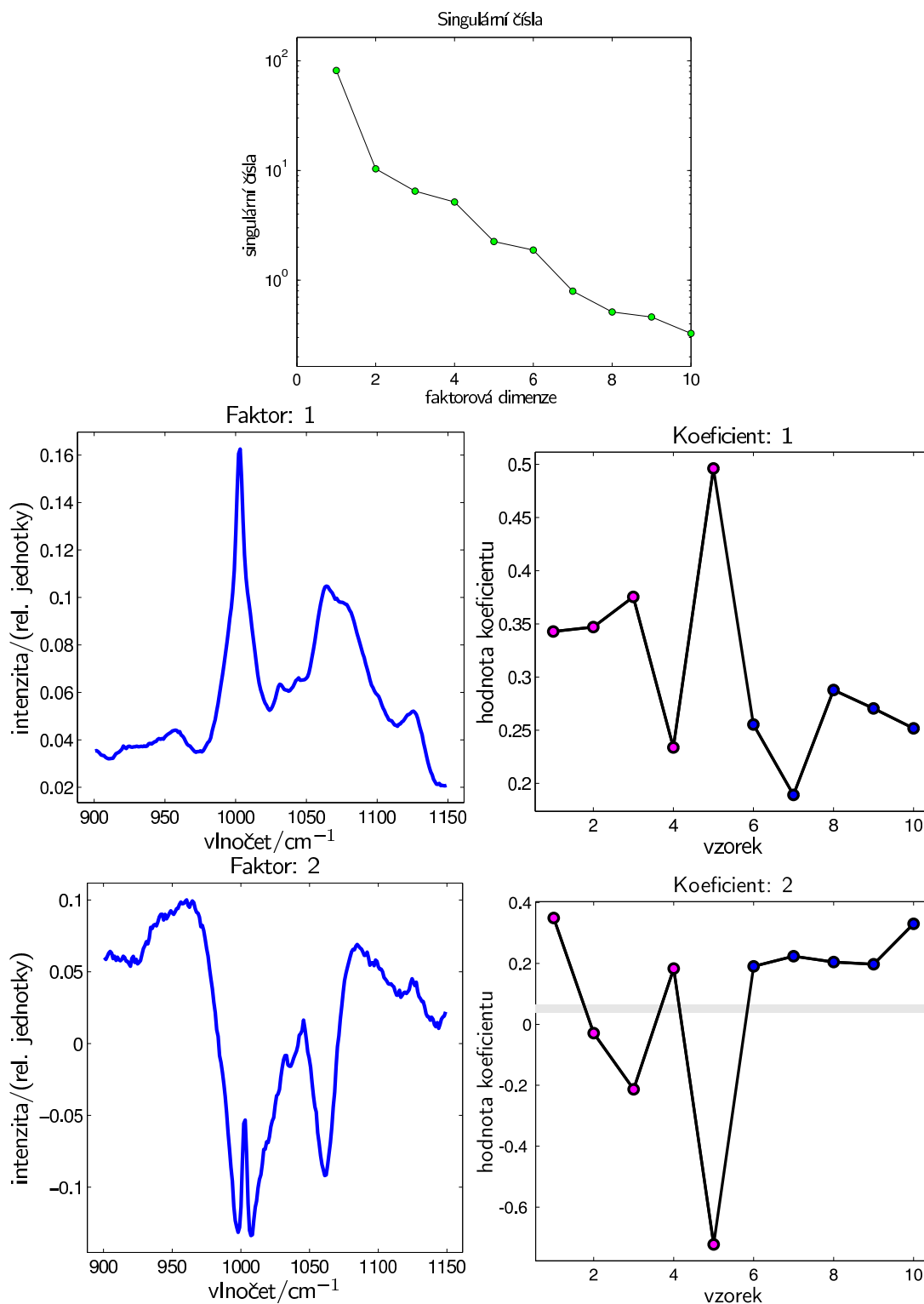
Obrázek 3.49: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 5 spekter zdravých pacientů a 5 spekter pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku jsou fialově označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a modře koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Podle výsledků shlukové analýzy v Obr. 3.48 je šedivou čarou stanovena hranice mezi zdravými a nemocnými pacienty v grafu koeficientů k druhému faktoru.



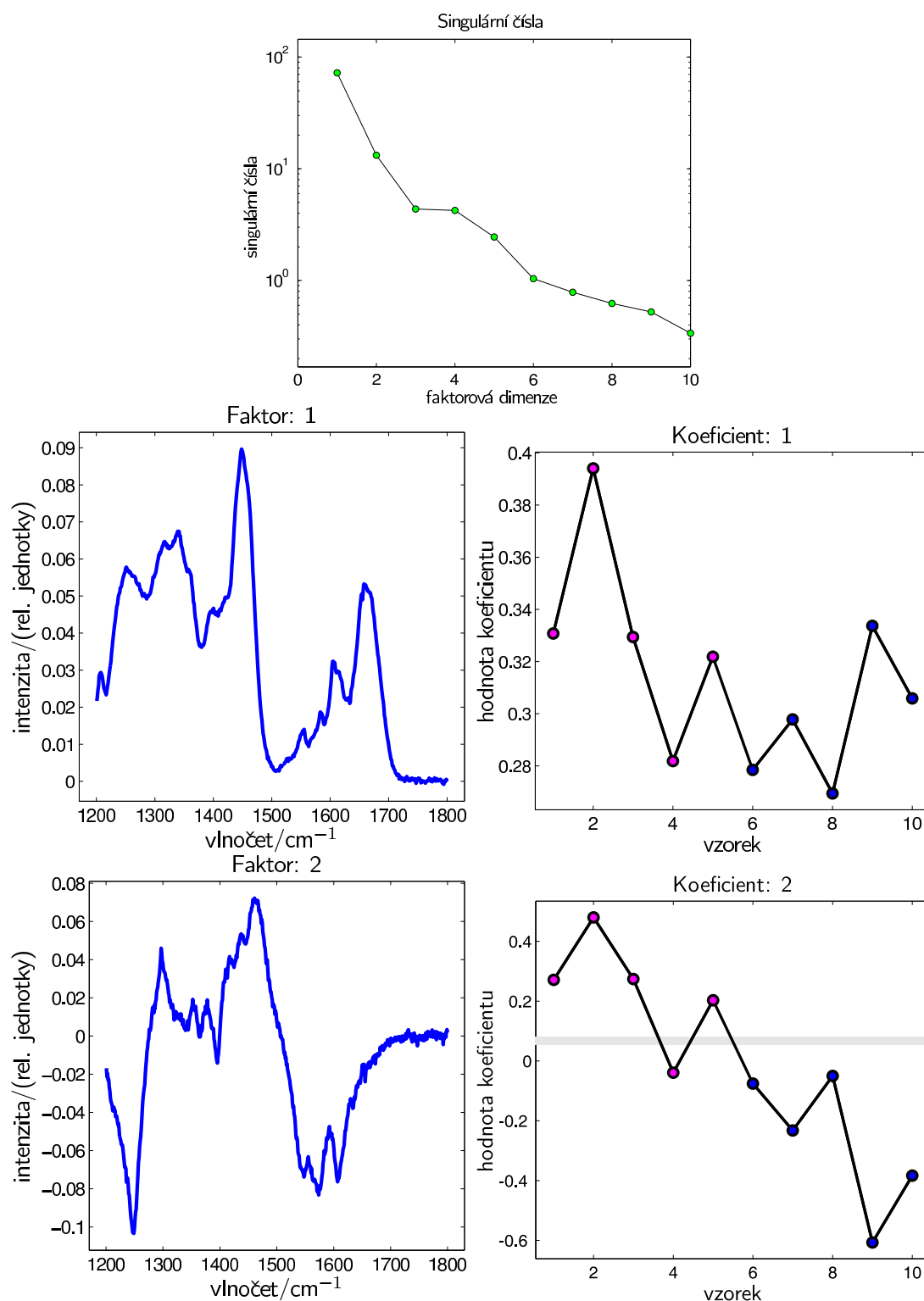
Obrázek 3.50: Dendrogram shlukové analýzy použité na intervalu $900\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ na spektra vzorků pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (v grafu zvýraznění modře a označení písmenem **A**) a k nim příslušejících kontrol (v grafu zvýraznění fialově a označení písmenem **S**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.



Obrázek 3.51: Dendrogram shlukové analýzy použité na intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ na spektra vzorků pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (v grafu zvýraznění modře a označení písmenem **A**) a k nim příslušejících kontrol (v grafu zvýraznění fialově a označení písmenem **S**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.

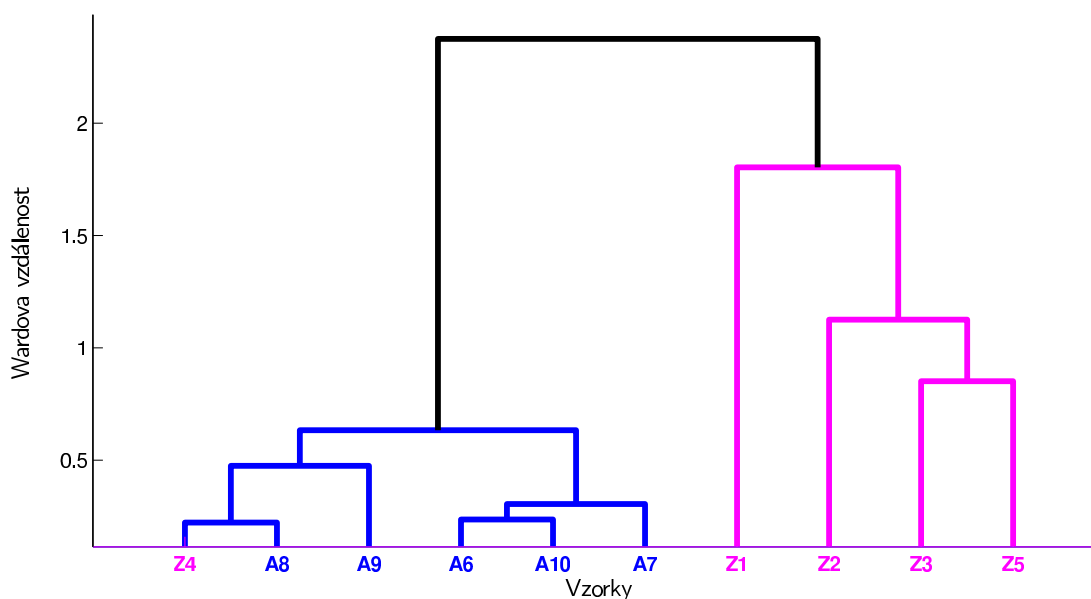


Obrázek 3.52: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 5 spekter zdravých pacientů a 5 spekter pacientů trpících Alzheimerovou nemocí na spektrálním intervalu 900–1150 cm^{-1} . V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku, jsou fialově označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a modře koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Hranice mezi zdravými a nemocnými pacienty, která je v grafu koeficientů k druhému faktoru zobrazena šedivou čarou byla stanovena dle výsledků shlukové analýzy v Obr. 3.50, vzorek S1 však musel být přiřazen k nemocným pacientům, protože jeho zařazení ke zdravým by znamenalo, že všichni nemocní, které shluková analýza určila správně jako nemocné by touto metodou byli určeni jako zdraví.

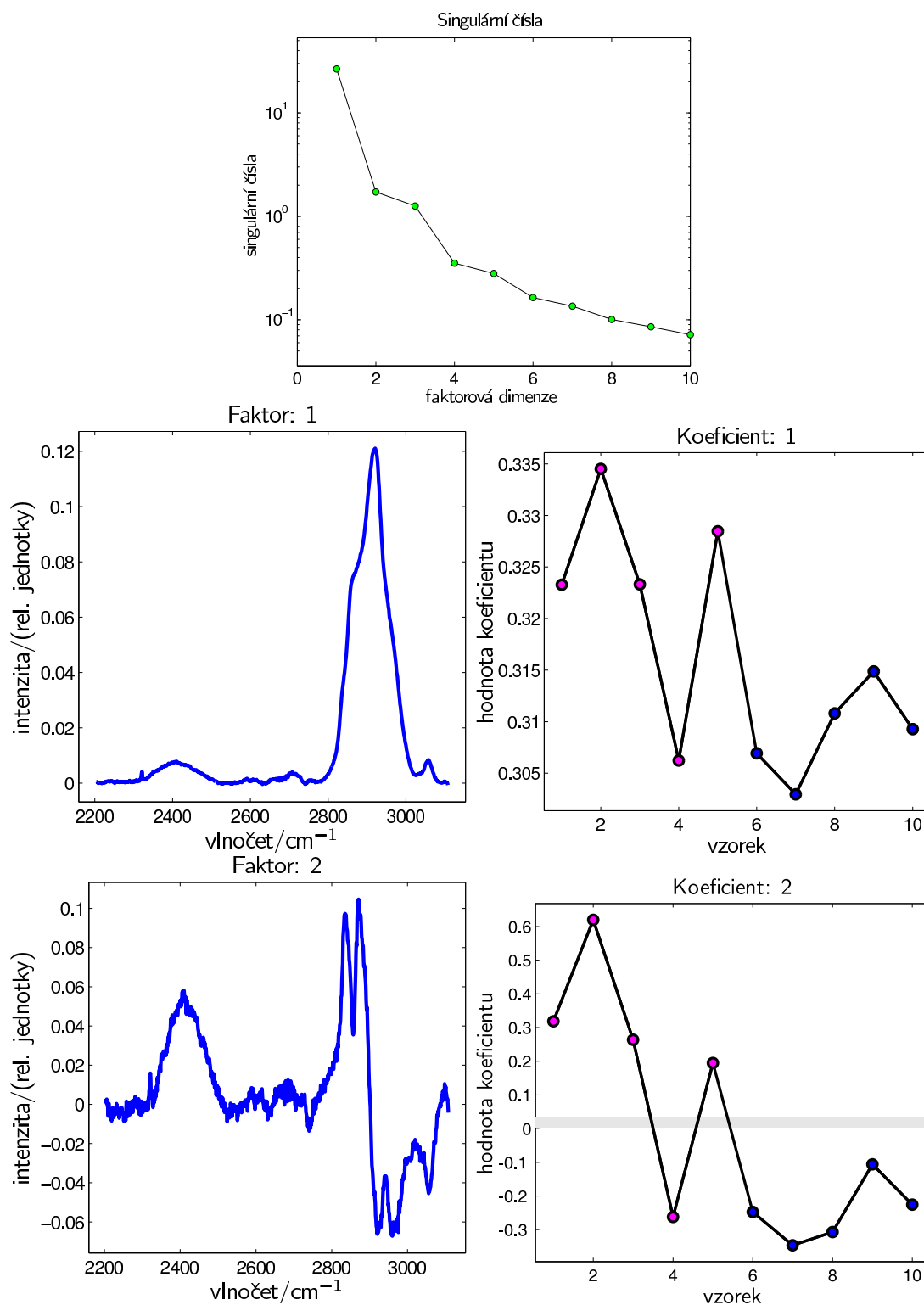


Obrázek 3.53: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 5 spekter zdravých pacientů a 5 spekter pacientů trpících Alzheimerovou nemocí na spektrálním intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku, jsou fialově označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a modře koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Podle výsledků v Obr. 3.51 je šedivou čarou stanovena hranice mezi zdravými a nemocnými pacienty v grafu koeficientů k druhému faktoru.

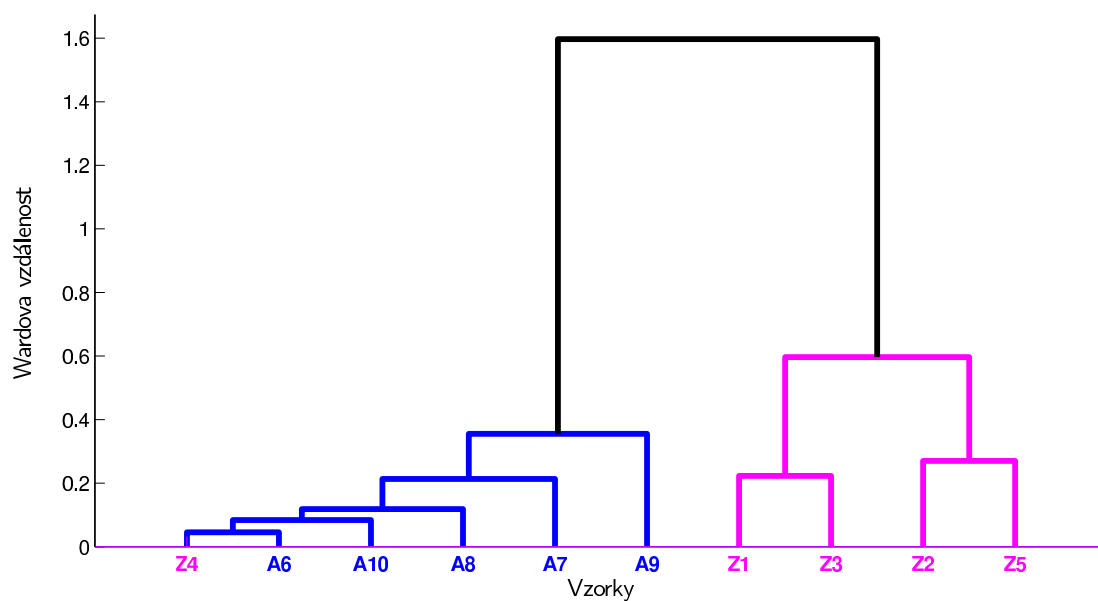
Měření na souboru pacientů spojených s AD bylo prováděno také s pozicí středu mřížky na 2675 cm^{-1} , kde bylo předpokládáno, že se potvrdí změny v bílkovinné části mozkomíšního moku. Zpracování spekter bylo v tomto případě velmi podobné jako se středem mřížky nastaveným na 1275 cm^{-1} a odečtení pozadí zde bylo dokonce mnohem jednodušší vzhledem k menší složitosti spektra. Normování spekter se provádělo na pás 2930 cm^{-1} . Faktorová i shluková analýza rozdělila spektra do stejných skupin jako pro měření na nižších frekvencích (viz *Obr. 3.54* respektive *3.55*). Ve druhém faktoru na *Obr. 3.55* se znovu daří identifikovat změny indikující patologický stav. Oblast pásu $\sim 2420\text{ cm}^{-1}$ bylo velmi složité rozlišit od fluorescenčního pozadí vzhledem k velké šířce tohoto pásu, a proto tato změna může být také pouze artefaktem z matematické úpravy spekter. Nejvýraznější změna ve spektru je pozorovatelná v oblasti $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$, kdy dochází k zúžení nejvýraznějšího pásu na 2930 cm^{-1} . Pokud zaměříme používané vícerozměrné statistické metody na tento interval, potvrdíme, že je skutečně v rozdělení spekter na ta, která přísluší zdravým pacientům a nemocným pacientům, postačující, protože dojde pomocí CA, jak je patrné z *Obr. 3.56*, k rozdělení do shluků zdravých a nemocných se stejnou úspěšností jako v případě zpracování celého spektrálního intervalu. Ve druhém faktoru na *Obr. 3.57* je poté zřetelná výše diskutovaná spektrální změna, indikující zdravotní stav pacientů.



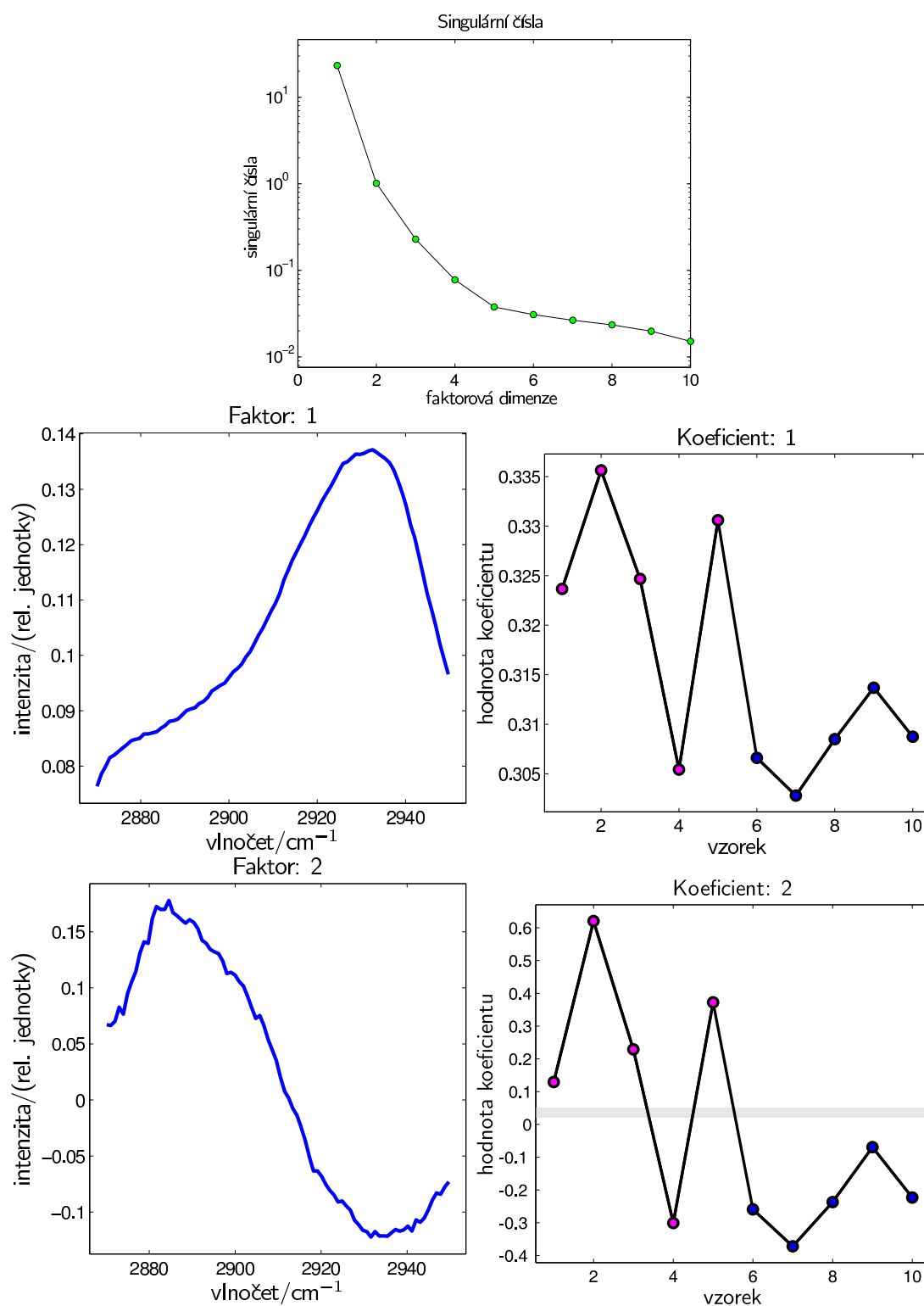
Obrázek 3.54: Dendrogram shlukové analýzy použité na spektra vzorků pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (v grafu zvýraznění modře a označení písmenem **A**) a k nim příslušejících kontrol (v grafu zvýraznění fialově a označení písmenem **S**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.



Obrázek 3.55: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 5 spekter zdravých pacientů a 5 spekter pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku, jsou fialově označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a modře koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Podle výsledků v Obr. 3.54 je šedivou čarou stanovena hranice mezi zdravými a nemocnými pacienty v grafu koeficientů k druhému faktoru.



Obrázek 3.56: Dendrogram shlukové analýzy použité na intervalu $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ na spektra vzorků pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (v grafu zvýraznění modře a označení písmenem **A**) a k nim příslušejících kontrol (v grafu zvýraznění fialově a označení písmenem **S**). Zcela napravo se formuje shluk zdravých proti shluku nemocných, který je viditelný na levé straně obrázku.



Obrázek 3.57: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor 5 spekter zdravých pacientů a 5 spekter pacientů trpících Alzheimerovou nemocí na spektrálním intervalu 2870–2950 cm⁻¹. V grafech koeficientů, které jsou uvedeny na pravé straně obrázku, jsou fialově označeny koeficienty zastoupení faktoru ve spektrech zdravých pacientů a modře koeficienty zastoupení ve spektrech pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Podle výsledků v Obr. 3.56 je šedivou čarou stanovena hranice mezi zdravými a nemocnými pacienty v grafu koeficientů k druhému faktoru.

3.8.3 Rozlišení věku a diagnózy všech pacientů

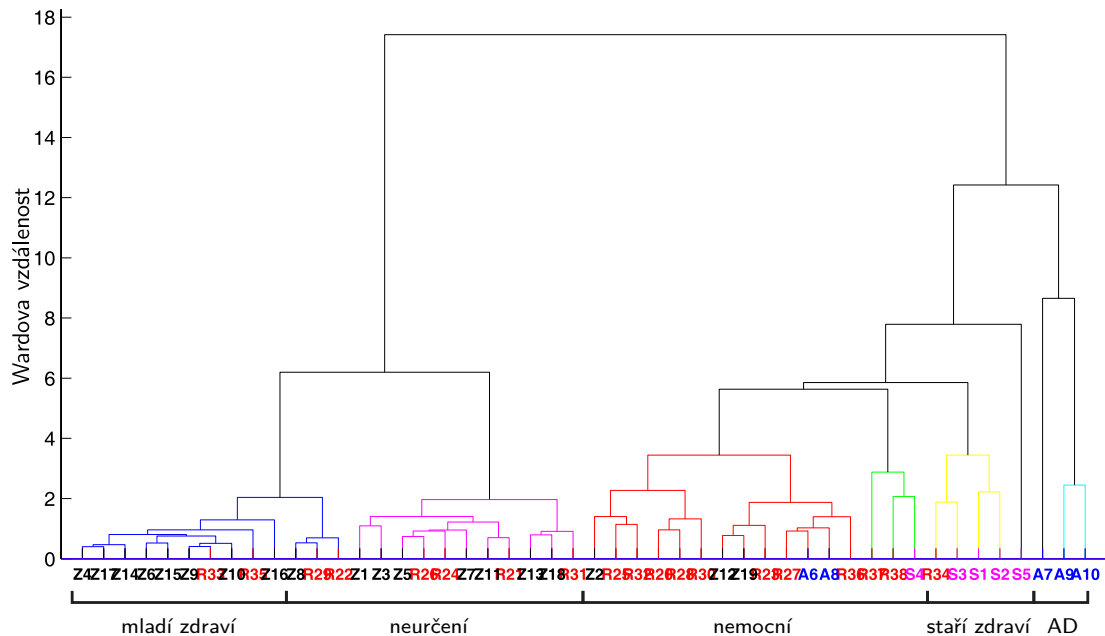
Nakonec bylo v této práci vyzkoušeno, zdali metoda od sebe dokáže rozlišovat mladé zdravé pacienty od starých zdravých pacientů a pacienty trpící RS od pacientů s AD.

Při řešení takto komplexního problému přestala CA při normování na běžné pásy proteinů vzorky správně rozdělovat do shluků, protože se snížila váha změn v páse na 1080 cm^{-1} (o kterém bylo zjištěno v předchozích kapitolách, že hraje roli v rozlišení pacientů s roztroušenou sklerózou i Alzheimerovou nemocí od zdravých pacientů) oproti ostatním spektrálním změnám ve smyslu euklidovské vzdálenosti spekter. Nabízela se řešení dvojího charakteru. Bylo možné použít nějaké vážené míry, kdyby tomuto pásu byla přiřčena vyšší váha oproti všem ostatním spektrálním bodům, v tomto případě by však nebylo možné použít Wardovy metody tvoření shluků v takové formě, v jaké byla implementována ve Statistic toolboxTM v Matlabu (The Matworks, Natick, MA, USA) a se kterou byly v předchozích částech práce získány nejlepší výsledky, nebo jsme mohli zvýšit význam tohoto pásu správným normováním spekter. Vzhledem k jednodušší aplikaci bylo využito druhé metody, kdy byla spektra normována právě na intenzitu pásu na 1080 cm^{-1} , čímž byly variace v jeho intenzitě převedeny na variace v intenzitě celého spektra, a tak se vzorky primárně rozdělily podle své příslušnosti ke zdravým, nebo nemocným pacientům a teprve následně se začaly dělit uvnitř těchto skupin. Faktorová analýza je mnohem méně citlivá na správné normování spekter, a tak takovýmto problémem netrpěla, přesto byla použita na stejně normovaná spektra, aby byla zajištěna co nejlepší porovnatelnost s CA.

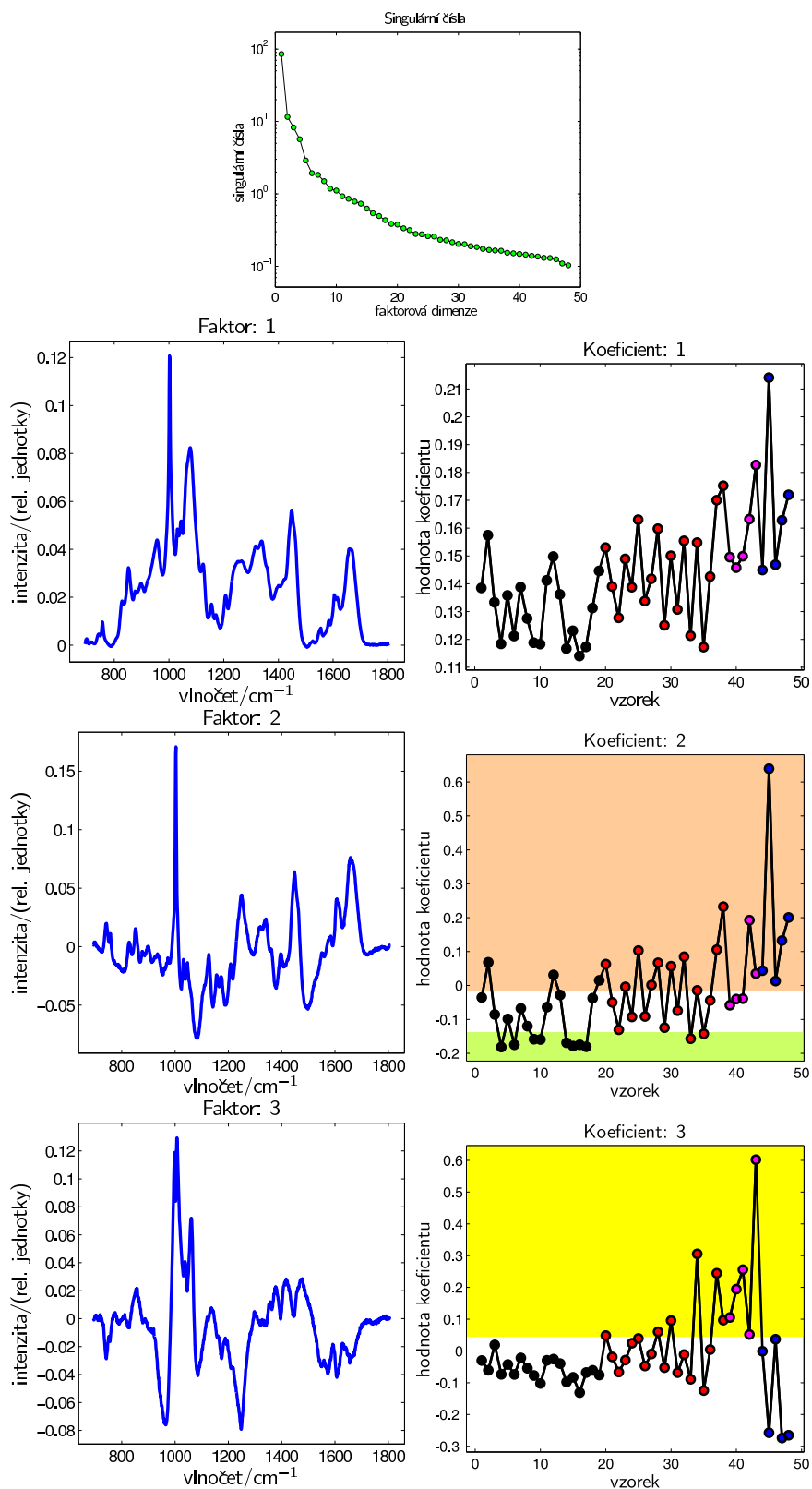
Z výsledků CA na *Obr. 3.58* je zřetelné, že se znovu pacienti rozdělí na shluk mladých zdravých, do kterého se dostali stejní pacienti nemocní RS, jako tomu bylo u samostatné analýzy RS. Dále se separují do dvou samostatných shluků čtyři staří zdraví pacienti, kteří taktéž byli identifikováni jako zdraví při samostatné analýze AD, přibyl k nim však ještě jeden pacient trpící RS. Shluk pacientů trpících AD zde obsahuje pouze tři z pěti měřených vzorků, zbylé dva jsou přiřazeni do shluku společně s pacienty trpícími RS, třemi mladými zdravými pacienty, kteří byli v samostatné analýze RS přiřazeni k nemocným a jedním starým zdravým pacientem, který byl také přiřazen v samostatné analýze, tentokrát však AD, k nemocným. Tento shluk pravděpodobně odpovídá nějakému obecnějšímu jevu souvisejícímu s patologickým stavem.

Pokud nahlédneme do faktorové analýzy, která je uvedena v *Obr. 3.59*, zjistíme, že v druhém faktoru, který pravděpodobně dle grafu koeficientů k němu příslušejících, přináší nějaké obecnější patologické progresi (tento faktor je zastoupen v pacientech trpících RS i AD), je velmi podobné spektrum faktoru prvnímu, chybí v něm však výrazný pás na 1080 cm^{-1} . To je dáno tím, že jsme na tento pás normovali, takže se mění v souvislosti s nemocí intenzita celého spektra relativně k tomuto pásu v souladu se změnami identifikovanými ve výzkumu samostatné RS (RS byla diagnostikována dle měnícího se poměru intenzity tohoto pásu ke zbytku spektra). Třetí faktor je zase podobný faktoru druhému ve faktorové analýze samostatných vzorků pacientů trpících AD uvedenému v *Obr. 3.49* a dle koeficientů zastoupení tento faktor rozlišuje zdravé pacienty trpící AD od starých zdravých pacientů. Problém je však v tomto případě dosti komplexní, protože k rozlišení jednotlivých diagnóz dochází jak v rámci druhého, tak v rámci třetího faktoru. Proto byly pro lepší orientaci zobrazeny průběhy koeficientů druhého a třetího

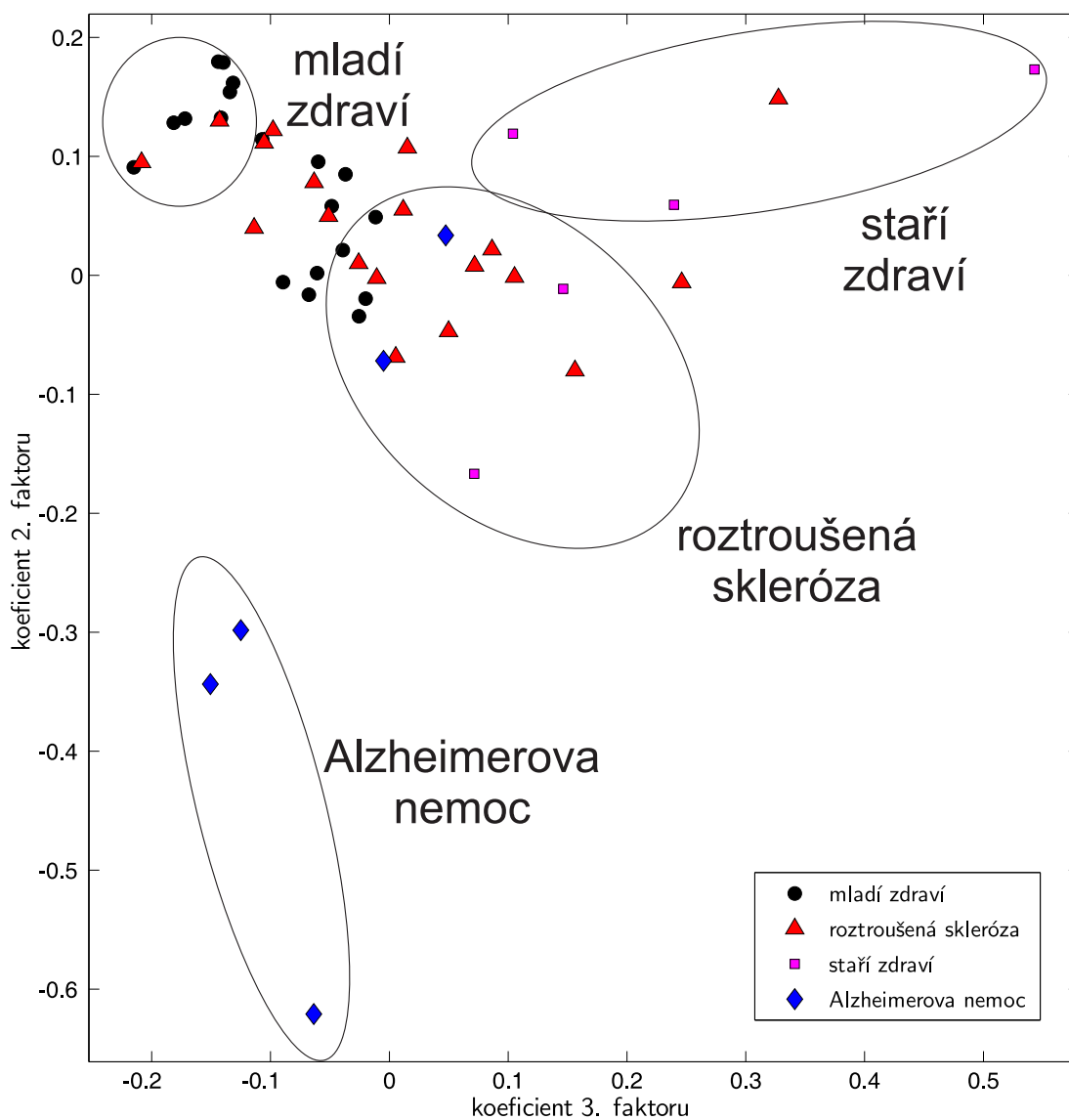
faktoru pomocí v rámci této práce v Matlabu (The Matworks, Natick, MA, USA) napsaného programu PCAview (viz přílohy) do jednoho grafu, který je uveden na *Obr. 3.60*, ve kterém jsou pouze orientačně zakresleny oblasti, do kterých se profilují vzorky s různou diagnózou. Umístění těchto oblastí bylo provedeno na základě CA celého spektrálního souboru uvedené v *Obr. 3.58*.



Obrázek 3.58: Dendrogram shlukové analýzy použité na spektra všech vzorků (mladí zdraví jsou označeni písmenem Z a černou barvou, nemocní roztroušenou sklerózou písmenem R a červeně, zdraví staří písmenem S a fialově a spektra pacientů trpících Alzheimerovou nemocí modře). Nalevo shluková analýza identifikuje stejný shluk nemocných, jako v případě měření pouze na souboru pacientů s roztroušenou sklerózou (viz *Obr. 3.46*) a druhá zprava je označena stejná oblast, jakou identifikuje shluková analýza v setu pacientů z výzkumu pouze Alzheimerovy nemoci jako shluk zdravých starých pacientů (viz *Obr. 3.51*), do které je přiřazený navíc jeden pacient trpící roztroušenou sklerózou. Do shluku sdružujícího pacienty trpící Alzheimerovou nemocí (v dendrogramu označení AD) jsou zařazeni pouze 3 z 5 pacientů trpících Alzheimerovou nemocí. Zbylí dva byli spolu s pacienty trpícími roztroušenou sklerózou, zdravými mladými pacienty stejnými jako v analýze roztroušené sklerózy a starým zdravým S4, který byl přiřazen v samostatné analýze Alzheimerovy nemoci k nemocným, přiřazení do skupiny, která indikuje nějaký obecnější patologický stav.



Obrázek 3.59: Výsledky faktorové analýzy použité na soubor zdravých mladých pacientů (vyznačeni zeleně) pacientů trpících roztroušenou sklerózou (červeně), zdravých starých pacientů (černě) a pacientů trpících Alzheimerovou nemocí (modře). V grafu druhého koeficientu je zeleně vyznačena oblast zdravých a červeně oblast nemocných pacientů. Graf třetích koeficientů rozděljuje pacienty na staré zdravé (ve žluté oblasti) a na ty, kteří trpí Alzheimerovou nemocí (v bílé oblasti). Hranice oblastí byli voleny podobným postupem, jako v Obr. 3.47 na základě shlukové analýzy uvedené v Obr. 3.58



Obrázek 3.60: Zobrazení hodnot druhého koeficientu vůči třetímu koeficientu faktorové analýzy všech vzorků uvedené v Obr. 3.59. V grafu jsou také orientačně zvýrazněny oblasti související s různou diagnózou pacientů, jejichž polohy byly určeny na základě výsledků shlukové analýzy uvedené v Obr. 3.58.

Kapitola 4

Diskuze

V první části této práce jsme se zabývali, v návaznosti na několikaletý výzkum na pracovišti a práci Nadi Rosové (2008), metodikou DCDR měření CSF. Bylo ukázáno, že vysušené kapky CSF jsou poměrně nehomogenní a že je tedy velmi vhodné měřit spektra ve spektrálních mapách, ve kterých se jednotlivé nehomogenity dají dobře identifikovat a jejich spektra ze zpracování vyřadit. Tento přístup je ve shodě s prací [Filik a Stone, 2008], kde byly měřeny spektrální mapy slz a s prací [Esmonde-White et al., 2009], kde pro změnu proměřovali DCDR spektrální mapy synoviální tekutiny. V práci [Filik a Stone, 2009] však autoři uvádějí, že spektra slz měřili pouze z pěti náhodných bodů na okraji depozitu, což je již dle našich měření na samé hranici reprodukovatelnosti DCDR měření takto komplexních tekutin a s největší pravděpodobností jsou takováto měření zatížená značnou chybou. Oproti tomu měření DCDR spekter synoviální tekutiny [Esmonde-White et al., 2009] bylo sice prováděno z dostatečného počtu bodů, ale tyto byly získány jako ekvidistantní body ležící na přímce, která byla náhodně umístěna na depozitu, což na rozdíl od našeho přístupu může narážet na problém nerovnoměrného zastoupení proteinové a nízkomolekulární složky v depozitu. Při skutečně náhodném měření autory zmíněných 126 spekter musí být nutně nízkomolekulární složky relativně nadhodnoceny vůči proteinové složce, která výrazně převažuje na okraji depozitu. V našem postupu se tomuto vyhneme měřením mapy z plochy na okraji kroužku.

I tak se ovšem ukazovalo, že nehomogenita vzorku představuje značný problém, proto jsme se homogenitu depozitu pokusili zvýšit použitím mikrodialýzy, přičemž bylo pomocí faktorové analýzy spektrálních map ukázáno, že s dobou dialýzy opravdu klesá variabilita ve spektrech. Kromě toho však také bylo ukázáno, že se mikrodialýzou ze vzorků mimo nízkomolekulárních látek zodpovědných za prorůstání krystalů depozity také odstraňují některé proteiny, které jsou náchylné k degradaci, což by mohlo naopak snížit citlivost metody na patologické změny v CSF. Toto pozorování je v souladu se stanovením A β a τ -proteinu v dialyzovaných vzorcích pomocí ELISA metody. Při kontrolním stanovení poměru těchto proteinů v dialyzovaném a nedialyzovaném vzorku bylo pozorováno, že mikrodialýza odstraní až 80 % těchto proteinů (A. Bartoš - osobní sdělení) ze vzorku. Což je podstatný problém pro aplikaci mikrodialýzy při našem holistickém přístupu ke vzorkům CSF.

Dalším problémem bylo také poměrně silné fluorescenční pozadí změřených spekter. V práci [Gryniewicz a Kauffman, 2008] tento problém řešili tak, že vzorky před měřením vybělovali excitačním laserem. Tento postup však pro námi studo-

vaný systém nebyl příliš vhodný. Vzorky totiž pod laserovým svazkem podléhaly fotopoškození, na rozdíl od inzulínu, na kterém nepozorovali Ortiz et al. (2006) žádné spektrální změny ani po hodině ozařování. Změny indukované laserovým svazkem dopadajícím na vzorek jsou dobře dokumentované na fotografiích vzorků (*Obr. 3.23*). Prozkoumání těchto spektrálních změn však šlo nad rámec našeho výzkumu. S velkou pravděpodobností však mohou být tyto změny indukovány lokálním ohřevem vzorku vlivem disipace záření na nehomogenitách takového komplexního vzorku.

Protože jsme se snažili směřovat v našem snažení ke klinické praxi spektroskopické metody, byla nedílnou součástí i otázka, jak správně zacházet se vzorky v klinické praxi. O tom, že jde o otázku stále aktuální a doposud ne zcela vyřešenou, svědčí práce [Kaiser et al., 2007]. Otázka týkající se správného skladování DCDR vzorků byla otevřena již v práci Nadi Rosové (2008), ve které se ukázalo, že vzorky podléhají degradaci při pokojové teplotě v řádu dní. Proto jsme se rozhodli skladovat DCDR vzorky v lednici, abychom jejich degradaci zpomalili. Z provedených měření však vyplývalo, že při uskladnění vzorků v lednici stejně k degradaci dochází v důsledku orosení vzorků při přemístování z lednice, kde byla teplota 4 °C na laboratorní teplotu 22 °C. Proto jsme DCDR vzorky před umístěním do lednice vždy vložili do exikátoru a po vyjmutí z lednice jsme je nechali alespoň půl hodiny ustálat na laboratorní teplotě. Při takovémto nakládání se vzorky již nebyly pozorovatelné žádné výrazné spektrální změny ani po 7 dnech uskladnění v lednici. Kromě skladování DCDR vzorků jsme také řešili otázku skladování alikvotů CSF, kde jsme při pokojové teplotě ve faktorové analýze pozorovali změny již po 5 hodinách, což byl nejkratší interval, který jsme měřili. Tento závěr je velmi zajímavý vzhledem k tomu, že biochemická analýza vzorků CSF pro diagnostické účely se provádí s několikahodinovým zpožděním po odebrání CSF od pacientů. Navíc se zde projevuje i síla holistického přístupu k CSF, neboť v práci [Kaiser et al., 2007] se uvádí, že uchování vzorku při pokojové teplotě po dobu 2 hodin nemá žádný vliv na A β a τ -protein a po 24 hodinách se změna projevuje pouze u A β , což jako obecné doporučení autorů práce – zamrazit vzorek pro analýzu A β neprodleně a pro τ -protein do 24 hodin – nelze, s ohledem na obecnější analýzu vzorků, považovat za dostatečné. Z naší analýzy je oproti tomu jasné, zohledníme-li senzitivitu metody, že vzorky by měly být zpracovány nejlépe do 2,5 hodin, maximálně však do 5 hodin, po odběru CSF.

Kromě skladování při pokojové teplotě má také na degradaci vzorků vliv jejich zamrazování, které způsobovalo poněkud jiné spektrální změny, než degradace na pokojové teplotě. Oba procesy se však projevovaly úbytkem zastoupení α -helikálních struktur v pásu amidu I na 1660 cm⁻¹. Degradaci v důsledku zamrazování vzorků pro další použití jsme se snažili omezit jejich rychlým zamrazením ponořením do kapalného dusíku před jejich uskladněním v mrazáku. Z hlediska obecného doporučení je však jasné, že opakované zamrazování vzorků nemůže v klinickém výzkumu (při aplikaci různých metod) poskytnout reprodukovatelné výsledky. Proto je vhodné mít vzorky zamražené v řadě alikvotů a použít vždy vzorek pouze po 1. rozmrazení.

Na konec části zabývající se optimalizací podmínek měření byla změřena spektra některých komponent CSF. S jejich pomocí bylo možné identifikovat některé spektrální pásy ve spektrech celkového CSF, avšak cesta snižování komplexnosti spekter pomocí odečtu spekter jednotlivých výrazných komponent se ukázala

neschůdnou pro přílišnou komplexnost systému a nevhodné výsledky při aplikaci metody ortogonálních diferencí.

Následně, po výše zmíněné optimalizaci podmínek měření, jsme mohli přikročit k analýze DCDR spekter. Měřením dialyzovaných vzorků CSF se nepodařilo dosáhnout žádných signifikantních výsledků. To potvrzuje výše zmíněnou domněnku, že se dialýzou ze vzorků odplavily také některé složky moku indikující u pacientů patologický stav. U nedialyzovaných vzorků pacientů trpících RS se podařilo za pomoci shlukové a faktorové analýzy identifikovat signifikantní pás na 1080 cm^{-1} , jehož intenzita nejvýrazněji klesá s progresí nemoci. S jeho pomocí jsme však byli schopni dosáhnout senzitivity pouze kolem 60 %, což je nejspíše dáno nižší reprodukovatelností DCDR měření v této oblasti. Při ověřování reprodukovatelnosti měření totiž právě v intenzitě tohoto pásu docházelo k největším variacím. Je zajímavé si povšimnout, že změny v tomto pásu byly pozorovány i v DCDR spektrech při diagnostikování artrózy ze synoviální tekutiny [Esmonde-White et al., 2009] a při diagnóze Parkinsonovy nemoci pomocí infračervené spektroskopie vyschlého depozitu krevní plazy [Ahmed et al., 2010]. Griebe et al. (2007) určili oblast $900\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ jako signifikantní region při diagnóze AD z CSF pomocí infračervené spektroskopie, v práci však dále bližší podrobnosti o měnících se pásech na tomto intervalu neuvádějí. Možnou interpretaci naší spektrální změny pásu na 1080 cm^{-1} nabízí práce [Xie et al., 2005], kde autoři pomocí DCDR pásů na 980 a 1080 cm^{-1} sledují fosforylaci peptidů, přičemž pás 980 odpovídá $\text{--OPO}_3\text{H}^-$ a 1080 cm^{-1} koresponduje s vibracemi --OPO_3^{2-} skupiny. Podíváme-li se na naše spektra CSF, pak by mohlo jít o vysvětlení diagnostických pásů na 962 a 1080 cm^{-1} . Podobná interpretace diagnostických pásů v této oblasti, tj. vibrace C–O, C–O–P a O=P skupin, je naznačena i v práci [Griebe et al., 2007]. V kontextu výše zmíněných prací je nasnadě vyvozovat souvislost pásu na $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$ s nějakým obecnějším jevem, provázejícím mnoho různých nemocí a projevujícím se i v jiných tělních tekutinách, než v CSF. Velmi důležité je, že tento jev pravděpodobně souvisí se změnami v jiných složkách než pouze proteínových, protože takovýto pás se v proteinech běžně nevyskytuje a jeho změnami není příliš postiženo spektrum v oblastech připisovaných vibracím proteinové páteře a dominantních postranních řetězců. Navíc navržená interpretace související s fosforylací proteinů či obecně s nárůstem OPO_3 skupin ve vzorku CSF je v souladu s možnou biochemickou představou, že prostřednictvím těchto pásů sledujeme spíše nějakou formu zánětlivého procesu v těle pacienta, než konkrétní chorobu.

Při výzkumu AD v této práci byly kromě změn na výše zmíněné oblasti také pozorovány mnohem komplexnější změny na intervalu $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$. Největších změn zde doznala oblast $1530\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$, ve které se objevují pásy vibrací postranních řetězců různých aminokyselin a dále pak došlo k nárůstu intenzity v oblasti amidu III na 1249 cm^{-1} , který pravděpodobně signalizuje nárůst struktury β -skládaného listu v proteinech mozkomíšního moku. Při tomto měření bylo dosaženo 100% senzitivity a 80% specificity. Tato čísla však nejsou příliš směrodatná vzhledem k tomu, že měření proběhlo pouze na souboru pěti pacientů trpících AD a pěti kontrolních zdravých pacientů ve stejné věkové kategorii oproti jiným pracím, kde Griebe et al. (2007) analyzovali spektra mozkomíšního moku 71 pacientů postižených AD a 66 zdravých pacientů s 88,5% senzitivitou a 80 % specificitou, Peuchant et al. (2008) vykázali přesnost v rozlišení spekter krevního séra se senzitivitou 100 % a specificitou 96,7 % na 25 nemocných a 76 zdravých

pacientech a Burns et al. (2009) rozdělili 17 zdravých pacientů od 19 nemocných na základě infračervené absorpční spektroskopie taktéž na krevním séru s 77% senzitivitou a 80% specificitou. (Všechny tyto práce však byly prováděny pomocí infračervené absorpční spektroskopie.) Abychom tedy dokázali lépe určit senzitivitu a specificitu naší metodiky, bylo by třeba změřit rozsáhlejší sérii vzorků, což však s ohledem na časové možnosti, nebylo možné v rámci diplomové práce provést. Přesto můžeme v kontextu našich výsledků a výsledků práce [Griebe et al., 2007], které byly měřeny na vzorcích mozkomíšního moku tvrdit, že specificity a senzitivity blíží se 100 %, které jsou uvedené v pracích [Peuchant et al., 2008] a [Ahmed et al., 2010] a které byly získané při výzkumu neurodegenerativní choroby z krevního séra, jsou velmi nadhodnocené a autoři detekují spíše, než specifické změny způsobené zkoumanými nemocemi, jakési obecnější patologické změny v organizmu.

Soubor pacientů trpících AD byl také proměřen na $2200\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$, na kterém byly zařazeny všechny vzorky do správných kategorií, kromě jednoho zdravého, který se objevil ve skupině nemocných a který byl chybně určen jako nemocný i analýzou na nižších frekvencích. Nejsignifikantnější změny zde byly na intervalu $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$. Změny v tomto intervalu jsou při diagnóze AD popsány taktéž v práci [Griebe et al., 2007] v infračervených absorpčních spektrech, kde však není diskutována síla jejich vlivu na diagnózu.

Nakonec byl v této práci prozkoumán celý soubor vzorků, obsahujících zdravé mladé pacienty, pacienty trpící roztroušenou sklerózou, zdravé staré pacienty a pacienty postižené AD, přičemž se ukázalo, že lze od sebe spektrálně rozlišit všechny 4 skupiny a že i při aplikaci na celý datový soubor získáme z faktorové analýzy rozlišení na základě stejných spektrálních jevů, jaké byly popsány výše pro řešení samostatných případů. Stárnutí pacientů bylo ve spektrech dobře pozorovatelné, což je v rozporu s prací [Griebe et al., 2007], kde pro výzkum diagnózy AD použili kontrolní skupinu zdravých pacientů, která byla v průměru o 16 let mladší než skupina pacientů nemocných, což nepochybně virtuálně zvýšilo senzitivitu metody avšak je to zcela v rozporu s klinickou praxí, kdy bude třeba tuto diagnostiku provádět především u starších pacientů.

Kapitola 5

Závěr

Na začátku této práce byla vyřešena metodika měření mozkomíšního moku metodou DCDR. DCDR vzorky mozkomíšního moku totiž prorůstaly různé krystaly solí a měření z různých míst depozitu byla velmi variabilní. V této práci bylo ukázáno, že mikrodialýza kromě zlepšení reprodukovatelnosti měření také odstraňuje ze vzorků některé jejich složky náchylné k degradaci, a proto ji není vhodné použít, pokud jsou ve vzorcích hledány patologické změny. Reprodukovatelnost výsledků také není vhodné zvyšovat vybělováním DCDR vzorků mozkomíšního moku, protože v nich byly pozorovány změny indukované dopadajícím excitačním laserovým svazkem. Zato měření spektrálních map, kdy se ve vzorku zvolila matice 10×10 bodů s roztečí $2 \mu\text{m}$ vedlo k výraznému zlepšení reprodukovatelnosti.

Kromě základní metodiky měření DCDR spekter mozkomíšního moku bylo také zkoumáno, za jakých podmínek je nejlepší skladovat depozity vzorků mozkomíšního moku. Již dříve bylo zjištěno [Rosová, 2008], že v DCDR spektrech mozkomíšního moku jsou pozorovatelné změny již třech nechání DCDR vzorku na pokojové teplotě. V této práci bylo ukázáno, že degradaci je možné velmi zpomalit (nepozorovali jsme žádné velké spektrální změny ani po sedmi dnech), pokud vzorky budou skladované za nižší teploty. V tomto případě je však třeba vzorky uchovávat v exikátoru, protože při přechodu z chladnějšího prostředí do teplejšího se na DCDR substrátech sráží vzdušná vlhkost, což proces degradace DCDR vzorků naopak velmi urychluje.

Dále byla také zkoumána rychlost degradace mozkomíšního moku na pokojové teplotě a vlivem zamrazování. Na pokojové teplotě docházelo k celkovým spektrálním změnám ve vzorcích s jistotou již po pěti hodinách. Změny způsobené zamrazením vzorků byly také ve spektrech dobře pozorovatelné. V obou případech docházelo k úbytku intenzity v pásu amidu I na 1660 cm^{-1} , který pravděpodobně odpovídá úbytku α -helikálních struktur v proteinové části vzorků.

Vyjasněním metodiky měření a nakládání se vzorky byla připravena cesta k vývoji nové metody pro diagnostiku neurodegenerativních chorob. V této práci bylo ukázáno, že pacienty trpící roztroušenou sklerózou lze odlišit od zdravých pacientů na základě snížení intenzity pásu na 1080 cm^{-1} . Také však bylo ukázáno, že právě intenzita tohoto pásu není příliš reprodukovatelná, což snížilo účinnost nově vyvíjené metody. Velmi zajímavý však je poznatek, že tento pás pravděpodobně nepřísluší proteinům, které jsou v mozkomíšním moku zastoupené a ve kterých bylo předpokládáno, že budou zřetelné patologické změny způsobené chorobou. Navíc bylo ukázáno, že intenzita tohoto pásu se také snižuje v případě pacientů

trpících Alzheimerovou nemocí. V tomto kontextu lze tento pás považovat za projev obecnějších patologických procesů v organismu. Spektrální změny u pacientů trpících Alzheimerovou nemocí však byly komplexnější a kromě výše zmíněného pásu se také projevovaly na pásech v oblasti $1200\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ a $2870\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ a skutečně tak odrážely různé zastoupení proteinů, či jejich rozdílnou konformaci v CSF při patologických stavech.

Vyvíjená metoda byla schopná od sebe spektrálně odlišit nejenom zdravé a nemocné pacienty, ale dokonce se ve spektrech projevoval i vliv věku zdravých pacientů.

Tato práce ověřila, že DCDR je vhodná metoda pro diagnózu neurodegenerativních chorob a našla takové podmínky měření, které jsou akceptovatelné i pro běžnou medicínskou praxi. Další rozšíření referenčních měření DCDR spekter tak může námi vytvořenou metodiku dovést až do klinické praxe, kde může sloužit jako pomocná metoda v předběžné diagnostice pacientů s neurodegenerativními onemocněními.

Literatura

- Ahmed, S. et al. (2010): *Neural network algorithm for the early detection of Parkinson's disease from blood plasma by FTIR micro-spectroscopy*. Vib. Spectrosc. **53**(2), 181–188. doi:10.1016/j.vibspec.2010.01.019.
- Amaldi a Placzek (1932): *Über das Ramanspektrum des gasförmigen Ammoniaks*. Naturwiss. **20**, 521.
- Arnold, M. A. a Small, G. W. (1990): *Determination of physiological levels of glucose in an aqueous matrix with digitally filtered fourier-transform near-infrared spectra*. Anal. Chem. **62**(14), 1457–1464.
- Backhaus, J. et al. (2010): *Diagnosis of breast cancer with infrared spectroscopy from serum samples*. Vib. Spectrosc. **52**(2), 173–177. doi:10.1016/j.vibspec.2010.01.013.
- Baker, M. J. et al. (2009): *Investigating FTIR based histopathology for the diagnosis of prostate cancer*. J. Biophotonics **2**(1-2), 104–113. doi:10.1002/jbio.200810062.
- Banerjee, H. N. a Zhang, L. (2007): *Deciphering the finger prints of brain cancer astrocytoma in comparison to astrocytes by using near infrared Raman spectroscopy*. Mol. Cell. Biochem. **295**(1-2), 237–240. doi:10.1007/s11010-006-9278-4.
- Bartoš, A. a Hasalíková, M., *Poznejte demenci správně a včas – příručka pro klinickou praxi*. Mladá fronta, 2010.
- Bartoš, A. a Pišha, J. (2004): *Roztroušená skleróza*. Causa Subita **7**(2), 41–44.
- Berger, A. J., Itzkan, I. a Feld, M. S. (1997): *Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared Raman spectroscopy*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. **53**(2), 287–292.
- Berger, A. J. et al. (1999): *Multicomponent blood analysis by near-infrared Raman spectroscopy*. Appl. Opt. **38**(13), 2916–2926.
- Buerger, K. et al. (2006): *CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease*. Brain **129**, 3035–3041.
- Burns, D. H. et al. (2009): *Near-Infrared Spectroscopy of Blood Plasma for Diagnosis of Sporadic Alzheimer's Disease*. J. Alzheimers Dis. **17**(2), 391–397. doi:10.3233/jad-2009-1053.
- Caspers, P. J., Lucassen, G. W. a Puppels, G. J. (2003): *Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin*. Biophys. J. **85**(1), 572–580.

- Caspers, P. J. et al. (2001): *In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: Noninvasive determination of molecular concentration profiles*. J. Invest. Dermatol. **116**(3), 434–442.
- Choo, R. E. a Huestis, M. A. (2004): *Oral fluid as a diagnostic tool*. Clin. Chem. Lab. Med. **42**(11), 1273–1287. doi:10.1515/cclm.2004.248.
- Cipriani, P. a Ben-Amotz, D. (2005): *Characterization of select members of the Taxane family using Raman spectroscopy*. J. Raman. Spectrosc. **36**(11), 1052–1058. doi:10.1002/jrs.1405.
- Clark, C. M. et al. (2003): *Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid – How well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses?* Arch. Neurol. **60**(12), 1696–1702. ISSN 0003-9942.
- Conti, C. et al. (2009): *Microimaging FTIR of Head and Neck Tumors. IV*. Microsc. Res. Tech. **72**(2), 67–75. doi:10.1002/jemt.20644.
- Český statistický úřad (1. 1. 2011): URL <<http://czso.cz>>.
- Das, G. et al. (2008): *Attomole (amol) myoglobin Raman detection from plasmonic nanostructures*. Microelectron. Eng. **85**(5-6), 1282–1285. doi:10.1016/j.mee.2007.12.082.
- Deegan, R. D. et al. (1997): *Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops*. Nature **389**(6653), 827–829.
- Diem, M., Griffiths, P. R. a Chalmers, J. M., ed., *Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2008.
- Djaoued, Y., Balaji, S. a Priya, S. (2007): *Non-resonance micro-Raman spectroscopic studies on crystalline domoic acid and its aqueous solutions*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. **67**(5), 1362–1369. doi:10.1016/j.saa.2006.10.025.
- Dou, X. et al. (1996): *Quantitative analysis of metabolites in urine using a highly precise, compact near-infrared Raman spectrometer*. Vib. Spectrosc. **13**(1), 83–89.
- Dou, X. M. et al. (1997a): *Quantitative analysis of metabolites in urine by anti-Stokes Raman spectroscopy*. Biospectroscopy **3**(2), 113–120.
- Dou, X. M. et al. (1997b): *A highly sensitive, compact Raman system without a spectrometer for quantitative analysis of biological samples*. Vib. Spectrosc. **14**(2), 199–205.
- Esmonde-White, K. A. et al. (2009): *Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis*. J. Biomed. Opt. **14**(3). doi:03401310.1117/1.3130338.
- Ettrich, R. et al. (2002): *Study of chaperone-like activity of human haptoglobin: Conformational changes under heat shock conditions and localization of interaction sites*. Biological Chemistry **383**(10), 1667–1676.

- Eysel, H. H. et al. (1997): *A novel diagnostic test for arthritis: Multivariate analysis of infrared spectra of synovial fluid*. *Biospectroscopy* **3**(2), 161–167.
- Farquharson, S. et al., *Urinalysis by surface-enhanced Raman spectroscopy*. V M. S. ElGenk, ed., *Space Technology and Applications International Forum, Pts 1 and 2*, roč. 504, s. 306–311. IOP Publisher LTD, 2000.
- Farquharson, S. et al. (2005): *Detection of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Vib. Spectrosc.* **38**(1-2), 79–84. doi:10.1016/j.vibspec.2005.02.021.
- Fendel, S. a Schrader, B. (1998): *Investigation of skin and skin lesions by NIR-FT-Raman spectroscopy*. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **360**(5), 609–613.
- Filik, J. a Stone, N. (2007): *Drop coating deposition Raman spectroscopy of protein mixtures*. *Analyst* **132**(6), 544–550. doi:10.1039/b701541k.
- Filik, J. a Stone, N. (2008): *Analysis of human tear fluid by Raman spectroscopy*. *Anal. Chim. Acta* **616**(2), 177–184. doi:10.1016/j.aca.2008.04.036.
- Filik, J. a Stone, N. (2009): *Investigation into the protein composition of human tear fluid using centrifugal filters and drop coating deposition Raman spectroscopy*. *J. Raman. Spectrosc.* **40**(2), 218–224. doi:10.1002/jrs.2113.
- Forlenza, O. V., Diniz, B. S. a Gattaz, W. F. (2010): *Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease*. *BMC Med.* **8**.
- Fukumoto, H. et al. (2010): *High-molecular-weight beta-amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients*. *FASEB J.* **24**(8), 2716–2726.
- Ginzburg, V. L. (2011): *Proč sovětští vědci nezískali všechny zasloužené Nobelovy ceny*. *Čs. čas. fyz.* **61**, 35.
- Gniadecka, M. et al. (1997): *Diagnosis of basal cell carcinoma by Raman spectroscopy*. *J. Raman. Spectrosc.* **28**(2–3), 125–129.
- Greve, T. M., Andersen, K. B. a Nielsen, O. F. (2008): *ATR-FTIR, FT-NIR and near-FT-Raman spectroscopic studies of molecular composition in human skin in vivo and pig ear skin in vitro*. *Spectr. Int. J.* **22**(6), 437–457. doi:10.3233/spe-2008-0365.
- Griebe, M. et al. (2007): *Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease*. *Neurosci. Lett.* **420**(1), 29–33. doi:10.1016/j.neulet.2007.03.075.
- Gryniewicz, C. M. a Kauffman, J. F. (2008): *Multivariate calibration of covalent aggregate fraction to the Raman spectrum of regular human insulin*. *J. Pharm. Sci.* **97**(9), 3727–3734. doi:10.1002/jps.21326.
- Guimaraes, A. E. et al. (2006): *Near infrared Raman spectroscopy (NIRS): A technique for doping control*. *Spectr. – Int. J.* **20**(4), 185–194.
- Hall, J. W. a Pollard, A. (1992): *Near-infrared spectrophotometry – A new dimension in clinical chemistry*. *Clin. Chem.* **38**(9), 1623–1631.

- Havrdová, E. (2008): *Roztroušená skleróza*. Cesk. Slov. Neurol. N. **71/104**, 121–132.
- Hebák, P. a Hustopecký, J., *Vícerozměrné statistické metody s aplikacemi*. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha, 1987.
- Heise, H. M. et al. (1994): *Multicomponent assay for blood substrates in human plasma by mid-infrared spectroscopy and its evaluation for clinical analysis*. Appl. Spectrosc. **48**(1), 85–95.
- Heise, H. M. et al. (2001): *Multivariate calibration for the determination of analytes in urine using mid-infrared attenuated total reflection spectroscopy*. Appl. Spectrosc. **55**(4), 434–443.
- Hernandez, F. a Avila, J. (2007): *Tauopathies*. Cell. Mol. Life Sci. **64**(17), 2219–2233.
- Hirschfeld, T. a Chase, B. (1986): *FT-Raman spectroscopy - Development and justification*. Appl. Spectrosc. **40**(2), 133–137.
- Hu, H. a Larson, R. G. (2002): *Evaporation of a sessile droplet on a substrate*. J. Phys. Chem. B **106**(6), 1334–1344. doi:10.1021/jp0118322.
- Hu, H. a Larson, R. G. (2005): *Analysis of the effects of Marangoni stresses on the microflow in an evaporating sessile droplet*. Langmuir **21**(9), 3972–3980. doi:10.1021/la0475270.
- Hu, H. a Larson, R. G. (2006): *Marangoni effect reverses coffee-ring depositions*. J. Phys. Chem. B **110**(14), 7090–7094. doi:10.1021/jp0609232.
- Isaksson, H. et al. (2010): *Infrared Spectroscopy Indicates Altered Bone Turnover and Remodeling Activity in Renal Osteodystrophy*. J. Bone Miner. Res. **25**(6), 1360–1366. doi:10.1002/jbmr.10.
- Kah, J. C. Y. et al. (2007): *Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles*. Int. J. Nanomedicine **2**(4), 785–798.
- Kaiser, E. et al. (2007): *Influence of delayed CSF storage on concentrations of phospho-tau protein (181), total tau protein and beta-amyloid (1–42)*. Neurosci. Lett. **417**(2), 193–195. doi:10.1016/j.neulet.2007.02.045.
- Kim, Y. J., Hahn, S. a Yoon, G. (2003): *Determination of glucose in whole blood samples by mid-infrared spectroscopy*. Appl. Opt. **42**(4), 745–749.
- Koljenovic, S. et al. (2005): *Tissue characterization using high wave number Raman spectroscopy*. J. Biomed. Opt. **10**(3), –. doi:031116.
- Kopecký, V. a Baumruk, V. (2006): *Structure of the ring in drop coating deposited proteins and its implication for Raman spectroscopy of biomolecules*. Vib. Spectrosc. **42**(2), 184–187. doi:10.1016/j.vibspec.2006.04.019.
- Krafft, C. a Sergo, V. (2006): *Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues*. Spectr. – Int. J. **20**(5–6), 195–218.

- Krafft, C. et al. (2006): *Identification of primary tumors of brain metastases by SIMCA classification of IR spectroscopic images*. BBA. Biomembranes **1758**(7), 883–891. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.001.
- Krishnakumar, N. et al., *FT-IR Spectroscopic Analysis of Normal and Malignant Human Oral Tissues*. In V. K. Vaidyan a V. S. Jayakumar, ed., *Perspectives in Vibrational Spectroscopy*, roč. 1075, s. 149–151. Amer. Inst. Physics, Melville, 2008.
- Lambert, J. L., Pelletier, C. C. a Borchert, M. (2005): *Glucose determination in human aqueous humor with Raman spectroscopy*. J. Biomed. Opt. **10**(3).
- Landsberg, G. S. a Mandelstam, L. I. (1928): *Eine neue Erscheinung bei der Lichtzertreuung*. Naturwiss. **16**, 557.
- Lash, P. a Kneipp, J., ed., *Biomedical vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2008.
- Lee, S. Y. et al. (2009): *Infrared spectroscopy characterization of normal and lung cancer cells originated from epithelium*. J. Vet. Sci. **10**(4), 299–304. doi: 10.4142/jvs.2009.10.4.299.
- LeVine, S. M. a Wetzell, D. L. (1998): *Chemical analysis of multiple sclerosis lesions by FT-IR microspectroscopy*. Free Radic. Biol. Med. **25**(1), 33–41.
- Liu, K. Z., Dembinski, T. C. a Mantsch, H. H. (1998): *Prediction of RDS from amniotic fluid analysis: A comparison of the prognostic value of TLC and infra-red spectroscopy*. Prenat. Diagn. **18**(12), 1267–1275.
- Liu, K. Z. a Mantsch, H. H. (1999): *Simultaneous quantitation from infrared spectra of glucose concentrations, lactate concentrations, and lecithin/sphingomyelin ratios in amniotic fluid*. Am. J. Obstet. Gynecol. **180**(3), 696–702.
- Liu, K. Z. et al. (2000): *Comparison of infrared spectroscopic and fluorescence depolarization assays for fetal lung maturity*. Am. J. Obstet. Gynecol. **183**(1), 181–187.
- Liu, K. Z. et al. (2002): *Reagent-free, simultaneous determination of serum cholesterol in HDL and LDL by infrared spectroscopy*. Clin. Chem. **48**(3), 499–506.
- Liu, K. Z. et al. (2003): *Infrared spectroscopic identification of beta-thalassemia*. Clin. Chem. **49**(7), 1125–1132.
- Liu, K. Z. et al. (2007): *Quantification of serum apolipoprotein B by infrared spectroscopy*. Anal. Bioanal. Chem. **387**(5), 1809–1814. doi:10.1007/s00216-006-0895-2.
- Long, D. A., *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley & Sons, 2002.
- Low-Ying, S. et al. (2002): *Quantitation of glucose and urea in whole blood by mid-infrared spectroscopy of dry films*. Vib. Spectrosc. **28**(1), 111–116.

- Lublin, F. D. a Reingold, S. C. (1996): *Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey*. *Neurology* **46**(4), 907–911.
- Masopust, J. (1.1.2011): *Klinická biochemie*. URL <<http://lekarny.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fuvod%2Fuvod.htm>>.
- Matousek, P. et al. (2006): *Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo*. *Appl. Spectrosc.* **60**(7), 758–763.
- Mattsson, N., Blennow, K. a Zetterberg, H. (2010): *Inter-laboratory variation in cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: united we stand, divided we fall*. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**(5), 603–607.
- McDonald, W. I. et al. (2001): *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. *Ann. Neurol.* **50**(1), 121–127.
- McKhann, G. et al. (1984): *Clinical-diagnosis of Alzheimers-disease – report of the MINCDS–ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer disease*. *Neurology* **34**(7), 939–944.
- Moger, J. et al. (2007): *Feasibility study using surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of tyrosine and serine phosphorylation*. *Biochim. Biophys. Acta. – Gen. Subj.* **1770**(6), 912–918. doi:10.1016/j.bbagen.2007.01.018.
- Moreno, M. et al. (2010): *Raman spectroscopy study of breast disease*. *Theor. Chem. Acc.* **125**(3-6), 329–334. doi:10.1007/s00214-009-0698-6.
- Nikulin, A. E. et al. (1998): *Near-optimal region selection for feature space reduction: novel preprocessing methods for classifying MR spectra*. *NMR Biomed.* **11**(4-5), 209–216.
- Ohnishi, S. a Takano, K. (2004): *Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding*. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(5), 511–524.
- Ortiz, C. et al. (2004): *Identification of insulin variants using Raman spectroscopy*. *Anal. Biochem.* **332**(2), 245–252. doi:10.1016/j.ab.2004.06.013.
- Ortiz, C. et al. (2006): *Validation of the drop coating deposition Raman method for protein analysis*. *Anal. Biochem.* **353**(2), 157–166. doi:10.1016/j.ab.2006.03.025.
- Ortiz, C. et al. (2007): *Analysis of insulin amyloid fibrils by Raman spectroscopy*. *Biophys. Chem.* **128**(2–3), 150–155. doi:10.1016/j.bpc.2007.03.012.
- Overman, S. A. a Thomas, G. J. (1999): *Raman markers of nonaromatic side chains in an alpha-helix assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage fd subunits*. *Biochemistry* **38**(13), 4018–4027.
- Park, C. et al. (2007): *Classification of glucose concentration in diluted urine using the low-resolution Raman spectroscopy and kernel optimization methods*. *Physiol. Meas.* **28**(5), 583–593. doi:10.1088/0967-3334/28/5/011.

- Patil, C. A. et al. (2011): *A clinical instrument for combined Raman spectroscopy – optical coherence tomography of skin cancers*. *Lasers. Surg. Med.* **43**(2), 143–151. doi:10.1002/lsm.21041.
- Petrich, W. (2001): *Mid-infrared and Raman spectroscopy for medical diagnostics*. *Appl. Spectrosc. Rev.* **36**(2–3), 181–237.
- Petrich, W. et al. (2002): *Correlation between the state of health of blood donors and the corresponding mid-infrared spectra of the serum*. *Vib. Spectrosc.* **28**(1), 117–129.
- Peuchant, E. et al. (2008): *Infrared spectroscopy: a reagent-free method to distinguish Alzheimer's disease patients from normal-aging subjects*. *Transl. Res.* **152**(3), 103–112. doi:10.1016/j.trsl.2008.05.009.
- Pichardo-Molina, J. L. et al. (2007): *Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients*. *Lasers. Med. Sci.* **22**(4), 229–236. doi:10.1007/s10103-006-0432-8.
- Placzek, G. a Teller, E. (1933): *Die Rotationsstruktur der Ramanbanden mehratomiger Moleküle*. *Z. Phys.* **81**(3–4), 209–258.
- Poser, C. M. et al. (1983): *New diagnostic-criteria for multiple-sclerosis – guidelines for research protocols*. *Ann. Neurol.* **13**(3), 227–231.
- Qi, D. H. a Berger, A. J. (2007): *Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy*. *Appl. Opt.* **46**(10), 1726–1734.
- Racek, J., *Klinická biochemie*. Galén, Praha, 1999.
- Raman, C. V. (1928): *A new Radiation*. *Ind. J. Phys.* **2**, 387–398.
- Raman, C. V. a Krishnan, K. S. (1928): *A new type of secondary radiation*. *Nature* **121**, 501–502.
- Ramser, K. et al. (2004): *Resonance Raman spectroscopy of optically trapped functional erythrocytes*. *J. Biomed. Opt.* **9**(3), 593–600.
- Reiber, H. (2001): *Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid*. *Clin. Chim. Acta* **310**(2), 173–186.
- Rohleder, D., Kiefer, W. a Petrich, W. (2004): *Quantitative analysis of serum and serum ultrafiltrate by means of Raman spectroscopy*. *Analyst* **129**(10), 906–911. doi:10.1039/b408927h.
- Rohleder, D. a Petrich, W., *Raman spectroscopy of Biofluids*. In *Biomedical vibrational spectroscopy*, s. 105–120. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2008.
- Rosová, N. (2008): *Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (DCDR) tělních tekutin*. Bakalářská práce, Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

- Saade, J. et al. (2008): *Identification of hepatitis C in human blood serum by near-infrared Raman spectroscopy*. Spectr. – Int. J. **22**(5), 387–395. doi:10.3233/spe-2008-0344.
- Sakudo, A. et al. (2005): *A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy*. Microbiol. Immunol. **49**(7), 695–701.
- Savino, R., Paterna, D. a Favalaro, N. (2002): *Buoyancy and Marangoni effects in an evaporating drop*. J. Thermophys. Heat Transf. **16**(4), 562–574.
- Savitzky, A. a Golay, M. J. E. (1964): *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*. Anal. Chem. **36**(8), 1627–1639.
- Schrader, B. et al. (1999): *NIR Raman spectroscopy in medicine and biology: results and aspects*. J. Mol. Struct. **481**, 21–32.
- Sharma, S. K. et al., *In-vitro micro-Raman study of tissue samples for detecting cervical and ovarian cancer with 785-nm laser excitation*. V B. M. Cullum, D. M. Porterfield a K. S. Booksh, ed., *Smart Biomedical and Physiological Sensor Technologies VII*, roč. 7674. SPIE–Int. Soc. Optical Engineering, Bellingham, 2010. doi:76740i10.1117/12.849613.
- Shaw, R. A. a Mantsch, H. H. (2000): *Multianalyte serum assays from mid-IR spectra of dry films on glass slides*. Appl. Spectrosc. **54**(6), 885–889.
- Shaw, R. A. et al. (1995): *Arthritis diagnosis based upon the near infrared spectrum of synovial fluid*. Rheumatol. Int. **15**(4), 159–165.
- Shaw, R. A. et al. (1996): *Quantitation of protein, creatinine, and urea in urine by near-infrared spectroscopy*. Clin. Biochem. **29**(1), 11–19.
- Shaw, R. A. et al. (1998): *Infrared spectroscopic analysis of biomedical specimens using glass substrates*. Anal. Biochem. **259**(2), 181–186.
- Shaw, R. A. et al. (2000): *Toward reagent-free clinical analysis: Quantitation of urine urea, creatinine, and total protein from the mid-infrared spectra of dried urine films*. Clin. Chem. **46**(9), 1493–1495.
- Shen, Y. C. et al. (2003): *The use of Fourier-transform infrared spectroscopy for the quantitative determination of glucose concentration in whole blood*. Phys. Med. Biol. **48**(13), 2023–2032.
- Smekal, A. (1923): *Zur Quantentheorie der Dispersion*. Naturwiss. **43**, 873–875.
- Staib, A. et al. (2001): *Disease pattern recognition testing for rheumatoid arthritis using infrared spectra of human serum*. Clin. Chim. Acta **308**(1-2), 79–89.
- Šípová, H. (2006): *Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech*. Bakalářská práce, Fyzikální ústav Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

- Tapiola, T. et al. (2009): *Cerebrospinal fluid beta-amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain*. Arch. Neurol. **66**(3), 382–389.
- Tarnowski, C. P., Ignelzi, M. A. a Morris, M. D. (2002): *Mineralization of developing mouse calvaria as revealed by Raman microspectroscopy*. J. Bone Miner. Res. **17**(6), 1118–1126.
- Tarnowski, C. P. et al. (2004): *Earliest mineral and matrix changes in force-induced musculoskeletal disease as revealed by Raman microspectroscopic imaging*. J. Bone Miner. Res. **19**(1), 64–71. doi:10.1359/jbmr.0301201.
- Teh, S. K. et al. (2009): *Near-infrared Raman spectroscopy for gastric precancer diagnosis*. J. Raman. Spectrosc. **40**(8), 908–914. doi:10.1002/jrs.2197.
- Tensmeyer, L. G. a Kauffman, E. W., Jr., *Protein structure as revealed by nonresonance Raman spectroscopy*. In H. A. Havel, ed., *Spectroscopic Methods for Determining Protein Structure in Solution*, s. 69–95. VCH Publishers, New York, 1996.
- Trachta, G. et al. (2004): *Combination of high-performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine*. J. Mol. Struct. **693**(1-3), 175–185. doi:10.1016/j.molstruc.2004.02.034.
- Uttinger, U. et al. (2001): *Near-infrared Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical precancers*. Appl. Spectrosc. **55**(8), 955–959.
- Wall, M. E., Rechtsteiner, A. a Rocha, L. M., *Singular value decomposition and principal component analysis*. V D. P. Berrar, W. Dubitzky a G. Martin, ed., *A Practical Approach to Microarray Data Analysis*, s. 91–109. Kluwer, Norwell, MA, 2003.
- Welzel, A. T. a Walsh, D. M. (2011): *Aberrant protein structure and diseases of the brain*. Ir. J. Med. Sci. **180**(1), 15–22.
- Wikipedia, 1. 1. 2011 (): *Wikipedia, the free encyclopedia*. URL <<http://en.wikipedia.org/>>.
- Williams, R. W. (1986): *Protein secondary structure-analysis using Raman amide I and amide III spectra*. Meth. Enzymol. **130**, 311–331.
- Xie, Y., Jiang, Y. a Ben-Amotz, D. (2005): *Detection of amino acid and peptide phosphate protonation using Raman spectroscopy*. Anal. Biochem. **343**(2), 223–230. doi:10.1016/j.ab.2005.05.038.
- Xie, Y., Zhang, D. a Ben-Arnatz, D. (2008): *Protein-ligand binding detected using ultrafiltration Raman difference spectroscopy*. Anal. Biochem. **373**(1), 154–160. doi:10.1016/j.ab.2007.10.040.
- Xie, Y. et al. (2004): *The Raman detection of peptide tyrosine phosphorylation*. Anal. Biochem. **332**(1), 116–121. doi:10.1016/j.ab.2004.05.052.

- Yin, Y. I. et al. (2007): *Gamma-secretase substrate concentration modulates the A beta 42/A beta 40 ratio*. J. Biol. Chem. **282**(32), 23639–23644.
- Zhang, D. M. et al. (2003): *Raman detection of proteomic analytes*. Anal. Chem. **75**(21), 5703–5709.
- Zhang, D. M. et al. (2004): *Chemical segregation and reduction of Raman background interference using drop coating deposition*. Appl. Spectrosc. **58**(8), 929–933.
- Zhang, D. M. et al. (2005): *Detection of the site of phosphorylation in a peptide using Raman spectroscopy and partial least squares discriminant analysis*. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. **61**(3), 471–475. doi: 10.1016/j.saa.2004.04.019.
- Zhang, D. M. et al. (2009): *Ratiometric Raman spectroscopy for quantification of protein oxidative damage*. Anal. Biochem. **391**(2), 121–126. doi:10.1016/j.ab.2009.05.019.
- Zhang, G. K. L. et al., *Interplay of univariate and multivariate analysis in vibrational microscopic imaging of mineralized tissue and skin*. V *Biomedical vibrational spectroscopy*, s. 357–378. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2008.

Seznam zkratek

- ANN umělé neuronové sítě (z angl. artificial neuronal network)
- AD Alzheimerova nemoc (z angl. Alzheimer's disease)
- A β amyloid β
- A β_{42} amyloid β o 42 aminokyselinách, který je nejvíce náchylný k tvorbě plaků
- CA shluková analýzy (z angl. cluster analysis)
- CNS centrální nervová soustava
- CSF mozkomíšní mok (z angl. cerebrospinal fluid)
- DCDR . . . Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (z angl. Drop coating deposition Raman)
- ELISA . . . enzyme linked imuno sorbent assay
- NIR blízká infračervená oblast (z angl. near infrared)
- PCA analýza hlavních komponent (z angl. principal component analysis)
- RS roztroušená skleróza
- SERS povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (z angl. surface enhanced Raman spectroscopy)
- SIMCA . . . soft independent modeling of class analogies
- SVD rozklad na singulární čísla (z angl. singular value decomposition)

Seznam tabulek

1.1	Složení mozkomíšního moku	4
2.1	Věkový profil pacientů a profil zastoupení jednotlivých pohlaví . .	29
3.1	Shrnutí dob dialýzy vzorků	42
3.2	Počet významných faktorů v závislosti na době dialýzy	42
3.3	Faktorová dimenze před a po vybělení	52
3.4	Poměry signál/šum	77
3.5	Délka degradace vzorku při pokojové teplotě	80
3.6	Přiřazení pásů ve spektru mozkomíšního moku	92

Přílohy

- *Spikie* – program na odečítání ostrých pásů ze spekter, který byl napsán v rámci této diplomové práce v prostředí Matlab za použití Signal Processing Toolbox™ (The Mathworks, Natick, MA, USA), je umístěn na přiloženém CD, na kterém k němu jsou k dispozici stručný manuál, zdrojový kód, spustitelný soubor a program umožňující běh aplikace i na počítačích, na kterých není nainstalován Matlab.
- *PCAvie*w – program na zobrazování dvou faktorových skóre vůči sobě, který byl napsán v rámci této diplomové práce v prostředí Matlab za použití Signal Processing Toolbox™ (The Mathworks, Natick, MA, USA), je umístěn na přiloženém CD, na kterém k němu jsou k dispozici stručný manuál, zdrojový kód, spustitelný soubor a program umožňující běh aplikace i na počítačích, na kterých není nainstalován Matlab.